

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BAZI ENGİNARLARIN (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* ÇOĞALTIMI, KALLUS
VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ YARDIMIYLA ELİSİTÖR
KULLANIMININ SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN TESPİTİ**

Tuğçe ÖZSAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ARALIK 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BAZI ENGİNARLARIN (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* ÇOĞALTIMI, KALLUS
VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ YARDIMIYLA ELİSİTÖR
KULLANIMININ SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN TESPİTİ**

Tuğçe ÖZSAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ARALIK 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ENGİNARLARIN (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* ÇOĞALTIMI, KALLUS
VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ YARDIMIYLA ELİSİTÖR
KULLANIMININ SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN TESPİTİ**

**Tuğçe ÖZSAN
BAHÇE BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**Bu tez
T.C. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FDK-2019-4611 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ARALIK 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ENGİNARLARIN (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* ÇOĞALTIMI, KALLUS
VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ YARDIMIYLA ELİSİTÖR
KULLANIMININ SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN TESPİTİ

Tuğçe ÖZSAN

BAHÇE BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 16./12./2019... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / ~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)

Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ece TURHAN

Prof. Dr. Ersin POLAT

ÖZET

BAZI ENGINARLARIN (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* ÇOĞALTIMI, KALLUS VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ YARDIMIYLA ELİSİTÖR KULLANIMININ SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN TESPİTİ

Tuğçe ÖZSAN

Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Aralık 2019; 224 sayfa

Enginar (*Cynara scolymus* L.) *Asteraceae* familyasına ait olup, dünyada çok geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Sahip olduğu biyoaktif bileşenler sayesinde önemini gün geçtikçe arttırmakta olup, fonksiyonel gıda olarak kabul görmektedir. Enginarda doku kültürü çalışmaları pek çok avantaj sunmaktadır. Ancak bu aşamada en önemli problem *in vitro* köklenmedir. Bu problemi aşabilmek amacıyla bu tez çalışması kapsamında, Bayrampaşa ve Sakız enginarları ile Olympus F₁ çeşidi değerlendirmeye alınmıştır. Bu üç çeşitte başarılı bir mikroçoğaltım sürecini takiben *in vitro* köklenme etkinliğinin artırılması amacıyla protokol geliştirilmeye çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda *in vitro* çoğaltım ve *in vitro* köklenme açısından çeşitlerin besi ortamlarına verdikleri tepkilerde farklılıklar olduğu ortaya koyulmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında enginarda *in vitro* kallus oluşumuna yönelik araştırmalar yapılmıştır. Enginarda *in vitro* kallus oluşumunu takiben çeşitler bazında en etkili kallus oluşum besi ortamları belirlenmiş ve hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuştur. Bununla birlikte son yıllarda oldukça ilgi çekici bir konu olan elisitör uygulamalarına yönelik bir araştırma da yapılmıştır. Bu amaçla iki farklı elisitör (metil jasmonat ve kitosan), üçer farklı konsantrasyonda ve üçer farklı sürede uygulanmıştır. Çeşitler arası tepkiler değerlendirildiğinde Olympus F₁ çeşidinin ülkemiz çeşitleri olan Bayrampaşa ve Sakız kadar iyi tepki vermediği tespit edilmiştir. Bayrampaşa ve Sakız için hücre süspansiyon kültürü etkinlikleri değerli bulunmuştur.

Yenilebilir kısmının (başlar) fenolik bileşiklerce zengin olduğu iyi bilinmektedir. Bunun yanı sıra, yaprakları bitki artığı veya atık madde olarak değerlendirilmekte ve ayrıca birçok polifenol içermektedir. Son yıllarda, enginar yapraklarının kullanımı özellikle farmasötik alanda artmış ve birçok bitkisel ilacın aktif maddesi olmuştur. Yaprak morfolojik farklılıklarına dayanarak sekonder metabolitlerin içeriğinde bir değişiklik olup olmadığını ortaya çıkarmak için yapılan bu çalışmada, Bayrampaşa, Sakız ve Olympus F₁ çeşitlerinin yapraklarındaki fenolik bileşikleri ve flavonoidleri ve farklı yaprak yaşlarına göre değişimleri belirlenmiştir. Enginar yaprakları iç ve dış olarak konumlarına göre aylık olarak, 7 ay boyunca (Ekim – Nisan) toplanmış ve enginar yaprağı numuneleri kurutulup öğütüldükten sonra % 80 metanolik ekstraksiyon çözücüsü kullanılarak ekstraksiyon yapılmış ve sonra HPLC-DAD'de kantitatif olarak analiz edilmiştir. Çalışmanın bulguları, çeşitler ile iç ve dış yaprak pozisyonları arasında, ayrıca farklı aylar arasında biyoaktif bileşenlerin içeriği açısından farklılıklar

olduğunu ortaya koymuştur. Çeşitler arasında Sakız enginarının, yaprak pozisyonları değerlendirildiğinde ise i yaprakların biyoaktif bileşenler açısından ön plana çıktığı ve Mart ayının da oldukça ümitvar sayılabileceği bulunmuştur. Bu tez çalışmasının sonuçlarına dayanarak, enginar yaprağının zengin polifenolik profilinin nutrasötik ve farmakolojik uygulamalarda kullanımı için faydalı olabileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: Enginar, Elisitör, Hücre süspansiyon kültürü, *In vitro* köklenme, Kallus kültürü, Kitosan, Mikrooğaltım, Metil jasmonat, Sekonder metabolitler

JRİ: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. ř. şebnem ELLİALTIOğLU

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ece TURHAN

Prof. Dr. Ersin POLAT

ABSTRACT

***IN VITRO* PROPAGATION OF SOME ARTICHOKES (*Cynara scolymus* L.) AND EFFECTS OF SOME ELUCIDIERS ON SECONDARY METABOLITES VIA CALLUS AND CELL SUSPENSION CULTURES**

Tuğçe ÖZSAN

PhD Thesis in Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. A. Naci ONUS

December 2019; 224 pages

Artichoke (*Cynara scolymus* L.) belongs to *Asteraceae* family and is cultivated in a wide area in the world. Thanks to its bioactive components, its importance increases day by day and is accepted as functional food. Artichoke tissue culture studies offer many advantages. However, the most important problem in tissue culture studies is *in vitro* rooting. In order to overcome rooting problem, two artichoke cultivars, Bayrampaşa and Sakız, which are valuable for our country, and Olympus F₁, were evaluated within the scope of this thesis. Following successful micropropagation process in these cultivars, a protocol has been tried to be developed in order to increase *in vitro* rooting efficiency. As a result of the study, micropropagation and *in vitro* rooting showed based on the cultivars and the nutrient media.

In this thesis, *in vitro* callus formation of artichokes was investigated, too. Following the *in vitro* callus formation in artichoke, the most effective callus growth media were determined and cell suspension cultures were established. A research on elicitor applications has also been conducted. For the purpose, two different elicitors (methyl jasmonate and chitosan) were applied in three different concentrations and three different periods. When the reactions between the cultivars were evaluated, it was found that Olympus F₁ did not react as well as Bayrampaşa and Sakız. Cell suspension culture activities were found to be valuable for Bayrampaşa and Sakız.

It is well known that the edible portion (heads) is rich in phenolic compounds. On the other hand, the leaves are considered to be plant waste or waste material and also contain many polyphenols. In recent years, the use of artichoke leaves has increased particularly in the pharmaceutical field and has been the active ingredient of many herbal medicines. In this study, it was aimed to evaluate the phenolic compounds and flavonoids in leaves of Bayrampaşa, Sakız and Olympus F₁ cultivars and their changes according to different leaf ages. To serve this purpose, artichoke leaves were collected on a monthly, internal and external basis during 7 months (October - April), and after artichoke leaf samples were dried and grounded, they were extracted using 80% methanolic extraction solvent and then quantitatively analyzed by HPLC-DAD.

The findings of the study showed that there were differences between cultivars, inner and outer leaf positions, as well as the content of bioactive components between different months. Among the cultivars, Sakız was found to be prominent in terms of bioactive constituents when the leaf positions were evaluated, and March was quite

hopeful. Based on the results of this thesis, it is thought that the rich polyphenolic profile of artichoke leaves may be useful for use in nutraceutical and pharmacological applications.

KEYWORDS: Artichoke, Callus culture, Cell suspension culture, Chitosan, Elicitor, *In vitro* rooting, Micropropagation, Methyl jasmonate, Secondary metabolites

COMMITTEE: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ece TURHAN

Prof. Dr. Ersin POLAT

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın başından sonuna kadar değerli desteğini her zaman hissettiren, beni cesaretlendiren, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla, güler yüzünü ve samimiyetini esirgmeden elinden gelenden fazlasını sunan, gelecekteki akademik hayatımda da bana her anlamda verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Naci ONUS'a teşekkürü bir borç biliyorum, şükranlarımı saygı ve sevgiyle sunuyorum.

Tez İzleme Komitesinde yer alan, değerli bilimsel katkılarıyla çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Kenan TURGUT'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yine Tez İzleme Komitesinde yer alan, her zaman kıymetli yardım ve destekleriyle katkı sağlayan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Ersin POLAT'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez Savunma Jürisinde yer almayı hiç düşünmeden kabul eden, çok değerli bilimsel katkılarıyla desteklerini esirgemeyen, canayakınlığı ve samimiyetini derinden hissettiren çok kıymetli saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na şükranlarımı sunuyorum.

Yine Tez Savunma Jürisinde yer almayı içtenlikle kabul eden, kıymetli vaktini ayırarak çok değerli fikirlerini esirgemeyen, çok kıymetli saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Ece TURHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın *in vitro* çalışmalarımı yürütmem için kapılarını hiç düşünmeden ardına kadar açarak desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli bilim insanı Sayın Prof. Dr. Narin ÜNAL'a ve tüm Güney Agripark firması çalışanlarına en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmamın diğer bir aşaması olan sekonder metabolitler konusundaki analizlerimi yürütmemde hiçbir zaman desteğini unutmamın mümkün olmadığı, çok değerli tecrübelerini ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli arkadaşım Öğr. Gör. Timur TONGUR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın istatistiksel analizlerinin yürütülmesinde desteğini esirgemeyen çok değerli arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Ebru KAYA BAŞAR'a ve çalışmakta olduğu Akdeniz Üniversitesi İstatistik Danışmanlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam boyunca arazi çalışmalarımda hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Burak AKTÜRK'e, Bahçe Bitkileri Bölümü lisansüstü ve lisans öğrencilerimizle birlikte tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmam sırasında da sonsuz anlayışla, manevi desteklerini her zaman üzerimde hissettiren çok kıymetli annem Duygu ÖZSAN ve babam Gürkan ÖZSAN'a minnet borcumun tek bir satırla ifade edilemeyeceğini bilsem de, en derin teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, bu kıymetli mesleği seşmemde içten işe en önemli nedenlerin başında gelen, hayatta olmasalar da her zaman benimle bir olduklarını hissettiğim çok sevgili dedelerim Antalya Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü kurucu mdrllerinden Ziraat Yüksek Mühendisi Bilal ÖZSAN ve Ziraat Donatım Kurumu Antalya Bölge eski mdrllerinden Ziraat Yüksek Mühendisi Nurettin GİRGIN'e ithaf ediyorum.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	6
2.1. Enginarın Sistematikteki Yeri ve Tarihçesi.....	6
2.2. Enginarın Botanik özellikleri	7
2.3. Enginarın Çoğaltılması.....	8
2.4. <i>In vitro</i> çoğaltma çalışmaları.....	9
2.5. Kallus - hücre süspansiyon kültürü ve elisitör uygulamalarına yönelik çalışmalar.....	19
2.6. Sekonder metabolitlere yönelik çalışmalar.....	38
3. MATERYAL VE METOD	52
3.1. Materyal.....	52
3.2. Metot.....	52
3.2.1. Açık alan çalışmaları.....	52
3.2.1.1. Arazinin dikime hazırlanması, materyallerin temini ve dikimi.....	52
3.2.1.2. Morfolojik gözlemler.....	56
3.2.1.3. Bitkilerden yaprak örneklerinin toplanması	56
3.2.2. <i>In vitro</i> çalışmalar.....	57
3.2.2.1. <i>In vitro</i> çalışmalar için genel laboratuvar hazırlığı.....	57
3.2.2.2. Mikroçoğaltım çalışması.....	57
3.2.2.3. <i>In vitro</i> köklenme çalışmaları.....	62
3.2.2.4. Kallus ve hücre süspansiyon kültürü çalışmaları ve elisitör uygulamaları aşaması.....	63
3.2.3. Sekonder metabolitlerin tespitine yönelik çalışmalar – HPLC	

(Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analizleri.....	70
3.2.3.1. HPLC analizleri için örneklerin hazırlanması.....	70
3.2.3.2. HPLC analizleri için kullanılan kimyasallar	71
3.2.3.3. Çalışmada kullanılan cihazlar	71
3.2.3.4. Sekonder metabolitlerin standart çözeltilerinin ve kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması.....	71
3.2.3.5. Sekonder metabolitlerin HPLC-DAD ile belirlenmesi.....	71
3.2.4. İstatistiksel analiz.....	74
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	75
4.1. Açık alan çalışmalarına ait bulgular.....	75
4.2. <i>In vitro</i> çalışmalara ait bulgular.....	79
4.2.1. Mikroçoğaltım aşaması bulguları.....	79
4.2.2. <i>In vitro</i> köklenme çalışmasına ait bulgular.....	95
4.2.3. Kallus kültürü çalışmasına ait bulgular.....	113
4.2.4. Süspansiyon kültürüne ait bulgular.....	157
4.2.4.1. Hücre süspansiyon kültürlerinde elisitör uygulamalarına ilişkin bulgular.....	165
4.2.5. Sekonder metabolitlerin tespitine yönelik bulgular.....	174
5. SONUÇLAR	203
6. KAYNAKLAR	205
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Bazı Enginarların (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* oğaltımı, Kallus ve Hücre Süspansiyon Kùltürleri Yardımıyla Elisitör Kullanımının Sekonder Metabolit İçerikleri Üzerine Etkisinin Tespiti” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

16/12/2019

Tuğçe ÖZSAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mg	: miligram
g	: gram
kg	: kilogram
L	: litre
mL	: mililitre
μ L	: mikrolitre
%	: yüzde
$^{\circ}$ C	: santigrat derece
M	: molarite
μ M	: mikromolar
ppm	: milyonda bir
ha	: hektar
m	: metre
m ²	: metrekare
cm	: santimetre
cm ²	: santimetrekare
mm	: milimetre
nm	: nanometre
rpm	: dakikadaki devir sayısı
λ	: dalga boyu (lamda)
M Ω	: megaohm

Kısaltmalar

IBA : İndol Bütirik Asit

IAA : İndol Asetik Asit

NAA : Naftalen Asetik Asit

BA : Benziladenin

BAP : Benzilaminopürin

DAD : Diyot Dizi Dedektör

GA₃ : Giberillik Asit

Kin : Kinetin

2,4-D : 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit

TDZ : Tiazuron

PBZ : Paklobutrazol

2iP : N⁶-(2-İzopentenil)adenine

NaCl : Sodyum klorür

HCl : Hidroklorik Asit

HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

MeJa : Metil Jasmonat

UPOV : Uluslararası Yeni Bitki Çeşitlerinin Korunması Birliği

MS : Murashige ve Skoog besi ortamı

SH : Schenk ve Hildebrandt besi ortamı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enginarın ülkeler bazında dünyadaki üretim değerleri (ton) (FAO 2017)	1
Şekil 1.2. Türkiye’de yıllara göre enginar üretim değerleri (ton) (FAO 2017).....	2
Şekil 2.1. Enginar bitkisinin baş ve çiçek yapısı	7
Şekil 2.2. Enginar tohumu (akenler)	8
Şekil 2.3. Mikroçoğaltım tekniğinin farklı bitki materyali ve metotlarda kullanımına ilişkin diyagram (Lindsey ve Jones 1989; Endress 1994’ten uyarlanmıştır).	10
Şekil 2.4. Kallus ve hücre süspansiyon kültürü aşamalarının şematik gösterimi (George 2008’den uyarlanmıştır).....	20
Şekil 2.5. Elisitörlerin doğalarına göre sınıflandırılması (Namdeo 2007’den uyarlanmıştır)	22
Şekil 2.6. Elisitörlerin orijinlerine göre sınıflandırılması (Namdeo 2007’den uyarlanmıştır)	22
Şekil 2.7. Sekonder metabolitlerin biyoteknolojide kullanımı (Wink 2009’dan uyarlanmıştır)..	40
Şekil 2.8. Sekonder metabolit üretim stratejileri (Wink 2009’dan uyarlanmıştır)	41
Şekil 2.9. Enginarda bulunan bazı biyoaktif bileşenlerin kimyasal yapıları.....	43
Şekil 3.1. Arazinin dikime hazırlanması.....	52
Şekil 3.2. Hazırlıklar; a. Torf : perlit (1:1) karışımının hazırlanması; b. Dip sürgünlerin alınması; c. Dip sürgünü; d. ve e. Sakız çeşidine ait dip sürgünler ve bunların hazırlanan harç karışımlarına dikilmesi; f. ve g. Bayrampaşa çeşidine ait dip sürgünler ve bunların harç karışımına dikilmesi; h. Olympus F ₁ çeşidine ait dip sürgünlerin görünümü; i. Sakız, Bayrampaşa ve Olympus F ₁ çeşitlerine ait dip sürgünlerin köklendirme ortamlarındaki görünümü; j. ve k. Dip sürgünlerin harçları içeren polipropilen tüplere dikimi	54
Şekil 3.3. a. Dikime hazır, köklenen bir bitki; b. Köklenen bitkilerin toprağa dikilmesi; c. Dikimden sonra arazinin görünümü	55
Şekil 3.4. Araziye dikildikten 1 ay sonra bitkilerin görünümleri, a. ve b. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiler; c. Sakız çeşidine ait bitkiler; d. ve e. Olympus F ₁ çeşidine ait bitkiler	55
Şekil 3.5. Araziye dikildikten 2 ay sonra bitki gelişimleri, a. Bayrampaşa; b. Sakız; c. Olympus F ₁	56
Şekil 3.6. Araziden toplanan bitkilerin doku kültürü çalışmalarına hazırlık aşaması,	

a. Sakız; b. Bayrampaşa; c. Olympus F ₁	59
Şekil 3.7. Bitkisel materyallerin sterilizasyon aşaması, a. ve b. 1. Sterilizasyon öncesi ve sonrası; 2. Sterilizasyon aşaması sonrası, c. Sakız, d. Bayrampaşa, e. Olympus F ₁	60
Şekil 3.8. Bayrampaşa bitkisine ait meristemlerin ana materyalden ayrılması ve kültüre alınması aşamaları (bar = 1 cm).....	60
Şekil 3.9. Sakız çeşidine ait meristemlerin ana materyalden ayrılması ve besi ortamı içeren tüplerde kültüre alınması (bar = 1 cm).....	61
Şekil 3.10. Olympus F ₁ bitkisine ait meristemlerin ana materyalden ayrılma aşaması (bar = 1 cm)	61
Şekil 3.11. Yaprak eksplantlarının sterilizasyonu ve kallus eldesi için kültüre alınması.....	67
Şekil 3.12. 50 ppm MIX1 standart karışımının 330 nm’de alınmış spektrumu. (1) 3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit, (2) 4- <i>O</i> -kafeoilkinik asit, (3) 5- <i>O</i> -kafeoilkinik asit, (4) 1,3- <i>O</i> -dikafeoilkinik asit, (5) p-kumarik asit, (6) 1,5- <i>O</i> -dikafeoilkinik asit	73
Şekil 3.13. 50 ppm MIX1 standart karışımının 280 nm’de alınmış spektrumu. (1) Narirutin	73
Şekil 3.14. 50 ppm MIX2 standart karışımının 330 nm’de alınmış spektrumu. (1) Kafeik asit, (2) luteolin 7- <i>O</i> -glukuronit, (3) ferulik asit, (4) apigenin 7- <i>O</i> -glukuronit, (5) luteolin, (6) apigenin	74
Şekil 4.1. Arazi koşullarında SPAD değerinin ölçümü	76
Şekil 4.2. Değerlendirilmeye alınan çeşitlere ait iç ve dış yaprakların SPAD değerleri.....	77
Şekil 4.3. Arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerden toplanan yaprak örneklerine ait taze yaprak ağırlıkları (g)	78
Şekil 4.4. Arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerden toplanan yaprak örneklerine ait kuru yaprak ağırlıkları (g)	78
Şekil 4.5. Çalışmada değerlendirilen çeşitlerin yaprak kuru ağırlık oranları (%)	79
Şekil 4.6. Çeşitlerin alt kültür sayılarına göre mikroçoğaltım oranları.....	81
Şekil 4.7. Çeşitlerin alt kültür sayılarına göre ortalama sürgün sayısı/eksplant	82
Şekil 4.8. Çeşitlerin alt kültür sayılarına göre ortalama yaprak sayısı/eksplant	82
Şekil 4.9. Enfeksiyon görülen bitkicik sayısı/kavanoz	83
Şekil 4.10. Gelişme göstermeyen bitkicik sayısı/kavanoz.....	84

Şekil 4.11. Yaşlanan bitkicik sayısı/kavanoz.....	84
Şekil 4.12. Bayrampaşa çeşidine ait meristemlerin gelişimlerinin gözlemi (bar =1 cm).....	85
Şekil 4.13. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 2. alt kültür gözlemi (bar =1 cm).....	86
Şekil 4.14. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 3. alt kültür gözlemi (bar =1 cm).....	86
Şekil 4.15. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 4. alt kültür gözlemi (bar =1 cm).....	87
Şekil 4.16. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 6. alt kültür gözlemi, çoğaltma besi ortamında oluşan kökler işaretlenmiştir (bar =1 cm).....	87
Şekil 4.17. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 8. alt kültür gözlemi, çoğaltma besi ortamında oluşan kökler işaretlenmiştir (bar =1 cm).....	88
Şekil 4.18. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 9. alt kültür gözlemi, çoğaltma besi ortamında oluşan kökler işaretlenmiştir (bar =1 cm).....	88
Şekil 4.19. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 11. alt kültür gözlemi, çoğaltma besi ortamında oluşan kökler işaretlenmiştir (bar =1 cm).....	89
Şekil 4.20. Olympus F ₁ çeşidine ait ilk başlatılan meristem kültürleri ve bitkiciklerin gelişme durumları, a. ve b. Meristemlerin ilk kültürüne ait görünümler; c – g. Meristemlerin kültüre alınmasından 22 gün sonraki görünümleri; h – k. Meristem kültürünün 2. ayından görünümler; l. Kültürün 3. ayında gelişmesi iyi olmayan, vitrifikasyon görülen bitkicikler (bar = 1 cm).....	90
Şekil 4.21. Alt kültürü yapılan çeşitlere ait bitkiciklerin büyüme odasındaki genel görünümleri; a. Sakız, b. Olympus F ₁	90
Şekil 4.22. Meristemlerin kültüre alınmasını takip eden 20. günde gelişme durumları a. Sakız; b. Olympus F ₁ (bar = 1 cm).....	91
Şekil 4.23. Meristemlerin kültüre alınmasından 1 ay sonra gözlem fotoğrafları; a. Sakız; b. Olympus F ₁ (bar =1 cm)	91
Şekil 4.24. Sakız çeşidine ait 2. alt kültür aşamasından gözlem fotoğrafları (bar =1 cm).....	91
Şekil 4.25. Sakız çeşidinde 6. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)....	92
Şekil 4.26. Sakız çeşidinde 7. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)....	92
Şekil 4.27. Sakız çeşidinde 9. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)....	93
Şekil 4.28. Olympus F ₁ çeşidine ait 2. alt kültür aşamasından gözlem fotoğrafları (bar =1 cm).....	93
Şekil 4.29. Olympus F ₁ çeşidinde 3. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi	

(bar = 1 cm).....	93
Şekil 4.30. Olympus F ₁ çeşidinde 4. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm).....	94
Şekil 4.31. Olympus F ₁ çeşidinde 5. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm).....	94
Şekil 4.32. Çeşitlerin <i>in vitro</i> kök oluşum oranları (%).....	99
Şekil 4.33. Çeşitlerin aklimatizasyon durumları.....	99
Şekil 4.34. Çeşitlerin arazi koşullarında yaşama durumları	100
Şekil 4.35. <i>In vitro</i> çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kök oluşturan bitkiciklerin değerlendirilmesi	100
Şekil 4.36. K kodlu köklenme ortamlarında Bayrampaşa bitkiciklerinin kültüre alınması; a. K1, b. K2, c. K3, d. K4, e. K5, f. K6, g. K7, h. K8, i. K9, j. K10 (bar = 1 cm).....	101
Şekil 4.37. K kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa Bitkiciklerinin 1 ay sonraki kavanozlardaki gözlemi; a. K1, b. K2, c. K3, d. K4, e. K5, f. K6, g. K7, h. K8, i. K9, j. K10 (bar = 1 cm).....	102
Şekil 4.38. K kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa bitkiciklerinin 1 ay sonraki gözlemi; a. K1, b. K2, c. K3, d. K5, e. K6, f. K7, g. K8, h. K9 (bar = 1 cm).....	102
Şekil 4.39. K kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan bazı Bayrampaşa bitkiciklerinin 2 ay sonraki gözlemi; a. K2, b. K3, c. K5, d. K4 (bar = 1 cm).....	102
Şekil 4.40. Bayrampaşa bitkiciklerinin bazı K köklenme ortamlarına verdikleri tepkilerin gözlemi; a. ve a' . K1, b. ve b' . K2, c. ve c' . K8, d. K10 (bar =1 cm).....	103
Şekil 4.41. Çoğaltma besi ortamında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarına ait gözlem fotoğrafları.....	103
Şekil 4.42. Köklenen bitkiciklerin dış koşullara alıştırma aşamasından bir görüntü.....	104
Şekil 4.43. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin sera koşullarında alıştırmaya alınmasına ait gözlem fotoğrafları.....	104
Şekil 4.44. Bazı K kodlu köklenme ortamlarında köklenen bitkiciklerin aklimatizasyon aşamasına alınması; a. K1, b. K2, c. K3, d. K4 (bar = 1 cm).....	105
Şekil 4.45. Bazı K kodlu köklenme ortamlarında köklenen bitkiciklerin	

aklimatizasyon aşamasına alınması; a. K5, b. K6, c. K7, d. K8, e. K9, f. K10 (bar = 1 cm).....	106
Şekil 4.46. Aklimatizasyon sonrası (süreleri belirtilmiştir) açık araziye dikime hazır Bayrampaşa bitkiciklerinden bir görünüm; a. K8 (4 ay), b. Çoğaltma ortamı (3 ay), c. K3 (3 ay), d. K4 (3 ay), e. K9 (3 ay), f. Çoğaltma ortamı (2 ay), g. ve j. K10 (2 ay), h. Çoğaltma ortamı (1 ay), i. K2 (2 ay), k. ve l. K3 (1 ay) (bar = 1 cm).....	107
Şekil 4.47. K1 kodlu köklenme ortamında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm).....	108
Şekil 4.48. K2 kodlu köklenme ortamında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm).....	108
Şekil 4.49. K7 kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm).....	109
Şekil 4.50. Çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm).....	109
Şekil 4.51. Çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm).....	110
Şekil 4.52. Sakız çeşidine ait K kodlu köklenme ortamlarında köklendirildikten sonra aklimatizasyon amacıyla seraya alınan bitkiciklerden bir görünüm; bitkiciklerin, a. 1 ay sonra, b. 2 ay sonra gözlemi.....	110
Şekil 4.53. K kodlu köklenme ortamında kültüre alınan Olympus F ₁ çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi; a. K3, b. K4, c. K6, d. K10 (bar = 1 cm).....	111
Şekil 4.54. Çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kültüre alınan Olympus F ₁ çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm).....	111
Şekil 4.55. Bazı K kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan Olympus F ₁ çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi, a. K1, b. K2, c. K3, d. K4, e. K5, f. K6, g. K7, h. K8, i. K9, j. K10 (bar = 1 cm).....	112
Şekil 4.56. Olympus F ₁ çeşidine ait K kodlu köklenme ortamlarında köklendirildikten sonra aklimatizasyon amacıyla seraya alınan bitkiciklerden bir görünüm.....	112
Şekil 4.57. D kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F ₁ çeşidine ait yaprak eksplantlarının 1. alt kültür sonunda gözlemi, a. D1, b. D2, c. D3, d. D4 (bar = 1 cm).....	113
Şekil 4.58. N kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F ₁ çeşidine ait yaprak eksplantlarının 1. alt kültür sonunda gözlemi; a. N1, b. N2, c. N3, d. N4 (bar = 1 cm).....	113

- Şekil 4.59.** Sakız çeşidine ait yaprak ve yaprak ana damarı eksplantlarının bazı X kodlu farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamlarında kallus elde edilmesi amacıyla kültüre alınması, **a.** X4, **b.** X10, **c.** X11, **d.** X14, **e.** X15, **f.** X16 (a – f yaprak eksplantı), **g.** X10, **h.** X11, **i.** X12, **j.** X13, **k.** X14, **l.** X15, **m.** X16 (g – m yaprak ana damarı eksplantı) (bar = 1 cm)..... 114
- Şekil 4.60.** Sakız çeşidine ait yaprak ve yaprak ana damarı eksplantlarının bazı X kodlu farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamlarında kallus elde edilmesi amacıyla kültüre alınmasını takiben gösterdikleri gelişmelerin gözlemi, **a.** X21, **b.** X23, **c.** X27, **d.** X30, **e.** X32, (a – e yaprak eksplantı), **f.** X21, **g.** X26, **h.** X27, **i.** X28, **j.** X29, **k.** X30, **l.** X32, (f – l yaprak ana damarı eksplantı) (bar = 1 cm)..... 115
- Şekil 4.61.** Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların ‘B’ kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda gelişen yaprak eksplantlarının oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁..... 121
- Şekil 4.62.** Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların ‘B’ kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallus oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁ 122
- Şekil 4.63.** Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların ‘B’ kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallusların ortalama ağırlıkları (g); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁ 123
- Şekil 4.64.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** B2 (1.0x), **b.** B3 (0.8x), **b’.** B3 (1.0x), **c.** B4 (0.8x), **c’.** B4 (1.0x), **d.** B5 (0.63x), **d’.** B5 (1.0x), **d’.** B5 (1.25x), **e.** B8 (1.0x), **f.** B9 (0.8x), **f’.** B9 (1.0x), **g.** B10 (0.8x), **g’.** B10 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm).....124
- Şekil 4.65.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (2. alt kültür sonu); **a.** B3 (0.63x), **b.** B7 (1.0x), **c.** B9 (0.8x), **c’.** B9 (1.0x), **c’.** B9 (1.5x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm) 124
- Şekil 4.66.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (3. alt kültür sonu); **a.** B1(0.63x), **a’.** B1 (1.0x), **b.** B2 (0.63x), **b’.** B2 (0.8x), **c.** B3 (0.8x), **d.** B4 (1.0x), **e.** B5 (0.63x), **f.** B7 (1.0x), **g.** B9 (0.63x), **h.** B10 (0.63x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)..... 125
- Şekil 4.67.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** B3 (0.8x), **a’.** B3 (1.0x), **b.** B4 (1.0x), **c.** B5 (1.5x), **d.** B6 (1.0x), **e.** B7 (1.5x), **f.** B8 (1.0x), **f’.** B8 (1.25x), **g.** B10 (0.63x), **g’.** B10 (1.25x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)..... 126
- Şekil 4.68.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait

- in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (2. alt kültür sonu); **a.** B1 (0.8x), **b.** B3 (0.8x), **b'.** B3 (1.0x), **c.** B8 (0.8x), **d.** B9 (0.8x), **d'.** B9 (1.0x), **e.** B10 (0.8x), **e'.** B10 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm).. 127
- Şekil 4.69.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (3. alt kültür sonu); **a.** B3 (0.8x), **b.** B10 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm) 127
- Şekil 4.70.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** B1 (1.0x), **b.** B3 (1.0x), **c.** B4 (1.0x), **c'.** B4 (1.25x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)..... 128
- Şekil 4.71.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (2. alt kültür sonu); **a.** B1 (1.0x), **b.** B4 (1.0x), **c.** B5 (0.8x), **c'.** B5 (1.0x), **d.** B6 (1.0x), **e.** B8 (0.8x), **f.** B9 (0.8x), **g.** B10 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm) 128
- Şekil 4.72.** B3 kodlu kallus ortamında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (3. alt kültür sonu); **a.** 0.8x, **a'.** 1.0x (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm) 128
- Şekil 4.73.** *In vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda gelişen yaprak eksplantlarının oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁ 133
- Şekil 4.74.** Bayrampaşa çeşidinde *in vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben bu ortamlarda oluşan kallus oranı (%) 134
- Şekil 4.75.** Bayrampaşa çeşidinde *in vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben bu ortamlarda oluşan kallusların ortalama ağırlıkları (g)..... 134
- Şekil 4.76.** Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vitro* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** B1 (0.8x), **b.** B3 (0.63x), **c.** B6 (0.8x), **d.** B8 (0.8x), **e.** B9 (0.63x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)..... 135
- Şekil 4.77.** Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda gelişen yaprak eksplantlarının oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁ 144
- Şekil 4.78.** Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallus oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁..... 145
- Şekil 4.79.** Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallusların ortalama ağırlıkları (g); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁ 146

Şekil 4.80. Bazı T kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait <i>in vivo</i> yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); a. T3 (1.25x), b. T7 (0.8x), c. T8 (0.8x), d. T11 (0.63x), d'. T11 (0.8x), d''. T11 (1.25x), e. T12 (1.0x), f. T16 (1.0x), g. T17 (1.0x), h. T18 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm).....	147
Şekil 4.81. Bazı T kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait <i>in vivo</i> yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); a. T4 (1.0x), b. T5 (1.0x), c. T9 (1.0x), d. T12 (1.0x), e. T17 (1.25x), f. T18 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm).....	147
Şekil 4.82. Bazı T kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F ₁ çeşidine ait <i>in vivo</i> yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); a. T3 (0.8x), b. T8 (1.25x), c. T9 (1.0x), c'. T9 (1.25x), d. T10 (1.25x), e. T13 (0.8x), f. T18 (1.25x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)	148
Şekil 4.83. <i>In vitro</i> çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda gelişen yaprak eksplantlarının oranı (%); a. Bayrampaşa, b. Sakız, c. Olympus F ₁	155
Şekil 4.84. <i>In vitro</i> çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallus oranı (%); a. Bayrampaşa, b. Sakız.....	156
Şekil 4.85. <i>In vitro</i> çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallusların ortalama ağırlıkları (g); a. Bayrampaşa, b. Sakız	156
Şekil 4.86. Bazı T kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait <i>in vitro</i> yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); a. T2 (0.8x), a'. T2 (2.0x), b. T3 (1.0x), c. T4 (2.0x), d. T5 (1.25x), e. T7 (0.8x), e'. T7 (1.0x), f. T13 (1.0x), g. T14 (0.8x), h. T15 (1.0x), i. T17 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm).....	157
Şekil 4.87. Süspansiyon kültürü	159
Şekil 4.88. Bayrampaşa çeşidine ait süspansiyon kültürü bulguları	161
Şekil 4.89. Sakız çeşidine ait süspansiyon kültürü bulguları.....	163
Şekil 4.90. Olympus F ₁ çeşidine ait süspansiyon kültürü bulguları	164
Şekil 4.91. Bayrampaşa çeşidine ait Metil Jasmonat elisitörü uygulamasından elde edilen bulgular	170
Şekil 4.92. Sakız çeşidine ait Metil Jasmonat elisitörü uygulamasından elde edilen bulgular.....	171
Şekil 4.93. Bayrampaşa çeşidine ait Kitosan elisitörü uygulamasından elde edilen bulgular.....	172

Şekil 4.94. Sakız çeşidine ait Kitosan elisitörü uygulamasından elde edilen bulgular173



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya enginar üretimi (FAO 2017)	2
Çizelge 2.1. Enginarın bilimsel sınıflandırmadaki yeri	7
Çizelge 3.1. Toprak analizi sonuçları	53
Çizelge 3.2. Bitkilerin yetiştirildiği alana ilişkin meteorolojik veriler	53
Çizelge 3.3. Besi ortamlarının hazırlanmasında kullanılan Murashige ve Skoog (1962) ve Gamborg vd. (1968) temel besi ortamlarının içerikleri	57
Çizelge 3.4. Çalışmanın mikroçoğaltım aşamasında kullanılan besi ortamı kombinasyonları	58
Çizelge 3.5. <i>In vitro</i> köklenme amacıyla hazırlanan ‘Z’ kodlu besi ortamı kombinasyonları	62
Çizelge 3.6. <i>In vitro</i> köklenme amacıyla hazırlanan ‘K’ kodlu besi ortamı kombinasyonları	62
Çizelge 3.7. ‘E’ kodlu kallus besi ortamı içeriği	64
Çizelge 3.8. ‘C’ kodlu kallus besi ortamı içeriği	64
Çizelge 3.9. ‘N’ kodlu kallus besi ortamı içeriği	64
Çizelge 3.10. ‘D’ kodlu kallus besi ortamı içeriği	65
Çizelge 3.11. ‘X’ kodlu kallus besi ortamı içeriği	65
Çizelge 3.12. ‘B’ kodlu kallus besi ortamı içeriği	66
Çizelge 3.13. ‘T’ kodlu kallus besi ortamı içeriği	66
Çizelge 3.14. HPLC mobil faz akış programı	72
Çizelge 3.15. Fenolik bileşenlerin alıkonma zamanları ve maksimum absorbanans verdiği dalga boyları	72
Çizelge 4.1. Çeşitlere ait morfolojik gözlem değerlendirmesi	75
Çizelge 4.2. Oluşan sürgünlerin kalite skorlaması	85
Çizelge 4.3. Bayrampaşa çeşidi için <i>in vitro</i> köklenme çalışması sonuçları	97
Çizelge 4.4. Sakız çeşidi için <i>in vitro</i> köklenme çalışması sonuçları	98
Çizelge 4.5. Olympus F ₁ çeşidi için <i>in vitro</i> köklenme çalışması sonuçları	98

Çizelge 4.6. <i>In vitro</i> oluşan köklerin kalite skorlaması	101
Çizelge 4.7. Bayrampaşa çeşidinde <i>in vivo</i> (dış koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri	118
Çizelge 4.8. Sakız çeşidinde <i>in vivo</i> (dış koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri	119
Çizelge 4.9. Olympus F ₁ çeşidinde <i>in vivo</i> (dış koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri	120
Çizelge 4.10. Bayrampaşa çeşidinde <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri	130
Çizelge 4.11. Sakız çeşidinde <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri	131
Çizelge 4.12. Olympus F ₁ çeşidinde <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri	132
Çizelge 4.13. Bayrampaşa çeşidinde <i>in vivo</i> (dış koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri	138
Çizelge 4.14. Sakız çeşidinde <i>in vivo</i> (dış koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri	140
Çizelge 4.15. Olympus F ₁ çeşidinde <i>in vivo</i> (dış koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri	142
Çizelge 4.16. Bayrampaşa çeşidinde <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri	149
Çizelge 4.17. Sakız çeşidinde <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri	151
Çizelge 4.18. Olympus F ₁ çeşidinde <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri	153
Çizelge 4.19. Bayrampaşa çeşidinde hücre süspansiyon kültürü sonuçları	160
Çizelge 4.20. Sakız çeşidinde hücre süspansiyon kültürü sonuçları	162
Çizelge 4.21. Olympus F ₁ çeşidinde hücre süspansiyon kültürü sonuçları	164
Çizelge 4.22. 24 saat elisitör uygulamasının ardından hücre süspansiyon kültürlerindeki değişimler	167
Çizelge 4.23. 48 saat elisitör uygulamasının ardından hücre süspansiyon kültürlerindeki değişimler	168
Çizelge 4.24. 72 saat elisitör uygulamasının ardından hücre süspansiyon	

kültürlerindeki değişimler	169
Çizelge 4.25. Çeşitlere göre iç yaprakların 3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	176
Çizelge 4.26. Çeşitlere göre dış yaprakların 3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	176
Çizelge 4.27. Çeşitlere göre iç yaprakların 4- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	178
Çizelge 4.28. Çeşitlere göre dış yaprakların 4- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	178
Çizelge 4.29. Çeşitlere göre iç yaprakların 5- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	179
Çizelge 4.30. Çeşitlere göre dış yaprakların 5- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	179
Çizelge 4.31. Çeşitlere göre iç yaprakların 1,3- <i>O</i> -dikafeoilkinik asit değerleri	181
Çizelge 4.32. Çeşitlere göre dış yaprakların 1,3- <i>O</i> -dikafeoilkinik asit değerleri	181
Çizelge 4.33. Çeşitlere göre iç yaprakların kafeik asit değerleri	182
Çizelge 4.34. Çeşitlere göre dış yaprakların kafeik asit değerleri	182
Çizelge 4.35. Çeşitlere göre iç yaprakların <i>p</i> -kumarik asit değerleri	185
Çizelge 4.36. Çeşitlere göre dış yaprakların <i>p</i> -kumarik asit değerleri.....	185
Çizelge 4.37. Çeşitlere göre iç yaprakların ferulik asit değerleri	186
Çizelge 4.38. Çeşitlere göre dış yaprakların ferulik asit değerleri.....	186
Çizelge 4.39. Çeşitlere göre iç yaprakların 1,5- <i>O</i> -dikafeoilkinik asit değerleri	187
Çizelge 4.40. Çeşitlere göre dış yaprakların 1,5- <i>O</i> -dikafeoilkinik asit değerleri	187
Çizelge 4.41. Çeşitlere göre iç yaprakların narirutin değerleri.....	188
Çizelge 4.42. Çeşitlere göre dış yaprakların narirutin değerleri	188
Çizelge 4.43. Çeşitlere göre iç yaprakların luteolin değerleri	190
Çizelge 4.44. Çeşitlere göre dış yaprakların luteolin değerleri.....	190
Çizelge 4.45. Çeşitlere göre iç yaprakların luteolin 7- <i>O</i> -glukuronit değerleri	191
Çizelge 4.46. Çeşitlere göre dış yaprakların luteolin 7- <i>O</i> -glukuronit değerleri	191
Çizelge 4.47. Çeşitlere göre iç yaprakların apigenin değerleri.....	192
Çizelge 4.48. Çeşitlere göre dış yaprakların apigenin değerleri	192
Çizelge 4.49. Çeşitlere göre iç yaprakların apigenin7- <i>O</i> -glukuronit değerleri.....	193

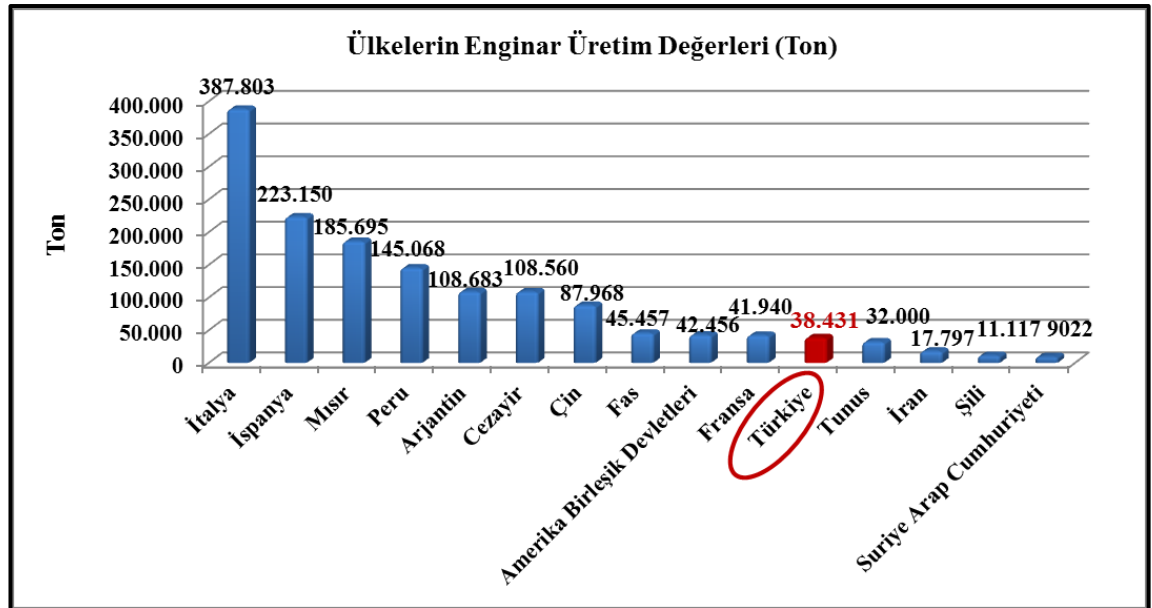
Çizelge 4.50. Çeşitlere göre dış yaprakların apigenin 7- <i>O</i> -glukuronit değerleri.....	193
Çizelge 4.51. Bayrampaşa çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	195
Çizelge 4.52. Bayrampaşa çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 4- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	195
Çizelge 4.53. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	196
Çizelge 4.54. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 4- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	196
Çizelge 4.55. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 5- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	197
Çizelge 4.56. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım kafeik asit değerleri.....	197
Çizelge 4.57. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım ferulik asit değerleri.....	198
Çizelge 4.58. Bayrampaşa çeşidi süspansiyon kültürü – katı kısım değerleri.....	199
Çizelge 4.59. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – katı kısım değerleri.....	200
Çizelge 4.60. Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin süspansiyon kültürü – sıvı kısım 3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	200
Çizelge 4.61. Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin süspansiyon kültürü – sıvı kısım 3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	200
Çizelge 4.62. Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin süspansiyon kültürü – katı kısım 3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	201
Çizelge 4.63. Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin süspansiyon kültürü – katı kısım 4- <i>O</i> -kafeoilkinik asit değerleri	201

1. GİRİŞ

Atası deve dikenini olduğu bilinen ve *Asteraceae* familyasının önemli bir üyesi olan enginarın anavatanı başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere Güney Avrupa ve Kuzey Batı Afrika olduğu kabul edilmekte, dahil olduğu ‘*Cynara*’ cinsinin orijini de buzul çağına dayanmaktadır. Bu devirde yabancı enginar, ‘cardoon’, Akdeniz havzasının güneyinden Sahra’ya kadar dağılım gösterirken, buzul çağıının sonunda Akdeniz’in doğu ve batı kısımlarına da yayılmış olup (Ciancolini 2012), bugün dünyada yetiştiriciliği oldukça yaygındır.

Enginar taze, konserve ya da dondurulmuş olarak farklı tüketimlere imkân tanıyan bir sebzedir. Olgunlaşmamış çiçeklerinin (başlar, tomurcuklar ya da kapitula) içteki brakte yaprakları ve çiçek tablası ‘receptacle’ (“kalbi”) enginar bitkisinin yenilen kısımlarını (Abu-Reidah vd. 2013), başın dış kısmındaki brakte yapraklar, yapraklar ve gövde ise endüstriyel ikincil ürün olarak değerlendirilmekte olup enginar bitkisinin yenilmeyen kısmını oluşturmaktadır (Ruiz-Aceituno vd. 2016). Enginar sağlık açısından çok kıymetli bir sebze olup, %88-90 su içeren 100 g taze enginarın yaklaşık 10 g karbonhidrat, 3 g protein ve 0,3 g yağ içermesinin yanı sıra vitamin ve minerallerce de zengin olduğu bilinmektedir (Vural vd. 2000; Ekbiç 2005).

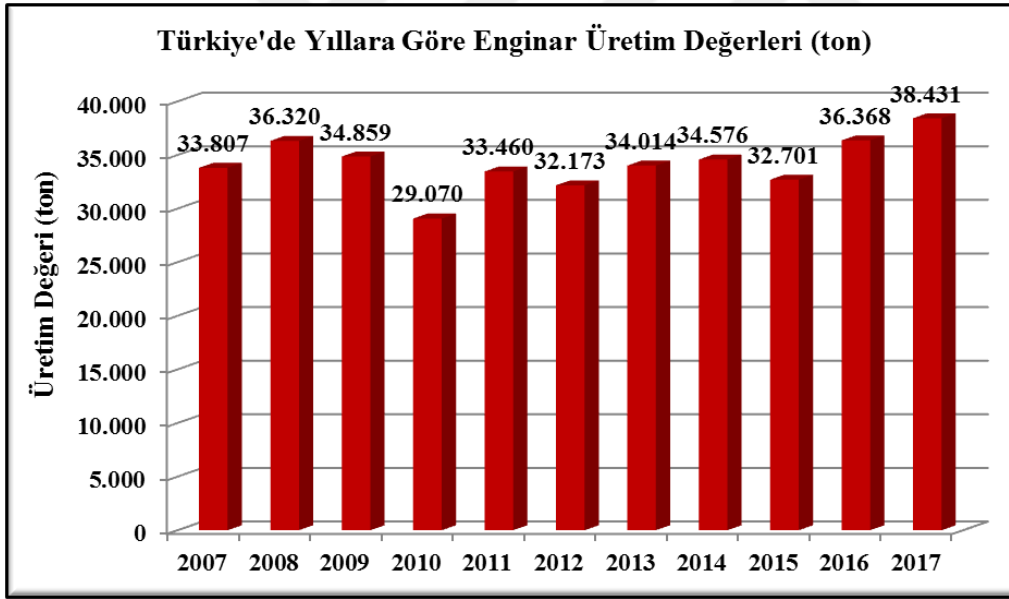
Enginar, ekonomik önemi her geçen gün artan sebzeler arasında yer almakta ve dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliği yaygınlaşmaktadır. 2017 yılı dünyadaki enginar üretimine bakılacak olursa 1505,328 tona ulaştığı görülmektedir. Dünyadaki enginar üretiminde büyük pay sahibi ülkelerin başında İtalya (387.803 ton), İspanya (223.150 ton) ve Mısır (185.695 ton) gelirken, ülkemiz bu sıralamada 38,431 ton enginar üretimi ile 11. sırada yer almaktadır (Şekil 1.1, Çizelge 1.1). Ülkemizde son 10 yıldaki enginar üretim değerlerinde ise dalgalanmalar söz konusuysen, 2015 yılından bu yana artış olduğu görülmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Enginarın ülkeler bazında dünyadaki üretim değerleri (ton) (FAO 2017)

Çizelge 1.1. Dünya enginar üretimi (FAO 2017)

Ülkeler	Üretim Değeri (ton)	Ekili Alan (ha)
İtalya	387.803	40.482
İspanya	223.50	16.403
Mısır	185.695	10.159
Peru	145.068	8.646
Arjantin	108.683	4.472
Cezayir	108.560	5.532
Çin	87.968	11.803
Fas	45.457	2.923
ABD	42.456	2.914
Fransa	41.940	7.544
Türkiye	38.431	2.994
Tunus	32.000	3.687
İran	17.797	911
Şili	11.117	1.464
Dünya	1505.328	122.390



Şekil 1.2. Türkiye’de yıllara göre enginar üretim değerleri (ton) (FAO 2017)

Ülkemizde önemli iki enginar çeşidi mevcut olup, bunlar Sakız ve Bayrampaşa’dır. Sakız enginar çeşidi erkenci, Bayrampaşa ise geçici özellik göstermektedir. Taze tüketime yönelik olarak yetiştirilen çeşidimiz Sakız iken, büyük tablasından ötürü daha çok sanayiye yönelik kullanım alanına sahip olan ise Bayrampaşa’dır (Abak 1987).

Heterozigot yapı ve protandri gösteren enginarlarda açılımlar gözlenmektedir ve generatif olarak üretim oldukça sınırlı kalmakta ve genellikle tohumla üretim tercih edilmemektedir. Enginar, geleneksel olarak vegetatif yöntemlerle çoğaltılmakta olup,

vegetatif olarak üretimde ise başlıca 4 farklı yöntem kullanılmaktadır: rizom, ovoli (yarı dormant dip sürgünleri), dip sürgünleri ve bu materyallerden elde edilen köklü bitkiciklerle üretim. Genel olarak tercih edilen üretim şekli dip sürgünleri ile yapılan olmasının yanı sıra, bu başlangıç materyallerinin sağlıklı olmaması, hastalık ve zararlılarla bulaşık olması durumunda üretilen materyalde de aynı problemle karşılaşılacaktır. Böylesi durumlarda klasik yetiştiriciliğe alternatif olarak kullanılma potansiyeline sahip olan bir diğer yöntem tavsiye edilmekte olup, bu alternatif ise *in vitro* çoğaltımdır.

Enginar, *in vitro* tekniklerle oldukça kolay kültüre alınmaktadır. Ancak mikroçoğaltım aşamasını takiben elde edilen bitkiciklerin *in vitro* koşullarda köklendirilmesi ve köklü bitkiciklerin geliştirilmesinde zorluklarla karşılaşmaktadır. Enginar bitkisi *in vitro* kök oluşumu bakımından inatçı bitkiler arasında yer almakta olup, bu problemin aşılmasına yönelik olarak günümüze kadar birçok yöntem denenmiştir. Bu yöntemler arasında besi ortamına aktif kömür ve siklodekstrin gibi çeşitli destekleyicilerin eklenmesinin yanı sıra (Bigot ve Foury 1984; Brutti vd. 2000), farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşitli oran ve kombinasyonlarda kullanılmasını içeren (Harbaoui vd. 1982; Marras vd. 1985; Draoui vd. 1993; Iapichino 1996; Morzadec ve Hourtmant 1997; Bedini vd. 2012; López-Pérez ve Martínez 2015; Ercan 2016) birtakım çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte enginar bitkisinin *in vitro* köklenme oranının genotiplere göre de farklılık gösterdiği yapılan çalışmalarda bildirilmiş olup (Benoit ve Ducreux 1981; Morzadec ve Hourmant 1997; López-Pérez ve Martínez 2015), bu konu enginarın *in vitro* çoğaltımında henüz tam olarak aşılamamış bir problem olarak görülmektedir.

Son yıllarda insanların fonksiyonel gıdalara olan artan ilgisi karşısında enginar bitkisi de payını almış, enginarlardan elde edilen ekstraktlar ve kapsüller oldukça fazla ilgi görmeye başlamıştır. Roma zamanından beri insan sağlığı açısından önemi bilinen enginar, hepatoprotektif, antikarsinojenik, antioksidatif, antibakteriyel, antikolesterol gibi birtakım güçlü etkilere sahiptir (Adzet vd. 1987; Schütz vd. 2004; Ciancolini vd. 2013; Ruiz-Aceituno vd. 2016; Lattanzio vd. 2019). Karaciğerin korunmasına ve yenilenmesine yardımcı olarak işlevini yerine getirmesini teşvik eden enginar (Pandino vd. 2011a), bu sebeple karaciğer dostu olarak bilinmektedir. Buna bağlı olarak hepatit hastalıklarına yakalanma riskini de azaltmaktadır. Bunun yanı sıra enginar, içerdiği luteolin maddesinden ötürü kolesterol biyosentezini azaltmaya yardımcı olur (Ruiz-Aceituno vd. 2016), kötü kolesterolü düşürürken iyi kolesterolü de yükselterek kalbi korumaktadır. Enginarın sağlıkla ilişkili diğer olumlu fonksiyonları ise, kanın temizlenmesine katkı sağlayarak damar sertleşmesini önlemek, böbreklerin işlevlerini düzgün yerine getirmesini sağlamak, romatizma ve şeker hastalıklarına karşı da savaşmasının yanı sıra sindirim sisteminde de olumlu etkileri gözlenmekte olup mide ve bağırsakların temizlenmesine olumlu katkılar yapmaktadır. Besleyicilik bakımından sebze ve meyveler arasındaki yeri yadsınmaz olan enginarın (Ekbiç 2005), sağlık için yaptığı bu kadar olumlu katkının altında yatan asıl nedenin düşük miktarda yağ, yüksek miktarda mineral, C vitamini, lif, inülin ve biyoaktif bileşenlerin kaynağı olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Pandino vd. 2010b, 2011a).

Enginar bitkisi bilindiği üzere çok yıllık bir bitki olup, bu bitkinin yenilen kısımlarını başları (iç brakteleri ve kalbi) ve çiçek tablası oluşturmaktadır. Bununla

birlikte başlardaki dış brakte yaprakları, yaprakları ve gövdesi ise yenilmeyen kısımlar olarak değerlendirilmektedir. Diğer ülkelerde olduğu gibi çeşitlerin özellikleri tüketim alışkanlıklarına göre değişmekle birlikte bu durum ülkemizde görülmekte, farklı tüketim alışkanlıklarına uygun iki önemli çeşidimiz (Sakız ve Bayrampaşa) mevcuttur. Genel olarak bir enginar bitkisinin yenilen kısımlarının tüm bitkideki oranı, genotip ve hasat zamanı farklılığına göre değişmekle birlikte yaklaşık olarak %35–55 olduğu bilinmektedir (Abu-Reidah vd. 2013). Başların büyüklükleri ve ağırlıkları da yine genotip ve hasat zamanına göre değişiklik göstermekte olup, 150 – 600 g arasındadır. Bir enginar başının sahip olduğu kısımların kendi içindeki oranına bakılacak olduğunda ise reseptaklın %10-18, iç brakteler ve bunların reseptakl ile birleştiği baş kısımlarının yaklaşık %40 olduğu bilinmektedir (Pandino vd. 2011a). Enginar bitkisinin gövde ve yaprakları gıda dışı olarak değer görmekte olup genellikle değerli biyoaktif bileşenlerin elde edilmesi amacıyla faydalanılmaktadır (Ruiz-Aceituno vd. 2016).

1990'lı yılların başından itibaren insan beslenmesinde enginarların da içerisinde yer aldığı sebzelerin önemi taşımış oldukları vitaminler, mineral maddeler ve sekonder metabolitlerin keşfedilmesinden sonra giderek artış göstermiştir. Sebzelerin günlük yaşamımızın idame ettirilmesindeki önemi yadsınamaz olup, bitkilerden elde edilen tıbbi değerleri oldukça yüksek olan bitkisel biyoaktif bileşenlerin üretim katsayısı çoğunlukla düşük seviyede kalmakta ve bitkilerin gelişim süreçlerine bağlı olarak değişmektedir. Bu noktada, başlangıç materyalleri olarak hastalık ve virüsten ari, sağlıklı bitki materyalleri kullanılarak *in vitro* tekniklerin duruma dahil edilmesi sayesinde üretim katsayısı ve dolayısıyla bitkisel biyoaktif bileşen miktarlarının da arttırılabileceği düşünülmektedir. *In vitro* yöntemler ile çoğaltılan enginar bitkilerinde bu değerli biyofarmasötiklerin miktarlarında ne gibi değişiklikler olduğunun tespit edilmesi, artmasına yönelik araştırmalara hız verilmesi, günümüz koşullarında fonksiyonel gıdalara olan artan ilgiyi tatmin edici sonuçlar eldesinde önemli olacaktır.

Sekonder metabolitler oldukça değerli biyoaktif bileşenler olup, bunlar genellikle doğada çok az miktarlarda oluşum göstermekte ya da bitkilerin yaşam döngülerinin belirli evrelerinde ortaya çıkmaktadırlar. Diğer birçok bitkide olduğu gibi enginarda da var olan mineral maddelerin yanı sıra değerli biyoaktif bileşenler birtakım faktörler tarafından etkilenmektedir (Pandino vd. 2010a, b). Bitkinin sahip olduğu bu değerli biyoaktif kompozisyonda meydana gelebilecek değişikliklerde, birtakım çevresel faktörlerin (toprak ve iklim yapısı), lokasyonun, bitkinin yetiştirildiği mevsim gibi etkenlerin yanı sıra genotip ve buna bağlı olarak çeşitli bitki kısımlarının (kök, yaprak, brakte vb.) rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında öncelikli olarak *in vitro* tekniklerden meristem kültürü tekniği kullanılarak hastalık, zararlı ve virüsten ari, sağlıklı başlangıç materyallerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bu başlangıç materyalleri kullanılarak, en uygun besi ortamı ve hormon konsantrasyonlarıyla etkin bir *in vitro* rejenerasyon eldesine çalışılmıştır.

Bu çalışmada, ülkemizde ekonomik değeri yüksek olan Sakız ve Bayrampaşa çeşitleri ile Olympus F₁ hibrit enginar çeşidinin *in vitro* sekonder metabolit içeriklerinin tespiti, eldesi ve karşılaştırılması üzerinde durulmuştur. Bunun yanı sıra *in vitro* yöntemler kullanılarak kallus ve hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuştur. Ayrıca hücre süspansiyon kültürleri esnasında sekonder metabolitler tespit edilmeye çalışılmış,

yine hücre süspansiyon kültürleri esnasında çeşitli elisitörler yardımıyla bu sekonder metabolitlerin artırılmasına yönelik denemeler yapılarak elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Enginarın Sistematikteki Yeri ve Tarihçesi

Günümüze kadar yapılmış olan bilimsel araştırmalar incelendiğinde, bazı araştırmacılar enginarın ilk kültüre alınma tarihini milattan önceki yıllara, bazıları ise milattan sonraki yıllara uzandığını belirtmiştir (Montelucci 1962; Foury 1989; Ciancolini 2012). Enginarın ilk olarak kültüre alındığı yer Sicilya olarak kayıtlara geçmiş olup, dünyaya buradan yayıldığı düşünülmektedir (Pignone ve Sonnante 2004). Enginarında modern yöntemler kullanılarak yetiştiriciliğinin yapılması ve bu değerli bitkide ıslah yöntemlerinin geliştirilmesi nispeten daha sonra başlamış olmasına rağmen, birçok araştırmacının da belirttiği üzere üretimi milattan sonra 15. Yüzyılda başlamıştır (Bianco 1990; Ciancolini 2012). Bu zamanlarda Sicilya'dan Floransa'ya getirilmiş, burada kültüre alınmış ve sonra Araplar tarafından bugün yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgelere yayılım göstermiştir (Şeniz ve Erdoğan 2011; Ciancolini 2012). Türkiye'nin enginarla ilk tanışması 1940'lı yıllara dayanmakta olup, enginar yetiştiriciliği Sakız adasından getirilen enginarlar ile başlamıştır (Kütahyalı 1971; Ekbiç 2005).

'*Cynara scolymus*' kelimelerinin kökeni incelendiğinde Yunancadan türetildiği, '*cynara* = kinara' kelimesinin Yunancadaki karşılığının 'dikenli'; '*scolymus*' kelimesinin ise 'sivri şekil' anlamına geldiği bildirilmiştir (Bianco 1990; Ciancolini 2012). Dünya genelinde farklı isimlerle bilinen bu bitki, ülkemizde 'enginar', Kıbrıs'ta 'angynara', Arnavutluk'ta 'anginare' gibi benzer kelimelerle adlandırılırken, İtalya'da 'carciofo', İspanya'da 'alcachofa' olarak bilinmektedir (Ekbiç 2005; Ciancolini 2012).

Birçok araştırmacının belirttiği üzere *Cynara* cinsi iki farklı grubu içermektedir. Birinci grubu kültür ve yabancı enginarı da içine alan *C. cardunculus* oluştururken, birinci gruba göre daha heterojen olan ikinci grup ise dikenli geniş yaprakları ve başları olan yedi yabancı türden oluşmaktadır (Wiklund 1992, Rottenberg ve Zohary 1996, Pignone ve Sonnante 2009, Ciancolini 2012). Günümüzde Pignone ve Sonnante (2009)'nin de belirttiği üzere, *C. syriaca* Boiss, *C. auranitica*, *C. cyrenaica*, *C. cornigera*, *C. baetica*, *C. algarbiensis* Cosson, *C. humilis* L. gibi yabancı enginarların hala varlık gösterdiği bilinmektedir (Ciancolini 2012). Yine Pignone ve Sonnante (2009)'nin de belirttiği üzere bahsi geçen yabancı enginarların türler arasındaki genetik farklılığın asıl sebebi olduğudur. Yabancı enginarların üç farklı botanik formu mevcuttur (Migliori 1995; Ekbiç 2005; de Falco vd. 2015);

- Kültüre alınmış yabancı enginar olarak bilinen - *Cynara cardunculus* L. var. *atilis* D.C.
- Kültür enginarı olan, 'globe' enginar olarak da bilinen - *Cynara cardunculus* L. *Cynara scolymus* L.
- Yabancı enginar olarak tanımlanan ve 'cardoon' olarak bilinen - *Cynara cardunculus* L. var. *silvestris* Lam.'dır.

Kültür enginarı olarak bilinen *Cynara scolymus* L. *Asteraceae* familyasının önemli bir üyesi olup, $2n = 2x = 34$ kromozoma sahip diploit dikotiledon bitkilerdir (Çizelge 2.1) (Bianco 1990; Pignone ve Sonnante 2009; Ciancolini 2012).

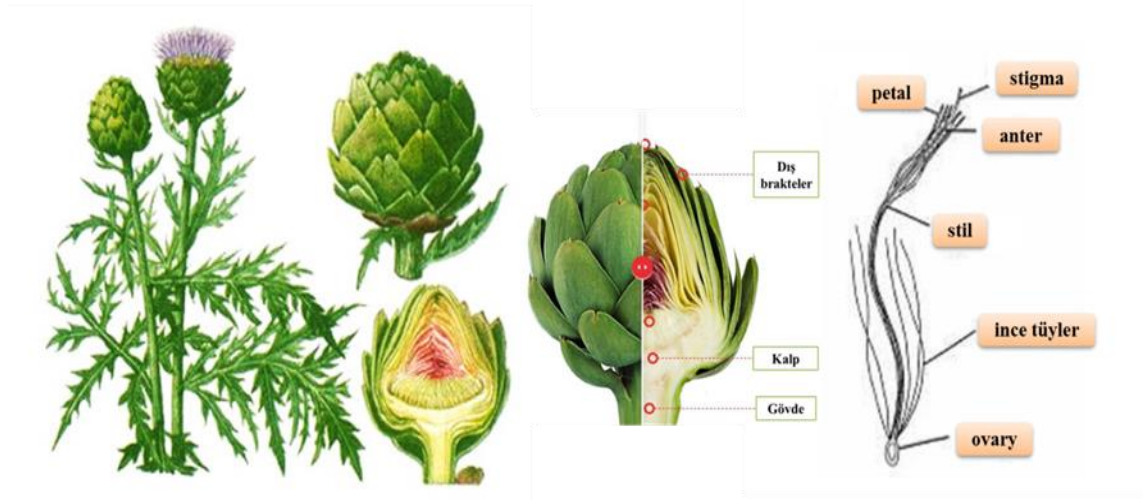
Çizelge 2.1. Enginarın bilimsel sınıflandırmadaki yeri

Enginarın Bilimsel Sınıflandırılması*	
Alem	<i>Plantae</i> - Bitkiler
Şube	<i>Magnoliophyta</i> - Çiçekli bitkiler
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i> - Dikotiledonlar
Alt Sınıf	<i>Asteridae</i>
Takım	<i>Asterales</i>
Familya	<i>Asteraceae</i>
Cins	<i>Cynara</i> L.
Tür	<i>Cynara scolymus</i> L.

*(USDA - Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı web sitesinden alınmıştır)

2.2. Enginarın Botanik Özellikleri

Çok yıllık, otsu bir bitki olan enginar, morfolojik bakımdan iki kısımda incelenmekte olup, toprak üstü aksamı (sürgün, yapraklar ve çiçekler) tek yıllıktır ve 1 m kadar boylanıp, 1 m² alan kaplayabilmektedir. Rozet şeklinde olan yaprakları çeşide bağlı olarak farklı yapılarda (dilimli ya da dilimsiz) olabilmekte, bu yaprakların birleştiği noktada büyüme ucu bulunmakta ve uygun hava sıcaklığında (13-17°C) çiçek sapı oluşmaktadır. Oluşan bu çiçek sapının en ucunda bir tane ana baş, nispeten daha alt kısımlarında ise yan başlar oluşmaktadır (Macit ve Şalk 1970; Ekbiç 2005). Diğer kısmı ise toprak altı aksamı olarak ifade edilmekte, toprak üstü aksamının aksine bitkinin bu kısımları çok yıllık olup, rizom ve köklerden oluşur. Uyur gözleri ihtiva eden rizomlara uyandırma sulaması yapılarak sürmeleri teşvik edilir ve her yıl yeni sürgünlerin (toprak üstü aksamı) meydana gelmesi sağlanır (Şekil 2.1) (Alp 2008).

**Şekil 2.1.** Enginar bitkisinin baş ve çiçek yapısı

Enginarın yenilen kısmı olgunlaşmamış çiçek topluluğudur. Bu yapı, etli bir çiçek tablası ve çeşitli katmanlardaki brakte yapraklardan meydana gelir ve 'baş' olarak ifade edilir. Başların şekilleri daha önce de ifade edildiği üzere farklı yapılarda olabildiği gibi, bu başlarda rengi yeşilden mora kadar değişiklik gösteren 800-1200 adet

çiçek topluluğu mevcuttur. Bu çiçekler erselik yapıdadır ve oluşumları dış kısımdan merkeze doğrudur. Enginar bitkisinde protandri söz konusu olup, tozlanma böceklerle gerçekleşmektedir (Ekbiç 2005; Ciancolini 2012). Eliptik şekilli enginar tohumları aken olarak ifade edilmekte, renkleri gri-kahverengi, ağırlıkları ise 30-70 mg arasında değişiklik göstermektedir (Şekil 2.2) (Ciancolini 2012).



Şekil 2.2. Enginar tohumu (akenler)

Dünyadaki en kapsamlı enginar gen havuzuna sahip ülke İtalya olup, Portis vd. (2005) tarafından bildirildiği üzere enginarların sınıflandırılmaları genellikle başlarının morfolojik yapıları ve hasat zamanları dikkate alınarak yapılmaktadır. Hasat zamanı farklılıklarına göre erkenci ve geçici çeşitler olarak ifade edilen enginarlar buna göre bahar dönemlerinde (sonbahar ve ilkbahar, erkenci çeşitler) veya ilkbahar – yaz döneminde (geçici çeşitler) gruplandırılmaktadır (de Falco vd. 2015). Bunun yanı sıra enginar başlarının irilik ve şekillerine göre birbirlerinden farklılıklar göstermekte (Abak 1987), sahip olduğu morfoloji dikkate alındığında ise dört farklı grup karşımıza çıkmaktadır (Ekbiç 2005; de Falco vd. 2015). Bunlar;

1. Spinosi grubu: Hem yaprakları hem de başları dikenli olan grup,
2. Violetti grubu: Mor renkli başlar oluşturmakla birlikte bir önceki gruba göre dikenlilik seviyesi daha az olan ve hasat zamanı ilkbaharın erken dönemlerine denk düşen grup,
3. Romaneshi grubu: Dikensiz, iri ve yuvarlak başlar meydana getiren ve hasat zamanı ilkbaharın geç döneminde olan grup,
4. Catenesi grubu: Dikensiz, küçük ve uzun başlar meydana getiren, hasat zamanı sonbaharın geç dönemlerinden ilkbahara kadar uzayabilen grup.

Enginarın botanik açıdan bu denli varyasyon göstermesi yüksek oranda heterozigosite göstermesiyle ilişkilendirilmektedir (Pandino vd. 2010a).

2.3. Enginarın Çoğaltılması

Enginar hem generatif hem de vegetatif yöntemlerle çoğaltılabilmekle birlikte, heterozigot yapı göstermesinden ötürü daha çok tercih edilen çoğaltım şekli vegetatif çoğaltım olarak karşımıza çıkmaktadır. Enginarda generatif çoğaltma yöntemleri genellikle F₁ hibrit çeşitlerin geliştirilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Verim ve kalite açısından daha üstün özelliklere sahip olmaları, birtakım hastalık ve zararlıların taşınmasına ilişkin problemlerin önüne geçilmesinde bir alternatif sunmaları, çoğaltım hızının artırılmasını sağlamaları gibi birtakım avantajlara sahip olmasının yanı sıra bu

yöntemle üretimde açılımlar görülmekte ve çok fazla tercih edilmemektedir (Foury ve Martin 1974; Macua vd. 2000; Ekbiç 2005).

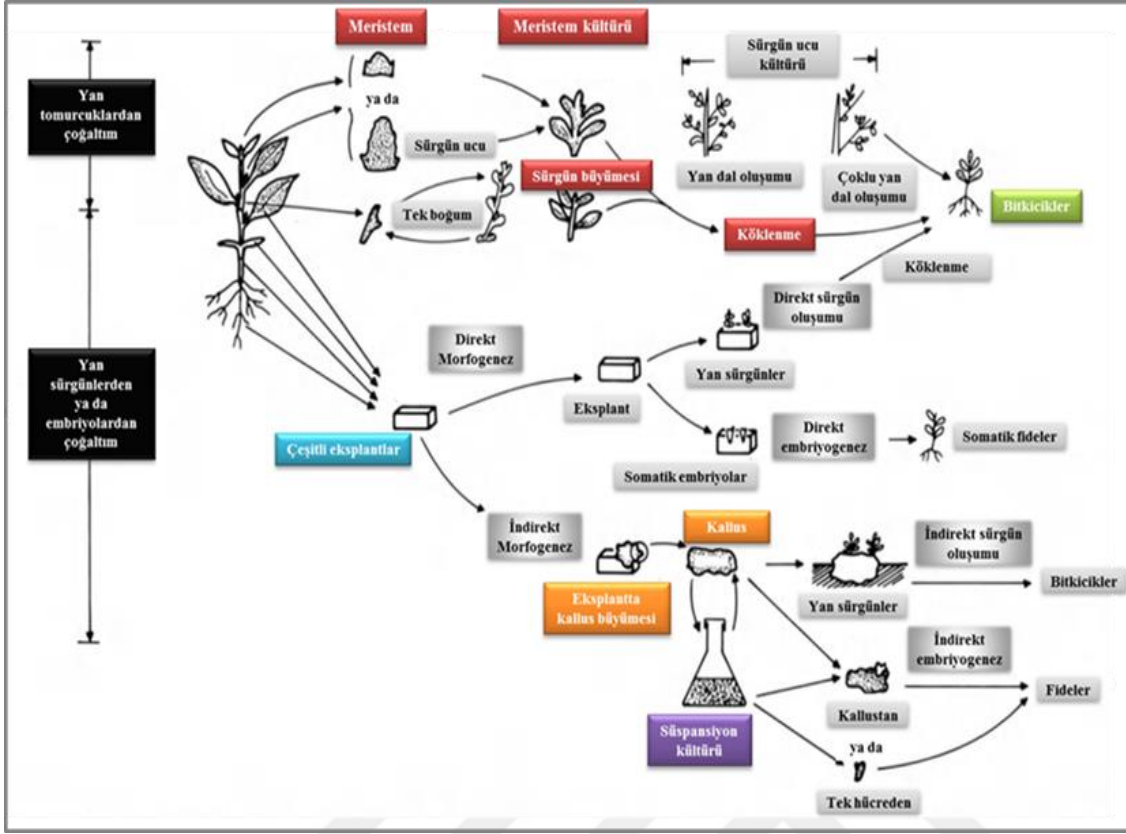
Günümüzde üretim amacıyla ağırlıklı olarak vegetatif çoğaltımın kullanıldığı bilinmektedir. Çoğaltma materyalleri olarak rizom, yarı dormant dip sürgünleri (ovoli), halk arasında ‘piç’ olarak da bilinen dip sürgünlerinden yararlanılmaktadır (Özzambak ve Yoltaş 1988; Eser vd. 2006; Alp 2008). Başlangıç materyali rizom olan çoğaltım yönteminin uygulanması için, rizomların elde edilebilmesi amacıyla mevcut plantasyonlar bozulmalı ve bu şekilde başlangıç materyalleri elde edilmelidir. Bu nedenle bu çoğaltım yöntemi pek fazla tercih edilmemektedir (Rossi ve De Paoli 1992; Alp 2008). Genellikle kullanılan vegetatif çoğaltım yönteminin ülkeden ülkeye değişiklik gösterdiği, Amerika, Fransa ve Mısır’da yapılan enginar üretiminde rizomların (Ryder vd. 1983), İtalya’da ovolilerin, İspanya ve Fransa’da yapılan geleneksel üretimde ise köklü dip sürgünlerinin tercih edildiği rapor edilmiştir (Rossi ve De Paoli 1992; Eser vd. 2006; Alp 2008). Ülkemizde ise enginar bitkilerinden bahar dönemlerinde (ilkbahar ve sonbahar) alınan dip sürgünleri ile yapılan çoğaltma tekniği yaygın olarak uygulanmaktadır (Abak 1987; Ekbiç 2005). Bu yöntemin yanı sıra yarı dormant bitki materyalleri de çoğaltımda kullanılmakta ancak çoğaltım hızı ve katsayısı bakımından tatminkâr sonuçlar vermediği için diğer yöntemlere göre daha az tercih edilmektedir (Uğur 2005).

2.4. *In vitro* Çoğaltma Çalışmaları

Geleneksel olarak uygulanan vegetatif üretimle birlikte birçok araştırmacının da belirttiği üzere birtakım güçlüklerin de söz konusu olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında çoğaltma amacıyla kullanılan ana materyal aracılığıyla bazı hastalık ve zararlıların taşınması, yetiştirme dönemi süresince çoğaltma katsayısının düşük olması ve bu durumun dolaylı olarak genetik ve agronomik gelişimi engellemesi, aynı ana bitkiden alınmasına rağmen sürgünler arasında fizyolojik farklılıkların görülmesi sayılabilir (Ancora 1986; Morzadec ve Hourmant 1997; Bekheet vd. 2014). Bu noktada geleneksel çoğaltım metotlarına alternatif yöntemlerin kullanımı ön plana çıkmakta olup, bunların başında ise *in vitro* teknikler gelmektedir.

Babaoğlu vd. (2001) “bitki doku kültürü” ifadesini; tamamen steril koşullar altında, tüm bir bitkinin, bitkilerden alınan çeşitli dokuların veya apikal meristem, kök vb. organların ya da hücrelerin, hazırlanan yapay besi ortamlarında kültüre alınarak bu bitki kısımlarından yeni doku, bitki ya da metabolitler gibi bitkisel ürünlerin elde edilmesi olarak tanımlamışlardır.

Bitki doku kültürü teknikleri arasında ‘mikroçoğaltım’ yöntemi birçok bitkide uygulanmakta ve başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (Şekil 2.3). Bitkilerin sahip oldukları gizli güç ‘totipotensi’ yeteneği sayesinde, *in vitro* koşullar altında kültüre alınan tohum, sürgün, kök, gövde, kallus, hücre ya da embriyo gibi herhangi bir kısımdan çok sayıda birbirinin aynısı olan yeni bitkilerin hızlı bir şekilde elde edilmesi ‘mikroçoğaltım’ tekniğinin tanımı kapsamındadır (Mansuroğlu ve Gürel 2001).



Şekil 2.3. Mikroçoğaltım tekniğinin farklı bitki materyali ve metotlarda kullanımına ilişkin diyagram (Lindsey ve Jones 1989; Endress 1994'ten uyarlanmıştır)

Bu mikroçoğaltım tekniğinin kullanılmaya başlaması bitki doku kültürünün tarihsel kronolojisinde ilk sıralarda yer almış, bu teknik botanikçi Haberlandt tarafından ilk kez 1902 yılında uygulanmıştır. Sağlıklı bitkilerin klonal çoğaltımına imkân tanıyan mikroçoğaltım tekniği yetiştiricilik ve genetik açıdan birtakım avantajlara sahiptir. Bunlar;

- a. Hastalık ve zararlılardan arı, sağlıklı bitki materyalinin elde edilmesine yardımcı olur,
- b. Kitleli üretimde;
 - Çoğaltımı yapılan bitkilerde hem fenotipik hem de genotipik açıdan homojenite söz konusudur,
 - Üretim hızlıdır,
 - Çoğaltıma verdiği tepki zor olan bitkiler daha kolay üretilebilir,
 - İslah çalışmaları sonucunda elde edilen üstün genotiplerin daha hızlı üretilmesi sağlanabilir,
 - Kısıtlı materyalle çoğaltım yapılabilir,
- c. Çoğaltım esnasında karşılaşılan somaklonal varyasyondan ötürü yeni genotiplerin elde edilmesi söz konusudur (Mansuroğlu ve Gürel 2001).

Birçok bitki doku kültürü tekniğinde olduğu gibi, başarılı bir mikroçoğaltım tekniği uygulanırken de birtakım aşamalardan geçilmekte ve bunları beş basamakta toplamak mümkün olmaktadır (Debergh ve Read 1993; Mansuroğlu ve Gürel 2001). Bu aşamalar;

1. Hazırlık aşaması: Başarılı bir mikroçoğaltım yapılabilmesi için başlangıç materyalinin genotipi, sağlık durumu, fizyolojik durumlarını etkileyen beslenme, ışık, sıcaklık gibi yetiştirilme koşullarının uygunluğu önemlidir.
2. Kültür başlangıç aşaması: Bu aşamada da birçok faktörün etkisi söz konusu olup, bunlar;
 - Uygun eksplantın seçimi,
 - Eksplantların sterilizasyonu,
 - Uygun başlangıç ortamının belirlenmesi,
 - Kültür odasının uygun fiziksel çevreye (sıcaklık, ışık ve nem) sahip olmasıdır.
3. Sürgün çoğaltım aşaması: Bu aşamada farklı besi ortamları kullanılabilceği gibi, başlangıç ortamı olarak uygun görülen besi ortamı da kullanılabilir. Çoğaltma amacıyla kullanılacak olan tür ya da çeşide bağlı olarak kallus oluşumu, adventif tomurcuk oluşumu ya da yaprak koltuklarında bulunan aksiller tomurcuk oluşumu ile sürgün çoğaltımı sağlanabilmektedir.
4. Sürgün gelişimi ve bunu takiben köklendirme aşaması: Bir önceki aşamada elde edilen sürgünler belirli bir yapıya ulaştıktan sonra köklenmelerini sağlamak amacıyla farklı kompozisyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren besi ortamlarına aktarılır.
5. Aklimatizasyon (dış koşullara alıştırma) aşaması: *In vitro* koşullarda çoğaltılan bitkiciklerin *ex vitro* koşullara aktarılması oldukça kritik bir aşamadır. Kontrollü koşullardaki (steril ortam, düşük ışık yoğunluğu, yüksek nem içeriği, ihtiyaç duyulan tüm besin elementlerinin mevcut olduğu) bitkiciklerin dış koşullara (steril olmayan, yüksek ışık yoğunluğu, düşük nem) aktarılmasını takip eden birkaç gün *in vitro* bitkicikler için oldukça hayati önem taşımakta olup, bu nedenle bu süreçte yüksek nemde tutulmaları gerekmektedir.

Mikroçoğaltım tekniği uygulanırken birtakım problemlerle karşılaşılabilir. Bu problemlerin başında vitrifikasyon (camsılaşma) gelmektedir. Sürgün sayısını arttırmak amacıyla belirli bir süre alt kültür yapılmakta, bu süre bitki türü ya da çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Optimum alt kültür sayısı aşıldığında ya da besi ortamı kompozisyonundan (bitki büyüme düzenleyicileri arasındaki denge, mineral maddeler, şeker miktarı ve agar) kaynaklı olarak karşılaşılan fizyolojik bir sorun olarak görülmektedir (Hempel 1985; Mansuroğlu ve Gürel 2001). Mikroçoğaltımda karşılaşılan bir diğer problem ise eksplantların kültüre alınmaları esnasında kesim yüzeylerinden besi ortamlarına nüfuz eden fenolik bileşiklerdir. Bu durumda besi ortamlarında kararmalar meydana gelmekte, toksik etki yaratarak eksplantların gelişimini engellemektedir. *In vitro* teknikler uygulanırken genel bir problem olarak karşımıza çıkan kontaminasyon olayı mikroçoğaltımda da gelişmeyi

oldukça sınırlandırıcı bir durum olup eksplantların yüzeylerindeki mikroorganizmalar kontaminasyona neden olmaktadır.

Kontaminasyonun sebepleri arasında çalışma ortamının steril koşullara uygunluğu ve çalışan kişinin çalışma titizliğinin yanı sıra temel olarak dış koşullarda yetiştirilen bitkilerin hastalık ve zararlı ile bulaşık olup olmama durumu etkindir. *In vitro* kültürlerde en başta dikkat edilmesi gereken husus hastalık ve zararlılardan arı, temiz ve sağlıklı bitki materyali ile kültüre başlanması gerektiğidir. Doğal ortamından toplanan bitkisel materyallere farklı dozlarda çeşitli dezenfektan maddelerin uygulandığı yüzey sterilizasyonu işlemi, etkili bir şekilde yapıldığında bu problem bir noktaya kadar ortadan kaldırılabilir. Bununla birlikte bitkisel materyalden kaynaklı içsel mikroorganizmaların varlığında ya da kültürün ilerleyen zamanlarında da kontaminasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Mikroorganizmaların vegetatif yollarla taşındığı bilinen bir gerçek, bu sebeple mikroçoğaltım tekniği uygulanırken alt kültürler süresince elde edilen bitkiciklerin tümünün hastalık ve zararlılardan arı, sağlıklı bitkicikler olduğunu ileri sürmek pek mümkün olmamaktadır (George 1993). Bu problemin üstesinden gelebilmek amacıyla birtakım yöntemler geliştirilmiş, ‘meristem kültürü’ ve ‘sürgün ucu kültürü’ teknikleri de bu amaca hizmet eden özel *in vitro* kültür teknikleridir.

Hiç şüphesiz bitkilerin farklı hücrelerinde mevcut olan virüs konsantrasyonu farklılık göstermektedir. Virüsle bulaşık olma bakımından en temiz bitkisel materyaller meristematik hücrelerin yoğun bulunduğu bitkilerin meristem dokularıdır. Meristem kültürünün asıl kullanım amacı virüsten arı, sağlıklı çoğaltım materyali elde etmek olmasının yanı sıra bu özel teknik mikroçoğaltım, germplazm muhafazası, uluslararası bitki materyali transferi gibi pek çok amaçla da kullanılmaktadır (George 1993; Bürün 2001).

Çalışmada kullanılan eksplantın büyüklüğüne göre uygulanan yöntemin ismi değişmekte, ‘meristem kültürü’ terimi 0,2 – 1,0 mm uzunluğundaki apikal meristemin (bununla birlikte 1-2 yaprak primordiyasını da içerebilir) kültüre alınmasını ifade ederken; ‘sürgün ucu kültürü’ terimi ise 1,0 mm’den büyük (genellikle 5-10 mm büyüklüğünde) eksplantlar kullanıldığını göstermektedir (George 1993; Bürün 2001; George 2008). Birçok *in vitro* kültür tekniğinde olduğu gibi, başarılı bir meristem kültürü tekniğinin yapılabilmesi için de birtakım koşullar söz konusudur (Bürün 2001). Bunlar;

- Bitkisel materyale ilişkin özellikler
 - *Kullanılacak olan eksplantın büyüklüğü:* Çalışmanın amacına uygun olacak şekilde eksplantın büyüklüğünün belirlenmesi önemlidir. Virüsten arı bitki elde edilmek isteniyorsa oldukça küçük eksplantların kullanılması önerilirken, eğer amaç mikroçoğaltım ise nispeten daha büyük bitki parçaları kullanılabilir.
 - *Ana bitki materyalinin fizyolojik durumu:* Ana bitki materyallerinin aktif büyüme dönemlerinde alınan eksplantlarla başlatılan kültürlerden elde edilen başarı oranı daha fazla olmaktadır.
 - *Mevsim:* Eksplantların alınacağı mevsim, meristem kültüründe başarıyı etkilemektedir.

- *Çeşit:* Farklı genotipler, meristem kültürüne (koşullar aynı olsa bile) farklı tepkiler verebilmektedirler.
- Besi ortamı kompozisyonuna ilişkin özellikler
 - *Mineral tuz farklılığı* (farklı temel besi ortamlarının kullanımı)
 - *Şekerler* (farklı karbon kaynaklarının çeşitli dozlarda kullanımı)
 - *Agar*
 - *Bitki büyüme düzenleyicileri* (çalışılacak olan bitki türüne ve kültürün hangi safhasında olduğuna göre değişiklik gösteren tip ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı)
- Kültürün fiziksel koşullarına ilişkin özellikler
 - *Işık yoğunluğu*
 - *Sıcaklık*
 - *Fotoperiyot*

In vitro yöntemler, geleneksel üretimde karşılaşılan sorunların aşılmasında büyük ölçüde yardımcı olmakta, geniş ölçekli çoğaltım amacıyla kullanılacak hızlı, güvenilir ve gerçekçi alternatif yöntemler olarak görülmektedir (Rey vd. 2013; Campanelli vd. 2014). *In vitro* yöntemler arasında mikroçoğaltım tekniği enginarında ilk olarak De Leo ve Greco (1973) tarafından geliştirilmiştir. Uygulanan mikroçoğaltım tekniğinin ardından, *in vitro* koşullarda köklenmesi diğer bitkilere nazaran biraz daha zor olan enginarında, çeşitli araştırmacılar birçok çalışma yürütmüştür. Uygulanan bu teknikler geleneksel yöntemlerle çoğaltıma güçlü bir alternatif olarak karşımıza çıkmakta, günümüze kadar pek çok çalışmada yer bulmuştur.

Lauzer ve Vieth (1990), enginar tohumlarını *in vitro* koşullarda çimlendirdikten sonra elde ettikleri bitkicikleri başlangıç materyali olarak kullandıkları çalışmada etkili bir mikroçoğaltım sağlamaya çalışmışlardır. Bitki büyüme düzenleyicilerinden BAP'ın farklı dozlarını besi ortamına ekleyen araştırmacılar bununla birlikte 0,5 mg L⁻¹ NAA kullanarak en ideal çoğaltma oranını elde etmişlerdir. Etkili bir mikroçoğaltımın ardından 1 mg L⁻¹ NAA içeren köklenme ortamlarına alınan sürgünlerin 2 ay gibi bir sürenin ardından neredeyse %65'inin köklendiği saptanmış olup, toprak koşullarına alındıklarında köklenen bitkiciklerin adaptasyonunun daha kolay olduğu bildirilmiştir.

Akıncı (1990), enginarında *in vitro* çoğaltma üzerine yaptığı çalışmada meristem kültürü tekniğini kullanmıştır. Çalışmada *in vitro* sürgün gelişimi, *in vitro* kardeşlenme ve *in vitro* köklenme aşamalarında çeşitli dozlarda NAA ve kinetin kullanarak etkileri gözlemlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular incelendiğinde sürgün gelişimi aşamasında 0 mg L⁻¹ NAA, kardeşlenme aşamasında 1 mg L⁻¹ kinetin ve köklenme aşamasında 0,5 mg L⁻¹ NAA konsantrasyonlarının ideal bulunduğu bildirilmiştir.

Yalçın (1992), Sakız enginar çeşidinde *in vitro* köklenme problemini aşmak amacıyla yürüttüğü çalışmada, iki aşamalı ön deney uygulamıştır. İlk ön deneyde ½ MS besi ortamına farklı konsantrasyonlarda (0,5, 2 ve 4 mg L⁻¹) NAA, 4 g L⁻¹ aktif karbon ile birlikte 100 mg L⁻¹ riboflavin eklenmiş, ikinci ön deneyde ise 0,5, 1 ve 2 mg L⁻¹ NAA konsantrasyonları ile birlikte 4 g L⁻¹ aktif karbon kullanılmıştır. Ana deneyde ise besi ortamına çeşitli konsantrasyonlarda (0, 1, 2,5 ve 5 mg L⁻¹) IBA ve NAA ile 4 g L⁻¹

aktif karbon ilave edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde en ideal köklenme oranları $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (%56.3) ve 1 mg L^{-1} NAA (%53.8) varlığında elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan aktif karbonun *in vitro* köklenmeye olan etkisi ise oksin konsantrasyonuna göre değişiklik göstermiş, aktif karbon varlığında kök sayısı azalırken kök uzunluklarında artış gözlemlenmiştir.

Gülen (1992), Sakız enginar çeşidinde *in vitro* çoğaltımın ardından *in vitro* köklendirmeyi arttırmak amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışmada, 5 farklı agar konsantrasyonu uygulaması (0, 4, 8, 12 ve 16 g L^{-1}), 3 farklı karbonhidrat uygulaması (%3 sakkaroz, %3 mannitol ve kontrol) ile kültür kabındaki atmosfer oransal nemini azaltmaya yönelik uygulamalar yapmış, bu uygulamaların yaprak gelişimi üzerine etkilerini araştırmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular, yüksek agar konsantrasyonu ile birlikte kültür kabındaki atmosfer oransal neminin azaltılmasının olumlu etki gösterdiğini, normal yaprak sayısı/bitki, yaprak alanı, kuru madde içeriğinde artış ve stomalarda da hareketlilik gözlemlendiğini bildirmiştir. Elde edilen bulgulara göre ise 12 g L^{-1} agar konsantrasyonunun *in vitro* kök gelişimi için ideal olduğu, köklendirme aşamasının son 5 gününde kültür kaplarının kapaklarının yerine filtre kağıtları kullanımının da köklendirmeye olumlu etki sağladığı bildirilmiştir.

Iapichino (1996), enginar bitkisinin toprak altında gelişen organlarından (ovoli) *in vitro* kültür tekniklerini kullanarak çoğaltma yapmayı amaçlamıştır. Bu amaca ulaşmak için farklı büyüme düzenleyicilerini (BA ve NAA) farklı konsantrasyonlarda (BA için $0,5, 1$ ve 2 mg L^{-1} ; NAA için $0, 0,1$ ve $0,2 \text{ mg L}^{-1}$) besi ortamına ekleyerek etkinliklerini değerlendirmiştir. Çalışmanın sonucunda sürgün oluşumunu teşvik etmesi bakımından en etkili besi ortamı kombinasyonunun 0 mg L^{-1} NAA + 1 mg L^{-1} BA olduğunu tespit eden araştırmacı, bu sürgünlerin köklenmeleri için $\frac{1}{2}$ MS + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ IAA besi ortamı kombinasyonuna aktarmış ve 5 hafta gibi bir sürede sürgünlerin %60'nın köklenmesini sağlamıştır.

Morzadec ve Hourmant (1997), *in vitro* koşullarda enginar bitkiciklerinin çoğaltımını takiben *in vitro* köklenmeleri üzerine araştırma yürütmüşlerdir. Çalışmada oksinin hâkim olduğu ($2,68 \text{ } \mu\text{M}$ NAA) köklenme besi ortamında, 3 farklı konsantrasyonda GA_3 ($2,9, 14,4, 28,8 \text{ } \mu\text{M}$) eklenmesinin bitki materyallerinin köklenmelerini artırma potansiyeli üzerine denemelerini kurmuşlardır. Çalışmadan elde edilen verilere bakıldığında yüksek oranda ($28,8 \text{ } \mu\text{M}$) GA_3 kullanımının önemli bir farklılık yaratmadığı, bununla birlikte $14,4 \text{ } \mu\text{M}$ GA_3 kullanıldığında %92,3 oranında kök gelişimi sağlandığı bildirilmiştir. Ayrıca $2,9 \text{ } \mu\text{M}$ GA_3 ilave edilen besi ortamında köklenme yüzdesinin %80,5 olduğu tespit edilirken, özellikle yüksek köklenme oranları elde edilen bu iki GA_3 konsantrasyonlarının bulunduğu besi ortamlarında oluşan kök sayılarında da artış sağlandığı rapor edilmiştir.

Brutti vd. (2000), erkenci enginar çeşidinde *in vitro* çoğaltım üzerine yaptıkları çalışmada, başlangıç materyali olarak kullandıkları sürgün parçalarını 10 mg L^{-1} 2ip, 2 mg L^{-1} kinetin, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren modifiye edilmiş MS besi ortamında kültüre almışlardır. Çoğaltılan sürgünlere 3 mg L^{-1} NAA ile birlikte siklodektrin uygulaması yapılmış ve çalışmanın sonucunda bu uygulamanın köklenme yüzdesi üzerine pozitif etkisini oldukça fazla gördüklerini ifade etmişlerdir.

Fortunato vd. (2005), enginar bitkisinde yaptıkları çalışmada, 2 yaşındaki ana bitki materyalinden aldıkları eksplantları kullanarak bir çalışma yürütmüşlerdir. Belirli büyüklükteki sürgün uçlarını başlangıç materyali olarak kullanan araştırmacılar, bu bitki parçalarını MS makro elementleriyle NN mikro elementleri ve çeşitli oranlarda farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren (1 mg L^{-1} 2ip, 1 mg L^{-1} IAA, $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ GA₃) besi ortamında kültüre almışlardır. 3 hafta süresinde bu besi ortamında gelişen sürgünlerin çoğaltılması amacıyla, kültür başlangıcından 3 hafta sonra $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ BAP içeren besi ortamına alınmış ve 3 kez alt kültür işlemi yapılmıştır. Ardından çoğaltılan bu sürgünler *in vitro* köklenmelerinin sağlanması için 2, 5 ya da 10 mg L^{-1} gibi farklı konsantrasyonlarda farklı oksinler (IAA, NAA, IBA) içeren besi ortamlarına transfer edilmiştir. Çalışmada bir de mikoriza uygulamasının köklenme üzerine olası etkileri de değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre, *in vitro* köklenme besi ortamında 10 mg L^{-1} IAA bulunmasının en iyi sonuçları verdiğini, bununla birlikte mikoriza uygulamasına tabi tutulan sürgünlerin uygulama yapılmayanlara göre daha başarılı aklimatizasyon aşaması geçirdiği belirtilmiştir.

Elia vd. (2007), enginarda *in vitro* çoğaltım üzerine yürüttükleri çalışmada, uyguladıkları iki farklı yüzey sterilizasyonu protokolünün etkileriyle birlikte mikroçoğaltım etkinliğini araştırmışlardır. *In vitro* çoğaltmanın başlangıç aşamasında ve çoğaltım aşamasında farklı düzeylerde hormon konsantrasyonları içeren besi ortamları kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda elde ettikleri verilere dayanarak araştırmacılar, GA₃ varlığında bile yüksek konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımının gerekli olmadığını bildirmişlerdir.

Pacifici vd. (2007), enginarda mikroçoğaltma esnasında birtakım faktörlerin (besi ortamı bileşenleri, kültür kaplarında havalanma durumu) mikroçoğaltım üzerindeki olası etkilerini inceledikleri bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada besi ortamı olarak MS temel besi ortamı kompozisyonunu tercih eden araştırmacılar, hem tam güçlü hem de yarı güçlü MS besi ortamını denemişlerdir. Bu besi ortamlarının her ikisinde de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ BA + $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ GA₃ ekleyerek mikroçoğaltım etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bunun sonucunda yarı güçlü MS besi ortamının daha uygun olduğunu bildiren araştırmacılar, mikroçoğaltımın ardından köklenme durumuna bakmışlardır. Köklenme aşamasında ise sürgün eksplantlarına 48 saat ön uygulama yapılmış olup bu amaçla 20 mg L^{-1} IAA ile 20 mg L^{-1} NAA birlikte kullanılmıştır. 48 saat süren 40 mg L^{-1} oksin uygulamasının ardından eksplantlar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen tam güçlü ve yarı güçlü MS besi ortamlarına alınmıştır. Bu süre zarfında kültürler havalandırması olan ve olmayan kültür kaplarında tutularak, kültür kaplarındaki havalandırma durumunun olası etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda araştırmacıların bildirdiği üzere, her iki besi ortamı için de geçerli olarak, havalandırması daha az olan kültür kaplarındaki bitkiciklerde kök sayıları fazla tespit edilirken, havalandırmanın nispeten daha fazla olduğu kültür kaplarında ise oluşan köklerin uzunlukları daha fazladır. Tüm bunların sonucunda ise araştırmacılar, köklenen bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması aşamasında besi ortamı ile birlikte fiziksel çevre koşullarının da oldukça etkili olduğu görüşündedirler.

Alp vd. (2010), enginar bitkisinde yaptıkları çalışmada, *in vitro* koşullarda kültüre alınan sürgünleri farklı sterilizasyon uygulamalarına tabi tutarak *in vitro* gelişen sağlıklı bitki oranını arttırmaya çalışmışlardır. Çalışmadan elde edilen bulgular

değerlendirildiğinde yüzey sterilizasyonu esnasında fungusit eklenmesinin yanısıra, *in vitro* kültürde kullanılan besi ortamına eklenen 100 mg L^{-1} konsantrasyonunda gümüş nitratın da sağlıklı gelişen sürgün sayısında artış sağladığı bildirilmiştir.

Cavallaro vd. (2010), meristem kültürü tekniğini kullanarak farklı enginar çeşitlerinde *in vitro* çoğaltım çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmada genotip etkisinin yanı sıra çeşitli besi ortamı jelleştirici ajanların (çeşitli agarlar, agaroz ve gelrite) olası farklılıkları da ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar, kullandıkları farklı jel yapıcı maddelerin enginarlarda mikroçoğaltım etkinliğini etkilediğini, tek bir eksplanttan elde edilen sürgün sayılarında farklılıklar görüldüğünü bildirmişlerdir.

El Boullani vd. (2012), Fas'a özgü bir enginar aksesyonunun *in vitro* çoğaltım potansiyelini arttırmaya yönelik çalışma yürütmüşlerdir. Enginar tohumları önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş, ardından *in vitro* çimlendirilmeleri sağlanmıştır. Çimlenmeyi takip eden ayda, buradan elde edilen bitki parçaları *in vitro* çoğaltım amacıyla başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Başlangıçta MS besi ortamının makro ve mikro elementleri ile Gamborg B5 besi ortamının vitaminleri 1 mg L^{-1} IBA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ GA₃ eklenerek hazırlanan besi ortamı kombinasyonunda kültüre alınan bitki parçaları, çoğaltımın devamlılığı amacıyla daha sonra yine aynı temel besi ortamı kombinasyonunda fakat bu sefer 1 mg L^{-1} kinetin + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren kombinasyonda çoğaltılmıştır. Bahsi geçen çoğaltma besi ortamında (1 mg L^{-1} kinetin + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA) iyi bir rejenerasyon etkinliği yakaladıklarını belirten araştırmacılar, ışık yoğunluğuyla birlikte eksplant dikim sıklığını da azalttıklarını ve bunun sonucunda çoğaltım katsayısında da artış sağladıklarını rapor etmişlerdir.

Bedini vd. (2012) yaptıkları çalışmada, İtalya'da yetiştirilen dört farklı çeşidin *in vitro* çoğaltımı üzerine çalışmışlardır. Enginar bitkilerine ait eksplantlar öncelikle başlangıç ortamında kültüre alınmış daha sonra çoğaltma ortamına oradan da köklenme ortamına transfer edilmiştir. Başlangıç ortamı için nitrat konsantrasyonu $\frac{1}{4}$ oranında azaltılmış MS ortamı ile birlikte $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ BA + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ IBA bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonunu kullanmışlardır. Ardından bitkicikler $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ BA + $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ GA₃ içeren çoğaltma ortamına alınmıştır. Bitkicikler köklenmeleri amacıyla önce, $\frac{1}{2}$ oranında azaltılmış nitrat konsantrasyonu içeren MS ortamı + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IAA + 1 mg L^{-1} PBZ besi ortamında 2 hafta bekletilmiştir. Köklenmenin ikinci aşamasında ise MS + 2 mg L^{-1} β -siklodekstrin + 2 mg L^{-1} NAA içeren ortamda yaklaşık dört hafta bekletilmiştir. Çalışmanın sonucunda enginarlarda mikroçoğaltım aşamasının başarılı bir şekilde yürütüldüğü ancak *in vitro* köklenmenin hala çözülmesi gereken bir problem olduğu belirtilmiştir.

El-Zeiny vd. (2013), enginarlarda *in vitro* çoğaltımın ticari ölçekte yapılabilirliğini değerlendirmek amacıyla çalışma yapmışlardır. İki aşamalı olarak çalışmalarını yürüten araştırmacılar, ilk aşamada enginarın mikroçoğaltımı için 2-5 cm boyutundaki sürgünleri kültüre almışlar ardından ikinci aşamada ise gelişen sürgünlerin *in vitro* kök oluşumunu araştırmışlardır. Çalışma esnasında mikroçoğaltım için farklı konsantrasyonlarda ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ile 10 mg L^{-1} arasında değişen miktarlarda) BA ve kinetin kullanılmış olup, yüksek konsantrasyonların sürgün sayısı bakımından daha etkili olduğu, bununla birlikte yine yüksek konsantrasyonların kallus oluşumunu da

tetiklediği bildirilmiştir. Ayrıca alt kültür sayıları ile sürgün oluşturulma potansiyeli arasında da ilişki bulunmuştur. Alt kültür sayısı belirli bir süreye kadar arttığında oluşan sürgün sayısında artış yaşanırken, sürgün uzunluğunda azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. *In vitro* köklenme aşamasını etkileyen faktörler arasında bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonlarının yanı sıra köklenme besi ortamında aktif kömür bulunup bulunmaması da yer almaktadır. Çalışmadan elde edilen veriler ışığında IAA ile IBA'nın köklenme üzerine etkileri karşılaştırıldığında oluşan kök sayısı ve uzunluğunun IBA bulunan ortamlarda daha iyi olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde aktif kömür ihtiva eden besi ortamlarında da kök oluşumları olumlu etkilenmiştir.

Bekheet vd. (2014), Green Globe enginar çeşidinde etkili ve güvenilir bir *in vitro* çoğaltım tekniği geliştirmeye çalışmışlardır. Çalışmada başlangıç materyali olarak *in vitro* koşullarda çimlendirdikleri sürgünlerden aldıkları kotiledonları kullanan araştırmacılar, bu bitki parçacıklarını MS + 2 mg L⁻¹ BA içeren besi ortamında kültüre alarak çoğaltımını sağlamışlardır. Araştırmacılar çalışmanın bir diğer kısmında ise yine *in vitro* geliştirdikleri bitkiciklerden aldıkları yaprak, petiol ve gövde parçalarını da farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında kültüre alarak kallus elde etmeyi amaçlamışlardır. Kallus oluşumuna verdikleri tepki bakımından yaprak eksplantının üstünlüğü olduğunu, en iyi kallus elde edilen besi ortamı kombinasyonunun ise MS + 5 mg L⁻¹ kinetin + 0,5 mg L⁻¹ IAA olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte bu besi ortamına 3 mg L⁻¹ oranında ilave edilen pikloram, kallus gelişimi ve ağırlığı açısından en ideal sonucu vermiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında ise, elde ettikleri kalluslardan indirekt organ oluşumunda en etkili besi ortamı birleşimi MS + 2 mg L⁻¹ kinetin + 2 mg L⁻¹ NAA olduğu ifade edilirken, direkt organ oluşumunda MS + 1 mg L⁻¹ BA + 2 mg L⁻¹ NAA besi ortamı içeriğinin üstün olduğu tespit edilmiştir. BA ile kinetin besli ortamlarında bulunmalarının *in vitro* oluşan sürgünlerin birtakım özellikleri (uzun/kısa sürgün veya çoklu sürgün oluşumu) üzerine etkilerinin farklılık gösterdiği de çalışmada saptanan etkiler kapsamındadır.

Campanelli vd. (2014), enginarda mikroçoğaltım tekniğiyle mikoriza uygulamasının birlikte kullanılmasının etkinliği üzerine bir çalışma yapmışlardır. Başlangıç materyali olarak kullandıkları 5-6 mm uzunluğundaki sürgün uçlarının gerekli yüzey sterilizasyonları tamamlandıktan sonra başarılı bir *in vitro* çoğaltım uygulaması yapılmıştır. *In vitro* koşullarda gelişen bitkicikler belirli birtakım özelliklere (4-5 cm uzunluğunda birkaç kökü ve 4-6 yaprağı olan 6-8 cm uzunluğunda bitkicikler) sahip olduktan sonra dış koşullara aktarılmıştır. Dış koşullara alınan bu bitkiciklere fungus uygulaması yapılarak değerlendirilmeler yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda ise bitkiciklere fungus uygulanmasının pozitif etkiler yarattığı görüşünü bildirmişlerdir.

López-Pérez ve Martínez (2015), *in vitro* çoğaltımları yapılan enginar bitkiciklerinin köklenme potansiyellerini arttırmaya yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Öncelikle 3 farklı çeşitte, farklı konsantrasyonlarda (0, 1,4, 4,2, 7, 14, 28, 42 µM) kinetin kullanımının *in vitro* sürgün gelişimini ve mikroçoğaltım açısından etkilerini değerlendirmişlerdir. Buna göre 1,4 µM gibi düşük bir konsantrasyonda kinetin kullanıldığında etkili sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmanın bir sonraki aşamasında ise köklenmenin artırılması amacıyla 3 farklı uygulama yürüten araştırmacılar, ilk uygulamada 6 mg L⁻¹ NAA ya da 6 mg L⁻¹ IBA ekledikleri köklenme

ortamında 5 gün boyunca sürgünleri karanlık koşullarda bekletmiştir. İkinci uygulamada, bahsi geçen bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonlarına daldırılıp çıkarılan sürgünler dış koşullara aktarılmış, fotoperiyot koşullarında 20 gün boyunca bekletilmiştir. Üçüncü uygulamada ise çift aşamalı bir protokol izleyen araştırmacılar, önce diğer uygulamalardaki gibi sürgünleri aynı bitki büyüme düzenleyicileri ve oranlarına sahip besi ortamında kültüre alarak burada 5 gün boyunca fotoperiyot koşullarında tutmuş, ardından MS-0 besi ortamında 15 gün boyunca aynı koşullarda kültürün devamlılığını sağlamıştır. Çalışmadan elde ettikleri verilere bakıldığında, köklenme yüzdelerinin çeşitlere göre farklılık göstermekle birlikte %73,3 ile %93,3 arasında değiştiğini, yapılan köklenme uygulamaları arasında ise 6 mg L⁻¹ IBA eklenen besi ortamlarında 5 gün karanlıkta bekletmenin çeşitlerin köklenme potansiyellerini arttırdığı söylenebilir. Araştırmacılar, bu çalışmada tespit ettikleri düşük kinetin konsantrasyonunun ve karanlık koşulların olumlu etkilerinin *in vitro* köklenme için kritik olduğunu, bu şekilde elde edilen köklü bitkiciklerin dış koşullarda hayatta kalma şanslarının da yüksek olduğunu (%75-83) rapor etmişlerdir.

Ercan (2016), ülkemize özgü çeşitler olan Sakız ve Bayrampaşa enginar çeşitlerinin *in vitro* çoğaltımlarını takiben köklenme yüzdelerinin artırılmasına yönelik çalışmıştır. Ana bitki materyali olarak 4 yaşındaki bitkiler kullanılırken, mikroçoğaltımın ardından farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenen besi ortamı kombinasyonlarında köklenme potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla köklenme üzerine IBA ve NAA etkilerini görmek için 0, 0,1, 0,4, 0,8, 1 mg L⁻¹ konsantrasyonları, GA₃ etkisini belirlemek için 0, 1, 5, 10 mg L⁻¹ konsantrasyonları eklenmiştir. Bununla birlikte köklenme ortamında 1 g L⁻¹ aktif kömür olup olmamasıyla köklenmeye verilen tepki ve yine farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2,5, 5 mg L⁻¹) jasmonik asit putresin eklenen besi ortamlarında kök oluşum durumu da değerlendirilmeye alınmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre Sakız ve Bayrampaşa çeşitlerinin köklenme potansiyellerinin farklılık gösterdiği, Sakız çeşidinde köklenme oranının %63,35, Bayrampaşa çeşidinde ise %36,60 olduğu belirtilmiştir. Araştırmacıya göre çalışmadan elde edilen bu köklenme oranları en iyileri olup, bu köklenme yüzdeleri 5 mg L⁻¹ GA₃ ile 1 mg L⁻¹ aktif kömür besi ortamında birlikte kullanıldığında elde edilmiştir.

El Boullani vd. (2017), enginarda mikroçoğaltım üzerine yürüttükleri çalışmada farklı eksplant boyutlarının ve bunların besi ortamlarına dikim sıklıklarının olası etkileri üzerine araştırma yapmışlardır. *In vitro* çoğaltma besi ortamı 1 mg L⁻¹ kinetin ve 1 mg L⁻¹ NAA kombinasyonundan oluşurken, kültür ortamlarına farklı sayılarda (3, 4, 6 ve 7 sürgün) dikilmiştir. Bununla birlikte çalışmada değerlendirmeye alınan sürgünler de farklı boyutlardadır (<1 cm, 1-1,5 cm, 1,5-2 cm, >2cm). Çalışmadan elde edilen verilere bakıldığında, enginar sürgünlerinin *in vitro* çoğaltımı için en uygun sürgün boyutu 1-1,5 cm (%100 sürgün oluşumu), bir kültür kabında bulunması en ideal sürgün yoğunluğu ise 4 eksplant olarak saptanmıştır.

Pandino vd. (2017a), *in vitro* tekniklerin uygulanmasıyla hastalıkların elimine edilmesinden bitki gelişimine ve biyoaktif bileşenlerin üretimine kadar geniş bir yelpazede ticari boyutta gelişmeler sağlandığını ifade eden araştırmacılar, biyoaktif bileşenlerce zengin enginar bitkisinde bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada mikroçoğaltım teknikleri uygulanan ve uygulanmayan (klasik yetiştiricilik yapılan)

enginar bitkiciklerine mikoriza uygulamasının etkileri değerlendirilmiştir. *In vitro* çoğaltılan bitkiciklere mikoriza uygulanmasının ardından yapılan aznalizler sonucunda, bu bitkiciklerin diğerlerine kıyasla daha yüksek biyoaktif bileşen (özellikle kafeoilkinik asitler) içeriği sergilediği tespit edilmiştir.

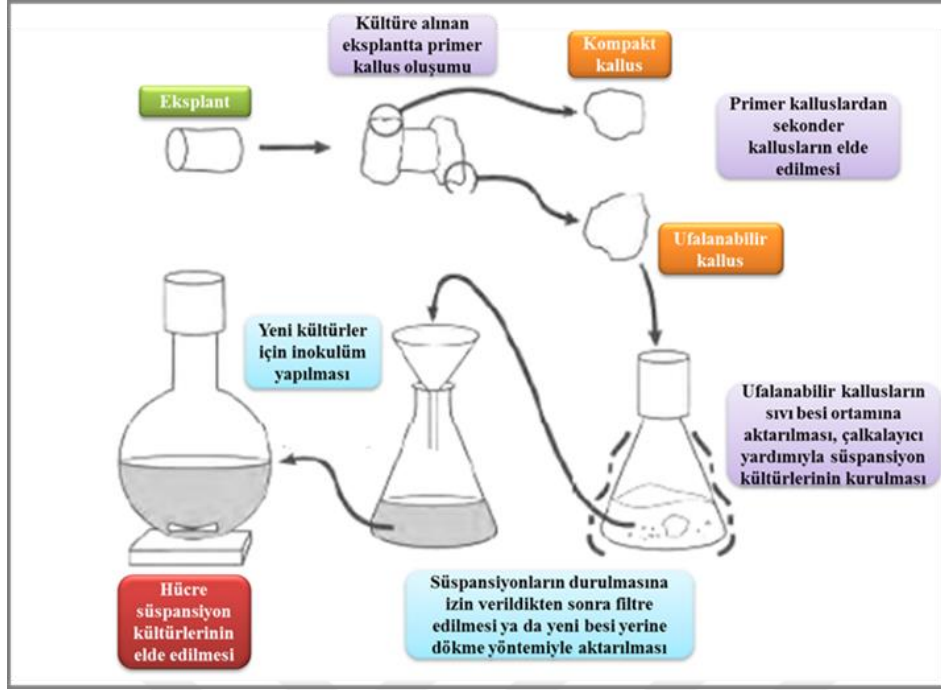
2.5. Kallus - Hücre Süspansiyon Kültürü ve Elisitör Uygulamalarına Yönelik Çalışmalar

Bahsedilen meristem ve sürgün ucu kültürleri genellikle organize olmuş ve farklılaşmış hücre kültürleri olarak ifade edilmektedir. Diğer bir kültür şekli ise organize olmamış ve farklılaşmamış hücrelerin kültürüdür. Bu kültürlerin başlıca uygulamaları 'kallus' ve 'hücre süspansiyon' kültürleridir.

Kallus, bölünme yeteneği devam eden eksplantların donör bitkilerden alınarak aseptik koşullar altında birtakım uyarıcıların (bitki büyüme düzenleyicileri, mikroorganizma ya da çeşitli stresler) varlığında kültüre alınması sonucunda oluşan morfolojik olarak düzensiz ya da farklılaşmamış dokular olarak açıklanmaktadır (Sökmen ve Gürel 2001; George 2008).

In vitro kültüre alınan çeşitli bitki parçaları potansiyel olarak kallus üretme yeteneğine sahip olup, bazı dokuların bu potansiyelleri daha yüksektir. *In vitro* kültüre alınacak olan bitki kısımlarının bitkideki konumları ve fizyolojik durumları önemli görülmekte, genellikle genç bitki dokularının daha fazla meristematik hücreye sahip olmasından ötürü etkili bir kallus kültürünün başlatılmasında güçlü bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir (Endress 1994; George 2008). Bununla birlikte biyoaktif bileşenlerin üretimine de imkân tanıyan kallus ve hücre süspansiyon kültürlerini başlatmak amacıyla kullanılan eksplantların alındığı bitki kısımları da önem taşımaktadır. Hedef biyoaktif bileşenin yoğun olduğu bitki kısımları kullanılarak *in vitro* kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılması, kültür süresince elde edilen potansiyel biyoaktif bileşen için avantaj sağlayacaktır (Sökmen ve Gürel 2001).

Bitkilere ait organize olmamış dokular yukarıda bahsedildiği gibi 'kallus' olarak geliştirilebilirken, 'hücre süspansiyon kültürü' tekniğinde ise bu kallusların ('friable' = ufalanabilir/dağılabilir özellikteki kalluslar) sıvı ortamlarda dağılmaları, homojen hale gelmeleri sağlanabilir (Şekil 2.4). Hücre süspansiyon kültürü tekniğinde, kallus tekniğinde olduğu gibi çeşitli bitki parçaları başlangıç materyali olarak kullanılabilir. Ancak başlangıç materyali olarak kallusların kullanılması, organize olmamış bu dokular daha önceden *in vitro* koşullara adaptasyon sağladığından dolayı avantajlı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 2.4. Kallus ve hücre süspansiyon kültürü aşamalarının şematik gösterimi (George 2008'den uyarlanmıştır)

Kallus kültürleri başlatıldığında, kullanılan eksplanttan elde edilen ilk kallus 'primer kallus' olarak ifade edilmektedir. Ardından primer kallus dokusundan 'sekonder kalluslar' elde edilebilmektedir. Hem kallus hem de süspansiyon kültürleri, uzun yıllar alt kültüre alınarak sürdürülebilir potansiyellerine sahiptir. Kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde morfolojik ve genetik açıdan bir örnek hücrelerin elde edilmesinin yanı sıra buna bağlı olarak kültürler arasında homojenlik sağlamak oldukça önemlidir. Ancak alt kültürlerin sayısındaki artışa bağlı olarak elde edilen homojenite risk altına girmektedir (Sökmen ve Gürel 2001; George 2008).

In vitro kültür tekniklerin çoğunda olduğu gibi bu iki özel teknik kullanılarak başarılı bir süreç geçirilmek isteniyorsa birtakım faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Kültürlerde elde edilmek istenen farklılaşma, organogenez ya da değerli biyoaktif bileşenlerin üretimini teşvik etmek ya da istenilen yöne yönlendirmek amacıyla çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda uygulanabilmektedir. Bu noktada özellikle oksin ve sitokinin arasındaki denge oldukça önemlidir. Belirlenen bu denge ile kalluslardan kök ya da sürgün gibi belirli bitki organlarının oluşumu teşvik edilebilmektedir. Oluşan bu organlarda biriken sekonder metabolit miktarlarında ise çoğu zaman farklılıklar görülmekte, kimi zaman organ oluşumu ile birlikte sekonder metabolit miktarı artarken, kimi zaman da azalmaktadır. Bu noktada hücre süspansiyon kültürleri kallus kültürlerine göre daha avantajlı sistemler olarak görülmektedir. Bu avantajlar arasında; hücre süspansiyon kültürlerinde büyümenin daha hızlı olması ve dolayısıyla kütle verimliliği arttığı için hücre verimliliğinde de artış sağlanması, morfolojik açıdan daha homojen hücrelerin elde edilmesi ve dolayısıyla varyasyon riskinin ortadan kalkması, arzu edilen özelliklerdeki hücre hatlarının seçimine imkân tanınması sayılabilir. Dolayısıyla bu kadar çok pozitif

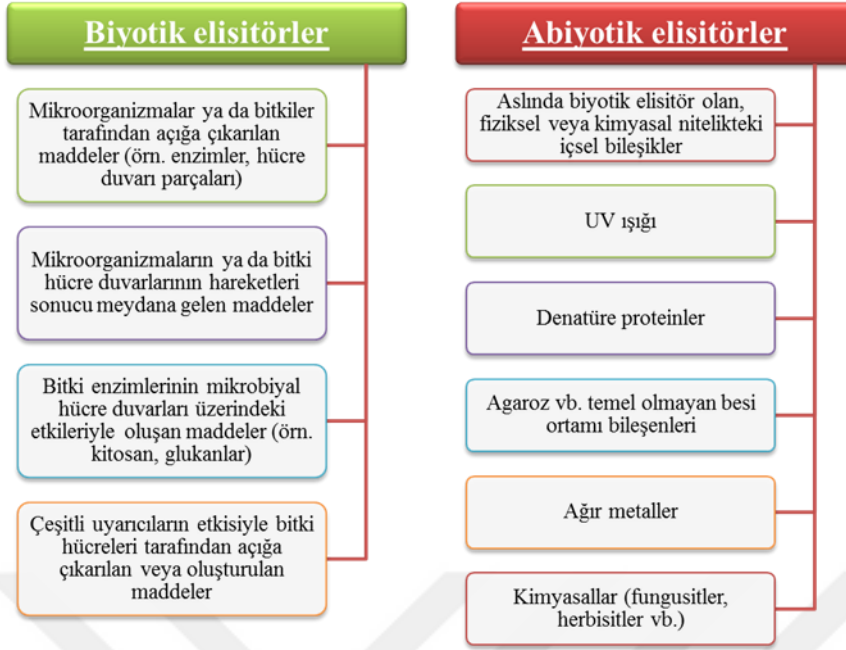
yönü olan bu teknik, değerli biyoaktif bileşenlerin üretiminde diğer tekniklere nazaran daha ön plana çıkmaktadır (Sökmen ve Gürel 2001).

Değerli biyoaktif bileşenler doğal olarak bitkilerde mevcut olmakla birlikte hücre süspansiyon kültürü tekniği kullanılarak da üretimleri söz konusudur. Günümüzde sekonder metabolitlerin hızlı ve etkin bir şekilde üretimi daha çok kallus ve hücre kültürleri yöntemleriyle sağlanmaktadır. Buradaki en önemli problem, hedef biyoaktif bileşenin miktarının birtakım faktörlerden etkilenmesi ve istenilen seviyede üretilmemesidir. Diğer *in vitro* kültür tekniklerinde olduğu gibi sekonder metabolit üretiminde de çalışılan bitkinin türü ve çeşidi oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra bitkisel koşullar (donör hücre ve doku ile sekonder metabolit ilişkisi), besi ortamının koşulları (karbon, azot ve fosfor kaynağı, bitki büyüme düzenleyicileri, besi ortamı kompozisyonu, pH, osmotik basınç), kültür ortamının dışındaki ışık, sıcaklık ve havalandırma gibi birtakım fiziksel çevre koşulları da sekonder metabolit üretimini etkilemektedir. Bahsi geçen bu faktörlere ek olarak *in vitro* süspansiyon kültürlerinde genel anlamda verimi (hem bitki doku ve hücrelerinin büyümesinin, hem de hedef biyoaktif bileşenin üretiminin artırılmasını) sağlamak amacıyla birtakım uygulamalar geliştirilmiştir. Öncüller, elisitörler, tutuklama, senkronize kültürler ve iki aşamalı kültürler bu uygulamalar arasında yer almış ve son yıllarda en dikkat çeken uygulama elisitörler olmuştur.

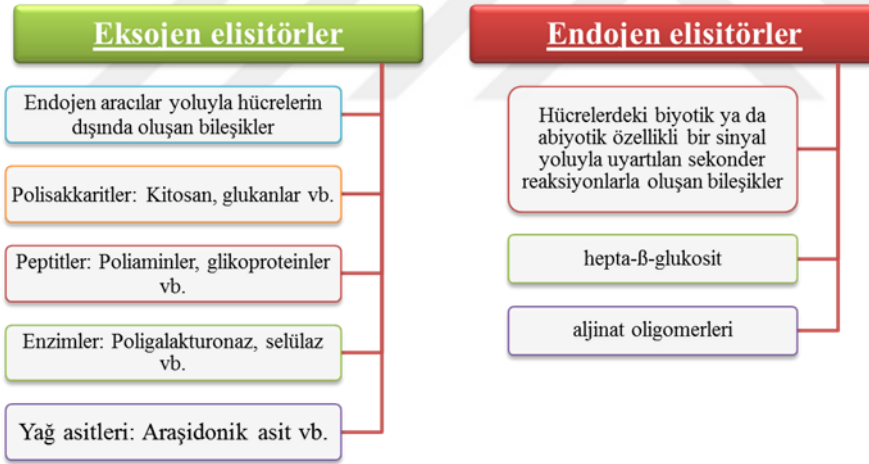
Bitkilerin, herhangi bir saldırı ile karşı karşıya kaldıklarında kendi savunma mekanizmalarını devreye sokabilmeleri amacıyla, salgıladıkları fitoaleksinlerin¹ ve bu bileşiklerin salgılanmasından sorumlu enzimlerin sentezini sağlamakla yükümlü genlerin tetiklenmesi gerekmektedir. ‘Elisitör’, bitkilerin saldırıya uğramaya yakın olduklarını bildiren sinyaller ya da bitki hücrelerine çok az miktarlarda bile dahil olduklarında biyoaktif bileşenlerin üretimini tetikleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır (Namdeo 2007; Wink 2009). ‘Elisitasyon’ ise tüm bu sürece verilen isimdir.

Elisitörlerin sınıflandırılması farklı şekillerde olmakla birlikte; doğalarına göre sınıflandırıldıklarında abiyotik ve biyotik elisitörler, orijinlerine göre sınıflandırıldıklarında ise eksojen ve endojen elisitörler olarak gruplandırılmaktadır (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6) (Namdeo 2007).

¹ **Fitoaleksinler (phytoalexins):** Adını Yunanca’da ‘*phyton*’ = bitki ve ‘*alexis*’ = savunma kelimelerinin birleşiminden alan fitoaleksinler, aslında bitkilerin sekonder metabolizmasında antibiyotik olarak etkili olan düşük molekül ağırlığına sahip bileşikler olup, bitkilerin herhangi bir patojenik organizma ile temas ettiğinde kendilerini savunma amacıyla meydana getirdikleri bileşiklerdir.



Şekil 2.5. Elisitörlerin doğalarına göre sınıflandırılması (Namdeo 2007'den uyarlanmıştır)



Şekil 2.6. Elisitörlerin orijinlerine göre sınıflandırılması (Namdeo 2007'den uyarlanmıştır)

Elisitörler, hedef biyoaktif bileşenin birikimini etkilerken, farklı parametrelerden etkilenmektedirler. Kullanılan elisitörün konsantrasyonu, elisitöre maruz kalma süresi, elisitör uygulanacak olan kültürün yaşı, besi ortamı kompozisyonu gibi faktörler, arzu edilen sekonder metabolit miktarında farklılıklar yaratabilmektedir (Namdeo 2007).

Kısaca özetlemek gerekirse, *in vitro* koşullarda farklı bitki kısımlarının çeşitli besi ortamı kombinasyonlarında ve farklı stres faktörleri altında kültüre alınmaları sonucunda düzensiz bir morfolojik yapıya sahip dokular meydana gelmekte ve bu

dokular kallus olarak adlandırılmaktadır. Katı besi ortamlarında elde edilen kalluslar sıvı besi ortamlarında kültüre alındıklarında ise süspansiyon kültürleri başlatılabilmektedir. Bu iki *in vitro* teknik, *in vitro* bitki rejenerasyonunda indirekt yolla duruma dahil olurken, bu teknikler aynı zamanda bitkilerde doğal olarak var olan ancak oldukça az miktarlarda birikim gösteren değerli sekonder metabolitlerin üretimi açısından da önemli bir potansiyele sahiptir. Ayrıca yine bu tekniklerin uygulanması esnasında elisitörler adı verilen birtakım farklı özelliklerdeki uyarıcıların da kültürlere dahil edilmesi sonucunda, arzu edilen sekonder metabolitin üretim miktarında değişiklikler yaratılabilmektedir. Bu teknikler kullanılarak yapılan çalışmalar geçmişten günümüze kadar enginar ve diğer birçok tıbbi ve aromatik bitkide uygulanmakta olup, ziraat, gıda, farmakoloji gibi temel alanlarda önemini her geçen gün arttırmaktadır.

Ordás vd. (1990), enginarda *in vitro* rejenerasyon amacıyla yaptıkları çalışmada, oldukça genç aşamada topladıkları braketlerden sürgün rejenerasyonu sağlamışlar ve ardından kallus oluşumuna yönelik bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarını denemişlerdir. Araştırmacıların belirttiği üzere en başarılı kallus oluşum ortamının sahip olduğu bitki büyüme düzenleyicileri 5 mg L^{-1} NAA + 2 mg L^{-1} BAP kombinasyonu olmuştur. Kültür ortamında yaklaşık 5 hafta sonra meydana gelen sürgünlerin uzamasını sağlamak amacıyla farklı bir kombinasyonda bitki büyüme düzenleyicilerini ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) içeren besi ortamına transfer edilmiş ve burada başarı yakalanmıştır.

Ordas vd. (1991), enginarda hücre süspansiyon kültürü tekniğini uygulayarak protoplast izolasyonu üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar protoplast verimini birçok faktörün etkilediğini belirtmişlerdir. Yine hücre duvarı rejenerasyonu ve hücre bölünmesinin de birtakım faktörlere bağlı olduğu görüşündedirler. Bu faktörler arasında hücrenin yaşı, enzim kompozisyonu ve kültür yoğunluğu bulunmaktadır. Araştırmacılar ilk hücre bölünmesini kültürün 4-6. gününden sonra gözlemlemişler ve hücreleri katı ortama aktardıklarında yeşil kalluslar elde etmişlerdir. Elde ettikleri bu kalluslardan globular yapıda oluşumlar gözlemlediklerini bildiren araştırmacılar bu oluşumlardan daha ileri bir gelişme kaydedemediklerini bildirmişlerdir.

Rijhwani ve Shanks (1998), özellikle antikanser özellik gösteren alkaloidlere sahip *Catharanthus roseus* bitkisinde *in vitro* saçak kök kültürleri başlatarak, bu kültürlere eklenecek olan elisitörlerle bu önemli alkaloidlerin üretimlerinin artırılma potansiyeli üzerine bir çalışma yapmışlardır. Elisitör olarak pektinaz ve jasmonik asit kullanan araştırmacılar, bu elisitörleri farklı konsantrasyonlarda uygulamışlardır. Daha sonra uygulama konsantrasyonları ve elisitasyona maruz kalma sürelerini değerlendirmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri bulgulara göre, jasmonik asidin oldukça etkili bir elisitör olduğu ve değerlendirilmeye alınan alkaloidlerin miktarlarında oldukça iyi artışlar sağladığı bildirilirken, bazı alkaloidlerin miktarındaki artışın jasmonik asit konsantrasyonu ile paralel şekilde olduğu rapor edilmiştir.

Zhang vd. (2002), yapmış oldukları çalışmada *Vitis vinifera* süspansiyon kültürlerinde biyoaktif bileşen sentezini arttırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada jasmonik asit ya da ışığın, süspansiyon kültüründe tetikleyebileceği olası etkileri değerlendiren araştırmacılar, $20 \mu\text{M}$ jasmonik asit eklenen kültür ortamlarında kültürün 7. gününde kontrole kıyasla 8,5 kat antosiyanin artışı tespit etmişlerdir. Işığın etkisini

değerlendirdiklerinde ise en fazla etkiyi kültürün 10. gününde 6,8 kat antosiyanin artışı olarak belirlemişlerdir. Bununla birlikte jasmonik asit ile ışığın birlikte kombine edilerek kullanılması sonucunda asma hücre süspansiyon kültürlerinin 7. gününde yine kontrol ortamı ile karşılaştırıldığında 13,9 kat daha fazla antosiyanin oluşumu belirlediklerini rapor etmişlerdir.

Gürel vd. (2002), şeker pancarı ıslah hatlarından kallus ve hücre süspansiyon kültürleri eldesi, ardından bu hücre süspansiyon kültürü kökenli kalluslardan bitki rejenerasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu amaçla BAP ve 2,4-D büyüme düzenleyicilerinin farklı oranlarını denemişlerdir. Belirli aralıklarla (0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15 gün) süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin büyüme oranlarını inceleyen araştırmacılar, başlangıçta gerçekleşen gelişmenin yavaş olduğunu fakat 15. günde oldukça yüksek oranda biyokütle birikimi oluştuğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca kullandıkları bitki büyüme düzenleyicileri oranlarındaki artışa paralel olarak hücre bölünmesinde de artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Üstün vd. (2004), *in vitro* koşullarda üç farklı biber genotipine ait bitkilerden aldıkları hipokotil eksplantlarını hücre süspansiyon kültürlerinde başlangıç materyali olarak kullandıkları çalışmada, çeşitli uyarıcıların kapsidiol birikimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada maya ekstraktı, selüloz, jasmonik asit, hidrojen peroksit ve salisilik asidin etkileri değerlendirilmiştir. Kapsidiol birikimi elisitör uygulamalarından 24 saat ve 48 saat sonra belirlenmiş, en fazla kapsidiol miktarı selüloz ve *A. alternata* elisitörleri ile muamele edilen kültürlerde tespit edilmiştir.

Sánchez-Sampedro vd. (2005), *Silybum marianum* bitkisinin hücre kültürlerinde maya ekstraktı, kitin ve kitosanın silimarin üretimi üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmada, sadece maya ekstraktının etkisini tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra metil jasmonatın varlığında silimarin birikiminin olumlu yönde etkilendiği de bildirilmiştir.

Trajtemberg vd. (2006), yabancı enginar bitkisinde yürüttükleri çalışmada sinarin ve klorojenik asit gibi önemli biyoaktif bileşenlerin miktarlarının belirlenmesini amaçlamışlardır. Genç yabancı enginar yapraklarını eksplant olarak kullanmayı tercih eden araştırmacılar, bu eksplantları 4,4 μM BA + 16,1 μM NAA içeren MS besi ortamında kültüre alarak kallus elde etmişlerdir. Elde ettikleri kallusların ve yabancı enginar yapraklarının kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Gerekli analizlerin sonucunda yaprak eksplantlarının ve kallusların antioksidan aktivitelerinin kültürün 3. gününe kadar benzer sonuçlar sergilediğini, bununla birlikte kültürün ilerleyen günlerinde kallus ekstraktının antioksidan kapasitesinin yaprak eksplantından daha az olduğu belirlenmiştir.

Cimino vd. (2006), *Asteraceae* familyasında yer alan deve dikenini (*Silybum marianum* L. Gaertn.) bitkisinde kallus kültürlerinin oluşturulmasını amaçlamışlardır. Çalışmada Gamborg B5 temel besi ortamına 0,05 mg L^{-1} BA + 0,5 mg L^{-1} 2,4-D ekleyen araştırmacılar, deve dikeninin kallus kültürleri için bu oksin:sitokinin dengesinin oldukça ümitvar olduğu kanısındadırlar.

Uslu Kıran vd. (2007), *Verticillium dahliae* fungusuna dayanıklı ve duyarlı patlıcan genotiplerini kullanarak, *in vitro* kallus kültürlerinde üç farklı konsantrasyonda,

24, 48 ve 72 saat sürelerince elisitör uygulaması yapmışlardır. Solavetivon birikimi ile *V. dahliae* fungusuna dayanıklılık arasındaki ilişkiyi ortaya koymayı amaçlayan araştırmacılar, 2 ml elisitör uygulamasının 72 saat sonra yapılan ölçümlerinde ve yabani patlıcan türünün kallus dokularında solavetivon birikiminin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Vázquez-Flota vd. (2009), *Catharanthus roseus* bitkisinde bazı *in vitro* tekniklerden ve elisitörlerden yararlanarak alkaloit birikiminin sağlanmasını hedeflemişlerdir. Hücre süspansiyon kültürü tekniği, saçak kök tekniği ve köksüz sürgünlerin kültüre alınması yoluyla yürütülen bu çalışmada değerlendirilen alkaloit miktarları ile elde edildiği kültürler arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Metil jasmonat ve etilenin genel anlamda olumlu etkilerini gözlemlediklerini, ancak salisilik asidin herhangi bir etkisinin görülmediğini bildirmişlerdir.

Wiktorowska vd. (2010), hücre süspansiyon kültürü tekniğini kullanarak *Calendula officinalis* bitkisinde oleanolik asit birikimi ve hücre büyümesini araştırmışlardır. Çalışmada farklı elisitörler, farklı dozlarda ve sürelerde hücre kültürlerine uygulanmıştır. Farklı dozlarda hücre kültürlerine eklenen elisitörlerin olası etkilerini gözlemek amacıyla 4 gün boyunca her 24 saatte bir yaptıkları gözlem ve analizlerle en uygun elisitörün en uygun dozu ve uygulama zamanını saptamayı amaçlamışlardır. Araştırmacılar, elisitörlerin etkilerinin birbirlerinden farklı olduğunu, etki dozlarının ve uygulama zamanlarının da farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Oleanolik asit birikimi bakımından uyguladıkları elisitörler incelendiğinde jasmonik asidin en etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, 100 µM jasmonik asidin uygulamadan 72 saat sonra, 50 mg L⁻¹ kitosanın 48 saat sonra, 200 mg L⁻¹ maya ekstraktının 96 saat sonra ve 2 mg L⁻¹ pektinin ise 48 saat sonra en etkili sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte uygulanan elisitörlerin hücre büyümesini az da olsa engellediğini rapor etmişlerdir.

Donnez vd. (2011), asma hücre kültürlerinde elisitör kullanımıyla önemli biyoaktif bileşenlerden olan resveratrol ve viniferinlerin üretimi üzerine çalışmışlardır. Elisitör uygulamaları amacıyla metil jasmonatı tercih eden araştırmacılar, kültürün 5. gününden sonra kültür ortamlarına 0,2, 0,4 ve 1 µM konsantrasyonlarında metil jasmonat eklemişlerdir. Resveratrol üretiminde optimum metil jasmonat konsantrasyonu belirlemek amacıyla, kültürleri 10 gün boyunca gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar çalışmadan elde ettikleri bulguları değerlendirdiklerinde 0,2 µM metil jasmonat kullanımıyla en yüksek resveratrol verimini (150 mg L⁻¹) elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Coste vd. (2011), *Hypericum hirsutum* ve *H. maculatum* bitkilerinin sürgün kültürleriyle ilgili bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar, bu bitkilerin *in vitro* büyümelerinin yanı sıra, elisitör kullanımının bitkide mevcut olan biyoaktif bileşenlerin birikimini değerlendirmişlerdir. Farklı bitki büyüme düzenleyicilerin (BA, kinetin, 2iP, TDZ ve NAA) kullanıldığı bu çalışmada, elisitör olarak jasmonik asit ve salisilik asidin etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, besi ortamlarına BA ve kinetin eklendiğinde her iki türde de ilgili biyoaktif bileşenlerde artış görülürken, TDZ'nin tam tersi etki ettiği ve bu bileşenlerin miktarlarında azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra çalışmada kullandıkları elisitörleri karşılaştırdıklarında, salisilik asidin ilgili biyoaktif bileşen birikiminde jasmonik asitten daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Menin vd. (2012), enginar bitkisinde kallus üretimi amacıyla yürüttükleri çalışmada, üç farklı genotiple çalışmışlardır. Eksplant olarak enginar yapraklarından yararlanan araştırmacılar, elde ettikleri kallus etkinliğinin oldukça iyi (%100) olduğunu ve bu etkinliği 7 gün gibi kısa bir sürede elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kallus eldesinden sonra *Agrobacterium tumefaciens*'e ait bir ırktan yararlanarak yaprak eksplantlarında genetik transformasyon sağlamışlar, GUS gen markırını kullanmışlardır. *Agrobacterium tumefaciens* ile transformasyona uğrattıkları yaprak parçalarından elde ettikleri kallusların histokimyasal analizleri sonucunda %30'unun GUS aktivitesine olumlu tepki verdiği bildirilmiştir.

Krzyzanowska vd. (2012), *Lamiaceae* familyasında yer alan nane bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerinde jasmonik asit ve metil jasmonat ile elisitasyonun, diğer bitkilerde olduğu gibi nanede de yaygın bir şekilde bulunan rosmarinik asit birikimi üzerine olan etkilerini değerlendirmişlerdir. Bununla birlikte elisitörlerin hücre gelişimi üzerine olan etkilerine de bakılmıştır. Bu amaçla her iki elisitör için üç farklı konsantrasyon dozu (50, 100 ve 200 μM) kullanılmış ve kültür başlangıcından 7 gün sonra kültür ortamlarına eklenmiştir. Elisitörlerin ve dozlarının etkilerini değerlendirmek amacıyla 0, 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süre aralıklarıyla hücreler toplanmış, yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiş ve gerekli kromatografik analizler yapılmıştır. Bunun sonucunda araştırmacılar, elisitör uygulanmayan kültürlerle karşılaştırdıklarında sırasıyla kültürlerle ilave edilen 100 μM metil jasmonatın 24 saat sonra, 200 μM jasmonik asidin ise 48 saat sonra toplanmasıyla rosmarinik asit birikimi bakımından en iyi sonuçları aldıklarını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, jasmonik asit ve metil jasmonat uygulamalarının sonucunda hücrelerin biyokütlelerinde azalmalar olduğu da rapor edilmiştir.

Giri vd. (2012), nadir bulunan şifalı bir bitki olan Himalaya orkidesinde kallus süspansiyon kültürlerini oluşturmayı, bu kültürlerden bu değerli bitkinin sahip olduğu biyoaktif bileşenlerin üretimini amaçlayan bir çalışma yürütmüşlerdir. *In vitro* koşullarda kültüre aldıkları tohumlardan elde ettikleri kallusları, kütle artışı amacıyla ayda bir alt kültüre almış ve sıvı besi ortamına adapte edilmiştir. Ardından farklı konsantrasyonlarda benziladenin (0 – 3 μM) ve metil jasmonat (10 – 1000 μM) eklenen besi ortamlarında gözlemler yapılmış, kallus gelişimiyle birlikte biyoaktif bileşenler ve antioksidan kapasiteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen verilere göre araştırmacılar, 1 μM benziladenin bulunan besi ortamında en ideal kallus büyümesinin görüldüğünü, fenolik bileşiklerin miktarıyla antioksidan kapasitesinin ise benziladeninin farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ve ideal benziladenin konsantrasyonunun 3 μM olduğunu belirtmişlerdir.

Ruta vd. (2013), enginar braktelerini başlangıç materyali olarak kullanarak kallus oluşumuna ve sekonder metabolit birikimine yönelik yaptıkları çalışmada, 3 farklı bitki büyüme düzenleyicisini (NAA, BAP, GA₃) çeşitli konsantrasyonlarda besi ortamına ilave etmişlerdir. Eksplantların gerekli yüzey sterilizasyonlarının ardından, belirtilen bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarının bulunduğu besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Kallus oluşumunu tetiklemek amacıyla oksin kullanımının önemini vurgulayan araştırmacılar, düşük konsantrasyonlarda birlikte kullanılan bu bitki büyüme düzenleyicileriyle birlikte karanlık ortam koşullarında

kültüre alınan eksplantların kallus oluşturma potansiyellerinin oldukça iyi olduğunu belirtmişlerdir.

Menin vd. (2013), enginar da *in vitro* tekniklerden yararlanarak kallus kültürlerini oluşturmuşlar, ardından kafeoilkinik asitlerin üretimini araştırmışlardır. Kallus kültürlerini oluşturmak ve devam ettirmek amacıyla birçok faktörün etkisini (bitki büyüme düzenleyicileri, ışık rejimi ve genotip farklılığı) değerlendirdikleri çalışmada, 100'den fazla besi ortamı kombinasyonu denemişlerdir. Kallus kültürünü oluşturabilmek amacıyla meristem kültüründen elde ettikleri bitkiciklerin yaprak eksplantlarını başlangıç materyali olarak kullanan araştırmacılar, kültür başlangıcından 7 gün sonra etkili bir kallus protokolü belirlediklerini ifade etmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri verilere dayanarak, tıpkı *in vivo* enginar yapraklarında olduğu gibi kallus kültürlerinin HPLC analizleri sonucunda ortaya çıkan en yüksek fenolik asit miktarlarının mono- ve di- kafeoilkinik asitler olduğunu rapor etmişlerdir. Bu sonuçlara ek olarak, di-kafeoilkinik asit miktarının *in vivo* enginar yapraklarındakine kıyasla *in vitro* kallus kültürlerinde daha fazla olduğu (5 kata kadar), elisitör olarak UV-C'nin etkisinin ise biyoaktif bileşenlerin miktarında daha da artış sağlayabileceğini bildirmişlerdir.

Ali vd. (2013), *Asteraceae* familyasındaki şifalı bitkilerden biri olan *Artemisia absinthium* L. (pelin otu) bitkisinin yapraklarından kallus süspansiyon kültürlerini başlatarak değerli biyoaktif bileşenlerinin üretimini amaçlamışlardır. Kallus elde etmek amacıyla farklı bitki büyüme düzenleyicilerini kullanan araştırmacılar, biyokütlede meydana gelen artışla birlikte oluşan sekonder metabolitlerin miktarlarını değerlendirmişlerdir. Kallus kültürünün ardından hücre süspansiyon kültürlerini oluşturmuşlar ve kültürün büyüme kinetiğiyle birlikte yine sekonder metabolit miktarlarını tespit etmişlerdir. HPLC yardımıyla yapılan analizlerin sonucunda ise hücre süspansiyon kültürlerinin sahip olduğu sekonder metabolit miktarlarının ve antioksidan kapasitelerinin daha yüksek olduğunu ve dolayısıyla değerli sekonder metabolitlerin üretim potansiyellerinin hücre süspansiyon kültürlerinde daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Lim vd. (2013), elisitörler yardımıyla hücre süspansiyon kültürlerinde *Lamiaceae* familyasında yer alan *Orthosiphon stamineus* bitkisinde mevcut olan fenolik bileşiklerle birlikte antioksidan kapasitelerindeki değişimi üzerine çalışmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan maya ekstraktı, sükroz, NaCl, kitosan ve kazein hidrolizatın hücre süspansiyon kültüründeki etkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada, 150 mg L⁻¹ kitosan ilave edilen besi ortamında bulunan *O. stamineus* bitkisine ait hücre süspansiyonunun fenolik bileşen içeriğinde ve antioksidan aktivitesinde artışlar görüldüğü bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada ana bitki materyalinin, *in vitro* bitkiciklerin, elisitör uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin fenolik bileşen içerikleri ile antioksidan aktiviteleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş olup, elisitasyon sürecinden geçen hücrelerin diğerlerine kıyasla oldukça olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmiştir.

Bekheet vd. (2014), karaciğer hastalıklarına iyi geldiği bilinen enginar ve deve diken bitkilerinin kallus kültürlerine yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Kallus elde etmek amacıyla yaprak eksplantlarından yararlanan araştırmacılar, besi ortamlarına

farklı dozlarda (1, 2, 3 ve 4 mg L⁻¹) ekledikleri pikloram maddesinin yanı sıra yine farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 75 ve 100 µM) ekledikleri salisilik asit ve jasmonik asidin kallus gelişimi üzerinde etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, kültür ortamlarına 3 mg L⁻¹ pikloram, 75 µM salisilik asit ve 50 µM jasmonik asit eklenmesi her iki bitki türünden elde edilen kallusların büyüme değerleri için ideal bulunmuştur. Araştırmacılar ayrıca antioksidan aktivitesi bakımından enginarın deve dikenine kıyasla daha güçlü potansiyele sahip olduğunu da belirtmişlerdir.

Joshaghani vd. (2014), enginarlarda kallus kültürlerini oluşturmak amacıyla yaptıkları çalışmada, belirledikleri bitki büyüme düzenleyicisinin farklı konsantrasyonlarının, birtakım besi ortamlarının ve farklı eksplant tiplerinin kallus eldesinde olası etkilerini değerlendirmeyi hedeflemişlerdir. Üç farklı besi ortamı (MS, B5 ve SH) ile birlikte bu besi ortamlarına ilave ettikleri farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D (0, 0,5, 0,75, 1 mg L⁻¹) bitki büyüme düzenleyicisinin etkisini değerlendirdikleri bu çalışmada kök, yaprak ve petiol eksplantları kullanılmıştır. Çalışmadan elde ettikleri bulgulara dayanarak bitki büyüme düzenleyicisi eklenmeyen besi ortamında kallus gelişimi saptamadıklarını, 1 mg L⁻¹ 2,4-D ilave edilen kültür ortamında ise en iyi kallus oluşumunu gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar, kallus oluşumunda hem kullanılan eksplant tipinin hem de besi ortamının önemini vurgulamış olup, yaprak eksplantı ve B5 besi ortamının diğerlerine kıyasla daha iyi tepki verdiğini rapor etmişlerdir.

Çetin ve Göktürk Baydar (2014), üç farklı üzüm çeşidi kullanarak yaptıkları çalışmada, kallus hücre süspansiyon kültürlerinde farklı elisitörlerin etkilerini araştırmışlardır. Farklı dozlarda uyguladıkları kadmiyum sülfat, metil jasmonat ve sükrozun olası etkilerinin yanı sıra, floresan radyasyonunun etkisini de değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, fenolik bileşikler, antosiyanin ve flavanol içerikleri bakımından çeşitler bazında uygulanan elisitörler ile dozları dikkate alındığında önemli farklılıklar tespit etmiş olup, fenolik bileşiklerin üretiminin arttırılmasına yönelik olarak denedikleri elisitörlerin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Ahmed ve Baig (2014), 'Babchi' olarak da bilinen önemli bir tıbbi bitki olan *Psoralea corylifolia* L. bitkisinin yaprak eksplantlarını kullanarak kallus kültürleri oluşturmaya yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada çeşitli fungal ve maya eksrakları ile değişik konsantrasyonlarda hazırlanan kitosan kullanılarak psoralen maddesinde meydana gelecek olan değişimler gözlemlenmiştir. Araştırmacılar hücre kültürlerini 16 gün boyunca sürdürmüşler ve çalışmanın sonucunda 16 saat ışık 8 saat karanlık periyot altında psoralen maddesinin sentezinde artış olduğu tespit etmişlerdir. Psoralen miktarındaki artışı en fazla tetikleyen elisitör *A. niger* olduğunu belirten araştırmacılar, bu uygulama ile kontrole kıyasla 9 kat artış sağladıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmada değerlendirilmeye alınan diğer elisitörlerin ilgili biyoaktif maddenin birikimine etkisini de gözlemleyen araştırmacılar, bu elisitörlerin de kontrole kıyasla 4 – 7 kat arasında psoralen birikimini etkilediğini tespit etmişlerdir.

Tanoori vd. (2015), enginar kallus kültürlerinde metil jasmonat ve salisilik asit kullanımının farmakolojik özelliklerine olası etkilerini gözlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla *in vitro* koşullarda çimlendirdikleri tohumlardan

gelişen bitkiciklerden aldıkları petiolleri eksplant olarak değerlendiren araştırmacılar, 2 mg L⁻¹ BA ve 5 mg L⁻¹ NAA ilave edilen MS besi ortamında kallus oluşturmak amacıyla kültüre almışlardır. Bu besi ortamı kombinasyonunda geliştirilen kallusların fenolik bileşen ve flavonoid içeriklerinin miktarca arttırmaya yönelik olarak metil jasmonat ve salisilik asidin farklı konsantrasyonlarını (0, 25, 50, 100 ve 200 µM) elisitör olarak denemişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri bulgular ışığında araştırmacılar, salisilik asidin kullanılan farklı konsantrasyonlarının enginar kallus ekstraktlarında en yüksek fenolik bileşen içeriğinin ve antioksidan aktivitesinin elde edilmesini teşvik ettiğini ifade etmişlerdir.

Hariprasath vd. (2015), *Asteraceae* familyasında yer alan, ‘melek kanatları’ olarak da bilinen *Senecio candicans* DC endemik bitkisinin biyoaktif bileşenlerini ve antioksidan kapasitesini, farklı metotlar kullanarak ortaya koymayı amaçlamıştır. Bu bitkinin *in vivo* yapraklarının ve *in vitro* elde edilen kalluslarının antioksidan aktiviteleri değerlendirildiğinde, *in vivo* yaprakların daha güçlü antioksidan kapasitesine sahip olmakla birlikte, antioksidan kapasiteleriyle biyoaktif bileşen içeriklerinin birbirine benzer değerler gösterdiğini belirtmişlerdir.

Siva vd. (2015), dikkate değer birçok farmasötik özellikler sergilediği bilinen *Psoralea corylifolia* L. tıbbi bitkisinde elisitör kullanımının psoralen üretimindeki etkilerini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. Elisitör olarak jasmonik asidin 5 farklı konsantrasyonunun (50, 100, 150, 200, 250 µM L⁻¹) denemeye alındığı bu çalışmada, genel olarak yapraklarında ve köklerindeki psoralen miktarında artış yaşandığını gözlemlemişlerdir. Psoralen birikimini artırması bakımından jasmonik asidin uygun konsantrasyonu olarak ise 150 µM L⁻¹ belirlenmiştir.

Perassolo vd. (2016), *Rubiaceae* familyasında yer alan 2 türde hücre süspansiyon kültürleri yoluyla, değerli sekonder metabolitlerden biri olan antrakınonların üretimine yönelik çalışmışlardır. Çalışmada 2 farklı elisitörü (metil jasmonat ve siklodekstrin) farklı dozlarda kullanarak bunların sekonder metabolit üretimindeki etkileşimlerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmadan elde ettikleri bulgulara dayanarak *Rubiaceae* familyasında yer alan bu değerli bitkilerin hücre süspansiyon kültürlerinde başarı sağladıklarını, metil jasmonat ile siklodekstrinin birlikte kullanılmasıyla da antrakınonların üretiminde artış yarattıklarını bildirmişlerdir.

Veraplakorn (2016), sağlığa yararlı birçok özelliğe sahip şifalı bir bitki olan *Lantana camara* L. (ağaç minesesi) bitkisinin *in vitro* potansiyeline yönelik bir çalışma yürütmüştür. Çalışmada etkili bir sürgün çoğaltımı, kök ve kallus oluşumu için *in vitro* teknikler kullanılmıştır. Araştırmacı MS besi ortamına ilave ettiği büyüme düzenleyicilerden benziladeninin sürgün oluşumunda, yine MS besi ortamına eklenen IBA’in *in vitro* kök oluşumunda etkili olduğunu belirtirken, kallus oluşumunda ise farklı konsantrasyonlarda NAA ve BA kombinasyonunun daha etkin olduğunu bildirmiştir.

Manivannan vd. (2016), değerli sekonder metabolitlere sahip önemli bir bitki olan *Scrophularia kakudensis* üzerine yaptıkları çalışmada, bitkinin yapraklarını başlangıç materyali olarak kullanarak kallus hücre kültürlerini başlatmışlardır. Temel besi ortamı olarak MS, bitki büyüme düzenleyicileri olarak ise 3 mg L⁻¹ BA ile 2 mg L⁻¹ 2,4-D kullanımının yanı sıra araştırmacılar, birtakım elisitörlerden (metil jasmonat,

salisilik asit, sodyum nitroprusit) de yararlanmışlardır. Çalışmanın sonucunda bu tıbbi bitki için kallus süspansiyon kültürü kullanımının uygun olduğunu, yüksek oranlarda metil jasmonat kullanımıyla da antioksidan kapasitesinin arttırılabileceği yönünde görüş bildirmişlerdir.

Schmidt–Durán vd. (2016), tropikal dağ böğürtleninin *in vitro* koşullarda kallus oluşumu ve hücre süspansiyon kültürlerine dair bir çalışma yürütmüşlerdir. Değerli biyoaktif bileşenleri içermesinden ötürü birçok açıdan insan sağlığı için oldukça yararlı olduğu bilinen böğürtlenin yaprak parçalarından kallus eldesi amacıyla 2,4-D'nin çeşitli konsantrasyonları kültür ortamına eklenmiştir. Çalışmada kontrol besi ortamı dahil 7 farklı konsantrasyon (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 mg L⁻¹) denenmiş olup, bu konsantrasyonlar arasında 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D en ideal bulunmuştur. En büyük kallusun elde edildiği bu 2,4-D konsantrasyonu ile kallus kültürünün ardından hücre süspansiyon kültürlerine geçen araştırmacılar, elde ettikleri bulguları farklı biyoteknolojik yöntemlere de adapte edilebileceği kanısındadırlar.

Zaragoza-Martínez vd. (2016), sahip olduğu önemli biyoaktif bileşenlerden ötürü biyodizel üretimi ve tıp alanında kullanım potansiyeline sahip olan *Jatropha curcas* bitkisinde hücre süspansiyon kültürlerini başlatmışlar ve elisitör uygulaması yapmışlardır. Elisitör olarak jasmonik asidin farklı konsantrasyonlarını değerlendiren araştırmacılar, kültür başlangıcından sonra 12. günde en iyi biyokütle birikimini elde ettiklerini, 7. günde kültür ortamına ekledikleri 200 µM jasmonik asidin ise triterpen birikimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte çalışmada değerlendirmeye aldıkları çeşitli biyoaktif bileşenlerin (betulin, betulinik asit, lupeol) jasmonik asit elisitasyonundan farklı sürelerde ve farklı konsantrasyonlarda etkilendiklerini ortaya koymuşlardır.

Salem vd. (2017), enginarın yapraklarını eksplant olarak kullandıkları çalışmada temel biyoaktif bileşenlerin analizini yaparak enginarın sağlığı iyileştirici özelliklerini ortaya koymaya çalışmışlardır. Farklı metotlar uygulayarak antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitesini belirlemeye çalışan araştırmacılar, çalışmada denemeye aldıkları tüm metotlarda enginar yapraklarının yüksek fenolik bileşen miktarı, flavonoid ve taninlere sahip olmakla birlikte kuvvetli antioksidan özellikler gösterdiğini bildirmişlerdir.

Enginar bitkisinin sağlığı iyileştirici birtakım özellikler göstermesinin ardında yatan sebeplerden birinin sahip olduğu biyoaktif bileşenler olduğunu belirten Pandino vd. (2017a), bu biyoaktif bileşenlerin eldesinde *in vitro* süspansiyon kültürlerinin olası etkilerini araştırmışlardır. Antosiyanin üreten ve üretmeyen olarak iki farklı süspansiyon kültürü başlatan araştırmacılar, toplam polifenol miktarı, toplam antosiyanin içeriği ve antioksidan özelliklerini belirlemeyi amaçlamıştır. Belirledikleri parametreleri değerlendirmek amacıyla 25 gün kültürleri devam ettirmişler ve 25. günde kültürleri değerlendirdiklerinde en iyi polifenol birikiminin bu günde olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri bulgulara dayanarak, antosiyanin üreten hücre süspansiyonlarında antosiyanin üretmeyen hücre süspansiyon kültürüne ve kalluslara kıyasla daha fazla biyoaktif bileşen birikimini saptadıklarını bildirmişlerdir. Dolayısıyla araştırmacılar, enginar hücre süspansiyon kültürlerinin endüstriyel ölçekte kullanılabilme potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu savunmaktadırlar.

Anjum vd. (2017), keten bitkisinde *Linum usitatissimum* L. *in vitro* tekniklerin yardımıyla farmakolojik açıdan önemli biyoaktif bileşenlerin üretiminin sağlanmasını araştırmışlardır. Özellikle bu bitkinin sahip olduğu değerli biyoaktif bileşenlerden olan lignanların üretimini arttırmayı hedefleyen araştırmacılar, çalışmada çeşitli konsantrasyonlarda (0,5 – 5 mg L⁻¹) bitki büyüme düzenleyicilerinin (NAA, TDZ, BA) keten kallus kültüründe etkilerini değerlendirmişlerdir. Doğal ortamından topladıkları keten tohumları *in vitro* koşullarda sterilizasyonu sağladıktan sonra çimlendirilmiş, ardından bu bitkiciklerden alınan gövde ve yapraklar eksplant olarak kullanılmıştır. Gövde ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların antioksidan aktiviteleri, biyokütle birikimleri, fenolik bileşenler ve flavonoidlerin üretimi karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, yapraklardan elde edilen kalluslarda biyokütle ve antioksidan aktiviteleri daha üstün bulunurken, gövdeden elde edilen kalluslarda ise fenolikler ve flavonoidler daha üstün bulunmuştur. Bitki büyüme düzenleyicilerinin keten bitkisi kalluslarından lignanların üretimindeki etkinlikleri değerlendirilmeye alındığında ise her iki eksplant için de 1 mg L⁻¹ konsantrasyonunda kullanılan NAA diğerlerine nazaran daha etkili bulunmuştur.

El-Bahr vd. (2018), enginar bitkisinde yaptıkları çalışmada, enginarın kallus kültürlerini oluşturmuşlar ve ardından farklı konsantrasyonlarda elisitör olarak etefon kullanmışlardır. Araştırmacılar, oluşturdukları kallus kültürlerine 45, 90 ve 180 µL L⁻¹ etefon eklemiş ve bu elisitörün etkilerini farklı zamanlarda (6, 9, 12, 15, 18 ve 21 gün) hasat ettikleri hücrelerin analizini yaparak gözlemlemişlerdir. Elisitörle muamele edilen kallusların büyümeleri incelendiğinde genel anlamda artış görülmüştür. Bununla birlikte kallus ağırlığı bakımından değerlendirildiğinde, elisitör konsantrasyonunun artışıyla kallus ağırlığında azalma tespit etmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri diğer bulgulara bakıldığında, en yüksek fenolik bileşen miktarı ile en kuvvetli antioksidan ve antiviral özelliklerin görüldüğü elisitör konsantrasyonu ve süresinin farklı olduğunu saptamışlardır. Buna göre 90 µL L⁻¹ konsantrasyonunda kullanılan etefonun olduğu kültürler 12. günde hasat edildiğinde en yüksek fenolik bileşen oranını verirken, 180 µL L⁻¹ etefon ile muamele edilen kültürler 15. günde hasat edildiğinde en kuvvetli antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra en iyi antiviral özellikleri gösteren kültürler, 45 ve 90 µL L⁻¹ etefon ile muamele edilenler olmuştur. Enginarın önemli biyoaktif bileşenlerinden biri olan sinarin içeriğini de değerlendiren araştırmacılar, elisitör ile muamele görmemiş kültürlerde 12. güne kadar bu değerli biyoaktif bileşeni tespit ederlerken, etefon ilave edilen kültürlerde ise çalışmada değerlendirmeye alınan son güne kadar (21. gün) sinarine rastladıklarını bildirmişlerdir.

Lattanzio vd. (2018), enginarda kallus ve hücre kültürü tekniklerini çalışmış olup, bu kültürlerdeki sekonder metabolitlerin ve prolinin durumunu araştırmıştır. Bu amaçla kültür ortamlarında besinsel stres yaratan araştırmacılar, hem sekonder metabolitler hem de prolin birikiminin bu durumdan olumsuz etkilendiğini bildirmiştir.

Fadda vd. (2018), *Asteraceae* familyasının oldukça değerli bir üyesi olan enginar bitkisinde yaptıkları bu çalışmada, farklı gün uzunluklarının (15 ve 17 saat) enginarın sahip olduğu birtakım biyoaktif bileşen miktarlarında değişim sağlayıp sağlamadığını belirlemeyi amaçlamışlardır. Bitkinin yenilen kısımlarından elde edilen uygulama verilerine göre, gün sürelerinin uzamasıyla iç braketlerdeki fenolik bileşenlerin miktarlarında azalma saptanmış olup, reseptakldaki değişimler çok ciddi olmadığı için

fazla dikkate alınmamıştır. Benzer sonuçlar flavonoidler ve antioksidanlar için de bulunmuştur. Araştırmacılar normal gün uzunluğu şartlarının, uzatılmış gün uzunluklarına kıyasla daha uygun olduğu sonucuna vardıklarını bildirmişlerdir.

Farhan vd. (2018), enginar yapraklarında ve kalluslarında bulunan biyoaktif bileşenlerine ilişkin yaptıkları çalışmada, yaprak eksplantlarını çimlenen enginar tohumlarından temin etmişlerdir. Kallus oluşumu için farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin (NAA, BA) farklı konsantrasyonları eklenmiştir. Çalışmada sekonder metabolitlerin belirlenmesine ilişkin yapılan analizler HPLC ile yürütülmüştür. MS temel besi ortamına eklenen 5 mg L^{-1} NAA + 2 mg L^{-1} BA kombinasyonunda kültüre alınan yaprak eksplantlarında kallusların elde edildiği, 3 mg L^{-1} NAA + 1 mg L^{-1} BA kombinasyonunda da kallus elde edilebildiğini ve bu kallusların kırılğan yapıda olduğunu rapor etmişlerdir. HPLC analizi sonucunda araştırmacılar, yaprak ekstraktlarından ve kallus ekstraktlarından farklı miktarlarda farklı sekonder metabolitlerin baskın çıktığını ifade etmişlerdir.

Ferri vd. (2018), biber bitkisinin önemli biyoaktif bileşenlerinin üretimini sağlamak amacıyla *in vitro* tekniklerden yararlanarak çalışma yürütmüşlerdir. Hücre süspansiyon kültürü tekniği kullanılarak yapılan çalışmada kapsaisinoidlerin ve fenolik bileşiklerin etkin bir şekilde üretimi amacıyla çeşitli yöntemler denenmiş olup, bu yöntemler arasında elisitörler, öncüller ve ara ürünler kullanılması gelmektedir. Elisitör olarak metil jasmonat ve kitosan, ara ürün olarak ise vanilin, fenilalanin ve valin tercih edilmiştir. Başta kapsaisinoid olmak üzere fenolik bileşenler, flavonoid miktarı ve antioksidan kapasitesindeki değişimlerin ortaya koyulmasının hedeflendiği bu çalışmadan elde edilen veriler göstermiştir ki, $10 \text{ } \mu\text{M}$ metil jasmonat ile birlikte $100 \text{ } \mu\text{M}$ fenilalanin ve $100 \text{ } \mu\text{M}$ valin kombinasyonunda en yüksek seviyede kapsaisinoid elde edilmiştir.

Aghdasi vd. (2018), deniz üzümü ya da efedra olarak da bilinen *Ephedra major* Host bitkisinde etkili bir kallus protokolü oluşturduktan sonra tıbbi açıdan önemli etkilere sahip bir alkaloid olan efedrin sentezinin artırılmasına yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada efedrin üretiminde MS ve B5 temel besi ortamları arasındaki olası farkların ortaya koyulması ile birlikte farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin (2,4-D, kinetin ve NAA) efedrin üretimi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının denendiği bu çalışmada araştırmacılar çalıştıkları bitkide kallus üretiminin başlatılması için en etkili besi ortamı kombinasyonunun MS + 1 ya da 2 mg L^{-1} NAA + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ kinetin olduğunu ifade ederlerken, B5 + 2 mg L^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ kinetin kombinasyonundan ise %100 kallus oluşumu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri veriler ışığında MS ile B5 temel besi ortamları arasında kallus oluşumu bakımından belirgin farklılıklar tespit edemediklerini rapor eden araştırmacılar, efedrin üretimi için en ideal bitki büyüme düzenleyicisi ve oranının $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D olduğu kanısına varmışlardır.

Khan vd. (2018), *Fagonia indica* şifalı bitkisinde yaptıkları çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerinde elisitör kullanımı ile bitki büyüme düzenleyicileri ve ışığın hücre büyümesiyle birlikte biyoaktif bileşenlerindeki potansiyel etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla çalışmada farklı büyüme düzenleyicilerinin (BA, IBA, 2,4-

D, TDZ) farklı konsantrasyonlarını (0,5, 1, 1,5 mg L⁻¹) kullanan araştırmacılar, elisitör olarak ise metil jasmonat ve fenil asetik asidin etkilerini değerlendirmişlerdir. Bunun yanı sıra ışığın da etkisini gözlemleyen araştırmacılar, kültürleri 3 farklı ışık rejimine (devamlı ışık koşullarında, fotoperiyot koşullarında, devamlı karanlık koşullarda) maruz bırakmışlardır. Çalışmadan elde edilen bulgulara bakıldığında, katı besi ortamında tüm ışık rejimleri altında tutulan kültürlerde biyokütle birikimi bakımından çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin elisitörlerden daha etkili sonuçlar verdiğini söylemek mümkündür. Sıvı kültürlerin bulguları değerlendirildiğinde ise, dikkate değer bir biyokütle artışı olmadığı görülmüştür. Elisitör uygulamasının etkileri ise biyoaktif bileşen içeriklerinin değerlendirilmesiyle ortaya çıkmış olup, sürekli karanlık koşullar altındaki hücrelere uygulanan 0,5 mg L⁻¹ metil jasmonatın biyoaktif bileşen içeriğini ve antioksidan özelliklerini maksimum seviyeye getirdiği tespit edilmiştir.

Ahmadi-Sakha vd. (2018), endemik bir bitki türü olan *Scrophularia striata* Boiss. bitkisinde hücre süspansiyon kültürü tekniğinden yararlanarak biyoaktif bileşenlerinin durumunu araştırmışlardır. Bu amaçla araştırmacılar hücre süspansiyon kültürlerini hem erlenmayerleri hem de biyoreaktörleri kullanarak başlatmışlardır. Biyoaktif bileşenlerin miktarlarını HPLC yoluyla analiz etmişlerdir. Araştırmacıların çalışmadan elde ettikleri bulgulara göre biyoaktif bileşenlerin miktarı biyoreaktörlerde daha fazla çıkmıştır. Biyoaktif bileşenlerin kültürlerde birikme oranları da birbirlerinden farklılık göstermiş, bazıları sadece biyoreaktör sisteminde birikirken bazıları her iki sistemde de birikme göstermiştir. Bununla birlikte kültürlerden elde edilen biyoaktif bileşenlerin miktarları ile büyüme periyotları arasında da olumlu bir ilişki olduğu bildirilmiştir.

Jiao vd. (2018), çivit otu olarak bilinen *Isatis tinctoria* L. bitkisinde saçak kök kültürü tekniğini kullanarak bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar bu bitkinin sahip olduğu biyoaktif bileşenlerin üretimini arttırmayı hedeflemişler ve bu amaçla kitosan ile elisitasyon yönteminden yararlanmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 150, 200 ve 400 mg L⁻¹) sıvı kültüre ilave eden araştırmacılar, ideal kitosan uygulama süresini tespit etmek amacıyla farklı zamanlarda (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 ve 96 saat) hücreleri toplamışlardır. Buna göre en uygun konsantrasyonu 150 mg L⁻¹ ve en uygun uygulama zamanını ise 36 saat olarak belirlemişlerdir. Belirtilen konsantrasyon ve sürede toplanan hücrelerin biyoaktif bileşenlerinin elisitasyon uygulanmayan hücrelerin sahip olduğundan daha fazla olduğunu saptamışlardır.

El-Mekkawy vd. (2018), tıbbi bitki olarak değerlendirilen *Ecballium elaterium* bitkisinden *in vitro* koşullarda elde edilen kalluslarda bulunan kukurbitasinlerin üretimi üzerine bitki büyüme düzenleyicileriyle birlikte elisitör kullanımının etkisini araştırmışlardır. Kallus kültürlerini oluşturduktan sonra süspansiyon kültürlerini başlatan araştırmacılar, farklı abiyotik ve biyotik elisitörleri (kitosan, asetik asit, sitrik asit, salisilik asit ve mannitol) farklı konsantrasyonlarda süspansiyon kültürüne ilave etmişler, farklı sürelerdeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri bulgulara göre, 1 g L⁻¹ kitosanın bulunduğu sıvı kültürde kukurbitasin E, %20 mannitolün bulunduğu sıvı kültürde ise kukurbitasin I en yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur.

Pourjabar vd. (2018), *Asteraceae* familyasının önemli bir üyesi olan, deve dikenini olarak bilinen *Silybum marianum* L. bitkisinde hücre süspansiyon kültürü tekniğini

kullanarak bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacıların çalışmadaki asıl hedefi, sağlık açısından birtakım önemli özellikler sergileyen silimarin maddesinin birikiminin sağlanması olmuştur. Bu amaçla 100 µM metil jasmonat ve %0,1 maya ekstraktı hücre kültürlerine ilave edilmiş, 48 saat sonra hücreler kültürlerden alınarak uygulanan elisitörlerin etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, uygulanan elisitör konsantrasyonları ve süresi silimarin birikiminde oldukça fazla artış sağlamıştır.

Ali vd. (2018), *Zingiber officinale* Rosc. olarak da bilinen zencefilde, hem kallus kültürleri oluşturmuş ve bu kültürleri birtakım elisitörlerle muamele ettikten sonra biyoaktif bileşenlerinin ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesini hedeflemişler hem de rizomlarının sahip olduğu biyoaktif bileşenleri belirleyerek karşılaştırmalı olarak değerlendirmeye almışlardır. Ekstraksiyonları yapılan rizomlar ve kalluslar karşılaştırıldığında, kallusların oldukça düşük antioksidan aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Elde edilen kallusları farklı konsantrasyonlarda maya ekstraktı ve salisilik asit gibi birtakım elisitörlerle buluşturdıklarında ise daha yüksek fenolik bileşen içeriği ve daha güçlü antioksidan aktivite performansı sergilediklerini ifade etmişlerdir. Özellikle 100 mg L⁻¹ maya ekstraktı ya da 50 mg L⁻¹ salisilik asit uygulanan kültürlerden elde edilen kallusların sekonder metabolitler bakımından performansları değerlendirildiğinde, endüstriyel ölçekte bu bitkinin kullanım şansının daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Liu vd. (2018), gardenya bitkisinde yaptıkları çalışmada hücre süspansiyon kültürü tekniğinden yararlanarak elisitör uygulamasıyla klorogenik asit ve türevlerinin miktarlarında artış sağlamayı amaçlamışlardır. Çalışmada elisitör olarak metil jasmonat ve salisilik asit farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200, 400 µM metil jasmonat; 10, 25, 50, 100 µM salisilik asit) kallus ortamlarına eklenmiştir. Kültür ortamlarına eklenen elisitörlerin optimum etkinlik sürelerinin tespiti için elisitör uygulanan kültürler 1, 2 ve 3 gün sonra hasat edilerek analizleri yapılmıştır. Çalışmadan elde ettikleri verilere göre araştırmacılar, elisitörleri kıyasladıklarında metil jasmonatın daha üstün olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte uygulama dozları bakımından değerlendirdiklerinde 200 µM metil jasmonatın ideal olduğu, bu uygulama dozunun kullanıldığı kültürlerden alınan örneklerde yüksek miktarlarda klorogenik asit ve türevlerinin elde edilmesinin yanı sıra yüksek antioksidan kapasitesinin de sergilendiği ifade edilmiştir.

Mendoza vd. (2018), süs bitkisi olarak bilinen *Thevetia peruviana* bitkisinde hücre süspansiyon kültürlerini başlatarak bu bitkinin sahip olduğu biyoaktif bileşenlerin elisitör uygulamalarıyla artırılmasına yönelik çalışmışlardır. Elisitör olarak metil jasmonat ve salisilik asit kullanan araştırmacılar, bu iki elisitörün hem bireysel hem de kombinasyonlarının etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (metil jasmonat 0, 1, 3, 5 µM; salisilik asit ise 0, 100, 300, 600 µM) kullanılan elisitörler için optimum elisitör konsantrasyonlarının belirlenmesinin yanı sıra kültüre ilave edilen elisitörlerle muamele edilen hücreler için en uygun uygulama sürelerinin (24 saat ve 96 saat) tespit edilmesi de amaçlanmıştır. Çalışmadan elde ettikleri verilere dayanarak araştırmacılar en yüksek fenolik bileşen ve flavonoid içeriği ile en güçlü antioksidan aktivitesini 3 µM metil jasmonat ilave edilen kültürlerden elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte 3 µM metil jasmonat ile 300 µM salisilik asidin birlikte ilave edilmesi ya da 300 µM salisilik asidin kültürlere tek başına eklenmesi ile de olumlu sonuçlar alındığı belirtilmiştir.

Reis vd. (2018) yapmış oldukları bir çalışmada, izoflavonlarca zengin olduğu bilinen çayır üçgülünün hücre kültürlerinde içeriklerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla hem *in vitro* olarak hem de iki farklı sezonda yabancı olarak topladıkları bitki materyallerini kullanmışlardır. MS besi ortamlarını kullandıkları çalışmalarında bitki büyüme düzenleyicilerinden NAA ve kinetini uyguladıkları besi ortam kombinasyonlarında en yüksek oranda kırılğan kallus elde ettiklerini belirten araştırmacılar, bu kallusların analizlerini kültürün 60. gününden sonra yapmışlardır. Analizler için ultra performans sıvı kromatografisini (UPLC) kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda elde ettikleri sonuçlara dayanarak araştırmacılar, elisitör kullanılmamasına rağmen *in vitro* bitkilerden elde ettikleri içeriklerin yabancı bitkilerden daha yüksek ya da eşit olduğunu, bu nedenle ticari amaçla kullanıma uygunluğunu ortaya koymuşlardır.

Abbas vd. (2018), Afrika keçiboynuzu olarak bilinen *Parkia biglobosa* (Jacq.) tohumlarının çimlenme ve fide oluşumunu arttırmaya yönelik olarak en iyi ekim öncesi uygulamanın belirlenmesi, ardından kallus ve süspansiyon kültürlerinin başlatılarak uzun soluklu devam ettirilmesine yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. En iyi kallus oluşumu için MS + 1 mg L⁻¹ 2,4- D'nin ideal olduğunu, ayrıca MS ortamına 50 mg L⁻¹ sitrik asit eklenmesinin kallusların kararmalarını azaltmada etkili olduğunu bildirmişlerdir. 18 gün boyunca devam ettirdikleri kültür süresinin 9. gününde maksimum yaşama oranına sahip olduklarını ancak 12. günde her bir mL'de yaşayan hücrelerin konsantrasyonlarının en yüksek seviyeye ulaştığını, kültür süresinin sonunda ise oldukça düştüğünü belirtmişlerdir.

Mejía-Espejel vd. (2018), *Asteraceae* familyasındaki çok yıllık bir çalı olarak bilinen *Stevia rebaudiana* Bertoni'de bir çalışma yürütmüşlerdir. Son yıllarda oldukça artan bir ilgiye sahip olan bu bitki steviosidler olarak bilinen glikositlere sahip olup, araştırmacılar biyoteknolojik yöntemlerle bu bileşiklerin arttırılmasına yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmadaki amaç, *S. rebaudiana*'nın kalluslarında bulunan steviosidler sentezinde elisitörlerin etkisini belirlemektir. Salisilik asit, metil jasmonat, ışığa maruz bırakma, inkübasyon sıcaklığı, antioksidanlar ve büyüme düzenleyicilerin stevia kalluslarından elde edilecek olan steviosidler üretimi üzerine etkilerini belirlemeyi amaçlayan araştırmacıların hipotezleri, bu elisitörlerden en az bir tanesinin istenilen bileşiği arttıracığı yönündedir. Araştırmacılar yaprak eksplantlarını kültüre alarak kallus elde etmeye çalışmışlardır. Besi ortamına ilave ettikleri 10 ve 100 µM oranlarında salisilik asit ve metil jasmonat, 200 mg L⁻¹ sitrik asit, 100 mg L⁻¹ askorbik asit ile 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D ve 1,5 mg L⁻¹ BAP içeren besi ortamlarını kullanmışlardır. Çalışmada kırmızı, mavi ya da beyaz ışık altında, 25 ya da 28 °C'de kalluslar elde edilmiştir. Çalışmadan elde ettikleri sonuçlar değerlendirildiğinde 28 °C ya da 100 µM salisilik asit ile birlikte kullanılan ortamlarda kültüre alınan kalluslarda, sera koşullarında yetiştirilen bitkilerin yapraklarındakine nazaran 9,8 kat daha fazla steviosid üretimi gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte çalışmada uygulanan 10 µM salisilik asit konsantrasyonunun rebaudiosid A üretimini oldukça arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, yine çalışmada denemeye alınan uygulamalardan 100 µM salisilik asit ve 28 °C ile kombinasyonu ile birlikte antioksidanlarla ve büyüme düzenleyicilerin birlikte kullanımı sonucunda steviol birikimi de görülmüştür. Araştırmacılar, elde ettikleri bulgulara dayanarak salisilik asit, dışarıdan uygulanan belirli antioksidanlar, bitki

büyüme düzenleyicileri ile sıcaklık uygulamalarının bu bitkideki mevcut steviosidlerin birikimini teşvik edebileceğini bildirmişlerdir.

Sarmadi vd. (2018) porsuk ağacı olarak bilinen *Taxus baccata*'nın kallus kültürlerinde elisitör kullanarak taksan üretimini değerlendirmişlerdir. Elisitör olarak salisilik asit ve çeşitli glikoz seviyelerini kullanan araştırmacılar, ayrıca bu elisitörlerin büyüme ve biyokimyasal özellikler üzerine olan etkilerini de araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmada önce 5 µM salisilik asit ile ön işlem uygulamış, ardından üç aylık kallusları, % 0, 0,5, 1, 2 ve 3 oranlarında glikoz içeren B5 ortamlarında kültüre almışlardır. Bu uygulamalardan elde ettikleri bulguları sadece glikoz eklenmiş B5 ortamlarında kültüre alınan kalluslar ile karşılaştırmışlardır. Çalışmada kültürün 21. gününde kalluslardaki değişimleri değerlendirmeye almışlardır. Bunun sonucunda yüksek glikoz konsantrasyonlu besi ortamlarında, kallus taze ağırlığı (g), kuru ağırlığı (g) ve hücre canlılığında (%) önemli derecede düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu düşüşün sebebi olarak, glikoz uygulamasıyla birlikte hidrojen peroksit (H₂O₂) ve malondialdehit (MDA) içeriğinde artış olduğunu ve yine bu uygulamayla birlikte oksidatif strese maruz kaldığını rapor etmişlerdir. Daha düşük H₂O₂ içeriği ve oksidatif stresi, salisilik asit uygulanan örneklerdeki artan antioksidan enzim aktivitesi ile ilişkilendiren araştırmacılar, bu durumun daha az membran zararlanması ve kontrolle karşılaştırıldığında glikoz uygulaması altında gelişen büyüme ve hücre canlılığının sonucu olarak görmektedirler. Çalışmada glikoz uygulamasıyla birlikte salisilik asit ön uygulaması fenilalanin ammonialiaz (PAL) ve polifenol oksidaz (PPO) aktivitelerini azaltmakta, dolayısıyla fenolik bileşiklerin üretimi ve oksidasyonu azaltılmaktadır. Fenolik bileşiklerdeki ve oksidasyondaki azalma ise yüksek canlılık oranı ve dokularda daha az kararma ile ilişkilendirilmektedir. Çalışmadan elde edilen bulgulara bakıldığında salisilik asit ön uygulaması ile birlikte uygulanan %2 konsantrasyonundaki glikozun, kalluslarda taksol ve toplam taksan üretiminin arttırılmasına yönelik önemli uygulamalar olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Ghimire vd. (2019), *Asteraceae* familyasının önemli bir üyesi olan *Aster scaber* Thunb bitkisinin saçak kök kültürü yöntemini kullanarak biyokütlesinde ve fenolik bileşenlerinde artış sağlamayı hedeflemişlerdir. Bu amaçla çalışmalarında elisitör olarak farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat (50, 100, 200 µM) ve maya ekstraktı (50, 100, 200 mg L⁻¹) kullanmışlardır. Biyokütlerdeki artış bakımından 100 mg L⁻¹ maya ekstraktının etkili olduğunu belirten araştırmacılar, 100 µM metil jasmonat ve 100 mg L⁻¹ maya ekstraktı kullanımıyla toplam fenolik bileşikler ve flavonoidlerin miktarlarında artış olduğunu bildirmişlerdir. Elisitör uygulamaları sonucunda fenolik bileşiklerde görülen artış, bitkinin sahip olduğu diğer anti-aktivitelerinde de (antimikrobiyal, antikanser, antioksidan gibi) artış sağlamıştır. Araştırmacılar ayrıca, maya ekstraktına nazaran metil jasmonatın *A. scaber* bitkisinin fenolik bileşiklerinin elisitasyonu amacıyla kullanımının daha etkili olduğunu da rapor etmişlerdir.

Roy ve Bharadvaja (2019), *Plumbago zeylanica* L. bitkisinde mevcut olan, birtakım önemli biyolojik aktivite özellikleri (antikanser, antibakteriyel ve antiinflamatuvar) sergileyen plumbagin maddesinin üretimini arttırmayı amaçlamışlardır. Bitkinin köklerinde bulunan bu maddenin üretimi için öncelikle kök süspansiyon kültürlerini başlatmışlardır. Ardından bu maddenin üretimini arttırmak amacıyla biyotik ve abiyotik elisitörlerden yararlanan araştırmacılar farklı konsantrasyonlarda

uyguladıkları bu elisitörlerin etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Buna göre abiyotik elisitörlerden maya ekstraktını 150 mg L^{-1} konsantrasyonunda kullandıklarında, ilgili maddenin miktarında 3 kat artış sağladıklarını bildirmişlerdir.

Alsoufi vd. (2019), *Calendula officinalis*'te yaptıkları çalışmada, *in vitro* saçak kök kültürü tekniğini kullanarak jasmonik asit ve kitosanın bu bitkinin sahip olduğu triterpenoidlerin üretimini ve birikimini nasıl etkilediğini ortaya koymaya çalışmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada, jasmonik asidin oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Jasmonik asit saçak kök dokularında mevcut olan oleanolik asit saponinleri gibi bazı sekonder bileşiklerin birikimini arttırdığı gibi (20 kat) salgılanmasını da teşvik ettiğini (113 kat) bildiren araştırmacılar, öte yandan sterol biyosentezinin ve birikiminin yaklaşık %60 oranında jasmonik asit tarafından engellendiğini de rapor etmişlerdir. Kitosan etkisinin ise jasmonik asidinkine göre daha az olduğunu, ancak hem oleanolik asit saponinlerinin hem de sterollerin birikimini teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, çalışmada uyguladıkları iki biyotik elisitörün bu bitkinin metabolizması üzerindeki olası etkilerinin birbirinden farklılık gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Kazmi vd. (2019), *Asteraceae* familyasının önemli bir üyesi olan ve doğal tatlandırıcı bitki olarak kullanılan *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin *in vitro* adventif kök oluşumunu ve sahip olduğu biyoaktif bileşenlerin üretimini amaçlamışlardır. Araştırmacılar, farklı elisitörlerin (metil jasmonat, fenil asetik asit, melatonin), farklı uygulama dozlarının ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 1 mg L^{-1} , 2 mg L^{-1}) ve farklı uygulama periyotlarının (15, 30 ve 45 dakika) etkilerini değerlendirmişlerdir. Her bir elisitörün etkisini ayrı ayrı değerlendirdiklerinde elde ettikleri bulgular; $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ metil jasmonata 45 dakika, 1 mg L^{-1} fenil asetik aside 15 dakika ve 2 mg L^{-1} melatonine 15 dakika sürelerle daldırılan eksplantlarda en yüksek adventif kök eldesi şeklinde olmuştur. Ayrıca, çalışmada uygulanan elisitörler kıyaslandığında metil jasmonatın, bu bitkinin biyoaktif bileşen miktarlarında daha fazla artış sağladığı bildirilmiştir.

Krishnan vd. (2019), *Apiaceae* familyasında yer alan ve içerdiği çeşitli biyoaktif bileşenlerden ötürü şifalı bitki olarak değerlendirilen *Centella asiatica* bitkisinde sürgün, kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda kullanılan metil jasmonatın elisitör olarak kullanılma potansiyelini değerlendirmişlerdir. Başlatılan farklı kültürlerde farklı seviyelerde tepkiler alındığını belirten araştırmacılar, ilgili biyoaktif bileşen miktarında kallus, sürgün ve hücre süspansiyon kültürlerinde elisitasyona maruz bırakılmayan kültürlerle kıyasla sırasıyla 69 kat, 39 kat ve 1,9 kat artış sağladıklarını rapor etmişlerdir. Bu nedenle metil jasmonatın oldukça önemli bir elisitör olduğu kanısındadırlar.

Faizal ve Sari (2019), Endonezya'ya özgü şifalı bir bitki olan *Talinum paniculatum* Gaertn. bitkisinde bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada, bitkinin adventif köklerini kullanarak *in vitro* kültürler oluşturmuşlardır. Bu değerli bitkinin köklerinde mevcut olan saponin maddesinin üretimini artırılmasını hedefleyen araştırmacılar, bu amaçla *in vitro* kültürlerde farklı konsantrasyonlarda elisitör olarak metil jasmonat ve salisilik asit (0, 0,05, 0,1, ve $0,2 \mu\text{M}$) eklemişlerdir. Adventif kökler, uygulamanın 5., 10. ve 15. günlerinde elisitörlerle muamele edilen kültürlerden toplanmış ve saponin miktarlarındaki değişikliklerin tespiti amacıyla analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar, elisitör uygulamasının kök gelişiminde olumsuz etkilerini gözlemlerken,

saponin miktarında artış sağladığını saptamışlardır. Buna göre, iki elisitör arasında etkileri bakımından çok fazla farklılık olmamakla birlikte, her iki elisitör de 0,2 µM konsantrasyonunda uygulanıp, uygulamanın 15. gününde köklerin durumu değerlendirildiğinde saponin miktarlarında 1,5 kat (metil jasmonat) ve 1,3 kat (salisilik asit) artış görüldüğü bildirilmiştir.

Açıkgöz vd. (2019), *Asteraceae* familyasında yer alan şifalı bitki olarak değer gören Türkiye'ye özgü endemik bir tür olan *Achillea gypsicola* bitkisinde *in vitro* süspansiyon kültürü tekniğini kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada elisitör kullanımının bu değerli bitkinin sahip olduğu biyoaktif bileşenlerinin miktarları üzerine olası etkileri araştırılmıştır. Kültür ortamlarına 0, 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında ilave edilen elisitörler (metil jasmonat ve salisilik asit) etkinlikleri bakımından değerlendirildiklerinde, dozları arttıkça biyoaktif bileşenlerin birikiminde de artış sağladıkları görülmüştür.

2.6. Sekonder Metabolitlere Yönelik Çalışmalar

Bitkiler, primer ve sekonder metabolitler olarak tanımlanan organik bileşikleri büyük ölçüde sentezlemektedirler. Primer metabolitler bitkilerin yaşamsal döngülerinde gerçekleşen fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme gibi birtakım önemli olaylarda rol oynarlar. Sekonder metabolitler ise bitkilerin temel yaşamsal olaylarında olmazsa olmazlardan değildir fakat 'yaşam kalitesinin artırılması' bakımından gerekli olarak görülmektedirler. Bu organik moleküller, birtakım mikroorganizmalar ve herbivorların saldırıları karşısında bitkilerin kendilerini savunmalarını sağlamalarına yardımcı olurlarken, çeşitli stres koşullarına direnç göstermelerinde de etkilidirler. Bununla birlikte, beslenme düzeninin sekonder metabolitlerce zengin besinlerle zenginleştirilmesiyle diyabet, kanser, kalp hastalıkları gibi kronik hastalıkların riskini azaltılmasının yanı sıra yaşam kalitesinde de artış sağladığı rapor edilmiştir (Pandino vd. 2011a).

Hayvanların çoğu çevreden gelen birtakım predatör saldırısı ile karşılaştıklarında fiziksel olarak kaçma ya da uçma gibi tepkilerle saldırıya karşılık verebilmekte ya da bağışıklık sistemleri buna katkı sağlamaktadır. Bitkilerde ise hayvanlarınkine benzer bir kaçış durumu görülme de, yaralandıklarında ya da hastalandıklarında kendi parçalarını değiştirebilme, rejenerasyon yeteneği sergilemektedirler. Bununla birlikte bazı bitkilerin geliştirdikleri dikenler, genellikle zehirli kimyasalları barındıran salgı bezleri ve tüyler, odunsu çok yıllık bitkilerde görülen sert kabuk oluşumu gibi bazı mekanik ve morfolojik koruma özellikleri kendilerini savunmaya çalıştıklarını gösteren özelliklerdir (Wink 2009). Daha önceleri işe yaramaz artık ürünler olarak tanımlanan sekonder metabolitler, özellikle son yıllarda bitkilerin kendilerini bakterilere, funguslara, herbivora ve virüslere karşı savunmalarında oldukça önemli roller üstlenen ürünler olarak kabul görmektedir (Wink 2009).

Bununla birlikte bu değerli bileşiklerin bazıları tozlanma ve döllemeye yardımcı olacak şekilde ve bitki tohumlarının yayılmasını sağlamak amacıyla sinyal molekülleri olarak görev almaktadır. Bazı durumlarda bir sekonder metabolit aynı anda birden fazla görev üstlenebilmekte, bir yandan tozlanma-döllemeye yardımcı olan böcek ya da arıları kendine çekerken bir yandan da insektisidal ve antimikrobiyal olabilmektedir. Dolayısıyla tozlanma-döllemeyi sağlayan aracı böcekler bitkiye

kondduğunda, çiçeği yemeden bitkiden aldığı nektarla ödüllendirilmiş olmaktadır. Bununla birlikte sekonder metabolitlerin bazıları zehirli nitrojenin ve depolanan bazı bileşiklerin taşınmasını sağlamak ya da ultraviyole ışınlarından bitkiyi korumak gibi birtakım fonksiyonlar da sergilemektedir (Wink 2009).

Günümüzde tanımlanan sekonder metabolitlerin 100,000 gibi bir sayıya ulaştığı bilinmektedir. Sekonder metabolitler temelde azot içeren ve içermeyen grup olarak sınıflandırılmaktadır (Wink 2009). Bitkilerdeki sekonder metabolitler birçok küçük bileşenin birleşmesi ve farklı biyokimyasal yollardan geçmesiyle, türden türe, bitkiden bitkiye ve hatta organdan organa değişen bileşikler olarak karşımıza çıkmakta, özel biyosentetik enzimlerle bitkilerin farklı kısımlarında (doku ve organ) sentezlenmektedir (Facchini ve De Luca, 2008; Murata vd. 2008; Wink 2009).

Bitkilerde bulunan sekonder metabolitler biyosentetik orijinlerine göre 3 temel grupta incelenmektedir (Crozier vd. 2006);

- I. Flavonoidler ve polifenolik bileşikler,
- II. Terpenoidler,
- III. Azot içeren alkaloidler ile sülfür içeren bileşenler.

En az bir tane aromatik halka ve bir ya da birden fazla hidroksil grubu barındıran fenolik bileşikler, bitkiler âleminde oldukça fazla bulunmakta, 8000'den fazla fenolik yapı gösterdiği bilinmektedir (Strack 1997; Crozier vd. 2006). Fenolik bileşikler polifenollerden türemekte, farklı sayı ve yapıda aromatik halka bileşenlerini ve taninleri içermekte, sahip olduğu karbon atomlarına göre sınıflandırılmaktadır. Bununla birlikte fenolik bileşikler temel olarak iki grupta toplanmaktadır;

- I. Flavonoidler
- II. Flavonoid olmayanlar.

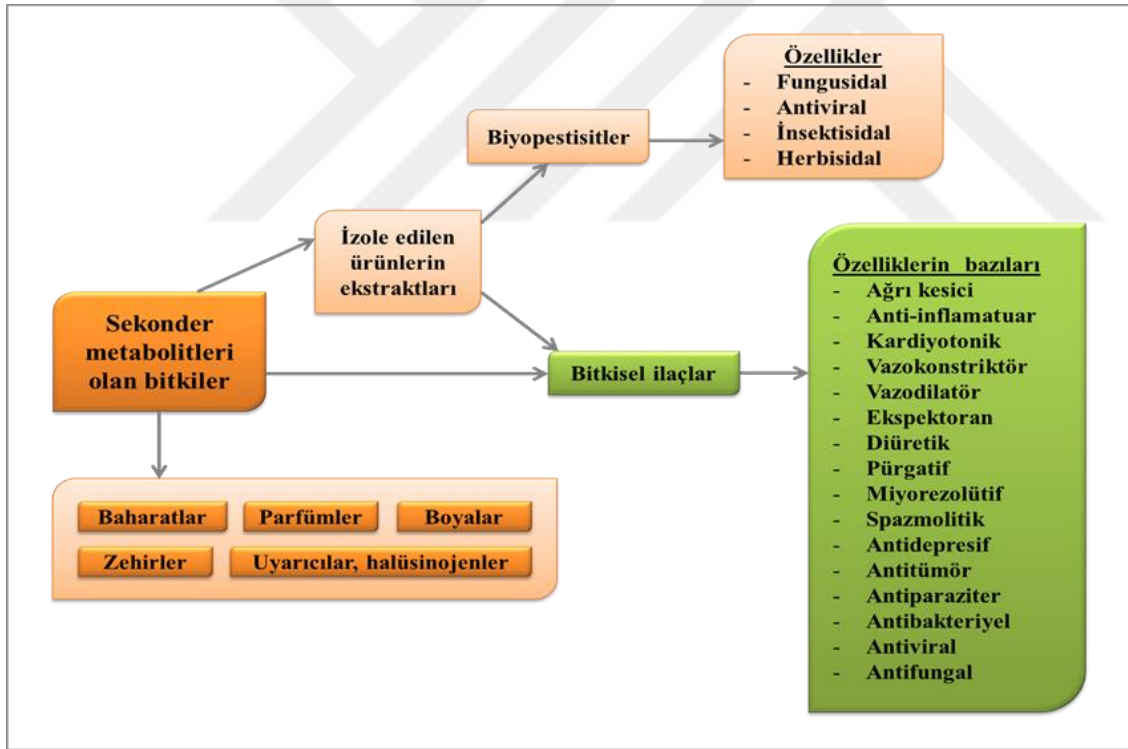
Flavonoidler, polifenolik bileşenler, bitkiler âleminde en çok rastlanan fenoliklerdir (Harborne 1993; Crozier vd. 2006). Çok çeşitli ve önemli roller üstlenen flavonoidler bitkilerin farklı yerlerinde (yaprak epidermisinde, meyvelerin dış kabuğunda) varlık göstermektedirler. Bitkilerin UV ışınlarından korunması, renklenme süreci, nitrojen bağlayıcı nodüllerin uyarılmasının yanı sıra hastalıklara dayanıklılık sağlanması gibi bitkinin yaşadığı çeşitli süreçlerde işlev görmektedir (Koes vd. 1994; Pierpoint 2000; Crozier vd. 2006). Flavonoidler kendi içinde alt sınıflara ayrılmaktadır;

- ✓ Flavonlar
- ✓ Flavonoller
- ✓ Flavan-3-oller
- ✓ İzoflavonlar
- ✓ Flavanonlar
- ✓ Antosiyanidinler olarak karşımıza çıkmaktadır (Crozier vd. 2006).

Flavonoid olmayan sekonder metabolitler grubuna baktığımızda ise hidroksibenzoatlar olarak da bilinen fenolik asitlerin yer aldığı görülmektedir. En çok bilinen hidroksisinatlardan olan *p*-kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit de flavonoid olmayan sekonder metabolitler sınıfında yer almaktadır. Bu grupta yer alan ve

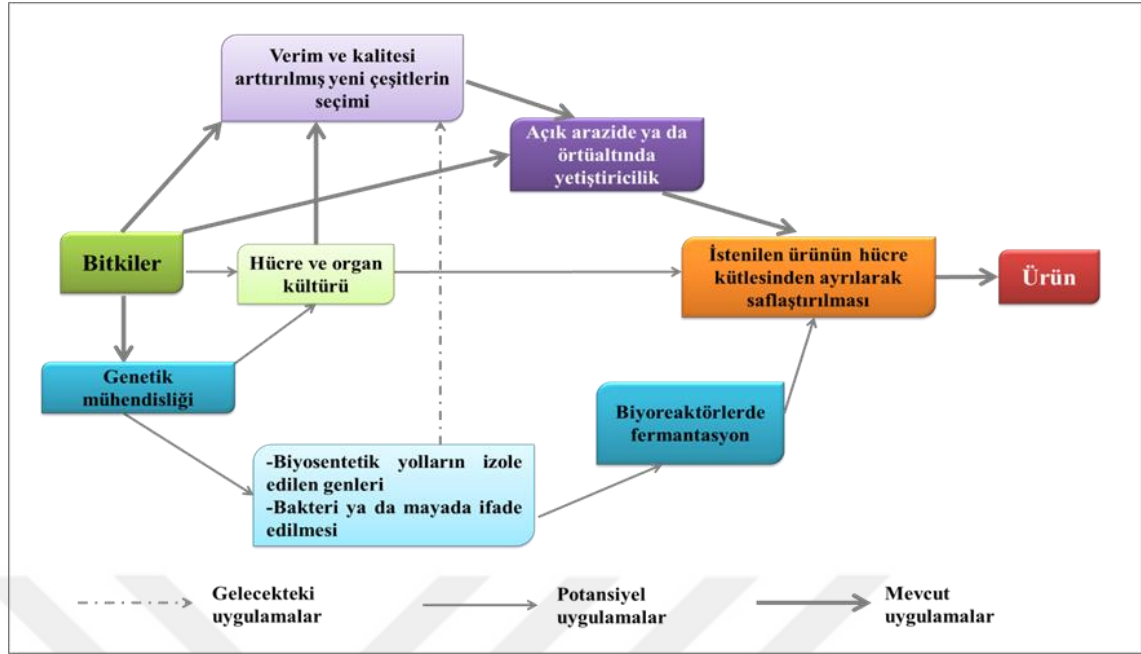
özellikle sebze ve meyvelerde yaygın bir şekilde bulunan bileşenler arasında kafeik asidin kinik asit konjugatları da (3-, 4-, 5-*O*-kafeoilkinik asit) bulunmaktadır. Stilbenler aynı zamanda fitoaleksinler olarak bilinmektedir ve birçok bitkide yüksek miktarlarda bulunan bu bileşikler yine flavonoid olmayan sekonderler grubunda yer almaktadır.

Aslında sekonder metabolitler, sentezlendiği organizmanın sağlığı ve dış koşullara uyum sağlaması, büyüme ve gelişme esnasında oluşabilecek farklılıkların önlenmesi bakımından oldukça önemli olup, bu değerli metabolitlerin bazıları birtakım farmakolojik amaçlarla uyumsuzluk göstermektedir. Bu durum, aslında binlerce yıldır bilinmekte ve çok çeşitli amaçlar için (boya, tat, koku, uyarıcı, halüsinojen, insektisit, omurgalı hayvan ve insan zehiri, terapötik ajan) hizmet etmekte olan sekonder metabolitlerin birçok biyoteknolojik uygulama için ilgi çekici olmasını sağlamaktadır (Şekil 2.7) (Wink 2009). Bitkiler geleneksel olarak açık arazilerde ya da örtü altında yetiştirilmekte, arzu edilen bileşenlerin ekstraksiyonları da bu bitkilerden elde edilmektedir (Şekil 2.8). Birçok türde ise yeni çeşitlerin geliştirilmesi, geliştirilen bu bitkilerin artırılmış verim ve kaliteye sahip olması önem arz etmektedir. Bu bağlamda *in vitro* tekniklerin (mikroçoğaltma, hücre ve organ kültürleri) devreye girmesi oldukça önemli görülmektedir.



Şekil 2.7. Sekonder metabolitlerin biyoteknolojide kullanımı (Wink 2009'dan uyarlanmıştır)²

² **Anti-inflamatuar:** İltihap sökücü, yangı önleyici; **Kardiyotonik:** Kalp kuvvetlendirici; **Vazokonstriktör:** Damar büzücü; **Vazodilatör:** Damar genişletici; **Ekspektoran:** Balgam söktürücü; **Diüretik:** İdrar söktürücü; **Pürgatif:** Bağırsak temizleyici; **Miyorezolütif:** Kas gevşetici; **Spazmolitik:** Spazm önleyici



Şekil 2.8. Sekonder metabolit üretim stratejileri (Wink 2009'dan uyarlanmıştır)

İnsanlar, sağlıklı bir yaşam idame ettirebilmek için gündelik yaşamlarına tahılların yanı sıra mutlaka taze sebzeleri ve meyveleri dahil etmelidirler. Taze meyve, sebzelerle birlikte tahılların ve zeytinyağının Akdeniz beslenme stilindeki yeri yadsınamazdır. Bu beslenme biçimi sayesinde Akdeniz insanları vitaminlerle minerallerin yanı sıra mikro besinleri (polifenoller, lifler vb.) de oldukça fazla miktarda almaktadırlar (Visioli vd. 2005; Pandino vd. 2011a). Bu bağlamda sebzeler arasında ekonomik açıdan da önemli bir üye olan enginar, çeşitli şekillerde tüketilebildiği gibi (ham, haşlanmış, kızartılmış) insan sağlığı açısından da oldukça yararlıdır (Pandino vd. 2011a). Enginarın sağlığa yararlılığı sahip olduğu zengin biyofarmasötik içeriğinden kaynaklanmakta olup, çok eski zamanlardan beri gerek gıda amacıyla gerekse tedavi edici amaçla kullanılmasının altında yatan başlıca nedenin bu olduğu düşünülmektedir (Mulinacci vd. 2004; Jun vd. 2007; Ciancolini vd. 2013; Pandino vd. 2013a). Diğer sebzelerle toplam polifenol içeriği bakımından karşılaştırıldığında oldukça iyi bir konumdadır (Abu-Reidah vd. 2013). Birçok terapötik etkiye sahip olan enginarın içerdiği başlıca biyoaktif bileşenler arasında birçok fenolik asit (kafeoilkinik asitler ile flavonoidler), seskiterpen laktonları ile inülin yer almaktadır (Lattanzio vd. 2019). Lattanzio vd. (2019)'nin bildirdiği üzere, enginar yapraklarında bulunan temel biyoaktif bileşenlerin başında gelen sinarin maddesinin keşfi 1954 yılında Panizzi ve onun araştırma grubu tarafından gerçekleştirilmiş olup, enginarın sahip olduğu değerli biyoaktif bileşenlerin açığa çıkarılması bu yıllarda başlamıştır. Enginarında bulunan başlıca sekonder metabolitler ise şu şekildedir (Lattanzio vd. 2019) (Şekil 2.9);

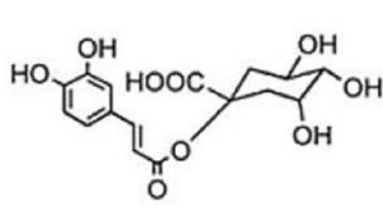
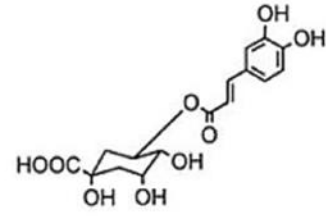
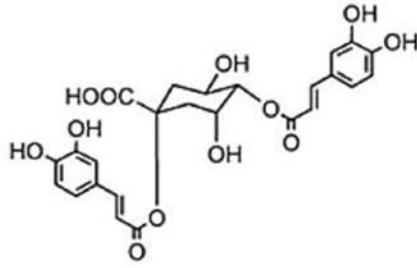
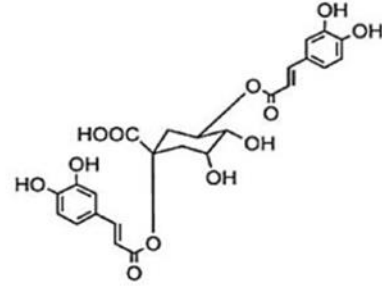
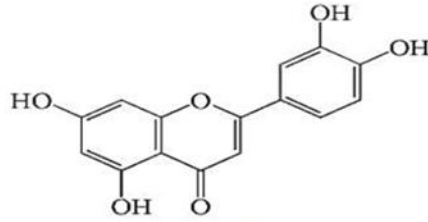
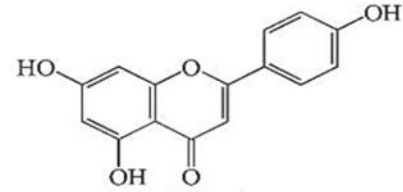
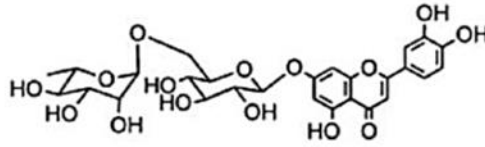
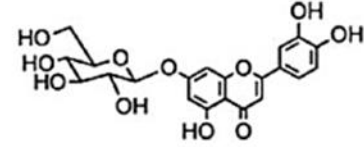
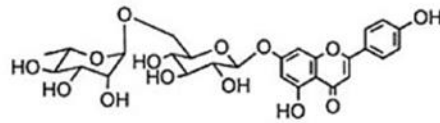
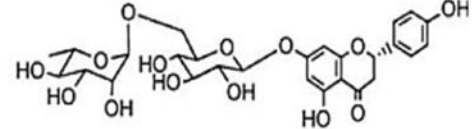
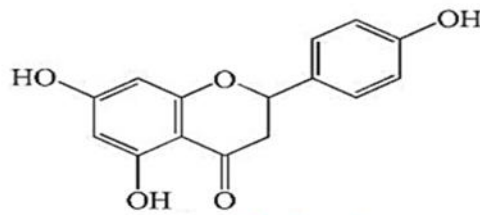
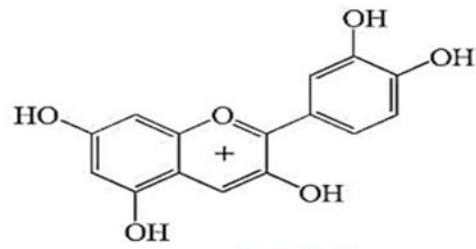
➤ Fenolikler

❖ Mono- ve dikafeoilkinik asitler

- 1-*O*-kafeoilkinik asit
- Sinarin (1,3-*O*-dikafeoilkinik asit),
- Klorojenik asit (3-*O*-kafeoilkinik asit; 5-*O*-kafeoilkinik asit),

- Kriptoklorogenik asit (4-*O*-kafeoilkinik asit),
 - Neoklorogenik asit (5-*O*-kafeoilkinik asit),
 - Kafeik asit,
 - 1,4-*O*-dikafeoilkinik asit,
 - 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit,
 - 3,4-*O*-dikafeoilkinik asit,
 - 3,5-*O*-dikafeoilkinik asit
- ❖ Flavonoidler
- Flavonlar
 - Apigenin
 - Apigenin 7-*O*-glukosit
 - Apigenin 7-*O*-glukuronit
 - Apigenin 7-*O*-rutinosit
 - Luteolin
 - Luteolin 7-*O*-glukosit
 - Luteolin 7-*O*-glukuronit
 - Luteolin 7-*O*-rutinosit
 - Antosiyanidinler
 - Siyanidin
 - Peonidin
 - Delfinidin
 - Flavanonlar
 - Naringenin
 - Narirutin (Naringenin 7-*O*-rutinosit)
 - Hesperetin
- Seskiterpen laktonları
- Sinaropikrin
 - Grosheimin
- İnülin

Polifenoller, sekonder bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturmakta olup, stres faktörlerine karşı koruyucu görev üstlenmesinin yanı sıra büyüme ve gelişmede de etkin rol oynamaktadır (Pandino vd. 2011a). Birçok yenilebilir bitki, sağlığı iyileştirici birtakım özellikler sergilemekte, bunlar içerdikleri fitokimyasallar ile ilişkilendirilmekte ve bu bitkiler fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir (Segasothy ve Phillips 1999). Enginarın, bu kadar değerli biyoaktif bileşenlerin temel kaynağı konumunda olması, onun oldukça güçlü bir fonksiyonel gıda olarak tanınmasına büyük katkı sağlamaktadır.

**1-O-Kafeoilkinik asit****5-O-Kafeoilkinik asit****1,4-O-Dikafeoilkinik asit****1,5-O-Dikafeoilkinik asit****Luteolin****Apigenin****Luteolin-7-O-rutinosit****Luteolin-7-O-glukosit****Apigenin-7-O-rutinosit****Narirutin (Naringenin-7-O-rutinosit)****Naringenin****Siyanidin****Şekil 2.9.** Enginarıda bulunan bazı biyoaktif bileşenlerin kimyasal yapıları

Sekonder metabolitler genellikle bitkilerin yaşamsal döngülerinde farklı süreçlerde oluşmakta, az miktarlarda birikmekte ve oluşumları çok çeşitli faktörler (mevsim, genotip, farklı bitki kısımları) tarafından etkilenmektedir. Enginar, diğer sebzelerle de karşılaştırıldığında hem yenilen hem de yenilmeyen kısımlarında çok zengin bir biyoaktif bileşen madeni barındırmakta, sağlığı iyileştirici özellikler göstermekte, bu özelliğinden ötürü de çok eski zamanlardan beri gerek gıda olarak tüketilmekte gerekse tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Enginarın sahip olduğu zengin sekonder metabolit kompozisyonu birçok araştırmacı için araştırma konusu olmuş, günümüzde insanların fonksiyonel gıdalara yöneliminin artmasıyla da bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır.

Schütz vd.'nin 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada, enginarın belirli kısımlarının fenolik bileşenlerinin analizine yönelik bir araştırma yürütmüş olup, bir metot geliştirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada bitki materyali olarak enginar başlarını, posasını ve suyunu değerlendirmeye almışlardır. Monokafeoilkinik asitler klorogenik asit olarak ve dikafeoilkinik asitler sinarin olarak hesaplanmıştır. Ayrıca apigenin, apigenin 7-O-glukosit; luteolin türevleri, luteolin 7-O-glukosit ve naringenin 7-O-glukosit ise narirutin olarak hesaplanmıştır. Sunulan tüm veriler standart sapmaya göre anlamlandırılmış ve bağımsız 4 deney (n=4) olarak yürütülmüştür. Fenolik bileşiklerin fraksiyonlanması için en iyi sonuçlar, % 10 sulu metanol (fraksiyon I) ve saf metanol (fraksiyon II) ile ard arda yıkama ile elde edilmiştir. Bu çalışma ile enginarında bulunan 22 tane temel bileşenden, 11 tane kafeoilkinik asit ve 8 tane flavonoid tespit edildiği bildirilmiştir. Kalibrasyonları yapılarak her bir bileşenin miktarı belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara bakıldığında ise belirlenen temel flavonoidin apigenin 7-O-glukuronit olduğu bildirilmiştir. Çalışmada değerlendirilen bitki kısımlarında, özellikle başlarında ve posasında, en çok bulunan hidroksisinamik asidin 1,5-O-dikafeoilkinik asit olduğu tespit edilirken, enginar suyunda ise baskın olan bileşiğin 1,3-O-dikafeoilkinik asit (sinarin) olduğu belirlenmiştir. Doğal antioksidanların ve fonksiyonel gıdaların önem kazandığı günümüzde araştırmacılar, enginar posasında tespit edilen yaklaşık 12 g kg⁻¹ toplam fenolik içeriğinin umut verici bir kaynak olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mulinacci vd. (2004) yapmış oldukları çalışmada, HPLC/DAD ve HPLC/MS tekniklerini kullanarak enginar yapraklarında bulunan sinnamik asitlerin ve flavonoidlerin belirlenmesini hedeflemişlerdir. Bu amaçla çalışmalarında enginarın yaprak ekstraktlarını ve iki farklı laboratuvar yaprak ekstraktını değerlendirmeye almışlardır. Çalışmada değerlendirmeye aldıkları bitkisel materyallerden elde ettikleri sonuçları karşılaştırmalı olarak inceleyen araştırmacılar, ticari ekstraktların çoğunda benzer sonuçlara ulaşmışlardır. Bununla birlikte bu ekstraktların sahip olduğu nitel ve nicel özelliklerin diğerlerine nazaran 5-6 kat daha fazla olduğunu da bildirmişlerdir.

Zhu vd. (2005) yaptıkları çalışmada, enginar yaprakları, başları ve gövdelerinin kloroform, etanol ve etil asetat ekstraktlarının antifungal aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, kullanılan bitki materyalleri arasında en aktif olanın yaprak ekstraktları ve fungal enfeksiyonları önlemede en etkilisinin etanol ekstraksiyonları olduğu tespit edilmiştir.

Friatianni vd. (2007) İtalya'ya özgü 5 tane enginar çeşidi ve 1 tane kültüre alınan yabancı enginar aksesyonunun yapraklarındaki ve başının farklı kısımlarındaki polifenollerin analizine yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Bölgeye özgü standart yetiştirme koşullarına göre yetiştiriciliğini yaptıkları çeşitlere ait en az 3 farklı bitkiden bitkisel materyal örneği toplamışlardır. Daha sonra bu bitki materyalleri belirli kısımlara ayrılarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada bazı hidroksisüsinamik asitlerin ve flavonoidlerin (apigenin ve luteolin) miktarlarını araştırmışlardır. Analizlerin sonucunda başların, yapraklara nazaran daha fazla polifenol miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Farklı bitki kısımlarının değişen miktarlarda biyoaktif bileşenleri içerdiğini, bu miktarların çeşitlere göre de değiştiğini belirten araştırmacılar, yaprak, dış ve orta braktelerin polifenol içeriklerinin diğer kısımlardakine kıyasla düşük kaldığını rapor etmişlerdir. Yaprakların içerdiği biyoaktif bileşen miktarını da araştıran araştırmacılar, daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlardan farklı olarak yapraklardaki biyoaktif bileşen miktarının oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer çalışmalardan farklı bir sonuç elde edilmesinin ise çalışmada kullandıkları yaprak yaşıyla alakalı olduğunu, kendilerinin oldukça genç yapraklar kullandıkları şeklinde açıklamışlardır. Çalışmadan elde edilen veriler ışığında araştırmacılar, enginarın hem yenilen hem de yenilmeyen kısımlarının iyi bir biyoaktif bileşen kaynağı olduğu ve bu değerli bitkiden elde edilecek olan ekstraktların fitofarmasötik uygulamalara potansiyel bir alternatif oluşturduğu görüşündedirler.

Sharaf-Eldin vd. (2007) yapmış oldukları çalışmada, enginarın sinarin ve klorojenik asit gibi fenolik bileşenleri yüksek oranda içermesiyle ilişkili olarak önemli bir besinsel içeriğe sahip olduğunu ve bu fenoliklerin birçok hastalık üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar enginarın yenilen ve yenilmeyen kısımlarında bulunan bazı sekonder metabolitlerin verimi üzerine GA₃'in etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Bitkilerin dikimini takip eden 1, 1,5 ve 2. aylarda 60 ppm dozunda GA₃ uygulaması yapan araştırmacılar, 1 ay sonra uyguladıkları GA₃'in yapraklardaki klorojenik asit miktarında artış sağladığını, bununla birlikte sinarin miktarında ise herhangi bir değişikliğe neden olmadığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda GA₃ uygulamasıyla çiçeklenme zamanının kısaltıldığını, 3-5 kez hasat edilen çiçek başlarındaki sinarin içeriğinin GA₃ uygulaması yapılmayanlara kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda elde ettikleri bulgulara dayanarak araştırmacılar, GA₃ uygulama zamanı ile çiçeklenme zamanı arasında ilişki olduğunu, bu uygulama ile bazı sekonder metabolit miktarlarında değişiklikler sağlanabildiği görüşünde olduklarını belirtmişlerdir.

Orlovskaya vd. (2007) enginardaki amino asit ve mineral kompozisyonun ortaya koyulmasını amaçlayan bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar enginar yapraklarında toplam 15 adet amino asit saptamış, bunların dokuzunun (valin, treonin, methionin, izolösin, lösin, lisin, fenilalanin, histidin ve arjinin) temel amino asitler olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda enginarın sahip olduğu temel içerikteki temel amino asit içeriği payının %4,71 olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda yapraklarda bulunan makro ve mikro element kompozisyonunu belirlemiş olup, toplamda 21 element saptamışlardır. Bu elementlerden 5 tanesi sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve fosfor gibi makro elementlerken, diğer 16 tanesi ise bakır, çinko, gümüş, molibden, lityum, kurşun, kobalt, nikel, titanyum, vanadyum,

krom, demir, bor, alüminyum, silisyum ve manganez gibi mikro elementler olduğu bildirilmiştir.

Falleh vd. (2008) yürüttükleri bir çalışmada *Cynara cardunculus* L. bitkisinde biyoaktif bileşenlerin tespiti ve antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Farklı bitki kısımlarını değerlendirmeye alan araştırmacılar, çalışmanın sonucunda yaprak ve tohumların biyoaktif bileşen miktarlarının benzer olduğunu, çiçeklerdekiyle kıyaslandığında ise daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte enginarın antibakteriyel özelliğini de değerlendiren araştırmacılar, yabancı enginar yapraklarının bazı patojen bakterilerin (*Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*) büyümesini engellediğini saptamışlardır.

Lombardo vd. (2009), enginardaki farklı kısımların farklı biyoaktif bileşen miktarı içerdiğini ve bu durumun birtakım biyotik ve abiyotik faktörlere bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Biyoaktif bileşen kompozisyonunun biyolojik, teknik ve çevresel faktörlerden etkilendiğini savunan araştırmacılar, yaptıkları bu çalışmada genotip, bitkisel materyal, mevsim ve yetiştiricilik farklılıklarının biyoaktif bileşen içeriğinde meydana getirdiği farklılıklar üzerine çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda ise bu değerli biyoaktif bileşen içeriğindeki değişimlerin büyük oranda genotipe bağlı olduğunu belirten araştırmacılar, farklı bitki kısımlarında (çiçek sapı ve reseptakl) bileşen madde birikimin fazla olduğunu bildirmişlerdir. Buna ilaveten, içeriğin mevsim koşullarından da etkilendiğini, yetiştirme sezonunun ikinci yılı süresince bileşen miktarında azalmalar saptandığı rapor edilmiştir. Ayrıca dikim sıklığı ile bileşen miktarı arasındaki ilişkiyi de inceleyen araştırmacılar, 1 m² bitki yoğunluğu yerine 1,8 m² olduğunda bileşen miktarında da artış görüldüğünü bildirmişlerdir.

Pandino vd. (2010a), Akdeniz ülkelerinin beslenme tarzının bir parçası olan enginar başlarında mevcut olan bazı temel sekonder metabolitleri araştırmayı amaçlamışlardır. Denemeye aldıkları tüm örneklerde apigenin türevleri üstünlük göstermiş ve miktar olarak en yüksek yabancı enginar formunda ortaya koyulmuştur. Kafeoilkinik asitler ve luteolin türevleri sadece '*scolymus*' türünde gözlemlenmiş olup çeşide göre değişmekle birlikte miktar olarak en fazla tespit edilen bileşikler flavonlar olmuştur. Önceki çalışmaların aksine kafeoilkinik asitler değil apigenin ve türevleri en baskın bileşen olarak tespit edilmiştir. Diğer çalışmalardakinden farklı bir sonuç elde edilmesini genotip farklılığı ya da başların farklı olgunluk aşamalarında olmasıyla açıklayan araştırmacılar, yabancı enginarın başlarına ait fenolik profilin ilk kez bu çalışma ile ortaya koyulduğunu belirtmişlerdir. Bileşen analizleri ile elde ettikleri profil yardımıyla '*scolymus*' türü enginarın diğer türlerden ayrımını sağlayan araştırmacılar, bu çalışmanın yabancı ve kültür enginar formları arasındaki farklılıkları ortaya koymada yol gösterici olabilecek bir 'fenolik parmakizi' görevi üstlenebileceği görüşündedirler.

Lombardo vd. (2010) kültür enginarının Akdeniz Bölgesinde eski zamanlardan beri doğal olarak yetişen bir bitki olduğunu ve bu bitkinin yenilebilir kısmının (başların) şifa verici özelliklerinin kaynağı olan polifenollerce zengin olduğunu belirtmektedir. Araştırmacılar bu çalışmada farklı biyolojik ve morfolojik profile sahip 9 farklı enginar genotipinde çalışmışlardır. Gerekli ölçüm, tartım ve analizlerin ardından, farklı fenolik maddelerin bitkilerin farklı kısımlarında birikmekte olduğunu ve bu durumun yine genotipe göre de farklılık gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca iklim koşullarının biyoaktif bileşen profilinin değişmesinde etkili olduğunu ve bu hususta

hasat zamanının da dikkate değer bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar, enginarın yenilebilir kısımlarının yanı sıra ikincil ürün olarak değerlendirilen yenilmeyen kısımlarının da zengin biyoaktif bileşen içeriğine sahip olduğunu, bu durumun geleneksel uygulamalara potansiyel bir alternatif sunabileceği görüşünde olduklarını ifade etmişlerdir.

Salata ve Gruszecki 2010 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, enginar bitkilerindeki toplam polifenolik bileşenlerin tespit edilmesini amaçlamışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmanın sonucunda enginar bitkilerinin farklı kısımlarındaki polifenolik bileşenlerin içeriğinde önemli farklılıklar olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri bulgulara göre yapraklarda ve olgunlaşmamış tomurcuklarda biriken fenolik madde miktarları bitkinin farklı gelişme dönemlerinde yüksek bulunmuş olup, yapraklarda %3,167 (vegetatif gelişme süresince), olgunlaşmamış tomurcuklarda ise %3,730 (generatif gelişme süresince) fenolik asit birikimi en fazla olmuştur. Klorogenik asit ve sinarin asıl fenolik bileşenler olarak tespit edilen bu çalışmada, polifenoliklerin miktarlarında bitki yaşına bağlı olarak değişim görüldüğü belirtilmiştir. Buna göre, bitki yaşının artmasıyla fenolik madde miktarında azalma meydana geldiğini, çiçeklenme başlangıcındaki henüz olgunlaşmamış enginar başlarının sahip olduğu polifenol miktarının olgunlaşmış başların sahip olduğu miktardan daha yüksek olduğu rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra, farklı büyüme devrelerinde birikim gösteren fenolik maddelerin de farklı olduğunu belirten araştırmacılar, vegetatif büyüme aşamasında bitki yapraklarında kafeik asidin, generatif büyüme aşamasında ise bitki tomurcuklarında ferulik asidin diğer fenoliklere nazaran daha fazla birikim gösterdiğini de belirtmişlerdir.

Pandino vd. (2011a) yaptıkları çalışmada, içerdiği yüksek hidrokisisamik asit ve flavon seviyelerinden ötürü enginarın Roma zamanından beri geleneksel tıpta kullanıldığını belirtmişlerdir. Çalışmanın amacı ise mevcut olan bu polifenollerin başın farklı kısımlarında nasıl bir dağılım gösterdiğinin tespitidir. Çalışmada bu amaca yönelik olarak 6 farklı enginar çeşidi kullanılmış olup, polifenol miktarlarının tespitine yönelik yürütülen analiz HPLC–DAD–MS/MS yoluyla yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen verilere bakıldığında içteki braktelerden dışakine ya da genç braktelerden yaşlılara doğru, hidrokisisamik asitlerde büyük oranda bir azalma görülmesi şaşırtıcı olmuştur. Lignifikasyon (odunlaşma) sürecinde oldukça önemli rol oynadığı bilinen hidrokisisamik asit miktarında tespit edilen azalmanın sebebi olarak, lignin biyosentezinde bu bileşenlerin öncüller olarak kullanıldıklarından kaynaklandığı belirtilmiştir. Biyotik ve abiyotik stres koşullarında lignince zengin olan dış brakteler iç brakteleri koruyarak, baştaki iç kısımların fiziksel dayanıklılığını muhafaza edilmesine yardımcı olmaktadır. Hem çeşitlerin hem de farklı bitki kısımlarının sahip olduğu polifenol profilinin birbirinden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada değerlendirilmeye alınan çeşitlerin başlarının dış braktelerinde düşük fenolik profil (443 mg kg⁻¹ kuru madde) tespit edilirken, bitkinin yenilen kısımlarının sahip olduğu fenolik profilin ise kısmen daha yüksek (1473 mg kg⁻¹ kuru madde) olduğu bildirilmiştir.

Pandino vd. (2011b), kültür ve yabani enginar formlarındaki 10 genotip kullanarak yaptıkları bir çalışmada, bu genotiplerin polifenolik profilini ve antioksidan aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, nitel ve nicel profilleri belirlenen bileşenler flavonlar ve kafeoilkinik asitler olmuş ve analizi yapılan tüm *C. cardunculus* genotiplerinin yaprak ve çiçek sapı arasında değişiklik göstermişlerdir.

Çiçek gövdesinde kafeoilkinik asitler bol miktarda bulunurken, yapraklarda bulunan temel bileşenler; enginarında luteolin türevleri, yabancı ve kültüre alınan enginarında ise apigenin türevleri olmuştur. Bu sonuçlar, belirli bitki kısımlarında belirli fenolik bileşenlerin biriktiğini göstermektedir.

Lombardo vd. (2012) 17 enginar çeşidinden aldıkları çiçek sapı, reseptakl, iç ve dış brakteler gibi farklı bitki parçalarındaki mevcut polifenol içeriği ve antioksidan aktiviteleri üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında kış ve bahar aylarında yapılan hasadın bitki kısımlarının sahip olduğu toplam polifenol içeriğinde olası etkilerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Çalışmanın sonucunda elde ettikleri verilere dayanarak araştırmacılar, enginarın farklı kısımlarının polifenol profilinin birbirinden farklılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca bu farklılıkların çeşit bazında da dikkat çektiğini bildirmişlerdir. Enginarın çiçek sapı ve reseptaklının kafeoilkinik asitler ve apigenin türevlerince zengin olduğunu belirten araştırmacılar, her bir çeşidin kendine özgü bir şekilde belirli kısımlarında belirli polifenollerin birikiminin sözcüğü olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri bu bulguların, insan sağlığını iyileştirici özelliklerini ön plana çıkartarak, enginardan elde edilecek olan ekstraktların çeşide bağlı olarak polifenol profili ve antioksidan aktivitelerine göre özel ıslah programları düzenlenmesine imkân sağlayacağı görüşündedirler. Bunun yanı sıra araştırmacılar, enginarın polifenol profili üzerine hasat zamanının da etkili olduğunu, sıcaklık ve fotoperiyot gibi birtakım çevresel faktörlerin polifenol profilini düzenlemesinde oldukça etkili olduğunu ve bu konuya gereken önemin verilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Pandino vd. (2012) yürüttükleri bir çalışmada özellikle İtalya'da önemli bir yer tutan enginarın hem başlarının morfolojisi hem de polifenol profilini ele almışlardır. Çalışmada İtalya'ya özgü bir yerel çeşit olan '*Spinoso di Palermo*' ve 6 klon kullanılmış, atık madde olarak dikkate alınan dış brakteler de değerlendirilip polifenol profilleri ortaya koyulmuştur. Çalışmada kullanılan 3 klondan elde edilen polifenol içeriklerine dair verilerle '*Spinoso di Palermo*' yerel çeşidinin geliştirilebileceğini öne süren araştırmacılar, klonal seleksiyon yapılmasının mevcut yerel çeşitleri geliştirmek için pozitif bir strateji olduğunu belirtmektedirler.

Ciancolini vd. (2013) 17 İtalyan genotipi ile yürüttükleri bir çalışmada, genotiplerin farmasötik olarak aktif bileşenlerinin ekstraksiyonları için biyokütle üretimini değerlendirmeyi ve bu amaca yönelik olarak genotip seçimini gerçekleştirmeyi amaçlamışlardır. Biyokütle değerlendirmesini yürütmek amacıyla agro-morfolojik açıdan tanımlanan beş UPOV tanımlayıcısından (bitki boyu, yan sürgün sayısı, çiçek sapı çapı, tam gelişen ilk yaprak uzunluğu ve yaprak lob sayısı) yararlanmışlardır. Bununla birlikte biyokütle üretim tanımlayıcısı olarak kullanılan 6 farklı tanımlayıcıyı da (yan sürgün sayısı, tam oluşan ilk yaprak eni, asıl çiçek sapındaki yaprak sayısı, kuru yaprak sayısı, bitki çapı ve bitki kuru ağırlığı) kullanmışlardır. Biyokimyasal olarak fenolik bileşik içeriklerini belirlemek amacıyla da HPLC analizleri yapmışlardır. Elde ettikleri verilere göre genotipler bazında hem morfolojik hem de biyokimyasal özellikler bakımından önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuşlardır. HPLC analizleri sonucunda ise temel fenolik bileşiklerin klorojenik asit ve 1,5-O-dikafeoilkinik asit olduğunu belirtmişlerdir.

Pandino vd. (2013a) yaptıkları bir çalışmada doğal gıdaların ve farmasötiklerin gün geçtikçe artan bir ilgiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Buna yönelik olarak enginarın aslında atık madde olarak görülen yapraklarının ve çiçeklenme kısımlarının nitel ve nicel olarak karakterizasyonunu ele alan bu çalışmayı yürütmüşlerdir. Sicilya'ya özgü 2 farklı yerel çeşitten elde edilen klonları kullandıkları çalışmada yaprakların yüksek miktarda flavonları, çiçek sapının ise kafeoilkinik asitleri içerdiğini tespit etmişlerdir. Hem yapraklarda hem de çiçek sapındaki baskın kafeoilkinik asitler 5-*O*-kafeoilkinik ve 1,5-*O*-dikafeoilkinik iken, baskın luteolinlerin luteolin 7-*O*-rutinosit ve luteolin 7-*O*-glukosid olduğunu bildirmişlerdir.

Pandino vd. (2013b) yapmış oldukları bir çalışmada birtakım faktörlerin (genotip, yetiştirme ortamı ve hasat sonrası süreçler) enginarın polifenol profiline etkilerini ortaya koymayı amaçlamışlardır. Çalışmada Kasım – Nisan ayları arasında bitkisel materyaller toplanmış olup, güneş ışınlarının ve hava sıcaklığının polifenol içeriği üzerine olası etkilerinin saptanması amaçlanmıştır. Çalışmadan elde ettikleri verilere göre, hasat zamanındaki farklılıkların bitkinin çeşitli kısımlarının polifenol profilini nitel ve nicel anlamda etkilediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılara göre enginar bitkisinin polifenol profili hava sıcaklığı ve güneş ışınları ile oldukça ilişkili bulunmuştur. Şubat ayında düşük hava sıcaklığı ile güneş ışınlarının birlikte etkileri, yaprak, çiçek sapı ve braktelerde mevcut polifenol içeriğinde artış olarak tespit edilmiştir. Ancak, güneş ışınları reseptaklın sahip olduğu polifenol profilini diğer bitki kısımlarına nazaran daha fazla etkilemiş ve Nisan ayında tespit edilen kuru madde miktarının 9,46 g kg⁻¹'e kadar ulaştığı bildirilmiştir.

Abu-Reidah vd. (2013) DAD-ESI-QTOF-MS ile desteklenen HPLC metodunu kullanarak enginar kalbindeki fenolik bileşenleri karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada 61 bileşeni tanımlamakla birlikte 34 yeni fenolik bileşen ve izomerlerini ilk kez karakterize ettiklerini rapor etmişlerdir. Tanımladıkları fenolik bileşenler başlıca 3 hidroksibenzoik asit, 17 hidroksisinamik asit, 4 lignan, 7 flavone, 2 flavonol ve 1 fenol türevi bileşen olmuştur. Bunun yanı sıra araştırmacılar daha önce tanımlanan fenoliklerin 28 izomerini de saptadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmadan elde ettikleri bulgular ışığında araştırmacılar, enginar ekstraktlarının fonksiyonel bir biyoaktif gıda olarak dikkate alınabileceğini, ayrıca antioksidan bileşenlerinin de ümitvar bir kaynak olarak görülebileceğini göstermiştir.

El Senousy vd. (2014), üç farklı enginar çeşidi kullanarak yürüttükleri çalışmada enginara ait bitki materyallerini, gelişme sürecinin 4 farklı aşama ve pozisyonunda toplamışlar ve analizlerini UHPLC–MS yoluyla yapmışlardır. Araştırmacılar, bu üç çeşit arasında kafeik asit ve flavonoidler bakımından net bir ayırım ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte araştırmacılar, ortaya koydukları bu farklılıkların bitki yaşı dikkate alınmaksızın, farklı pozisyonlarda hasat edilen yapraklarda belirlediklerini bildirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre araştırmacılar, üst konumlu enginar yapraklarının sahip olduğu kafeoilkinik asit miktarının, alt konumlu yapraklara kıyasla daha iyi bir biyoaktif bileşen kaynağı olarak dikkate alınabileceği sonucuna varmışlardır.

Ramos vd. 2014 yılında *Cynara cardunculus* L. var. *atilis* (DC) üzerinde bir çalışma yürütmüşlerdir. Bitkilerin çeşitli morfolojik parçalarının içerdiği değerli biyoaktif bileşenlerini ortaya koymayı hedefledikleri bu çalışmada metanol:su:asetik

asit (49,5:49,5:1) ile ekstraksiyon uygulayarak UHPLC ile analizlerini yapmışlardır. Araştırmacılar çalışmada 28 fenolik bileşen tanımlamışlardır. Bu bileşenler arasında eriyodisitol heksosit bileşeninin *C. cardunculus* L. bitkisinde ilk kez tanımlandığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte yabancı enginarın bileşeni olarak 6 farklı bileşik tanımlanmıştır. Bunlar arasında 1,4-*O*-dikafeoilkinik asit, naringenin 7-*O*-glukosit, naringenin rutinosit, naringenin, luteolin asetil-heksosit ve apigenin asetil-heksosit yer almaktadır. Araştırmacılar elde ettikleri bulguları değerlendirdiklerinde farklı bitki kısımlarında belirli bileşenlerin üstünlük gösterdiğini tespit ederlerken, en yüksek hidroksisinamik asit içeriğinin gövdenin dış kısmında, en yüksek flavonoid içeriğinin ise başlarda bulunduğunu ifade etmişlerdir. Bunun yanı sıra baş ve gövdenin diğer kısımlarında da oldukça yüksek hidroksisinamik asit içeriği tespit ettiklerini bildiren araştırmacılar, yaprakların ise flavonoidlerce zengin olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca yüksek antioksidan aktivite göstermesiyle yine başların ön plana çıktığı ifade edilmiş olup, antioksidan fenolik bileşiklerinin kaynağı olarak yabancı enginarın çok önemli bir potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir.

Sihem vd. (2015), Tunus'a özgü 2 enginar çeşidinin farklı kısımlarının biyoaktif bileşenlerini tespit etmek ve antioksidan aktivitelerini ortaya koymak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Antioksidan testlerini farklı yöntemler (ABTS ve DPPH) kullanarak değerlendiren araştırmacılar, çeşitler ve farklı bitki kısımları arasında fenolik bileşenler bakımından farklılıklar bulmuşlardır. Yüksek miktarda tespit edilen bileşen 3,5-*O*-dikafeoilkinik asit olurken, brakte ve çiçeklenme kısımlarının toplam kafeoilkinik asitlerce zengin, yapraklarınsa önemli bir luteolin kaynağı olduğunu ifade etmişlerdir. Bunun yanı sıra çeşitlere ait bitki ekstraktlarının yüksek antioksidan aktivite potansiyeline sahip olduğu da belirtilmiştir. Çeşitlerin farklı bitki kısımlarının antioksidan aktiviteleri değerlendirildiğinde ise braktelerin oldukça güçlü toplam antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar çalışmadan elde ettikleri sonuçları genel anlamda değerlendirdiklerinde ise enginar yapraklarında tespit edilen antioksidan aktivitenin, brakte ve çiçeklenme kısımlarındakinden daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, enginar bitkisinin atık olarak kabul gören kısımlarının güçlü bir antioksidan bileşen kaynağı olabileceği görüşündedirler.

Wahba vd. (2016) yabancı enginar üzerine yürüttükleri çalışmada, bu bitkinin tıbbi bitki olarak kullanılma potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu, bununla birlikte bu değerli bitkinin hem tarım hem de kimyasal kompozisyonunun araştırılması gerektiği üzerinde durmuşlardır. Bu amaçla 2 yıl boyunca yetiştirdikleri yabancı enginar bitkilerini kullandıkları bu çalışmada, hasat sayısının bitki büyümesi ve aktif bileşenleri üzerine ne gibi etkiler yaptığı araştırılmıştır. Bitkilerin dikimini takiben belirli haftalarda hasatları gerçekleştirilmiş olup, hasat edilen yaprakların taze ve kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Karbonhidrat, flavonoid, polifenol ve klorogenik asit içerikleri gibi aktif bileşenleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar, hasat sayısının artmasıyla (3 hasada kadar) değerlendirmeye alınan parametrelerdeki değerlerin arttığını tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışma, yaprakların hasat ya da kesim sayısının artışı ile verimde artış sağlandığına dair önceki çalışmalar (Mauromicale ve Ierna 2000; Salata ve Buczkowska 2007; Matthes ve Honermeier 2007) ile uyum içinde olmuştur. Bunun yanı sıra hasat/kesim sayısı, zamanı ya da yaprakların bitki üzerindeki pozisyonu ile yapraklarda bulunan temel bileşenlerden olan kafeoilkinik asitler ve flavonoidler gibi

polifenolik bileşiklerin konsantrasyonlarında artışın ilişkili olduğu da diğer çalışmaları (Constantinescu vd. 1967; Netien ve Roulier 1967; Hammouda vd. 1993; Matthes ve Honermeier 2007; Salata ve Buczkowska 2007; Honermeier ve Gottmann 2010) destekler niteliktedir.

Ruiz-Aceituno vd. (2016) enginarın dış braktelerinde bulunan inositoller ve inülin gibi önemli biyoaktif karbonhidratların etkili bir ekstraksiyonu için 2 farklı ekstraksiyon metodunu (mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon – MAE ve basınçlı sıvı ekstraksiyon – PLE) kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Bahsi geçen bu iki metodu karşılaştırdıklarında inositol konsantrasyonunu MAE metodu kullanıldığında; inülin konsantrasyonu bakımından ise PLE metodu kullanıldığında daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki metodun da özellikle endüstriyel yan ürünlerden bu değerli biyoaktif karbonhidratların eş zamanlı elde edilmesine uygun olduğunu belirten araştırmacılar, bu tekniklerin belirtilen amaçlar için ilk kez kullanıldığını vurgulamışlardır.

Spînu vd. (2017), insan sağlığı için tıbbi ve aromatik bitkilerin önemini vurguladıkları çalışmada, bitkisel materyal olarak *Cynara scolymus* L. bitkilerini seçmişlerdir. Bu değerli bitkilerden elde edilecek olan ekstraktların sentetik ilaçlara bir alternatif olacağı görüşünü savunan araştırmacılar, çalışmalarında HPLC yöntemi ile analizlerini yürütmüşlerdir. Enginarın sahip olduğu klorojenik asitler, toplam polifenoller ve flavonoid içeriklerini belirleyerek, potansiyel antioksidan aktivitelerini ortaya koyan araştırmacılar yaptıkları bu çalışma ile enginarın flavonlarca ve fenolik bileşenlerce özellikle de klorojenik asitçe zengin olduğunu bir kez daha ortaya koymuşlardır.

Kollia vd. (2017) yılında yapmış oldukları bir çalışmada bitkisel materyal olarak yabani enginar ve kültür enginarını kullanarak bu bitkilerin çeşitli kısımlarının fenolik içeriklerini ve antioksidan kapasitelerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Bu amaçla iki farklı ekstraksiyon tekniği (ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ve klasik ekstraksiyon tekniği) kullanmışlardır. Araştırmacılar çalışmanın sonunda, yabani enginar başlarına ait ekstraktlarda kültür enginarına kıyasla daha yüksek oranda toplam fenol içeriği tespit ettiklerini ve güçlü antioksidan aktivitesi saptadıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, ultrason destekli tekniğin biyoaktif bileşen tespitinde ve antioksidan potansiyelinin ortaya konmasında daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Son yıllarda mevsimsel değişikliklerin dünya genelinde üretimi etkilediğini belirten Wahba vd. (2017), yaptıkları çalışmada yetiştirme sezonu süresince enginarın sahip olduğu flavonoid, polifenol, kafeoilkinik asitler gibi tıbbi açıdan önemli aktif bileşenlerin ve kimyasal kompozisyonundaki değişimlerle vegetatif büyüme üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanacakları bitki materyallerini Şubat ayından Haziran ayına kadar aylık olarak toplamışlardır. Araştırmacıların çalışmadan elde ettikleri sonuca göre Şubat ayından Haziran ayına kadar geçen süre içerisinde bitki yaşı arttıkça, fizyolojik faktörlerde (bitki boyu, yaprak sayısı) ve yaprak biyokütlesinde (yaş ve kuru ağırlık) artış görülmüştür. Ancak bu artışların Mayıs ayından sonra önemli bir seviyeye ulaştığını belirten araştırmacılar, karbonhidrat, flavonoid ve polifenol değerlerinin yaşla birlikte Mayıs ayında maksimum değere ulaştığını, bununla birlikte kafeik asit, vanilik asit ve klorojenik asidin ise Nisan ayı süresince en yüksek değerlere ulaştığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırmanın açık alan yetiştiriciliği çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme parsellerinde, doku kültürü çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ve Güney Agripark firması doku kültürü laboratuvarında, HPLC analizleri ise Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarında, 2017 – 2019 yılları arasında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Araştırmada enginarın (*Cynara scolymus* L.) üç farklı çeşidi kullanılmıştır. Bunlar Sakız, Bayrampaşa ve Olympus F₁ çeşitleridir. Hem doku kültürü çalışmaları için başlangıç materyalleri hem de HPLC analizleri için yararlanılan bitkisel materyaller Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme parsellerinden toplanmıştır. Araştırmada kullanılan enginar çeşitlerinin özelliklerine ilişkin bilgiler aşağıda kısaca sunulmuştur:

Sakız: Çok erkenci bir çeşit olarak bilinen Sakız, Ege bölgesinde özellikle İzmir, Çeşme, Karaburun, Urla, Ildır taraflarında yetiştirilmekle birlikte Akdeniz bölgesinde de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Başlar sıkı ve orta irilikte olup, çiçek tablası fazla büyük değildir. Genellikle taze tüketime uygundur. Brakte yaprakları ile birlikte çiçek tablası yenir. Tipik özelliği ise yapraklarının lobsuz, yani düz oluşudur.

Bayrampaşa: Geçici bir çeşittir. Bu özelliğinden ötürü taze tüketimden çok konservelik olarak tüketime uygundur. Marmara bölgesinin İstanbul ve Bursa taraflarında yetiştiriciliği yaygındır. Başlar oldukça iri, basık; çiçek tablası büyüktür. Tipik özelliği ise yaprakları girintili çıkıntılıdır.

Olympus F₁: Taze tüketime uygun olan bu çeşit, orta erkenci özellik göstermektedir. Başlar iri, yuvarlak ve yeşil renkte olup, dış braktelerde hafif mor renk oluşumu görülebilmektedir.

3.2. Metot

3.2.1. Açık alan çalışmaları

3.2.1.1. Arazinin dikime hazırlanması, materyallerin temini ve dikimi

Çalışmanın başlangıcında arazi dikime hazır hale getirilmiş (Şekil 3.1), araştırmanın sağlıklı yürütülmesi amacıyla toprak analizi de yapılmıştır (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. Arazinin dikime hazırlanması

Çizelge 3.1. Toprak analizi sonuçları

pH	7,34	Fe (ppm)	7,72
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	469,1	Mn (ppm)	28,04
Kireç (%)	42,90	Cu (ppm)	1,36
Organik madde (%)	5,93	Zn (ppm)	3,52
K (ppm)	681,43	Kum (%)	31,44
Na (ppm)	56,18	Kil (%)	46,56
Ca (ppm)	5465,16	Silt (%)	22,00
Mg (ppm)	432,70	Bünye	C

2017 – 2019 yılları arasındaki aylık minimum, maksimum ve ortalama sıcaklık değerlerine ait veriler Antalya Meteoroloji Bölge Müdürlüğü'nden temin edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Bitkilerin yetiştirildiği alana ilişkin meteorolojik veriler

Aylar/Yıllar	Aylık Maksimum Sıcaklık Değerleri (°C)			Aylık Minimum Sıcaklık Değerleri (°C)			Aylık Ortalama Sıcaklık Değerleri (°C)		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019
Ocak	14,58	18,61	14,24	7,09	9,79	8,10	10,20	13,21	10,58
Şubat	16,61	19,37	16,98	9,46	11,72	9,78	12,51	14,82	12,90
Mart	18,61	19,64	18,78	11,59	12,82	10,85	15,02	16,09	14,74
Nisan	21,48	23,99	20,52	14,59	16,06	13,53	17,71	19,61	16,59
Mayıs	23,71	27,05	25,04	18,05	19,93	18,44	21,34	23,26	21,50
Haziran	30,98	28,59	29,65	22,93	22,39	22,82	26,34	25,50	26,01
Temmuz	34,99	33,59	33,65	27,03	25,78	25,51	30,51	29,22	28,76
Ağustos	32,04	32,35		26,30	26,05		29,03	29,05	
Eylül	30,28	31,96		23,57	24,38		26,9	27,53	
Ekim	26,73	27,20		18,77	18,95		22,15	22,61	
Kasım	21,49	22,92		13,69	14,90		16,85	18,14	
Aralık	18,71	16,89		11,70	9,53		14,42	12,86	

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne ait deneme alanlarında plantasyon kurmak amacıyla çeşitli yerlerden (Antalya – Aksu, Gazipaşa; İzmir – Ildır, Karaburun, Urla, Çeşme; Adana) başlangıç materyalleri temin edilmiştir. Toplanan bu materyaller deneme parsellerine dikilmeden önce hazırlanan torf:perlit (1:1) harç karışımına alınarak kök gelişimleri kuvvetlendirilmiştir (Şekil 3.2).

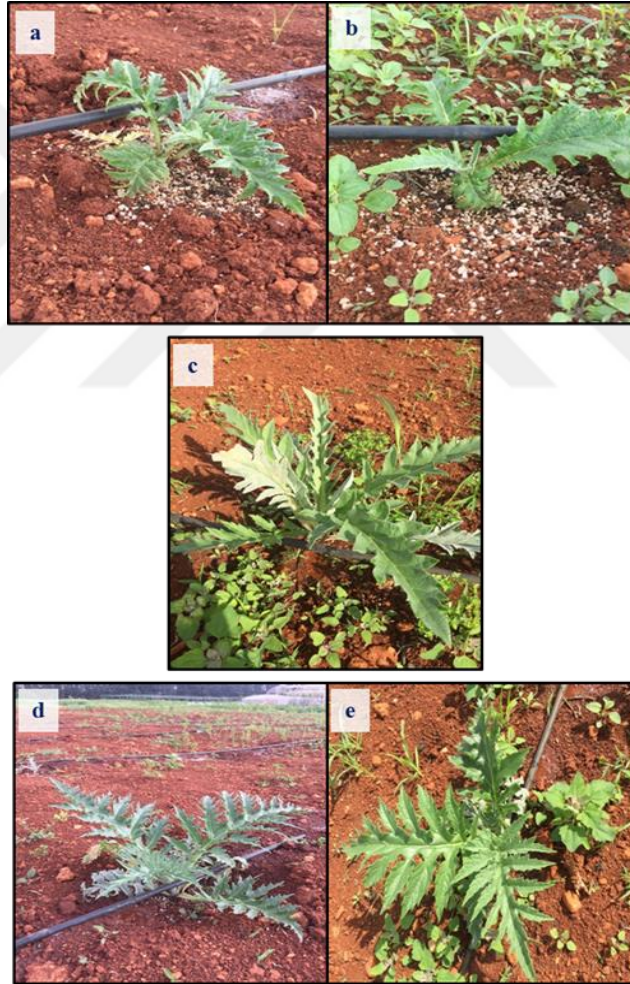


Şekil 3.2. Hazırlıklar; **a.** Torf : perlit (1:1) karışımının hazırlanması; **b.** Dip sürgünlerin alınması; **c.** Dip sürgünü; **d.** ve **e.** Sakız çeşidine ait dip sürgünler ve bunların hazırlanan harç karışımlarına dikilmesi; **f.** ve **g.** Bayrampaşa çeşidine ait dip sürgünler ve bunların harç karışımına dikilmesi; **h.** Olympus F₁ çeşidine ait dip sürgünlerin görünümü; **i.** Sakız, Bayrampaşa ve Olympus F₁ çeşitlerine ait dip sürgünlerin köklendirme ortamlarındaki görünümü; **j.** ve **k.** Dip sürgünlerin harçları içeren polipropilen tüplere dikimi

Bu işlemleri takiben 2017 yılı Mart ayında materyallerin dikimi yapılmış, aynı senenin Eylül ayı başında uyandırma suyu verilmiştir (Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). Bitkisel materyallerin sağlıklı gelişimlerini sürdürebilmek amacıyla kültürel işlemler düzenli bir şekilde uygulanmıştır (Eser vd. 2006). İlerleyen süreçte sürgünler (piçler) alınarak yeni dikim yerlerine dikilmiş, plantasyon genişletilmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.3. a. Dikime hazır, köklenen bir bitki; b. Köklenen bitkilerin toprağa dikilmesi; c. Dikimden sonra arazinin görünümü



Şekil 3.4. Araziye dikildikten 1 ay sonra bitkilerin görünüşleri, a. ve b. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiler; c. Sakız çeşidine ait bitkiler; d. ve e. Olympus F₁ çeşidine ait bitkiler



Şekil 3.5. Araziye dikildikten 2 ay sonra bitki gelişimleri, **a.** Bayrampaşa; **b.** Sakız; **c.** Olympus F₁

3.2.1.2. Morfolojik gözlemler

Yetiştirilen bitkilerin morfolojik olarak gelişimlerini gözlemlemek amacıyla birtakım parametreler belirlenmiş (Ekbiç 2005), bu parametreler şu şekildedir:

- ✓ Yaprakların şekilleri (bütün, parçalı, çok parçalı)
- ✓ Yapraklardaki klorofil miktarı (SPAD değeri)
- ✓ Yaprak genişliği ve uzunluğu (cm)
- ✓ Baş şekli (silindirik, hafif basık yuvarlak, oval, yuvarlak oval, yuvarlak)
- ✓ Baş sıklığı (sıkı başlı, sıkı olmayan başlı)
- ✓ Braktelerin rengi / antosiyan oluşumu (antosiyanlı, az antosiyanlı, antosiyansız)
- ✓ Brakte ucunun şekli (düz, girintili)
- ✓ Dikenlilik (dikenli, dikensiz)

3.2.1.3. Bitkilerden yaprak örneklerinin toplanması

Enginarın polifenollerce oldukça zengin olduğu bilinmektedir. Araştırmada kullanılan çeşitlerin HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yöntemi ile tespit edilecek olan polifenol içerikleri için yaprak örnekleri toplanmıştır. Çalışmada değerlendirmeye alınan çeşitlere ait arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerden iç ve dış olarak iki farklı pozisyondan, en az 3 farklı bitkiden, 2018 Ekim – 2019 Nisan ayları arasında 10’ar yaprak toplanmıştır. Arazi koşullarından toplanan bu yapraklar hemen laboratuvara getirilerek tartılmış, elde edilen değerler “yaprak taze ağırlığı” olarak ifade edilmiştir. Taze ağırlıkları ölçülen yapraklar, önceden sıcaklığı 65 °C’ye ayarlanmış etüvlerde sabit ağırlıklarına ulaşmaya kadar, yaklaşık 4 gün süresince bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yaprak örneklerinin ağırlıkları tekrar tartılmış, bu değerler de “yaprak kuru ağırlığı” olarak ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra hem iç hem de dış yapraklara ait “kuru ağırlık yüzdeleri” de tespit edilmiştir. Bu amaçla aşağıdaki eşitlikten faydalanılmıştır:

$$\text{Kuru Ağırlık (\%)} = \frac{\text{Yaprak örneğinin kuru ağırlığı (g)}}{\text{Yaprak örneğinin taze ağırlığı (g)}} \times 100$$

3.2.2. *In vitro* çalışmalar

3.2.2.1. *In vitro* çalışmalar için genel laboratuvar hazırlığı

Araştırmada farklı aşamalarda farklı kültür kapları kullanılmıştır. Meristem kültürünün başlangıcında cam deney tüpleri kullanılırken, bunu takiben alt kültür aşamalarında ve *in vitro* köklendirme çalışmalarında 660 mL'lik plastik kapaklı otoklavlanabilen cam kavanozlar kullanılmıştır. Kallus kültürü çalışmalarında 60 ve 90 mm steril plastik petrilerden yararlanılmıştır. İrileşen kalluslar için Magenta kutuları kullanılmıştır. Hücre süspansiyon kültürleri ise 100 ve 250 mL'lik erlenlenlerle yürütülmüştür.

Genel olarak *in vitro* çalışmaların steril bir şekilde yürütülmesi amacıyla tüm cam malzemeler, pens ve bistüriler, filtre kağıtları, sterilizasyonda kullanılan distile saf sular otoklav sterilizasyonuna (1,2 kg cm⁻² basınç ve 121 °C sıcaklıkta 20 dakika) tabi tutulmuştur. Çalışma esnasında pens ve bistürilerin steril hallerinin muhafazası amacıyla 'glass bead' olarak da bilinen boncuklu sterilizatör aleti kullanılmıştır. Zaman zaman da daha eski ve bilinen bir yöntem olan alkol + alev işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce çalışma ortamı olan steril kabinlerin steril hale getirilmesi için %70 (v/v) etil alkol hazırlanarak temizlenmiş, UV ışığı da açılarak bir süre bekletilmiştir. Ardından çalışmada kullanılacak olan tüm malzemeler hazırlanan bu alkol solüsyonu ile muamele edildikten sonra steril kabine alınmıştır.

3.2.2.2. Mikroçoğaltım çalışması

Araştırmanın mikroçoğaltım çalışmalarını yürütürken kullanılan temel besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin tipi ve konsantrasyonları farklılık göstermiştir. Başlangıçta birtakım besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları denemeye alınmış, daha sonra en ideal tepkiyi ortaya koyma potansiyeli olanlarla çalışmalara devam edilmiştir. Genel anlamda mikroçoğaltım amacıyla Murashige ve Skoog (MS) temel besi ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Tüm besi ortamlarında ortak olan diğer bileşenler ise karbonhidrat kaynağı olarak 30,0 g L⁻¹ sükroz ve besi ortamlarını yarı katı hale getirmek için 6,0 g L⁻¹ agardır. Hazırlanan besi ortamlarının pH değerleri 5,7 – 5,8 arasında sabitlenmiş, 1,2 kg cm⁻² basınç ve 121 °C sıcaklıkta 20 dakika otoklav sterilizasyonu yapılmıştır.

Çizelge 3.3. Besi ortamlarının hazırlanmasında kullanılan Murashige ve Skoog (1962) ve Gamborg vd. (1968) temel besi ortamlarının içerikleri

Besi Ortamı İçeriği	Murashige & Skoog (mg L ⁻¹)	Gamborg B5 (mg L ⁻¹)
Makro Elementler		
KNO ₃	1900,00	2500,00
NH ₄ NO ₃	1650,00	-
CaCl ₂	332,02	113,23
MgSO ₄	180,54	121,56

Çizelge 3.3. 'ün devamı

KH ₂ PO ₄	170,00	-
NaH ₂ PO ₄	-	130,44
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134,00
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,80
Mikro Elementler		
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	10,00
H ₃ BO ₃	6,20	3,00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	2,00
KI	0,83	0,75
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
FeNaEDTA	36,70	36,70
Organik Bileşikler		
<i>myo</i> -inositol	100,00	100,00
Tiamin-HCl	0,10	10,00
Nikotinic asit	0,50	1,00
Pridoksin-HCl	0,50	1,00
Glisin	2,00	

Çalışmada mikroçoğaltımı optimum düzeyde sağlamak amacıyla temel besi ortamı olarak MS ile hazırlanan 2 farklı besi ortamı kombinasyonu denemeye alınmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Çalışmanın mikroçoğaltım aşamasında kullanılan besi ortamı kombinasyonları

<i>In vitro</i> Çoğaltma Ortam Kompozisyonları	
1	$\frac{3}{4}$ MS + 0,05 mg L ⁻¹ BAP + 0,005 mg L ⁻¹ IBA + 30 g L ⁻¹ sükroz
2	$\frac{3}{4}$ MS + 0,25 mg L ⁻¹ BAP + 0,025 mg L ⁻¹ IBA + 30 g L ⁻¹ sükroz

Mikroçoğaltım çalışması için başlangıç materyali olarak belirli zamanlarda meristemler alınmıştır. 2017 yılı Mart ayında deneme parsellerine ana bitki materyalleri dikilmiş olup, 2017 yılı Haziran ayında bu bitki materyallerinin arasından iyi gelişmiş olanlarından ilk eksplantlar alınmıştır. Bu tarihte alınan üç çeşide ait meristem eksplantlarının *in vitro* gelişme durumları birbirlerinden farklı olmuştur. Bayrampaşa çeşidine ait meristemlerin alt kültürlerinde iyi gelişmeler gözlemlenip aylık periyotlar bazında alt kültürleme işlemine devam edilirken, Sakız ve Olympus F₁ çeşitlerine ait meristemlerin gelişmelerinde vitrifikasyonlar ve anormal gelişmeler gözlemlenmiştir. Haziran ayı içerisinde deneme parsellerinde sulama durdurulup, bitkiler dinlenme dönemine geçirilmiş ve ardından Eylül ayı içerisinde uyandırma sulaması ile gelişmelerine devam etmeleri sağlanmıştır. Bu aydan itibaren kendilerini toparlamaya

başlayan Sakız ve Olympus F₁ çeşidine ait bitkilerden 2018 Şubat ayı başında tekrar meristemler alınarak, mikroçoğaltım aşamaları tekrarlanmıştır.

Çalışmada kullanılacak olan eksplantlar deneme parsellerinden toplanmış, laboratuvar ortamına getirilmiştir. Açık araziden toplanan bu ana materyaller öncelikle akan musluk suyu altında bir süre tutularak toprak vs. parçaları temizlenmiştir. Ardından ana bitki materyalleri belirli bir büyüklüğe kadar küçültülmüş ve hazırlanan anti-bakteriyel sabun solüsyonunda (95 mL saf su + 5 mL anti-bakteriyel sabun) 10 dakika bekletilmiş, ardından akan musluk suyunda arındırılmışlardır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Araziden toplanan bitkilerin doku kültürü çalışmalarına hazırlık aşaması, **a.** Sakız; **b.** Bayrampaşa; **c.** Olympus F₁

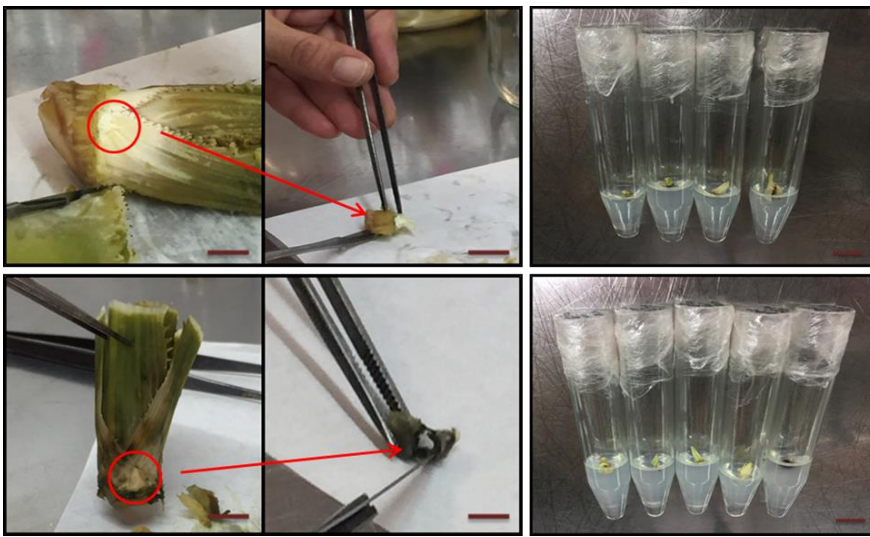
Ön arındırma aşamasından sonra bitki materyalleri laminar akışlı steril kabin içerisine alınarak, sterilizasyonlarına burada devam edilmiştir. İlk olarak steril distile saf sudan geçirilen materyaller, ardından %70'lik (v/v) etil alkol solüsyonunda 10-15 saniye bekletilmiş ve tekrar steril distile saf sudan geçirilmiştir. Bu işlemin ardından materyallere iki aşamalı sterilizasyon işlemi uygulanmış olup, ilk aşamada %30'luk (v/v) (%4,5 aktif madde) sodyum hipoklorit solüsyonunda 20 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin ardından steril distile saf su ile 4 kez yıkanan materyaller, belirli bir büyüklüğe

kadar ikinci kez küçültülmüştür. Ardından sterilizasyonun ikinci aşamasına geçilmiş olup, yine %30'luk (v/v) hazırlanan ticari çamaşır suyu solüsyonunda bu sefer 10 dakika bekletilmiştir. Ardından 4 defa steril distile saf sudan geçirilen bitki materyalleri kesime ve besi ortamlarına dikime hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.7).

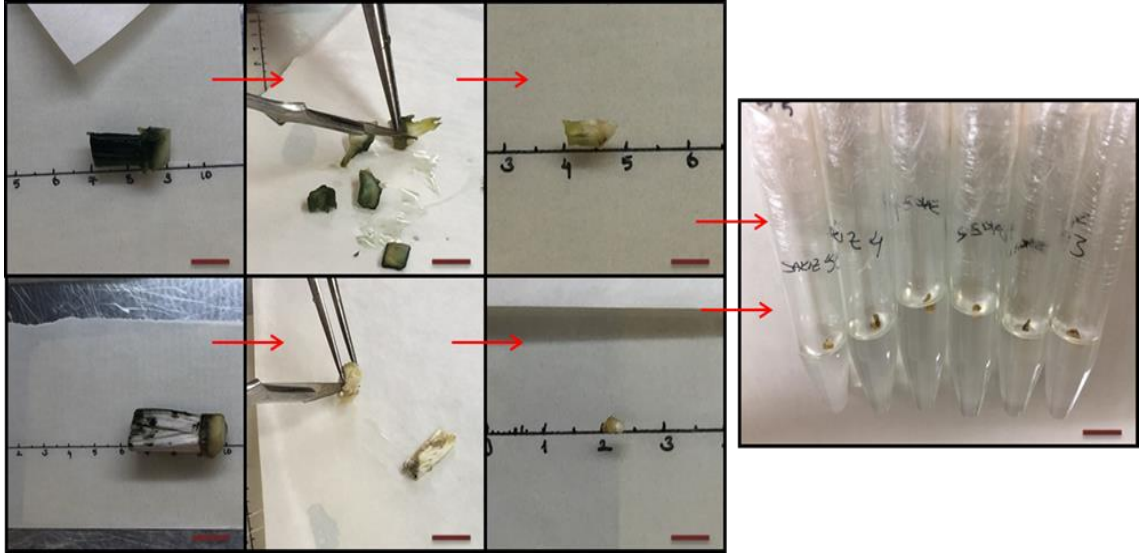


Şekil 3.7. Bitkisel materyallerin sterilizasyon aşaması, **a.** ve **b.** 1. Sterilizasyon öncesi ve sonrası; **c.**, **d.** ve **e.** 2. Sterilizasyon aşaması sonrası (**c.** Sakız, **d.** Bayrampaşa, **e.** Olympus F₁)

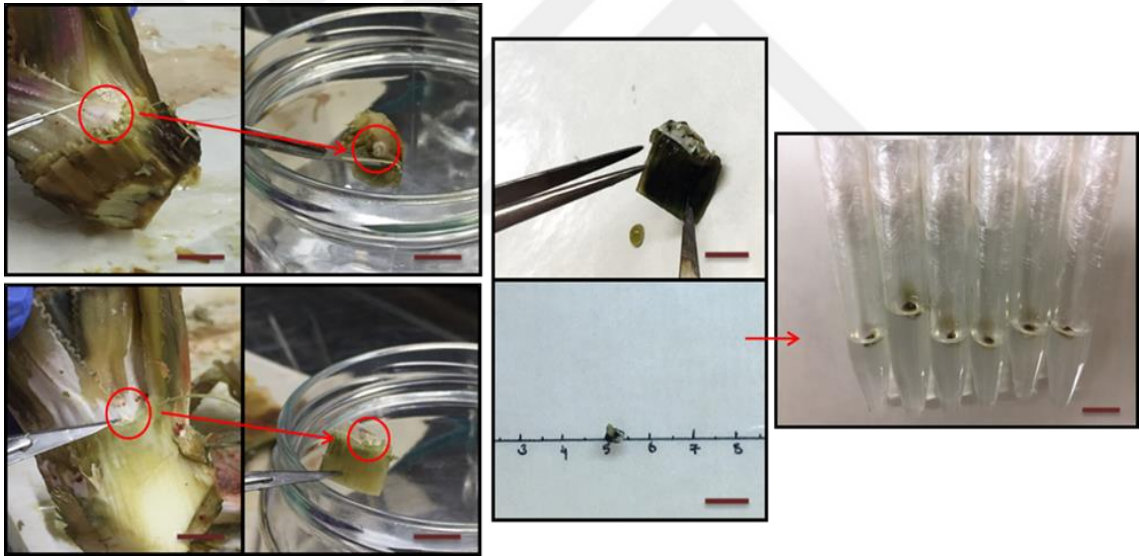
Çalışmada mikroçoğaltımın başlatılması amacıyla meristem kültürü tekniğinden yararlanılmıştır. Sterilizasyonları tamamlanan eksplantlar yaklaşık 0,5 – 1,0 cm olacak şekilde kesilerek besi ortamlarına dikime hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10).



Şekil 3.8. Bayrampaşa bitkisine ait meristemlerin ana materyalden ayrılması ve kültüre alınması aşamaları (bar = 1 cm)



Şekil 3.9. Sakız çeşidine ait meristemlerin ana materyalden ayrılması ve besi ortamı içeren tüplerde kültüre alınması (bar = 1 cm)



Şekil 3.10. Olympus F₁ bitkisine ait meristemlerin ana materyalden ayrılma aşaması (bar = 1 cm)

Araştırmanın mikroçoğaltım çalışmaları esnasında kültüre alınan başlangıç materyallerinin gelişimlerini takiben, 30 gün süre gibi belirli aralıklarla taze besi ortamlarına aktarmaları (alt kültür) yapılmıştır. Çalışmada her bir çeşit için alt kültürler süresince her bir kavanoza yeni oluşan sürgünlerden 5-6 tane kültüre alınmış, 4 hafta sonra yeni oluşan sürgün sayıları hesaplanmış ve çoğaltma katsayısı olarak ifade edilmiştir. Alt kültür süreçlerinde çoğaltılan bitkiciklerde gözlemler yapılarak mikroçoğaltım oranı, eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı, sürgün başına düşen ortalama yaprak sayısı, kültüre alınan kavanozlar başına enfeksiyon, gelişmeyen ve yaşlı bitki oranları çoğaltım katsayıları çeşitler bazında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. *In vitro* köklenme çalışmaları

In vitro çalışmalarda mikroçoğaltım aşamasını takiben köksüz bitkiciklerin köklendirilip dış koşullara alıştırılması oldukça önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Doku kültürü koşullarında çoğaltımları yapılan bitkiciklerin yine aynı koşullarda köklendirilip dış koşullara adaptasyonu sağlanmaya çalışılmıştır. *In vitro* koşullarda çoğaltılan bitkiciklerin köklendirilmesi amacıyla yarı güçlü MS temel besi ortamı ($\frac{1}{2}$ MS) ile birtakım bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak oluşturulan besi ortamı kombinasyonları denenmiştir. Bu besi ortamlarının içerikleri Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.5. *In vitro* köklenme amacıyla hazırlanan 'Z' kodlu besi ortamı kombinasyonları

Ortam Kodu	<i>In vitro</i> Köklenme Besi Ortamı Kompozisyonu
Z1	$\frac{1}{2}$ MS + 2 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ B1 vit. + 100 mg L ⁻¹ myo-inositol + 10 mg L ⁻¹ nikotinik asit
Z2	$\frac{1}{2}$ MS + 2 mg L ⁻¹ NAA
Z3	$\frac{1}{2}$ MS + 2 mg L ⁻¹ NAA + 5 mg L ⁻¹ GA ₃
Z4	$\frac{1}{2}$ MS + 3 mg L ⁻¹ NAA
Z5	$\frac{1}{2}$ MS + 3 mg L ⁻¹ NAA + 5 mg L ⁻¹ GA ₃
Z6	$\frac{1}{2}$ MS + 2 mg L ⁻¹ NAA + 1 g L ⁻¹ aktif kömür
Z7	$\frac{1}{2}$ MS + 2 mg L ⁻¹ NAA + 2 g L ⁻¹ aktif kömür
Z8	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ IAA + 5 mg L ⁻¹ GA ₃
Z9	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ NAA + 5 mg L ⁻¹ GA ₃ + 1 g L ⁻¹ aktif kömür
Z10	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ IBA
Z11	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ IBA + 5 mg L ⁻¹ GA ₃ + 1 g L ⁻¹ aktif kömür
Z12	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ IBA + 1 g L ⁻¹ aktif kömür
Z13	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ IBA + 0,3 mg L ⁻¹ B6 vit.
Z14	$\frac{1}{2}$ MS (kontrol)

Çizelge 3.6. *In vitro* köklenme amacıyla hazırlanan 'K' kodlu besi ortamı kombinasyonları

Ortam Kodu	<i>In vitro</i> Köklenme Besi Ortamı Kompozisyonu
K1	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ IAA
K2	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ IAA + 1 g L ⁻¹ aktif kömür
K3	$\frac{1}{2}$ MS + 10 mg L ⁻¹ IAA + 2 g L ⁻¹ aktif kömür
K4	$\frac{1}{2}$ MS + 6 mg L ⁻¹ IBA

Çizelge 3.6.'nın devamı

K5	$\frac{1}{2}$ MS + 6 mg L ⁻¹ IBA + 1 g L ⁻¹ aktif kömür
K6	$\frac{1}{2}$ MS + 6 mg L ⁻¹ IBA + 2 g L ⁻¹ aktif kömür
K7	$\frac{1}{2}$ MS + 5 mg L ⁻¹ GA ₃ + 0,5 mg L ⁻¹ NAA
K8	$\frac{1}{2}$ MS + 5 mg L ⁻¹ GA ₃ + 0,5 mg L ⁻¹ NAA + 1 g L ⁻¹ aktif kömür
K9	$\frac{1}{2}$ MS + 5 mg L ⁻¹ GA ₃ + 0,5 mg L ⁻¹ NAA + 2 g L ⁻¹ aktif kömür
K10	$\frac{1}{2}$ MS

Çalışmada mikroçoğaltım uygulamalarının 4. alt kültüründen itibaren bitkiciklerin sağlıklı ve düzenli gelişme gösterdiği, çoğaltım katsayılarının da *in vitro* köklenme çalışmalarına yetecek düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle *in vitro* köklenme çalışmaları için hazırlanan besi ortamlarına alınan bitkicikler bu seviyedeki bitkicikler olmuştur.

Hem mikroçoğaltım amacıyla kullanılan besi ortamında köklenen bitkicikler, hem de *in vitro* köklenmenin geliştirilmesi amacıyla hazırlanmış olan besi ortamı kombinasyonlarından elde edilen köklü bitkiciklerin dış koşullara alıştırmaları gerçekleştirilmiştir. Birtakım gözlemler yapıldıktan sonra köklü bitkicikler *in vitro* koşullardan alınmış ve torf:perlit (1:1) karışım harcını içeren plastik viyollere aktarılmıştır. *In vitro* koşullardan aktarılan bu bitkicikler sera koşullarında 30 – 40 gün bekletilmiştir. *In vitro* koşullara oldukça kontrollü olduğundan dolayı, seraya getirilen bitkicikler ilk 10 gün boyunca polietilen bir örtü altında muhafaza edilmiştir. Bu sürenin ardından polietilen örtü gün geçtikçe yavaş yavaş kaldırılmıştır. Sera koşullarındaki bitkicikler sisleme sistemiyle günde 2 kez sulanmıştır. Belirtilen sürenin sonunda bitkiciklerin durumları kontrol edilmiş, gerekli gözlemler yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir. Aklimatizasyon aşamasının ardından gelişmesi iyi olan bitkicikler arazi koşullarına aktararak gelişmelerine burada devam etmeleri sağlanmıştır.

3.2.2.4. Kallus ve hücre süspansiyon kültürü çalışmaları ve elisitör uygulamaları aşaması

Araştırmanın bir diğer aşamasında kallus kültürlerinin oluşturulması hedeflenmiştir. Kallus kültürlerinin başlatılması amacıyla başlangıçta yaprak, yaprak ana damarı gibi farklı eksplantlar kullanılmıştır. Çalışmanın da ana hedefi olan sinarin maddesinin yaprak ana damarı değil de yapraklarda daha fazla miktarda olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hedef sekonder metabolite ulaşmak için kallus kültürü çalışmalarına yaprak eksplantları üzerine yoğunlaşarak devam edilmiştir.

Çalışmada, kallus kültürlerini başlatmak amacıyla çeşitli besi ortamı kombinasyonları denenmiştir. Bu ortam kombinasyonlarında temel besi ortamı olarak MS ve Gamborg B5'ten yararlanılmıştır. Araştırmada denemeye alınan besi ortamı kombinasyonları arasında karışıklığı önlemek adına farklı kodlandırmalar yapılmış olup (E, C, N, D, X, B ve T), ortamların içerikleri aşağıdaki çizelgelerde sunulmuştur (Çizelge 3.7 – Çizelge 3.13).

Çizelge 3.7. 'E' kodlu kallus besi ortamı içeriği

Ortam Kodu	Temel Besi Ortamı – MS (g L ⁻¹)	Besi Ortamı Kompozisyonu		
		NAA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	Sükroz (g L ⁻¹)
E1	4,4	2,0	5,0	30,0
E2	4,4	0,5	5,0	30,0
E3	4,4	5,0	0,5	30,0
E4	4,4	1,0	1,0	30,0
E5	4,4	0	0	30,0

Çizelge 3.8. 'C' kodlu kallus besi ortamı içeriği

Ortam Kodu	Temel Besi Ortamı – ³ / ₄ MS (g L ⁻¹)	Besi Ortamı Kompozisyonu		
		IBA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	Sükroz (g L ⁻¹)
C0	3,3	0,005	0,05	30,0
C1	3,3	0,010	0,10	30,0
C2	3,3	0,015	0,15	30,0
C3	3,3	0,020	0,20	30,0
C4	3,3	0,025	0,25	30,0
C5	3,3	0,050	0,50	30,0
C6	3,3	0,125	1,25	30,0
C7	3,3	0,250	2,50	30,0
C8	3,3	0,125	1,25	30,0
C9	3,3	0,125	1,25	60,0
C10	3,3	0,125	1,25	20,0

Çizelge 3.9. 'N' kodlu kallus besi ortamı içeriği

Ortam Kodu	Temel Besi Ortamı – Gamborg B5 (g L ⁻¹)	Besi Ortamı Kompozisyonu		
		NAA (mg L ⁻¹)	Glutamin (g L ⁻¹)	Aktif Kömür (g L ⁻¹)
N0	3,2	-	-	-
N1	3,2	10,0	-	-
N2	3,2	10,0	1,0	-
N3	3,2	10,0	-	1,0
N4	3,2	10,0	1,0	1,0

Çizelge 3.10. ‘D’ kodlu kallus besi ortamı içeriği

Ortam Kodu	Temel Besi Ortamı – Gamborg B5 (g L ⁻¹)	Besi Ortamı Kompozisyonu		
		2,4-D (mg L ⁻¹)	Glutamin (g L ⁻¹)	Aktif Kömür (g L ⁻¹)
D0	3,2	-	-	-
D1	3,2	10,0	-	-
D2	3,2	10,0	1,0	-
D3	3,2	10,0	-	1,0
D4	3,2	10,0	1,0	1,0

Çizelge 3.11. ‘X’ kodlu kallus besi ortamı içeriği

Ortam Kodu	Temel Besi Ortamı MS (g L ⁻¹)	Besi Ortamı Kompozisyonu							
		Kin (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)	IAA (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	Sükroz (g L ⁻¹)
X1	4,4	0,05	3,0	-	-	-	-	-	30,0
X2	4,4	0,05	3,0	-	-	-	-	-	50,0
X3	4,4	0,1	2,0	-	-	-	-	-	30,0
X4	4,4	0,1	2,0	-	-	-	-	-	50,0
X5	4,4	0,5	2,0	-	-	-	-	-	30,0
X6	4,4	0,5	3,0	-	-	-	-	-	30,0
X7	4,4	0,5	2,0	-	-	-	-	-	50,0
X8	4,4	0,5	3,0	-	-	-	-	-	50,0
X9	4,4	0,5	2,0	-	-	1,0	-	-	30,0
X10	4,4	0,5	0,5	-	-	-	-	-	30,0
X11	4,4	1,0	1,0	-	-	-	-	-	30,0
X12	4,4	1,0	3,0	-	-	-	-	-	30,0
X13	4,4	1,0	-	1,0	-	-	-	-	30,0
X14	4,4	1,0	-	3,0	-	-	-	-	30,0
X15	4,4	-	0,5	-	0,5	-	-	-	30,0
X16	4,4	-	1,0	-	0,5	-	-	-	30,0
X17	4,4	-	0,5	-	0,5	-	-	-	50,0
X18	4,4	-	1,0	-	0,5	-	-	-	50,0
X19	4,4	-	2,0	-	0,5	-	-	-	30,0
X20	4,4	-	3,0	-	0,5	-	-	-	30,0
X21	4,4	-	-	0,2	0,2	1,0	-	-	30,0
X22	4,4	-	-	2,0	0,5	0,5	0,5	-	30,0
X23	4,4	-	-	3,0	0,5	0,5	-	-	30,0

Çizelge 3.11.'in devamı

X24	4,4	-	-	3,0	0,5	-	-	-	30,0
X25	4,4	-	-	1,0	1,0	-	-	-	30,0
X26	4,4	-	-	1,0	1,0	0,5	-	-	30,0
X27	4,4	-	-	2,0	1,0	-	-	-	30,0
X28	4,4	-	-	3,0	1,0	-	-	-	30,0
X29	4,4	-	-	2,0	2,0	-	-	-	30,0
X30	4,4	-	-	2,0	2,0	-	-	-	50,0
X31	4,4	-	-	3,0	2,0	-	-	-	30,0
X32	4,4	-	-	-	0,5	-	-	0,5	30,0
X33	4,4	-	-	-	-	-	-	-	30,0

Çizelge 3.12. 'B' kodlu kallus besi ortamı içeriği

Ortam Kodu	Temel Besi Ortamı B5 (g L ⁻¹)	Besi Ortamı Kompozisyonu					
		BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Kin (mg L ⁻¹)	Glutamin (g L ⁻¹)	Sükroz (g L ⁻¹)
B1	3,2	0,1	1,0	-	-	-	30,0
B2	3,2	0,5	5,0	-	-	-	30,0
B3	3,2	1,0	1,0	-	-	-	30,0
B4	3,2	2,0	2,0	-	-	-	30,0
B5	3,2	5,0	5,0	-	-	-	30,0
B6	3,2	0,1	1,0	-	-	1,0	30,0
B7	3,2	-	6,0	-	0,5	-	30,0
B8	3,2	1,0	-	7,0	-	-	30,0
B9	3,2	0,5	-	5,0	-	-	30,0
B10	3,2	5,0	-	5,0	-	-	30,0
B11	3,2	-	-	-	-	-	30,0

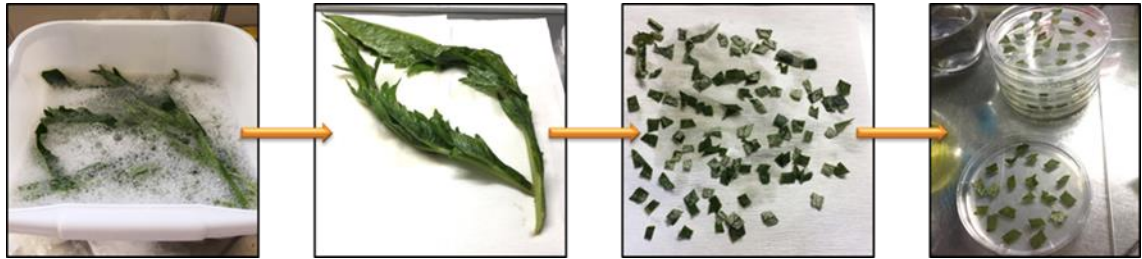
Çizelge 3.13. 'T' kodlu kallus besi ortamı içeriği

Ortam Kodu	Temel Besi Ortamı – B5 (g L ⁻¹)	Besi Ortamı Kompozisyonu				
		BAP (mg L ⁻¹)	NAA (mg L ⁻¹)	Kin (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	Sükroz (g L ⁻¹)
T1	3,2	0,1	0,5	-	-	30,0
T2	3,2	0,1	1,0	-	-	30,0

Çizelge 3.13.'ün devamı

T3	3,2	0,1	2,0	-	-	30,0
T4	3,2	0,5	0,5	-	-	30,0
T5	3,2	0,5	1,0	-	-	30,0
T6	3,2	0,5	2,0	-	-	30,0
T7	3,2	1,0	1,0	-	-	30,0
T8	3,2	1,0	2,0	-	-	30,0
T9	3,2	2,0	2,0	-	-	30,0
T10	3,2	-	-	0,1	0,5	30,0
T11	3,2	-	-	0,1	1,0	30,0
T12	3,2	-	-	0,1	2,0	30,0
T13	3,2	-	-	0,5	0,5	30,0
T14	3,2	-	-	0,5	1,0	30,0
T15	3,2	-	-	0,5	2,0	30,0
T16	3,2	-	-	1,0	1,0	30,0
T17	3,2	-	-	1,0	2,0	30,0
T18	3,2	-	-	2,0	2,0	30,0
T19	3,2	-	-	-	-	30,0

Çalışmada kullanılan eksplantlar, açık alanda yetiştirilen bitkilerden temin edilmiştir. Yeni çıkan, taze ve iç kısımda bulunan yaprakların toplanmasına özellikle dikkat edilmiştir. Toplanan genç yapraklar laboratuvara getirilmiş, öncelikle akan su altında her türlü kirden arındırılmıştır. Ardından 15 dakika gibi bir süre antibakteriyel sabun (95 mL su + 5 mL aktibakteriyel sabun) ile yıkanmıştır. Sterilizasyon amacıyla durulanan yapraklar steril kabine alınmış, %20 oranında ticari sodyum hipoklorit (%4,5 aktif madde) içeren solüsyonda 10 dakika bekletilmiştir. Bu işlemi takiben her biri 3'er dakika olmak üzere 3 kez durulama suyundan geçirilen yapraklar kültüre alınmaya hazır hale gelmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Yaprak eksplantlarının sterilizasyonu ve kallus eldesi için kültüre alınması

Steril kabin içerisinde dezenfeksiyon işlemleri tamamlanan yaprak eksplantları 0,5 – 1,0 cm büyüklüğünde parçalara ayrılmıştır. Bu şekilde dikime hazır hale getirilen eksplantlar, hazırlanan besi ortamlarına dikilmiştir. Sadece 'T' kodlu kallus ortamları 60

mm büyüklüğündeki steril plastik petrilere hazırlanmış olup, diğer tüm kallus ortamları için 90 mm büyüklüğündeki steril plastik petrilere kullanılmıştır. Bu sebeple, 'T' kodlu kallus ortam kombinasyonlarının bulunduğu petrilere 10 parça yaprak eksplanti dikilirken, diğer tüm kallus ortamlarının bulunduğu petri kaplarına 20'şer parça yaprak eksplanti dikilmiştir. Her bir besi ortamı için 3 petri kullanılmıştır. Çalışmada kültüre alınan yaprak eksplantlarının bir kısmı *in vivo* yetiştirilen bitkilerden toplanmış olup, bu eksplantların kültüre alındığı denemeler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Bununla birlikte çalışmanın bir kısmında ise *in vitro* çoğaltılıp köklendirilen ve dış koşullara adaptasyonları sağlanan bitkilerden de yaprak örnekleri toplanmış, bunlar da besi ortamlarında kültüre alınmıştır. *In vitro* yaprak eksplantlarını içeren kallus çalışmaları ise 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Kültüre alınan eksplantlar, 24±2°C sıcaklık, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyot ve 3000 lüks ışık şiddetine sahip iklim odalarına alınmıştır. Arzu edilen sekonder bileşiklerin arttırılması amaçlanan bu çalışmada, bunu sağlamak amacıyla kültürler tüm alt kültürleri süresince karanlık koşullar altında muhafaza edilmiştir (Pandino vd. 2017a; El-Bahr vd. 2018).

Kültüre alınan eksplantlardan yaklaşık 20 gün sonra kallus oluşumları gözlemlenmeye başlamıştır. Elde edilen kalluslar belirli aralıklarla (yaklaşık 30 gün) alt kültüre alınmıştır. Kallusların alt kültür işlemi 3 alt kültür süresince devam ettirilmiştir. Bu süre zarfında gözlemler yapılarak aşağıdaki parametreler incelenmiştir;

- ✓ Gelişme gösteren yaprak eksplanti sayısı,
- ✓ Eksplantlarda meydana gelen kallusların ağırlığı,
- ✓ Oluşan kallusların rengi,
- ✓ Oluşan kallusların dokuları.

Çalışmada incelenen ilk parametre kültüre alınan yapraklarda meydana gelen gelişimlerin gözlemlenmesi olmuştur. Gelişen yaprak oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Gelişen Yaprak Oranı (\%)} = \frac{\text{Gelişen yaprak eksplanti sayısı}}{\text{Kültüre alınan toplam yaprak eksplanti sayısı}} \times 100$$

Kallus kültürlerinin başlamasını takiben oluşan kallusların öncelikle tartımları yapılmış, ardından taze besi ortamlarına aktarılmıştır. Yeni besi ortamlarına aktarılan bu kallusların stereo mikroskop ve görüntüleme sistemi yardımıyla görüntüleri alınmıştır.

Çalışmada yaprak gelişim oranını takiben kallus oluşum oranları hesaplanmış olup, aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır.

$$\text{Kallus Oluşum Oranı (\%)} = \frac{\text{Kallus oluşturan eksplant sayısı}}{\text{Gelişen yaprak eksplanti sayısı}} \times 100$$

Son alt kültür işleminin ardından kallus kültürlerine en iyi tepkiyi veren besi ortamları tespit edilmeye çalışılmış ve yaprak eksplantlarından elde edilen tatminkâr miktarlardaki kallusların süspansiyon kültürlerinin başlatılması amacıyla belirlenen bu besi ortamlarının sıvı versiyonları hazırlanarak burada kültüre alınmıştır. Meydana gelen kalluslar tartılmış, 30 mL/100 mL ya da 50 mL/250 mL (besi ortamı/erlen) olacak şekilde hazırlanmıştır. Böylece kalluslardan hücre süspansiyonları başlatılmıştır. Orbital çalkalayıcı 130 rpm hızına ayarlanmış olup, hazırlanan bu kallus + besi ortamı bileşiminin süspansiyon haline gelmesi için bu çalkalayıcılar üzerine yerleştirilmiştir. Kültürlerin daha sonraki inkübasyonları için kültür koşulları $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve sürekli karanlık olarak ayarlanmıştır. Süspansiyon kültürlerinin başlatılmasını takiben sürekli gözlemler yapılmış olup, kültürlerin besi ortamları 12 günde bir yenilenmek suretiyle, filtre edilerek alt kültür işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu süreç iki alt kültür süresince devam ettirilerek kallusların sıvı besi ortamlarına adaptasyonları sağlanmıştır. Her alt kültür sonunda filtre işleminin ardından hücrelerin yaş ağırlıkları hesaplanarak hücre büyümesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra alt kültürler süresince sıvı besi ortamında meydana gelen pH değişimleri de kaydedilmiştir.

Araştırmanın bir diğer basamağında, enginarın fonksiyonel gıda olarak değerinin artırılmasına yönelik olarak bazı sekonder metabolitlerin içeriğinin artması üzerine biyotik ve abiyotik olmak üzere iki farklı elisitörün etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılacak olan elisitörler kitosan ve metil jasmonat olarak belirlenmiş olup, bunlar kültürlere farklı zamanlarda ve farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir. Çalışmada her iki elisitörden üçer farklı konsantrasyonda eklenmiş (Krzyzanowska vd. 2012; Lim vd. 2013; Ahmed vd. 2014; Tanoori vd. 2015; Jiao vd. 2018; Liu vd. 2018) elisitörler için kullanılan dozlar ve uygulama süreleri şu şekildedir:

Elisitörler ve uygulama dozları;

- ✓ Kitosan: 200, 400 ve 800 mg L⁻¹,
- ✓ Metil Jasmonat: 50, 100 ve 200 µM

Kültürlere uygulama süreleri:

- ✓ 24,
- ✓ 48,
- ✓ 72 saat

Hücre süspansiyon kültürlerinin son alt kültüründen sonra hücrelerde meydana gelen taze ağırlık artış veya azalışları tespit edilmiş, besi ortamındaki azalma oranları belirlenmiş ve pH değişim düzeyleri ölçülmüştür. Belirtilen bu gözlemler arasından taze ağırlık değişimleri, çalışmanın bir sonraki aşaması olan elisitör uygulamalarına yön vermiş olup, tespit edilen en yüksek taze ağırlığın elde edildiği besi ortamı belirlenerek bu ortam elisitör uygulamasında besi ortamı olarak değerlendirilmeye alınmıştır. Elisitör uygulamaları 30 mL/100 mL (besi ortamı/erlen) olacak şekilde oluşturulmuş olup, her bir besi ortamını içeren erlene, ortam içeriği toplamda 30 mL olacak şekilde eklenmiş ve 0,7 g kallus tartılıp eklenerek hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen dozlarda uygulanması planlanan elisitörlerin hazırlanması esnasında;

- ✓ Kitosan için 0,1 M'lık HCl çözeltisinde stok solüsyonu hazırlanarak steril kabin içerisinde filtre sterilizasyonu yapılmış ve besi ortamlarına ilave edilmiştir.
- ✓ Metil jasmonat için ise saf su ile stok solüsyonu hazırlanmış olup, yine steril kabinde filtre sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra besi ortamlarına ilavesi yapılmıştır.

Bahsi geçen dozlardaki elisitörlerin sıvı besi ortamlarına ilavesi hücre süspansiyon kültürünün 2. alt kültüründen sonra gerçekleştirilmiştir. Her bir uygulamanın kontrol grubu için ise, uygulanan elisitör dozu kadar %50 (v/v) etil alkol solüsyonu kullanılmıştır. Kültürlerin inkübasyonları hızı 130 rpm'e ayarlanan orbital çalkalayıcıda, $24\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve sürekli karanlık kültür koşulları altında sürdürülmüştür. Uygulamayı takip eden 24 saat, 48 saat ve 72. saatlerin sonunda kültürler filtre yöntemi ile süzülerek, hücrelerin taze ağırlıkları, ortam miktarları ve pH'ları tespit edilerek değişimler gözlemlenmiştir. Ardından HPLC yöntemi kullanılarak analizler yapılmış olup, arzu edilen sekonder metabolit miktarları üzerine elisitör uygulamalarının olası etkilerinin (elisitör tipi, uygulama konsantrasyonu ve uygulama zamanı) tespit edilmesi amaçlanmıştır.

3.2.3. Sekonder metabolitlerin tespitine yönelik çalışmalar – HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) analizleri

3.2.3.1. HPLC analizleri için örneklerin hazırlanması

Çalışmada değerlendirilmeye alınan çeşitlerden 7 ay boyunca (2018 Ekim – 2019 Nisan ayları arasında) 2 farklı kısımdan (iç ve dış yapraklar) en az 5'er adet yaprak örnekleri toplanmıştır. Toplanan yaprakların yaş ağırlıkları belirlendikten sonra, 65°C 'de 4 gün boyunca bekletilerek sabit ağırlığa ulaşmaları sağlanmış ve kuru ağırlıkları hesaplanmıştır. Kuruyan yaprak örnekleri çeşitler, iç ve dış yapraklar bazında ayrı ayrı öğütülmüş, etiketlendirmeleri yapıldıktan sonra hava geçirmeyen kilitli poşetlere aktarılmış ve analizleri yapılana kadar -18°C 'de muhafaza edilmiştir.

Kurutulup öğütülmüş olan bu yaprak örneklerinin sekonder metabolit analizleri için her bir örnekten $1\pm 0,01$ g tartılarak 15 mL'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Örneklerin üzerine 10 mL %80'lik metanol (metanol:su = 80:20) ilave edilmiştir. Bu örnekler bir süre vortekslendikten sonra 24 saat 250 rpm devir hızındaki çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu sürenin ardından 4000 rpm devirde 15 dakika santrifüjlenen örneklerden 1 mL alınıp, 2 mL kapasiteli viyalere alınarak cihaza enjekte edilmiştir (Pandino vd. 2010a).

Çalışmanın bir diğer aşamasında *in vitro* kültürlerden elde edilen kallusların ve ardından oluşturulan hücre süspansiyon kültürlerinin içerdiği sekonder metabolitlerin tespit edilmesi de yine HPLC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kültürlerden elde edilen kalluslar ısısı önceden 65°C 'ye ayarlanmış etüvlerde 24 saat boyunca bekletilmiş, ardından öğütülmüştür. Öğütülen kallus örnekleri $0,5\pm 0,01$ g olarak tartılarak 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldıktan sonra üzerlerine 5 mL %80'lik metanol (metanol:su = 80:20) eklenmiştir. Bu aşamadan sonraki işlemlerin sırası yukarıda açıklandığı şekilde devam etmiştir.

Hücre süspansiyon kültürlerinin (hem elisitör uygulaması yapılan hem de elisitör uygulanmayan örnekler) içerdiği sekonder metabolit içeriklerinin tespitinde ise yine yukarıda açıklanan aşamalardan sonra cihaza enjekte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2. HPLC analizleri için kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan yüksek saflıktaki metanol, asetonitril, asetik asetik Isolab'dan temin edilmiştir. Toz formda satın alınmış sekonder metabolitler olan 3-*O*-kafeoilkinik asit (> %98) (Toronto Research Chemicals), 4-*O*-kafeoilkinik asit (%99) (Cayman Chemical), 5-*O*-kafeoilkinik asit (%99) (Cayman Chemical), 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit (%99) (Cayman Chemical), 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit (%99) (Toronto Research Chemicals), kafeik asit (\geq %98) (Sigma-Aldrich), *p*-kumarik asit (\geq %99) (Sigma-Aldrich), ferulik asit (%99) (J&K Scientific), narirutin (%99) (Cayman Chemical), luteolin (%99) (Cayman Chemical), luteolin 7-*O*-glukuronit (%87) (Harbison Walker International), apigenin (%99) (Cayman Chemical), apigenin 7-*O*-glukuronit (%99) (Cayman Chemical) kullanılmıştır.

Mobil faz ve ekstraksiyon çözeltisi hazırlamak için kullanılan 18.2 M Ω ultra saf su Millipore Direct-Q 3 System saf su cihazından sağlanmıştır.

3.2.3.3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çalışmada sekonder metabolitlerin kantitatif analizleri Chem Station yazılımı ile kontrol edilen Hewlett Packard 1100 serisi çift gradiyent pompalı, oto örnekleyicili, diyot dizi detektöre (DAD) sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazında gerçekleştirilmiştir. Kimyasal bileşenlerin kromatografik ayırımı Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm ID x 250 mm, 5 μ m partikül büyüklüğü) analitik kolonda gerçekleştirilmiştir. Koruyucu kolon olarak da Eclipse XDB-C18 (4,6 mm ID x 12,5 mm, 5 μ m partikül büyüklüğü) kullanılmıştır.

Örneklerin ekstraksiyonunda Heidolph Unimax 1010 çalkalayıcı inkübatör, santrifüj işlemlerinde MSE Mistral santrifüj cihazı kullanılmıştır.

3.2.3.4. Sekonder metabolitlerin standart çözeltilerinin ve kalibrasyon eğrilerinin hazırlanması

Fenolik bileşenlerin stok çözeltileri 0,01 mg hassasiyet ile tartılmış standartların saf metanolde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Metanolde hazırlanmış çözeltiler daha uzun raf ömrüne sahip olduğu için hem de ekstraktlar metanolik çözeltide hazırlandığı için su yerine tercih edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltiler -18 °C'de saklanmıştır. Fenolik bileşenlerin stok çözeltilerden farklı oranlarda seyreltmeler yapılarak kantitatif belirleme için gerekli kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Tez çalışmasında fenolik bileşenlerin kalibrasyon eğrileri 5, 10, 25, 50, 100 ve 250 mg kg⁻¹'lık konsantrasyonlarda HPLC'ye enjekte edilmiştir.

3.2.3.5. Sekonder metabolitlerin HPLC-DAD ile belirlenmesi

Enginar ekstraktlarındaki bazı sekonder metabolitler, sıvı kromatografisi cihazı ile tayin edilmiştir. Bunun için Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde

bulunan HP 1100 HPLC-DAD cihazı kullanılmıştır. DAD detektörde ölçümler 3 ayrı dalga boyunda aynı anda yapılmıştır. Ölçümler için literatür taramasından sonra 310 nm, 330 nm, 280 nm dalga boyları tercih edilmiştir. Her bir enjeksiyon, bir sonraki enjeksiyona hazırlanma süresi dahil 70 dakika sürmüştür. Kolon fırın sıcaklığı 28 °C, enjeksiyon hacmi de 20 µL olarak belirlenmiştir. HPLC’de analizler için mobil fazlar olarak % 5 asetik asit içeren su (mobil faz A) ile asetonitril (mobil faz B) kullanılmıştır. Kullanılan akış metodu Çizelge 3.14’te verilmiştir.

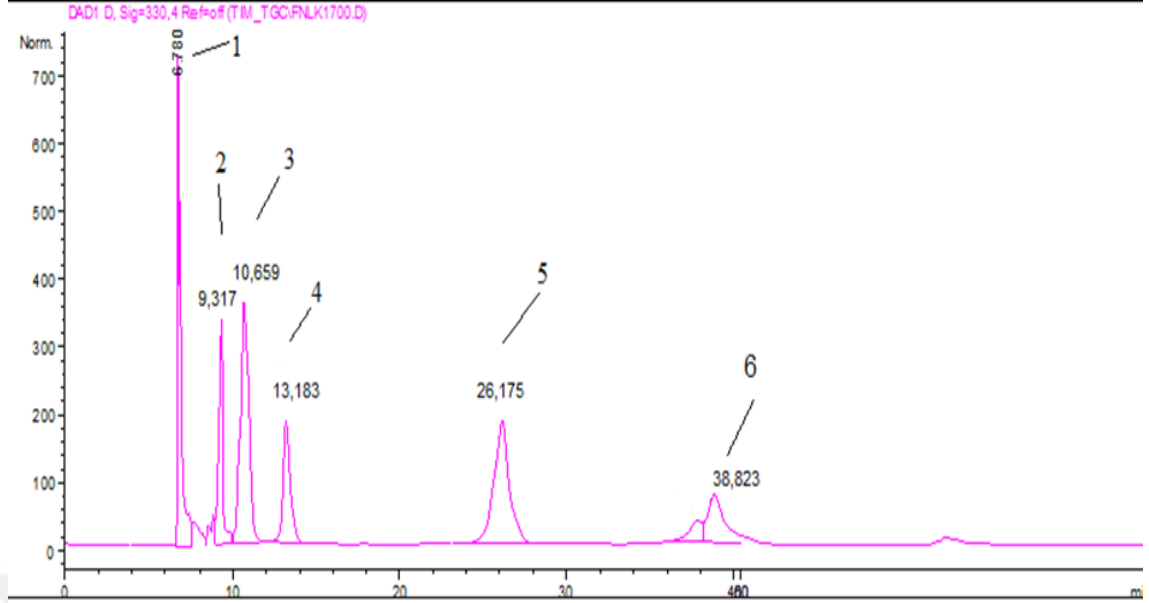
Çizelge 3.14. HPLC mobil faz akış programı

Süre (dakika)	% Mobil Faz A	% Mobil Faz B
0	85	15
40	85	15
45	50	50
55	0	100
60	0	100
65	85	15

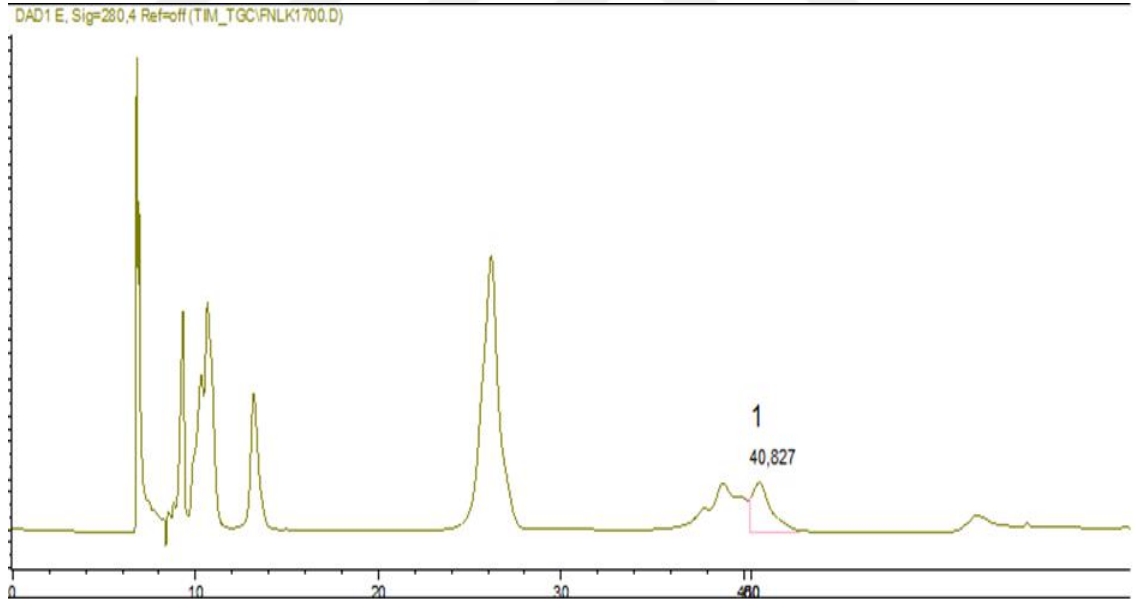
İncelenen sekonder metabolitler, kullanılan akış metodu ile cihaza tek tek enjekte edilmiş ve alıkonma zamanları tespit edilmiştir. Ardından sekonder metabolitlerin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyları (λ_{\max}) belirlenmiştir (Çizelge 3.15). Farklı konsantrasyonda enjekte edilmiş sekonder metabolitlerin standartları kullanılarak belirlenen dalga boylarında kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile ekstraktlardaki bileşenlerin kantitatif değerlendirilmesi mümkün kılınmıştır (Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14).

Çizelge 3.15. Fenolik bileşenlerin alıkonma zamanları ve maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyları

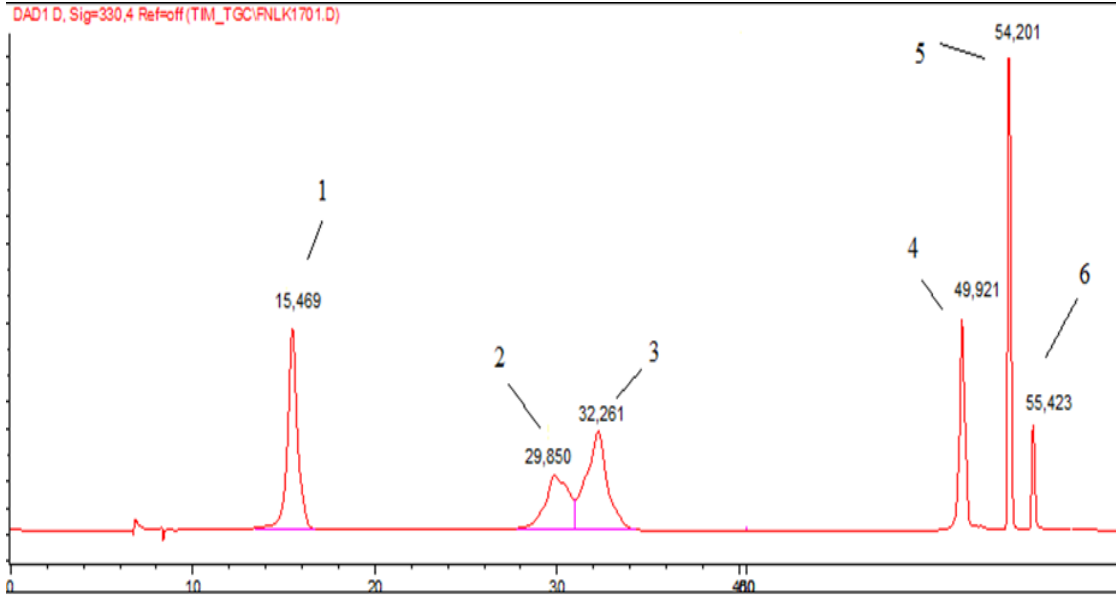
Bileşen Numarası	Sekonder Metabolit	Alıkonma Zamanı (dakika)	λ_{\max} (nm)
1	3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit	6,78	330
2	4- <i>O</i> -kafeoilkinik asit	9,31	330
3	5- <i>O</i> -kafeoilkinik asit	10,65	330
4	1,3- <i>O</i> -dikafeoilkinik asit	13,18	330
5	<i>p</i> -kumarik asit	26,17	330
6	1,5- <i>O</i> -dikafeoilkinik asit	38,82	330
7	Narirutin	40,82	330
8	Kafeik asit	15,46	330
9	Luteolin 7- <i>O</i> -glukuronit	29,85	330
10	Ferulik asit	32,26	280
11	Apigenin 7- <i>O</i> -glukuronit	49,92	330
12	Luteolin	54,20	330
13	Apigenin	55,42	330



Şekil 3.12. 50 ppm MIX1 standart karışımının 330 nm’de alınmış spektrumu. (1) 3-*O*-kafeoilkinik asit, (2) 4-*O*-kafeoilkinik asit, (3) 5-*O*-kafeoilkinik asit, (4) 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit, (5) *p*-kumarik asit, (6) 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit



Şekil 3.13. 50 ppm MIX1 standart karışımının 280 nm’de alınmış spektrumu. (1) Narirutin



Şekil 3.14. 50 ppm MIX2 standart karışımının 330 nm’de alınmış spektrumu. (1) Kafeik asit, (2) luteolin 7-*O*-glukuronit, (3) ferulik asit, (4) apigenin 7-*O*-glukuronit, (5) luteolin, (6) apigenin

3.2.4. İstatistiksel analiz

Sekonder metabolit parametrelerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma değerleri kullanılmıştır. Normallik varsayımı Shapiro Wilk Testi ile kontrol edilmiştir. Normallik varsayımı sağlanmadığı için parametre değerlerine logaritmik transformasyon (dönüşüm) uygulanmıştır. Yorumlama kolaylığı sağlamak için tablolarda verilerin transformasyon yapılmamış değerleri sunulmuştur. Çeşit ve ay etkilerini görmek için iki yönlü ANOVA yöntemi kullanılmıştır. Anlamlı çıkan durumlarda ikili karşılaştırmalar Duncan Testi ile yapılmıştır. Analizler SAS 9.4 programı ile yapılmıştır. $P \leq 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Açık Alan Çalışmalarına Ait Bulgular

Açık alanda yetiştiriciliği yapılan, çalışmada değerlendirmeye alınan Bayrampaşa, Sakız ve Olympus F₁ çeşitlerinin morfolojik yapılarını gözlemek amacıyla birtakım parametreler belirlenmiş olup, yapılan gözlemler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Çalışmada değerlendirilmeye alınan enginar çeşitlerinin morfolojik yapılarına bakıldığında farklılıklar gözlemlenmiştir. Buna göre Sakız çeşidinin yaprak yapısı düz, Bayrampaşa ve Olympus F₁ çeşitlerinin ise parçalıdır. İç ve dış yaprakların genişliği ve uzunluğu Sakız ve Bayrampaşa çeşidinde benzer büyüklüklerde tespit edilirken, Olympus F₁ çeşidinin bu iki çeşide nazaran daha büyük yapraklara sahip olduğu söylenebilir. Çeşitlerin baş özellikleri değerlendirildiğinde, Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin hem iç hem de dış brakte renklerinde değişiklik olmadığı ve yeşil rengin hakim olduğu görülmüştür. Olympus F₁ çeşidinde ise dış braktelerin yeşil renkli olduğu, iç kısımlarda ise antosiyanin birikimiyle alakalı olduğu düşünülen mor renk oluşumu gözlemlenmiştir. Bayrampaşa ve Olympus F₁ çeşitlerinin meydana getirdiği başlar Sakız çeşidine göre daha büyüktür. Başlar, Sakız ve Olympus F₁ çeşidinde Bayrampaşa çeşidine kıyasla daha sıkı yapılıdır. Braktelerin uçları ve dikenlilik durumlarına bakıldığında ise Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin brakte uçları girintili yapıda ve dikensiz oluşumlar gösterirken, Olympus F₁ çeşidinde ise brakte ucu düz ve dikenlidir.

Çizelge 4.1. Çeşitlere ait morfolojik gözlem değerlendirilmesi

Parametreler	Çeşitler		
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁
Yaprak şekli	Parçalı	Düz	Parçalı
İç yaprak genişliği (cm)	21	24	39
Dış yaprak genişliği (cm)	33	22	67
İç yaprak uzunluğu (cm)	35	47	61
Dış yaprak uzunluğu (cm)	92	88	105
Brakte rengi (antosiyanin oluşumu)	Yeşil	Yeşil	Yeşil, iç braktelerde antosiyanin oluşumu var
Baş şekli	Büyük, yuvarlak	Küçük, ovale yakın	Büyük, ovale yakın
Baş sıklığı	Hafif sıkı	Sıkı	Sıkı
Brakte ucu şekli (düz/girintili)	Girintili	Girintili	Düz
Dikenlilik	Dikensiz	Dikensiz	Dikenli

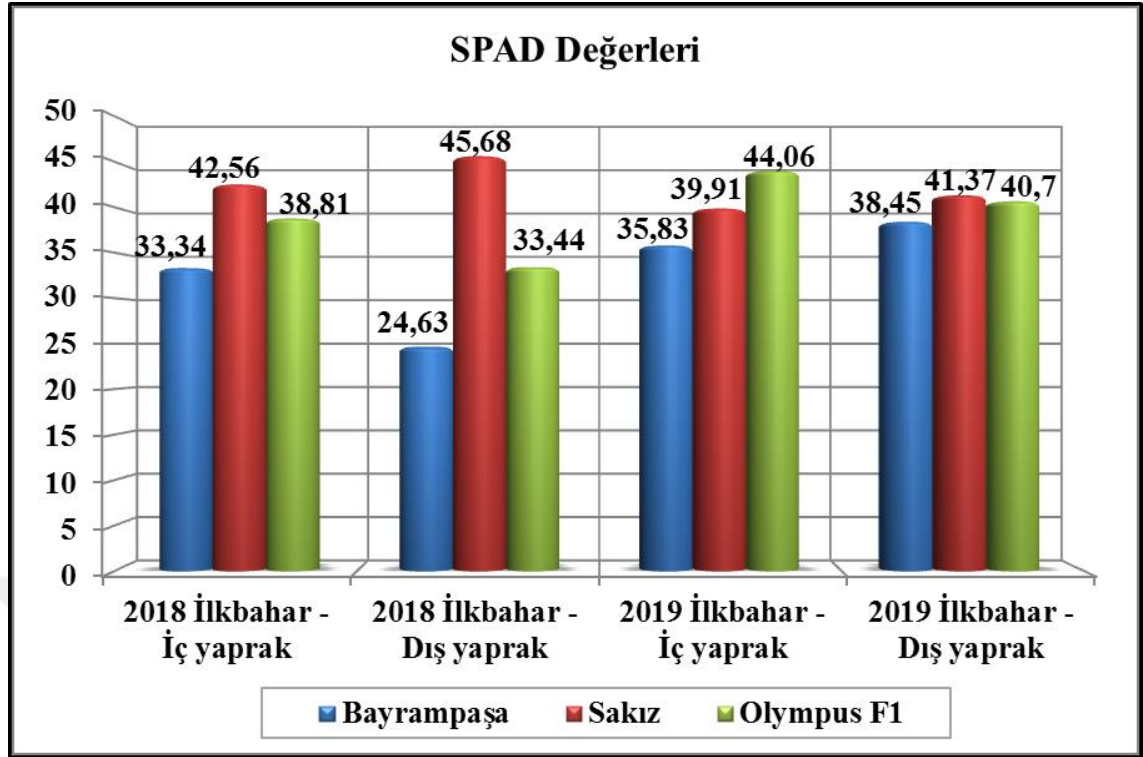
Çalışmada 2018 ve 2019 yılları ilkbahar aylarında olmak üzere 2 kez yapraklarda mevcut olan klorofil miktarlarının tespitine yönelik olarak SPAD değerleri (SPAD – 502plus Konica Minolta) belirlenmiştir. Bu amaçla sabah saatlerinde (08:00 – 10:00) her bir çeşide ait 10’ar adet iç ve dış yaprakta 3 defa okuma yapılmıştır (Şekil

4.1). SPAD ölçüm değerlerine ilişkin ortalama değerlere ait grafik Şekil 4.2’de sunulmuştur.



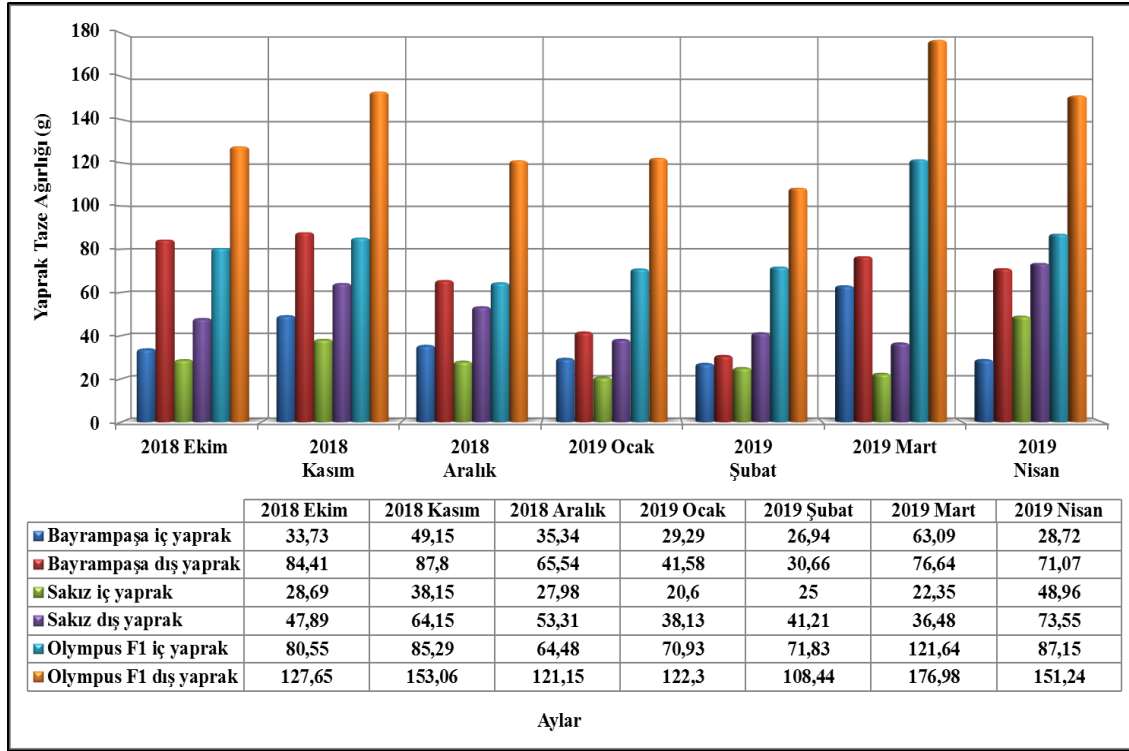
Şekil 4.1. Arazi koşullarında SPAD değerinin ölçümü

Çalışmada değerlendirmeye alınan çeşitlerin 2018 yılı ilkbahar aylarındaki SPAD değerlerine bakıldığında, Bayrampaşa ve Olympus F₁ çeşitlerinin iç yapraklarının SPAD değerlerinin dış yapraklarınıninkine oranla daha fazla olduğu tespit edilirken, Sakız için tam tersi söz konusudur. 2019 yılı ilkbahar aylarındaki değerlere bakıldığında Olympus F₁ ve Sakız çeşitleri aynı çizgilerini korurken, Bayrampaşa çeşidinde ise dış yaprakların değerlerinin iç yaprakların değerlerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. SPAD kelime anlamı olarak, “toprak bitki analiz gelişimi” olarak ifade edilmektedir. Bitkilerin yapraklarının yeşil rengi ya da içerdiği klorofil miktarının belirlenmesini sağlayan bu değer, aslında dolaylı olarak yaprakların içerdiği azot miktarının da ifade edilmesine yardımcı olmaktadır. Yaprakların SPAD değerlerinin nispeten yüksek olması, özellikle azot bakımından bitki beslenmesinin iyi durumda olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Campanelli vd. 2014). Bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, en yüksek SPAD değeri ölçümünün Sakız çeşidinin dış yapraklarında 2018 yılı ilkbahar aylarında tespit edildiği, dolayısıyla en yüksek klorofil miktarının Sakız çeşidinin dış yapraklarında olduğu söylenebilir. Bitkilerin yine 2018 yılı SPAD değerlerine bakıldığında, bu değeri Sakız çeşidinin iç yapraklarının takip ettiği görülmektedir. 2019 yılı değerlerine bakıldığında ise Olympus F₁ çeşidinin iç yapraklarının ön plana çıktığı, bunu ise Sakız çeşidinin dış yapraklarının takip ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.2).

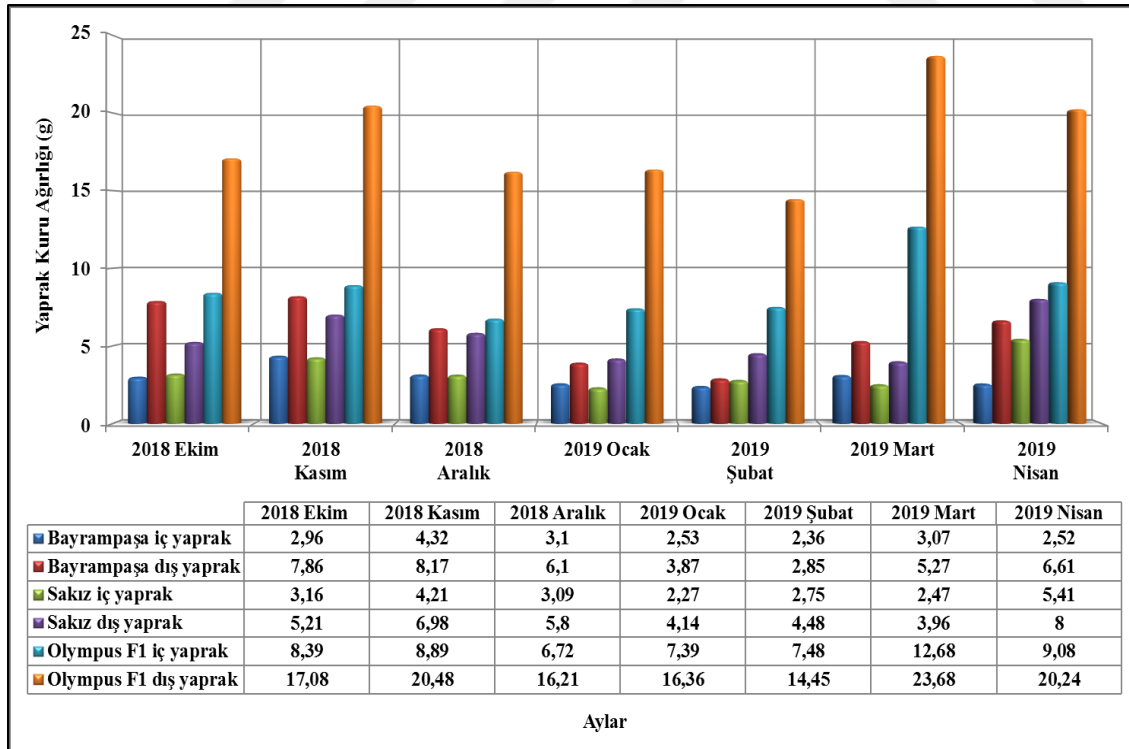


Şekil 4.2. Değerlendirilmeye alınan çeşitlere ait iç ve dış yaprakların SPAD değerleri

Şekil 4.3'te de görüldüğü üzere aylar bazında incelendiğinde en yüksek yaprak taze ağırlık değerlerinin genel olarak Olympus F₁ çeşidinin dış yapraklarından elde edildiği görülmektedir. Bunu birkaç istisna dışında (Bayrampaşa çeşidi dış yapraklar – 2018 Ekim ve 2018 Kasım) Olympus F₁ çeşidinin iç yaprakları takip etmektedir. Bu durum, daha önce arazi koşullarında yapılan çeşitlerin morfolojik yapılarına ilişkin gözlemlerde de belirtilen yaprakların ölçüm değerleriyle uyum içinde olup, beklenen bir sonuç olmuştur. Değerlendirmeye alınan aylarda yaprakların taze ağırlıkları bakımından en düşük ölçüm değerleri ise 2019 yılı Nisan ayı hariç, Sakız çeşidinin iç yapraklarından elde edilmiştir. 2019 yılı Nisan ayındaki en düşük değer ise Bayrampaşa çeşidinin iç yapraklarından elde edildiği söylenebilir. Çeşitlerin kuru yaprak ağırlıklarına ilişkin değerlerde de taze ağırlıklarına benzer bir eğilim olduğu görülmektedir (Şekil 4.4).

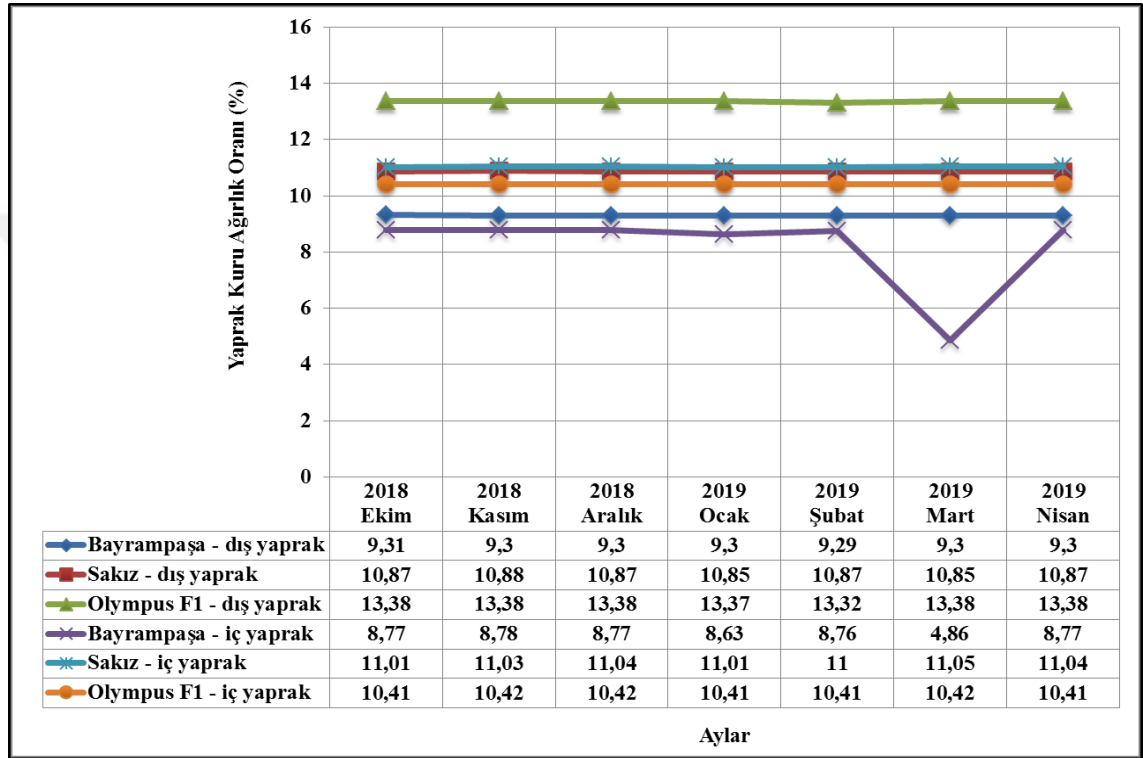


Şekil 4.3. Arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerden toplanan yaprak örneklerine ait taze yaprak ağırlıkları (g)



Şekil 4.4. Arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerden toplanan yaprak örneklerine ait kuru yaprak ağırlıkları (g)

Çeşitlerin toplanıp kurutulan yapraklarına ilişkin 2018 Ekim ile 2019 Nisan ayları arasındaki kuru ağırlık oranları değerlendirildiğinde, bu oranların belirtilen aylar arasında belirli bir düzeyde kaldığı Şekil 4.4'te görülmektedir. Ancak Bayrampaşa çeşidinin 2019 yılı Mart ayında toplanıp kurutulan iç yapraklarındaki değer düşüşü dikkat çekmektedir. Aslında değerlendirmeye alınan aylar arasında 2019 yılı Mart ayındaki Bayrampaşa çeşidinin iç yapraklarının taze ağırlığı değer olarak diğer aylara kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup, en fazla su kaybını bu ayda yaşamıştır. Diğer iki çeşitte ve Bayrampaşa çeşidinin diğer aylardaki değerlerinde ise taze ağırlıkla orantılı bir şekilde ağırlık kayıpları olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Çalışmada değerlendirilen çeşitlerin yaprak kuru ağırlık oranları (%)

4.2. *In vitro* Çalışmalara Ait Bulgular

4.2.1. Mikroçoğaltım aşaması bulguları

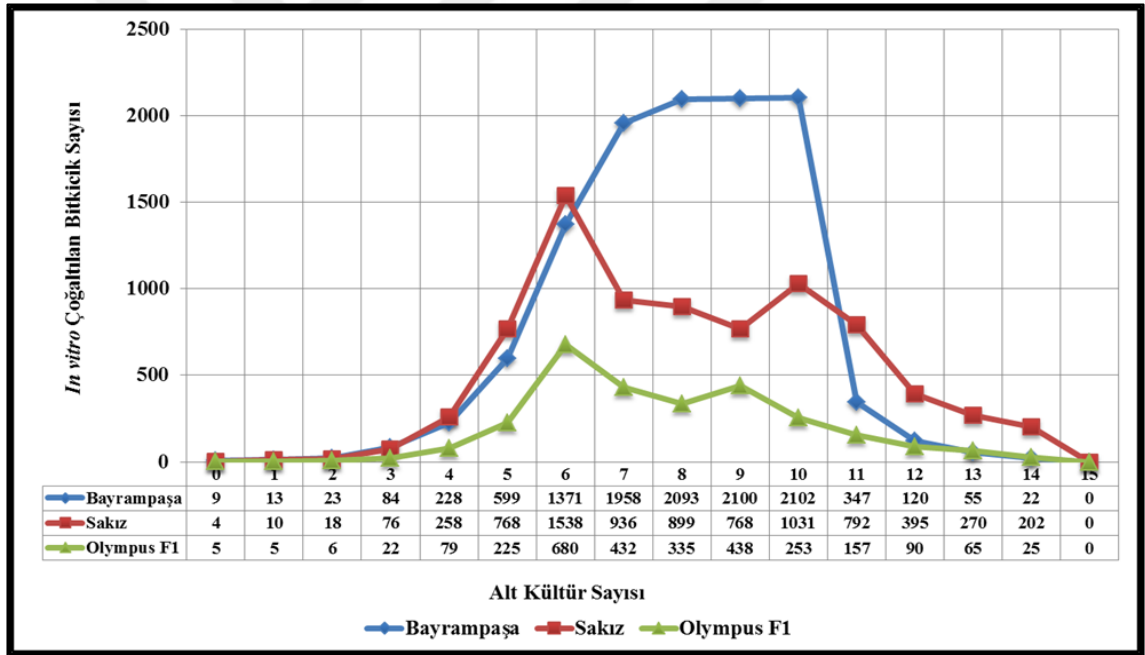
Mikroçoğaltım amacıyla meristem kültürü tekniği uygulanan araştırmada iki farklı besi ortamı kombinasyonu denemeye alınmıştır. Bu iki besi ortamı ile yürütülen denemeler öncelikle Bayrampaşa çeşidinde uygulanmış olup, buradan elde edilen veriler ışığında diğer çeşitlere de uygulanarak devam edilmiştir. Mikroçoğaltım aşamasına yönelik denemeler, çalışmada kullanılan 2 numaralı çoğaltma ortamında ($\frac{3}{4}$ MS + 0,25 mg L⁻¹ BAP + 0,025 mg L⁻¹ IBA + 30 g L⁻¹ sükroz) 3. alt kültüre kadar sürdürülmüştür. Ancak bu alt kültürden sonra elde edilen sürgün sayıları fazla olmasına rağmen, bitkiciklerin istenilen güçlü yapıya ulaşamadıkları belirlenmiş olup bu besi ortamının kullanımı bırakılarak, denemelere 1 numaralı besi ortamı kombinasyonu ($\frac{3}{4}$ MS + 0,05 mg L⁻¹ BAP + 0,005 mg L⁻¹ IBA + 30 g L⁻¹ sükroz) ile devam edilmiştir.

Bitkilerin *in vitro* koşullara uyum sağlaması ve gelişimlerinin sürdürülebilmesi birtakım faktörlere bağlı olarak değişiklikler gösterebilmektedir. Bu faktörler arasında bitki büyüme düzenleyicilerinin tipi, konsantrasyonu ve kombinasyonları oldukça önemli etkenler olarak karşımıza çıkmakla birlikte, elde edilmesi beklenen *in vitro* tepkiler genotipe, çeşide hatta eksplantın tipine bağlı olarak da farklılıklar gösterebilmektedir (George 1993; López-Pérez ve Martínez 2015). Enginarın *in vitro* çoğaltımına yönelik olarak yapılan önceki çalışmalarda genel olarak kullanılan temel besi ortamının MS olduğu bildirilmektedir (López-Pérez ve Martínez 2015). Bununla birlikte MS besi ortamının modifiye edilerek kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Rossi ve De Paoli (1992) ile Brutti vd. (2000) enginarında *in vitro* çoğaltım üzerine yaptıkları çalışmalarda, MS temel besi ortamının makro element miktarlarını ya da NH_4NO_3 ve KNO_3 konsantrasyonlarını yarıya indirerek çalışmalarını yürütmüşlerdir. Bu tez çalışması kapsamında da enginarın *in vitro* çoğaltımı amacıyla kullanılan temel besi ortamı olan MS, $\frac{3}{4}$ oranında kullanılmıştır. Yine yapılan birçok çalışmada bitki büyüme düzenleyicileri gruplarından oksinler ve sitokininler arasında en çok tercih edilenlerin başında kinetin, 2-izopenteniladenin (2iP), BAP (sitokinler); IAA ve NAA (oksinler) geldiği bildirilmektedir (López-Pérez ve Martínez 2015). Enginarında *in vitro* çoğaltım amacıyla BAP ve IBA'nın 2'şer farklı konsantrasyonlarının denemeye alındığı bu çalışmada etkili bir mikroçoğaltım oranı elde edildiği düşünülmekte olup, bu iki bitki büyüme düzenleyicisinin konsantrasyonlarının mikroçoğaltım etkinliğini farklılaştırdığı belirlenmiştir. *In vitro* çoğaltım amacıyla kullanılan besi ortamlarının ikisinde de BAP ve IBA kullanılmıştır. Bununla birlikte besi ortamının içerdiği BAP + IBA konsantrasyonlarının $\frac{1}{5}$ oranında azaltılmasıyla bitkiciklerin daha güçlü ve bitkinin *in vivo* gelişimine daha uygun bir yapıda geliştiği gözlemlenmiştir. Önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar sunulmuş olup, bitki büyüme düzenleyicilerini düşük konsantrasyonlarda kullanmanın eksplantların kalitesine olumlu yönde etki ettiği, bununla birlikte kullanılan konsantrasyonlardaki artışla bitkiciklerde birtakım istenmeyen etkiler (kararma, vitrifikasyon gibi) gözlemlenmesine sebep olduğu bildirilmiştir (Ancora vd. 1981; Pecaüt vd. 1983; Rossi ve De Paoli 1992; Castiglione vd. 2007; Bedini vd. 2012). Bahsedilen olumsuz durumları mümkün olduğunca en aza indirmek adına bu çalışmada kullanılan hem temel besi ortamının hem de bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları düşük seviyelerde tutulmaya özen gösterilmiştir.

Çalışmadan elde edilen veriler ışında mikroçoğaltım oranları (Şekil 4.6), eksplant başına düşen ortalama sürgün sayıları (Şekil 4.7), sürgün başına düşen ortalama yaprak sayıları (Şekil 4.8), kültüre alınan kavanozlar başına enfeksiyon oranları (Şekil 4.9), gelişmeyen ve yaşlı bitki oranları (Şekil 4.10 ve 4.11) genotipler bazında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilere bakıldığında kültür başlangıcında mikroçoğaltım oranlarında hızlı artışlar görülmemiştir. Alt kültür sayısı arttıkça sürgünler *in vitro* koşullara alışmış ve mikroçoğaltım oranlarında artışlar olmuştur. Rey vd. (2013)'e göre, alt kültür işleminin ilk safhalarında bitkiciklerde görülen değişimler daha fazla olmakta, alt kültür sürecinin ilerlemesiyle sürgünlerin *in vitro* koşullara adaptasyonları daha hızlı sağlanmakta ve bitkiciklerde meydana gelen değişikliklerde de azalmalar görülmektedir. Bu durum birçok araştırmacı tarafından şu şekilde açıklanmaktadır; dış koşullardan *in vitro* koşullara alınan eksplantlar yeni bir ortama alındıklarından ötürü

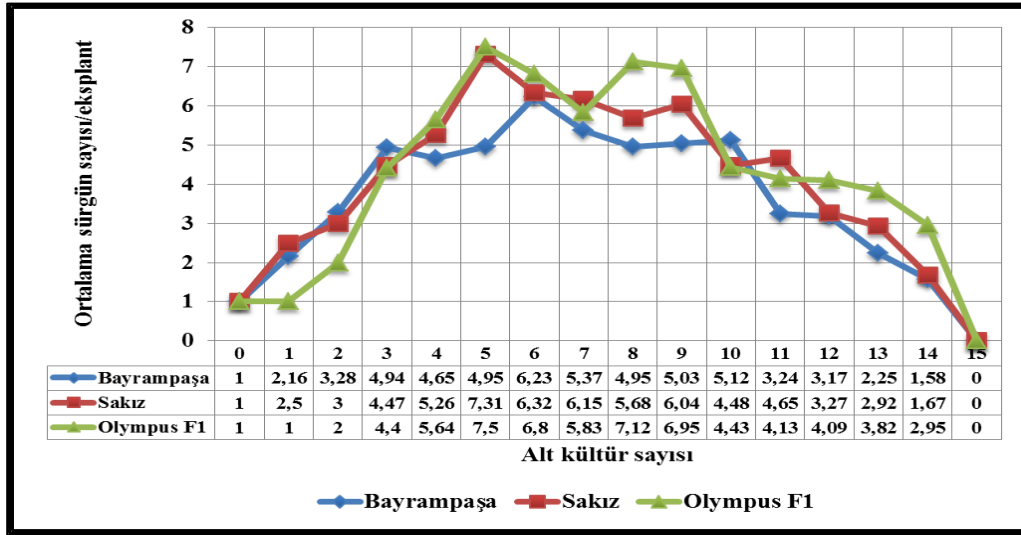
başlangıçta strese girmekte, kültür süresi ilerledikçe ortama daha fazla uyum sağlamaktalar ve bunun sonucunda da meydana getirdikleri farklı yapıların oranlarında da azalmalar olmaktadır (Phillips vd. 1994; Hirochika vd. 1996; Zucchi vd. 2002). Çalışmada bazı çeşitler, mikroçoğaltım sürecinden diğerlerine göre daha fazla etkilenmiştir. Bayrampaşa maksimum mikroçoğaltım oranına 10. alt kültürde ulaşırken, Sakız ve Olympus F₁ ise 6. alt kültürde ulaşmışlardır (Şekil 4.6). Bayrampaşa çeşidi maksimum mikroçoğaltım oranına 10. alt kültürde ulaşmasına rağmen, bu değer çalışmanın geneli değerlendirildiğinde en yüksek mikroçoğaltım değeri olarak tespit edilmiştir. Çalışmada değerlendirilen üç çeşit için besi ortamları, kültüre alınan eksplant sayıları, alt kültürler arasındaki süreler gibi *in vitro* koşulların aynı olduğu göz önüne alındığında, mikroçoğaltım sürecinde gözlemlenen bu farklılıkların çeşit farklılığından kaynaklandığı düşünülmekte olup, önceki çalışmalarla uyum içindedir. Klasik yetiştiricilikte vegetatif tekniklerle çoğaltımı yapılan enginar bitkisinde, heterojenlik ya da hastalık ve zararlılar gibi birtakım problemlerden ötürü elde edilen çoğaltım katsayısı oldukça düşük seviyede kalmaktadır (Foury 1976; El Boullani vd. 2012). Bu sebeple *in vitro* tekniklerin adaptasyonu sağlanarak enginarın *in vitro* çoğaltımının yapılması, sağlıklı bitkilerin elde edilmesi bakımından hızlı ve güvenilir teknikler olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 4.6. Çeşitlerin alt kültür sayılarına göre mikroçoğaltım oranları

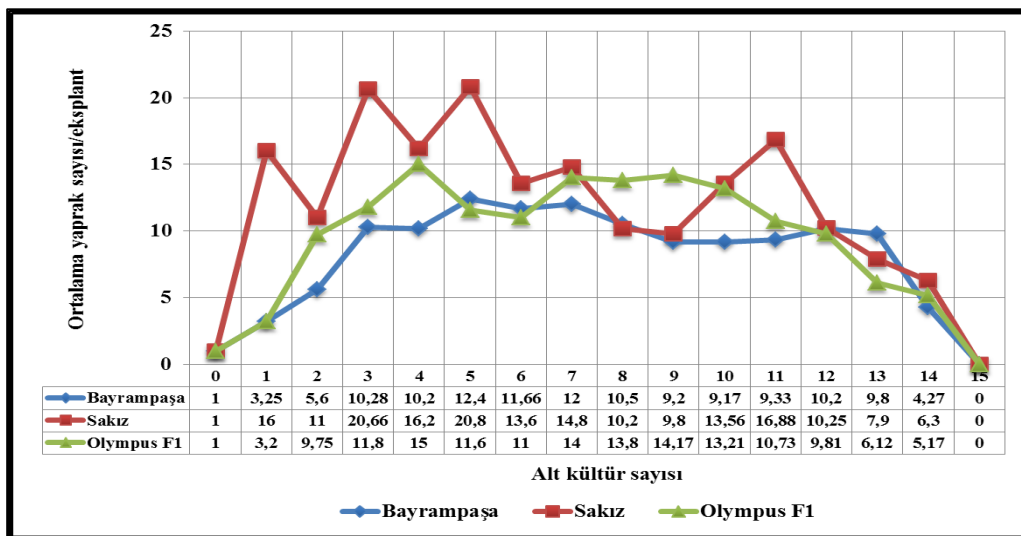
Araştırmada, değerlendirmeye alınan çeşitlerde meydana gelen sürgünlerin alt kültürler bazında değerlendirilmesi yapılmıştır. Elde edilen bulgular ışığında, eksplant başına düşen en fazla sürgünün 5. alt kültürde meydana geldiği, çeşitlerin ise sırasıyla Olympus F₁ (7,50 sürgün/eksplant) ve Sakız (7,31 sürgün/eksplant) oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.7). *In vitro* çoğaltım ortamlarına farklı oranlarda kinetin ilavesi yapan iki farklı çalışmanın sonuçları incelendiğinde, López-Pérez ve Martínez (2015) eksplant başına 4,8 sürgün elde ettiklerini bildirirken, El Boullani vd. (2013) ise daha yüksek kinetin kullandıkları besi ortamlarından eksplant başına 7,56 sürgün elde ettiklerini rapor etmiştir. Bu çalışmada ise *in vitro* çoğaltma besi ortamında kinetin kullanılmamış

olup, eksplant başına düşen en yüksek sürgün sayısına (7,50 sürgün/eksplant) 10:1 oranında kullanılan BAP + IBA (0,05 mg L⁻¹ + 0,005 mg L⁻¹) kombinasyonu ulaşılmıştır. Neredeyse tüm *in vitro* teknikler için geçerli olan genotip farklılığının güçlü etkisinden ötürü enginarın *in vitro* çoğaltımı amacıyla da genel bir mikroçoğaltım ortamı prosedürü belirlemek zor olsa da, yapılan bu çalışmada değerlendirilen üç çeşit için de kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarının ve kombinasyonunun uygun olduğu belirlenmiştir.



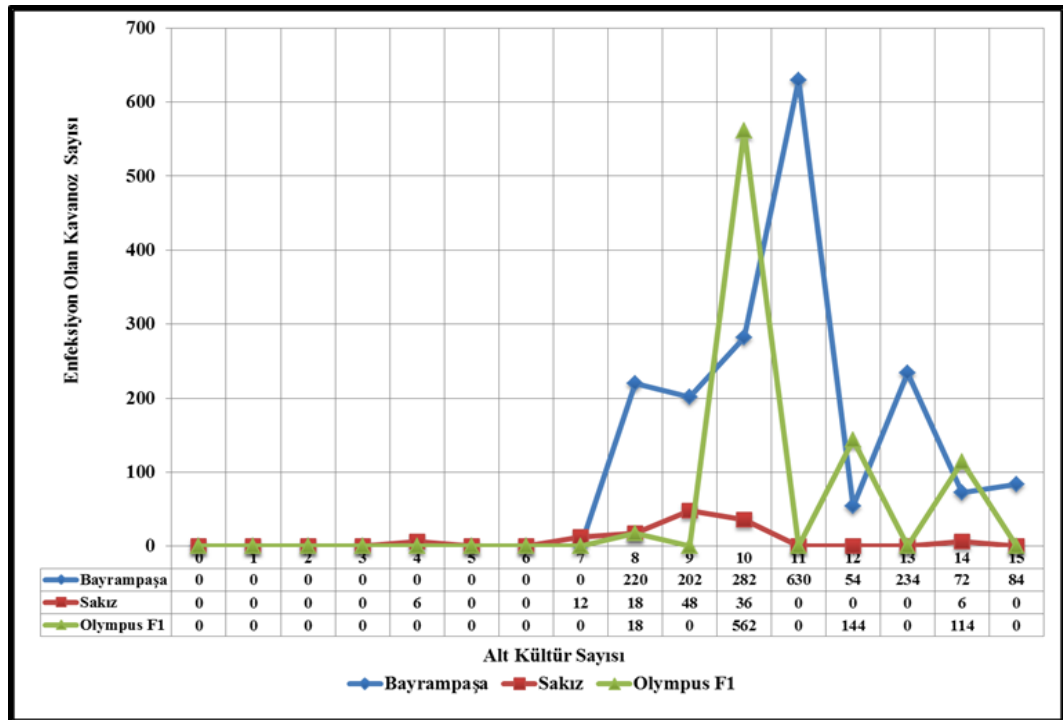
Şekil 4.7. Çeşitlerin alt kültür sayılarına göre ortalama sürgün sayısı/eksplant

Çeşitlerin eksplantlarında oluşan yaprak sayılarının ortalamaları değerlendirildiğinde, en fazla ortalamanın yine 5. alt kültürde Sakız çeşidinde (20,8 yaprak/eksplant) olduğu görülmektedir (Şekil 4.8). Bununla birlikte Olympus F₁ çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı en fazla 5. alt kültürde tespit edilmesine rağmen, eksplantlarda meydana gelen yaprak sayısı bakımından bu çeşitte en ideal 9. alt kültür (14,17 yaprak/eksplant) olduğu belirlenmiştir.

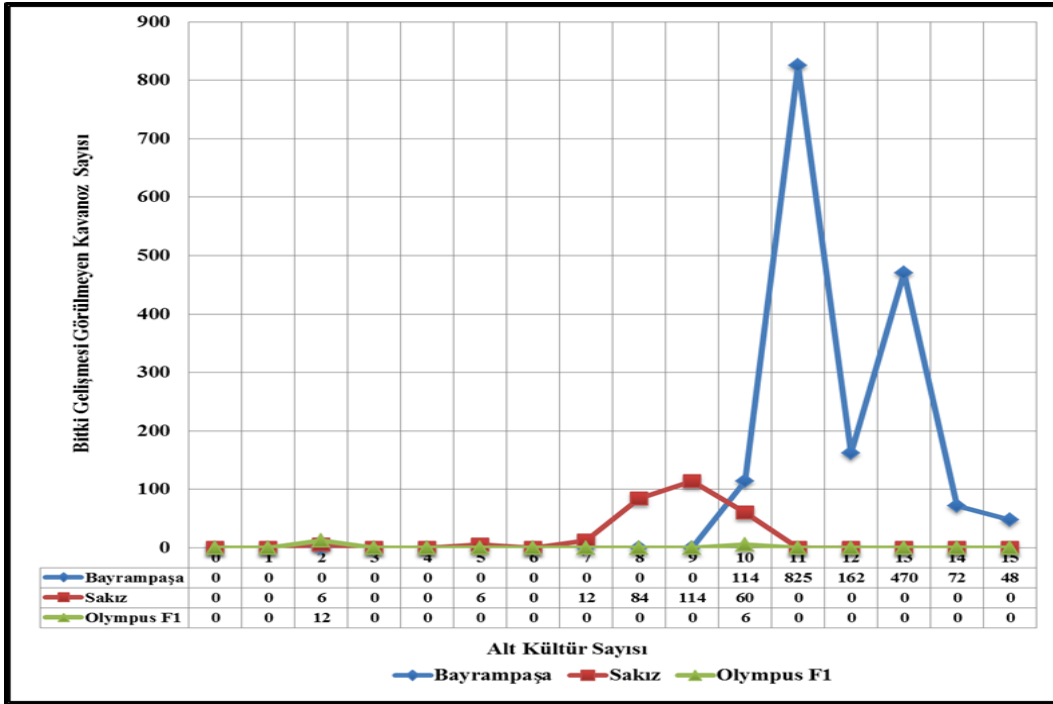


Şekil 4.8. Çeşitlerin alt kültür sayılarına göre ortalama yaprak sayısı/eksplant

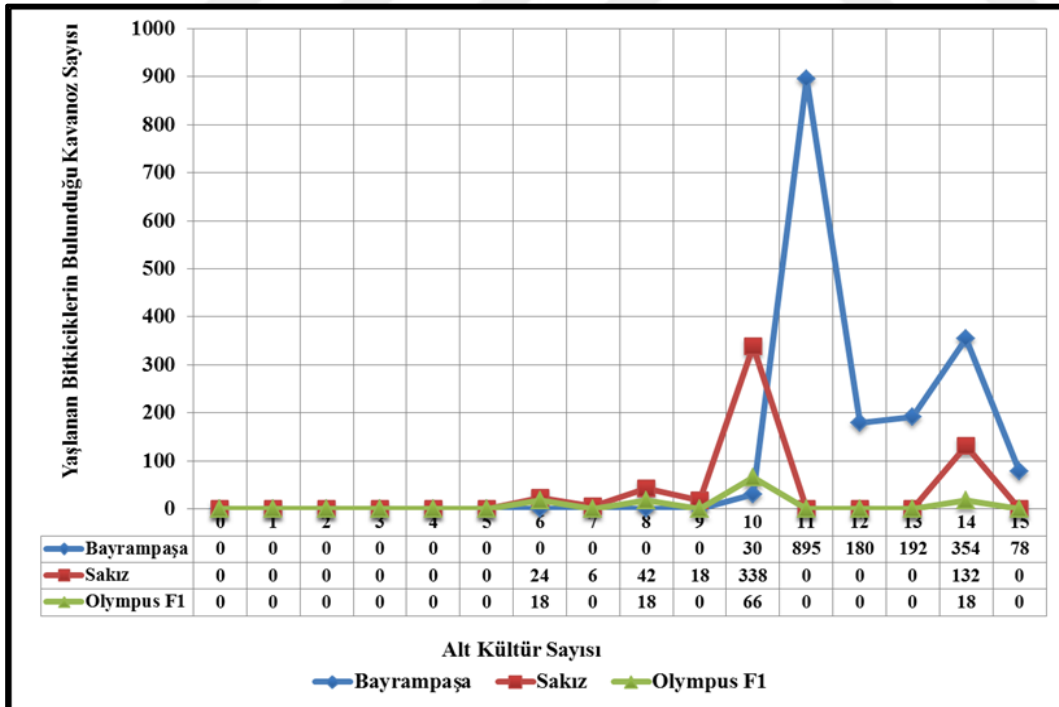
Çalışmada çeşitlerin mikroçoğaltım aşamaları esnasında alt kültürler bazında karşılaştıkları enfeksiyon, gelişmeyen bitki ve yaşlı bitki oranları da değerlendirilmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Her üç parametre için de Bayrampaşa çeşidinin en yüksek oranlara sahip olduğu, bu durumun en belirgin 11. alt kültürde gözlemlendiği söylenebilir. Çeşitlerin mikroçoğaltım oranlarında alt kültürler arasındaki ilişki değerlendirilecek olursa, Bayrampaşa çeşidinde 10. alt kültürden 11. alt kültüre geçişteki yaklaşık 6 kat oranında çoğaltım kaybının sebebini bu şekilde açıklamak mümkündür. Bununla birlikte Sakız ve Olympus F₁ çeşitleri için 6. alt kültürden sonra yaşanan mikroçoğaltım oranlarındaki azalışların sebebi enfeksiyonun yanı sıra gelişme göstermeyen ve yaşlanan bitkicik sayılarındaki artışlardan da kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikroçoğaltım tekniği sayesinde çok sayıda, tek tip ve en önemlisi sağlıklı gelişen bitkiler elde edilebilmekte, böylece ticari boyutta üretim sağlanabilmektedir (Moncousin 1981; Alp vd. 2010). Enginar bitkisi *in vitro* çoğaltım açısından problem yaşanan bitkiler arasında bulunmakta, özellikle toprakla temas halinde olan başlangıç materyallerinin *in vitro* koşullara aktarılması esnasında enfeksiyon problemleriyle karşılaşmaktadır (Ancora 1986; Rossi ve de Paoli 1992; Alp vd. 2010). Bitki parçalarının *in vitro* koşullara alınmaları sırasında sterilizasyon işlemlerinin çok dikkatli bir şekilde uygulanmasıyla bu problemin önüne bir miktar geçilebilmektedir. Ancak kültür başlangıcında ortaya çıkan enfeksiyon kaynağının genellikle gram-negatif bakteriler olduğu (Peñalver vd. 1994), kültürün ilerleyen alt kültür aşamalarında karşılaşılan enfeksiyonların kaynağının ise gram-pozitif bakteriler olduğu bildirilmektedir (Leifert ve Cassells 2001; Alp vd. 2010). Bu çalışmada da alt kültür sayısının belirli bir sayıya ulaşmasıyla gözlemlenen enfeksiyon artışı sebebiyle alt kültür işlemi belirli bir süre devam ettirilmiş olup, 15. alt kültürde bu işleme son verilmiştir.



Şekil 4.9. Enfeksiyon görülen bitkicik sayısı/kavanoz



Şekil 4.10. Gelişme göstermeyen bitkicik sayısı/kavanoz




Şekil 4.11. Yaşlanan bitkicik sayısı/kavanoz

Çalışma süresince her bir çeşit için daha önce de belirtildiği üzere 15 alt kültüre kadar çoğaltma aşaması sürdürülmüştür. Çeşitlerin alt kültürler süresince oluşturdukları yaprak, sürgün ve kök yapıları gözlemlenmiş olup aşağıda şekiller halinde sunulmuştur. Kültür başlangıcında *in vitro* koşullara adaptasyon süreci yaşayan eksplantlar, kültürün ilerleyen safhalarında daha sağlıklı bir görünüm almıştır. Bayrampaşa çeşidindeki gelişmeler incelendiğinde, özellikle 3. alt kültürden sonra gerek yaprak rengi ve yapısı, gerekse sürgün sayısında gelişmeler gözlemlenmiştir (Şekil 4.12 – Şekil 4.15).

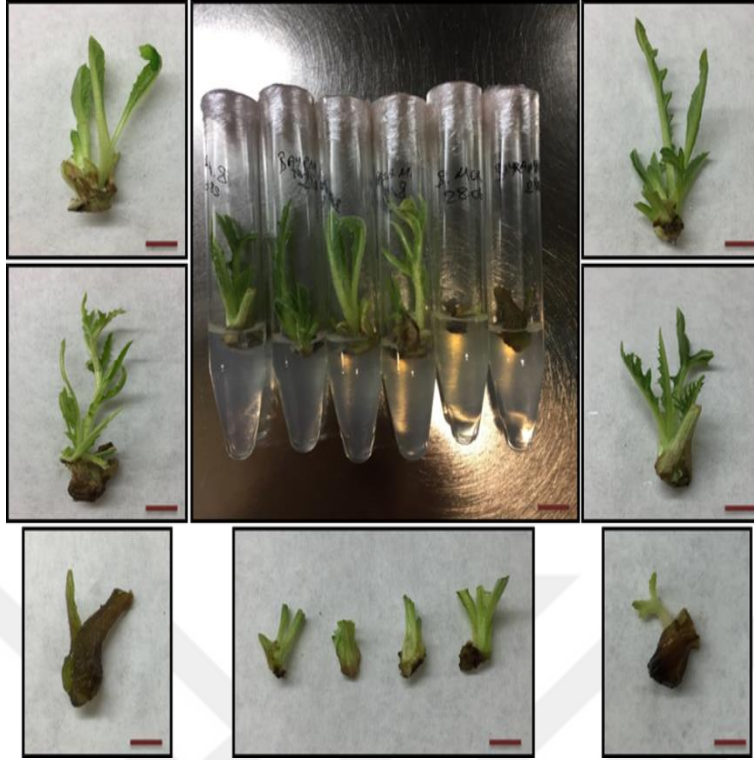
Çalışmada mikroçoğaltım çalışması süresince oluşan sürgünlerin gelişme durumları göz önünde bulundurularak kalite skorlaması skalası hazırlanmıştır (Çizelge 4.2). Alt kültürler boyunca yapılan gözlemler sonucunda çeşitlerin aldığı değerler; Bayrampaşa çeşidi için 4 olurken, Sakız ve Olympus F₁ çeşitleri için ise 3 değerinde kaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Oluşan sürgünlerin kalite skorlaması

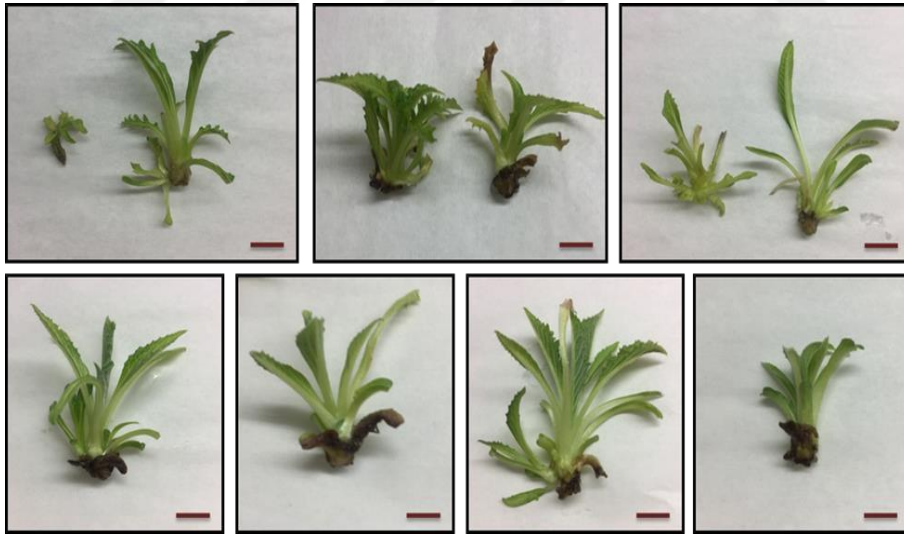
Kalite Skoru		Kalite Skoru Açıklaması
<p>En Kötü</p>  <p>En İyi</p>	1	Ölü bitki oranı çok yüksek, vitrifikasyon oranı oldukça fazla
	2	Yaşlı bitki oranı yüksek, yapraklar ağırlıklı olarak sarı-yeşil, vitrifikasyon var
	3	Yaşlı bitki oranı az, vitrifikasyon oranı az, eksplantlarda büyüme geriliği var
	4	Yaşlı yaprak oranı çok az, yapraklar koyu yeşil, sürgün gelişimi iyi
	5	Yaşlı yaprak neredeyse yok, yapraklar koyu yeşil, sürgün gelişimi çok kuvvetli



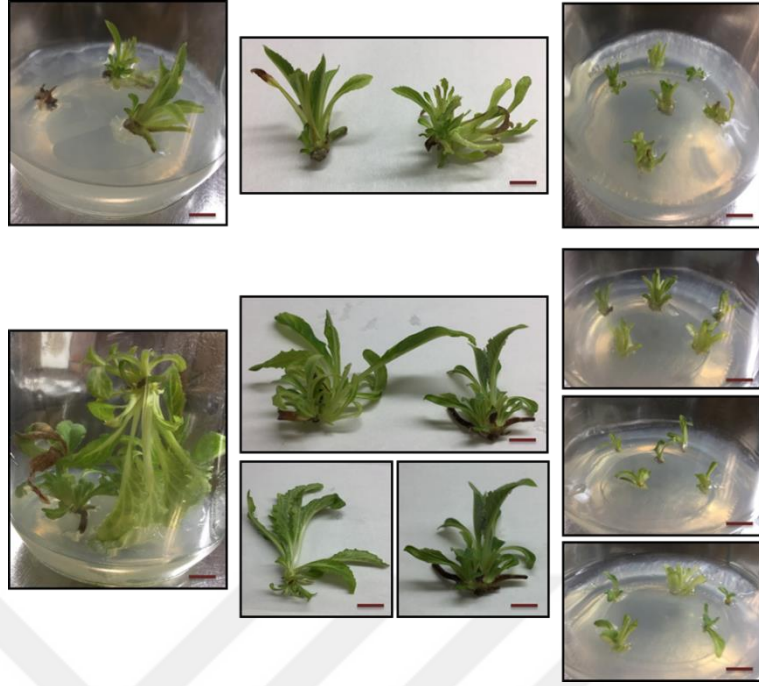
Şekil 4.12. Bayrampaşa çeşidine ait meristemlerin gelişimlerinin gözlemi (bar =1 cm)



Şekil 4.13. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 2. alt kültür gözlemi (bar =1 cm)

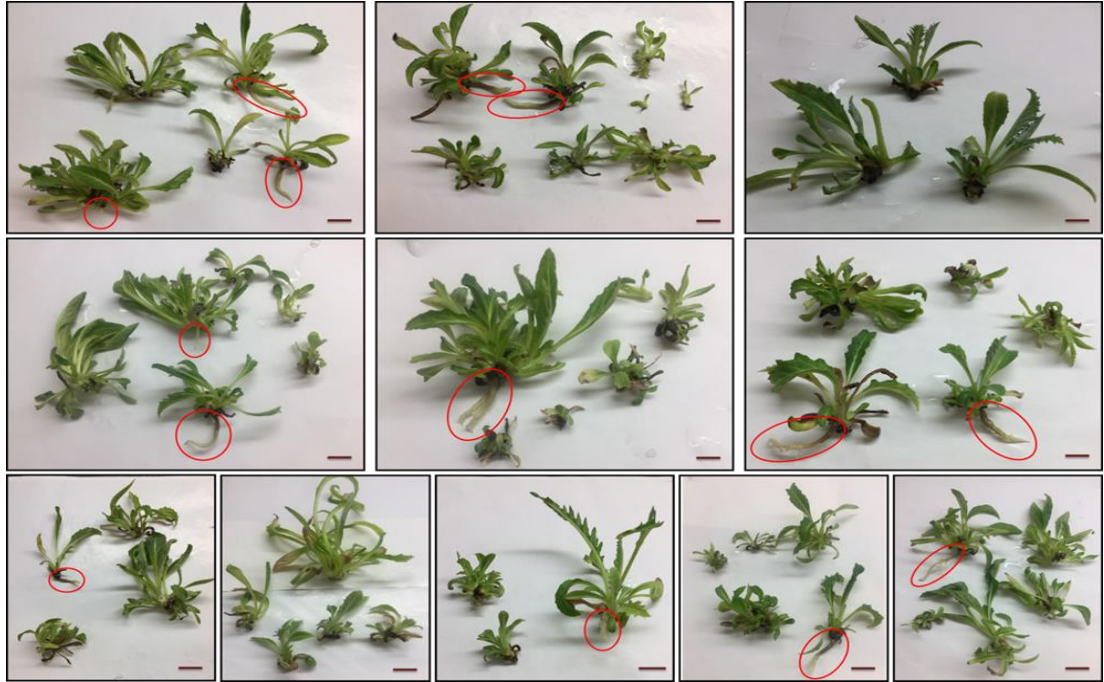


Şekil 4.14. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 3. alt kültür gözlemi (bar =1 cm)

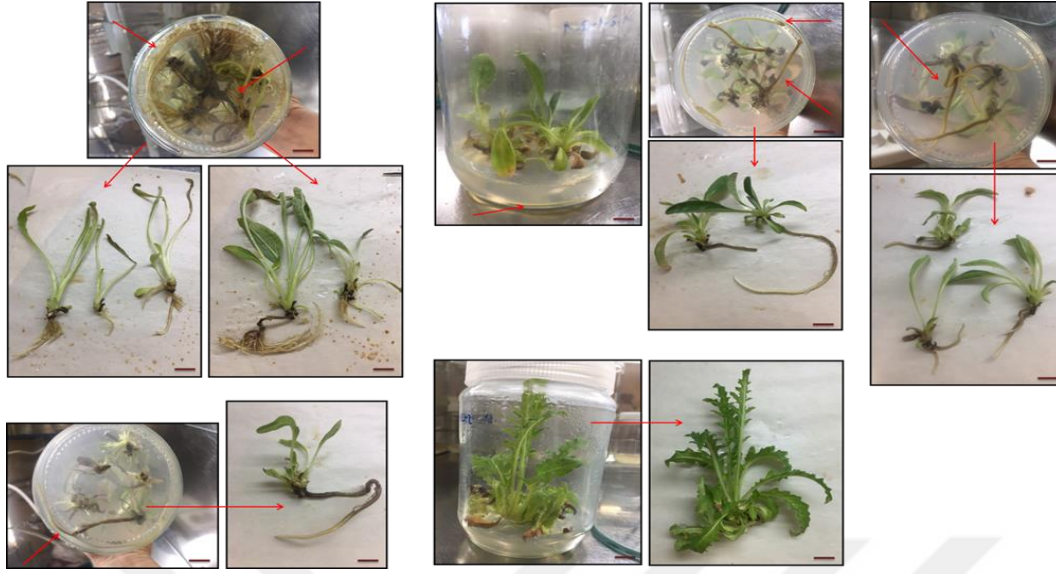


Şekil 4.15. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 4. alt kültür gözlemi (bar =1 cm)

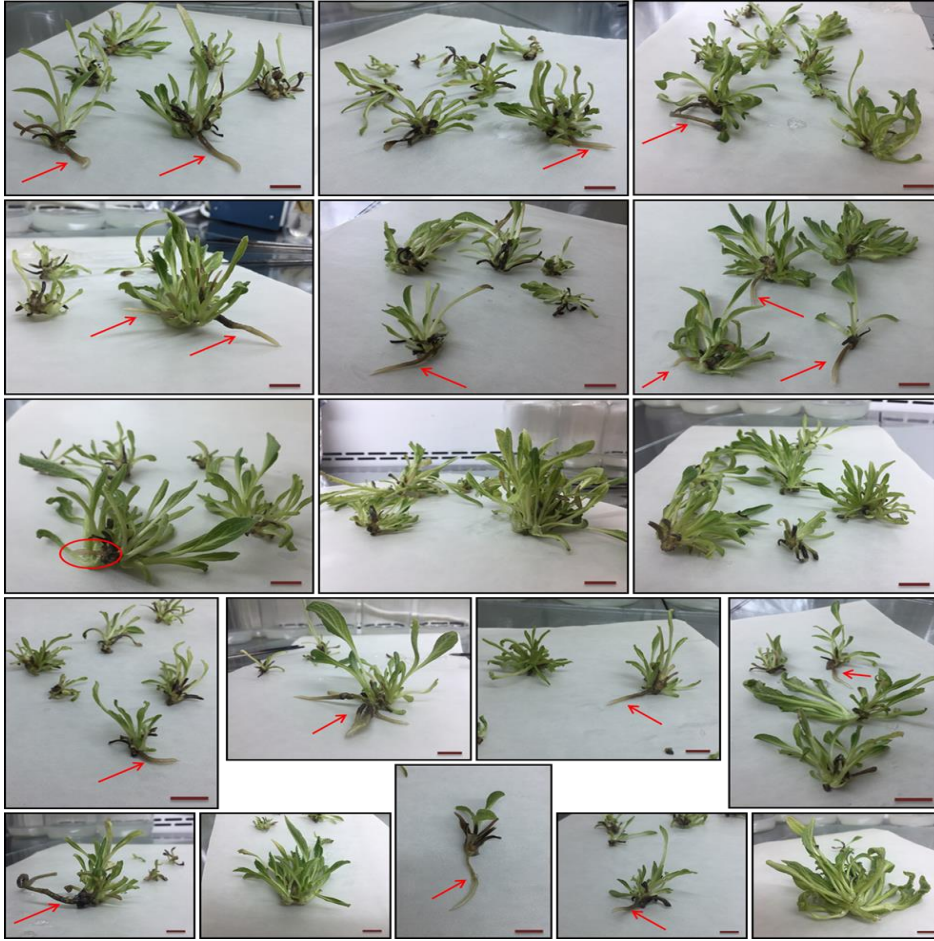
Mikroçoğaltım aşaması devam ederken 6. alt kültür ve daha sonraki alt kültürlerde çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında gelişen bitkiciklerde kök oluşumları gözlemlenmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18). *In vitro* kök geliştiren bu bitkiciklerin, daha sonra aklimatizasyon aşamasından geçirilerek arazi koşullarında devamlılığı sağlanmaya çalışılmıştır.



Şekil 4.16. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 6. alt kültür gözlemi, çoğaltma besi ortamında oluşan kökler işaretlenmiştir (bar =1 cm)

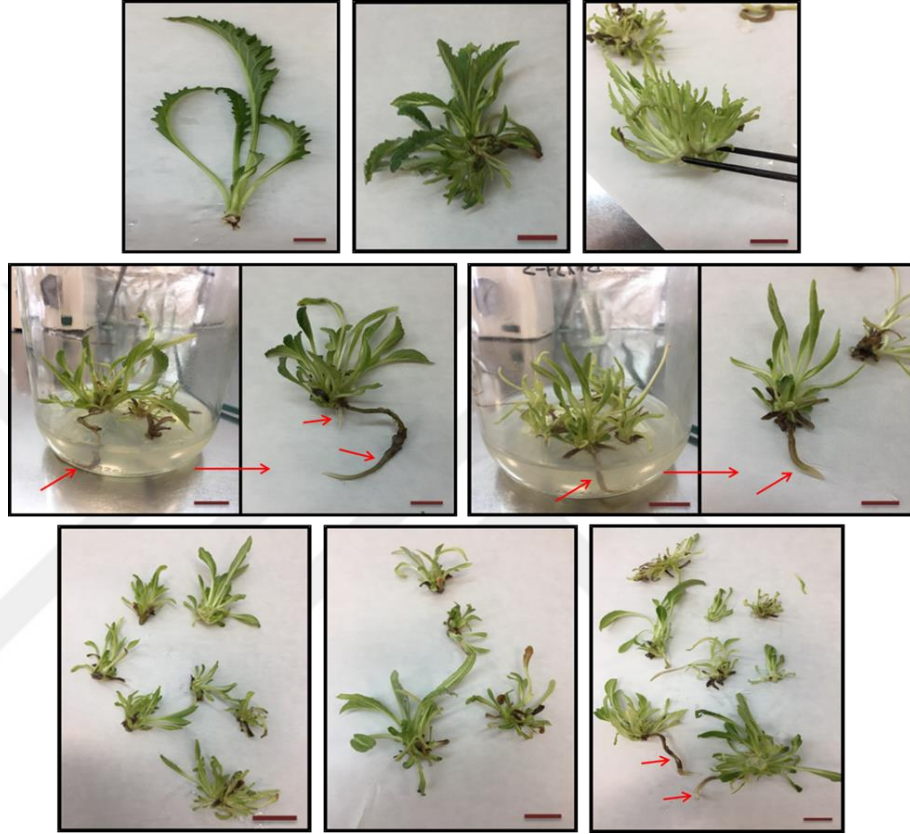


Şekil 4.17. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 8. alt kültür gözlemi, çoğaltma besi ortamında oluşan kökler işaretlenmiştir (bar =1 cm)



Şekil 4.18. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin 9. alt kültür gözlemi, çoğaltma besi ortamında oluşan kökler işaretlenmiştir (bar =1 cm)

Çalışmada Bayrampaşa çeşidinde mikroçoğaltım aşamasının 10. alt kültürden sonraki alt kültürlerde bitkilerin çoğaltım oranlarının azalmasının yanı sıra, oluşturdukları sürgün sayılarında da azalmalar görülmüştür. Bununla birlikte bahsi geçen alt kültür sayısına kadar gelişen bitkiciklerin yapıları sağlıklı gelişirken, bu alt kültürden sonra istisnalar olmakla birlikte sürgünlerin çoğunun çok daha zayıf gelişme gösterdiği, renklerinde de açık yeşile doğru değişimler görüldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.19).

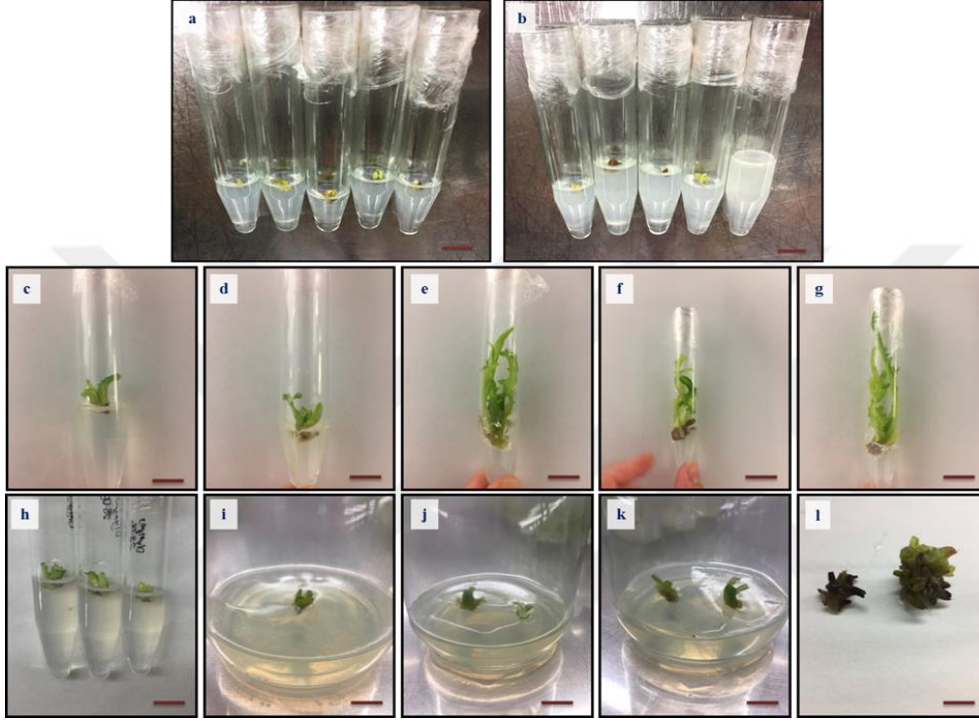


Şekil 4.19. Bayrampaşa çeşidinde ait bitkiciklerin 11. alt kültür gözlemi, çoğaltma besi ortamında oluşan kökler işaretlenmiştir (bar =1 cm)

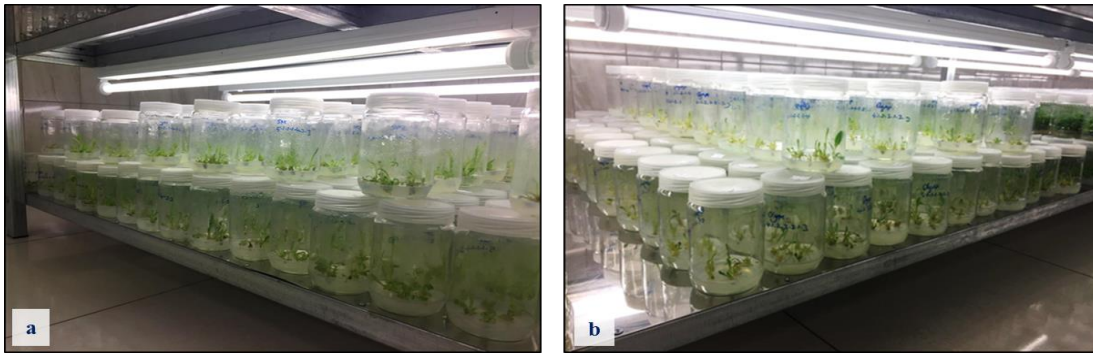
Çalışmada değerlendirmeye alınan üç çeşit için de mikroçoğaltım çalışmalarına 2017 yılı Haziran ayında başlanmıştır. Ancak bu tarihte meristem kültürü yapılan Olympus F₁ bitkiciklerinin gelişmeleri iyi olmamış, sürgünlerde anormal gelişmelerle birlikte camsılaşma olayı ön plan çıkmış, dolayısıyla daha ileri alt kültürlerle gidilememiştir (Şekil 4.20). Aynı durum Sakız çeşidinde de görülmüştür. Bu nedenle, bu iki çeşidin alt kültürleri 2018 yılı Şubat ayında tekrar başlatılmıştır. Bu tarihte Sakız ve Olympus F₁ için tekrar başlatılan meristem kültürü çalışması, Bayrampaşa çeşidindeki gibi 15. alt kültüre kadar devam ettirilmiş ve gerekli gözlemler yapılmıştır (Şekil 4.21 – Şekil 4.31).

Sakız ve Olympus F₁ çeşitlerindeki gelişmeler incelendiğinde, 5. alt kültüre kadar her ikisinin sürgün sayılarında artışlar görülmüş, bu artışların Sakız çeşidinde 8. alt kültüre, Olympus F₁ çeşidinde ise 7. alt kültüre kadar devam ettiği gözlemlenmiştir. Belirtilen alt kültürlerden sonra sürgün sayılarında artış görülen bu çeşitlerin, 9. alt

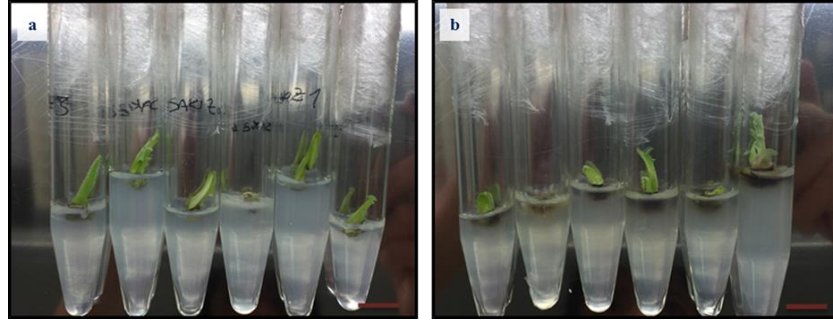
kültürden sonra geliştirdikleri sürgün sayıları da azalmıştır. 9. alt kültürde Sakız çeşidinde oluşan sürgünlerin yaprak yapılarında değişimler gözlemlenmiştir (Şekil 4.27). Genel olarak Olympus F₁ çeşidinin diğer iki çeşide kıyasla daha zayıf sürgünler, daha açık renkli yapraklar meydana getirdiği belirlenmiştir. Gözlemlerden elde edilen bu sonuçlar, *in vitro* çalışmaların büyük çoğunluğunda olduğu gibi, enginar bitkisinin mikroçoğaltım çalışmasında da genotip farklılığının elde edilmesi hedeflenen sonuçlara doğrudan etki ettiğini ve genotipe özgü prosedürlerin geliştirilmesi gerektiği hususundaki önemi bir kez daha göstermiştir.



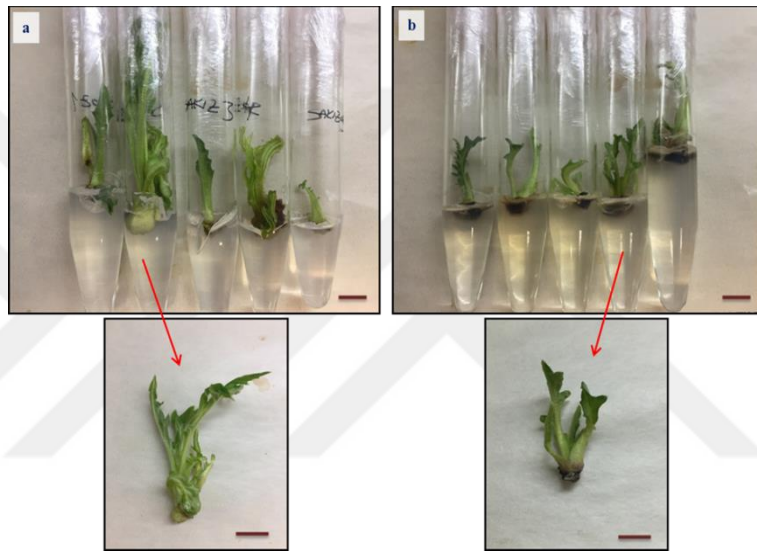
Şekil 4.20. Olympus F₁ çeşidine ait ilk başlatılan meristem kültürleri ve bitkiciklerin gelişme durumları, **a.** ve **b.** Meristemlerin ilk kültürüne ait görünüşleri; **c – g.** Meristemlerin kültüre alınmasından 22 gün sonraki görünüşleri; **h – k.** Meristem kültürünün 2. ayından görünüşleri; **l.** Kültürün 3. ayında gelişmesi iyi olmayan, vitrifikasyon görülen bitkicikler (bar = 1 cm)



Şekil 4.21. Alt kültürü yapılan çeşitlere ait bitkiciklerin büyüme odasındaki genel görünüşleri; **a.** Sakız, **b.** Olympus F₁



Şekil 4.22. Meristemlerin kültüre alınmasını takip eden 20. günde gelişme durumları **a.** Sakız; **b.** Olympus F₁ (bar = 1 cm)



Şekil 4.23. Meristemlerin kültüre alınmasından 1 ay sonra gözlem fotoğrafları; **a.** Sakız; **b.** Olympus F₁ (bar =1 cm)



Şekil 4.24. Sakız çeşidine ait 2. alt kültür aşamasından gözlem fotoğrafları (bar =1 cm)



Şekil 4.25. Sakız çeşidinde 6. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)

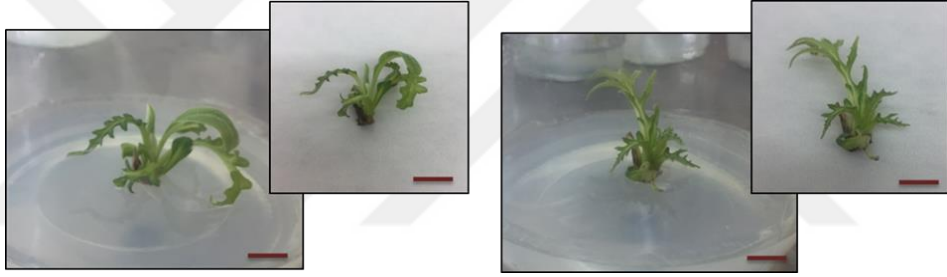
Mikroçoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında daha önce Bayrampaşa çeşidi için de bahsedildiği gibi Sakız çeşidinde de *in vitro* kök gelişimleri gözlemlenmiştir. Bayrampaşa çeşidinde ilk olarak 6. alt kültürde gözlemlenen kök gelişimleri, Sakız çeşidinde ise ilk olarak 7. alt kültürde gözlemlenmiştir (Şekil 4.26). Olympus F₁ çeşidinde de çoğaltma ortamında kök oluşumunda alt kültür zamanlaması bakımından Sakız çeşidindeki gibi benzer bir durum tespit edilmiştir. Ancak diğer iki çeşitte görülen *in vitro* kök oluşumuna kıyasla çok daha az sayıda *in vitro* kök geliştiren bitkicik olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.26. Sakız çeşidinde 7. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)



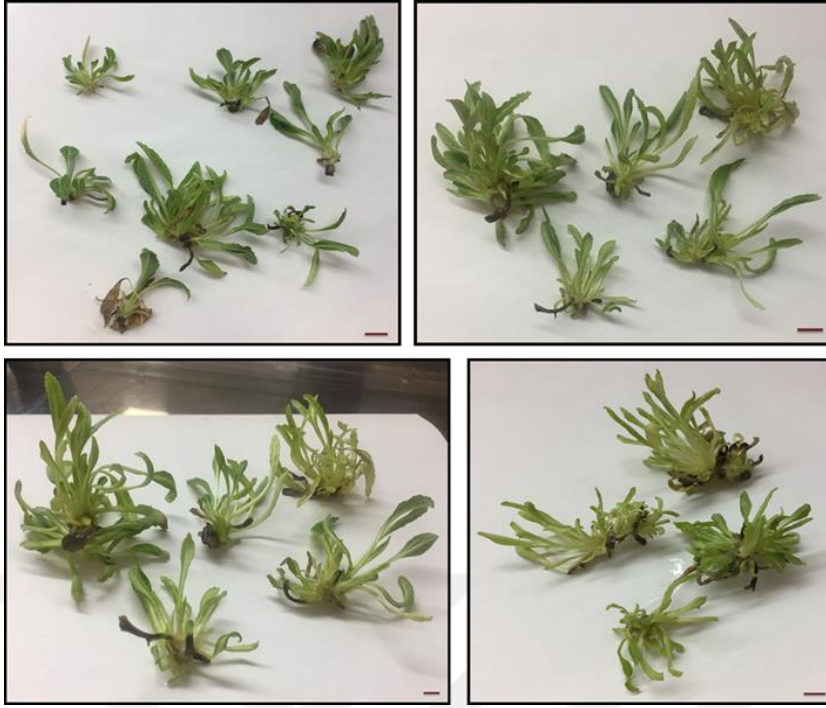
Şekil 4.27. Sakız çeşidinde 9. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)



Şekil 4.28. Olympus F₁ çeşidinde ait 2. alt kültür aşamasından gözlem fotoğrafları (bar =1 cm)



Şekil 4.29. Olympus F₁ çeşidinde 3. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)



Şekil 4.30. Olympus F₁ çeşidinde 4. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)



Şekil 4.31. Olympus F₁ çeşidinde 5. alt kültür sonunda bitkiciklerin gözlemi (bar = 1 cm)

4.2.2. *In vitro* köklenme çalışmasına ait bulgular

Doku kültürü yöntemleri kullanılarak yapılan *in vitro* üretim birçok avantaj sağlarken, enginarın *in vitro* çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi bu bitkinin *in vitro* koşullarda köklenmesinin zorluğudur. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında *in vitro* köklenmenin sağlanması amacıyla bir protokol geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, başlangıçtan itibaren 4 alt kültür aşamasını içeren başarılı bir mikroçoğaltım sürecinin ardından, gelişmesi iyi olan sürgünler iki farklı kodlandırma ile hazırlanmış besi ortamı kompozisyonlarında köklendirilmek üzere kültüre alınmıştır. İlk olarak denemeye alınan ‘Z’ kodlu besi ortamı kombinasyonlarında arzu edilen köklenme düzeyine erişilemediğinden dolayı farklı bir besi ortamı kombinasyon grubu hazırlama zorunluluğu doğmuştur. Bu amaçla ‘K’ kodlu besi ortamı kombinasyonları hazırlanarak denemeye alınmış olup (Çizelge 3.6), elde edilen köklenme sonuçları tatmin edici düzeyde olduğundan ötürü çalışmanın ilerleyen kısmında bu besi ortamı kombinasyonlarıyla devam edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda çizelgeler, grafikler ve şekiller halinde sunulmuştur (Çizelge 4.3 – Çizelge 4.5, Şekil 4.32 – Şekil 4.56).

Çalışmadan elde edilen verilere bakıldığında, *in vitro* kök oluşumu amacıyla değerlendirilen K kodlu köklenme ortamlarına çeşitlerin verdikleri tepkilerde farklılıklar görülmektedir (Şekil 4.32). Buna göre Bayrampaşa ve Olympus F₁ çeşitlerine ait bitkiciklerin en iyi kök oluşumu sağladıkları besi ortamı K4 ($\frac{1}{2}$ MS + 6 mg L⁻¹ IBA) olurken, Sakız çeşidi için K8 ($\frac{1}{2}$ MS + 5 mg L⁻¹ GA₃ + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 1 g L⁻¹ aktif kömür) olmuştur. Değerlendirmeye alınan üç çeşit arasında *in vitro* kök oluşum oranları incelendiğinde, %97,77 kök oluşum oranı ile Olympus F₁ çeşidinin diğer ikisine kıyasla (Bayrampaşa %56,34 kök oluşum oranı, Sakız %74,22 kök oluşum oranı) daha üstün olduğu görülmektedir. Bu kök oluşum değerlerinin kontrol ortamındaki (K10) köklenme oranlarından daha iyi olduğunu söylemek mümkündür (Çizelge 4.3 – Çizelge 4.5).

In vitro tekniklerin enginar bitkisi için elverişliliği bilinmekle birlikte, mikroçoğaltım aşamasının en zorlayıcı basamaklarından birini *in vitro* kök oluşumu ve gelişimi oluşturmaktadır. Literatürde bu konuya ilişkin çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerin ve bunların konsantrasyonlarının kullanımı (Harbaoui vd. 1982; Marras vd. 1985; Draoui vd. 1993; Iapichino 1996; Morzadec ve Hourtmant 1997; Bedini vd. 2012; López-Pérez ve Martínez 2015; Ercan 2016), siklodekstrin ve aktif kömür gibi çeşitli kimyasalların besi ortamlarına uygun oranlarda eklenmesi (Bigot ve Foury 1984; Brutti vd. 2000) gibi farklı uygulamaların enginarında *in vitro* kök oluşumunu geliştirmesine yönelik çalışmalara rastlamak mümkündür. Bu konuya dair önceki çalışmaların ve bu çalışmanın ortak sonucu olarak, enginarında *in vitro* kök oluşumu ve gelişiminin tam olarak istenilen düzeyde olmadığı ve bu durumun sebeplerinden belki de en önemlisinin ise genotip farklılığı olduğu görüştür.

Çalışmada K4 ortamındaki 6 mg L⁻¹ IBA, iki çeşitte (Olympus F₁ %97,77 ve Bayrampaşa %56,34) kök oluşumunda etkili bulunmuştur. Ercan (2016), köklenme amacıyla IBA kullanımının enginarında olumsuz etki ettiğini belirtmekle birlikte yaptığı çalışmada, Sakız ve Bayrampaşa çeşitlerinde *in vitro* kök oluşumu üzerine çeşitli konsantrasyonlarda kullandığı IBA arasından 0,4 mg L⁻¹ konsantrasyonunun en etkili sonuçları verdiğini ve sırasıyla Sakız ve Bayrampaşa çeşitlerinde %33 ve %16,6

oranlarında köklenme sağladığını bildirmiştir. Bu çalışmada daha yüksek oranda (6 mg L⁻¹) IBA kullanılmış olup, bahsedilen bu iki çeşitte daha yüksek seviyede kök oluşumu (Bayrampaşa %56,34 ve Sakız %56,33) elde edilmiştir. Benzer şekilde López-Pérez ve Martínez (2015), besi ortamına 29,5 µM IBA ekledikleri ve 5 gün karanlık uygulaması yaptıkları çalışmada, çeşitlere göre değişmekle birlikte %73,3 – %93,3 oranları arasında kök oluşumunu teşvik ettiklerini bildirmişlerdir. Fortunato vd. (2005) enginarda *in vitro* kök oluşumunu teşvik etmek amacıyla yaptıkları çalışmada NAA, IAA ve IBA'nin etkilerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar 10 mg L⁻¹ IAA kullanımıyla %86 oranında *in vitro* kök oluşumu elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte önceki çalışmalarda *in vitro* kök oluşumu üzerine besi ortamına IAA yerine IBA eklenmesinin kök oluşumu bakımından daha olumlu sonuçlar ortaya koyduğu, oluşan köklerin sayı ve uzunluk bakımından daha iyi durumda olduğu bildirilmiştir (Upadhyaya vd. 1985; El-Zeiny vd. 2013). Araştırmacılar, bitkiciklerin *in vitro* köklenmelerini teşvik etmek amacıyla IBA kullanımının daha fazla bitki türünde yaygın olması, çeşitli konsantrasyon aralıklarında etki etme özelliği göstermesi ve öte yandan fitotoksiklik seviyesinin de daha az olması gibi sebeplerden ötürü daha fazla tercih edildiği görüşündedirler (Hartmann ve Kester 1983; El-Zeiny vd. 2013).

Öte yandan literatüre bakıldığında enginarda *in vitro* kök oluşumunda GA₃'in etkisinin ortaya koyulduğu araştırmalar da mevcuttur. Morzadec ve Hourmant (1997), enginarda yaptıkları *in vitro* köklenme çalışmasında 2,68 µM L⁻¹ (0,5 mg L⁻¹) NAA ile birlikte iki farklı konsantrasyonda GA₃ (2,9 µM L⁻¹, 14,4 µM L⁻¹) etkisini gözlemlemişlerdir. Araştırmacıların çalışmadan elde ettikleri bulgulara bakıldığında GA₃ konsantrasyonundaki değişimle birlikte köklenme oranında da değişiklik görülmüş, 2,9 µM L⁻¹ (1 mg L⁻¹) ve 14,4 µM L⁻¹ (5 mg L⁻¹) konsantrasyonlarında sırasıyla %80,5 ve %92,3 köklenme oranları elde edilmiştir. Benzer şekilde Ercan (2016) Sakız ve Bayrampaşa çeşitlerine ait bitkiciklerin köklenmelerini teşvik etmek amacıyla besi ortamlarına ilave ettiği 5 mg L⁻¹ GA₃ ile 1 g L⁻¹ aktif kömürün oldukça etkili sonuçlar verdiğini, bu iki çeşitte sırasıyla %63,35 ve %36,6 oranlarında köklenme sağladığını bildirmiştir. Bu çalışma kapsamında denemeye alınan köklenme ortamlarından K8 (5 mg L⁻¹ GA₃ + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 1 g L⁻¹ aktif kömür) de benzer içeriğe sahip olup, çeşitlere göre değişmekle birlikte Bayrampaşa'da %50, Sakız'da %74,22 ve Olympus F₁'de %55 oranlarında köklenme sağlanmıştır (Çizelge 4.3 – Çizelge 4.5).

Çalışmada köklenme amacıyla besi ortamlarına eklenen aktif kömür çeşitlerine ve birlikte kullanıldığı bitki büyüme düzenleyicilerine göre farklılık göstermiştir. Elde edilen bulgular incelendiğinde, Bayrampaşa çeşidi için IAA ile birlikte 2 g L⁻¹ aktif kömür kullanılması daha etkili kök oluşumu sağlarken, IBA ve GA₃ + NAA kombinasyonunda ise aktif kömür eklenmeyen ortamlardan diğerlerine göre daha olumlu sonuçlar alınmıştır. Sakız çeşidini incelediğimizde Bayrampaşa ile benzer şekilde IAA ve IBA konsantrasyonlarında aktif kömürün olmadığı ortamlar daha iyi sonuçlar verirken, GA₃ + NAA kombinasyonunda ise 1 g L⁻¹ aktif kömür etkili bulunmuştur. Olympus F₁ çeşidinde ise aktif kömür kullanılmayan ortamların diğer ortamlara göre daha iyi kök gelişimi sağladığı tespit edilmiştir. Aktif kömürün besi ortamlarına eklenmesiyle kök gelişiminin teşvik edildiği bilinmekte olup, yapılan pek çok araştırmada aktif kömürün besi ortamında yarattığı “karanlık etkisi” sayesinde bu durumun gerçekleştiği birçok araştırmacı tarafından ortaya koyulmuştur (Klein ve Bopp 1971; Bigot ve Foury 1984; López-Pérez ve Martínez 2015). López-Pérez ve Martínez

(2015), IBA etkisinin köklenme üzerine olan etkisi görülmek isteniyorsa bu bitki büyüme düzenleyicisinin karanlık uygulamasıyla birlikte kullanılması gerektiğini vurgulamıştır. Bu çalışmada ise IBA kullanılan besi ortamlarının aktif kömür içermeyen kombinasyonlarında daha olumlu sonuçlar bulunmuştur.

Mikroçoğaltım çalışması esnasında gözlemlenen çeşitlerin eksplant başına yaprak oluşum sayıları değerlendirildiğinde Sakız çeşidinin diğer iki çeşide kıyasla daha fazla yaprak oluşturduğu belirlenmiştir. Pacifici vd. (2007)'e göre mikroçoğaltım esnasında bitkiciklerin oluşturdukları yaprak sayısı ne kadar fazla olursa, bu bitkiciklerin dış koşullara alıştırılmaları bir o kadar zorlaşacaktır. Çünkü oluşan yaprak sayısının fazla olması durumunda bitkiciklerin su kaybının da daha fazla olacağı görüşü belirtilmiştir. Sakız çeşidinin *in vitro* koşullar altında daha fazla yaprak oluşturduğu gözlemlenen bu çalışma kapsamında, *in vitro* kök oluşturan bitkiciklerin aklimatizasyon aşamalarındaki performansları çeşitler bazında değerlendirildiğinde, Sakız çeşidinin diğer iki çeşide göre dış koşullara adaptasyonunun bir miktar aşağı seviyede kaldığı görülmektedir (Şekil 4.33). Genel olarak köklenme amacıyla kullanılan besi ortamlarındaki bitkiciklerin aklimatizasyon aşamasındaki durumları değerlendirildiğinde, çeşitlere göre değişmekle birlikte %67,14 - %100 arasında aklimatizasyon oranları tespit edilmiştir. Bununla birlikte *in vitro* çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kök oluşumu gösteren bitkiciklerin oranları yine çeşide bağlı olarak %1,80 - %6,47 arasında değişiklik göstermektedir. Bu bitkiciklerin aklimatizasyon aşamasındaki oranları %80'lerde seyrederken, yaşayan bitkiciklerin oranı ise %7,56 - %10 civarında kalmıştır. Öte yandan yaşayan bitkiciklerin bu oranlarının, köklenmeyi teşvik etmek amacıyla hazırlanan ortam kombinasyonlarının birçoğundan elde edilen bitkicik yaşama oranlarından daha üstün olduğu görülmektedir (Şekil 4.35). Çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında yer alan 0,005 mg L⁻¹ IBA'nın bu duruma pozitif katkı sağladığı düşünülmektedir.

Brutti vd. (2000), *in vitro* kök ya da sürgün oluşumlarında anormallikler görülen ya da kallus oluşumu gözlemlenen bitkiciklerin aklimatizasyon aşamalarında pek fazla başarı sağlanamadığını rapor etmişlerdir. Bu çalışma kapsamında, kullanılan K4 ve K7 ortamlarında köklenmek üzere kültüre alınan bitkiciklerde oldukça fazla kallus gelişimi gözlemlenmiş, diğer besi ortamlarında ise yaşayan bitki tespit edilemeyenlerde gelişme bozuklukları gözlemlenmiş olup, sonuçların Brutti vd. (2000) ile uyum içinde bulunduğu söylenebilir.

Çizelge 4.3. Bayrampaşa çeşidi için *in vitro* köklenme çalışması sonuçları

Köklenme Ortamı Kodu	<i>In vitro</i> Kök Oluşumu (%)	Aklimatizasyon (%)	Yaşayan Bitki Oranı (%)
K1	52,90	97,80	0
K2	46,42	100,00	5,12
K3	53,72	100,00	1,98
K4	56,34	94,03	0,70
K5	51,06	100,00	0
K6	49,48	100,00	0
K7	55,84	100,00	0

Çizelge 4.3.'ün devamı

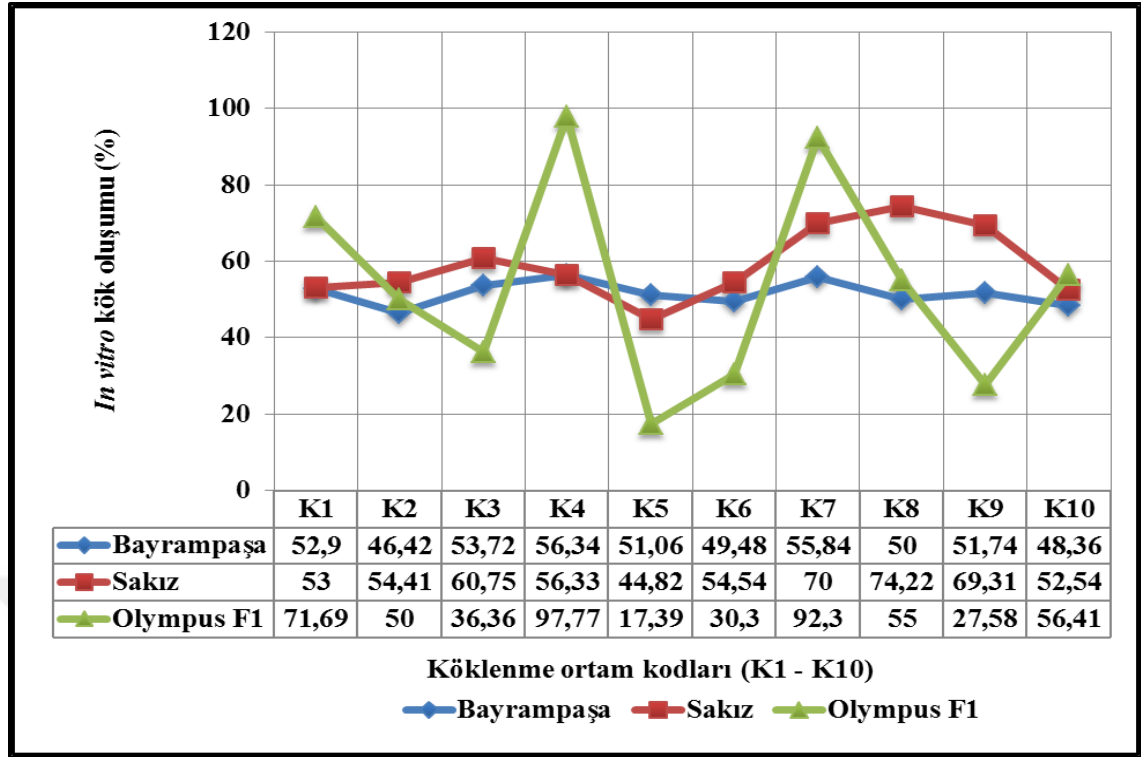
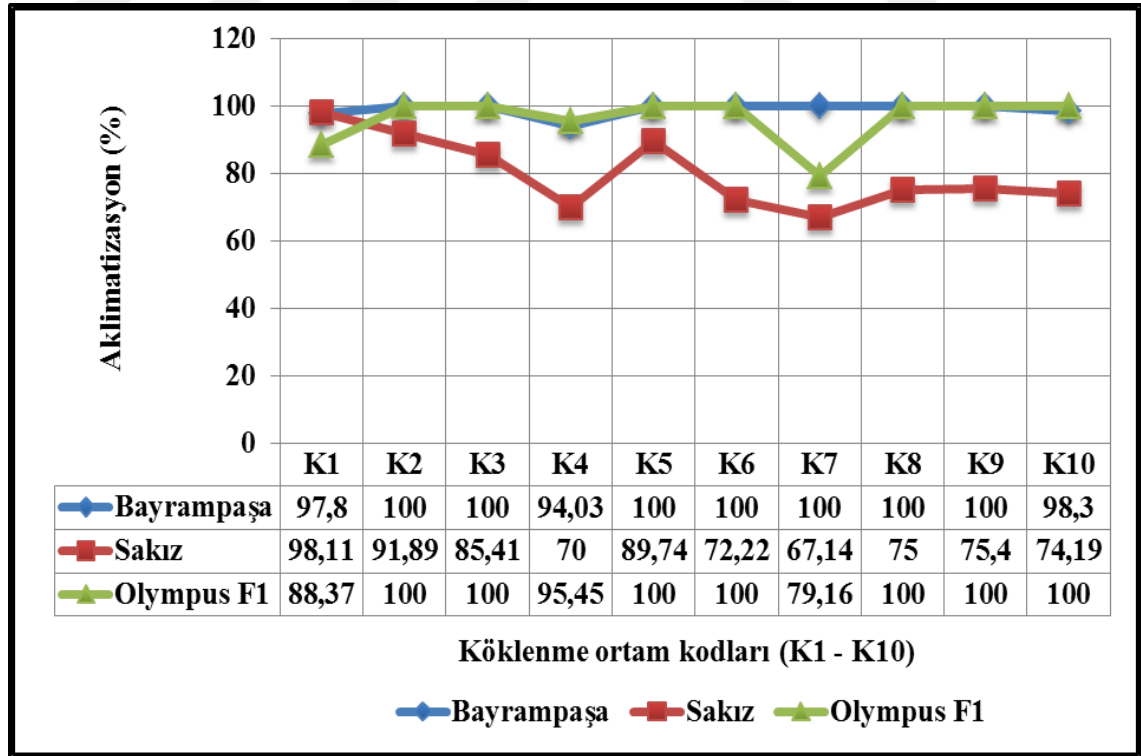
K8	50,00	100,00	1,53
K9	51,74	100,00	2,70
K10	48,36	98,30	1,72
Çoğaltma Ortamı	5,35	81,14	8,86

Çizelge 4.4. Sakız çeşidi için *in vitro* köklenme çalışması sonuçları

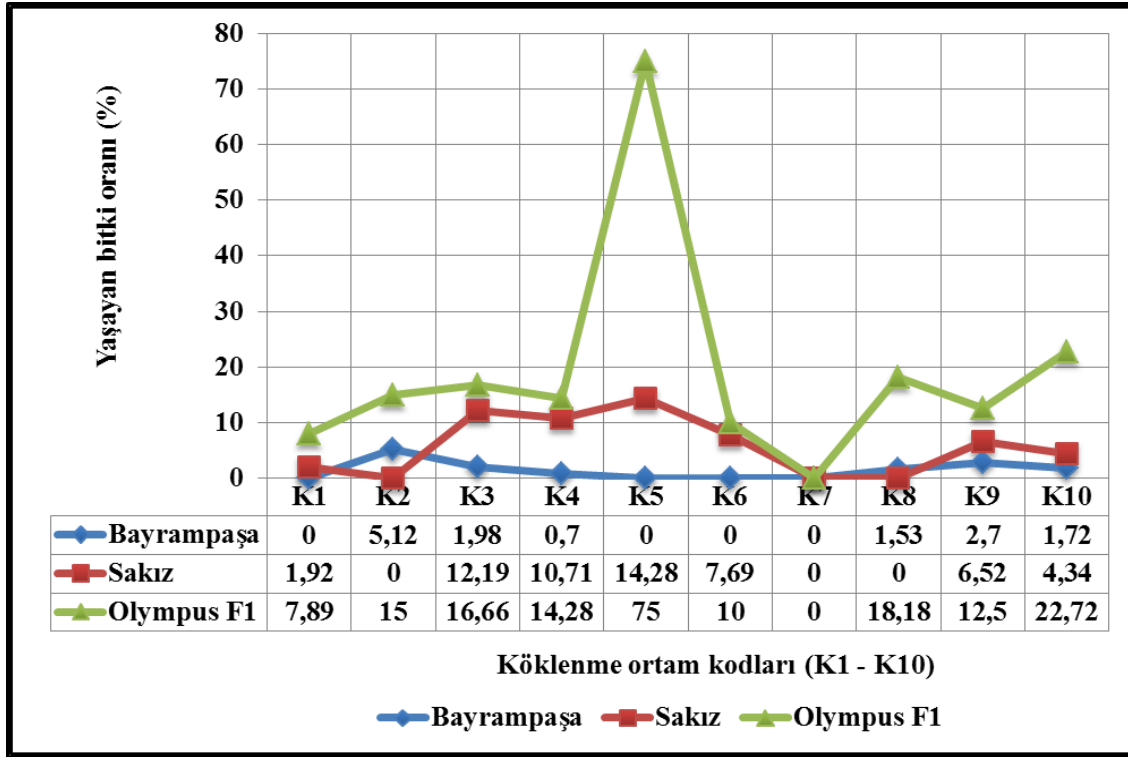
Köklenme Ortamı Kodu	<i>In vitro</i> Kök Oluşumu (%)	Aklimatizasyon (%)	Yaşayan Bitki Oranı (%)
K1	53,00	98,11	1,92
K2	54,41	91,89	0
K3	60,75	85,41	12,19
K4	56,33	70,00	10,71
K5	44,82	89,74	14,28
K6	54,54	72,22	7,69
K7	70,00	67,14	0
K8	74,22	75,00	0
K9	69,31	75,40	6,52
K10	52,54	74,19	4,34
Çoğaltma Ortamı	6,47	88,80	7,56

Çizelge 4.5. Olympus F₁ çeşidi için *in vitro* köklenme çalışması sonuçları

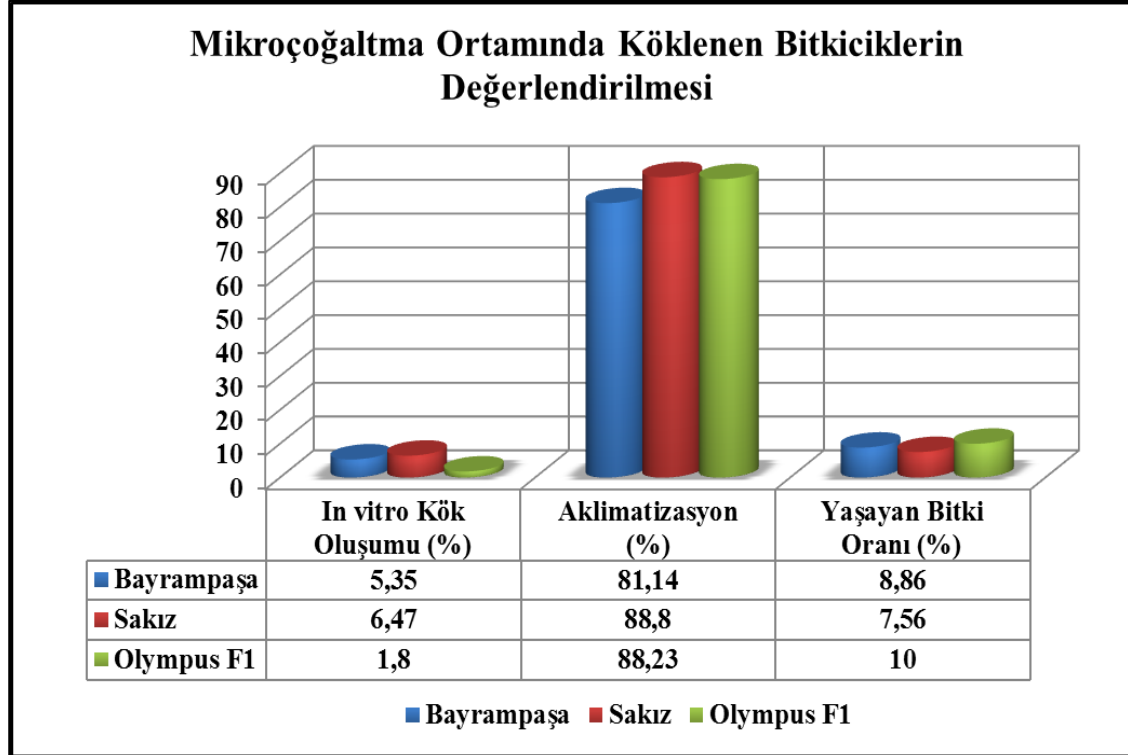
Köklenme Ortamı Kodu	<i>In vitro</i> Kök Oluşumu (%)	Aklimatizasyon (%)	Yaşayan Bitki Oranı (%)
K1	71,69	88,37	7,89
K2	50,00	100,00	15,00
K3	36,36	100,00	16,66
K4	97,77	95,45	14,28
K5	17,39	100,00	75,00
K6	30,30	100,00	10,00
K7	92,30	79,16	0
K8	55,00	100,00	18,18
K9	27,58	100,00	12,5
K10	56,41	100,00	22,72
Çoğaltma Ortamı	1,80	88,23	10,00

Şekil 4.32. Çeşitlerin *in vitro* kök oluşum oranları (%)

Şekil 4.33. Çeşitlerin aklimatizasyon durumları




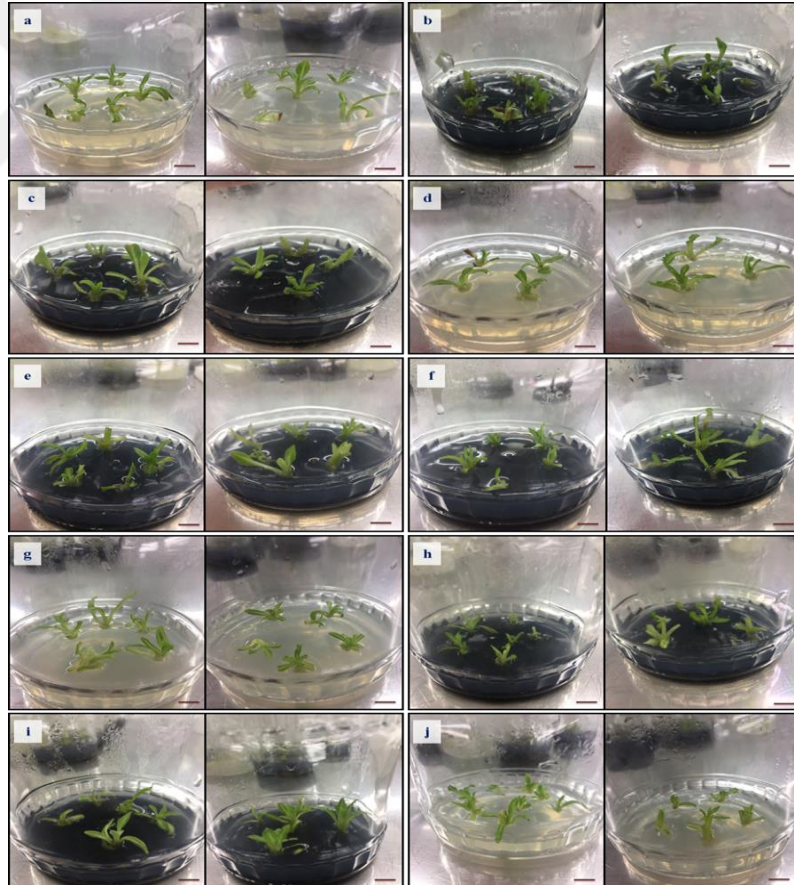
Şekil 4.34. Çeşitlerin arazi koşullarında yaşama durumları

Şekil 4.35. *In vitro* çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kök oluşturan bitkiciklerin değerlendirilmesi

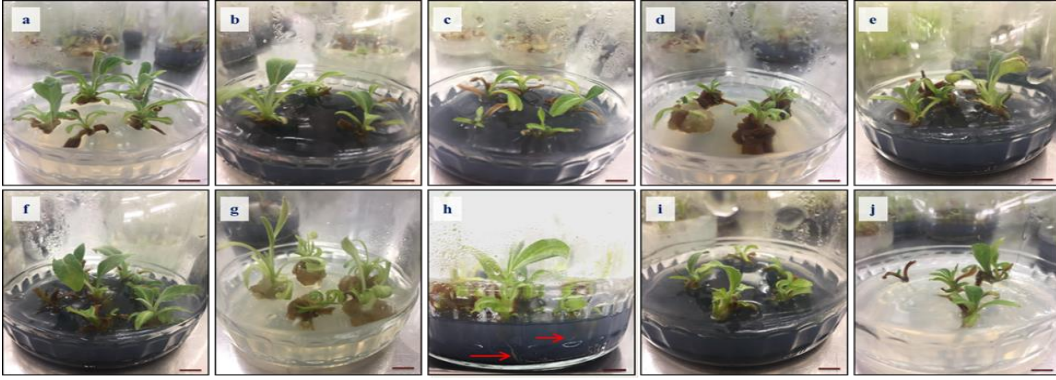
Çalışmada değerlendirilmeye alınan üç çeşit için *in vitro* kök oluşumuna ilişkin kalite skorlaması skalası hazırlanmış olup, oluşan köklerin gözlemi bu skalaya göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.6). Hazırlanan kalite skorlamasına göre çeşitlerin aldıkları değerler; Bayrampaşa çeşidi ağırlıklı olarak 4 değerini alırken, Sakız ve Olympus F₁ çeşitleri ise 3 değerini almışlardır.

Çizelge 4.6. *In vitro* oluşan köklerin kalite skorlaması

Kalite Skoru		Kalite Skoru Açıklaması
En Kötü  En İyi	1	Hiç kök oluşumu yok
	2	Oluşan kökler ≤ 1 cm uzunluğunda olup, tek kök oluşturanlar
	3	Oluşan kökler 1 – 5 cm uzunluk aralığında olup, 1-2 tane kök ve az saçak kök oluşturanlar
	4	Oluşan kökler 5 – 9 cm uzunluk aralığında olup, ≥ 2 tane kök ve çok saçak kök oluşturanlar
	5	Oluşan kökler ≥ 9 cm uzunluk aralığında olup, hem sayıca fazla, hem de yoğun saçak kök oluşturanlar



Şekil 4.36. K kodlu köklenme ortamlarında Bayrampaşa bitkiciklerinin kültüre alınması; **a.** K1, **b.** K2, **c.** K3, **d.** K4, **e.** K5, **f.** K6, **g.** K7, **h.** K8, **i.** K9, **j.** K10 (bar = 1 cm)



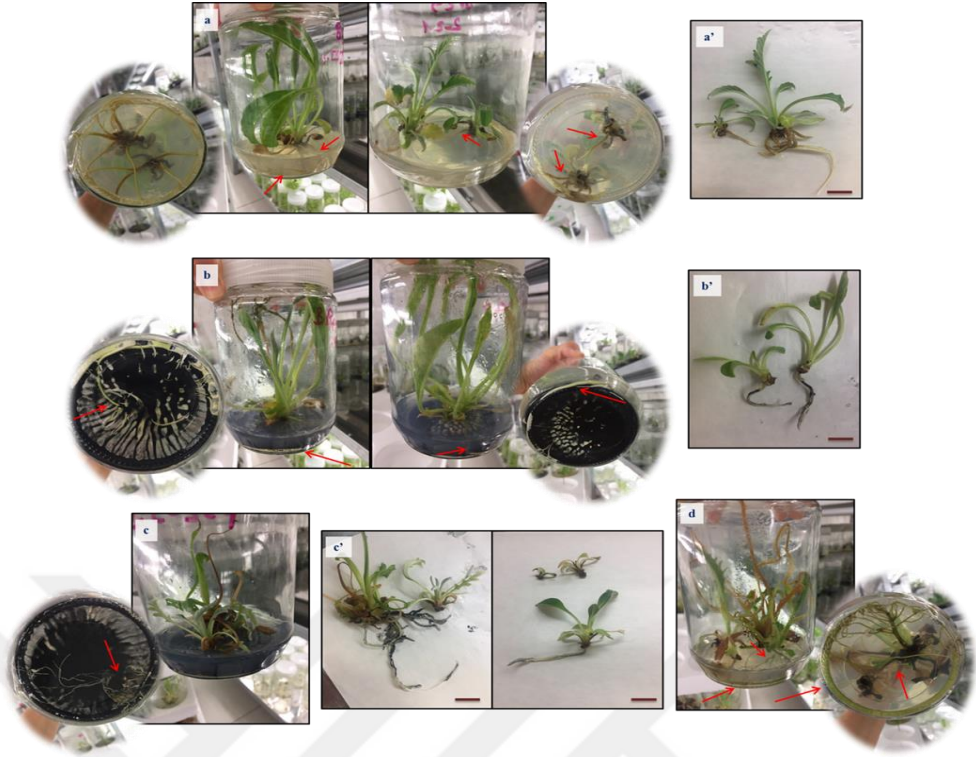
Şekil 4.37. K kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa bitkiciklerinin 1 ay sonraki kavanozlardaki gözlemi; **a.** K1, **b.** K2, **c.** K3, **d.** K4, **e.** K5, **f.** K6, **g.** K7, **h.** K8, **i.** K9, **j.** K10 (bar = 1 cm)



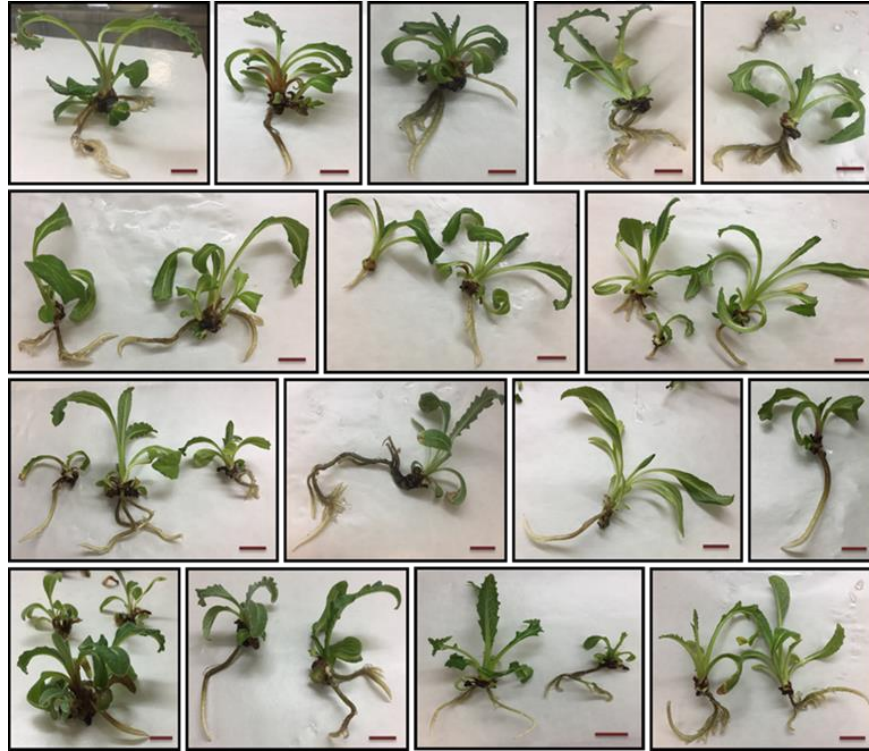
Şekil 4.38. K kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa bitkiciklerinin 1 ay sonraki gözlemi; **a.** K1, **b.** K2, **c.** K3, **d.** K5, **e.** K6, **f.** K7, **g.** K8, **h.** K9 (bar = 1 cm)



Şekil 4.39. K kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan bazı Bayrampaşa bitkiciklerinin 2 ay sonraki gözlemi; **a.** K2, **b.** K3, **c.** K5, **d.** K4 (bar = 1 cm)



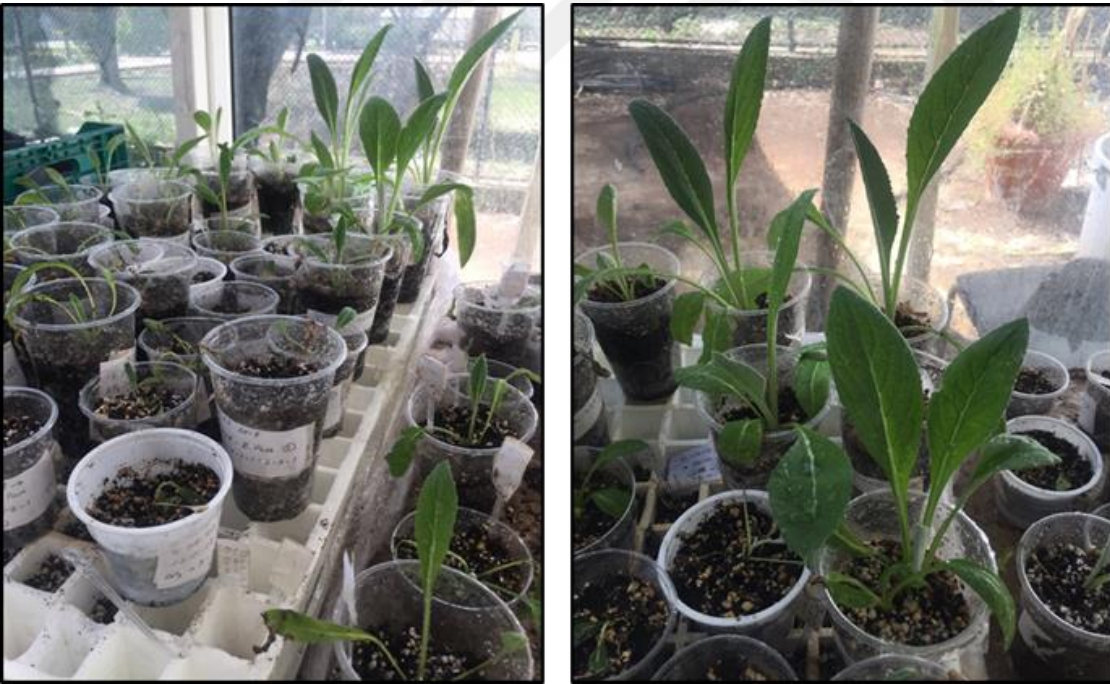
Şekil 4.40. Bayrampaşa bitkiciklerinin bazı K köklenme ortamlarına verdikleri tepkilerin gözlemi; a. ve a'. K1, b. ve b'. K2, c. ve c'. K8, d. K10 (bar =1 cm)



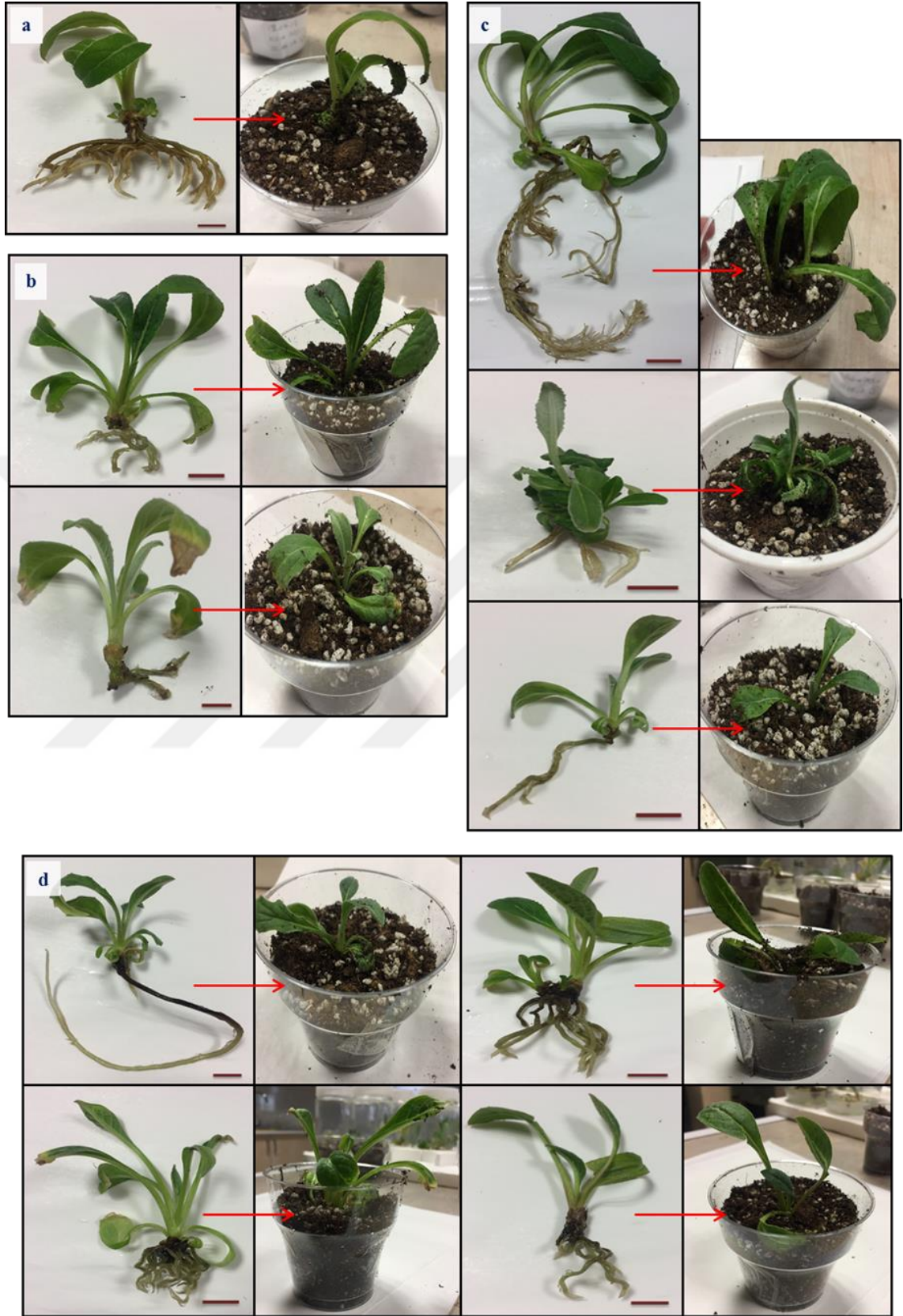
Şekil 4.41. Çoğaltma besi ortamında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarına ait gözlem fotoğrafları (bar =1 cm)



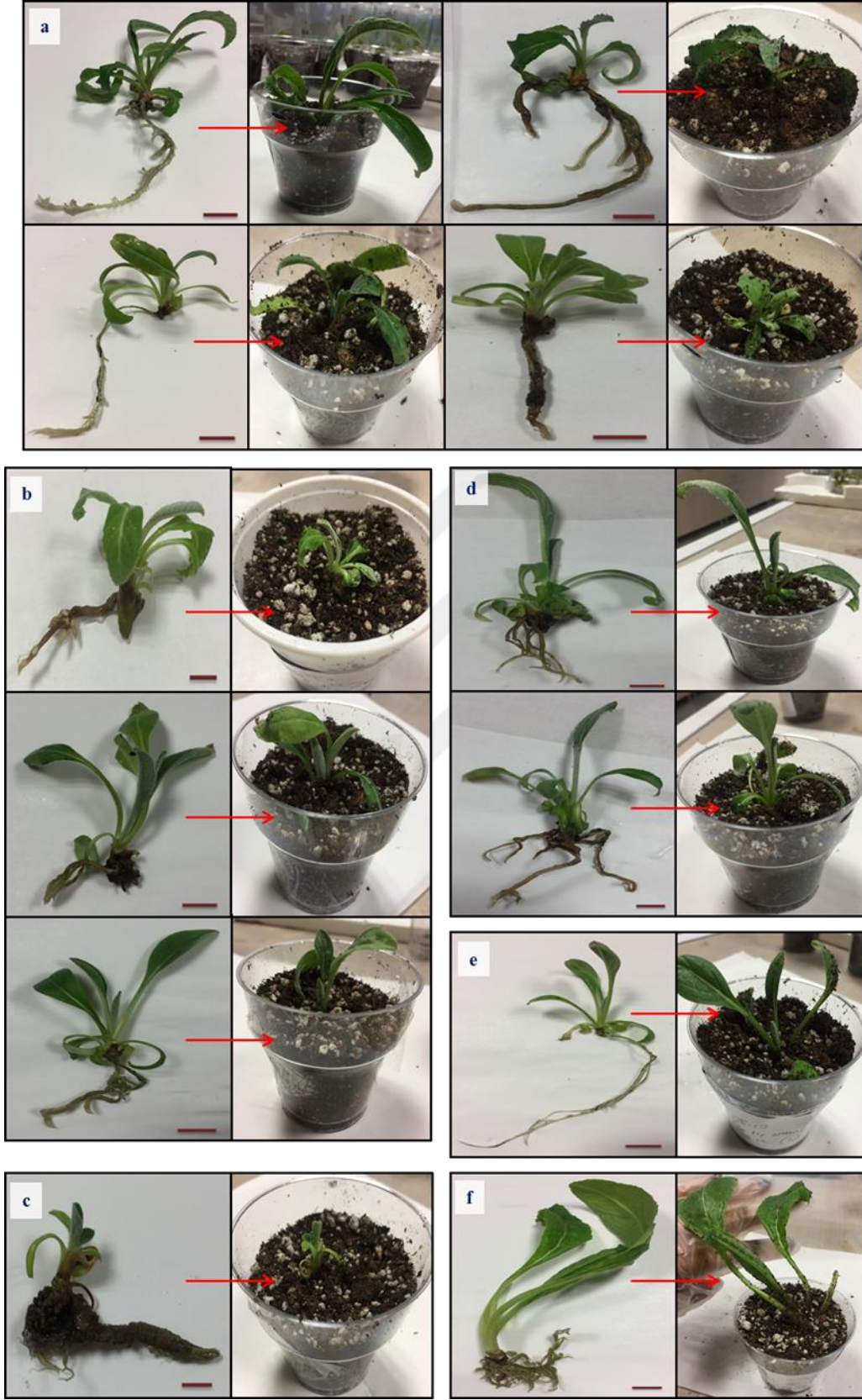
Şekil 4.42. Köklenen bitkiciklerin dış koşullara alıştırmaya aşamasından bir görüntü



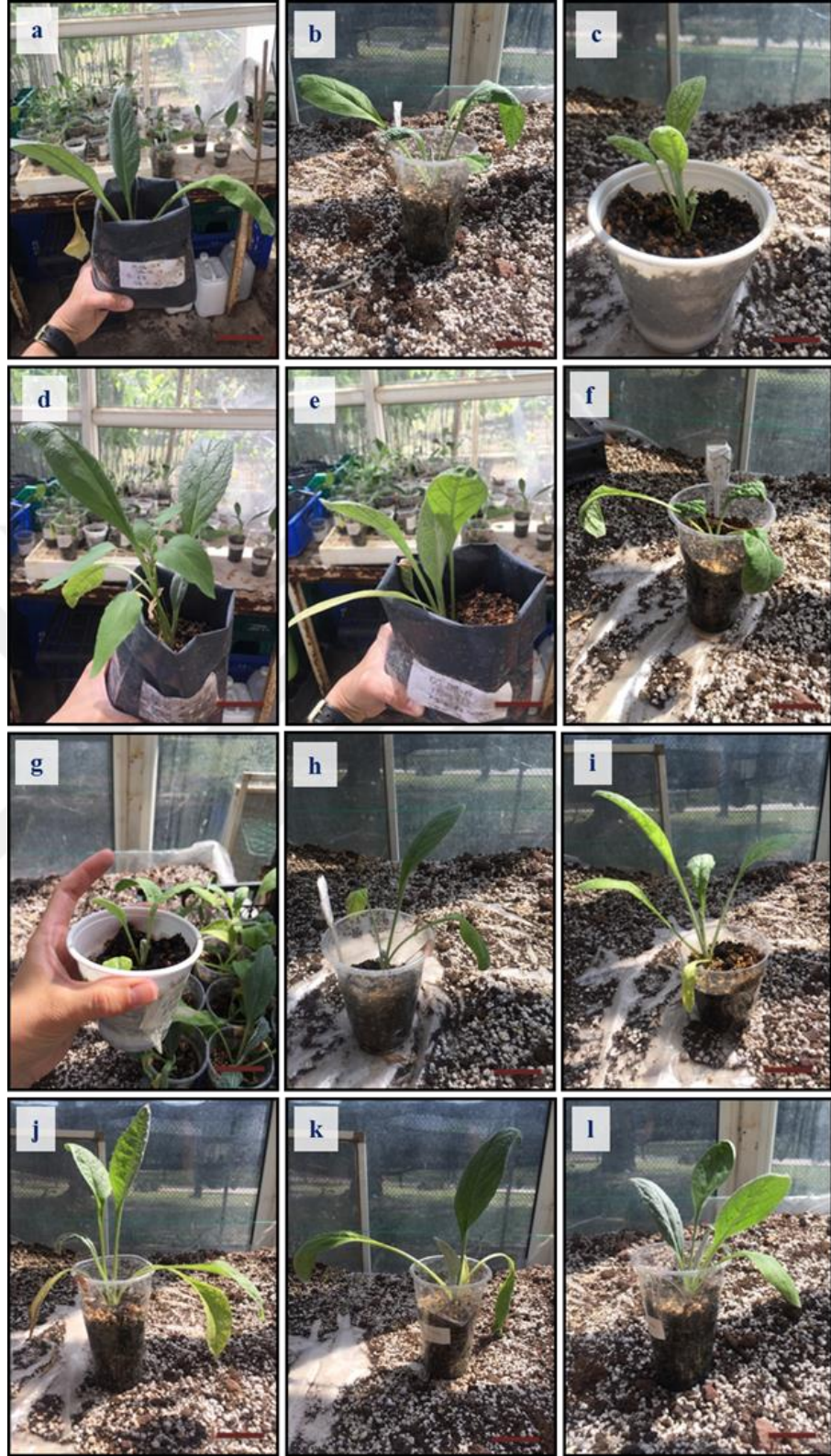
Şekil 4.43. Bayrampaşa çeşidine ait bitkiciklerin sera koşullarında alıştırmaya alınmasına ait gözlem fotoğrafları



Şekil 4.44. Bazı K kodlu köklenme ortamlarında köklenen bitkiciklerin aklimatizasyon aşamasına alınması; **a.** K1, **b.** K2, **c.** K3, **d.** K4 (bar = 1 cm)



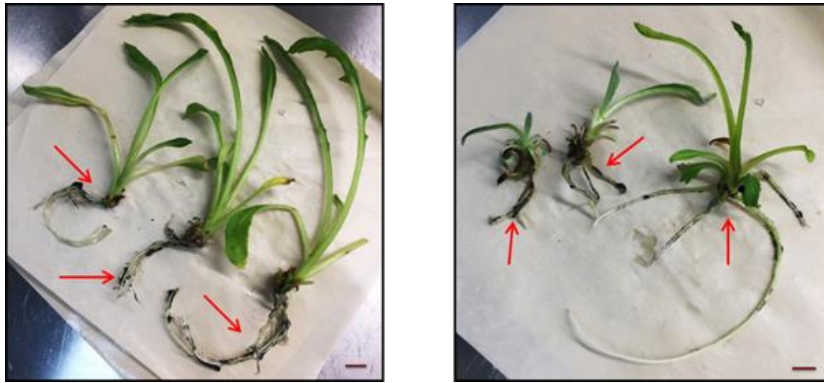
Şekil 4.45. Bazı K kodlu köklenme ortamlarında köklenen bitkiciklerin aklimatizasyon aşamasına alınması; **a.** K5, **b.** K6, **c.** K7, **d.** K8, **e.** K9, **f.** K10 (bar = 1 cm)



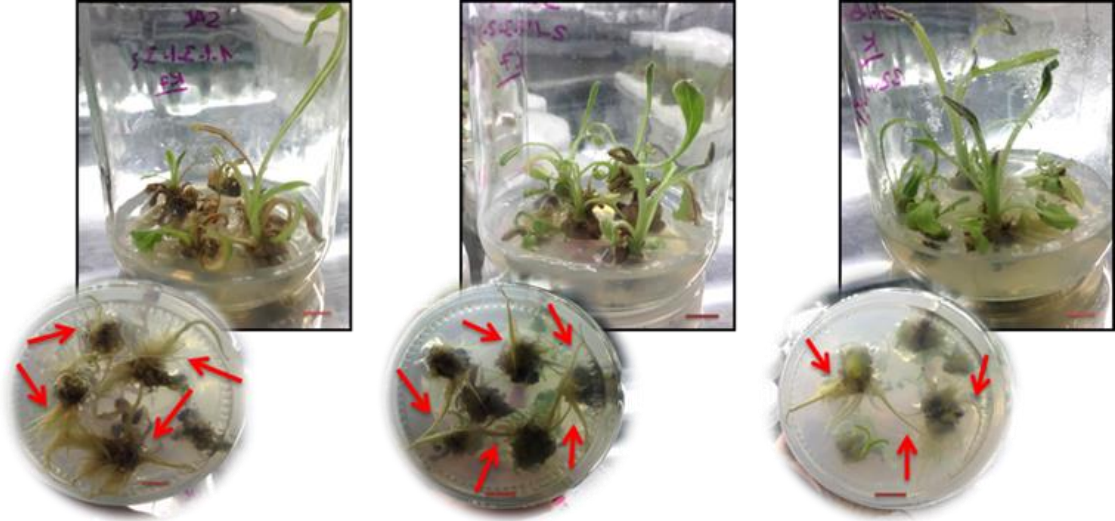
Şekil 4.46. Aklimatizasyon sonrası (süreleri belirtilmiştir) açık araziye dikime hazır Bayrampaşa bitkiciklerinden bir görünüm; **a.** K8 (4 ay), **b.** Çoğaltma ortamı (3 ay), **c.** K3 (3 ay), **d.** K4 (3 ay), **e.** K9 (3 ay), **f.** Çoğaltma ortamı (2 ay), **g.** ve **j.** K10 (2 ay), **h.** Çoğaltma ortamı (1 ay), **i.** K2 (2 ay), **k.** ve **l.** K3 (1 ay) (bar = 1 cm)



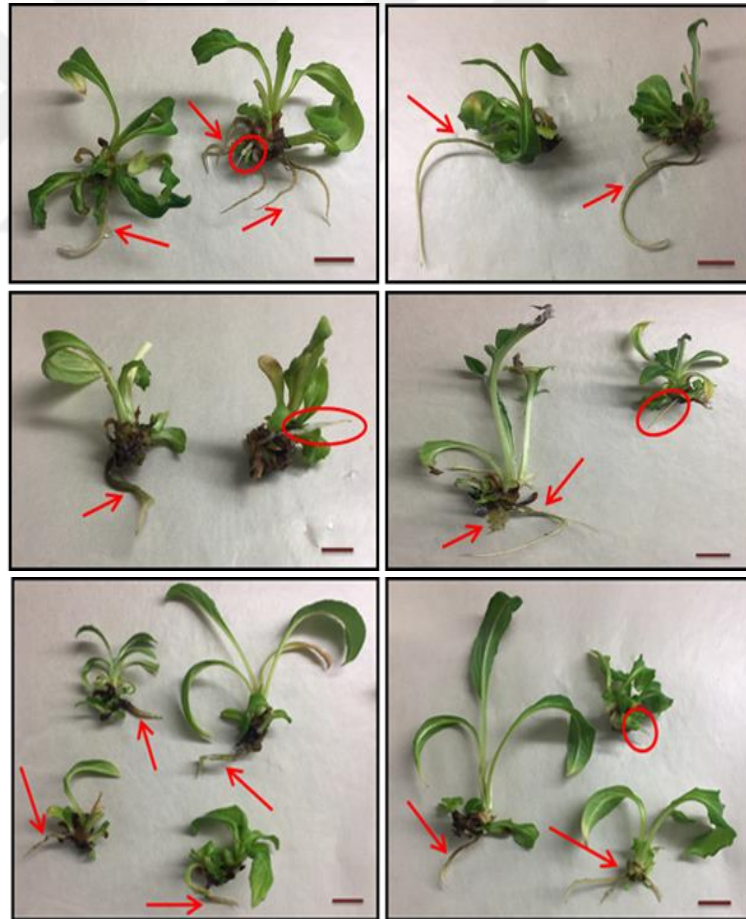
Şekil 4.47. K1 kodlu köklenme ortamında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm)



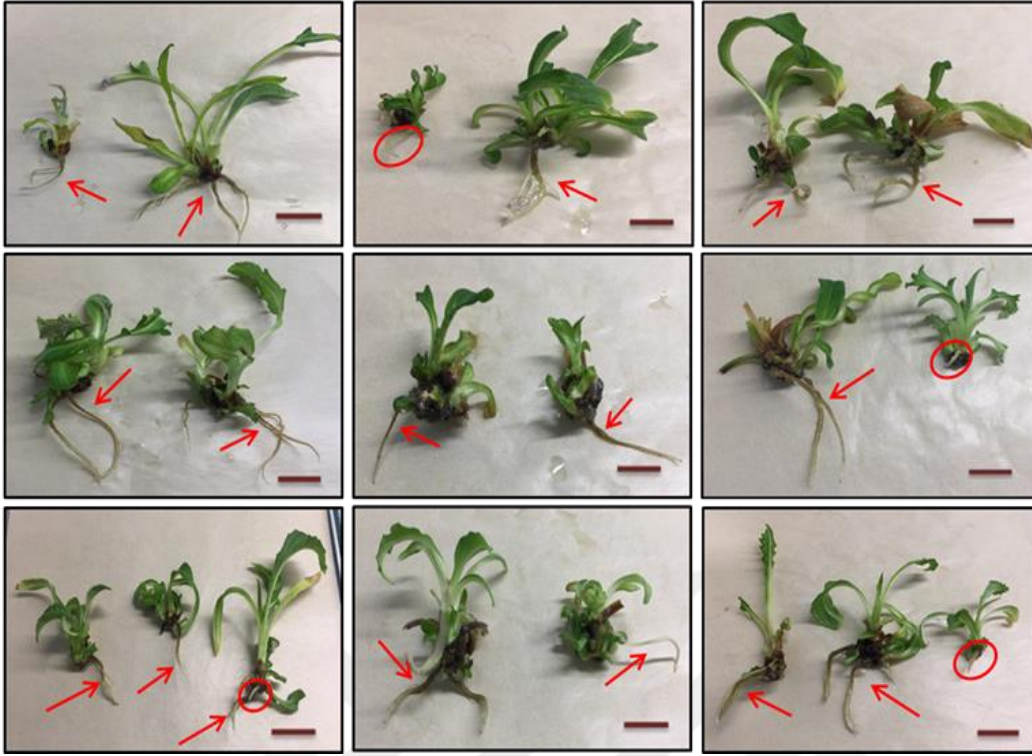
Şekil 4.48. K2 kodlu köklenme ortamında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm)



Şekil 4.49. K7 kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm)



Şekil 4.50. Çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm)



Şekil 4.51. Çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kültüre alınan Sakız çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm)



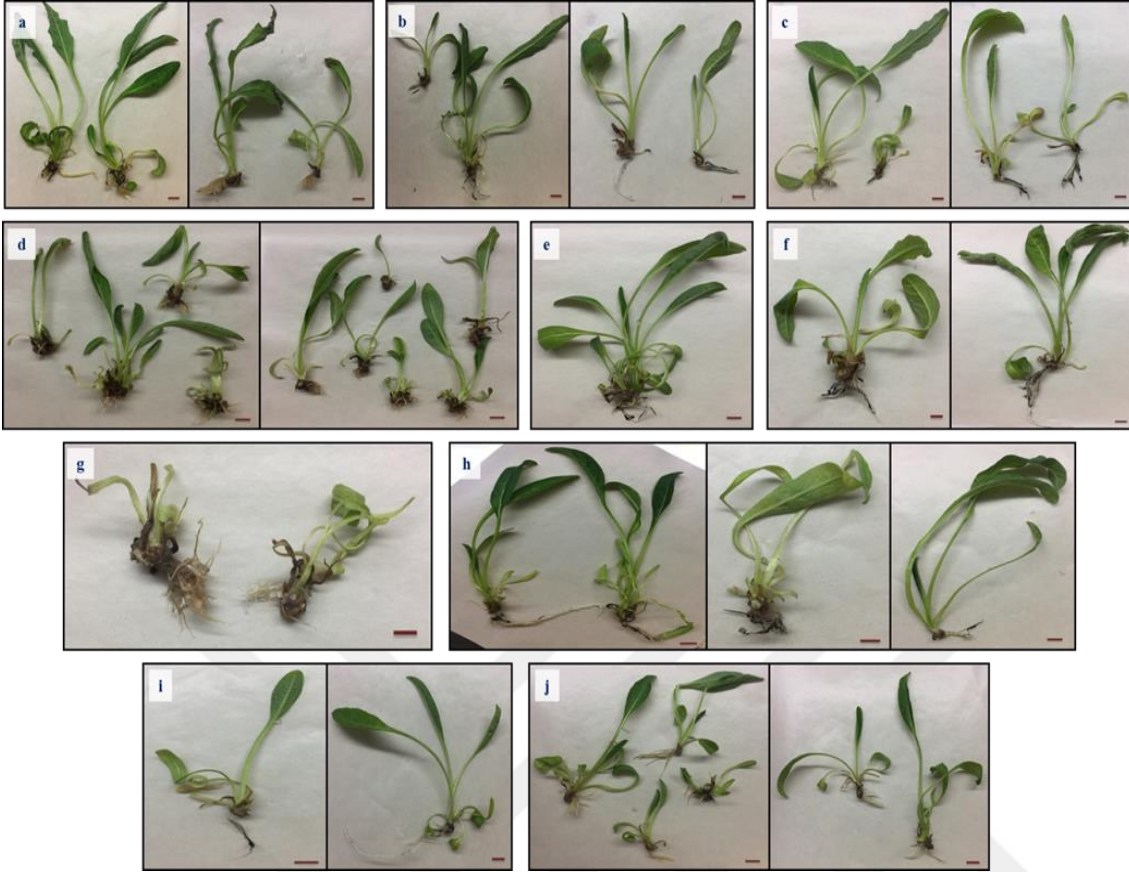
Şekil 4.52. Sakız çeşidine ait K kodlu köklenme ortamlarında köklendirildikten sonra aklimatizasyon amacıyla seraya alınan bitkiciklerden bir görünüm; bitkiciklerin, **a.** 1 ay sonra, **b.** 2 ay sonra gözlemi



Şekil 4.53. K kodlu köklenme ortamında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi; **a.** K3, **b.** K4, **c.** K6, **d.** K10 (bar = 1 cm)



Şekil 4.54. Çoğaltma amacıyla kullanılan besi ortamında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi (bar = 1 cm)



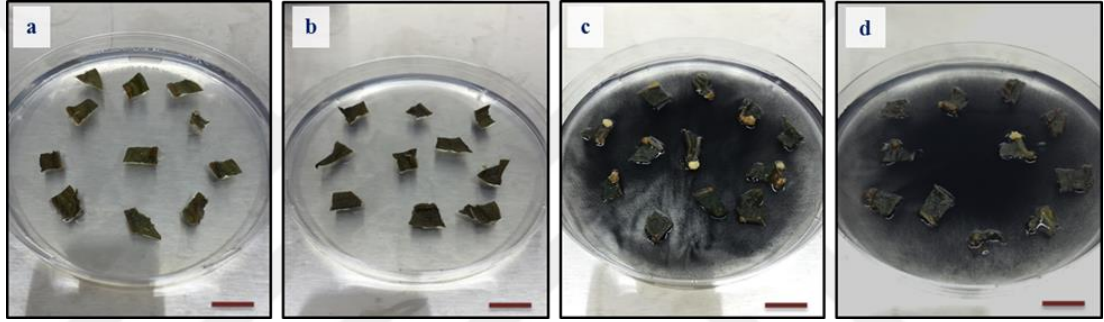
Şekil 4.55. Bazı K kodlu köklenme ortamlarında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait bitkiciklerin köklenme durumlarının gözlemi, **a.** K1, **b.** K2, **c.** K3, **d.** K4, **e.** K5, **f.** K6, **g.** K7, **h.** K8, **i.** K9, **j.** K10 (bar = 1 cm)



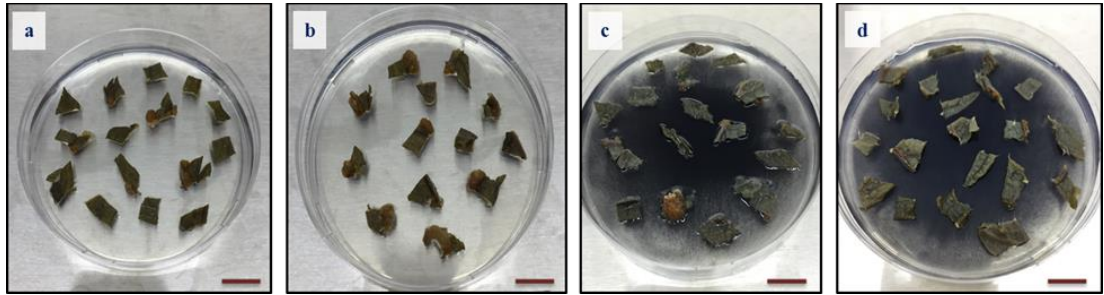
Şekil 4.56. Olympus F₁ çeşidine ait K kodlu köklenme ortamlarında köklendirildikten sonra aklimatizasyon amacıyla seraya alınan bitkiciklerden bir görünüm

4.2.3. Kallus kültürü çalışmasına ait bulgular

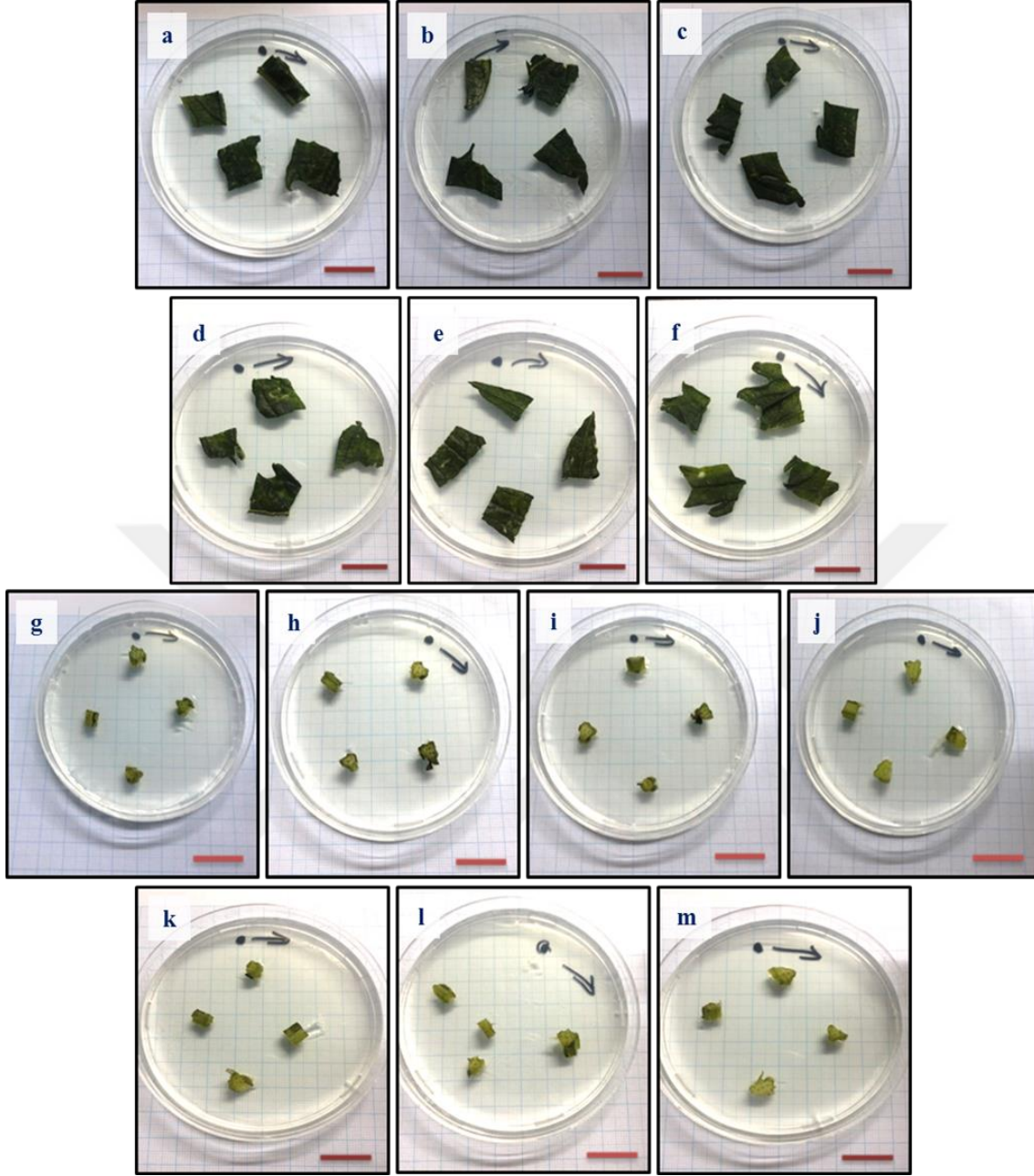
Çalışmada, kallus kültürlerini başlatmak amacıyla çeşitli besi ortamı kombinasyonları denenmiştir. Araştırmanın başlarında temel besi ortamı olarak MS kullanılmış olup, MS ile birlikte farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları ('E', 'C', 'D', 'N' ve 'X' kodlu besi ortamları) denenmiştir. Bu besi ortamı kombinasyonlarından hem tatmin edici sonuçlar elde edilemediği ('E', 'C', 'D' ve 'N' kodlu ortamlar) (Şekil 4.57 ve Şekil 4.58) hem de arzu edilen eksplantlarda (yapraklarda) değil, denemeye alınan diğer eksplantta (yaprak ana damarı) az miktarda kallus elde edildiğinden dolayı ('X' kodlu ortamlar) (Şekil 4.59 ve Şekil 4.60), temel besi ortamının farklılaştırılması düşünülmüş ve Gamborg B5 kullanılarak besi ortamı kombinasyonları ('B' ve 'T' kodlu besi ortamları) denenmeye devam edilmiştir. Bu besi ortamlarında ise yaprak eksplantlarında kallus eldesi sağlandığından ötürü çalışmalara bu iki farklı kodlama altında toplanan besi ortamı kombinasyonları ile devam edilmiştir.



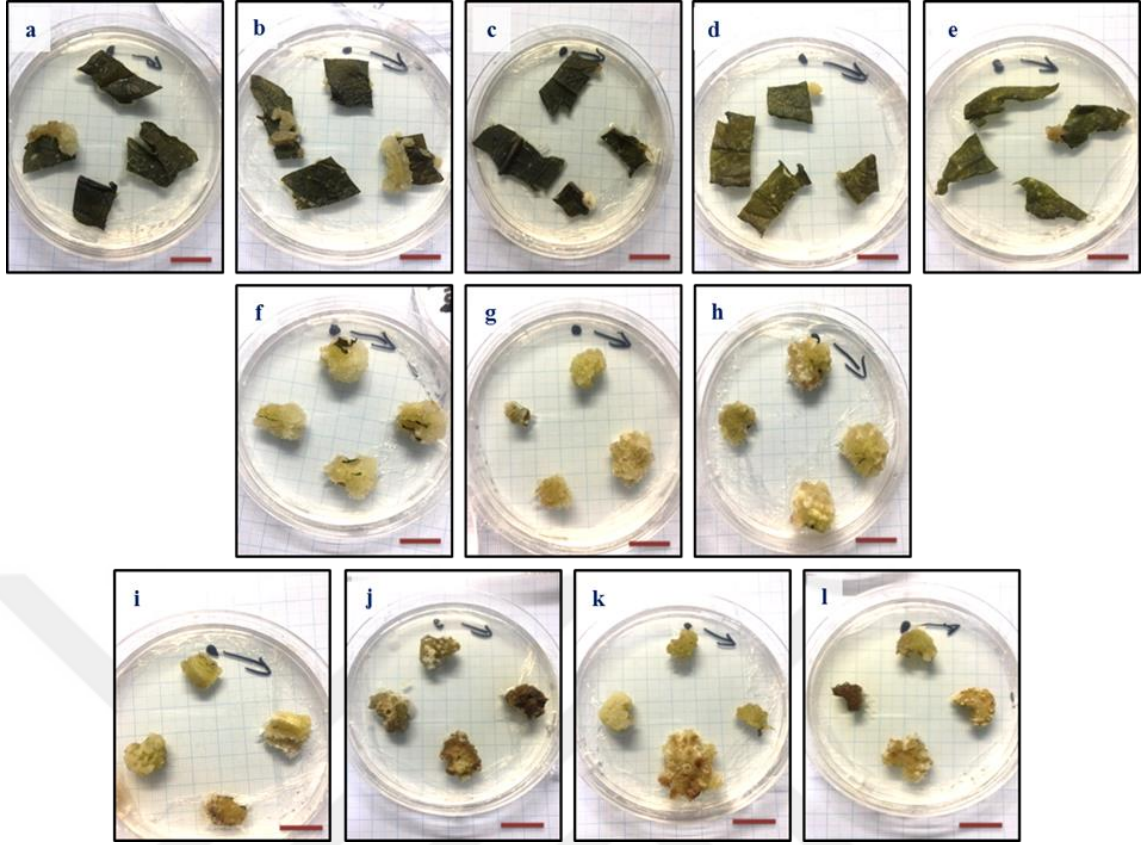
Şekil 4.57. D kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait yaprak eksplantlarının 1. alt kültür sonunda gözlemi; **a.** D1, **b.** D2, **c.** D3, **d.** D4 (bar = 1 cm)



Şekil 4.58. N kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait yaprak eksplantlarının 1. alt kültür sonunda gözlemi; **a.** N1, **b.** N2, **c.** N3, **d.** N4 (bar = 1 cm)



Şekil 4.59. Sakız çeşidine ait yaprak ve yaprak ana damarı eksplantlarının bazı X kodlu farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamlarında kallus elde edilmesi amacıyla kültüre alınması, **a.** X4, **b.** X10, **c.** X11, **d.** X14, **e.** X15, **f.** X16 (a – f yaprak eksplantı), **g.** X10, **h.** X11, **i.** X12, **j.** X13, **k.** X14, **l.** X15, **m.** X16 (g – m yaprak ana damarı eksplantı) (bar = 1 cm)



Şekil 4.60. Sakız çeşidine ait yaprak ve yaprak ana damarı eksplantlarının bazı X kodlu farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamlarında kallus elde edilmesi amacıyla kültüre alınmasını takiben gösterdikleri gelişmelerin gözlemi, **a.** X21, **b.** X23, **c.** X27, **d.** X30, **e.** X32, (a – e yaprak eksplanti), **f.** X21, **g.** X26, **h.** X27, **i.** X28, **j.** X29, **k.** X30, **l.** X32, (f – l yaprak ana damarı eksplanti) (bar = 1 cm)

Çalışmada kallus elde etmek amacıyla *in vivo* genç enginar yaprakları, hazırlanan 'B' kodlu besi ortamlarında 3 tekerrürlü olarak kültüre alınmıştır. Öncelikle kültüre alınan yaprak eksplantları şişmeye başlamış ardından kallus oluşumları gözlemlenmiştir. Çalışmanın kallus kültürü aşamasından elde edilen bulgular ışığında besi ortamlarına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumunda ve sürdürülmesindeki rolünün oldukça önemli olduğu söylenebilir. Buna göre elde edilen veriler incelendiğinde, üç çeşit arasında hem alt kültürler bazında hem de besi ortamları arasında, kültüre alınan yaprak eksplantlarının gelişme durumları bakımından farklılıklar olduğu görülmektedir.

Kültüre alınan yapraklarda Bayrampaşa çeşidinden elde edilen verilere bakıldığında 1. alt kültür sonunda gelişen yaprak oranlarında dalgalanmalar görüldüğü, en iyi yaprak gelişiminin ise B7 besi ortamında olduğu söylenebilir. Benzer şekilde 2. ve 3. alt kültür sonlarında da yine B7 ortamının yaprak gelişimindeki etkisi sürerken, ilk iki alt kültür süresince etkisi az olan B10 ortamında kültüre alınan yapraklarda 3. alt kültürde yaprak gelişim oranında artış gözlemlenmiştir. Bu durumda Bayrampaşa çeşidinin kültüre alınan yaprak eksplantlarındaki gelişimde kontrol ortamında etkili bir gelişimin görülmediği, 6 mg L^{-1} 2,4-D + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ kinetin (B7) kombinasyonu ile 5 mg L^{-1} BAP + 5 mg L^{-1} NAA (B10) etkili olduğu söylenebilir (Çizelge 4.7, Şekil 4.61a).

Sakız çeşidinde de benzer durum gözlemlenmiştir. Bazı besi ortamlarında alt kültür sayısı arttıkça yaprak gelişim oranlarında azalmalar görülmekte olup, bu azalma oranları kimi ortamlarda az (B3, B4) kimi ortamlarda ise keskin bir şekilde (B5, B7, B9) gerçekleşmiştir. Elde edilen veriler ışığında yaprak eksplantı gelişim oranı bakımından Bayrampaşa çeşidinde olduğu gibi kontrol ortamı en etkisiz ortam olarak belirlenmiştir. En etkili besi ortamları ise 1. alt kültür sonunda $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + 5 mg L^{-1} NAA (B9), 2. alt kültür sonunda 1 mg L^{-1} BAP + 7 mg L^{-1} NAA (B8) ve 3. alt kültürün sonunda ise 5 mg L^{-1} BAP + 5 mg L^{-1} NAA (B10) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.61b). Olympus F₁ çeşidine baktığımızda ise, yaprak gelişim oranlarında yine diğer iki çeşit gibi alt kültürler ve besi ortamları arasında dalgalanmalar görülmektedir. 1. alt kültür sonunda kültüre alınan yapraklarda $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + 1 mg L^{-1} 2,4-D + 1 g L^{-1} glutamin (B6) ortamı en etkili bulunurken, 2. alt kültürde 5 mg L^{-1} BAP + 5 mg L^{-1} NAA (B10), 3. alt kültürde ise 2 mg L^{-1} BAP + 2 mg L^{-1} 2,4-D (B4) ve $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + 5 mg L^{-1} NAA (B9) etkili olmuştur (Çizelge 4.9, Şekil 4.61c).

Bayrampaşa çeşidinde alt kültürler bazında yaprak gelişim oranı ile kallus oluşum oranı arasındaki ilişki incelendiğinde 1. alt kültür sonunda B6 ortamında yaprak gelişiminin düşük olduğu ve yine aynı alt kültürün sonunda aynı besi ortamında kallus oluşum oranının en düşük olduğunun tespit edilmesi şaşırtıcı bir sonuç olmamıştır. Kallus oluşum oranlarında alt kültürler bazında ve ortamlar arasında yine bir dalgalanma söz konusudur. En yüksek kallus oluşum oranı bu alt kültürde B9 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ NAA) ortamında görülmüştür. Oluşan kalluslar açık kahverengi renk ve yumuşak tekstürde oluşum göstermiştir. 2. alt kültürde B6 ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ g L}^{-1}$ glutamin) besi ortamında gelişen yaprak oranının diğer ortamlara göre nispeten düşük olduğu görülmekle birlikte kallus oluşum oranına bakıldığında B3 ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D) ortamı ile birlikte en yüksek kallus oluşumu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.62a). Bununla birlikte 2. alt kültürde oluşan kallusların ortalama ağırlıkları incelendiğinde en fazla ağırlığa sahip kallusların B6 ortamından geldiği söylenebilir (Çizelge 4.7). 3. alt kültür sonunda yine bir farklılaşma olmuş, B7, B8 ve B10 ortamlarında gelişen kallus oranlarında artışlar görülmüştür. Bu üç besi ortamında gelişen kallusların oranları aynı olmakla birlikte, oluşan kallusların ağırlıkları bakımından incelendiğinde B10 ortamındaki kallusların ağırlıkları diğerlerine göre oldukça yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.7, Şekil 4.63a, Şekil 4.64 – Şekil 4.66).

Sakız çeşidinde de kallus oluşumu bakımından alt kültürler ve ortamlar bazında farklılıklar gözlemlenmiş, 2. ve 3. alt kültürlerin sonlarında elde edilen değerler 1. alt kültür sonundan elde edilenlere kıyasla nispeten daha yüksek bulunmuştur. Buna göre en yüksek değerler 2. ve 3. alt kültür sonunda B10, 1. alt kültür sonunda ise B3 ortamında elde edilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.62b). Elde edilen kallusların tekstürleri hafif sert olarak belirlenmiş olup bu iki ortam arasında farklılık görülmezken, renklerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Buna göre B3 ortamında meydana gelen kalluslar sarımsı, açık kahverengi özellik gösterirken, B10 ortamında oluşanların ise krem rengi oldukları gözlemlenmiştir. Oluşan kallusların oluşum oranları ile ağırlıkları besi ortamları ile alt kültürler bazında incelendiğinde tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, 1. alt kültür sonunda B10, B3 ve B6 ortamlarında, 2. alt kültür sonunda B10 ortamında ve 3. alt kültürün sonunda ise B6, B8 ve B10 ortamlarında meydana gelen

kallusların ağırlıkları diğerlerine göre nispeten daha fazla olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.63b, Şekil 4.67 – Şekil 4.69).

Olympus F₁ çeşidinde elde edilen kallus oranlarına bakıldığında, yine ortamlar ve alt kültürler arasında dalgalanmalar görülmekle birlikte besi ortamlarında gözlemlenen yaprak gelişim oranları ile tutarlı etkileşimler olduğu tespit edilmiştir. Buna göre 1. alt kültür sonunda B6 ve B10 ortamlarında, 2. alt kültür sonunda B1, B3, B4, B9 ve B10 ortamlarında, 3. alt kültür sonunda ise B1, B3, B4 ve B9 ortamlarında yüksek kallus oluşum oranları elde edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.62c). Bununla birlikte oluşum gösteren kallusların ağırlıkları alt kültürler ve besi ortamları bazında incelendiğinde, 1. alt kültür sonunda kallus oluşum oranlarının en yüksek bulunduğu B6 ve B10 ortamlarında değil, B9 ortamında elde edilen kallusların ağırlık bakımından daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde 2. alt kültürde de benzer bir kıyaslama yapılabilmekle birlikte, B1, B3, B4, B10 ortamlarında değil, B8 ve B9 ortamlarında oluşan kallusların ağırlıkları daha fazla olmuştur. 3. alt kültürde ise oluşum oranı ile ağırlık kıyaslaması benzer doğrultuda gerçekleşmiş, B9 ortamında meydana gelen kallus ağırlıkları en iyi olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.63c, Şekil 4.70 – Şekil 4.72).

Çizelge 4.7. Bayrampaşa çeşidinde *in vivo* (dış koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri

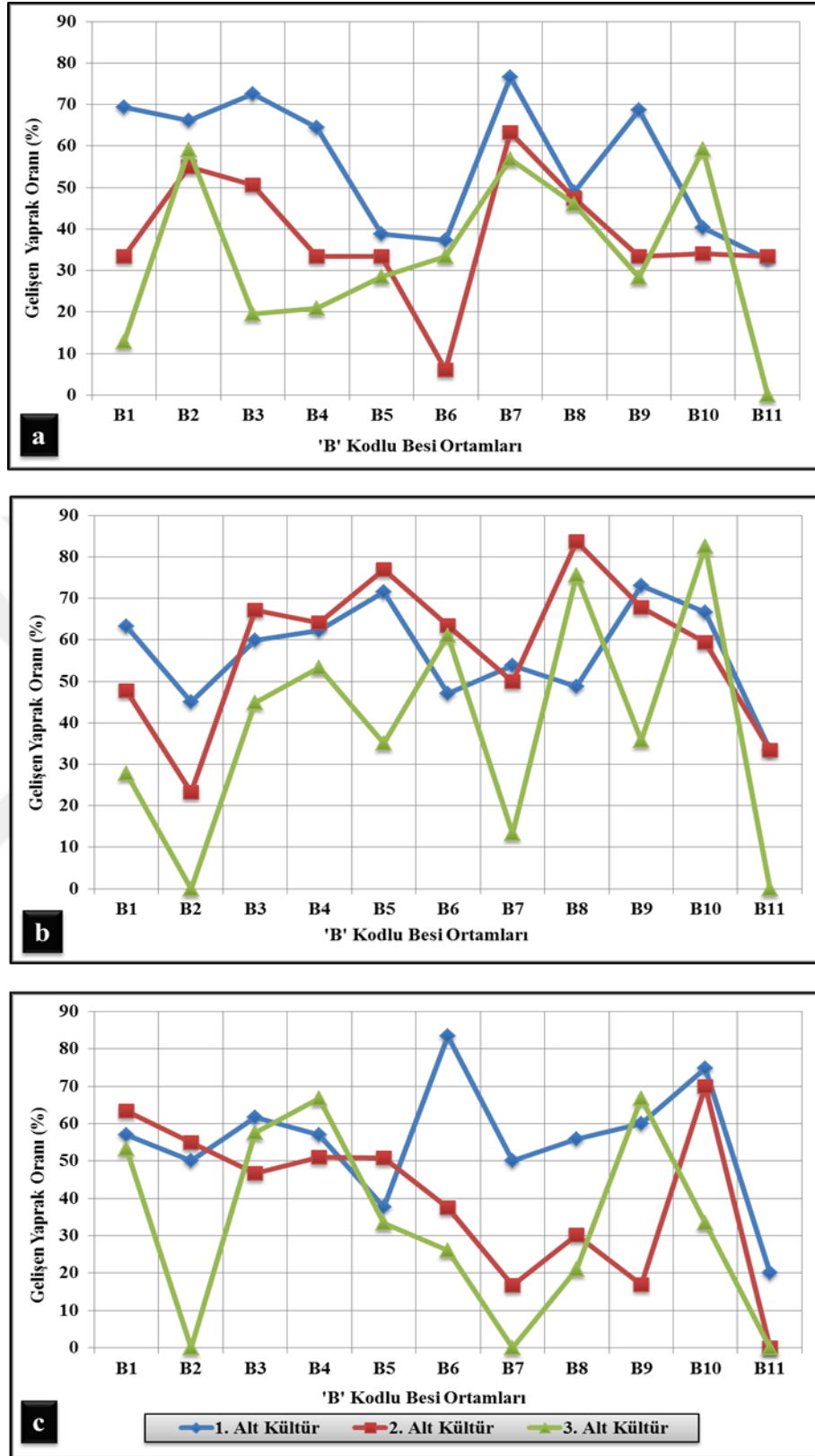
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu											
			B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Bayrampaşa	Gelişen yaprak oranı (%)	1	69,44	66,11	72,50	64,44	38,75	37,33	76,66	48,88	68,61	40,27	32,77	
		2	33,33	55,00	50,66	33,33	33,33	6,02	63,33	47,44	33,33	34,00	33,33	
		3	12,77	59,04	19,54	20,85	28,46	33,33	56,89	46,03	28,38	59,15	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	27,77	34,69	49,69	34,49	25,73	0	28,20	10,77	63,66	27,33	0	
		2	18,33	38,46	66,66	32,55	16,95	66,66	47,43	52,38	30,47	55,55	0	
		3	33,33	45,72	32,95	33,33	32,98	33,33	66,66	66,66	32,88	66,66	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,03	0,02	0,07	0,04	0,02	0	0,05	0,05	0,06	0,05	0	
		2	0,03	0,04	0,07	0,04	0,04	0,48	0,18	0,34	0,07	0,39	0	
		3	0,09	0,11	0,09	0,05	0,15	0,55	0,24	0,35	0,11	1,29	0	
	Oluşan kallusların rengi			Krem	Açık kahverengi	Krem, hafif gri-yeşil	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Krem	-
	Oluşan kallusların tekstürü			Hafif sert	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif sert	Hafif sert	Yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif sert	Yumuşak	Hafif sert	-

Çizelge 4.8. Sakız çeşidinde *in vivo* (dış koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri

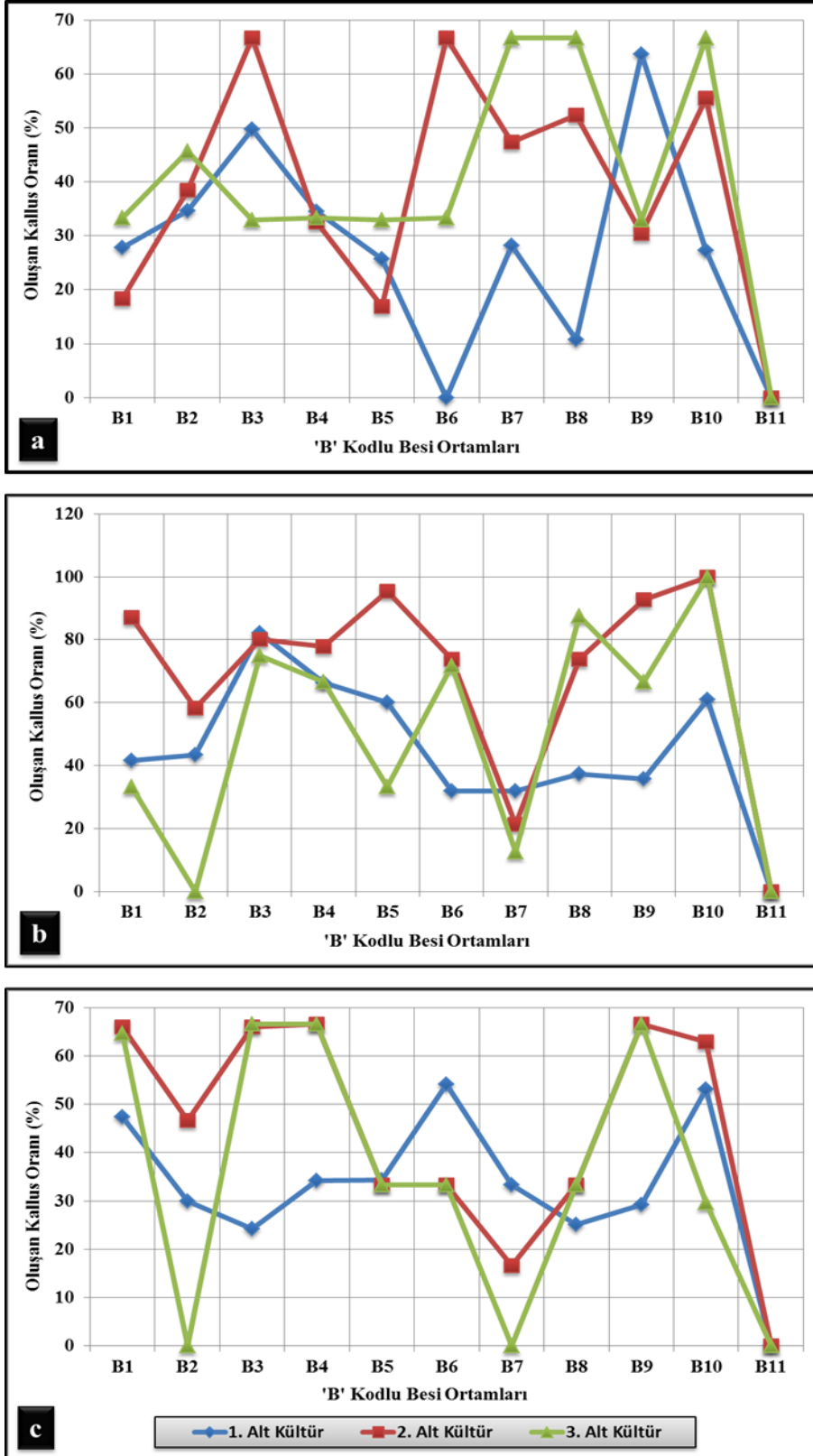
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu											
			B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Sakız	Gelişen yaprak oranı (%)	1	63,33	45,00	59,83	62,33	71,50	47,08	53,75	48,75	73,12	66,66	33,33	
		2	47,68	23,33	67,22	64,04	76,95	63,47	50,00	83,63	67,77	59,47	33,33	
		3	27,77	0	44,92	53,33	35,00	61,10	13,33	75,67	35,71	82,50	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	41,66	43,33	82,06	66,27	59,95	31,94	31,85	37,27	35,71	60,95	0	
		2	87,16	58,33	80,00	77,85	95,37	73,75	21,38	73,71	92,70	100,00	0	
		3	33,33	0	75,00	66,66	33,33	71,66	12,50	87,50	66,66	100,00	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,03	0,02	0,07	0,05	0,04	0,06	0,03	0,03	0,04	0,09	0	
		2	0,09	0,03	0,11	0,06	0,08	0,09	0,04	0,10	0,16	0,33	0	
		3	0,09	0	0,19	0,20	0,13	0,46	0,04	0,57	0,19	0,59	0	
	Oluşan kallusların rengi			Sarımsı açık kahverengi	Sarımsı açık kahverengi	Sarımsı açık kahverengi	Kremsi açık kahverengi	Kremsi açık kahverengi	Kremsi açık kahverengi	Kremsi hafif sarı	Açık kahverengi	Kremsi açık kahverengi	Krem	.
	Oluşan kallusların tekstürü			Hafif yumuşak	Hafif sert	Hafif sert	Hafif sert	Hafif sert	Hafif sert	Hafif sert	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif sert	.

Çizelge 4.9. Olympus F₁ çeşidinde *in vivo* (dış koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri

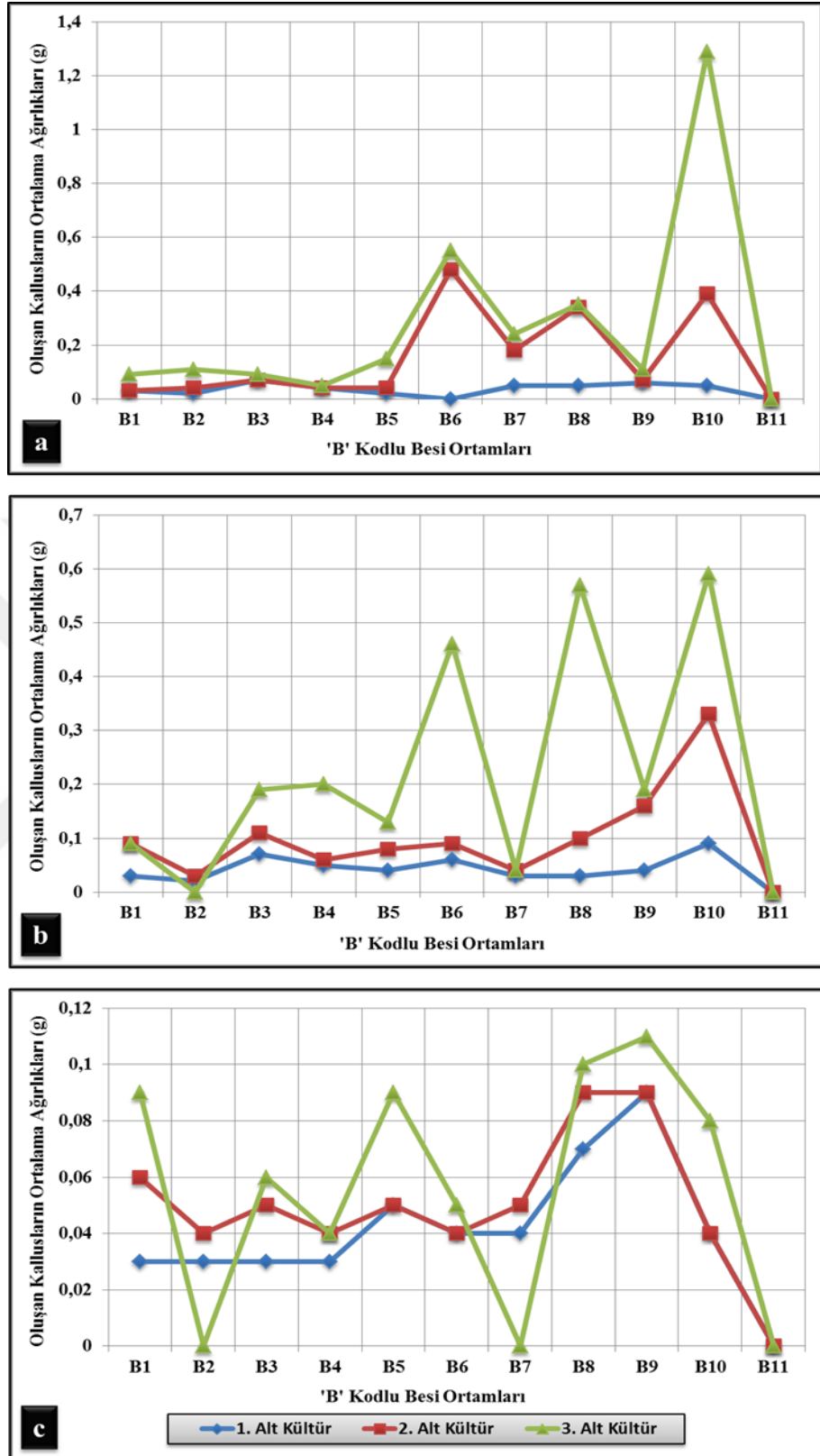
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu											
			B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Olympus F ₁	Gelişen yaprak oranı (%)	1	57,08	50,00	61,66	57,08	37,77	83,33	50,00	55,83	60,00	74,72	20,00	
		2	63,33	55,00	46,66	51,05	50,83	37,50	16,66	30,12	16,90	70,00	0	
		3	53,21	0	57,51	66,66	33,33	26,14	0	21,05	66,66	33,33	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	47,45	30,00	24,31	34,21	34,40	54,16	33,33	25,12	29,28	53,14	0	
		2	66,08	46,66	66,01	66,66	33,33	33,33	16,66	33,33	66,66	62,96	0	
		3	64,70	0	66,66	66,66	33,33	33,33	0	33,33	66,66	29,62	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,03	0,03	0,03	0,03	0,05	0,04	0,04	0,07	0,09	0,04	0	
		2	0,06	0,04	0,05	0,04	0,05	0,04	0,05	0,09	0,09	0,04	0	
		3	0,09	0	0,06	0,04	0,09	0,05	0	0,10	0,11	0,08	0	
	Oluşan kallusların rengi			Sarımsı açık kahverengi	Kahverengi	Açık kahverengi, hafif krem	Açık kahverengi	Kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	-
	Oluşan kallusların tekstürü			Hafif sert	Sert	Hafif yumuşak	Hafif sert	Sert	Sert	Hafif sert	Hafif sert	Hafif sert	Hafif sert	-



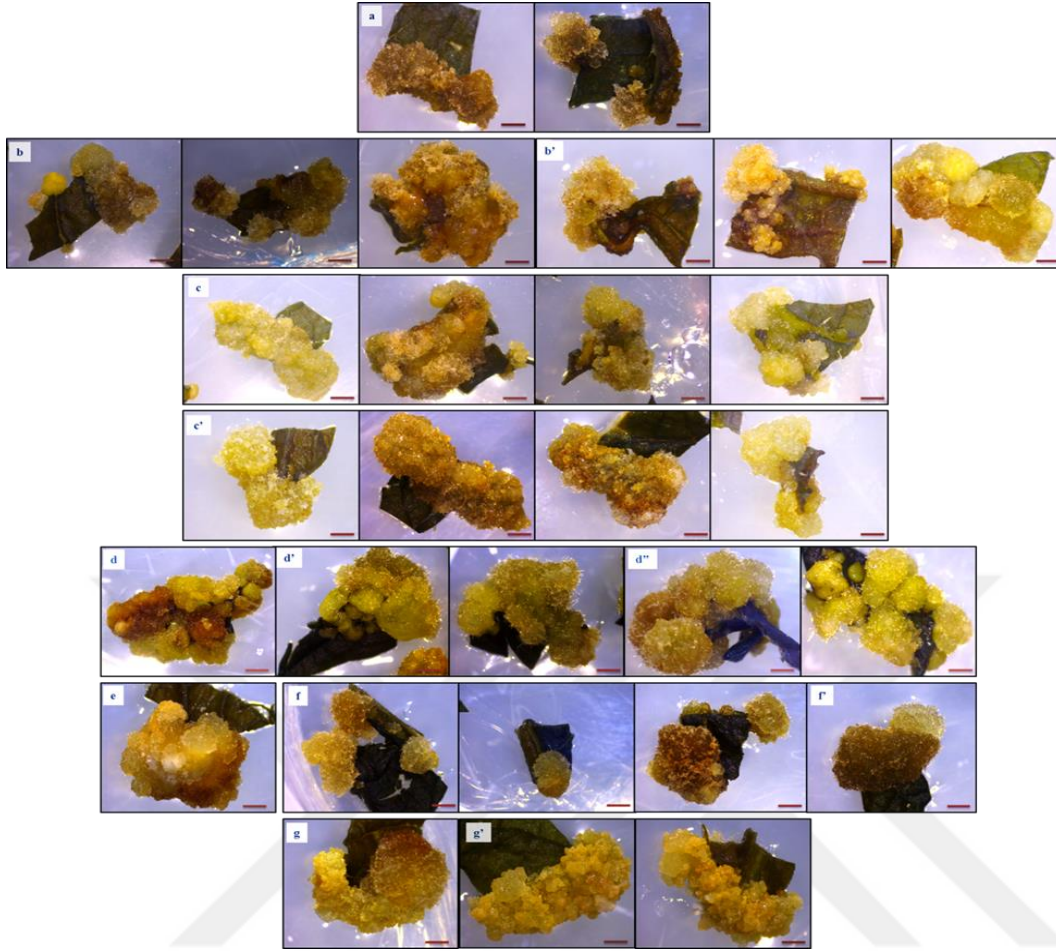
Şekil 4.61. Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda gelişen yaprak eksplantlarının oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁



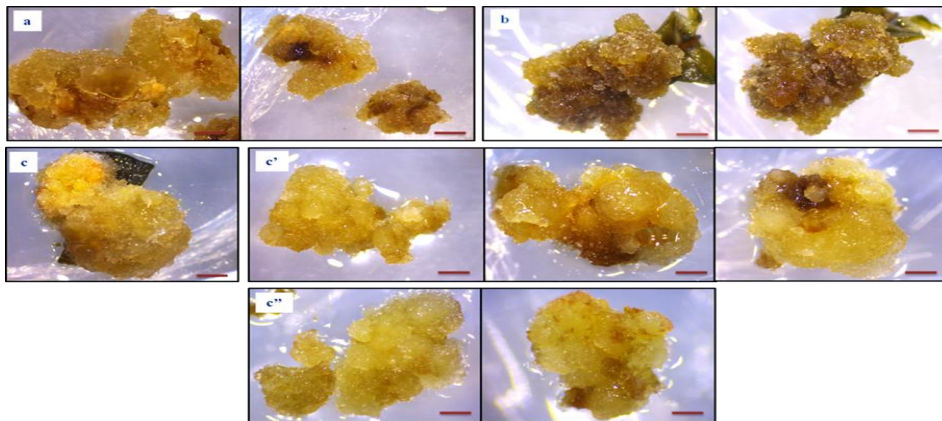
Şekil 4.62. Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallus oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁



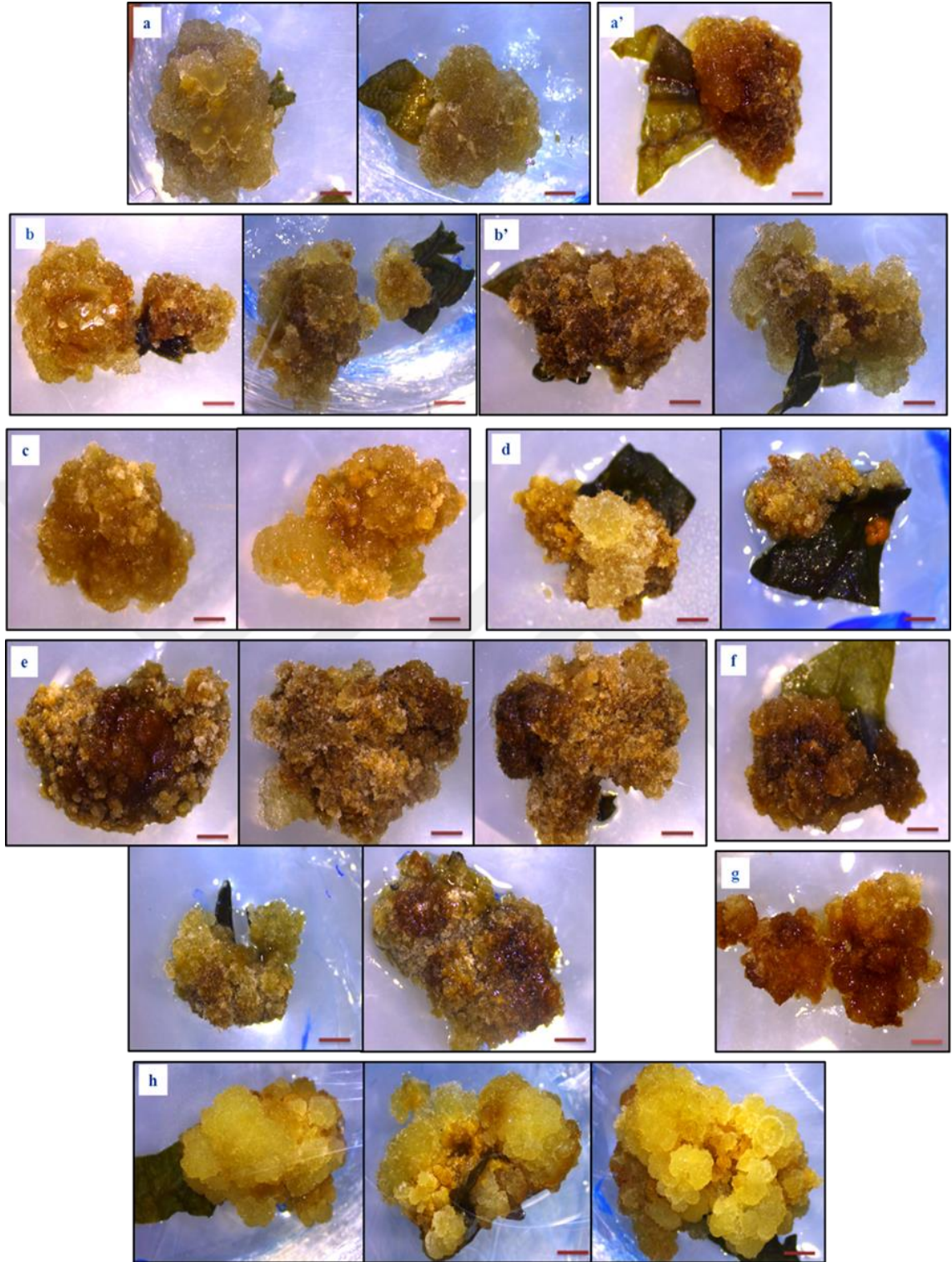
Şekil 4.63. Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallusların ortalama ağırlıkları (g); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁



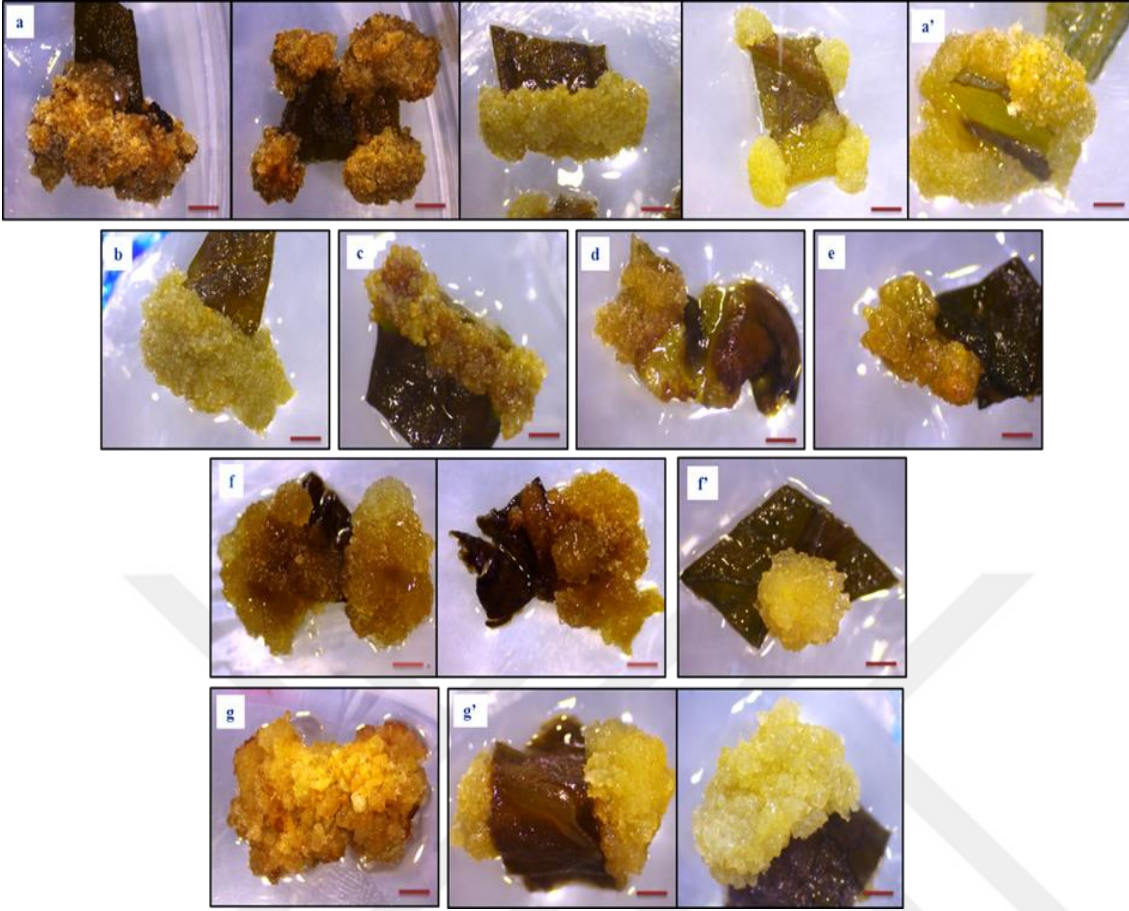
Şekil 4.64. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** B2 (1.0x), **b.** B3 (0.8x), **b'**. B3 (1.0x), **c.** B4 (0.8x), **c'**. B4 (1.0x), **d.** B5 (0.63x), **d'**. B5 (1.0x), **d''**. B5 (1.25x), **e.** B8 (1.0x), **f.** B9 (0.8x), **f'**. B9 (1.0x), **g.** B10 (0.8x), **g'**. B10 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



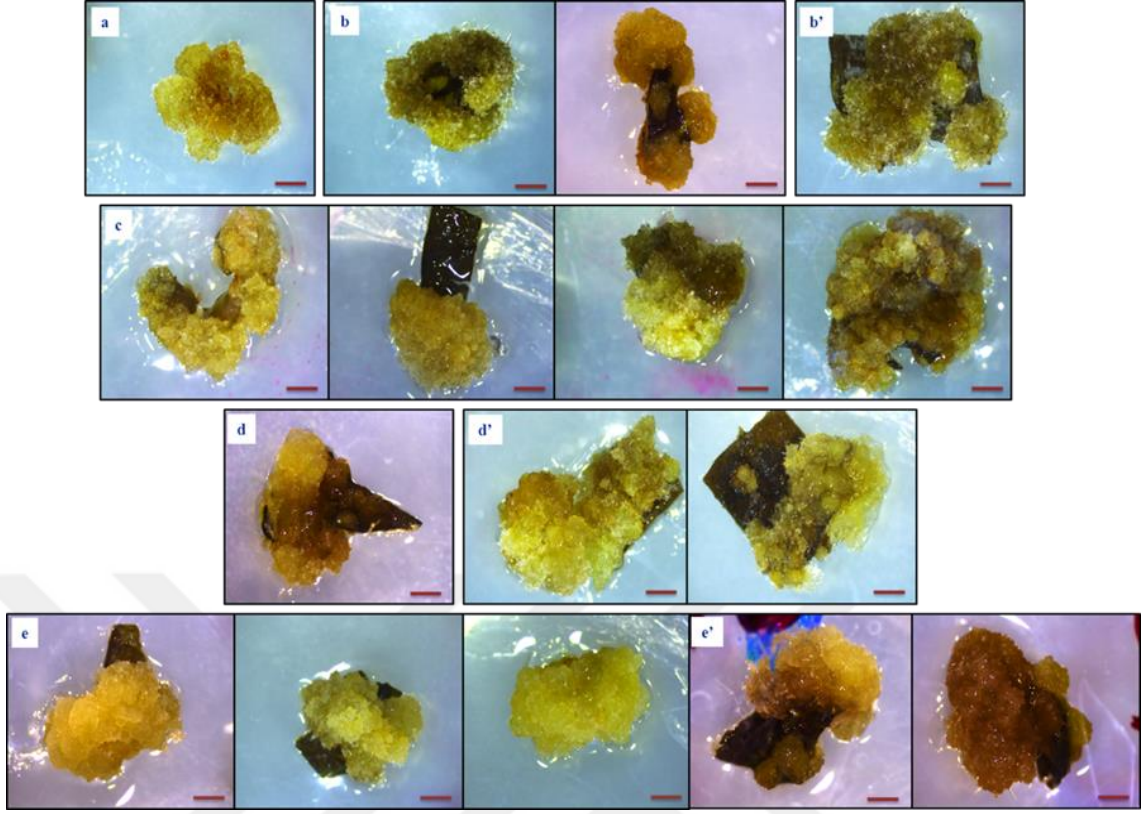
Şekil 4.65. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (2. alt kültür sonu); **a.** B3 (0.63x), **b.** B7 (1.0x), **c.** B9 (0.8x), **c'**. B9 (1.0x), **c''**. B9 (1.5x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



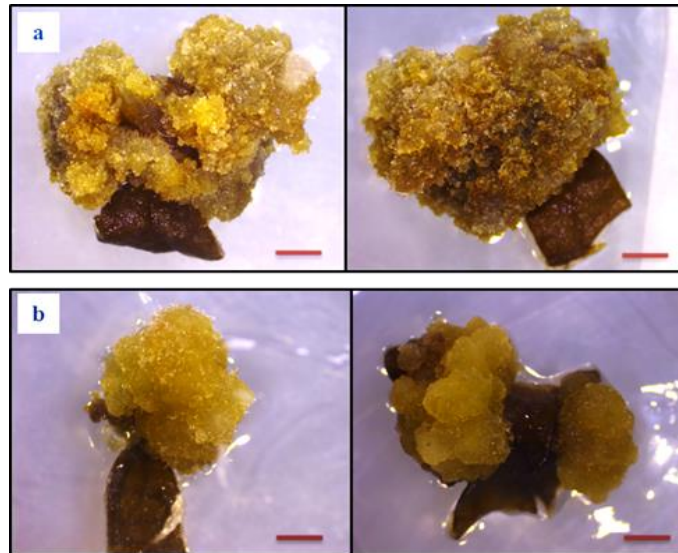
Şekil 4.66. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (3. alt kültür sonu); **a.** B1 (0.63x), **a'.** B1 (1.0x), **b.** B2 (0.63x), **b'.** B2 (0.8x), **c.** B3 (0.8x), **d.** B4 (1.0x), **e.** B5 (0.63x), **f.** B7 (1.0x), **g.** B9 (0.63x), **h.** B10 (0.63x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



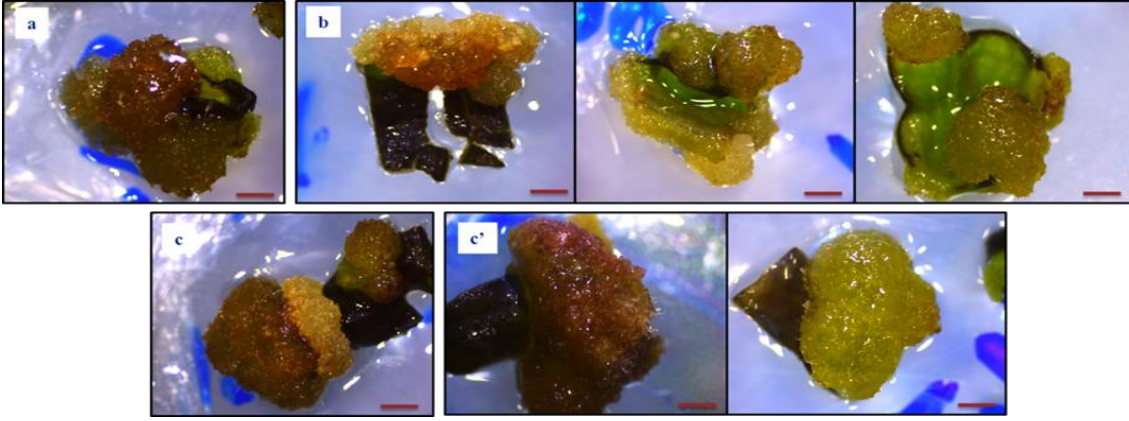
Şekil 4.67. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** B3 (0.8x), **a'.** B3 (1.0x), **b.** B4 (1.0x), **c.** B5 (1.5x), **d.** B6 (1.0x), **e.** B7 (1.5x), **f.** B8 (1.0x), **f'.** B8 (1.25x), **g.** B10 (0.63x), **g'.** B10 (1.25x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



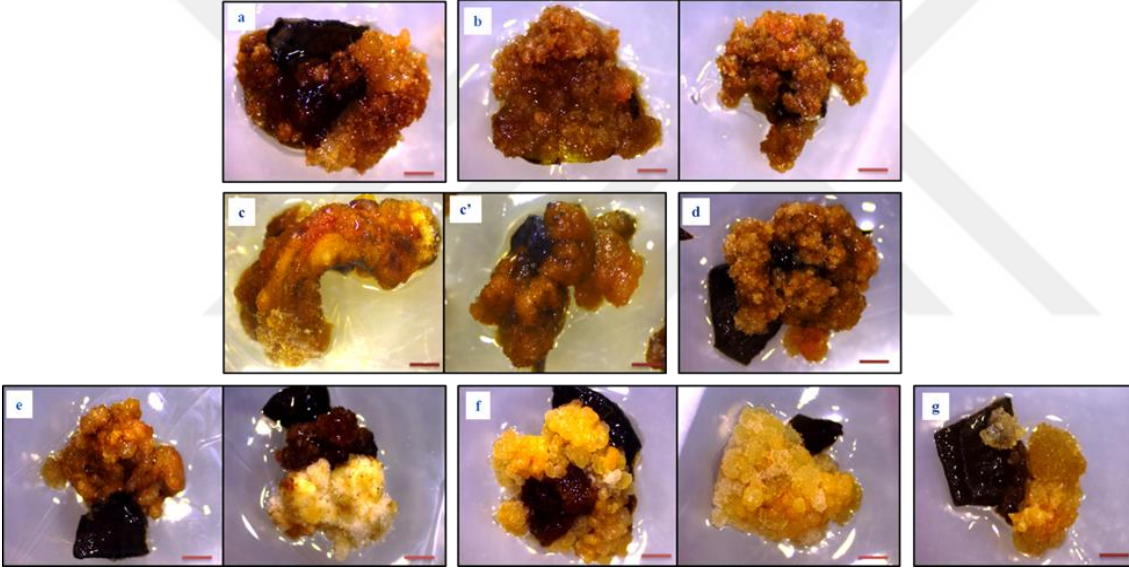
Şekil 4.68. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (2. alt kültür sonu); **a.** B1(0.8x), **b.** B3 (0.8x), **b'.** B3 (1.0x), **c.** B8 (0.8x), **d.** B9 (0.8x), **d'.** B9 (1.0x), **e.** B10 (0.8x), **e'.** B10 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



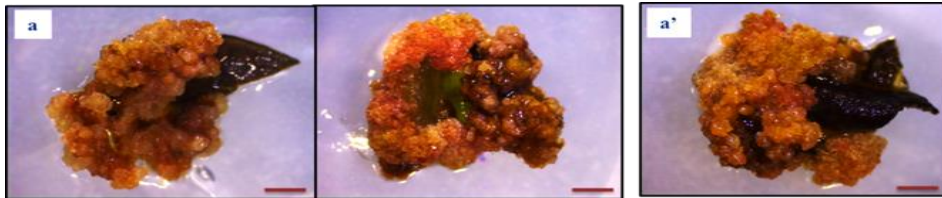
Şekil 4.69. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (3. alt kültür sonu); **a.** B3 (0.8x), **b.** B10 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



Şekil 4.70. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** B1 (1.0x), **b.** B3 (1.0x), **c.** B4 (1.0x), **c'.** B4 (1.25x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



Şekil 4.71. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (2. alt kültür sonu); **a.** B1 (1.0x), **b.** B4 (1.0x), **c.** B5 (0.8x), **c'.** B5 (1.0x), **d.** B6 (1.0x), **e.** B8 (0.8x), **f.** B9 (0.8x), **g.** B10 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



Şekil 4.72. B3 kodlu kallus ortamında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (3. alt kültür sonu); **a.** 0.8x, **a'.** 1.0x (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)

Kallus elde edilmesi amacıyla yine ‘B’ kodlu besi ortamları kullanılarak yürütülen bir diğer araştırma ise *in vitro* bitkilerden alınan yaprak eksplantlarıyla olmuştur. Çalışmanın bir önceki basamağı olan *in vitro* çoğaltım ve *in vitro* köklenme araştırmalarını takiben, başarılı bir *in vitro* çoğaltma sürecini geçirdikten sonra aklimatizasyon aşamasında sağlıklı bir şekilde yaşamlarını devam ettirebilen bitkicikler açık alan koşullarına aktarılmışlardır. Ardından açık alan koşullarında yaşamlarını idame ettirebilen bitkiciklerden de tıpkı *in vivo* gelişen bitkilerden alındığı gibi yaprak örnekleri alınarak *in vitro* koşullarda kallus elde edilmesine yönelik çalışılmıştır.

İki tekerrürlü gerçekleştirilen bu çalışmada, Bayrampaşa çeşidinde 1. ve 2. alt kültürler arasında gelişen yaprak oranları bakımından dalgalanmalar gözlemlenmiştir. Buna göre 1. alt kültürde en yüksek yaprak gelişim oranı B1 ortamında, en kötü gelişim oranları ise B10 ve kontrol ortamlarında görülmüştür. 2. alt kültürde ise B3 ve B6 ortamlarında en iyi gelişmeler gözlemlenirken, yine B10 ve kontrol ortamlarında en olumsuz gelişimler görülmüştür (Çizelge 4.10, Şekil 4.73a).

Sakız ve Olympus F₁ çeşitlerinin yaprak gelişim değerleri incelendiğinde ise benzer sonuçlar meydana geldiğini söylemek mümkündür. 1. alt kültürlerde B10 ortamından elde edilen verilerin en yüksek olduğu belirlenirken, 2. alt kültürde her iki çeşit için de besi ortamlarından olumlu sonuçlar elde edilememiştir (Çizelge 4.11, Çizelge 4.12).

Çeşitlerin kallus oluşum değerleri incelendiğinde, yine Bayrampaşa çeşidinde diğerlerine nazaran daha fazla hareketlenme olduğu göze çarparken, Sakız ve Olympus F₁ çeşitlerinin ise hiç kallus oluşturmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.10 – Çizelge 4.12). Bayrampaşa çeşidi için 1. alt kültürde en düşük değerler B5, B10 ve kontrol ortamlarında tespit edilirken, diğer ortamlarda elde edilen kallus oranları aynı seviyede seyretmiştir. 2. alt kültürde ise B7 ve B9 ortamları ön plana çıkarken, en kötü tepki veren ortamlar 1. alt kültürdekilerle aynı olmuştur (Şekil 4.74, Şekil 4.76). Oluşan kallusların ortalama ağırlıkları değerlendirildiğinde, B3 ortamındaki kalluslar en yüksek ağırlığa sahipken, bunu B4 ve B9 ortamları takip etmiştir (Şekil 4.75).

Genel olarak *in vivo* yaprak eksplantlarının ‘B’ ortamlarında kültüre alınmasını takiben incelenen parametreler bakımından elde edilen bulgular 1. alt kültür sonunda her üç çeşit için de en düşük seviyelerde bulunmuştur. Bu durumun, dış koşullardan alınan yaprak eksplantlarının *in vitro* koşullara aktarıldıktan sonra belirli bir adaptasyon sürecine ihtiyaç duymalarından kaynaklanabileceği öngörülmektedir. Belirli bir süre sonunda *in vitro* ortam koşullarına uyum sağlayan eksplantların, kültürün ilerleyen zamanlarında besi ortamı kombinasyonlarının da desteği ile istenilen tepkileri ortaya koyabildiği düşünülmektedir. Çalışmanın hem *in vivo* hem de *in vitro* yaprak eksplantlarının kullanıldığı denemelerden elde edilen bulgulara bakıldığında değerlendirilmeye alınan bu üç çeşidin kallus gelişimi bakımından en ideal verdiği tepkilerin genellikle çeşitli ve nispeten yüksek oranlarda kombinasyon oluşturulan BAP + NAA ortamlarında elde edildiği kanaatine varılmıştır. Bu kombinasyonlar arasından 5 mg L⁻¹ BAP + 5 mg L⁻¹ NAA (B10) ile 0,5 mg L⁻¹ BAP + 5 mg L⁻¹ NAA (B9) besi ortamlarından her üç çeşitten de olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Bayrampaşa çeşidinde *in vitro* (*in vitro* koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri

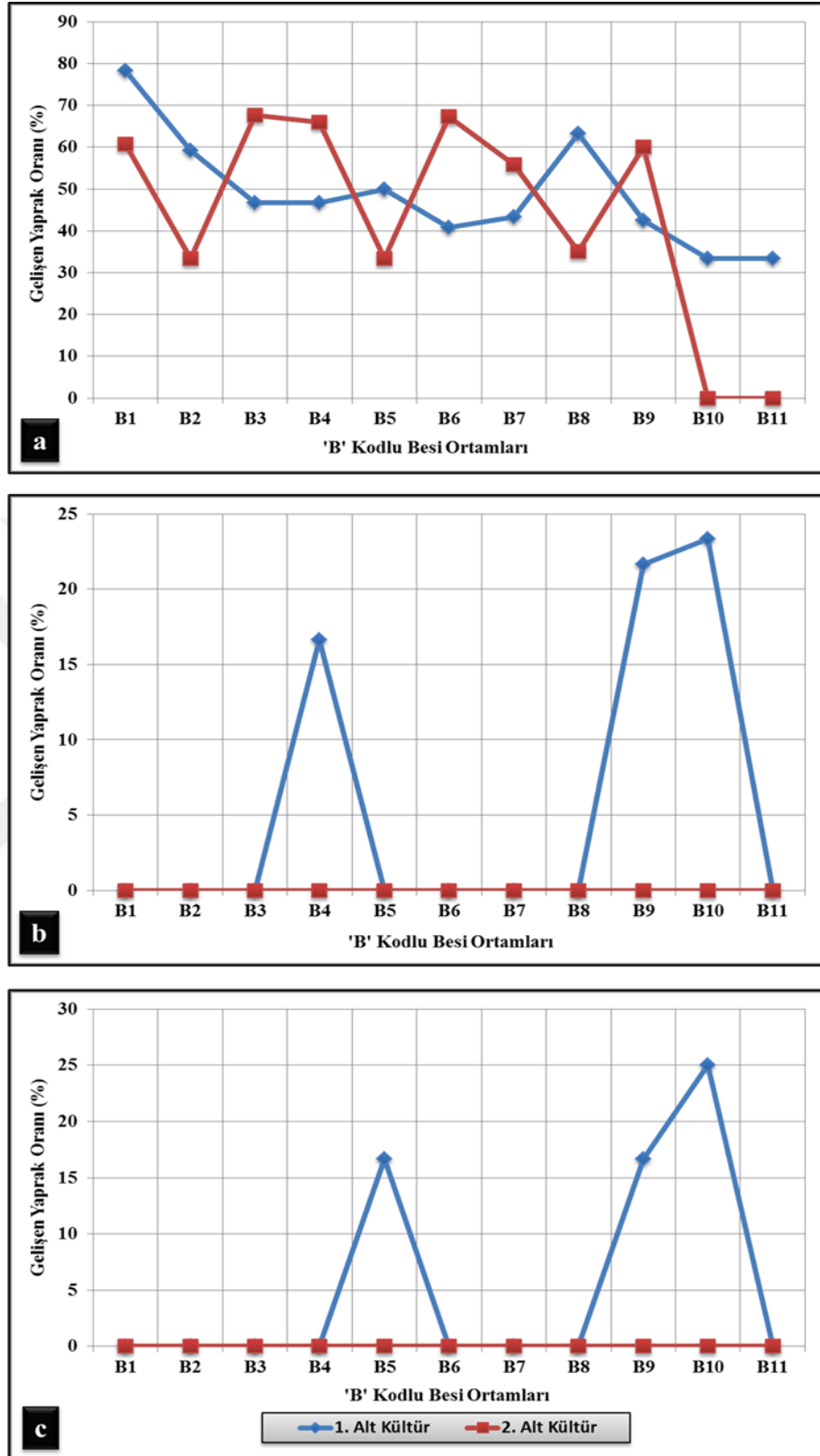
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu											
			B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Bayrampaşa	Gelişen yaprak oranı (%)	1	78,33	59,16	46,66	46,66	50,00	40,83	43,33	63,33	42,50	33,33	33,33	
		2	60,66	33,33	67,73	66,00	33,33	67,29	55,83	35,00	60,00	0	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	33,33	33,33	33,33	33,33	0	33,33	33,33	33,33	33,33	0	0	
		2	33,33	33,33	39,04	53,84	0	58,91	75,71	54,54	77,08	0	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,13	0,09	0,17	0,03	0	0,13	0,15	0,09	0,15	0	0	
		2	0,21	0,10	0,38	0,25	0	0,18	0,20	0,14	0,25	0	0	
	Oluşan kallusların rengi			.	Kahverengi	Kahverengi	Açık Kahverengi	Kahverengi	.	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Kahverengi	.
	Oluşan kallusların tekstürü			.	Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	.	Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	.

Çizelge 4.11. Sakız çeşidinde *in vitro* (*in vitro* koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri

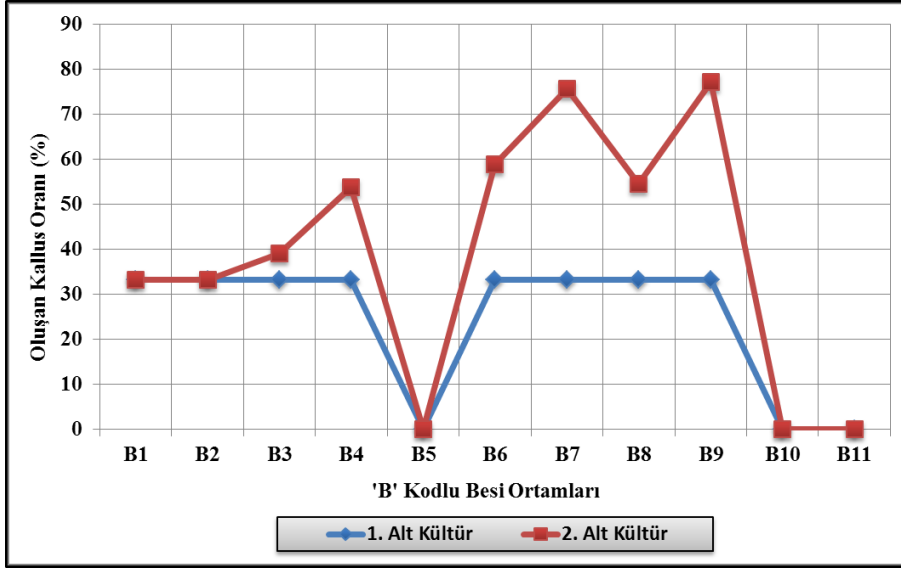
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu											
			B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Sakız	Gelişen yaprak oranı (%)	1	0	0	0	16,66	0	0	0	0	21,66	23,33	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların rengi			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oluşan kallusların tekstürü			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.12. Olympus F₁ çeşidinde *in vitro* (*in vitro* koşullardan alınan eksplantlarda) B kodlu ortamlara ait kallus verileri

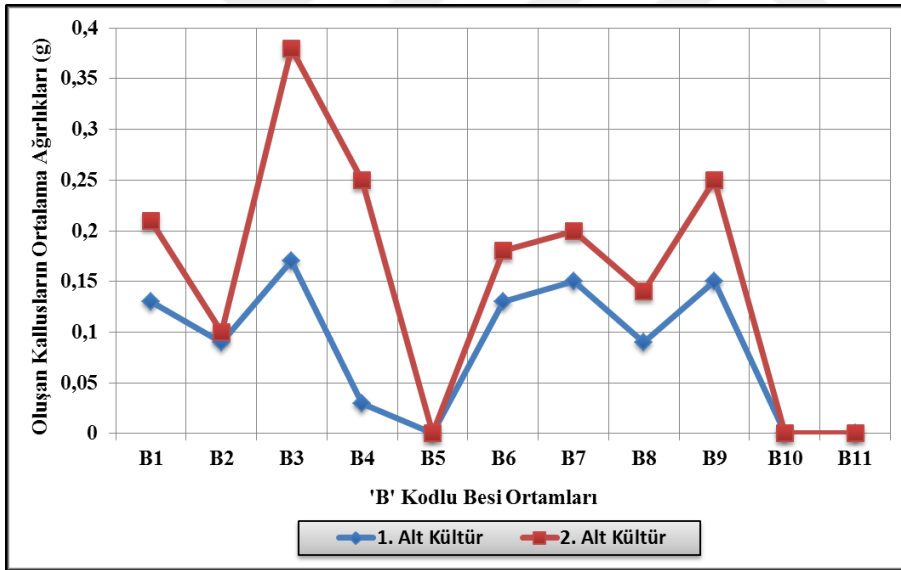
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu											
			B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Olympus F ₁	Gelişen yaprak oranı (%)	1	0	0	0	0	16,66	0	0	0	16,66	25,00	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların rengi			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oluşan kallusların tekstürü			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



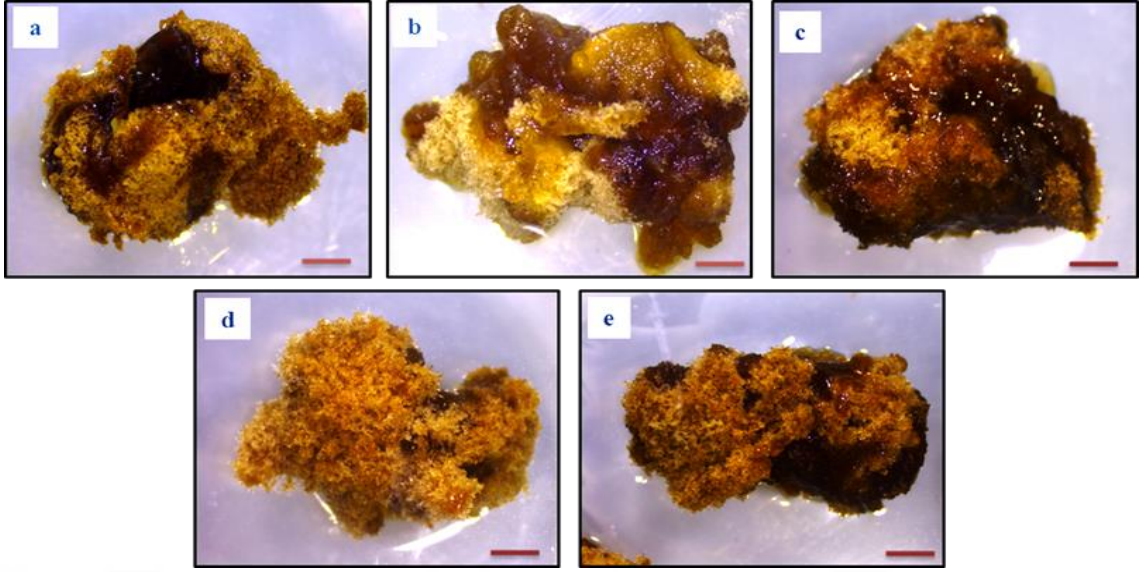
Şekil 4.73. *In vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda gelişen yaprak eksplantlarının oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁



Şekil 4.74. Bayrampaşa çeşidinde *in vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben bu ortamlarda oluşan kallus oranı (%)



Şekil 4.75. Bayrampaşa çeşidinde *in vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'B' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben bu ortamlarda oluşan kallusların ortalama ağırlıkları (g)



Şekil 4.76. Bazı B kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vitro* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** B1 (0.8x), **b.** B3 (0.63x), **c.** B6 (0.8x), **d.** B8 (0.8x), **e.** B9 (0.63x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)

In vitro koşullarda kültüre alınan eksplantlarda kallusların oluşturulması ve rejenerasyonunda, ayrıca sekonder metabolit oluşumunda birçok faktör etkili olmaktadır. Bu faktörler arasında genotip, eksplant tipi, besi ortamı kompozisyonu, karbonhidrat kaynağı, bitki büyüme düzenleyicilerinin tipi ve konsantrasyonu ile kültür koşulları önemli rol oynamaktadır (Rueb vd. 1994; Shahsavari vd. 2010; Siatka 2019).

Farklı bitkiler üzerinde kallus elde edilmesine yönelik yapılan birçok çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunmadığı besi ortamlarında kallus elde edilemediği bildirilmiş olup (Fiegert vd. 2000; Yasmin vd. 2003; Elaleem vd. 2009), bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yine daha önce yapılan birçok çalışmada, *in vitro* koşullarda kültüre alınan eksplantlardan kallus oluşumunda ve bitki rejenerasyonunda genotipe ve eksplant tipine bağlı olarak besi ortamlarının en ideal doz ve kombinasyonda bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Lestari vd. 2019).

Bu çalışmadan elde edilen bulguların birçok çalışmadan elde edilen bulgularla uyum içinde olduğu söylenebilir. Özellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin tek başına kullanılmaları kallus oluşumu bakımından olumlu sonuçlar doğurmamıştır ve bu durum diğer birçok çalışmada da benzer bulunmuştur. Çeşitli oranlarda oksin ve sitokininlerin birlikte kullanılmasının kallus oluşumunu teşvik ettiği belirtilen çalışmalarda, özellikle değişen oranlarda NAA ve BAP kullanımının farklı bitkilerde etkili kallus eldesi sağladığı bildirilmiştir. Hesami ve Daneshvar (2018) yaptıkları çalışmada $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA + $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ BAP kombinasyonunda maksimum kallus oluşumunu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Wani vd. (2018) ise kallus elde edilmesi amacıyla yaprak eksplantlarının 1/1 oranında NAA + BAP kombinasyonunda en iyi sonuçları belirlediklerini ve %83,5 oranında kallus oluşumu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da 'B' kodlu besi ortamları olarak hazırlanan grupta B9

ortamında NAA/BAP konsantrasyon ilişkisi 10/1 oranında olup (5 mg L⁻¹ NAA + 0,5 mg L⁻¹ BAP), 1/1 oranında hazırlanan B10 ortamıyla (5 mg L⁻¹ NAA + 5 mg L⁻¹ BAP) birlikte bu iki ortamın kallus oluşumu bakımından en iyi tepkiyi oluşturduğu tespit edilmiştir.

Günümüze kadar araştırmacılar tarafından kallus oluşturulması ve bu kallusların devamlılığının sağlanması amacıyla oksin ve sitokininlerin önemini vurgulayan birçok araştırma yapılmıştır. Suryowinata (1996)'ya göre kallus oluşumunu teşvik etmek amacıyla oksinlerden yararlanılmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicilerinden 2,4-D'nin tek başına ya da sitokininlerle birlikte kullanılmasının oldukça yaygın olduğu bilinmektedir (Castillo vd. 1998). Hatta birçok araştırmacıya göre 2,4-D'nin hem monokotiledon hem de dikotiledon bitkilerde kallus elde edilmesinde en etkili cevapları gösterdiği belirtilmiştir (Ho ve Vasil 1983; Chee 1990; Elaleem vd. 2009).

Çalışmada kallus elde edilmesi amacıyla 'B' kodlu besi ortamlarının yanı sıra 'T' kodlu besi ortamı kombinasyonları da denenmiş olup, *in vivo* yaprak eksplantlarından elde edilen bulgular şu şekildedir:

Her üç çeşit için de kültüre alınan yaprak eksplantlarının gelişim oranları incelendiğinde hem alt kültürler arasında hem de besi ortamları arasında farklılıklar olduğu görülmektedir (Çizelge 4.13 – Çizelge 4.15). Bayrampaşa çeşidindeki gelişmelere bakıldığında, 1. alt kültürde T10 ortamı, 2. ve 3. alt kültürlerde T16 ortamı ön plana çıkmaktadır (Şekil 4.77a). Sakız çeşidi için, 1. alt kültürde T16 ortamı, 2. alt kültürde T14 ortamı ve 3. alt kültürde ise T7 ortamı yaprak gelişimi bakımından etkili bulunmuştur (Şekil 4.77b). Olympus F₁ çeşidinde ise 1. alt kültürde T12, 2. ve 3. alt kültürlerde T8 ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarının gelişimleri daha iyi bulunmuştur (Şekil 4.77c).

Kallus oluşum oranı bakımından incelendiğinde, Bayrampaşa çeşidinde 1. alt kültürde elde edilen kallus oranı diğer iki alt kültürde elde edilenlerden daha az seviyede kalmıştır. 2. alt kültürde ön plana çıkan besi ortamları T7, T8, T10, T16, T17 ve T18 olarak belirlenirken, 3. alt kültürde ise T7, T10, T16 ve T18 olmuştur (Çizelge 4.13, Şekil 4.78a, Şekil 4.80). Sakız çeşidi için 1. alt kültürde en yüksek kallus oluşum oranı T6 ortamında tespit edilirken, 2. alt kültürde bu ortam T16 olarak belirlenmiştir. 3. alt kültürde ise kallus oluşum oranı bakımından birçok besi ortamı ön plana çıkmış olup bunlar T7, T11, T13, T14 ve T16 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.78b, Şekil 4.81). Olympus F₁ çeşidinde ise 1. alt kültürde oluşan kallusların oranı diğer iki alt kültüre nazaran daha alt seviyelerde seyretmiş olup, en yüksek kallus oluşum oranı değerlerine 3. alt kültürde ulaşıldığı görülmektedir. Buna göre T16 ve T18 ortamları 3. alt kültürde en etkili besi ortamları olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.15, Şekil 4.78c, Şekil 4.82).

Kallus ağırlıkları bakımından incelendiğinde Bayrampaşa çeşidinde meydana gelen kalluslardan ağırlık bakımından en ideal sonuçların 2. ve 3. alt kültürlerde T10 ortamında elde edildiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.79a). Sakız çeşidi için ise 3. alt kültürden elde edilen sonuçlar diğer alt kültürlerden elde edilenlere göre daha tatminkâr bulunmuş ve ön plana çıkan besi ortamları T7, T11, T13 ve T16 olmuştur (Çizelge 4.14, Şekil 4.79b). Benzer durum Olympus F₁ çeşidi için de söz konusu olup,

3. alt kültürde T16 ve T18 ortamları kallus ağırlığı bakımından en idealleri olarak bulunmuştur (Çizelge 4.15, Şekil 4.79c).

In vivo yaprak eksplantları kullanılarak yapılan denemeler için genel bir değerlendirme yapıldığında nispeten düşük miktarlarda kullanılarak kombinasyon oluşturulan kinetin + 2,4-D kombinasyonlarında her üç çeşit için de kallus gelişimleri daha arzu edilen düzeylerde tespit edilmiştir. Özellikle Bayrampaşa için 0,1 mg L⁻¹ kinetin + 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D (T10), Sakız için 0,5 mg L⁻¹ kinetin + 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D (T13), Olympus F₁ için 1 mg L⁻¹ kinetin + 1 mg L⁻¹ 2,4-D (T16) besi ortamı kombinasyonlarının ön plana çıktığı belirlenmiştir. *In vitro* yaprak eksplantlarının kültüre alınması ile yapılan denemelerden elde edilen bulgulara göz atıldığında Bayrampaşa çeşidi için yine kinetin + 2,4-D kombinasyonu etkili bulunurken, Sakız ve Olympus F₁ çeşitleri için BAP + NAA kombinasyonlarının ön plana çıktığı görülmüştür.

Çizelge 4.13. Bayrampaşa çeşidinde *in vivo* (dış koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri

Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu									
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
Bayrampaşa	Gelişen yaprak oranı (%)	1	15,00	15,00	21,10	23,33	20,91	16,66	40,00	27,50	23,33	
		2	33,33	0	33,33	31,57	0	0	34,31	37,50	28,57	
		3	33,33	0	0	0	0	0	43,66	7,33	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	33,33	0	33,33	24,56	24,05	30,55	26,43	30,30	23,80	
		2	33,33	0	29,16	29,62	0	0	66,66	66,66	33,33	
		3	33,33	0	0	0	0	0	66,66	33,33	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,03	0	0,05	0,04	0,05	0,03	0,06	0,04	0,04	
		2	0,05	0	0,07	0,04	0	0	0,10	0,06	0,07	
		3	0,06	0	0	0	0	0	0,11	0,12	0	
	Oluşan kallusların rengi			Açık kahverengi, krem	.	Açık kahverengi, krem	Açık kahverengi, krem	Açık kahverengi, krem	Açık kahverengi, krem	Sarımsı açık kahverengi	Sarımsı açık kahverengi	Açık kahverengi
	Oluşan kallusların tekstürü			Hafif yumuşak	.	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Hafif yumuşak

Çizelge 4.13.'ün devamı

Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu										
			T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
Bayrampaşa	Gelişen yaprak oranı (%)	1	52,22	33,33	31,66	50,00	40,00	50,00	35,83	40,00	35,00	8,33	
		2	40,00	33,33	33,33	4,16	33,33	33,33	43,13	32,43	18,51	0	
		3	43,33	33,33	33,33	6,66	0	33,33	50,00	33,33	20,00	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	33,33	25,00	22,22	0	22,22	6,66	31,94	29,05	24,63	0	
		2	66,66	33,33	33,33	33,33	22,22	6,66	66,66	66,66	66,66	0	
		3	66,66	33,33	33,33	33,33	0	33,33	66,66	33,33	66,66	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,04	0,04	0,03	0	0,03	0,06	0,03	0,04	0,03	0	
		2	0,16	0,06	0,05	0,07	0,07	0,08	0,10	0,07	0,06	0	
		3	0,17	0,07	0,07	0,08	0	0,09	0,12	0,07	0,07	0	
	Oluşan kallusların rengi			Açık kahverengi	Krem, hafif gri-yeşil	Krem, açık kahverengi	Açık kahverengi	Krem	Açık kahverengi	Açık kahverengi, hafif gri	Açık kahverengi, krem	Krem, hafif yeşil	.
	Oluşan kallusların tekstürü			Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif sert	Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	.

Çizelge 4.14. Sakız çeşidinde *in vivo* (dış koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri

Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu									
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
Sakız	Gelişen yaprak oranı (%)	1	38,33	55,83	42,22	59,11	60,83	55,27	65,00	52,16	49,16	
		2	43,33	60,00	42,22	60,00	30,00	18,33	58,33	46,66	29,74	
		3	33,33	0	8,33	12,34	9,52	3,03	52,38	0	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	34,28	33,65	31,94	55,55	59,39	66,66	49,86	59,59	48,57	
		2	33,33	30,00	33,33	33,33	0	0	33,33	33,33	33,33	
		3	33,33	0	33,33	33,33	0	33,33	66,66	0	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,04	0,05	0,05	0,06	0,06	0,07	0,08	0,07	0,07	
		2	0,04	0,05	0,07	0,07	0	0	0,08	0,07	0,07	
		3	0,04	0	0	0,10	0	0,03	0,23	0	0	
	Oluşan kallusların rengi			Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Kahverengi	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi
	Oluşan kallusların tekstürü			Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Hafif yumuşak	Yumuşak	Yumuşak

Çizelge 4.14.'ün devamı

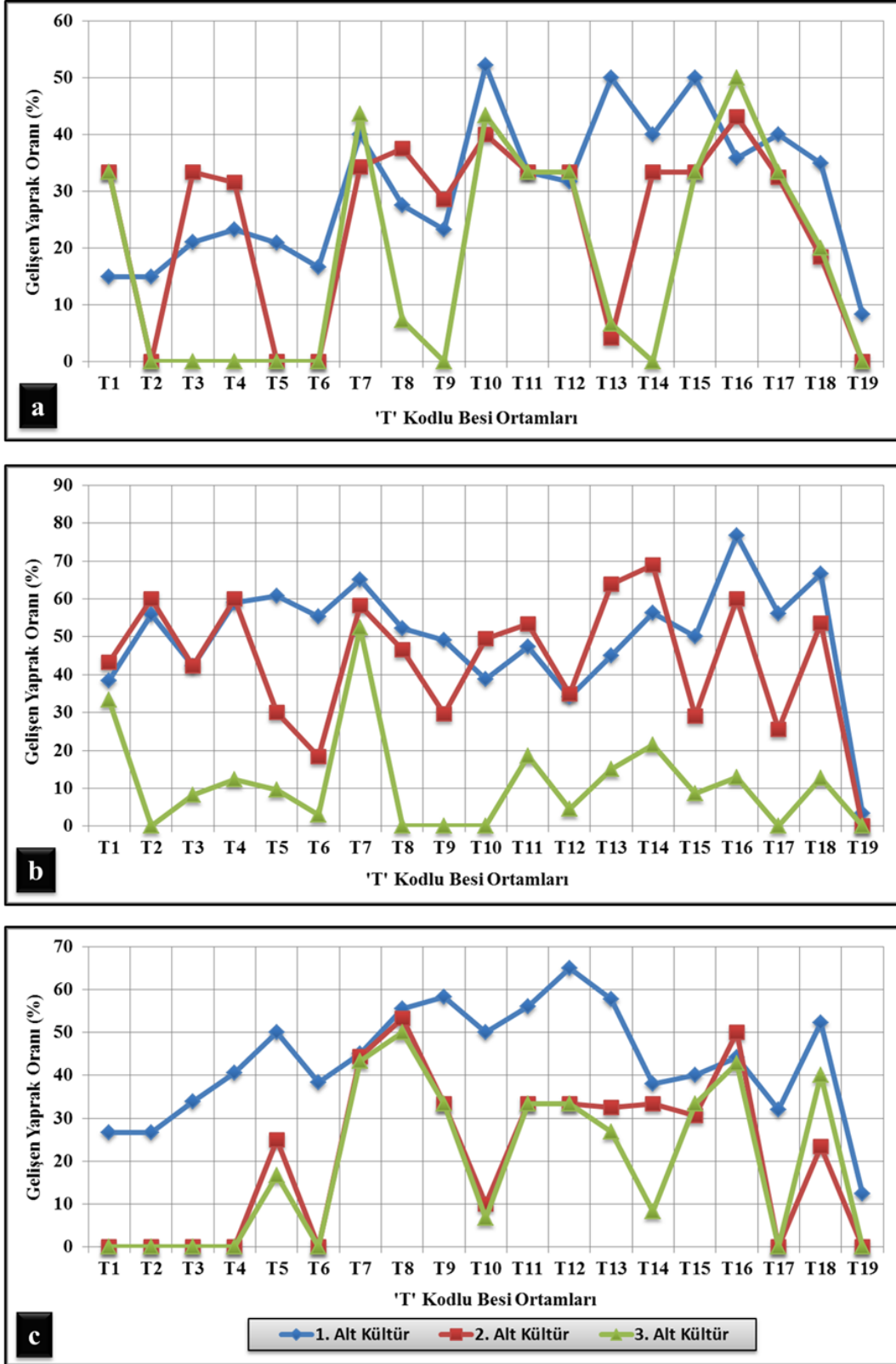
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu										
			T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
Sakız	Gelişen yaprak oranı (%)	1	38,75	47,33	34,16	44,97	56,33	50,00	76,66	56,16	66,66	3,33	
		2	49,46	53,33	35,00	63,88	69,00	29,16	60,00	25,61	53,63	0	
		3	0	18,65	4,54	15,06	21,57	8,57	12,83	0	12,69	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	57,23	47,24	55,95	38,78	55,55	21,66	24,00	54,83	55,04	0	
		2	16,66	33,33	33,33	33,33	33,33	0	56,66	33,33	31,66	0	
		3	0	66,66	33,33	66,66	66,66	33,33	66,66	0	33,33	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,05	0,04	0,04	0,03	0,05	0,03	0,03	0,06	0,05	0	
		2	0,07	0,06	0,04	0,04	0,06	0	0,11	0,06	0,07	0	
		3	0	0,26	0,05	0,32	0,17	0,03	0,27	0	0,04	0	
	Oluşan kallusların rengi			Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Açık kahverengi	Krem	Krem	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	.
	Oluşan kallusların tekstürü			Hafif sert	Hafif sert	Hafif sert	Hafif yumuşak	Hafif sert	Hafif sert	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	.

Çizelge 4.15. Olympus F₁ çeşidinde *in vivo* (dış koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri

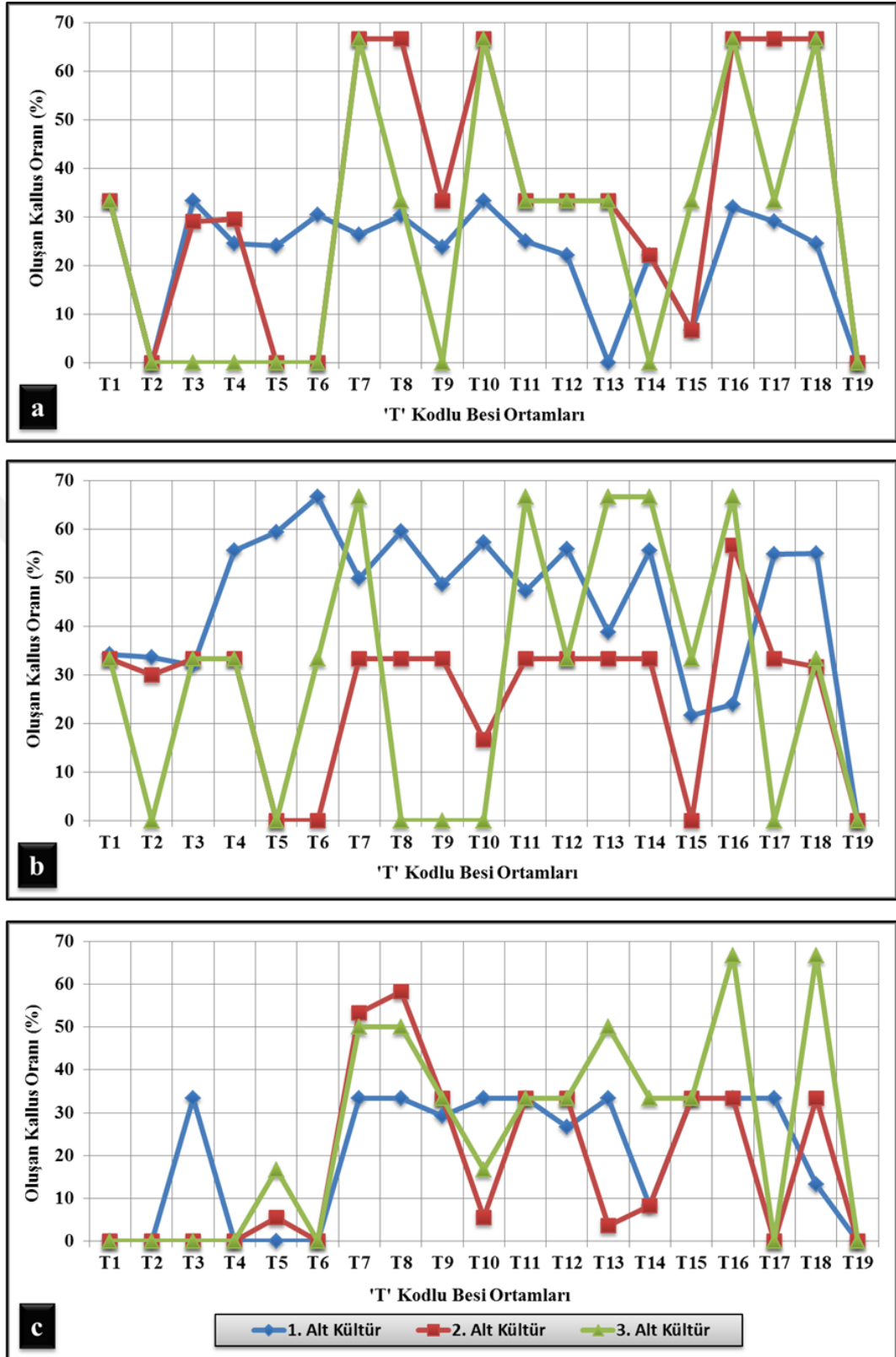
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu									
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
Olympus F ₁	Gelişen yaprak oranı (%)	1	26,66	26,66	33,88	40,66	50,00	38,33	45,00	55,55	58,33	
		2	0	0	0	0	25,00	0	44,44	53,33	33,33	
		3	0	0	0	0	16,66	0	43,33	50,00	33,33	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	0	0	33,33	0	0	0	33,33	33,33	29,16	
		2	0	0	0	0	5,55	0	53,33	58,33	33,33	
		3	0	0	0	0	16,66	0	50,00	50,00	33,33	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0	0	0,10	0	0	0	0,03	0,04	0,03	
		2	0	0	0	0	0,03	0	0,07	0,07	0,04	
		3	0	0	0	0	0,05	0	0,09	0,08	0,06	
	Oluşan kallusların rengi			.	.	Açık kahverengi	.	Kahverengi	.	Kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi
	Oluşan kallusların tekstürü			.	.	Hafif yumuşak	.	Hafif yumuşak	.	Hafif yumuşak	Hafif sert	Sert

Çizelge 4.15.'in devamı

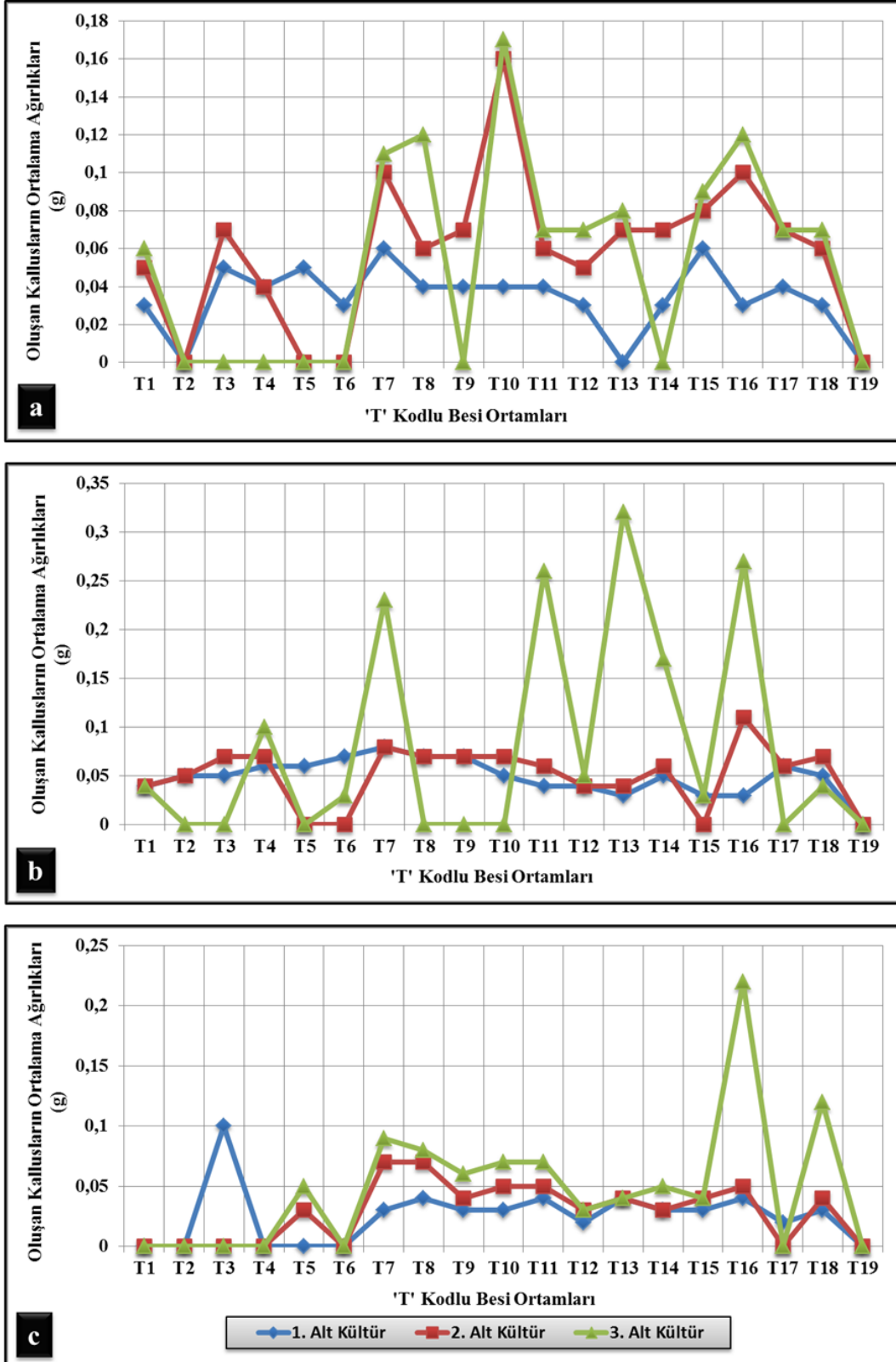
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu										
			T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
Olympus F ₁	Gelişen yaprak oranı (%)	1	50,00	56,00	65,00	57,77	38,00	40,00	44,16	32,00	52,22	12,33	
		2	10,00	33,33	33,33	32,45	33,33	30,55	50,00	0	23,33	0	
		3	6,66	33,33	33,33	26,92	8,33	33,33	42,85	0	40,00	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	33,33	33,33	26,66	33,33	8,33	33,33	33,33	33,33	33,33	13,33	0
		2	5,55	33,33	33,33	3,70	8,33	33,33	33,33	33,33	0	33,33	0
		3	16,66	33,33	33,33	50,00	33,33	33,33	66,66	0	66,66	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,03	0,04	0,02	0,04	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0	
		2	0,05	0,05	0,03	0,04	0,03	0,04	0,05	0	0,04	0	
		3	0,07	0,07	0,03	0,04	0,05	0,04	0,22	0	0,12	0	
	Oluşan kallusların rengi			Hafif sarı, kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Krem, açık kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	.
	Oluşan kallusların tekstürü			Hafif sert	Hafif yumuşak	Hafif sert	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Sert	Hafif yumuşak	Sert	.



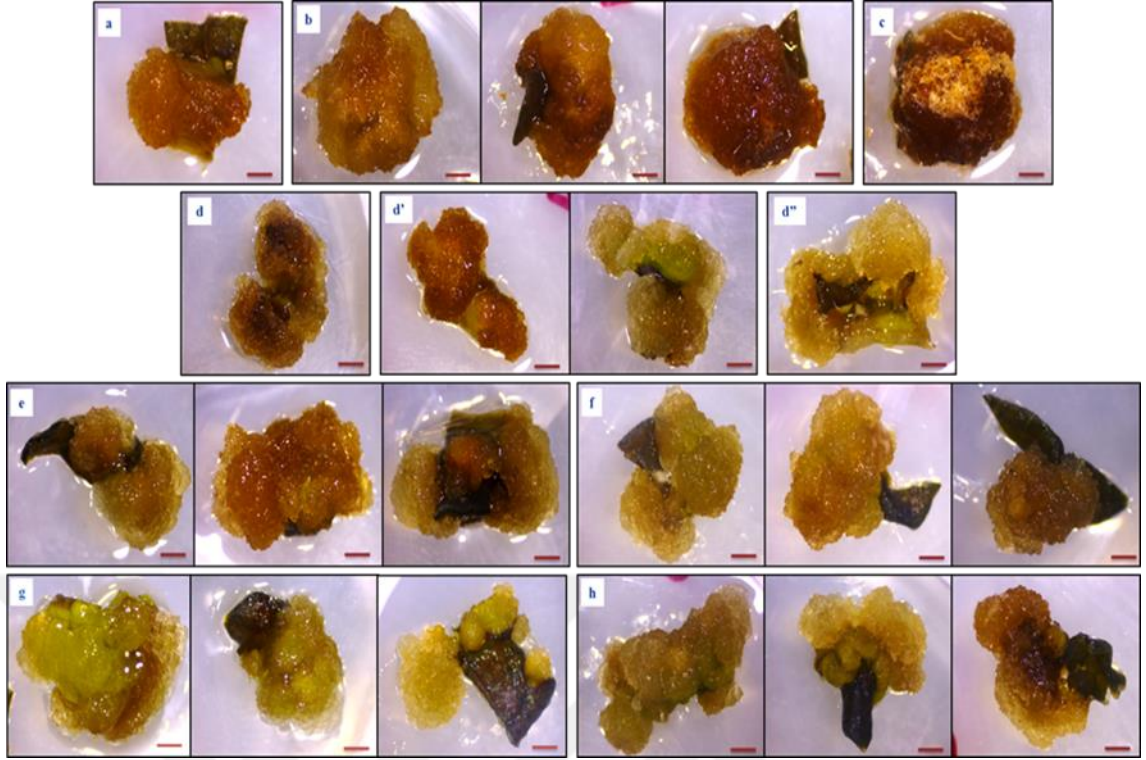
Şekil 4.77. Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların ‘T’ kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda gelişen yaprak eksplantlarının oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁



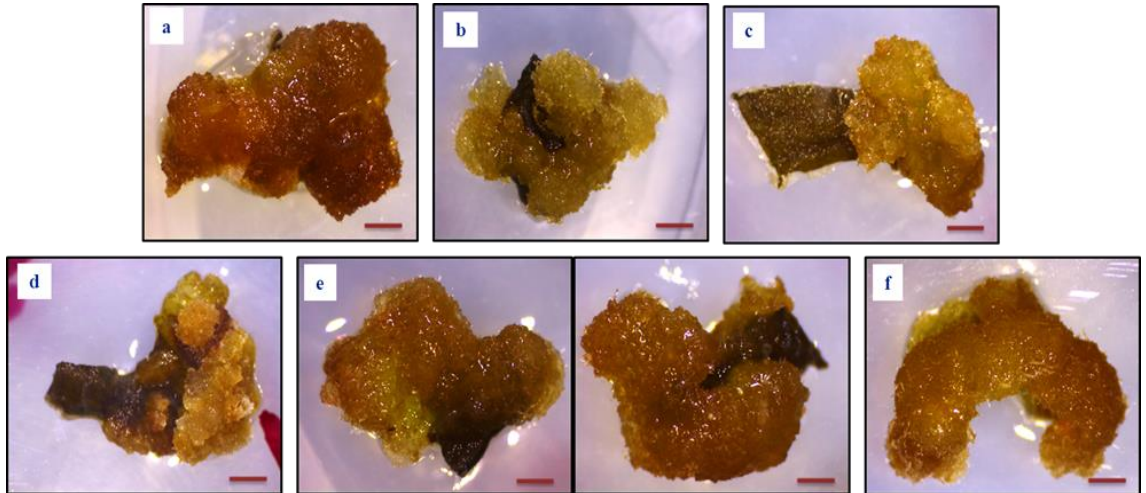
Şekil 4.78. Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallus oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁



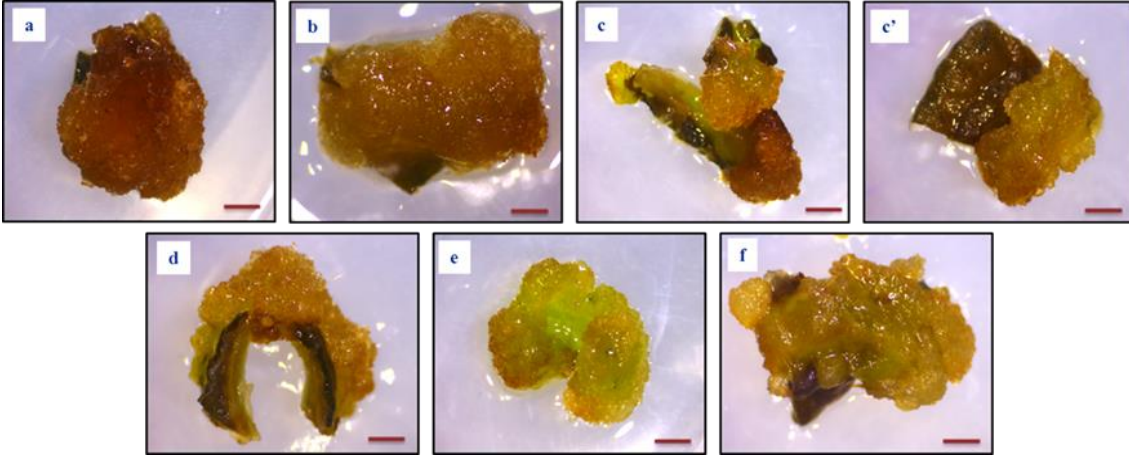
Şekil 4.79. Dış koşullarda yetiştirilen enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallusların ortalama ağırlıkları (g); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁



Şekil 4.80. Bazı T kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** T3 (1.25x), **b.** T7 (0.8x), **c.** T8 (0.8x), **d.** T11 (0.63x), **d'**. T11 (0.8x), **d''.** T11 (1.25x), **e.** T12 (1.0x), **f.** T16 (1.0x), **g.** T17 (1.0x), **h.** T18 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



Şekil 4.81. Bazı T kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Sakız çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** T4 (1.0x), **b.** T5 (1.0x), **c.** T9 (1.0x), **d.** T12 (1.0x), **e.** T17 (1.25x), **f.** T18 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)



Şekil 4.82. Bazı T kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Olympus F₁ çeşidine ait *in vivo* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** T3 (0.8x), **b.** T8 (1.25x), **c.** T9 (1.0x), **c'.** T9 (1.25x), **d.** T10 (1.25x), **e.** T13 (0.8x), **f.** T18 (1.25x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)

Nasıl ki 'B' kodlu besi ortamlarında hem *in vivo* hem de *in vitro* yapraklar kültüre alınıp değerlendirildiyse, aynı durum 'T' kodlu besi ortamları için de gerçekleştirilmiştir. Buna göre kültüre alınan yaprak eksplantlarında gelişim oranları incelendiğinde he üç çeşitte de 1. alt kültür değerleri 2. alt kültür değerlerine oranla daha yüksek bulunmuş olup, Bayrampaşa çeşidinde T5, Sakız çeşidinde T6 ve Olympus F₁ çeşidinde ise T4 ortamları ön plana çıkmıştır (Çizelge 4.16, Şekil 4.83). Kallus oluşumu bakımından değerlendirildiğinde Bayrampaşa çeşidi için 1. alt kültürde T2, T6, T16 ve T17 besi ortamları, 2. alt kültürde ise T17 ortamı ön plana çıkmaktadır (Çizelge 4.16, Şekil 4.84a, Şekil 4.86). Sakız çeşidinde 1. alt kültürde yaprak oluşumunun en yüksek olduğu T6 ortamıyla uyumlu şekilde kallus oluşumu görülürken, 2. alt kültürde herhangi bir gelişme tespit edilememiştir (Çizelge 4.17, Şekil 4.84b). Olympus F₁ çeşidinde ise her iki alt kültür aşamasında herhangi bir kallus gelişimi gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.18). Kallus ağırlıkları değerlendirilmeye alındığında ise Bayrampaşa çeşidinde 1. alt kültür için T2 ortamı, 2. alt kültür için T14 ortamı etkili bulunmuştur (Çizelge 4.16, Şekil 4.85a). Sakız çeşidinde ise kallus oluşum oranı bakımından T6 ortamından sonra 2. sırada gelen T4 ortamında en iyi kallus ağırlığı elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.17, Şekil 4.85b). Olympus F₁ çeşidinde ise gelişen kallus olmadığı için ağırlıkları tespit edilememiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.16. Bayrampaşa çeşidinde *in vitro* (*in vitro* koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri

Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu								
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Bayrampaşa	Gelişen yaprak oranı (%)	1	55,55	61,11	61,66	41,11	78,33	64,44	48,00	52,22	53,33
		2	21,79	32,45	16,66	33,33	31,66	26,66	20,83	17,64	33,33
	Oluşan kallus oranı (%)	1	30,76	64,91	63,33	61,90	59,16	64,16	27,08	33,33	28,57
		2	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,03	0,16	0,08	0,13	0,13	0,12	0,03	0,02	0,03
		2	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05	0,03	0,04
	Oluşan kallusların rengi		Açık kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi, krem	Sarımsı açık kahverengi	Sarımsı açık kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi
	Oluşan kallusların tekstürü		Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak

Çizelge 4.16.'nın devamı

Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu										
			T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
Bayrampaşa	Gelişen yaprak oranı (%)	1	55,00	23,33	23,33	25,55	32,66	42,50	35,55	39,44	45,83	16,66	
		2	33,33	33,33	33,33	5,79	46,15	5,98	33,33	37,71	33,33	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	22,22	30,55	33,33	33,33	33,33	48,14	66,66	66,66	33,33	0	
		2	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	66,66	33,33	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0,03	0,02	0,03	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06	0	
		2	0,05	0,06	0,09	0,06	0,18	0,06	0,06	0,13	0,03	0	
	Oluşan kallusların rengi			Açık kahverengi	Açık kahverengi	Açık kahverengi	Kahverengi	Açık kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	.
	Oluşan kallusların tekstürü			Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Yumuşak	Hafif yumuşak	Yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	Hafif yumuşak	.

Çizelge 4.17. Sakız çeşidinde *in vitro* (*in vitro* koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri

Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu									
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
Sakız	Gelişen yaprak oranı (%)	1	6,66	6,66	8,33	20,00	10,00	26,66	10,00	10,00	13,33	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	0	0	0	2,77	0	10,41	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0	0	0	0,19	0	0,04	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların rengi			-	-	-	Krem, açık kahverengi	-	Krem, açık kahverengi	-	-	-
	Oluşan kallusların tekstürü			-	-	-	Hafif yumuşak	-	Hafif yumuşak	-	-	-

Çizelge 4.17.'nin devamı

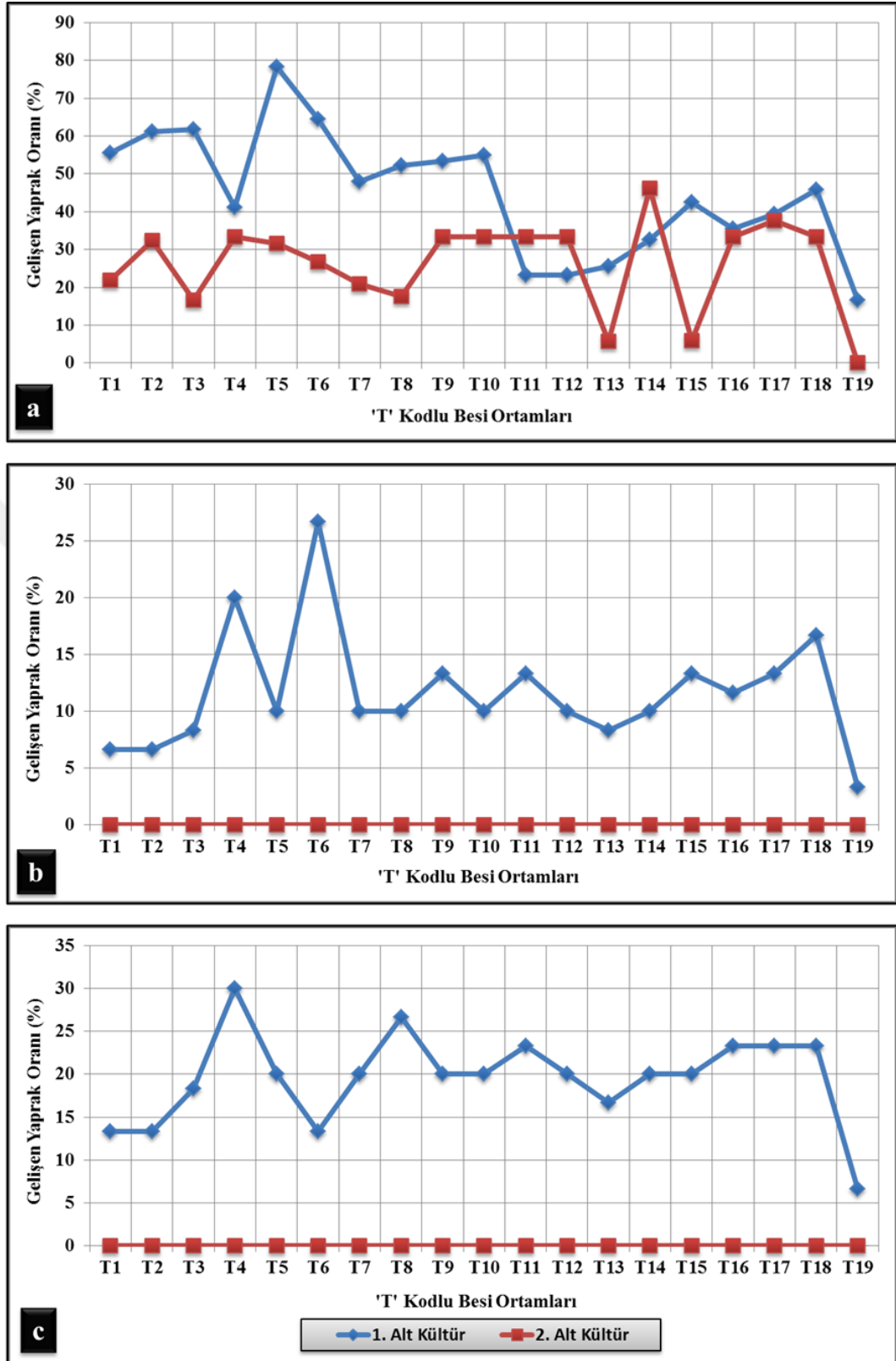
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu										
			T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
Sakız	Gelişen yaprak oranı (%)	1	10,00	13,33	10,00	8,33	10,00	13,33	11,66	13,33	16,66	3,33	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların rengi			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oluşan kallusların tekstürü			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.18. Olympus F₁ çeşidinde *in vitro* (*in vitro* koşullardan alınan eksplantlarda) T kodlu ortamlara ait kallus verileri

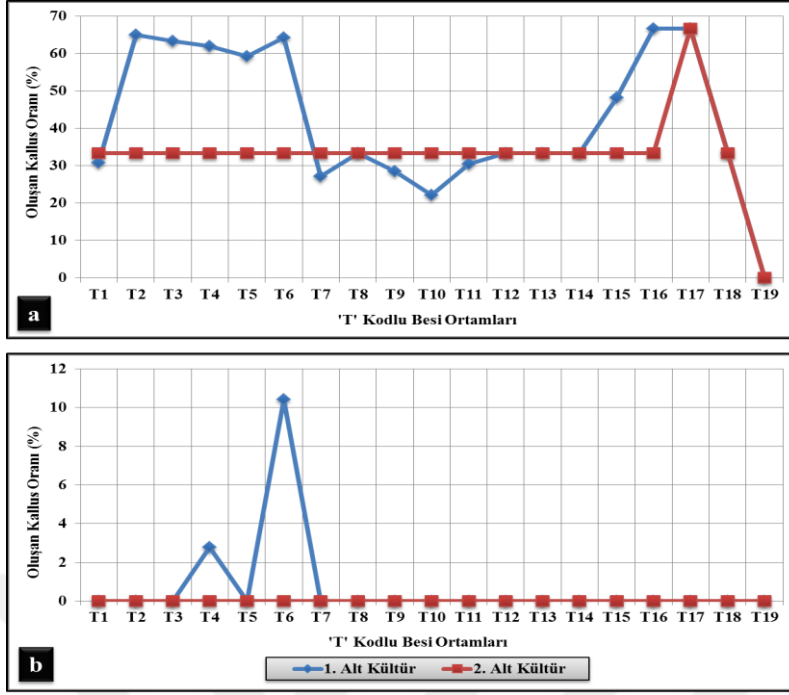
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu									
			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
Olympus F ₁	Gelişen yaprak oranı (%)	1	13,33	13,33	18,33	30,00	20,00	13,33	20,00	26,66	20,00	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların rengi			-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oluşan kallusların tekstürü			-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.18.'in devamı

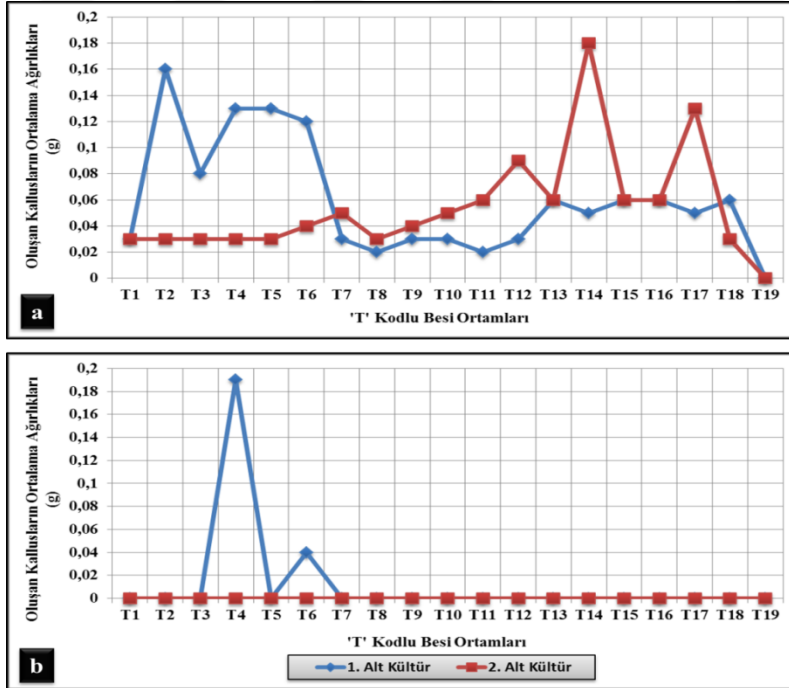
Çeşit	İlgili Parametreler	Alt Kültür Sayısı	Ortam Kodu										
			T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
Olympus F ₁	Gelişen yaprak oranı (%)	1	20,00	23,33	20,00	16,66	20,00	20,00	23,33	23,33	23,33	6,66	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallus oranı (%)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların ortalama ağırlığı (g)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Oluşan kallusların rengi			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oluşan kallusların tekstürü			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



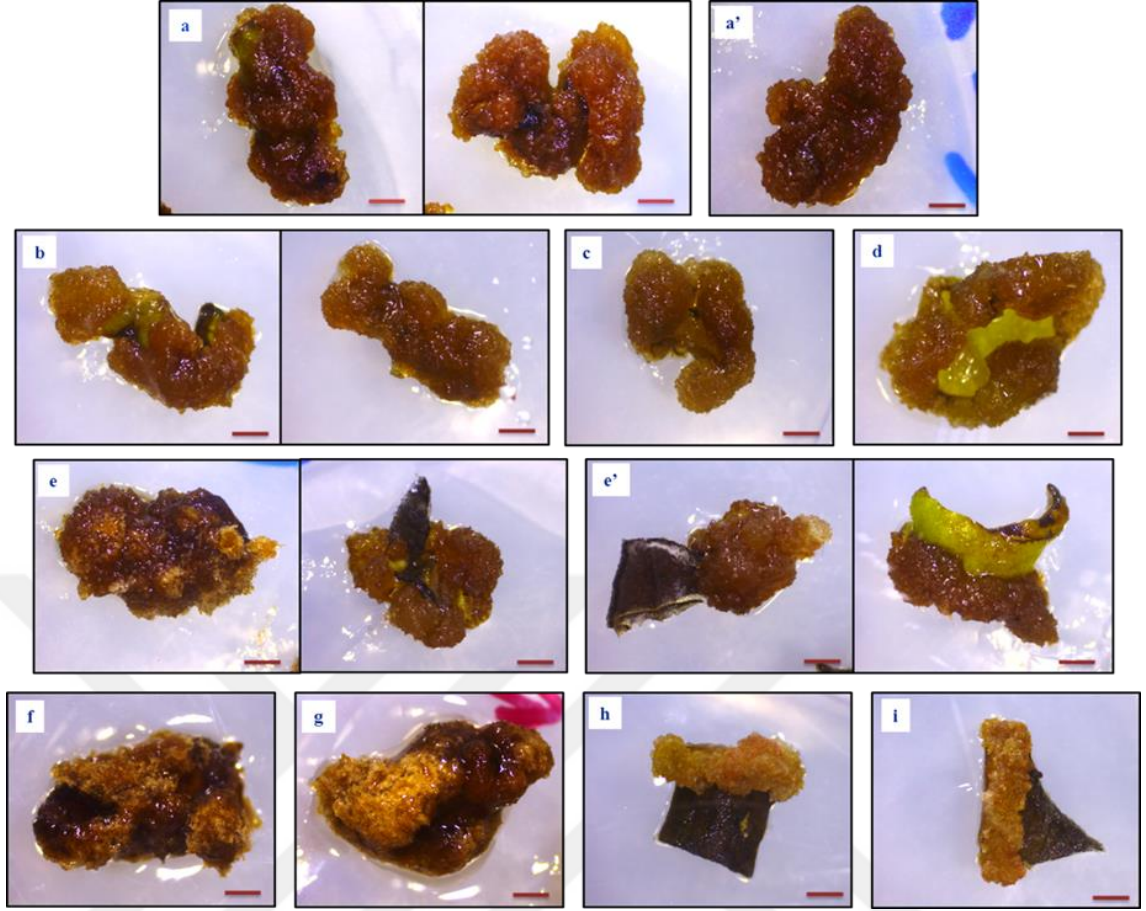
Şekil 4.83. *In vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda gelişen yaprak eksplantlarının oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız, **c.** Olympus F₁



Şekil 4.84. *In vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallus oranı (%); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız



Şekil 4.85. *In vitro* çoğaltılan enginar bitkilerinden alınan yaprakların 'T' kodlu besi ortamlarında kültüre alınmasını takiben, bu ortamlarda oluşan kallusların ortalama ağırlıkları (g); **a.** Bayrampaşa, **b.** Sakız



Şekil 4.86. Bazı T kodlu kallus ortamlarında kültüre alınan Bayrampaşa çeşidine ait *in vitro* yaprak eksplantlarında kallus oluşumu (1. alt kültür sonu); **a.** T2 (0.8x), **a'.** T2 (2.0x), **b.** T3 (1.0x), **c.** T4 (2.0x), **d.** T5 (1.25x), **e.** T7 (0.8x), **e'.** T7 (1.0x), **f.** T13 (1.0x), **g.** T14 (0.8x), **h.** T15 (1.0x), **i.** T17 (1.0x) (x= mikroskop büyütme katsayısı) (bar = 1 cm)

4.2.4. Süspansiyon kültürüne ait bulgular

Süspansiyon kültürleri oluşturulurken, kallus elde edilen besi ortamının agar kullanılmaksızın sıvı halleri hazırlanmış, elde edilen kallusların devamlılığı bu sıvı kültürlerde sağlanmıştır (Şekil 4.87). Süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında besi ortamları 100 mL erlenlere 30 mL ya da 250 mL erlenlere 50 mL olacak şekilde eklenmiştir. Sıvı besi ortamlarının pH değerleri 5,8 olarak sabitlenmiştir. Süspansiyon kültüründe alt kültürler 12 gün aralıklarla gerçekleştirilmiş olup 2 alt kültür uygulanmıştır. Alt kültürlerin sonunda kallus taze ağırlığı, besi ortamı miktarı ve pH'sındaki değişimler kaydedilmiştir. Her iki alt kültürde de 12. günün sonunda süspansiyon kültüründe çoğalan hücreler önce süzülmüştür. Süzülen hücreler tartılarak ağırlıkları belirlenmiş ve bu ölçüm 'taze ağırlık' olarak ifade edilmiştir. Böylece besi ortamları ve çeşitlere göre meydana gelen hücre artışları tespit edilmiştir (Çizelge 4.19 – Çizelge 4.21, Şekil 4.87 – Şekil 4.89). Çeşitlere ait süspansiyon kültürleri 'B' ve 'T' kodlu besi ortamlarında elde edilen kallusların miktar bakımından en ideal olanları seçilerek başlatılmıştır. Bu sebeple hangi besi ortamından ne kadar kallus elde edildiyse başlangıç miktarı için o miktar kullanılmıştır. Bayrampaşa çeşidi için en başarılı kallus

besi ortamları T7, T10, T11, T12, T16 ve T17 olarak belirlenmiştir. ‘B’ kodlu ortamlarda ise elde edilen kalluslar yeterli bulunmadığından dolayı süspansiyon kültürleri başlatılamamıştır. Sakız çeşidi için tespit edilen en başarılı ‘T’ kodlu kallus ortamları T2, T8, T11, T12, T14, T16 olurken, ‘B’ kodlu besi ortamlarından ise B10 ön plana çıkmıştır. Olympus F₁ çeşidinde ise sadece T8 besi ortamı kallus elde edilmesinde etkili bulunmuş ve bu ortamla süspansiyon kültürü başlatılmıştır.

İki alt kültürün sonunda hücrelerde tespit edilen en fazla taze artış sağlayan besi ortamları çeşitler bazında belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgulara göre, hücrelerde en fazla artış tespit edilen besi ortamı Bayrampaşa çeşidi için $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ kinetin + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D içeren T10 ortamı olurken, Sakız çeşidi için $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ kinetin + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D içeren T12 ortamı olmuştur. Alt kültürler sonunda süzülerek elde edilen taze ağırlıkların değişimleri de takip edilmiştir. Buna göre Bayrampaşa çeşidinde 30 mL T10 sıvı besi ortamı bulunan 1. erlende başlangıçta 5,70 g olan taze ağırlık 1. alt kültür sonunda 2 katından daha fazla artış yaşamış ve 12,04 g ağırlığa ulaşmıştır. Bununla birlikte 2. alt kültür sonunda bu ağırlık 11,45 g’a düşmüştür. 2. erlende ise alt kültürler sonunda hücre taze ağırlıklarında hep artış görülmüş, başlangıçta 3,80 g olan ağırlığın 1. alt kültür sonunda 7,82 g, 2. alt kültür sonunda ise 13,93 g ağırlığa ulaştığı belirlenmiştir. Sakız çeşidi için T12 besi ortamının etkili olduğu tespit edilmiş ve bu ortamda belirlenen parametreler doğrultusunda gözlemler yapılmıştır. Buna göre T12 besi ortamının bulunduğu 1. erlende 1. alt kültürde en fazla taze ağırlık artışı görülmüş ve 30,30 g ağırlığa ulaşmıştır. 2. alt kültürde de 1. alt kültürdeki kadar olmasa da yine ağırlık artışı görülmüştür. Bununla birlikte T12 ortamının bulunduğu 2. erlende ise 1. alt kültürde ölçülen ağırlık başlangıçtaki ağırlıkla aynı bulunurken, 2. alt kültürde azalma görülmüştür. Olympus F₁ çeşidinde T8 ortamında alt kültürler süresince taze ağırlık değişimleri değerlendirildiğinde, ağırlıkların azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir.

Süspansiyon kültürlerinin alt kültürleri süresince çeşitler ve besi ortamları bazında pH değerlerindeki değişimler gözlemlenmiştir. Buna göre Bayrampaşa çeşidinde değerlendirmeye alınan besi ortamlarının pH değerleri 1. alt kültür sonunda azalma göstermiştir. 2. alt kültür sonunda incelendiğinde ise T10 ortamının 2. erleni ve T12 ortamı haricinde, pH değerlerinin başlangıçta ve 1. alt kültür sonunda tespit edilen değerlerden daha yüksek oldukları belirlenirken, bahsi geçen bu iki ortamın 2. alt kültür sonundaki pH değerlerinde yine bir düşüş görülmüştür. Sakız çeşidi için kültüre alınan ‘T’ kodlu besi ortamlarındaki pH değerlerindeki değişimler değerlendirildiğinde, 1. alt kültür sonunda T14 ve T16 besi ortamlarının pH değerlerinde azalma görülürken, değerlendirilmeye alınan diğer ‘T’ kodlu besi ortamlarının pH değerlerinde artış saptanmıştır. Sakız çeşidinde ‘B’ kodlu besi ortamlarından B10 ortamının süspansiyon kültürü oluşturulmuş olup, pH değişimleri bakımından değerlendirildiğinde 1. erlendeki besi ortamı pH’sının düştüğü, 2. erlendeki besi ortamı pH’sının ise artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yine Sakız çeşidi için 2. alt kültür sonunda tüm besi ortamlarının pH değişim değerleri incelendiğinde pH değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Olympus F₁ çeşidini değerlendirdiğimizde iki alt kültür sonunda besi ortamının pH değerlerinin arttığı tespit edilmiştir.

Aseptik ve kontrollü koşullar altında yürütülen doku kültürü çalışmalarını kapsamında kallus kültürlerinin genotip, eksplant kaynağı, besi ortamı kompozisyonu ve kombinasyonu gibi birçok faktörden etkilendiği bilinmektedir. Kallus kültürü ile kıyaslandığında hücre süspansiyon kültürleri daha uzun prosedürlere ihtiyaç duymakla

birlikte, geniş ölçekte üretime imkân sağlayan tek tip hücrelerin iyi bir kaynağı olarak düşünülmektedir. Hücre süspansiyon kültürleri, kontrollü koşullarda kısa bir büyüme döngüsü ile farklılaşmaya devam eder, böylece deneyler içerisinde ve deneyler arasında tekrarlanabilme şansını da arttırmış olur (Ngara vd. 2008; Abbas vd. 2018). Dolayısıyla, *in vitro* kültür teknikleri kullanılarak hızlı bir şekilde kallus ve hücre süspansiyon kültürleri oluşturulabilir ve değerli biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonuna da olanak sağlanabilir (Verpoorte vd. 2002; Abbas vd. 2018).

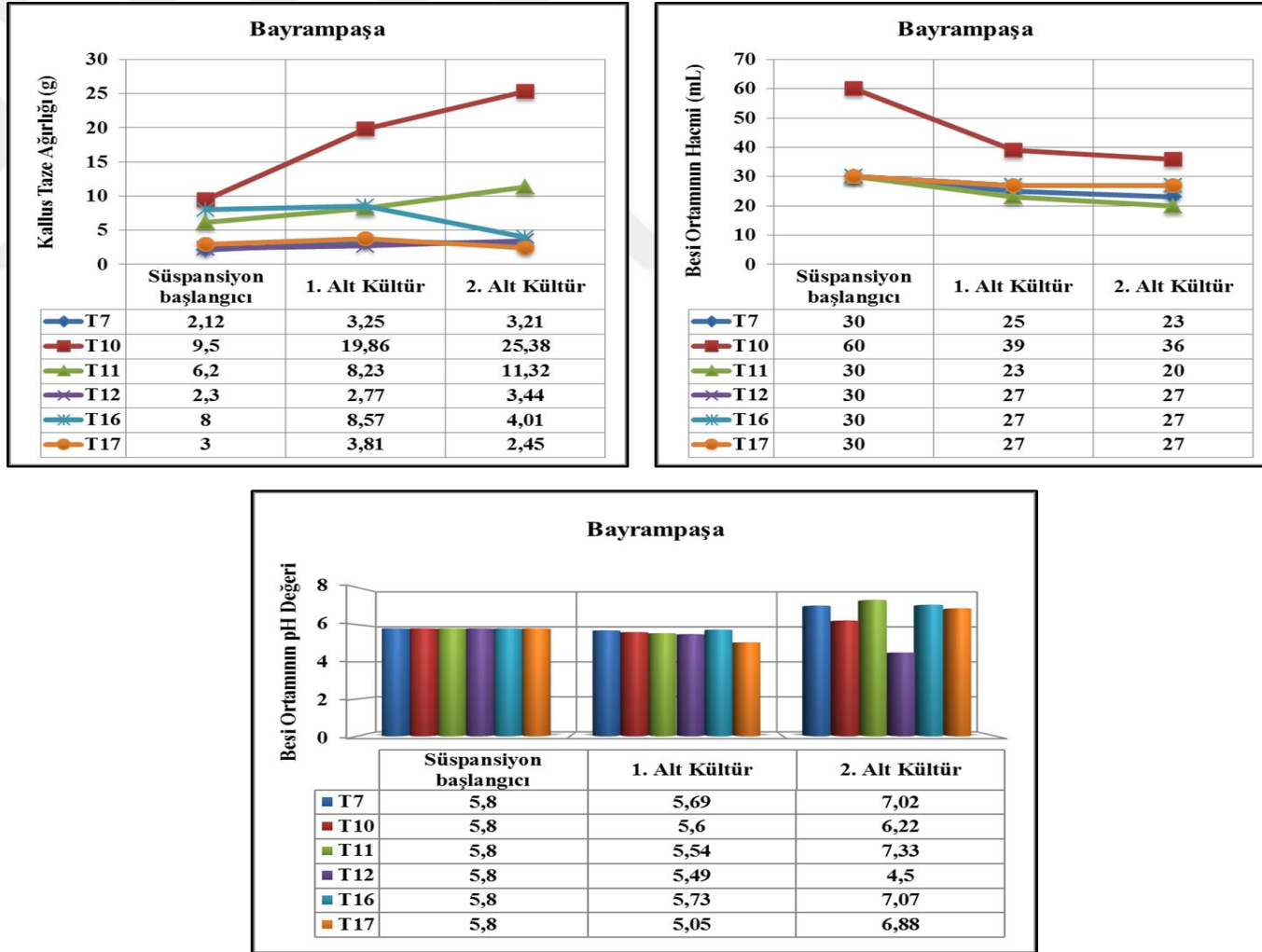
Birçok araştırmada arazi koşullarında yetiştirilen enginar bitkilerinin yapraklarında baskın olan kafeik asit türevleri arasında 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit ile birlikte 5-*O*-kafeoilkinik asit olduğu bildirilmektedir (Pandino vd. 2013b, 2015). Genotip farklılığı, yetiştirme koşulları vb. birçok faktörle bağlantılı olarak, bazı araştırmalarda bazı sekonder metabolitler yüksek miktarlarda tespit edilirken, bazılarında ise varlığı bulunamamıştır (Wang vd. 2003; Pandino vd. 2017b). Bununla birlikte Pandino vd. (2017b) yaptıkları çalışma, enginarlarda hücre süspansiyon kültürleri yoluyla fitokimyasalların birikimine yönelik yapılan ilk çalışmalardan biri kabul edilmekte ve dolayısıyla literatürde karşılaştırma yapılabilmesi sınırlı kalmaktadır. Pandino vd. (2017b), enginarlarda yaptıkları süspansiyon kültürü çalışmasının 5. gününde en yüksek fenolik madde birikimi tespit ettiklerini ve kültürün 10. gününde bu miktarın yaklaşık %26 oranında azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumun muhtemel sebebi olarak da bu süreçte hücrelerin hızlı büyüme fazında olmalarını göstermişlerdir. Öte yandan aynı araştırmacılar çeşide bağlı olarak değişmekle birlikte, hücre süspansiyon kültürlerinden elde ettikleri toplam kafeoilkinik asit değerlerinin yapraklardakinden daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde genç *in vivo* enginar yapraklarını değerlendiren Trajtemberg vd. (2006), kalluslarda bu yapraklardakinden daha fazla toplam kafeik asit birikimi belirlediklerini rapor etmişlerdir. Şifalı bitkilerde yapılan benzer birkaç çalışmada da *in vitro* örneklerin fenolik bileşenler bakımından *in vivo* örneklere kıyasla daha ümitvar olduğu bildirilmiştir (Giri vd. 2012).



Şekil 4.87. Süspansiyon kültürü

Çizelge 4.19. Bayrampaşa çeşidinde hücre süspansiyon kültürü sonuçları

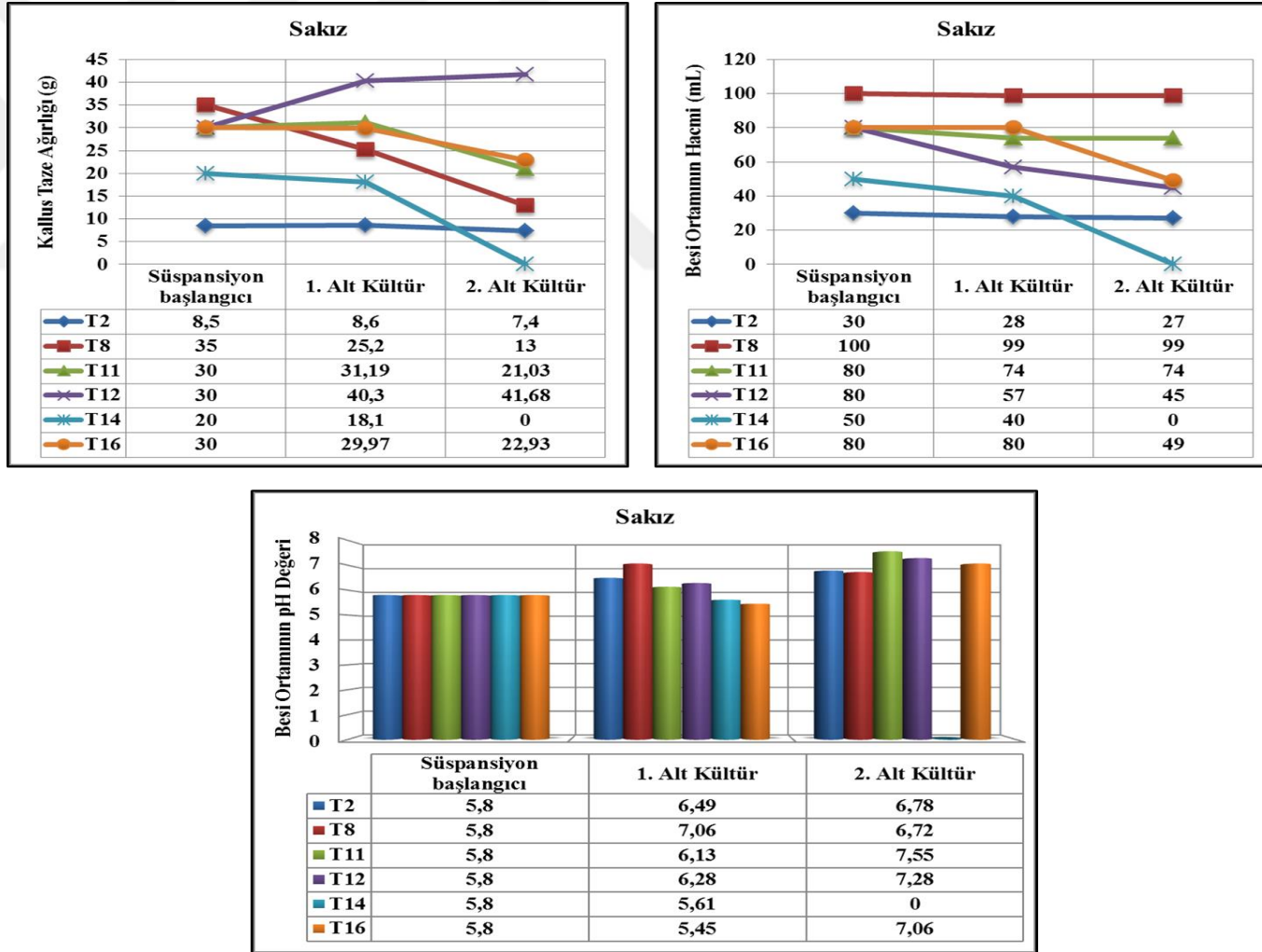
Bayrampaşa	Süspansiyon Başlangıcı			1. Alt Kültür			2. Alt Kültür		
	Besi Ortamları	Ortam miktarı (mL)/ Erlen (mL)	Kültüre alınan kallus gramı (g)	Besi ortamının pH'sı	1. alt kültür sonu besi ortamı miktarı (mL)	1. alt kültür sonu taze ağırlık (g)	1. alt kültür sonu besi ortamının pH'sı	2. alt kültür sonu besi ortamı miktarı (mL)	2. alt kültür sonu taze ağırlık (g)
T7	30/100	2,12	5,8	25	3,25	5,69	23	3,21	7,02
T10	30/100	5,70	5,8	18	12,04	5,70	18	11,45	7,00
	30/100	3,80	5,8	21	7,82	5,50	18	13,93	5,45
T11	30/100	6,20	5,8	23	8,23	5,54	20	11,32	7,33
T12	30/100	2,30	5,8	27	2,77	5,49	27	3,44	4,50
T16	30/100	8,0	5,8	27	8,57	5,73	27	4,01	7,07
T17	30/100	3,0	5,8	27	3,81	5,05	27	2,45	6,88
Hücrelerin yapısı	Krem, açık kahve - yumuşak			Açık kahverengi, yumuşak			Açık kahverengi, yumuşak		



Şekil 4.88. Bayrampaşa çeşidine ait süspansiyon kültürü bulguları

Çizelge 4.20. Sakız çeşidinde hücre süspansiyon kültürü sonuçları

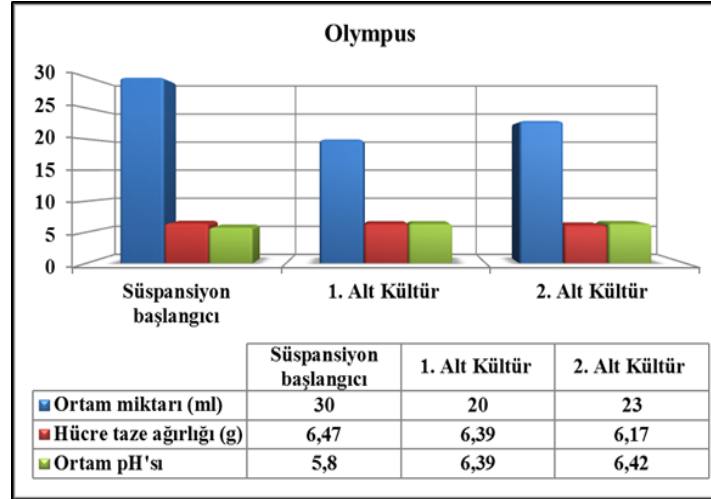
Sakız	Süspansiyon Başlangıcı			1. Alt Kültür			2. Alt Kültür			
	Besi Ortamları	Ortam miktarı (mL)/ Erlen (mL)	Kültüre alınan kallus gramı (g)	Besi ortamının pH'sı	1. alt kültür sonu besi ortamı miktarı (mL)	1. alt kültür sonu taze ağırlık (g)	1. alt kültür sonu besi ortamının pH'sı	2. alt kültür sonu besi ortamı miktarı (mL)	2. alt kültür sonu taze ağırlık (g)	2. alt kültür sonu besi ortamının pH'sı
T2		30/100	8,5	5,8	28	8,60	6,49	27	7,40	6,78
T8		50/250	15	5,8	49	8,20	7,57	49	4,90	7,06
		50/250	20	5,8	50	17,0	6,56	50	8,10	6,38
T11		50/250	20	5,8	41	21,31	6,34	41	9,36	7,56
		30/100	10	5,8	33	9,88	5,93	33	11,67	7,54
T12		50/250	20	5,8	28	30,30	6,65	20	34,74	7,35
T12		30/100	10	5,8	29	10	5,92	25	6,94	7,22
T14		50/250	20	5,8	40	18,10	5,61	enfeksiyon		
T16		50/250	20	5,8	50	20,35	5,47	23	15,49	7,11
		30/100	10	5,8	30	9,62	5,43	26	7,44	7,01
B10		30/100	9	5,8	29	10,05	5,72	26	7,69	7,54
		30/100	5,5	5,8	30	6,40	5,86	30	4,46	7,53
Hücrelerin yapısı	Krem, açık kahve – yumuşak (T ortamları) Krem, açık kahverengi – hafif sert (B10 ortamı)			Krem, açık kahve – yumuşak (T ortamları) Krem, açık kahverengi – hafif sert (B10 ortamı)			Krem, açık kahve – yumuşak (T ortamları) Krem, açık kahverengi – hafif sert (B10 ortamı)			



Şekil 4.89. Sakız çeşidine ait süspansiyon kültürü bulguları

Çizelge 4.21. Olympus F₁ çeşidinde hücre süspansiyon kültürü sonuçları

Olympus F ₁	Süspansiyon Başlangıcı			1. Alt Kültür			2. Alt Kültür		
Besi Ortamı	Ortam miktarı (mL)/ Erlen (mL)	Kültüre alınan kallus gramı (g)	Besi ortamının pH'sı	1. alt kültür sonu besi ortamı miktarı (mL)	1. alt kültür sonu taze ağırlık (g)	1. alt kültür sonu besi ortamının pH'sı	2. alt kültür sonu besi ortamı miktarı (mL)	2. alt kültür sonu taze ağırlık (g)	2. alt kültür sonu besi ortamının pH'sı
T8	30/100	6,47	5,8	20	6,39	6,39	23	6,17	6,42
Kallusun yapısı	Krem, açık kahve – hafif sert			Kahverengi – hafif sert			Kahverengi – hafif sert		

Şekil 4.90. Olympus F₁ çeşidine ait süspansiyon kültürü bulguları

4.2.4.1. Hücre süspansiyon kültürlerinde elisitör uygulamalarına ilişkin bulgular

Çalışmanın süspansiyon kültürü aşamasında, 2. alt kültürden sonra elisitör uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla iki farklı elisitör (metil jasmonat ve kitosan) üçer farklı konsantrasyonda ve üçer farklı uygulama süresinde denemeye alınmıştır. Başlangıçta her bir uygulama için 30 mL besi ortamı içeren 100 mL kapasiteli erlenlere 0,7 g kallus tartılarak eklenmiştir. Uygulamanın ardından hücre süspansiyon kültürleri 130 rpm devir hızı, karanlık ve 25±2 °C koşullarında muhafaza edilmiştir. Besi ortamlarında meydana gelen değişimler (hücre ağırlığı, ortam hacmi, ortam pH'sı) gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.22 – Çizelge 4.24'te sunulmuştur.

Buna göre, Bayrampaşa çeşidine ait metil jasmonat uygulamalarında kallus ağırlıklarında genel anlamda kayıp tespit edilmiş olup, en fazla değişim 200 µM MeJa 24 saat uygulandığında belirlenmiştir. Bununla birlikte kallus ağırlığındaki en az kayıp 200 µM MeJa 48 saat uygulamasında tespit edilmiştir. MeJa uygulamalarında besi ortamlarının hacimlerinde çok dikkat çekici bir değişim kaydedilmezken, pH değerlerinde 24 saat MeJa uygulamasını takiben artış görülmüştür. Benzer durum 100 µM ve 200 µM 48 saat MeJa uygulamasında da görülmüştür. Bununla birlikte denemeye alınan tüm konsantrasyonlarda 72 saat MeJa uygulamaları ile 50 µM 48 saat MeJa uygulamasından sonra ise pH değerlerinin azaldığı kaydedilmiştir (Şekil 4.90).

Sakız çeşidinde MeJa uygulamaları değerlendirildiğinde, kallus ağırlıklarında Bayrampaşa çeşidinde olduğu kadar fazla bir kayıp görülmemiştir. Bununla birlikte en fazla kallus ağırlığı kayıpları kontrol ortamlarında gözlemlenmiştir. Besi ortamı hacimlerinde de Bayrampaşa çeşidine benzer şekilde çok fazla değişim kaydedilmemiştir. Besi ortamlarının MeJa uygulamasından sonraki değişimleri değerlendirildiğinde ise 100 µM 72 saat MeJa uygulaması hariç diğer besi ortamlarının pH değerlerinde artışlar belirlenmiştir (Şekil 4.91).

Kitosan uygulamasının ardından yapılan gözlemlerde elde edilen sonuçlara bakıldığında, genel olarak her iki çeşitte de kallus ağırlıklarında azalmalar ve pH değerlerinde de düşüşler göze çarpmaktadır (Şekil 4.92 ve Şekil 4.93).

Belirtilen elisitör sürelerini tamamladıktan sonra, süspansiyon kültürleri 45 µM por çapı olan süzgeçlerden geçirilmiş ve elde edilen hücreler ayrı ayrı petri kaplarına aktarılmıştır. Ardından, önceden ısısı 65 °C'ye ayarlanmış etüvlere yerleştirilmiş, sabit kuru ağırlıklarına ulaşmaya kadar (yaklaşık 24 saat) bekletilmiştir. Kuruyan hücreler öğütülüp HPLC analizleri için hazırlanmıştır. Yaprak örnekleri için değerlendirilmeye alınan 13 sekonder metabolit, elisitör uygulamasından elde edilen örneklerde araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, belirlenen bu sekonder metabolitler, elisitör uygulamasının ardından çok iz miktarda tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının aksine kallus kültürlerine 200 µM MeJa uygulaması yapan Tanoori vd. (2015), bu uygulama dozu ile maksimum fenolik asit birikimi sağladıklarını ve elde ettikleri bu oranın kontrol grubuna kıyasla 3,96 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar en yüksek flavonoid birikimini ise 100 µM MeJa ile sağladıklarını rapor etmişlerdir. Matkowski (2008), metil jasmonat ve salisilik asit gibi elisitör uygulamaları sayesinde *in vitro* kültürlerde sekonder metabolitlerin birikimini uyarabildiği gibi, bu bileşenlerin miktarlarında artış da sağlanabildiği görüşündedir. Ahmad vd. (2019), *Linum usitatissimum* L. (keten) bitkisinde hücre kültürlerine uyguladıkları farklı

dozlarda kitosanın toplam fenolik madde birikimine olumlu etki ettiğini, bununla birlikte antioksidan aktivitesinde de 1,3 kat artış sağladıklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde *Ocimum basilicum* L. (fesleğen) bitkisinde yaptıkları çalışmada Pandey vd. (2019), MeJa uyguladıkları süspansiyon kültürlerinde kontrol olarak değerlendirdikleri *in vivo* yapraklara kıyasla değerlendirmeye aldıkları biyoaktif bileşenlerin miktarlarında sırasıyla yaklaşık olarak 1,79 ile 3,25 kat artış sağladıklarını rapor etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında da MeJa ile kitosan elisitörleri farklı dozlarda uygulanmış, fakat istenilen düzeyde bir gelişme gözlemlenmemiştir. Bunun sebebi olarak farklı çeşitlerin farklı etkiler sergileyebileceği göz önünde bulundurulmuş olup, uygulanan elisitörlerin niteliğinin, uygulama dozlarının ve uygulamaya maruz kalma sürelerinin önemli etkenler olduğu, bununla birlikte süspansiyon kültürü uygulanırken alt kültür sayısının az olmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, çilekte yapılan bir çalışmada hücre kültürlerinde pektinaz tüketiminin sebebi olarak antosiyaninlerin ve diğer metaolitlerin üretimi olarak gösterilmiştir. Bu durum hücre kümelerinin oluşumu ile sekonder metabolitler arasında bir bağ olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla hücre büyüklüğünün sekonder metabolit birikimini düzenleyebileceği görüşü ortaya çıkmaktadır (Edahiro ve Seki 2006). Bu çalışmada elisitör uygulamaları sonrasında hücre büyüklüklerinde ve ağırlıklarında kayıplar olduğu göz önüne alınırsa, neden sekonder metabolit birikiminde istenilen seviyelere ulaşamadığına dair bir açıklama daha getirilmiş olacaktır.

Çizelge 4.22. 24 saat elisitör uygulamasının ardından hücre süspansiyon kültürlerindeki değişimler

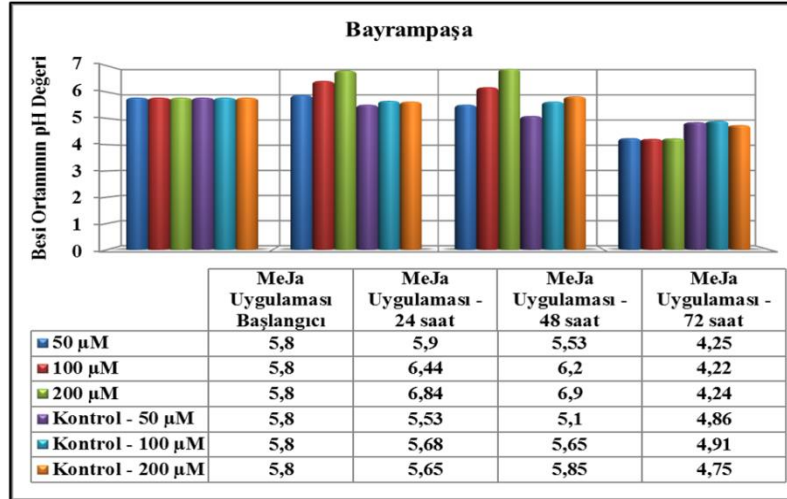
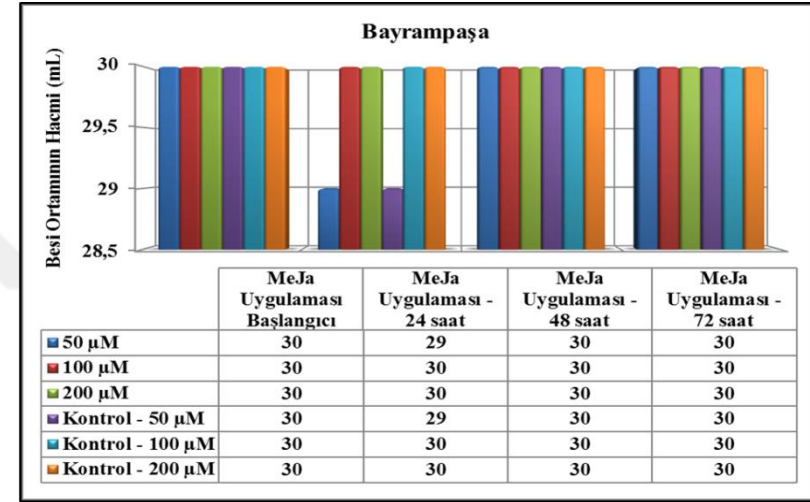
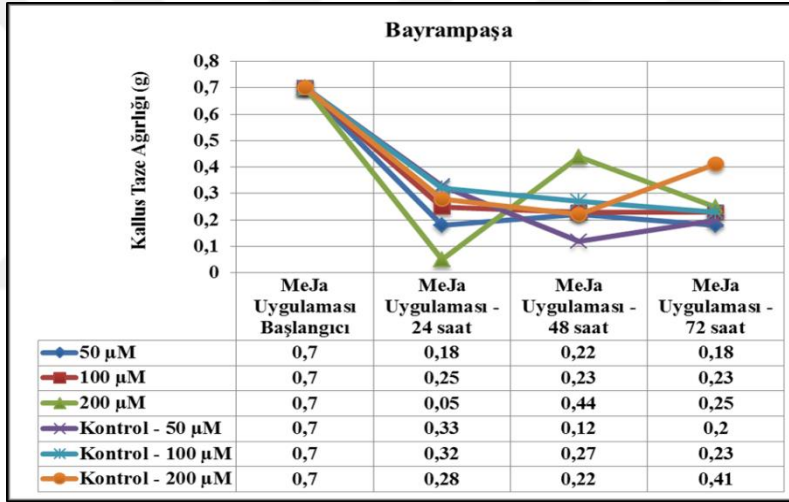
Elisitör Uygulama Kodları		Bayrampaşa			Sakız		
		Taze ağırlık (g)	Kalan besi ortamı hacmi (mL)	24 saatin sonunda besi ortamının pH'sı	Taze ağırlık (g)	Kalan besi ortamı hacmi (mL)	24 saatin sonunda besi ortamının pH'sı
Metil Jasmonat	M1	0,18	29	5,90	0,32	30	5,94
	M2	0,25	30	6,44	0,61	30	6,10
	M3	0,05	30	6,84	0,50	30	5,94
	M4	0,33	29	5,53	0,25	30	4,62
	M5	0,32	30	5,68	0,28	30	5,39
	M6	0,28	30	5,65	0,30	30	5,32
Kitosan	K1	0,19	29	3,72	0,37	24	3,21
	K2	0,29	30	3,42	0,27	30	3,20
	K3	0,41	28	3,55	0,62	30	3,47
	K4	0,18	27	5,37	0,61	29	5,74
	K5	0,24	27,5	4,76	0,73	28,5	5,94
	K6	0,21	30	5,15	0,69	30	5,95

Çizelge 4.23. 48 saat elisitör uygulamasının ardından hücre süspansiyon kültürlerindeki değişimler

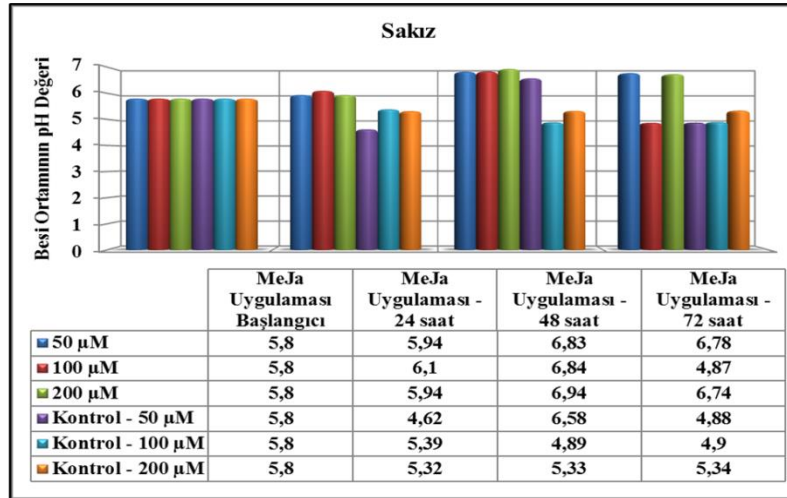
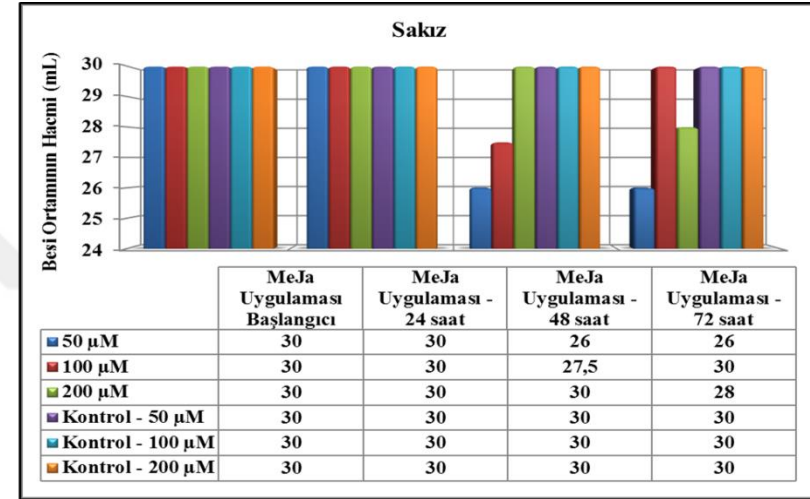
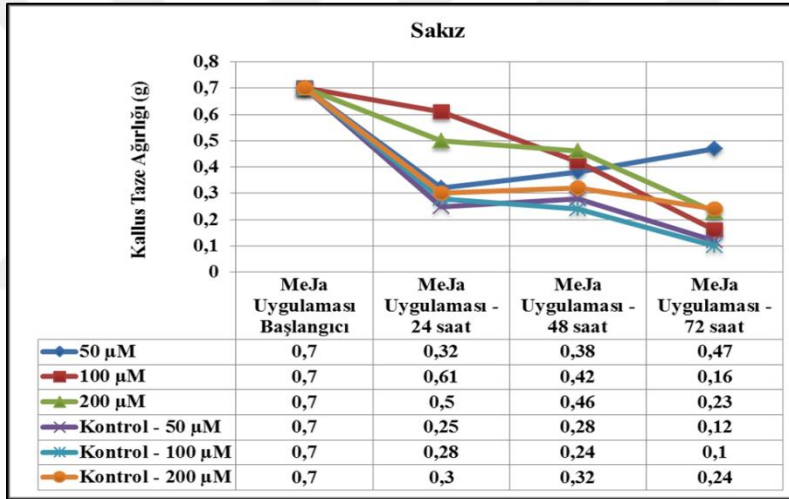
Elisitör Uygulama Kodları		Bayrampaşa			Sakız		
		Taze ağırlık (g)	Kalan besi ortamı hacmi (mL)	48 saatin sonunda besi ortamının pH'sı	Taze ağırlık (g)	Kalan besi ortamı hacmi (mL)	48 saatin sonunda besi ortamının pH'sı
Metil Jasmonat	M7	0,22	30	5,53	0,38	26	6,83
	M8	0,23	30	6,20	0,42	27,5	6,84
	M9	0,44	30	6,90	0,46	30	6,94
	M10	0,12	30	5,10	0,28	30	6,58
	M11	0,27	30	5,65	0,24	30	4,89
	M12	0,22	30	5,85	0,32	30	5,33
Kitosan	K7	0,29	30	3,39	0,15	30	3,37
	K8	0,29	30	3,50	0,49	30	3,24
	K9	0,43	30	3,66	0,26	30	3,36
	K10	0,28	27,5	4,77	0,23	27,5	6,30
	K11	0,26	30	4,83	0,34	28	6,41
	K12	0,39	30	4,84	0,27	30	5,10

Çizelge 4.24. 72 saat elisitör uygulamasının ardından hücre süspansiyon kültürlerindeki değişimler

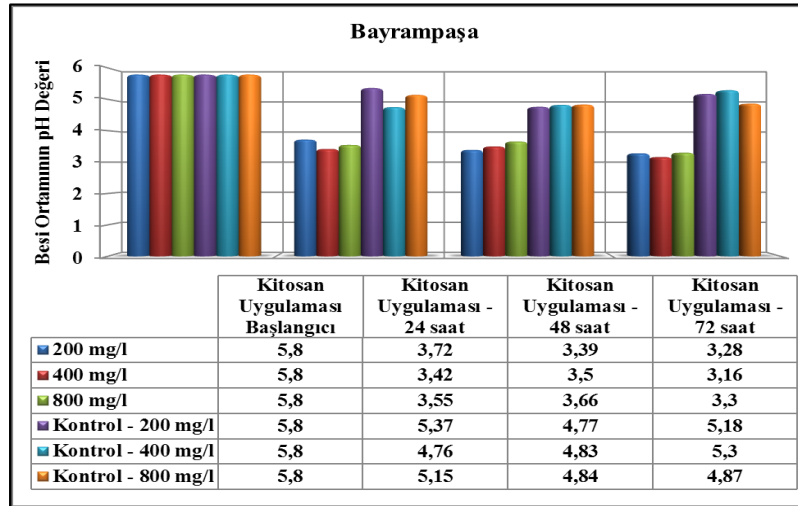
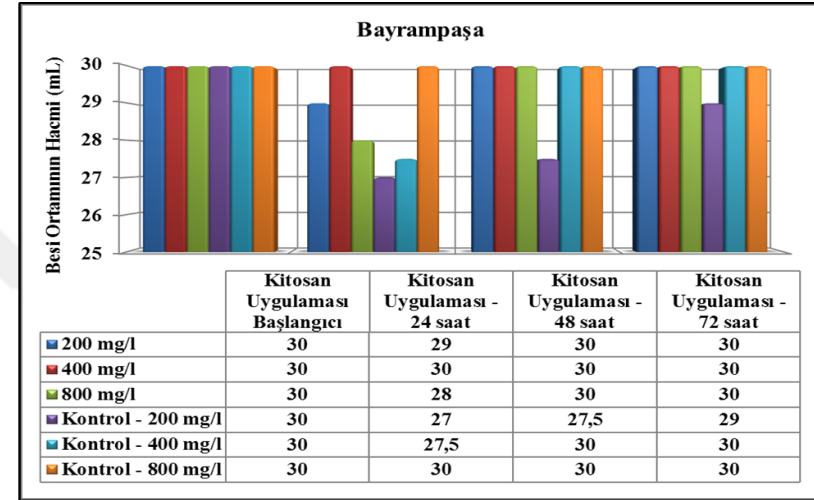
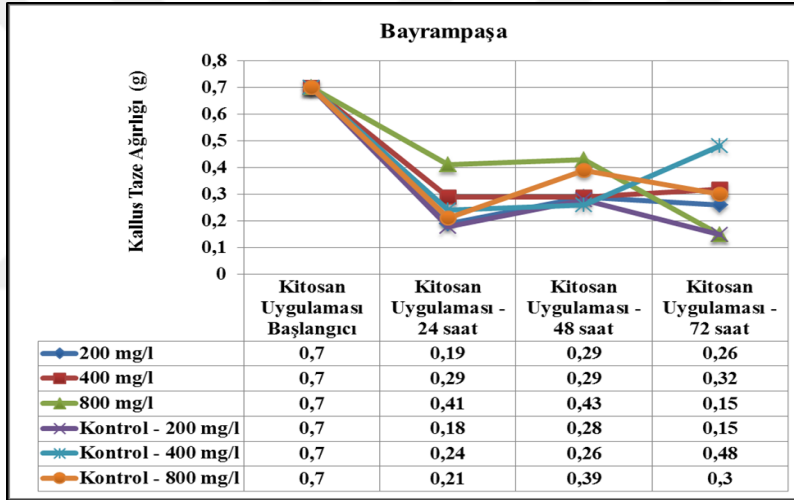
Elisitör Uygulama Kodları	Bayrampaşa			Sakız			
	Taze ağırlık (g)	Kalan besi ortamı hacmi (mL)	72 saatin sonunda besi ortamının pH'sı	Taze ağırlık (g)	Kalan besi ortamı hacmi (mL)	72 saatin sonunda besi ortamının pH'sı	
Metil Jasmonat	M13	0,18	30	4,25	0,47	26	6,78
	M14	0,23	30	4,22	0,16	30	4,87
	M15	0,25	30	4,24	0,23	28	6,74
	M16	0,20	30	4,86	0,12	30	4,88
	M17	0,23	30	4,91	0,10	30	4,90
	M18	0,41	30	4,75	0,24	30	5,34
Kitosan	K13	0,26	30	3,28	0,23	30	3,24
	K14	0,32	30	3,16	0,27	30	3,35
	K15	0,15	30	3,30	0,36	30	3,24
	K16	0,15	29	5,18	0,15	30	4,16
	K17	0,48	30	5,30	0,37	27,5	4,24
	K18	0,30	30	4,87	0,31	27,5	4,72



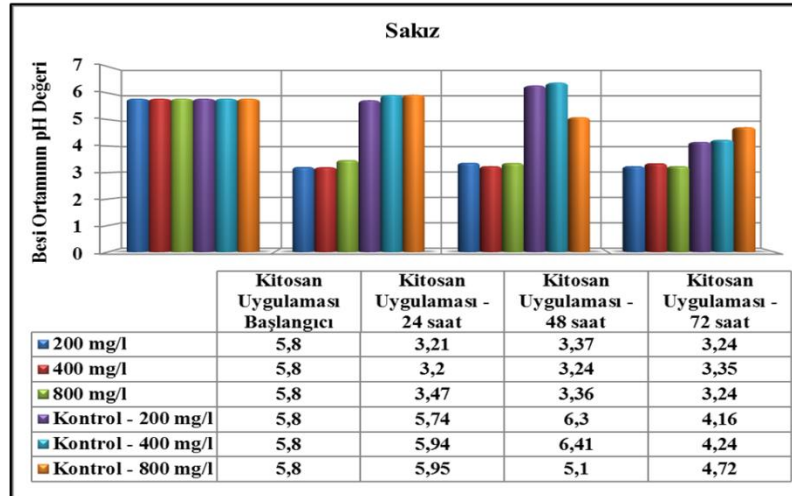
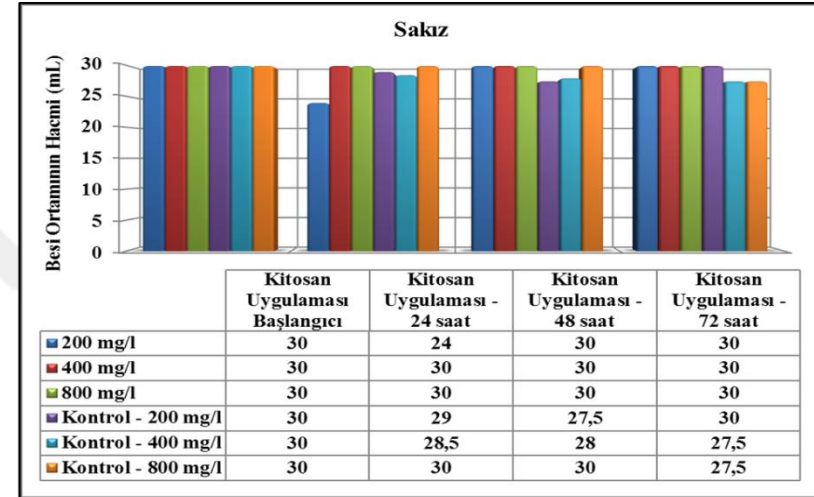
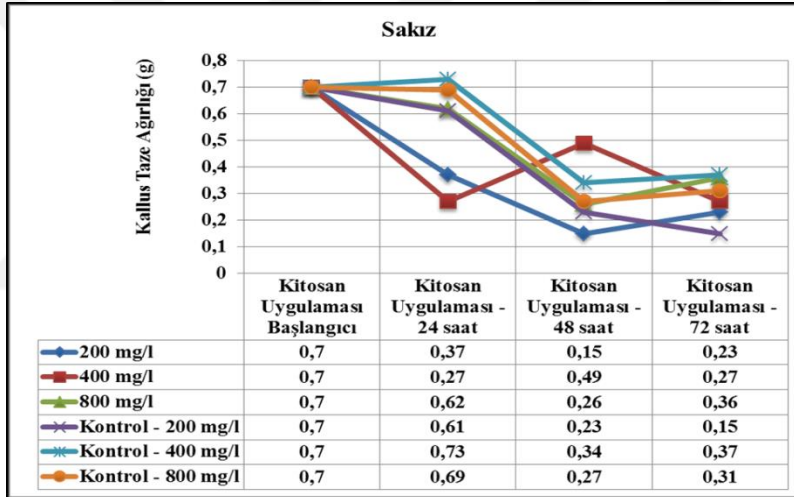
Şekil 4.91. Bayrampaşa çeşidine ait Metil Jasmonat elisitörü uygulamasından elde edilen bulgular



Şekil 4.92. Sakız çeşidine ait Metil Jasmonat elisitörü uygulamasından elde edilen bulgular



Şekil 4.93. Bayrampaşa çeşidine ait Kitosan elisitörü uygulamasından elde edilen bulgular



Şekil 4.94. Sakız çeşidine ait Kitosan elisitörü uygulamasından elde edilen bulgular

4.2.5. Sekonder metabolitlerin tespitine yönelik bulgular

Çalışmada iki farklı pozisyonda (iç ve dış yapraklar), 7 ay boyunca hasat edilen yaprak örnekleri kurutulup, öğütüldükten sonra sekonder metabolitlerinin içeriğine yönelik analizleri yapılabildiği kadar hava almayan kilitli poşetlerde, -18 °C’de muhafaza edilmiştir. Bunun yanı sıra hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen sıvı ve katı kısımların da sekonder metabolitler yönünden analizleri yapılmıştır. Analizler HPLC – DAD cihazı yardımıyla yapılmıştır. Çalışmada değerlendirmeye alınan sekonder metabolitlerin tespitine yönelik yapılan içerik analizlerinin bulgularına yönelik sonuçlar aşağıda çizelgeler halinde sunulmuştur.

Enginar, yüksek besinsel değeri ve polifenol içeriği ile insan sağlığı ve beslenmesi açısından önemli olmakla birlikte, son yıllarda doğal antioksidanlara ve fonksiyonel gıdalara olan artan ilgi karşısında dikkat çeken bitkiler arasında yerini almıştır. Bitkilerin farklı organlarının çeşitli fenolik bileşenleri farklı oranlarda içerebileceği ve bu eğilimin ise bitkilerin gelişim süreçlerindeki fizyolojik farklılıkların biyokimyasal farklılıklara yol açabildiğinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Lattanzio ve Van Sumere 1987; Pandino vd. 2011a). Bununla birlikte çeşit farkı gözetmeksizin, tek bir polifenolün bitkinin spesifik bir kısmında tercihen birikebileceği ve bu durumun nedeninin de o polifenolün bitkide üstlendiği görevle yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Fratianni vd. 2007; Lombardo vd. 2009, 2010, 2012; Pandino vd. 2011a, 2011b). Yine birçok araştırmacı tarafından bildirildiği üzere, bitkilerdeki polifenol profilindeki farklılıklar genetik, hasat zamanı, bitki kısımlarının farklılığı, çevresel faktörlerle birlikte yetiştirme teknikleri, bununla birlikte biyotik ya da abiyotik stres etmenlerinden kaynaklanabileceği gibi farklı ekstraksiyon metotlarının da bu durumu etkilemektedir (Lombardo vd. 2010, 2012; Ciancolini vd. 2013). Bu sebeple bu tez çalışması kapsamında, enginar yapraklarının farmasötik başta olmak üzere birçok alanda kullanım potansiyelini ortaya koymak amacıyla en uygun yaprak hasat zamanı ile birlikte yaprak pozisyonunun çeşitlere göre belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak üç çeşitten (Bayrampaşa, Sakız ve Olympus F₁) Ekim – Nisan ayları arasında iki farklı pozisyondan (iç ve dış) yaprak örnekleri toplanmış ve enginardaki önemli 13 bileşen seçilerek değerlendirilmiştir. Yapılan HPLC analizleri sonucunda elde edilen fenolik içerik değerleri Çizelge 4.25 – Çizelge 4.46’da sunulmuştur.

Arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınan yaprak örneklerinin sekonder metabolit içeriklerinin değerlendirilmesinin yanı sıra elisitör uygulaması yapılmış olan süspansiyon kültürleri de sekonder metabolit içerikleri bakımından incelenmiştir. Ancak elisitör uygulamalarından istenilen sonuçlara ulaşılamamış, belirlenen sekonder metabolitlerin süspansiyon kültürlerindeki varlığını değerlendirmek amacıyla bu kültürlerden elde edilen materyallerde HPLC analizleri uygulanmıştır. Olympus F₁ çeşidinin kallus ve süspansiyon kültürlerinden elde edilen değerler oldukça düşük kaldığı için bu çeşit değerlendirmeye alınamamış olup, Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin kallus ve süspansiyon kültürleri analize tabi tutulmuştur. Elde edilen verilere ait istatistiksel sonuçlar Çizelge 4.51 – Çizelge 4.63’te sunulduğu gibidir.

Çalışmada, yaprak pozisyonlarına göre çeşitlerin 3-O-kafeoilkinik asit değerlerine bakıldığında, hem iç yapraklarda (8286 mg kg⁻¹) hem de dış yapraklardaki (6866 mg kg⁻¹) değerlerde Sakız çeşidinin üstünlüğü görülmektedir (Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26). Bunu sırasıyla Bayrampaşa ve Olympus F₁ takip etmektedir. En düşük 3-

O-kafeoilkinik asit değerlerinin ise iç yapraklarda Ekim (132,69 mg kg⁻¹), dış yapraklarda ise Kasım aylarında (147,74 mg kg⁻¹) toplanan Sakız çeşidine ait olduğu belirlenmiştir. Değerlendirilmeye alınan aylar kendi arasında incelendiğinde Mart ayında toplanan iç ve dış yaprakların 3-*O*-kafeoilkinik asit değerlerinin diğer aylara göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte iç yapraklardan elde edilen 3-*O*-kafeoilkinik asit değerinin (3088,60 mg kg⁻¹) dış yapraklara (2772,70 mg kg⁻¹) göre daha fazla olduğu da belirlenmiştir. Nouraei vd. (2018) stres koşullarının belirledikleri bileşenler üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, en fazla bulunan fenolik asidin stres faktörü olmayan koşullarda 3-*O*-kafeoilkinikasit (klorogenik asit) olduğunu ve 481 mg kg⁻¹ olarak tespit ettiklerini, stres koşullarında ise bu miktarın 1198 mg kg⁻¹ değerine yükseldiğini bildirmişlerdir. Görüldüğü gibi araştırmacılar stres koşulları altında klorogenik asit miktarında artış sağladıklarını belirtmiş olmalarına rağmen, bu tez çalışmasından elde edilen klorogenik asit değerlerinin daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte Lombardo vd. (2010) klorogenik asidin enginarlarda asıl olarak bulunduğu yerin reseptakl ve gövde olduğunu belirtmişlerdir. Klorogenik asit ince bağırsakta çok zayıf bir şekilde emilen, bununla birlikte antioksidan ve antikarsinojenik özellikleri bakımından dikkat çekici olan (Gonthier vd. 2003; Fratianni vd. 2007) ve enginarın beslenme ile alakalı polifenollerine atfedilen biyolojik özelliklerinden sorumlu biyoaktif bileşenlerin başında gelmektedir (Rechner vd. 2002; Gonthier vd. 2003; Fratianni vd. 2007). Bu kadar değerli bir bileşiğin enginarın sadece yenilen kısımlarında değil yenilmeyen kısımlarında da bulunması, bu bitkinin farklı alanlara yönelik kullanım potansiyelini arttırdığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.25. Çeşitlere göre iç yaprakların 3-O-kafeoilkinik asit değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	1654,81±17,20 ^D	132,69±2,19 ^S	345,00±5,06 ^L	710,83±737,38 ^F
2018 Kasım	431,27±2,05 ^J	204,64±4,07 ^Q	399,12±1,35 ^K	345,01±109,69 ^g
2018 Aralık	1326,20±9,28 ^F	261,56±2,40 ^N	1419,53±6,40 ^E	1002,43±575,41 ^d
2019 Ocak	5569,99±3,34 ^B	182,33±2,39 ^R	1074,54±17,81 ^H	2275,62±2582,82 ^c
2019 Şubat	216,85±0,76 ^P	5443,09±5,09 ^C	1348,01±2,20 ^F	2335,98±2459,34 ^b
2019 Mart	318,98±0,65 ^M	8286,17±21,58 ^A	660,65±2,44 ^I	3088,60±4028,93 ^a
2019 Nisan	1200,61±3,46 ^G	340,43±1,62 ^L	229,33±1,57 ^O	590,12±475,48 ^e
Çeşit Ortalamaları	1531,24±1792,52 ^b	2121,56±3211,95 ^a	782,31±475,60 ^c	1478,37±2160,85

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.26. Çeşitlere göre dış yaprakların 3-O-kafeoilkinik asit değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	2920,45±40,36 ^B	460,19±495,61 ^{F-J}	732,59±10,85 ^{DE}	1371,08±1226,64 ^b
2018 Kasım	283,42±3,45 ^{F-J}	147,74±3,91 ^J	207,80±1,68 ^{HIJ}	212,98±60,85 ^d
2018 Aralık	581,66±5,89 ^{EF}	158,67±7,86 ^{IJ}	229,63±3,15 ^{HIJ}	323,32±202,66 ^d
2019 Ocak	1540,68±29,86 ^{BC}	207,405±1,66 ^{HIJ}	308,29±1,66 ^{F-J}	685,45±664,12 ^c
2019 Şubat	188,46±0,78 ^{HIJ}	903,81±19,38 ^{CDE}	483,44±1,08 ^{EF}	525,24±321,66 ^c
2019 Mart	267,58±0,68 ^{G-J}	6866,82±24,99 ^A	1183,70±7,97 ^{CD}	2772,70±3197,66 ^a
2019 Nisan	357,29±1,09 ^{FGH}	323,91±0,97 ^{F-I}	203,52±0,82 ^{HIJ}	294,90±72,35 ^d
Çeşit Ortalamaları	877,08±974,48 ^b	1295,50±2377,84 ^a	478,42±351,21 ^c	883,67±1498,99

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

4-*O*-kafeoilkinik asit değerleri incelendiğinde benzer bir eğilim olduğu görülmektedir. Çeşit bazında incelendiğinde Sakız çeşidinin üstün olduğu, en yüksek 4-*O*-kafeoilkinik asit değerlerinin Mart ayında toplanan Sakız çeşidinin iç (1216,93 mg kg⁻¹) ve dış yapraklarında (972,03 mg kg⁻¹) elde edildiği belirlenmiştir. Bununla birlikte en düşük 4-*O*-kafeoilkinik asit değerleri ise Ocak ayında toplanan yine Sakız çeşidine ait iç ve dış yapraklarda belirlenmiştir. Mart ayında toplanan iç ve dış yapraklardaki 4-*O*-kafeoilkinik asit değerleri karşılaştırıldığında çok fazla fark olmamakla birlikte yine dış yapraklara kıyasla iç yaprakların üstün olduğu görülmektedir (Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28). Lombardo vd. (2010), yaptıkları çalışmada 4-*O*-kafeoilkinik asit miktarının çeşide ve bitki kısımlarına göre farklılık gösterdiğini ve 16 – 574 mg kg⁻¹ arasındaki değerlerde tespit edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar en yüksek değerde tespit ettikleri (574 mg kg⁻¹) bu bileşiğin çiçek sapında belirlediklerini ve iç braketlerdekinden daha yüksek bir değer olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde enginarın yenilmeyen kısmında bu bileşiğin değerinin dikkate değer olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan çeşitlerin 5-*O*-kafeoilkinik asit değerleri incelendiğinde Sakız çeşidinin daha iyi sonuçlar verdiğini (iç yaprak 10924,21 mg kg⁻¹; dış yaprak 9614,81 mg kg⁻¹) söylemek mümkündür. Değerlendirmeye alınan aylar arasında inceleme yapıldığında Mart ayının diğerlerine göre daha üstün olduğu bulunurken, iç yaprakların (3946,93 mg kg⁻¹) dış yapraklara (3796,80 mg kg⁻¹) oranla daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. En düşük 5-*O*-kafeoilkinik asit değerleri ise, Olympus F₁ çeşidinin Nisan ayında toplanan iç yapraklarında, Sakız çeşidinin Aralık ayında toplanan dış yapraklarında bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.29 ve Çizelge 4.30). Birçok araştırmacı 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit ile birlikte 5-*O*-kafeoilkinik asidin, genotipe göre farklılık göstermekle birlikte, enginarda en fazla varlık gösteren bileşenler olduğunu bildirmektedir (Schütz vd. 2004; Romani vd. 2006; Coinu vd. 2007; Pandino vd. 2011a; Sihem vd. 2015). Bu tez çalışmasında da benzer bulgular elde edilmiş olup, Scavo vd. (2019) çalışmasında olduğu gibi metanol ekstraksiyonu sonucunda 5-*O*-kafeoilkinik asit en fazla bulunan bileşen olarak tespit edilmiştir. Sihem vd. (2015), yapraklardaki kafeoilkinik asit miktarını genel olarak braketlerdekinden ve çiçek sapındakinden daha az bulduklarını fakat bunun diğer çalışmalardan farklı bir sonuç olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, yapraklarda tespit ettikleri düşük bileşen miktarının sebebini çalışmalarında genç yaprakları kullanmalarına, diğer araştırmacıların (Wang vd. 2003) ise daha olgun yaprakları analiz ettiklerine dayandırmışlardır. Bu tez çalışması kapsamında farklı pozisyonlarda toplanan yapraklar değerlendirilmiş olup, değerlendirilen bu yaprak pozisyonları bakımından iç yaprakların dış yapraklara kıyasla daha genç yapraklar olduğu varsayılırsa, bu çalışmanın sonucunda genç yaprakların 5-*O*-kafeoilkinik asit içeriğinin daha yüksek olduğu söylenebilir. Pandino vd. (2013a) enginar yapraklarında fenolik bileşen miktarındaki değişimleri inceledikleri çalışmalarında, 5-*O*-kafeoilkinik asit değerini 4811 mg kg⁻¹ olarak belirlediklerini bildirmişlerdir. Reaktif oksijen türlerinin tetiklediği kanserlerin gelişmelerini önlemek adına, sağlık açısından etkili işlevleri olan doğal antioksidanlar arasında sayılan kafeoilkinik asitler, oldukça önemli bir potansiyele sahiptir (Fukumoto ve Mazza 2000). Bunun yanı sıra bu bileşenlerin gıdaların raf ömürleri üzerinde olumlu katkıları bulunmakta, dolayısıyla bu değerli bileşenlerin gıda sektörünün yanı sıra ilaç sektörü için de özel bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (Shahidi 1997; Holst ve Williamson 2008; Pandino vd. 2013a).

Çizelge 4.27. Çeşitlere göre iç yaprakların 4-O-kafeoilkinik asit değerleri

İç Yapraklar				
Değerlendirilen Aylar	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	277,60±4,29 ^E	128,32±0,47 ^{LM}	246,20±3,23 ^G	217,37±70,43 ^d
2018 Kasım	202,74±10,90 ^I	188,97±3,78 ^J	434,85±10,06 ^D	275,52±123,76 ^b
2018 Aralık	231,74±3,05 ^H	170,37±2,06 ^K	237,53±10,18 ^{GH}	213,21±33,63 ^d
2019 Ocak	860,85±8,60 ^B	79,50±1,56 ^O	264,43±1,10 ^F	401,59±365,24 ^a
2019 Şubat	87,92±1,34 ^N	581,16±7,80 ^C	198,52±7,83 ^I	289,20±231,55 ^c
2019 Mart	126,38±2,53 ^M	1216,93±7,65 ^A	125,57±1,49 ^M	489,62±563,38 ^a
2019 Nisan	264,57±5,31 ^F	133,97±0,62 ^L	122,84±0,86 ^M	173,79±70,53 ^e
Çeşit Ortalamaları	293,11±249,72 ^a	357,03±398,44 ^a	232,85±101,47 ^b	294,33±275,69

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.28. Çeşitlere göre dış yaprakların 4-O-kafeoilkinik asit değerleri

Dış Yapraklar				
Değerlendirilen Aylar	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	400,02±10,16 ^B	67,75±6,09 ^{IJ}	142,96±0,39 ^{DEF}	203,57±155,93 ^b
2018 Kasım	179,38±4,50 ^{CDE}	120,13±2,20 ^{EFG}	136,72±3,03 ^{DEF}	145,41±27,46 ^b
2018 Aralık	160,83±4,04 ^{DE}	57,63±4,85 ^J	101,26±8,21 ^{FGH}	106,57±46,56 ^c
2019 Ocak	241,04±3,23 ^C	1,23±0,86 ^K	87,18±3,97 ^{GHI}	109,82±108,69 ^d
2019 Şubat	91,63±3,86 ^{GHI}	143,98±2,34 ^{DEF}	64,11±3,18 ^{IJ}	99,90±36,37 ^c
2019 Mart	79,72±1,11 ^{HIJ}	972,03±5,81 ^A	158,57±1,18 ^{DE}	403,44±441,84 ^a
2019 Nisan	195,39±9,27 ^{CD}	147,70±1,73 ^{DEF}	104,50±3,90 ^{FGH}	149,19±40,919 ^b
Çeşit Ortalamaları	192,57±103,49 ^b	215,78±324,36 ^a	113,61±32,49 ^c	173,99±197,60

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.29. Çeşitlere göre iç yaprakların 5-O-kafeoilkinik asit değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	2762,97±8,44 ^C	63,95±2,15 ^N	239,64±4,10 ^J	1022,19±1350,70 ^d
2018 Kasım	424,26±12,03 ^I	76,32±1,31 ^M	75,23±2,68 ^M	191,93±180,04 ^f
2018 Aralık	1869,06±6,29 ^E	54,39±2,05 ^O	2017,08±4,32 ^D	1313,51±977,56 ^c
2019 Ocak	8271,30±9,21 ^B	50,71±1,62 ^P	1504,09±6,92 ^G	3275,36±3924,04 ^b
2019 Şubat	65,66±3,60 ^N	8200,97±3,59 ^B	1947,02±8,21 ^{DE}	3404,55±3809,37 ^a
2019 Mart	127,36±1,37 ^K	10924,21±34,71 ^A	789,23±8,41 ^H	3946,93±5412,70 ^a
2019 Nisan	17776,91±31,69 ^F	81,33±0,70 ^L	44,91±1,29 ^Q	634,38±885,26 ^c
Çeşit Ortalamaları	2185,36±2758,75 ^b	2778,84±4516,01 ^a	945,31±837,07 ^c	1969,84±3114,41

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.30. Çeşitlere göre dış yaprakların 5-O-kafeoilkinik asit değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	5060,85±11,29 ^B	62,32±2,02 ^O	1131,24±3,79 ^F	2084,80±2354,28 ^b
2018 Kasım	237,36±6,40 ^I	61,30±2,40 ^O	37,47±2,26 ^Q	112,04±97,70 ^g
2018 Aralık	667,55±8,21 ^G	35,83±0,42 ^Q	102,48±0,96 ^K	268,62±310,46 ^c
2019 Ocak	2360,76±3,45 ^C	80,15±1,44 ^M	261,23±1,98 ^H	900,71±1133,84 ^c
2019 Şubat	49,96±3,48 ^P	1244,63±27,64 ^E	635,11±5,74 ^G	643,23±534,45 ^d
2019 Mart	70,07±0,67 ^N	9614,81±21,90 ^A	1705,52±2,34 ^D	3796,80±4565,58 ^a
2019 Nisan	210,71±2,91 ^J	106,17±0,63 ^K	87,61±3,32 ^L	134,83±59,39 ^f
Çeşit Ortalamaları	1236,75±1798,82 ^b	1600,74±3421,29 ^a	565,81±612,52 ^c	1134,43±2246,01

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Sinarin (1,3-*O*-dikafeoilkinik asit) değerlerine bakıldığında iç yaprak değerleri bakımından Sakız ve Bayrampaşa çeşitleri Olympus F₁ çeşidine göre üstünlük gösterirken, dış yapraklara ait değerler incelendiğinde Sakız çeşidi diğerlerine göre daha üstün bulunmuştur. Bununla birlikte en yüksek 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit değerleri Mart ayında toplanan Sakız çeşidine ait iç yapraklarda (644,72 mg kg⁻¹), Mart ayında toplanan Sakız çeşidi dış yaprakları (475,66 mg kg⁻¹) ile Ekim ayında toplanan Bayrampaşa dış yapraklarında (327,55 mg kg⁻¹) tespit edilmiştir. En düşük 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit değerlerinin ise Ekim ayında toplanan Olympus F₁ çeşidinin iç yapraklarında ve Aralık ayında toplanan Bayrampaşa çeşidinin dış yapraklarında bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.31 ve Çizelge 4.32). Lombardo vd. (2010) çalışmalarında en yüksek sinarin miktarını 90 mg kg⁻¹ miktarında çiçek sapında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise Nouraei vd. (2018), stres olmayan koşullarda 155 mg kg⁻¹ olarak belirledikleri sinarin miktarının, dereceli olarak arttırılan stres koşulları altında sinarin miktarında da artış görüldüğünü ve bileşenin 498 mg kg⁻¹ miktarına kadar ulaştığını bildirmişlerdir. Sinarin, enginarın karakteristik bir fenolik bileşeni olup, koleretik etkisiyle yani karaciğerden salgılanan safranin hacmini arttırıcı etki göstermesiyle bilinmektedir (Gebhardt 1996). Varlığı ve miktarı genotip, bitki kısımları vb. gibi birçok faktöre göre değişmekte olup, birçok araştırmacıya göre enginarda en fazla bulunan dikafeoilkinik asit 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit olarak da bilinen sinarindir (Schütz vd. 2006; Wang vd. 2003; El-Senousy vd. 2014). Bu çalışma kapsamında yapılan analizler sonucu elde edilen bulgular ışığında ülkemizin önemli çeşitlerinden Sakız çeşidinin gıda olarak tüketiminin yanı sıra, atık madde olarak kabul gören yapraklarının da sinarin potansiyeli ortaya konarak ilaç endüstrisinde kullanımının da mümkün olabileceği görülmüştür.

Kafeik asit içeriği çeşitler bazında değerlendirildiğinde, Bayrampaşa çeşidi iç yapraklar bakımından daha iyi sonuçlar verirken, Sakız çeşidi dış yapraklardaki değerleriyle daha üstün bulunmuştur. Aylar kendi aralarında değerlendirildiğinde, iç yapraklarda Aralık ve Nisan ayları hariç değerlendirilmeye alınan diğer aylar arasında istatistiksel anlamda önemli farklılıklar bulunmazken, dış yapraklarda ise Ekim ayının en ideal ay olduğu belirlenmiştir. Ekim (85,73 mg kg⁻¹) ve Ocak (54,24 mg kg⁻¹) aylarında Bayrampaşa çeşidine ait iç yapraklar ile Şubat (59,38 mg kg⁻¹) ve Mart (82,57 mg kg⁻¹) aylarında Sakız çeşidine ait iç yaprakların diğer aylara göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. En düşük kafeik asit değerleri ise Nisan ayı Olympus F₁ çeşidi iç yaprakları ile Ocak ayı Sakız çeşidi dış yapraklarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.33 ve Çizelge 4.34). Nouraei vd. (2018) yaptıkları çalışmada kafeik asit miktarının stres olmayan koşullarda 172 mg kg⁻¹ olarak tespit ettiklerini, stres koşulları altında ise bu miktarda da artış sağlandığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.31. Çeşitlere göre iç yaprakların 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit değerleri

İç Yapraklar				
Değerlendirilen Aylar	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	251,81±2,82 ^B	20,45±0,50 ^{EF}	0,69±0,76 ^I	90,98±124,89 ^b
2018 Kasım	36,24±1,02 ^{DE}	20,19±1,18 ^{EF}	9,89±0,74 ^F	22,11±11,90 ^e
2018 Aralık	15,66±0,00 ^{EF}	Belirlenemedi	14,62±0,59 ^{EF}	10,09±7,83 ^f
2019 Ocak	185,16±2,29 ^B	0,86±0,67 ^{HI}	2,96±0,59 ^G	62,99±94,63 ^c
2019 Şubat	1,35±0,34 ^{GH}	227,40±6,76 ^B	34,18±2,81 ^{DE}	87,64±109,29 ^b
2019 Mart	15,81±1,02 ^{EF}	644,72±4,87 ^A	0,57±0,25 ^I	220,36±328,77 ^a
2019 Nisan	102,32±1,93 ^{BC}	63,17±0,59 ^{CD}	2,90±0,50 ^G	56,13±44,80 ^d
Çeşit Ortalamaları	86,91±93,73 ^a	139,54±227,33 ^a	9,40±11,66 ^b	78,61±148,80

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.32. Çeşitlere göre dış yaprakların 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit değerleri

Dış Yapraklar				
Değerlendirilen Aylar	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	327,55±1,78 ^A	28,60±1,08 ^{CDE}	88,93±0,92 ^B	148,36±141,40 ^a
2018 Kasım	13,79±0,76 ^E	32,98±1,27 ^{B-E}	1,15±0,75 ^G	15,97±14,35 ^c
2018 Aralık	0,93±1,11 ^G	18,50±0,59 ^E	3,78±0,59 ^F	7,73±8,45 ^d
2019 Ocak	78,02±2,37 ^{BC}	87,31±1,87 ^{BC}	1,05±0,60 ^G	55,46±42,37 ^b
2019 Şubat	3,57±1,44 ^F	56,41±0,33 ^{BCD}	0,75±0,51 ^G	20,24±28,05 ^{cd}
2019 Mart	32,39±0,68 ^{B-E}	475,66±5,65 ^A	22,27±1,10 ^{DE}	176,77±231,57 ^a
2019 Nisan	31,52±0,34 ^{B-E}	66,15±1,10 ^{BCD}	4,27±0,68 ^F	33,98±27,74 ^b
Çeşit Ortalamaları	69,68±112,07 ^b	109,37±156,87 ^a	17,46±31,15 ^c	65,50±116,38

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.33. Çeşitlere göre iç yaprakların kafeik asit değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	85,73±0,74 ^A	10,92±0,11 ^{B-E}	11,19±0,41 ^{B-E}	35,94±38,56 ^a
2018 Kasım	22,72±0,50 ^B	23,44±0,64 ^B	14,33±0,22 ^{BCD}	20,16±4,54 ^a
2018 Aralık	16,10±0,32 ^{BCD}	0,85±0,17 ^F	17,67±0,44 ^{BCD}	11,54±8,31 ^b
2019 Ocak	54,24±2,16 ^A	24,02±0,09 ^B	5,57±0,49 ^E	27,94±21,99 ^a
2019 Şubat	20,67±1,11 ^{BCD}	59,38±1,32 ^A	21,21±2,17 ^{BC}	33,75±19,88 ^a
2019 Mart	9,38±0,35 ^{CDE}	82,57±1,50 ^A	25,33±0,35 ^B	39,09±34,43 ^a
2019 Nisan	20,71±0,38 ^{BCD}	9,01±0,05 ^{DE}	0,36±0,41 ^G	10,02±9,13 ^c
Çeşit Ortalamaları	32,79±26,27 ^a	30,03±28,72 ^b	13,66±8,42 ^c	25,49±23,99

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.34. Çeşitlere göre dış yaprakların kafeik asit değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalamaları
2018 Ekim	100,03±0,52 ^{AB}	16,17±0,52 ^{EF}	62,01±0,23 ^{BC}	59,40±37,55 ^a
2018 Kasım	14,43±0,14 ^F	25,86±0,53 ^{DE}	6,00±0,54 ^H	15,43±8,92 ^c
2018 Aralık	13,68±0,20 ^{FG}	20,11±0,47 ^{EF}	8,14±0,60 ^{GH}	13,98±5,37 ^c
2019 Ocak	40,52±0,24 ^{CD}	0,28±0,05 ^J	3,51±0,73 ^I	14,77±20,00 ^e
2019 Şubat	14,52±0,64 ^F	42,06±0,43 ^{CD}	0,55±0,43 ^J	19,04±18,89 ^d
2019 Mart	8,22±0,29 ^{GH}	133,07±1,27 ^A	20,97±0,19 ^{EF}	54,08±61,44 ^b
2019 Nisan	0,36±0,17 ^J	12,22±0,94 ^{FG}	12,19±1,77 ^{FG}	8,26±6,18 ^e
Çeşit Ortalamaları	27,39±32,97 ^b	35,68±43,05 ^a	16,19±20,43 ^c	26,42±33,62

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Sakız çeşidinin hem iç hem de dış yaprakları *p*-kumarik asit değeri bakımından incelendiğinde Mart ayında en yüksek değerleri verdiği görülmektedir. Bu ayda toplanan Sakız çeşidi iç ($1664,71 \text{ mg kg}^{-1}$) ve dış ($1594,07 \text{ mg kg}^{-1}$) yapraklar birlikte değerlendirildiğinde ise yaprak pozisyonu bakımından iç yaprakların daha ideal olduğu belirlenmiştir. En düşük *p*-kumarik asit değerlerinin ise Aralık ayında toplanan Sakız çeşidi iç yapraklarında, Ocak ayında toplanan Olympus F₁ çeşidi dış yapraklarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.35 ve Çizelge 4.36). Nouraei vd. (2018) ise *p*-kumarik asit değerini 145 mg kg^{-1} olarak tespit ettikleri çalışmalarında, bu bileşeni sadece yapraklarda belirlediklerini bildirmişlerdir. Klorogenik aside benzer şekilde *p*-kumarik asit de sağlığı iyileştirme bakımından önemli özelliklere sahiptir. Özellikle, antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle, son yıllarda dikkate değer bir hidroksisanimik asit olarak ortaya çıkmıştır (Fратиanni vd. 2007).

Çeşitlerin sahip olduğu ferulik asit değerleri bakımından değerlendirilen diğer sekonder bileşenlerin çoğunda olduğu gibi yine Sakız çeşidinin üstün olduğu belirlenmiştir. Sakız çeşidi ferulik asit bakımından daha iyi sonuçlar vermekle birlikte, iç yaprakları ile dış yapraklarının ferulik asit içerikleri farklı aylarda farklı sonuçlar vermiştir. Buna göre iç yapraklarda Mart ayı değerleri ön plana çıkarken, dış yapraklarda ise Ocak ayı değerleri önemli bulunmuştur (Çizelge 4.37 ve Çizelge 4.38). Bitki hücre duvarının biyolojik ve yapısal olarak önemli bir bileşeni olan ferulik asit ve bazı türevleri birtakım radikal zincir reaksiyonlarını durdurabilir, böylece UV radyasyonuna karşı koruma sağlayabilir (Kroon vd. 1999; Brenelli de Paiva vd. 2013). Bunun yanı sıra antimikrobiyal, antiinflamatuvar, hepatoprotektif, nöroprotektif, antikarsinojenik, antidiyabetik, antikolesterolemik, UV-koruyucu ve radyoprotektif etkiler gösteren bileşenler olduğu yapılan birçok çalışmayla ortaya koyulmuştur. Ferulik asidin bahsedilen çeşitli farmakolojik özelliklerinin çoğu ile serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırma kabiliyetleri arasında sıkı ilişki olduğu söylenebilir (Brenelli de Paiva vd. 2013). Yine, ferulik asit ile ilgili olarak, Lin vd. (2008), cildin ve saçın ışıktan korunmasını arttırmak, erken ve doğal yaşlanma ile savaşmak için piyasada bulunan güneşten koruyucu kremlerde katkı maddesi olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

1,5-*O*-dikafeoilkinik asit değerleri incelendiğinde, Sakız çeşidinin Mart ayında toplanan hem iç ($2197,48 \text{ mg kg}^{-1}$) hem de dış yapraklarında ($2998,12 \text{ mg kg}^{-1}$) daha olumlu sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bahsi geçen çeşit ve ayda iç ve dış yapraklar arasındaki ilişki değerlendirildiğinde ise dış yapraklardan elde edilen değerler iç yapraklara kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir (Çizelge 4.39 ve Çizelge 4.40). Birçok araştırmacıya göre enginarın sahip olduğu fenolikler bakımından incelendiğinde, çeşide göre değişmekle birlikte 5-*O*-kafeoilkinik asidin yanı sıra 1,5-*O*-dikafeoilkinik asidin baskın bileşen olduğu görüşü yaygındır (Hausler vd. 2002; Wang vd. 2003; Schütz vd. 2004; Romani vd. 2006; Pandino vd. 2010, 2013a).

Çalışmada değerlendirilmeye alınan bir diğer sekonder metabolit narirutin olup, değerler çeşitler bazında incelendiğinde Sakız çeşidinin üstün olduğu tespit edilmiştir. Yaprakların toplandığı aylara göre değerlendirildiğinde ise yine Sakız çeşidi için, iç yapraklar bakımından Mart ayı ($1371,05 \text{ mg kg}^{-1}$), dış yapraklar bakımından ise Nisan ayı ($570,43 \text{ mg kg}^{-1}$) daha üstün bulunmuştur (Çizelge 4.41 ve Çizelge 4.42). Lombardo vd. (2010) yaptıkları çalışmada genotipe bağlı olarak enginarın farklı kısımlarında biriken fenolik bileşenlerin farklılığından söz etmişler ve narirutin bileşeninin

çiçeklenme kısmında hiç tespit edilemediğini, ancak bununla birlikte yapraklarda tespit ettikleri 586 mg kg^{-1} narirutin miktarının en baskın flavonoid olduğunu bildirmişlerdir.



Çizelge 4.35. Çeşitlere göre iç yaprakların *p*-kumarik asit değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	288,27±0,76 ^E	10,84±0,48 ^P	22,49±0,33 ^N	107,20±140,35 ^e
2018 Kasım	53,16±1,32 ^J	20,50±0,92 ^O	8,73±0,22 ^Q	27,46±20,60 ^g
2018 Aralık	115,07±1,01 ^G	7,71±0,36 ^K	30,10±0,06 ^M	50,96±50,65 ^f
2019 Ocak	391,85±0,75 ^D	29,92±0,72 ^M	34,51±0,62 ^K	152,09±185,72 ^d
2019 Şubat	20,56±0,15 ^O	605,19±0,26 ^B	63,24±0,72 ^I	229,66±291,50 ^c
2019 Mart	103,14±0,58 ^H	1664,71±3,79 ^A	142,86±0,77 ^F	636,90±796,33 ^a
2019 Nisan	499,86±1,20 ^C	297,00±1,11 ^E	32,67±0,62 ^L	276,51±209,53 ^b
Çeşit Ortalamaları	210,27±177,21 ^b	376,55±586,34 ^a	47,80±43,25 ^c	211,54±371,50

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.36. Çeşitlere göre dış yaprakların *p*-kumarik asit değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	459,73±5,16 ^B	10,34±0,06 ^L	137,62±0,59 ^G	202,56±207,18 ^b
2018 Kasım	86,35±0,42 ^H	11,01±0,34 ^L	4,15±0,24 ^M	33,84±40,79 ^f
2018 Aralık	134,55±0,12 ^G	3,40±0,12 ^N	3,58±0,34 ^N	47,17±67,67 ^g
2019 Ocak	303,85±1,61 ^C	36,62±0,33 ^I	1,35±0,09 ^O	113,94±147,94 ^e
2019 Şubat	15,59±0,33 ^K	230,49±0,53 ^D	31,62±0,50 ^J	92,57±107,07 ^d
2019 Mart	208,74±0,63 ^E	1594,07±9,00 ^A	234,55±0,50 ^D	679,12±708,82 ^a
2019 Nisan	158,96±1,11 ^F	311,72±0,84 ^C	3,37±0,14 ^N	158,01±137,90 ^c
Çeşit Ortalamaları	195,39±142,00 ^b	313,95±555,11 ^a	59,46±87,92 ^c	189,60±342,96

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.37. Çeşitlere göre iç yaprakların ferulik asit değerleri

İç Yapraklar				
Değerlendirilen Aylar	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	15,53±0,91	Belirlenemedi	Belirlenemedi	15,53±0,91
2018 Kasım	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2018 Aralık	5,71±0,22	Belirlenemedi	8,86±0,41	7,28±1,83
2019 Ocak	17,80±0,45	Belirlenemedi	Belirlenemedi	17,80±0,45
2019 Şubat	Belirlenemedi	6,41±0,28	Belirlenemedi	6,41±0,28
2019 Mart	Belirlenemedi	29,58±0,34	Belirlenemedi	29,58±0,34
2019 Nisan	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
Çeşit Ortalamaları	13,01±5,76	17,99±13,38	8,86±0,41	13,98±8,66

Çizelge 4.38. Çeşitlere göre dış yaprakların ferulik asit değerleri

Dış Yapraklar				
Değerlendirilen Aylar	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	34,62±0,62	Belirlenemedi	4,41±0,42	19,51±17,45
2018 Kasım	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2018 Aralık	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2019 Ocak	0,43±0,15	55,94±0,48	Belirlenemedi	28,18±32,05
2019 Şubat	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2019 Mart	Belirlenemedi	22,30±0,60	Belirlenemedi	22,30±0,60
2019 Nisan	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
Çeşit Ortalamaları	17,52±19,74	39,12±19,42	4,41±0,42	23,54±21,47

Çizelge 4.39. Çeşitlere göre iç yaprakların 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit değerleri

İç Yapraklar				
Değerlendirilen Aylar	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	1517,33±1,68	Belirlenemedi	265,82±1,61	891,58±722,56
2018 Kasım	224,72±3,79	Belirlenemedi	Belirlenemedi	224,72±3,79
2018 Aralık	Belirlenemedi	Belirlenemedi	1023,51±3,16	1023,51±3,16
2019 Ocak	1441,60±2,09	Belirlenemedi	251,95±1,78	846,77±686,84
2019 Şubat	Belirlenemedi	1126,86±3,79	378,62±1,80	752,74±432,00
2019 Mart	72,62±1,91	2197,48±20,30	Belirlenemedi	1135,05±1226,84
2019 Nisan	849,81±1,37	15,40±0,69	Belirlenemedi	432,60±481,75
Çeşit Ortalamaları	821,22±630,07	1113,24±975,95	479,98±339,56	780,48±677,14

Çizelge 4.40. Çeşitlere göre dış yaprakların 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit değerleri

Dış Yapraklar				
Değerlendirilen Aylar	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	2424,53±22,94	Belirlenemedi	842,26±3,23	1633,40±913,62
2018 Kasım	89,65±1,44	Belirlenemedi	Belirlenemedi	89,65±1,44
2018 Aralık	Belirlenemedi	Belirlenemedi	30,57±1,54	30,57±1,54
2019 Ocak	220,73±1,73	117,90±1,80	Belirlenemedi	169,31±59,38
2019 Şubat	Belirlenemedi	138,67±1,14	65,77±0,75	102,22±42,09
2019 Mart	24,39±0,93	2998,12±5,84	63,75±1,20	1028,75±1525,57
2019 Nisan	61,00±0,92	Belirlenemedi	22,41±0,47	41,71±22,28
Çeşit Ortalamaları	564,06±983,06	1084,90±1482,00	204,95±336,38	546,13±971,73

Çizelge 4.41. Çeşitlere göre iç yaprakların narirutin değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	Belirlenemedi	373,96±3,43	Belirlenemedi	373,96±3,43
2018 Kasım	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2018 Aralık	770,76±3,97	Belirlenemedi	Belirlenemedi	770,76±3,97
2019 Ocak	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2019 Şubat	386,01±3,16	Belirlenemedi	Belirlenemedi	386,01±3,16
2019 Mart	Belirlenemedi	1371,05±5,52	282,98±7,57	827,02±628,22
2019 Nisan	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
Çeşit Ortalamaları	578,38±222,15	872,50±575,68	282,98±7,57	636,95±425,38

Çizelge 4.42. Çeşitlere göre dış yaprakların narirutin değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2018 Kasım	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2018 Aralık	242,22±4,02	Belirlenemedi	Belirlenemedi	242,22±4,02
2019 Ocak	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2019 Şubat	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2019 Mart	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2019 Nisan	Belirlenemedi	570,43±4,70	Belirlenemedi	570,43±4,70
Çeşit Ortalamaları	242,22±4,02	570,43±4,70	Belirlenemedi	406,32±189,52

Luteolin değerleri bakımından çeşitler, aylar ve yaprak pozisyonları arasında istatistiksel anlamda farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir. Buna göre iç yapraklar değerlendirildiğinde Bayrampaşa çeşidi diğer çeşitlere göre daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiş ancak çeşit x ay interaksiyonu dikkate alındığında ise Mart ayında toplanan Sakız çeşidi iç yapraklarının ($199,97 \text{ mg kg}^{-1}$) daha üstün değere sahip olduğu belirlenmiştir. Dış yaprakların luteolin değerleri incelendiğinde de yine Sakız çeşidinin daha iyi sonuçlar verdiği, en uygun ayın ise Mart ayı ($200,68 \text{ mg kg}^{-1}$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.43 ve Çizelge 4.44). Yapraklarda ve başlarda tespit edilen en temel flavonoidlerin başında luteolin, apigenin ve bunların glikositleri geldiği bilinmektedir (Lombardo vd. 2010; Pandino vd. 2011b; El-Senousy vd. 2014). Pandino vd. (2013a) luteolinin diğer flavonoidlere kıyasla daha baskın bulunduğu bildirilmiştir. Nouraei vd. (2018) yaptıkları çalışmada ise belirledikleri luteolin miktarının diğer bileşenlerle karşılaştırıldığında az miktarda olduğunu (53 mg kg^{-1}), bununla birlikte apigenin miktarından (13 mg kg^{-1}) ise daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Luteolin 7-O-glukuronit değerleri incelendiğinde, Mart ayında toplanan Sakız çeşidine ait hem iç ($4009,02 \text{ mg kg}^{-1}$) hem de dış yapraklarda ($3838,20 \text{ mg kg}^{-1}$) en iyi değerlerin tespit edildiği görülmüştür. Sakız çeşidinin Mart ayında toplanan iç ve dış yaprakları arasındaki ilişkiye bakılacak olursa, iç yaprak değerlerinin dış yapraklara oranla daha yüksek luteolin 7-O-glukuronit değerine sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.45 ve Çizelge 4.46). Lombardo vd. (2010), denedikleri çeşitler arasında en fazla luteolin 7-O-glukuronit miktarını reseptaklda tespit ettiklerini ve 1683 mg kg^{-1} olduğunu bildirmişlerdir. Scavo vd. (2019) ise kullandıkları çeşitler arasında değerlendirme yaptıklarında en fazla bulunan luteolin türevi bileşiğin luteolin 7-O-glukuronit ($189,4 \text{ mg kg}^{-1}$) olduğunu bildirmişlerdir.

Sakız çeşidi apigenin değerleri bakımından da olumlu sonuçlar göstermiş olup, en yüksek değerler iç yapraklarda Nisan ayında ($2260,95 \text{ mg kg}^{-1}$), dış yapraklarda ise Mart ayında ($1926,42 \text{ mg kg}^{-1}$) belirlenmiştir. Bununla birlikte en düşük apigenin değerleri Kasım ayında toplanan Bayrampaşa çeşidi iç yaprakları ile Şubat ayında toplanan Bayrampaşa çeşidi dış yapraklarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.47 ve Çizelge 4.48). Nouraei vd. (2018) yaptıkları çalışmada apigenin miktarını oldukça düşük seviyede (13 mg kg^{-1}) tespit ettiklerini, stres koşulları altında ise bu değerlerin daha da düştüğünü bildirmişlerdir.

Apigeninin 7-O-glukuronit değerleri incelendiğinde, iç yapraklarda en yüksek bileşen değeri Sakız çeşidinin Mart ayında toplanan yapraklarında ($291,15 \text{ mg kg}^{-1}$) tespit edilirken, dış yapraklarda ise Olympus F₁ çeşidinin Nisan ayında toplanan yapraklarının ($123,06 \text{ mg kg}^{-1}$) üstün olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.49 ve Çizelge 4.50). Lombardo vd. (2010), değerlendirdikleri çeşitlerin yapraklarındaki apigenin 7-O-glukuronit miktarının oldukça düşük kaldığını (82 mg kg^{-1}) bildirmişlerdir. Normalde kereviz, maydanoz ve bazı şifalı bitkiler haricinde apigenin ve türevlerinin birikimi gıda olarak tüketilen bitkilerde çok fazla olmamaktadır (Pandino vd. 2011a). Pandino vd. (2013a) yaptıkları çalışmada değerlendirmeye aldıkları genotipler arasında flavonoid miktarları bakımından farklılıklar gördüklerini, apigenin ve bu bileşenin türevlerinin yüksek miktarlarda birikim gösterdiği (1207 mg kg^{-1}) genotipin ise daha sonraki çalışmalarda apigenin donörü olarak kullanılabileceğini ve ıslah programlarında bu amaçla değerlendirilebileceğini rapor etmişlerdir.

Çizelge 4.43. Çeşitlere göre iç yaprakların luteolin değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	111,65±2,02 ^C	16,83±0,67 ^P	42,47±1,94 ^{MJ}	56,98±43,88 ^e
2018 Kasım	49,75±0,38 ^L	23,62±1,05 ^O	60,72±0,15 ^L	44,70±17,05 ^f
2018 Aralık	65,90±0,41 ^{GH}	25,64±0,50 ^N	48,03±0,93 ^F	46,52±18,05 ^e
2019 Ocak	93,87±1,37 ^D	68,29±0,89 ^{FG}	69,11±1,08 ^{IJ}	77,09±13,03 ^c
2019 Şubat	54,05±0,48 ^K	96,85±2,00 ^D	62,86±0,76 ^{HI}	71,25±20,24 ^d
2019 Mart	169,35±2,05 ^B	199,97±2,24 ^A	64,21±0,82 ^D	144,51±63,70 ^a
2019 Nisan	84,51±1,58 ^E	108,05±1,14 ^C	94,79±1,88 ^D	95,78±10,62 ^b
Çeşit Ortalamaları	89,87±39,82 ^a	77,03±62,84 ^b	63,17±16,19 ^c	76,69±44,27

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.44. Çeşitlere göre dış yaprakların luteolin değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	78,62±1,52 ^D	16,49±0,56 ^L	65,20±0,75 ^{FG}	53,43±29,25 ^f
2018 Kasım	77,57±2,36 ^D	43,60±1,59 ^K	94,36±1,41 ^C	71,84±23,17 ^c
2018 Aralık	71,84±0,67 ^E	59,00±0,84 ^H	72,20±0,82 ^E	67,68±6,75 ^c
2019 Ocak	70,90±2,33 ^E	66,47±1,25 ^F	42,61±0,84 ^K	59,99±13,66 ^e
2019 Şubat	63,29±0,66 ^G	55,99±1,99 ^I	73,10±0,99 ^E	64,12±7,75 ^d
2019 Mart	96,28±0,67 ^C	200,68±0,74 ^A	71,97±0,73 ^E	122,98±61,16 ^a
2019 Nisan	49,40±1,22 ^J	121,20±2,07 ^B	78,80±1,51 ^D	83,13±32,30 ^b
Çeşit Ortalamaları	72,55±13,91 ^b	80,49±59,25 ^a	71,17±14,96 ^c	74,74±35,54

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.45. Çeşitlere göre iç yaprakların luteolin 7-O-glukuronit değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	341,43±2,04	4,02±0,92	1,28±0,74	115,58±174,95
2018 Kasım	42,45±2,04	1,66±0,56	1,16±0,94	15,09±21,22
2018 Aralık	201,25±1,18	2,85±1,19	359,94±2,34	188,01±160,02
2019 Ocak	735,89±3,34	18,87±1,21	108,93±2,45	287,90±349,35
2019 Şubat	18,56±1,32	1474,93±28,17	191,97±2,51	561,82±711,64
2019 Mart	183,53±3,30	4009,02±14,23	486,64±2,01	1559,73±1902,06
2019 Nisan	904,52±2,21	668,64±0,52	128,80±1,27	567,32±355,68
Çeşit Ortalamaları	346,80±330,66	882,85±1427,18	182,67±174,57	470,78±884,16

Çizelge 4.46. Çeşitlere göre dış yaprakların luteolin 7-O-glukuronit değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	739,29±2,10	1,61±1,21	260,33±2,22	333,74±334,76
2018 Kasım	109,00±2,81	6,88±0,48	9,54±1,51	41,80±52,08
2018 Aralık	247,83±1,63	40,73±1,99	38,07±2,05	108,87±107,65
2019 Ocak	577,89±3,86	39,11±0,93	146,47±2,70	254,49±255,07
2019 Şubat	14,46±1,80	513,10±2,48	114,31±0,74	213,96±235,98
2019 Mart	384,34±2,97	3838,20±37,04	1047,13±3,64	1756,56±1639,53
2019 Nisan	306,25±1,81	625,80±2,10	476,78±2,97	469,61±143,02
Çeşit Ortalamaları	339,86±243,99	723,63±1343,08	298,94±351,27	454,15±816,97

Çizelge 4.47. Çeşitlere göre iç yaprakların apigenin değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	285,18±5,79 ^K	163,78±3,88 ^{LM}	363,42±2,36 ^H	270,79±90,03 ^F
2018 Kasım	115,87±3,75 ^O	284,11±6,08 ^K	633,13±7,07 ^E	344,37±236,02 ^d
2018 Aralık	457,44±4,70 ^G	147,94±3,56 ^{MN}	346,65±13,80 ^{HIJ}	317,34±140,42 ^e
2019 Ocak	651,28±5,06 ^D	544,64±7,70 ^F	297,14±4,36 ^K	497,68±162,56 ^c
2019 Şubat	131,63±4,24 ^{NO}	355,03±6,99 ^{HI}	340,89±10,84 ^{IJ}	275,85±112,05 ^f
2019 Mart	151,60±4,58 ^M	1673,35±19,91 ^B	773,77±5,57 ^C	866,24±684,37 ^b
2019 Nisan	174,26±3,01 ^L	2260,95±13,95 ^A	331,88±6,74 ^J	922,36±1039,28 ^a
Çeşit Ortalamaları	281,04±194,55 ^c	775,68±808,86 ^a	440,98±177,77 ^b	499,23±522,47

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.48. Çeşitlere göre dış yaprakların apigenin değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	615,95±11,80 ^F	225,36±6,18 ^N	242,34±1,34 ^N	361,21±197,55 ^f
2018 Kasım	584,66±7,60 ^G	829,90±8,44 ^D	419,53±3,16 ^I	611,36±184,76 ^c
2018 Aralık	232,13±2,54 ^N	294,04±8,86 ^L	272,31±2,17 ^M	266,16±28,41 ^g
2019 Ocak	187,80±4,56 ^O	1226,91±5,76 ^C	355,50±9,87 ^K	590,07±498,99 ^d
2019 Şubat	169,60±6,08 ^P	777,11±15,27 ^E	376,65±2,55 ^J	441,12±276,33 ^e
2019 Mart	772,04±6,31 ^E	1926,42±12,11 ^A	521,94±4,89 ^H	1073,47±670,12 ^a
2019 Nisan	588,92±3,39 ^G	1441,34±21,60 ^B	295,42±3,41 ^L	775,23±532,49 ^b
Çeşit Ortalamaları	450,15±236,53 ^b	960,15±591,08 ^a	354,81±92,53 ^c	588,37±451,20

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.49. Çeşitlere göre iç yaprakların apigenin 7-O-glukuronit değerleri

Değerlendirilen Aylar	İç Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2018 Kasım	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2018 Aralık	Belirlenemedi	Belirlenemedi	40,67±1,15	40,67±1,15
2019 Ocak	61,23±1,49	Belirlenemedi	81,44±2,17	71,34±11,76
2019 Şubat	Belirlenemedi	94,09±0,86	160,66±0,97	127,37±38,43
2019 Mart	Belirlenemedi	291,15±2,32	41,06±1,03	166,10±144,39
2019 Nisan	191,07±1,53	Belirlenemedi	37,32±0,91	114,20±88,77
Çeşit Ortalamaları	126,15±74,97	192,62±113,78	72,23±49,65	110,96±84,18

Çizelge 4.50. Çeşitlere göre dış yaprakların apigenin 7-O-glukuronit değerleri

Değerlendirilen Aylar	Dış Yapraklar			
	Bayrampaşa	Sakız	Olympus F ₁	Ay Ortalaması
2018 Ekim	92,79±2,40	46,24±0,57	72,22±2,05	70,42±20,91
2018 Kasım	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Belirlenemedi
2018 Aralık	Belirlenemedi	34,45±0,70	28,40±0,91	31,43±3,55
2019 Ocak	17,82±0,51	Belirlenemedi	96,07±0,75	56,95±45,18
2019 Şubat	Belirlenemedi	61,70±0,57	Belirlenemedi	61,70±0,57
2019 Mart	49,56±2,08	43,74±1,04	77,82±1,08	57,04±16,34
2019 Nisan	79,72±0,74	Belirlenemedi	123,06±1,91	101,39±25,05
Çeşit Ortalamaları	59,97±30,97	46,53±10,48	79,51±32,81	63,35±29,75

Çeşitlerin arazide yetiştirilen bitkilerinin iç ve dış yapraklarının SPAD değerleri daha önce belirlenmiştir. Buna göre 2019 yılı ilkbahar aylarında dış yapraklarda sırasıyla Sakız, Olympus F₁ ve Bayrampaşa; iç yapraklarda ise yine aynı aylarda sırasıyla Olympus F₁, Sakız ve Bayrampaşa çeşitlerinin değerleri yüksek bulunmuştur. Değerlendirmeye alınan sekonder metabolitlerin genel olarak en yüksek çıktığı aylar ilkbahar ayları (özellikle Mart ayı) olarak tespit edilmiş olup, bu değerler ile SPAD değerlerinin uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir.

Biyoaktif bileşenlerin bitkilerde oynadıkları roller farklıdır (Pandino vd. 2011a). Özellikle bitki dokularının epidermal hücrelerinde biriken flavonoidler, bitkileri UV ışığının fotooksidatif zararından koruma görevi üstlenmektedirler (Pinelli vd. 2007). UV ışığının 280-320 nm aralığındaki B bileşeni çok zararlı etkilere sebep olabilmektedir. Bitkilerin güneş ışınlarına en fazla maruz kalan organları yapraklar olduğundan, bitkiler, kafeoilkinik asit biyosentezinde görev alan enzimlerin yerine flavonoid biyosentezini uyarıcı enzimleri tetiklemektedir (Brosché ve Strid 2003; Pandino vd. 2011b). Dolayısıyla, bitkilerin dokularında biriken flavonoidler adeta bir kalkan görevi görerek, bitkilerin bu zararlı radyasyondan korunmalarına yardımcı olurlar (Pinelli vd. 2007). Flavonoidlerin, özellikle luteolin ve apigeninin, sahip oldukları farmakolojik aktivitelerin farklılık gösterdiği bilinmektedir. Sağlıkla alakalı olarak antimikrobiyal aktivitelerine ek olarak, luteolin son yıllarda kolesterol sentezini ve safra salgılanmasını önlediği için dikkat çekmeye başlamıştır (Zhu vd. 2004; Kukić vd. 2008; Pandino vd. 2013a). Apigenin ise bazı sebzelerde birikim göstermekte ve çeşitli farmasötik uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (Pandino vd. 2013a).

Süspansiyon kültürü ile alakalı araştırmanın bulgularına bakılacak olursa, her iki çeşit için de süspansiyon kültürü uygulamasının ardından süzülen kısım ve arta kalan hücre kısmı çeşitlere ve alt kültürlere dayanarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Çizelge 4.51 – Çizelge 4.63). Buna göre çeşitlerin süspansiyon kültürlerine ait sıvı kısımları değerlendirilmeye alındığında Bayrampaşa çeşidi için 3-*O*-kafeoilkinik asit (15,66 mg kg⁻¹) ve 4-*O*-kafeoilkinik asit (72,75 mg kg⁻¹) değerleri en yüksek T7 besi ortamı kombinasyonunda (B5 + 1 mg L⁻¹ BAP + 1 mg L⁻¹ NAA) ve 2. alt kültürde tespit edilmiştir (Çizelge 4.51 ve Çizelge 4.52). Bununla birlikte 2. alt kültürde ve T7 besi ortamı kombinasyonunda tespit edilen bir diğer bileşen ise ferulik asit (7,93 mg kg⁻¹) olmuştur. Sakız çeşidi değerlendirildiğinde ise 3-*O*-kafeoilkinik asit (14,20 mg kg⁻¹) ve 4-*O*-kafeoilkinik asit (63,35 mg kg⁻¹) değerlerinin en yüksek T8 besi ortamı kombinasyonunda (B5 + 1 mg L⁻¹ BAP + 2 mg L⁻¹ NAA) elde edilmiştir. Ayrıca 3-*O*-kafeoilkinik asit değeri en yüksek 2. alt kültürde, 4-*O*-kafeoilkinik asit değeri ise en yüksek 1. alt kültürde tespit edilmiştir. 5-*O*-kafeoilkinik asit değeri Sakız çeşidinde tespit edilmiş olup, bu bileşenin en yüksek değeri B10 besi ortamı kombinasyonunda (B5 + 5 mg L⁻¹ BAP + 5 mg L⁻¹ NAA) 62,05 mg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir. Değerlendirilmeye alınan bir diğer bileşen ise kafeik asit olup, Sakız çeşidinde T8 besi ortamı kombinasyonunda (B5 + 1 mg L⁻¹ BAP + 2 mg L⁻¹ NAA) ve 2. alt kültürde en yüksek değeri (6,59 mg kg⁻¹) elde edilmiştir. Sakız çeşidinde ferulik asit değeri (9,31 mg kg⁻¹) T2 besi ortamı kombinasyonunda (B5 + 0,1 mg L⁻¹ BAP + 1 mg L⁻¹ NAA) 2. alt kültürde yüksek bulunmuştur. Bu bileşenlerin dışında Sakız çeşidinde 41,23 mg kg⁻¹ 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit (B10 besi ortamı – 1. alt kültür), luteolin 7-*O*-glukuronit (9,16 mg kg⁻¹) ile iz miktarda (3,19 mg kg⁻¹) apigenin tespit edilmiştir.

Çizelge 4.51. Bayrampaşa çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 3-O-kafeoilkinik asit değerleri

Bayrampaşa	1.Alt Kültür					2.Alt Kültür				
	Besli Ortamları					Besli Ortamları				
	T7	T11	T12	T16	T17	T7	T11	T12	T16	T17
3-O-kafeoilkinik asit	6,88b ^c	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	5,59 ^{bc}	15,66 ^a	4,11 ^d	0,88 ^e	0,00 ^e	8,20 ^b
Besli Ortamları Ortalamaları	T7 = 11,27 ^A		T11 = 2,05 ^C		T12 = 0,44 ^D	T16 = 0,00 ^D		T17 = 6,89 ^B		
Alt Kültür Ortalamaları	2,49 ^B					5,77 ^A				

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.52. Bayrampaşa çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 4-O-kafeoilkinik asit değerleri

Bayrampaşa	1.Alt Kültür					2.Alt Kültür				
	Besli Ortamları					Besli Ortamları				
	T7	T11	T12	T16	T17	T7	T11	T12	T16	T17
4-O-kafeoilkinik asit	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	72,75 ^a	10,27 ^c	0,00 ^e	3,62 ^d	36,14 ^b
Besli Ortamları Ortalamaları	T7 = 36,37 ^A		T11 = 5,13 ^C		T12 = 0,00 ^E	T16 = 1,81 ^D		T17 = 18,07 ^B		
Alt Kültür Ortalamaları	0,00 ^B					24,55 ^A				

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.53. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 3-O-kafeoilkinik asit değerleri

Sakız	1.Alt Kültür						2.Alt Kültür					
	Besi Ortamları						Besi Ortamları					
	T2	T8	T11	T14	T16	B10	T2	T8	T11	T14	T16	B10
3-O-kafeoilkinik asit	0,00 ^g	8,57 ^c	0,00 ^g	0,00 ^g	1,62 ^f	11,57 ^b	5,33 ^e	14,20 ^a	0,00 ^g	4,78 ^e	4,78 ^e	6,31 ^d
Besi Ortamları Ort.	T2 = 2,66 ^{CD}		T8 = 11,39 ^A		T11 = 0,00 ^E		T14 = 2,39 ^D		T16 = 3,20 ^C		B10 = 8,94 ^B	
Alt Kültür Ort.	3,62 ^B						5,90 ^A					

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.54. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 4-O-kafeoilkinik asit değerleri

Sakız	1.Alt Kültür						2.Alt Kültür					
	Besi Ortamları						Besi Ortamları					
	T2	T8	T11	T14	T16	B10	T2	T8	T11	T14	T16	B10
4-O-kafeoilkinik asit	0,00 ^h	65,35 ^a	0,00 ^h	0,00 ^h	0,00 ^h	55,05 ^b	43,56 ^c	37,54 ^d	33,46 ^e	0,00 ^h	30,80 ^f	17,78 ^g
Besi Ortamları Ort.	T2 = 21,78 ^C		T8 = 51,44 ^A		T11 = 16,73 ^D		T14 = 0,00 ^F		T16 = 15,40 ^E		B10 = 36,42 ^B	
Alt Kültür Ort.	20,06 ^B						27,19 ^A					

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.55. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım 5-O-kafeoilkinik asit değerleri

Sakız	1.Alt Kültür						2.Alt Kültür					
	Besi Ortamları						Besi Ortamları					
	T2	T8	T11	T14	T16	B10	T2	T8	T11	T14	T16	B10
5-O-kafeoilkinik asit	2,37 ^b	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	62,05 ^a	2,71 ^b	1,18 ^c	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^d
Besi Ortamları Ort.	T2 = 2,54 ^B		T8 = 0,59 ^C		T11 = 0,00 ^D		T14 = 0,00 ^D		T16 = 0,00 ^D		B10 = 31,02 ^A	
Alt Kültür Ort.	10,73 ^A						0,64 ^B					

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.56. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım kafeik asit değerleri

Sakız	1.Alt Kültür						2.Alt Kültür					
	Besi Ortamları						Besi Ortamları					
	T2	T8	T11	T14	T16	B10	T2	T8	T11	T14	T16	B10
Kafeik asit	0,00 ^c	3,20 ^b	0,00 ^c	3,21 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	3,55 ^b	6,59 ^a	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c
Besi Ortamları Ort.	T2 = 1,77 ^B		T8 = 4,89 ^A		T11 = 0,00 ^C		T14 = 1,60 ^B		T16 = 0,00 ^C		B10 = 0,00 ^C	
Alt Kültür Ort.	1,06 ^B						1,69 ^A					

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.57. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – sıvı kısım ferulik asit değerleri

Sakız	1.Alt Kültür						2.Alt Kültür					
	Besi Ortamları						Besi Ortamları					
	T2	T8	T11	T14	T16	B10	T2	T8	T11	T14	T16	B10
Ferulik asit	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	5,16 ^b	9,31 ^a	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	4,85 ^c	2,17 ^d
Besi Ortamları Ort.	T2 = 4,65 ^A		T8 = 0,00 ^D		T11 = 0,00 ^D		T14 = 0,00 ^D		T16 = 2,42 ^C		B10 = 3,67 ^B	
Alt Kültür Ort.	0,86 ^B						2,72 ^A					

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çalışmada ayrıca süspansiyon kültürlerinin sıvı kısımları haricinde katı (hücre) kısımları da sekonder metabolitler bakımından değerlendirilmeye alınmıştır. Buna göre Bayrampaşa çeşidinde hem 3-*O*-kafeoilkinik asit hem de 5-*O*-kafeoilkinik asit değerleri en yüksek T16 besi ortamı kombinasyonunda (B5 + 1 mg L⁻¹ kinetin + 1 mg L⁻¹ 2,4-D) sırasıyla 227,39 mg kg⁻¹ ve 106,23 mg kg⁻¹ değerlerinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.58). Bu bileşenlerin haricinde 4-*O*-kafeoilkinik asit (107,93 mg kg⁻¹) ve 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit (5,95 mg kg⁻¹) bileşenleri T11 besi ortamı kombinasyonunda (B5 + 0,1 mg L⁻¹ kinetin + 1 mg L⁻¹ 2,4-D) belirlenmiştir. Sakız çeşidi değerlendirilmeye alındığında ise T2 besi ortamı kombinasyonu 3-*O*-kafeoilkinik asit, 4-*O*-kafeoilkinik asit ve kafeik asit bakımından sırasıyla 171,10 mg kg⁻¹, 138,23 mg kg⁻¹ ve 38,49 mg kg⁻¹ değerlerini vermiştir. Diğer bileşenlerden 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit B10 besi ortamında 78,23 mg kg⁻¹ değerinde tespit edilirken, ferulik asit ise T16 besi ortamında 36,09 mg kg⁻¹ değerinde bulunmuştur (Çizelge 4.59). Bu bileşenlerin haricinde 5-*O*-kafeoilkinik asit ile luteolin 7-*O*-glukuronit bileşenleri de tespit edilmiş olup, sırasıyla T2 besi ortamında 12,98 mg kg⁻¹ ile T16 besi ortamında 56,31 mg kg⁻¹ değerleri bulunmuştur.

Süspansiyon kültürleri, çeşitlerin iyi tepki verdikleri besi ortamı kombinasyonlarıyla devam ettirilmiş olup, bu ortamlardan her iki çeşit için de ortak olanlar (T11 ve T16) hem süspansiyon sıvısındaki hem de süspansiyondan alınan katı (hücre) kısımları ayrı şekilde değerlendirmeye alınmıştır (Çizelge 4.60 – Çizelge 4.63). Buna göre 3-*O*-kafeoilkinik asit ile 4-*O*-kafeoilkinik asit değerlerinin çeşitler arasında istatistiksel bir farklılık yaratmadığı belirlenmiştir. Süspansiyon kültürlerinin sonunda katı kısımlardan elde edilen değerler incelendiğinde ise 3-*O*-kafeoilkinik asit ile 4-*O*-kafeoilkinik asit değerleri bakımından Bayrampaşa çeşidinin Sakız çeşidine göre daha üstün olduğu, bununla birlikte 3-*O*-kafeoilkinik asit için T16, 4-*O*-kafeoilkinik asit için T11 ortamının ön plana çıktığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.58. Bayrampaşa çeşidi süspansiyon kültürü – katı kısım değerleri

Sekonder Metabolitler	Bayrampaşa				
	Besi Ortamları				
	T7	T11	T12	T16	T17
3- <i>O</i> -kafeoilkinik asit	4,14 ^D	117,32 ^B	1,56 ^D	227,39 ^A	20,09 ^C
5- <i>O</i> -kafeoilkinik asit	0,00 ^D	0,00 ^D	24,41 ^C	106,23 ^A	38,40 ^B

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın P≤0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.59. Sakız çeşidi süspansiyon kültürü – katı kısım değerleri

Sekonder Metabolitler	Sakız					
	Besi Ortamları					
	T2	T8	T11	T12	T16	B10
3-O-kafeoilkinik asit	171,10 ^A	89,41 ^B	78,11 ^C	57,76 ^D	54,02 ^D	60,04 ^D
4-O-kafeoilkinik asit	138,23 ^A	54,15 ^C	67,31 ^B	60,44 ^{BC}	29,30 ^E	40,46 ^D
1,3-O-dikafeoilkinik asit	30,12 ^C	0,00 ^D	0,00 ^D	0,00 ^D	52,25 ^B	78,23 ^A
Kafeik asit	38,49 ^A	0,00 ^E	13,24 ^C	0,00 ^E	8,83 ^D	21,74 ^B
Ferulik asit	12,39 ^C	19,22 ^B	0,00 ^E	6,21 ^D	36,09 ^A	0,00 ^E

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.60. Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin süspansiyon kültürü – sıvı kısım 3-O-kafeoilkinik asit değerleri

	Bayrampaşa		Sakız	
	Besi Ortamları		Besi Ortamları	
	T11	T16	T11	T16
3-O-kafeoilkinik asit	2,05 ^{ab}	0,00 ^b	0,00 ^b	3,20 ^a
Besi Ortamları Ortalamaları	T11 = 1,02 ^A		T16 = 1,60 ^A	
Çeşit Ortalamaları	1,02 ^A		1,60 ^A	

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.61. Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin süspansiyon kültürü – sıvı kısım 4-O-kafeoilkinik asit değerleri

	Bayrampaşa		Sakız	
	Besi Ortamları		Besi Ortamları	
	T11	T16	T11	T16
4-O-kafeoilkinik asit	5,13 ^a	1,81 ^a	16,73 ^a	15,40 ^a
Besi Ortamları Ortalamaları	T11 = 10,93 ^A		T16 = 8,60 ^A	
Çeşit Ortalamaları	3,47 ^A		16,06 ^A	

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.62. Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin süspansiyon kültürü – katı kısım 3-*O*-kafeoilkinik asit değerleri

	Bayrampaşa		Sakız	
	Besi Ortamları		Besi Ortamları	
	T11	T16	T11	T16
3-<i>O</i>-kafeoilkinik asit	117,32 ^b	227,39 ^a	78,11 ^c	54,02 ^d
Besi Ortamları Ortalamaları	T11 = 97,72 ^B		T16 = 140,70 ^A	
Çeşit Ortalamaları	172,35 ^A		66,07 ^B	

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.63. Bayrampaşa ve Sakız çeşitlerinin süspansiyon kültürü – katı kısım 4-*O*-kafeoilkinik asit değerleri

	Bayrampaşa		Sakız	
	Besi Ortamları		Besi Ortamları	
	T11	T16	T11	T16
4-<i>O</i>-kafeoilkinik asit	107,93 ^a	0,00 ^d	67,31 ^b	29,30 ^c
Besi Ortamları Ortalamaları	T11 = 87,62 ^A		T16 = 14,65 ^B	
Çeşit Ortalamaları	53,96 ^A		48,30 ^B	

Aynı sütun ve satırdaki farklı harfler, ortalama farkın $P \leq 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Toplanan yaprak örnekleri için genel bir değerlendirme yapılacak olursa, çalışmada değerlendirmeye alınan üç çeşit arasında polifenol profili bakımından farklılıklar olduğu görülmüştür. Değerlendirmeye alınan bileşenler bakımından Sakız çeşidinin gerek fenolik asitler gerekse flavonoidler bakımından Bayrampaşa ve Olympus F₁ çeşitlerine kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Birçok araştırmacı gibi Lombardo vd. (2009) da bitkilerin sahip olduğu fenolik bileşenlerin seviyesi ile genotip arasında oldukça sıkı bir ilişki olduğunu bildirmiş olup, bu çalışmanın sonuçları önceki çalışmalarla uyum içerisindedir. Aylar arasında ise Mart ayının öne çıktığı görülmektedir. Pandino vd. (2013b) enginar yapraklarının ve çiçek sapının atık materyaller olarak bilindiğini ancak polifenol içeriği ve flavonoidler bakımından oldukça zengin olmakla birlikte, bu bitki kısımlarının toplanması için en uygun zamanların Şubat – Nisan ayları arasında olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasının bulguları da bu bakımdan bahsi geçen çalışmayı destekler niteliktedir. Bunun yanı sıra istisnalar olmakla birlikte (kafeik asit, ferulik asit, 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit ve luteolin) genel olarak iç yaprakların sahip olduğu bileşen içeriğinin dış yapraklarındaki kadar fazla olduğu belirlenmiştir. Birçok araştırmacı tarafından farklı bitki kısımlarında farklı biyoaktif bileşenlerin birikim gösterdiği belirtilmiş olup (Lattanzio vd. 2009; Lombardo vd. 2012), spesifik ıslah programları için olası

manipülasyonları öngörmek amacıyla çeşitlerin polifenol içeriklerinin oldukça yön gösterici olabileceği düşünülmektedir.

Hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen bulgulara dayanarak genel bir değerlendirme yapılacak olursa, çeşitlere ve besi ortamlarına göre biriken sekonder metabolit ve miktarı değişim göstermektedir. Bayrampaşa çeşidine ait süspansiyon kültürlerinin hem sıvı hem de katı kısımlarında belirlenen bileşenler 3-*O*-kafeoilkinik asit ve 4-*O*-kafeoilkinik asit olmakla birlikte, bu bileşenlere ait değerlerin katı materyallerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu duruma etki eden faktörler incelendiğinde besi ortamı içeriklerindeki farklılıklar göze çarpmakta olup, bu çeşitte kinetin + 2,4-D bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonunun BAP + NAA kombinasyonundan daha etkili bulunduğunu söylemek mümkündür. Buna ek olarak ferulik asit BAP + NAA kombinasyonunda süspansiyonun sadece sıvı kısmında belirlenirken, 5-*O*-kafeoilkinik asit ve 1,3-*O*-dikafeoilkinik asit bileşenleri kinetin + 2,4-D kombinasyonunda ve sadece katı kısımda tespit edilmiştir. Besi ortamlarına eklenen NAA sayesinde, kallus elde edilmesini teşvik etmesinin yanı sıra bu kallusların içerdiği fenolik bileşenlerin miktarlarına da oldukça olumlu etki ettiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Çölgeçen ve Toker 2008; Ercetin vd. 2012; Reis vd. 2018). Bayrampaşa çeşidinin süspansiyon kültüründe, çalışmanın genelinde değerlendirmeye alınan sekonder metabolitlerden sadece bahsedilen bileşenler belirlenmiş olup, diğer bileşenlerin varlığı tespit edilmemiştir. Çalışmada hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilen ekstraktların bileşimlerinde farklı sekonder metabolitlerin varlığı ve bu bileşenlerin farklı miktarlarda bulunduğu görülmüştür. Bu durum Negrel ve Javelle (1995)'e göre hücre duvarına etki eden enzimler tarafından üretilen, aynı hücre hatlarında bile çeşitli metabolitlerin biyosentezini başlatan savunma tepkilerinden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte, hücre kültürlerinde bazı bileşiklerin üretimi, orijinlerinin farklılaşmamış hücreler olmasından ötürü gerçekleşmeyebilir görüşü savunulmaktadır. Bu hücrelerin spesifik metabolitlerden yoksun olduğu, dolayısıyla dokuya özgü biyosenteze ihtiyaç duyduğu görüşü ortaya çıkmaktadır (Reis vd. 2018).

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde arazi koşullarından toplanan yaprakların sahip olduğu sekonder metabolit içeriklerinin hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilenlerden daha yüksek değerlerde bulunduğu görülmektedir. *In vivo* ve *in vitro* biyoaktif bileşenlerinin değerlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür (Umesh 2014; Farhan vd. 2018). Farhan vd. (2018)'e göre yaprak örneklerinde *in vitro* koşullardakinden daha yüksek değerlerde biyoaktif bileşenlerin bulunmasının nedeni olarak, bu değerli fitokimyasalların yaprakların farklı bölgelerinde birikim göstermesiyle ilişkili olduğu öngörülmektedir.

5. SONUÇLAR

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde yürütülen bu çalışmada ülkemizin önemli iki enginar çeşidi olan Bayrampaşa ve Sakız ile birlikte Olympus F₁ çeşidinin sekonder metabolit içeriklerinin tespit edilmesi, *in vitro* çoğaltım potansiyellerinin ortaya koyulması, kallus ve hücre süspansiyon kültürü teknikleri açısından etkinliklerinin görülmesi, elisitör uygulamalarıyla sahip oldukları sekonder metabolitlerin miktarlarında meydana gelebilecek değişikliklerin belirlenmesi ve bahsedilen tüm bu işlemlerin çeşitler bazında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın bir basamağında enginar çeşitlerine dair *in vitro* çoğaltım etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada besi ortamı olarak kullanılan $\frac{3}{4}$ MS + 0,05 mg L⁻¹ BAP + 0,005 mg L⁻¹ IBA + 30 g L⁻¹ sükroz kombinasyonu enginarlarda *in vitro* çoğaltım bakımından etkili bulunmuştur. Buna göre Bayrampaşa çeşidinin mikroçoğaltım açısından güzel tepkiler verdiği ortaya koyulmuştur. Ayrıca ortalama sürgün/eksplant sayısı, ortalama yaprak/eksplant sayısı, enfeksiyon olan bitkicik sayıları, yaşlanan bitkicik sayıları ve gelişme göstermeyen bitkicik sayıları da değerlendirmeye alınmıştır. Ortalama *in vitro* yaprak oluşumu göz önüne alındığında 5. alt kültürde 20,8 yaprak/eksplant oluşumu ile Sakız çeşidinin ön plana çıktığı tespit edilmiştir. Deneysel sonuçlar, genotip farklılıklarının ve alt kültür sayısının *in vitro* çoğalma için temel faktörler olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmanın olumlu bulgularının enginar mikroçoğaltım araştırmalarına ilişkin daha fazla çalışmaya ışık tutabileceği beklenmektedir.

Enginarlarda *in vitro* çoğaltım çalışmalarının ardından, oldukça zorlayıcı basamaklarından biri olduğu bilinen *in vitro* kök oluşumu ve gelişimine yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu aşamada çeşitli kök oluşum besi ortamları denemeye alınmıştır. Çalışmada değerlendirilen çeşitlerin *in vitro* köklenme ortamlarına verdikleri tepkiler farklı olmuştur. Buna göre Bayrampaşa (%56,34) ve Olympus F₁ (%97,77) çeşitlerine ait bitkiciklerin en iyi kök oluşumu sağladıkları besi ortamı K4 ($\frac{1}{2}$ MS + 6 mg L⁻¹ IBA), Sakız (%74,22) çeşidi için K8 ($\frac{1}{2}$ MS + 5 mg L⁻¹ GA₃ + 0,5 mg L⁻¹ NAA + 1 g L⁻¹ aktif kömür) olduğu belirlenmiştir. Bu besi ortamları farklılaştırılarak yapılacak olan daha sonraki çalışmalarla enginarlarda *in vitro* köklenme üzerine çeşide özgü besi ortamlarının geliştirilmesinin başarıyı daha da arttıracığı düşünülmektedir.

Enginarlarda *in vitro* tekniklerden kallus oluşumuna yönelik yapılan, tez çalışmasının bir diğer aşamasında birçok besi ortamı kombinasyonu denemeye alınmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmanın sonuçlarına bakıldığında kallus oluşumu ve gelişimi açısından olumlu sonuçlar alınmıştır. Diğer *in vitro* çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da genotip farklılığının önemi bir kez daha görülmüştür.

Enginarlarda *in vitro* kallus oluşumunu takiben, kallusların geliştirilmesi sağlanarak *in vitro* hücre süspansiyon kültürlerine yönelik çalışma da yürütülmüştür. Bu amaçla çeşitler bazında en etkili kallus oluşum besi ortamları belirlenmiş ve hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuştur. Çeşitler arası tepkiler değerlendirildiğinde Olympus F₁ çeşidinin ülkemiz çeşitleri olan Bayrampaşa ve Sakız kadar iyi tepki vermediği tespit edilmiştir. Bayrampaşa ve Sakız için hücre süspansiyon kültürü etkinlikleri değerli bulunmuştur. Buna göre Bayrampaşa için 0,1 mg L⁻¹ kinetin + 0,5

mg L⁻¹ 2,4-D içeren T10 ortamı etkili bulunurken, Sakız için 0,1 mg L⁻¹ kinetin + 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D içeren T12 ortamının olumlu etkisi tespit edilmiştir. Daha sonra bu noktada en etkili tepkileri verdiği tespit edilen bu besi ortamlarında elisitör uygulamaları yapılmıştır. Bu amaçla MeJa ve kitosan, üçer farklı konsantrasyon ve uygulama süresinde değerlendirmeye alınmıştır. Elisitör uygulamaları sonunda hücre ağırlıkları, pH değişimleri gibi birtakım faktörler belirlenmiş ve bu değerler incelenmiştir. Değerlendirilen bu parametrelerde elisitör uygulama dozu, elisitörün niteliği, kültürlerin elisitöre maruz kalma süreleri arasında farklılıklar tespit edilmiş ve bu farklılıklara bağlı olduğu düşünülen sonuçların değerli olduğu bulunmuştur. Daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Bununla birlikte kallus, hücre süspansiyon ve hücre süspansiyon kültürlerinde elisitör uygulamalarının sekonder metabolitler açısından da etkileri yapılan HPLC analizleriyle tespit edilmeye çalışılmıştır. Elisitör uygulamalarından fazla etkili sonuçlar elde edilmemekle birlikte, uygulama dozu, uygulama süresi ya da elisitörün niteliğinin farklılaştırılması ile daha olumlu sonuçlar alınabileceği, bu bakımdan da ileride yapılacak olan çalışmalarla enginar da bu sistemin geliştirilebileceği ve özellikle farmasötik alanında etkili değerlendirmeler yapılabileceği düşünülmektedir.

Enginar, sağlık açısından son derece değerli biyoaktif bileşenleri barındırmakla birlikte son yıllarda fonksiyonel gıdalara olan artan ilgiyle birlikte önemini daha da arttırdığı görülmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında bir başka değerlendirme ise bu konuya yönelik olarak olmuştur. Ülkemiz açısından önemli iki enginar çeşidi olan Bayrampaşa ve Sakız enginarlarının içerdiği sekonder metabolitlerin ortaya koyulmasının yanı sıra Olympus F₁ çeşidinin sahip olduğu sekonder metabolitleri de tespit etmek ve kendi çeşitlerimizi bu çeşitle karşılaştırmak amaçlanmıştır. Bu hedefe yönelik olarak 7 ay boyunca (Ekim – Nisan), iki farklı yaprak pozisyonu (iç ve dış) dikkate alınmıştır. Buna göre öncelikle çeşitler karşılaştırıldığında Sakız çeşidinin sekonder metabolit profili bakımından Bayrampaşa ve Olympus F₁ çeşitlerine kıyasla daha üstün olduğu belirlenmiştir. Yine değerlendirmeye alınan aylar arasında karşılaştırma yapıldığında Mart ayının ön plana çıktığı görülmüştür. Bununla birlikte sekonder metabolitlerin çoğunluğunun dış yapraklara kıyasla iç yapraklarda daha yüksek miktarlarda bulunduğu da belirlenmiştir. Çalışmada değerlendirilen sekonder metabolit sayısı 13 olup, bu bileşenler arasında ön plana çıkanlar sırasıyla 5-*O*-kafeoilkinik asit, 3-*O*-kafeoilkinik asit ve 1,5-*O*-dikafeoilkinik asit olmuştur. Yapılan bu değerlendirme sonucunda ülkemiz çeşitlerinin sekonder metabolitler açısından önemini ortaya koyulduğu düşünülmekte, nutrasötik ve farmakolojik potansiyellerini ortaya çıkarmak amacıyla ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Sonuncu fakat son derece önemli olduğu düşünülen genel bir sonuç ise, enginar yapraklarının fenolik bileşikler ve flavonoidler açısından oldukça değerli olduğu ve atık bitki materyali olarak işlem görmemesinin gerektiği açıkça görülmüş olmasıdır.

6. KAYNAKLAR

- Abak, K. 1987. Enginar ve Kuşkonmaz Yetiştiriciliği. Tav. Yayın No: 15, Yalova, 64 s.
- Abbas, M.S., El-Shabrawi, H.M., Soliman, A.S. and Selim, M.A. 2018. Optimization of germination, callus induction, and cell suspension culture of African locust beans *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16 (2018): 191–201.
- Abu-Reidah, I.M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. 2013. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chemistry*, 141 (3): 2269-2277.
- Açıkgöz, M.A., Kara, Ş.M., Aygün, A., Özcan, M.M and Batı Ay, E. 2019. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of camphor and phenolic compounds in cell suspension culture of endemic Turkish yarrow (*Achillea gypsicola*) species. *Turk J Agric For.*, 43: 351-359. doi:10.3906/tar-1809-54.
- Adzet, T., Camarasa, J., Laguna, J.C. 1987. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *J. Nat. Prod.* 50(4): 612–617. doi: 10.1021/np50052a004.
- Aghdasi, M., Padari, E.A. and Mianabadi, M. 2018. Trends in accumulation of ephedrine in callus cultures of *Ephedra major* Host. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 54: 465–474. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9887-0>.
- Ahmad, W., Zahir, A., Nadeem, M., Garros, L., Drouet, S., Renouard, S., Doussot, J., Giglioli-Guivarc'h, N., Hano, C., Bilal Haider Abbasi, B.H. 2019. Enhanced production of lignans and neolignans in chitosan-treated flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures. *Process Biochemistry*, 79: 155–165.
- Ahmadi-Sakha, S., Sharifi, M., Niknam, V. and Ahmadian-Chashmi, N. 2018. Phenolic compounds profiling in shake flask and bioreactor system cell cultures of *Scrophularia striata* Boiss. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 54: 444–453. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9899-9>.
- Ahmed, S.A. and Baig, M.M.V. 2014. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5): 499 –504.
- Akıncı, İ.E. 1990. Enginarın (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* vegetatif çoğaltılmasında besin ortamına eklenen NAA ve kinetinin sürgün verimi ve kalitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 76 s.
- Ali, M., Abbasi, B.H. and Ihsan-ul-haq, 2013. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Industrial Crops and Products*, 49: 400–406.

- Ali, A.M.A., El-Nour, M.E.M. and Yagi, S.M. 2018. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 677–682.
- Alp, H.A. 2008. Enginarıda Doku Kültürü Koşullarının İyileştirilmesine Yönelik Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 82 s.
- Alp, H.A., Düzyaman, E. and Özzambak, E. 2010. *İn Vitro*'da Kültüre Alınan Enginar Sürgün Uçlarında Sağlıklı Gelişim Oranını Arttırma Olanakları Üzerinde Bir Araştırma. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 47(2): 113-122.
- Alsoufi, A.S.M., Paçzkowski, C., Szakiel, A. and Długosz, M. 2019. Effect of jasmonic acid and chitosan on triterpenoid production in *Calendula officinalis* hairy root cultures. *Phytochemistry Letters*, 31: 5–11.
- Ancora, G. 1986. Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Bajaj, YPS (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry vol 2. Crops I*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 471 – 483.
- Ancora, G., Belli-Donini, M.L., Cozzo, L. 1981. Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* propagation, *Sci. Hort.*, 14: 207-213.
- Anjum, S., Abbasi, B.H. and Hano, C. 2017. Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 129: 73–87. DOI 10.1007/s11240-016-1158-3.
- Anonymous: FAO, 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/> [Son erişim tarihi: 20.11.2019].
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. 2001. Bitki Biyoteknolojisi Cilt I - Doku Kültürü ve Uygulamaları. S. Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 374 s.
- Bedini, L., Lucchesini, M., Bertozzi, F. and Graifenberg, A. 2012. Plant Tissue Cultures from Four Tuscan Globe Artichoke Cultivars. *Cent. Eur. J. Biol.* 7: 680-689. DOI: 10.2478/s11535-012-0064-x.
- Bekheet, S.A., Gabr, A.M.M., El-Bahr, M.K. 2014. Development a protocol for *in vitro* morphogenesis and multiplication of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *International Journal of Academic Research*, 6(6): 297-303. DOI: 10.7813/2075-4124.2014/6-6/A.41
- Benoit, H. and Ducreux, G. 1981. Etude de quelques aspects de la multiplication végétative *in vitro* de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Agronomie*, 1: 225-230.
- Bianco, V.V. 1990. Carciofo (*Cynara scolymus* L.). In: Bianco V.V. and Pimpini F. (eds), *Orticoltura*. Patron Editore, Bologna (in Italian), pp. 209-251.

- Bigot, C. and Foury, C. 1984. *In Vitro* Propagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) from Seedlings: Field Comparison of Some Clones with Their Parent Lines. *Agronomie*, 4: 699-710.
- Brenelli de Paiva, L., Goldbeck, R., Dantas dos Santos, W., Squina, F.M. 2013. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3): 395-411. doi: 10.1590/S1984-82502013000300002.
- Broschè, M., & Strid, A. 2003. Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Plant Physiology*, 117(1): 1–10.
- Brutti, C., Apostolo, N.M., Ferrarotti, S.A., LLOrente, B.E. and Krymkiewicz, N. 2000. Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Sci. Hort.*, 83(1): 1-10.
- Bürün, B. 2001. Hastaliksız Bitki Üretimi. Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (Ed.), Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, ss 190 – 210.
- Campanelli, A., Ruta, C., Tagarelli, A., Morone-Fortunato, I. and De Mastro, G. 2014. Effectiveness of mycorrhizal fungi on globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) micropropagation. *Journal of Plant Interactions*, 9(1): 100-106. DOI: 10.1080/17429145.2013.770928.
- Castiglione, V., Cavallaro, V., Di Silvestro, I., Melilli, M.G. 2007. Influence of different substrates on *in vitro* initiation of some early and late cultivars of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hayek]. *Acta Hort.*, 730: 107-112.
- Castillo, A.M., Egana, B., Sanz, J.M., Cistue, L. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. *Plant Cell Rep.*, 17: 902-906.
- Cavallaro, V., Castiglione, V., Barbera, A.C., Tringa, S. 2010. Influence of gelling agents on *in vitro* shoot proliferation of globe artichoke [*Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* (L.) Hegi] genotypes. *Adv. Hort. Sci.*, 24(4): 257-262.
- Chee, P.P. 1990. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *Hort. Sci.* 25(7): 792-793.
- Ciancolini, A. 2012. Characterization and Selection of Globe Artichoke and Cardoon Germplasm For Biomass, Food and Biocompound Production. PhD thesis, Università degli Studi della Tuscia, Italy and Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 250 p.
- Ciancolini, A., Alignan, M., Pagnotta, M.A., Miquel, J., Vilarem, G., Crinò, P. 2013. Morphological characterization, biomass and pharmaceutical compounds in Italian globe artichoke genotypes. *Industrial Crops and Products*, 49: 326– 333.

- Cimino, C., Cavalli, S.V., Spina, F., Natalucci, C. and Priolo, N. 2006. Callus culture for biomass production of milk thistle as a potential source of milk clotting peptidases. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3): Special Issue, DOI: 10.2225/vol9-issue3-fulltext-14.
- Coinu, R., Stefania, C., Urgeghe, P.P., Mulinacci, N., Pinelli, P., Franconi, F. and Romani, A. 2007. Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke. *Food Chem.*, 101(2): 524–531.
- Constantinescu, D.G., Platon, F., Pavel, M., 1967. Ingredients of the leaves of Romanian acclimatized *Cynara scolymus* L. *Pharmazie*, 22 (3): 176–178.
- Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. and Coldea, G. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 106: 279–288. DOI 10.1007/s11240-011-9919-5
- Crozier, A., Jaganath, I.B. and Clifford, M.N. 2006. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: Alan Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, UK, pp 1-25.
- Çetin, E.S. and Göktürk Baydar, N. 2016. Elicitor Applications to Cell Suspension Culture for Production of Phenolic Compounds in Grapevine. *Tarım Bilimleri Dergisi — Journal of Agricultural Sciences*, 22(2016): 42-53.
- Çölgeçen, H., Toker, M.C. 2008. Plant regeneration of natural tetraploid *Trifolium pratense* L. *Biol. Res.*, 41(1): 25–31. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602008000100004>.
- de Falco, B., Incerti, G., Amato, M., and Lanzotti, V. 2015. Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochem Rev.*, 14: 993–1018. DOI 10.1007/s11101-015-9428-y.
- De Leo, P. and Greco, B. 1973. New technique of propagation of the artichoke: *in vitro* culture of apical meristems. In: *Proceedings of the Third International Congress on Artichoke*, pp. 657–665, Bari, Italy.
- Debergh, P.C. and Read, P.E. 1993. Micropropagation. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Eds.), *Micropropagation – Technology and Application*, pp. 1-15, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland.
- Donnez, D., Kim, K-H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clément, C. and Courot, E. 2011. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, 46(5): 1056–1062.

- Draoui, N., Ghorbel, A., Kchouk, M.E. 1993. *In vitro* culture of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Tunisia: utilization of *in vitro* methods in artichoke improvement. *Agricoltura Mediterranea*, 123(2): 139–145.
- Edahiro, J. and Seki, M. 2006. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(1): 8-13. DOI: 10.1263/jbb.102.8.
- Ekbiç, E. 2005. Sakız Enginar Çeşidinde Meydana Gelen Dönüşüm Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 87 s.
- Elaleem, K.G.A., Modawi, R.S. and Khalafalla, M.M. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. *African Journal of Biotechnology*, 8(11): 2529-2534.
- El-Bahr, M.K., Bekheet, S.A.E-H., Gabr, A.M.M., El-Shenawy, R. and El Abd, Y.S. 2018. Accumulation of Cynarin, the Hepatoprotective Compound, in Ethephon Treated Callus Cultures of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Biological Sciences*, 18(5): 243-250. DOI: 10.3923/jbs.2018.243.250.
- El Boullani, R., Elmoslih, A., El Finti, A., El Mousadik, A. and Serghini, M.A. 2012. Improved *in vitro* micropropagation of artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). *European Journal of Scientific Research*, 80(4): 430–436.
- El Boullani, R., Elmoshli, A., El Finti, A., El Mousadik, A., Serghini, M.A. 2013. Effect of decapitation and size of explants on *in vitro* multiplication rate of globe artichoke. *Acta Hort*, 983: 325–329.
- El Boullani, R., Lagram, K., El Mousadik, A. and Serghini, M.A. 2017. Effect of explants density and size on the *in vitro* proliferation and growth of separated shoots of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). *JMES*, 8(7): 2469-2473.
- Elia, A., Conversa, G., Montervino, C., and Lotti, C. 2007. Micropropagation of the Early Artichoke Cultivar ‘Violet Du Provence’. *Acta Horticulturae*, 730: 127-34.
- El-Mekkawy, S., Farid, M.M., Taha, H.S., Fahmi, A.A., Amin, A.I. and Saker, M.M. 2018. Effect of different plant growth regulators and elicitors on the production of cucurbitacins in *Ecballium Elaterium* callus. *J. Mater. Environ. Sci.*, 9(9): 2529-2538.
- El Senousy, A.S., Farag, M.A., Al-Mahdy, D.A., Wessjohann, L.A. 2014. Developmental changes in leaf phenolics composition from three artichoke cvs. (*Cynara scolymus*) as determined via UHPLC–MS and chemometrics. *Phytochemistry*, 108: 67–76.

- El-Zeiny, O.A.H., El-Behairy, U.A., Zocchi, G. and Rashwan, M.M. 2013. Commercial Production of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) *in vitro*. *Egypt. J. Agric. Res.*, 91(3): 993-1007.
- Endress, R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 331 p.
- Ercan, N. 2016. Effects of Various Growth Regulators on *in vitro* Rooting of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 6(2016): 335-340. doi: 10.17265/2161-6256/2016.05.005.
- Ercetin, T., Toker, G., Kartal, M., Colgecen, H., Toker, M.C. 2012. *In vitro* isoflavonoid production and analysis in natural tetraploid *Trifolium pratense* (red clover) calluses. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(5): 964–970. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102695X2012005000102>.
- Eser, B., İlbi, H. ve Uğur, A. 2006. Enginar Yetiştiriciliği. Hasat Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul, 64 s.
- Facchini, P.J. and De Luca, V. 2008. *Opium poppy* and *Madagascar periwinkle*: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J.*, 54(4): 763–784.
- Fadda, A., Viridis, A., Barberis, A., Melito, S. 2018. Variation in secondary metabolites contents of Spinoso Sardo artichoke (*Cynara cardunculus* L.) under different day lengths. *Turk J Agric For.*, 42: 372-381. doi:10.3906/tar-1711-27.
- Faizal, A. and Sari, A.V. 2019. Enhancement of saponin accumulation in adventitious root culture of Javanese ginseng (*Talinum paniculatum* Gaertn.) through methyl jasmonate and salicylic acid elicitation. *African Journal of Biotechnology*, 18(6): 130-135. DOI: 10.5897/AJB2018.16736.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331(5): 372–379.
- Farhan, M.M., Hassawi, D.S. and Ibraheem, N.K. 2018. Polyphenols Compounds Investigation of Leaves and Callus Artichokes (*Cynara scolymus* L.). *Plant Archives*, 18(2): 2629-2635.
- Ferri, M., Gruarin, N., Barbieri, F. and Tassoni, A. 2018. *Capsicum* spp *in vitro* liquid cell suspensions: A useful system for the production of capsaicinoids and polyphenols. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 152(3): 436-444. DOI: 10.1080/11263504.2017.1305998.
- Fiegert, A.K., Mix, W.G., Vorlop, K.D. 2000. Regeneration of *Solanum tuberosum* L. Tomensa cv, Induction of somatic embryogenesis in liquid culture for the production of artificial seed. *Landbauforschung Volkenrode*, 50(3): 199-202.

- Fortunato, I.M., Ruta, C., Castrignano, A. and Saccardo, F. 2005. The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. *Scientia Horticulturae*, 106(4): 472–483.
- Foury, C. and Martin, F. 1974. Etude des possibilites de creation et d'utilisation de varietes d'artichaut issues de semences. Atti 2. Cong. Int. Sul Carciofo, Bari. pp. 667-669.
- Foury, C. 1976. L'Artichaut. Bul. Tech. Informa. 311: 415-432.
- Foury, C. 1989. Ressources génétiques et diversification de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Acta Horticulturae*, 242: 155-166.
- Fратиanni, F., Tucci, M., Palma, M.D., Pepe, R., Nazzaro, F. 2007. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chem.* 104 (3): 1282–1286. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.01.044.
- Fukumoto, L.R. and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48(8): 3597–3604.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50(1): 151-158.
- Gebhardt, R., Beck, H. 1996. Differential effects of garlic-derived organosulfides on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. *Lipids*, 31 (12): 1269–1276. doi: 10.1007/bf02587912.
- George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Technology. Exegetic Ltd. Edington, Wilts, England, 574 p.
- George, E.F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure – Background, Chapter 1. In: Edwin F. George, E.F., Hall, M.A and De Klerk, G.J. (Eds.), Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Volume 1, Dordrecht, Springer Publ., The Netherlands, pp. 1-29.
- Ghimire, B.K., Thiruvengadam, M. and Chung, I.-M. 2019. Identification of elicitors enhances the polyphenolic compounds and pharmacological potential in hairy root cultures of *Aster scaber*. *South African Journal of Botany*, 125: 92–101.
- Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I.D., Nandi, S.K., Rawal, R.S. and 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– 6.
- 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. *Journal of Nutrition*, 133(6): 1853–1859.
- Gülen, H. 1992. Doku kültürü ile çoğaltılan enginar (*Cynara scolymus* L.) fidelerinin dış ortama adaptasyon yetenekleri üzerine besin ortamındaki sakkaroz mannitol

ve farklı düzeylerdeki agar ile kültür kabı atmosferindeki oransal nemi azaltıcı uygulamaların etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 70 s.

- Gürel, S., Gürel, E. and Kaya, Z. 2002. Establishment of Cell Suspension Cultures and Plant Regeneration in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Turk J Bot.*, 26(4): 197-205.
- Haberlandt, G. 1902. Kulturenversuche mit isolierten Pflanzellen. *Sber. Acad. Wiss. Wien*, 111: 69-92.
- Hammouda, F.M., El-Nasr, M.M.S., Ismail, S.I., Shahat, A.A., 1993. Quantitative determination of the active constituents in Egyptian cultivated *Cynara scolymus*. *Int. J. Pharmacogn.* 31 (4): 299–304.
- Harbaoui, Y., Smaïjin, G., Welvaert, W. and Debergh, P. 1982. Assainissement viral de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) par la culture *in vitro* d'apex méristématiques. *Phytopathologie Méditerrané*, 21: 15–19 (in French).
- Hariprasath, L., Jegadeesh, R., Arjuna, P. and Raaman, N. 2015. *In vitro* propagation of *Senecio candicans* DC and comparative antioxidant properties of aqueous extracts of the *in vivo* plant and *in vitro*-derived callus. *South African Journal of Botany*, 98: 134–141.
- Hartmann, H.T. and Kester, D.E. 1983. Plant propagation principles and practices. Section 16:4 th Edition Prentice-Hall.Inc. Englewood Cliffs New Jersey, 15 p.
- Hausler, M., Ganzera, M., Abel, G., Popp, M., & Stuppner, H. 2002. Determination of caffeoylquinic acids and flavonoids in *Cynara scolymus* L. by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 56: 407–411.
- Harborne, J.B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry, 4th edn, Academic Press, London, 384 p.
- Hempel, M. 1985. The influence of micropropagation on progeny plants. *Acta Hort.*, 226(2): 615-630.
- Hesami, M., Daneshvar, M.H. 2018. Indirect Organogenesis through Seedling-Derived Leaf Segments of *Ficus Religiosa* - a Multipurpose Woody Medicinal Plant. *J. Crop Sci. Biotech.*, 21(2): 129 -136. DOI: 10.1007/s12892-018-0024-0.
- Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H. and Kanda, M. 1996. Retrotransposon of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7783-7788.
- Ho, W.J., Vasil, I.K. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*, 118: 169-180.
- Holst, B., Williamson, G. 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19: 73–82.

- Honermeier, B., Gottmann, S., 2010. Leaf yields and concentrations of polyphenolic compounds in artichoke (*Cynara cardunculus* L.) affected by different row spacing and plant densities. German]. *J. Kulturpflanz.*, 62 (11): 393–401.
- Iapichino, G. 1996. Micropropagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) From Underground Dormant Buds ("Ovoli"). *In Vitro Cell. Dev. Biol.--Plant*, 32(4): 249-252.
- Jiao, J., Gaia, Q-Y., Wang, X., Qin, Q-P., Wang, Z-Y., Liu, J. and Fu, Y-J. 2018. Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Industrial Crops & Products*, 124: 28–35.
- Joshaghani, M.S., Ghasemnezhad, A. and Alizadeh, M. 2014. Effect of explants types, culture media and concentrations of plant growth regulator on callus induction rate in Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *International Journal of Biotechnology Research*, 2(6): 070-074.
- Jun, N.J., Jang K.C., Kim S.C., Moon D.Y., Seong K.C., Kang K.H., Tandang, L., Kim, P.H., Cho, S.K. and Park, K.H. 2007. Radical scavenging activity and content of cynarin (1,3-dicaffeoylquinic acid) in Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Applied Biological Chemistry*, 50(4): 44–248.
- Kazmi, A., Khan, M.A., Mohammad, S., Ali, A., Kamil, A., Arif, M. and Ali, H. 2019. Elicitation directed growth and production of steviol glycosides in the adventitious roots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Industrial Crops & Products*, 139: 111530.
- Khan, T., Abbasi, B.H., Khan, M.A. 2018. The interplay between light, plant growth regulators and elicitors on growth and secondary metabolism in cell cultures of *Fagonia indica*. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, 185: 153–160.
- Klein, B., Bopp, M. 1971. Effect of activated charcoal in agar on the culture of lower plants. *Nature*, 230: 474.
- Kollia, E., Markaki, P., Zoumpoulakis, P. and Proestos, C. 2017. Antioxidant activity of *Cynara scolymus* L. and *Cynara cardunculus* L. extracts obtained by different extraction techniques. *Natural Product Research*, 31 (10): 1163-1167. DOI: 10.1080/14786419.2016.1219864.
- Krishnan, M.L., Roy, A. and Bharadvaja, N. 2019. Elicitation effect on the production of asiaticoside and asiatic acid in shoot, callus, and cell suspension culture of *Centella asiatica*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(6): 67-74. DOI: 10.7324/JAPS.2019.90609.
- Kroon, P.A., Garcia Cones, M.T., Fillingham, I.J., Williamson, G. 1999. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J. Sci. Food Agric.*, 79(3): 428-434.

- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszevska, T., Stochmal, A. and Oleszek, W. 2012. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha x piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 108(1): 73–81. DOI 10.1007/s11240-011-0014-8.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F. and Mol, J.N.M. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16(2): 123–132.
- Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., Soković, M. 2008. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chem.*, 107(2): 861–868.
- Kütahyalı, S. 1971. Aydın ilinin enginar yetiştiriciliği yönünden etüdü ve enginar yetiştiriminin genel esasları. Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Lattanzio, V., and Van Sumere, C.F. 1987. Changes in phenolic compounds during development and cold storage of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry*, 24: 37–50.
- Lattanzio, V., Kroon, P.A., Linsalata, V., Cardinali, A. 2009. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J. Funct. Foods*, 1(2): 131–144.
- Lattanzio, V., Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G. 2018. Signal transduction in artichoke [*Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hayek] callus and cell suspension cultures under nutritional stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 127: 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.017>.
- Lattanzio, V., Comino, C., Moglia, A. and Lanteri, S. 2019. Bio-active Compounds and Their Synthetic Pathway. In: Portis, E., Acquadro, A., Lanteri, S. (Eds.), *The Globe Artichoke Genome, Compendium of Plant Genomes*, Springer Nature, Switzerland, pp. 99-113. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20012-1_5
- Lauzer, D. and Vieth, J. 1990. Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* L. cv ‘Green Globe’. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 21: 237-244.
- Leifert, C. and Cassells, A.C. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37: 133–138.
- Lestari, N.K.D., Deswiniyanti, N.W., Astarini, I.A., Arpiwi, L.M. 2019. Callus and shoot induction of leaf culture *Lilium longiflorum* with NAA and BAP. *Nusantara Bioscience*, 11(2): 162-165.
- Lim, F.L., Yam, M.F., Asmawi, M.Z. and Chan, L-K. 2013. Elicitation of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture forenhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 50: 436–442.

- Lin, J.K., Tournas, J.A., Burch, J.A., Monteoriviere, N.A., Zielinski, J. 2008. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 24(2): 61-66.
- Lindsey, K., Jones, M.G.K. 1989. Plant biotechnology in agriculture. Open University Press, Wiley, Chichester, p 59.
- Liu, Z-B., Chen, J-G., Yin, Z-P., Shanguan, X-C., Peng, D-Y., Lu, T. and Lin, P. 2018. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in *Gardenia jasminoides* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134: 79–93. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1401-1>.
- Lombardo, S., Pandino, G., Mauro, R., Mauromicale, G. 2009. Variation of phenolic content in globe artichoke in relation to biological, technical and environmental factors. *Ital. J. Agron.* 4(4): 181–189. doi: 10.4081/ija.2009.4.181.
- Lombardo, S., Pandino, G., Ierna, A., Mauromicale, G. 2012. Variation of polyphenols in a germplasm collection of globe artichoke. *Food Res. Int.*, 46(2): 544–551. doi: 10.1016/j.foodres.2011.06.047.
- Lombardo, S., Pandino, G., Mauromicale, G., Knödler, M., Carle, R. Schieber, A. 2010. Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chem.*, 119(3): 1175–1181. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.08.033.
- López-Pérez, A.J. and Martínez, J.A. 2015. *In Vitro* Root Induction Improvement by Culture in Darkness for Different Globe Artichoke Cultivars. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 51(2): 160-165. doi: 10.1007/s11627-015-9667-z.
- Macit, F. ve Şalk, A. 1970. Enginar. E.Ü.Z.F. Teknik No: 14, Bornova, İzmir.
- Macua, J.I., Lahoz, I. and Santos, A. 2000. Agronomic and qualitative influence of different artichoke cultivars in sucker fields with one-year and multi-year crops. IV International Congress on Artichoke, October 17-21. Valenzano- Bari, Italy, 2000.
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y.G. and Jeong, B.R. 2016. Chemical Elicitor-Induced Modulation of Antioxidant Metabolism and Enhancement of Secondary Metabolite Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(3): 399. doi:10.3390/ijms17030399.
- Mansuroğlu, S. ve Gürel, E. 2001. Mikroçoğaltım. In: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (Eds.), Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, ss 262 – 281.
- Marras, F., Foddai, A. and Fiori, M. 1985. La selezione sanitaria del carciofo “*Spinoso Sardo*”. *Informatore fitopatológico*, 35: 47–50 (in Italian).

- Matthes, C. and Honermeier, B., 2007. Cultivation of the artichoke as a medicinal plant under temperate climate conditions in Germany. *Acta Hort.*, 730: 483–489.
- Matkowski, A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances*, 26: 548-560.
- Mauromicale, G. and Ierna, A. 2000. Characteristics of heads of seed-grown globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori] as affected by harvest period, sowing date and gibberellic acid. *Agronomie*, 20(2): 197–204.
- Mejía-Espejel, L., Robledo-Paz, A., Lozoya-Gloria, E., Peña-Valdivia, C.B. and Carrillo-Salazar, J.A. 2018. Elicitors on steviosides production in *Stevia rebaudiana* Bertoni calli. *Scientia Horticulturae*, 242: 95–102.
- Mendoza, D., Cuaspuud, O., Arias, J.P., Ruiz, O. and Arias, M. 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, 19: e00273.
- Menin, B., Moglia, A., Comino, C., Lanteri, S., Van Herpen, T.W.J.M. and Beekwilder, J. 2012. *In Vitro* Callogenesis and Agrobacterium-Mediated Transformation of Globe Artichoke. Proc. 7th IS on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding; Ed.: D. Geelen, Acta Hort. 961.
- Menin, B., Moglia, A., Comino, C., Hakkert, J.C., Lanteri, S. and Beekwilder, J. 2013. *In vitro* callus-induction in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) as a system for the production of caffeoylquinic acids. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 88(5): 537–542.
- Migliori, A. 1995. L'artichaut donnees generales. INRA Centre de Rennes Le Rheu. Station Pathologie Vegetale, 107 p.
- Moncousin, C., 1981. Rapid vegetative propagation of *Cynara scolymus* L. II. Improvement of the various techniques. *Hort. Abstr.* 51: 6926.
- Montelucci, G. 1962. Un'escursione a Montetosto, presso Cerveteri. *Annali di Botanica – Roma*, 27: 323-330.
- Morone Fortunato, I., Ruta, C., Castrignano, A., Saccardo, F. 2005. The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. *Sci. Hort.*, 106(4): 472-483.
- Morzadec, J.M. and Hourmant, A. 1997. *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA₃. *Sci. Hort.*, 72(1): 59-62.
- Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, C., Vincieri, F.F., 2004. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: Estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(2): 349–357.
- Murashige, T. and Skoog, F.A. 1962. A Revised Medium for a Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissues Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-97.

- Murata, J., Roepke, J., Gordon, H. and De Luca, V. 2008. The leaf epidermone of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *Plant Cell*, 20(3): 524–42.
- Namdeo, A.G. 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 69-79.
- Negrel, J. and Javelle, F. 1995. Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase- or pronase-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiol. Plant.*, 95(4): 569–574. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb05524.x>.
- Netien, G. and Roulier, A., 1967. Standardization of artichoke leaves and of artichoke-based galenicals. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon*, 11(3): 121-133.
- Ngara, R., Ressand, J., Ndimba, B.K. 2008. Establishment of sorghum cell suspension culture system for proteomics studies. *Afr J Biotechnol.*, 7(6): 744–9.
- Nouraei, S., Rahimmalek, M., Saeidi, G. 2018. Variation in polyphenolic composition, antioxidants and physiological characteristics of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* Hayek L.) as affected by drought stress. *Scientia Horticulturae*, 233: 378–385.
- Ordás, R.J., Tavazza, R. and Ancora, G. 1990. *In Vitro* Morphogenesis in the Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Plant Science*, 71(2): 223-237.
- Ordas, R.J., Tavazza, R. and Ancora, G. 1991. Callus formation from isolated globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) suspension protoplasts. *Plant Science*, 77(2): 253 – 259.
- Orlovskaya, T.V., Luneva, I.L. and Chelombit'ko, V.A. 2007. Chemical Composition of *Cynara scolymus* Leaves. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(2): 239-240.
- Özzambak, E. ve Yoltaş, T. 1988. Enginar (*Cynara scolymus* L. cv. Sakız) yetiştiriciliğinde uygulanan yeni üretim yöntemleri. *E.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1): 345-351.
- Pacifici, S., Lucchesini, M., Curadi, M., Grainfenberg, A. 2007. Influence of medium composition and vessel ventilation during the micropropagation stages of *Cynara scolymus* L. cv. Grato 1. *Adv Hort Sci.*, 21(2):83-88.
- Pandey, P., Singh, S., Banerjee, S. 2019. *Ocimum basilicum* suspension culture as resource for bioactive triterpenoids: yield enrichment by elicitation and bioreactor cultivation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137: 65–75. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01552-9>
- Pandino, G., Courts, F.L., Lombardo, S., Mauromicale, G. and Williamson, G. 2010a. Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in the Immature Inflorescence of Globe Artichoke, Wild Cardoon, and Cultivated Cardoon. *J. Agric. Food Chem.*, 58(2): 1026–1031.

- Pandino, G., Lombardo, S. and Mauromicale, G. 2010b. Mineral profile in globe artichoke as affected by genotype, head part and environment. *J Sci Food Agric.*, 91(2): 302–308. DOI 10.1002/jsfa.4185.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G. 2011a. Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2): 148–153.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G. 2011b. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chem.*, 126(2): 417–422. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.001.
- Pandino, G., Lombardo, S., Williamson, G., Mauromicale, G. 2012. Polyphenol profile and content in wild and cultivated *Cynara cardunculus* L. *Ital. J. Agron.*, 7(3): 254–261. doi: 10.4081/ija.2012.e35.
- Pandino, G., Lombardo, S. and Mauromicale, G. 2013a. Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 44: 44–49. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.10.022.
- Pandino, G., Lombardo, S., Lo Monaco, A. and Mauromicale, G. 2013b. Choice of time of harvest influences the polyphenol profile of globe artichoke. *Journal of Functional Foods*, 5(4): 1822–1828. doi: 10.1016/j.jff.2013.09.001.
- Pandino, G., Lombardo, S., Moglia, A., Portis, E., Lanteri, S., Mauromicale, G., 2015. Leaf polyphenol profile and SSR-based fingerprinting of new segregant *Cynara cardunculus* genotypes. *Front. Plant Sci.*, 5(800): 1–7.
- Pandino, G., Meneghini, M., Tavazza, R., Lombardo, S. and Mauromicale, G. 2017a. Phytochemicals accumulation and antioxidant activity in callus and suspension cultures of *Cynara scolymus* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 128: 223–230. DOI 10.1007/s11240-016-1102-6.
- Pandino, G., Lombardo, S., Antonino, L.M., Ruta, C. and Mauromicale, G. 2017b. *In vitro* micropropagation and mycorrhizal treatment influences the polyphenols content profile of globe artichoke under field conditions. *Food Research International*, 99(Part 1): 385–392.
- Panizzi, L. and Scarpati, M.L. 1954. Constitution of cynarine, the active principle of the artichoke. *Nature*, 174: 1062–1063.
- Pecaut, P., Dumas, R., De Vaux, R., Lot, H. 1983. Virus free clone of globe artichoke (*Cynara scolymus*) obtained after *in vitro* propagation, *Acta Hort.*, 131: 303-309.
- Peñalver, R., Durán-Vila, N. and López, M.M. 1994. Characterization and pathogenicity of bacteria from shoot tips of the globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Annals of Applied Biology*, 125(3): 501-513.
- Perassolo, M., Smith, M.E., Giulietti, A.M. and Talou, J.R. 2016. Synergistic effect of methyl jasmonate and cyclodextrins on anthraquinone accumulation in cell

- suspension cultures of *Morinda citrifolia* and *Rubia tinctorum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 124(2): 319–330. doi: 10.1007/s11240-015-0896-y.
- Phillips, R.L., Kaeppler, S.M., Olhoft, P., 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(12): 5222–5226.
- Pierpoint, W.S. 2000. Why do plants make medicines. *Biochemist*, 22: 37–40.
- Pignone, D. and Sonnante, G. 2004. Wild artichokes of south Italy: did the story begin here? *Genet Resour Crop Evol*, 51(6): 577–580.
- Pignone, D. and Sonnante, G., 2009. Origine ed evoluzione. AA.VV. 2009. Il carciofo e il cardo, coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana Coltura&Cultura, Ed. Script Bologna, pp. 2-11.
- Pinelli, P., Agostini, F., Comino, C., Lanteri, S., Portis, E., Romani, A. 2007. Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves. *Food Chemistry*, 105(4): 1695–11701.
- Portis, E., Mauromicale, G., Barchi, L., Mauro, R. and Lanteri, S. 2005. Population structure and genetic variation in autochthonous globe artichoke germplasm from Sicily Island. *Plant Sci.*, 168(6): 1591–1598.
- Pourjabar, A., Azimi, M.R., Mostafaie, A., Kahrizi, D., Cheghamirza, K. 2018. Proteome Analysis Of Milk Thistle (*Silybum marianum* L.) Cell Suspension Cultures In Response To Methyl Jasmonate And Yeast Extract Elicitors. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(1): 547-560. doi: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1701_547560.
- Ramos, P.A.B., Santos, S.A.O., Guerra, Â.R., Guerreiro, O., Freire, C.S.R., Rocha, S.M., Duarte, M.F., Silvestre, A.J.D. 2014. Phenolic composition and antioxidant activity of different morphological parts of *Cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC). *Industrial Crops and Products*, 61: 460–471.
- Rechner, A.R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G.P., Moore, K.P., Rice-Evans, C.A. 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radicals Biology and Medicine*, 33(2): 220–235.
- Reis, A., Scopel, M. and Zuanazzi, J.A.S. 2018. *Trifolium pratense*: Friable calli, cell culture protocol and isoflavones content in wild plants, in vitro and cell cultures analyzed by UPLC. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(5): 542–550.
- Rey, N.A, Papacchioli, V., Tavazza, R., Pagnotta, M.A. 2013. Gauging the genetic changes occurring across globe artichoke micropropagation towards an appropriate variety registration and nursery production. *Scientia Horticulturae*, 156: 121–126.

- Rijhwani, S.K. and Shanks, J.V. 1998. Effect of Elicitor Dosage and Exposure Time on Biosynthesis of Indole Alkaloids by *Catharanthus roseus* Hairy Root Cultures. *Biotechnol. Prog.*, 14(3): 442-449.
- Romani, A., Pinelli, P., Cantini, C., Cimato, A., Heimler, D. 2006. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chem.*, 95(2): 221–225.
- Rossi, V. and De Paoli, G. 1992. Micropropagation of Artichoke (*Cynara scolymus*), In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 19. High-Tech and Micropropagation III*, Spinger- Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 118-134.
- Rottenberg, A., Zohary, D., Nevo, E., 1996. Isozyme relationships between cultivated artichoke and the wild relatives. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 43(1): 59–62.
- Roy, A. and Bharadvaja, N. 2019. Establishment of root suspension culture of *Plumbago zeylanica* and enhanced production of plumbagin. *Industrial Crops & Products*, 137: 419–427.
- Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R.A., Hensgens, L.A.M. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 36(2): 259-264.
- Ruiz-Aceituno, L., Garcia-Sarrio, M.J., Alonso-Rodriguez, B., Ramos, L., Luz Sanz, M. 2016. Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus* L.) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction. *Food Chemistry*, 196: 1156-1162.
- Ruta, C., Tagarelli, A., Campanelli, A., De Mastro, G. and Morone-Fortunato, I. 2013. Callogenesis Capability of Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. Fiori). Proc. 8th IS on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives; Pagnotta, M.A. (Ed.) - Acta Hort. Vol: 983.
- Ryder, E.J., Devos, N.E. and Bari M.A. 1983. The globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *HortScience*, 18(5): 646-653.
- Salata, A. and Buczkowska, H., 2007. Effect of the method of harvesting on the yield and the content of phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.) herb. *Herba Pol.*, 53(3): 110–114.
- Salata, A. and Gruszecki, R. 2010. The Quantitative Analysis of Poliphenolic Compounds in Different Parts of The Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Depending on Growth Stage of Plants. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 9(3): 175-181.
- Salem, M.B., Affes, H., Athmouni, K., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., Hammami, S. and Zeghal, K.M. 2017. Chemicals Compositions, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Cynara scolymus* Leaves Extracts, and Analysis of Major Bioactive Polyphenols by HPLC. *Hindawi Evidence-Based*

Complementary and Alternative Medicine, Volume 2017, Article ID 4951937, 14 p. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/4951937>.

- Sánchez-Sampedro, M.A., Fernández-Tárrago, J. and Corchete, P. 2005. Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Biotechnology*, 119(1): 60–69.
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A. and 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.
- Scavo, A., Pandino, G., Restuccia, C., Parafati, L., Cirvilleri, G. et al. 2019. Antimicrobial activity of cultivated cardoon (*Cynara cardunculus* L. var. *altilis* DC.) leaf extracts against bacterial species of agricultural and food interest. *Industrial Crops & Products*, 129: 206–211.
- Schmidt-Durán, A., Alvarado-Ulloa, C., Chacón-Cerdas, R., Alvarado-Marchena, L.F. and Flores-Mora, D. 2016. Callogenesis and cell suspension establishment of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos* Schldl.) and its microscopic analysis. *SpringerPlus*, 5(1): 1717. DOI 10.1186/s40064-016-3381-0.
- Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R. and Schieber, A. 2004. Identification and Quantification of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, Juice, and Pomace by HPLC-DAD-ESI/MSn. *J. Agric. Food Chem.*, 52(13): 4090-4096.
- Schütz, K., Persike, M., Carle, R., Schieber, A. 2006. Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC–DAD–ESI–MSn. *Anal. Bioanal. Chem.*, 384(7-8): 1511–1517.
- Segasothy, M. and Phillips, P.A. 1999. Vegetarian diet: Panacea for modern lifestyle diseases?. *QJM: An International Journal of Medicine*, 92(9): 531–544.
- Shahidi, F. 1997. Natural antioxidants: An overview. In: Shahidi, F. (Ed.), *Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications*. Champaign, IL:AOCS Press, pp. 1-7.
- Shahsavari, E., Maheran, A.A., Siti Nor Akmar, A. and Hanafi, M.M. 2010. The effect of plant growth regulators on optimization of tissue culture system in Malaysian upland rice. *African Journal of Biotechnology*, 9(14): 2089-2094.
- Sharaf-Eldin, M.A., Schnitzler, W.H., Nitz, G., Razin, A.M. and El-Oksh, I.I. 2007. The effect of gibberellic acid (GA₃) on some phenolic substances in globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori). *Scientia Horticulturae*, 111(4): 326–329.

- Siatka, T. 2019. Effects of Growth Regulators on Production of Anthocyanins in Callus Cultures of *Angelica archangelica*. *Natural Product Communications*. June 2019: 1–4. doi: 10.1177/1934578X19857344.
- Sihem, D., Samia, D., Gaetano, P., Sara, L., Giovanni, M., Hassiba, C., Laura, G., Nouredine, H.A. 2015. *In vitro* antioxidant activities and phenolic content in crop residues of Tunisian globe artichoke. *Scientia Horticulturae*, 190: 128–136.
- Siva, G., Sivakumar, S., Prem Kumar, G., Vigneswaran, M., Vinoth, S., Muthamil Selvan, A., Parveez Ahamed, A., Manivannan, K., Rajesh Kumar, R., Thajuddin, N., Senthil Kumar, T. and Jayabalan, N. 2015. Optimization of elicitation condition with Jasmonic Acid, characterization and antimicrobial activity of Psoralen from direct regenerated plants of *Psoralea corylifolia* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4): 624–631.
- Sökmen, A. ve Gürel, E. 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. In: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (Eds.), Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, ss. 211 – 261
- Spînu, S., Ionescu, D., Drugulescu, M., Orţan, A., Moraru, I. and Turtoi, M. 2017. Biological Aspects, Composition and Potential Application of *Cynara scolymus* L. *Current Trends in Natural Sciences*, 6(11): 98-104.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. In: P.M. Dey and J.B. Harborne (Eds.), Plant Biochemistry. Academic Press, London, pp. 387–416.
- Suryowinata M. 1996. *Pemuliaan Tanaman secara In vitro*. Kanisius, Yogyakarta. [Indonesian]
- Şeniz, V. ve Erdoğan, V. 2011. Enginar Yetiştiriciliği. In: Şeniz, V. ve Erdoğan, V. (Eds), Bahçe Tarımı Kitabı-II. Anadolu Üniversitesi Yayını, Eskişehir, No:2358, 242 s.
- Tanoori, A., Ghasemnezhad, A. and Alizadeh, M. 2015. *In vitro* estimation of antioxidant compounds of artichoke (*Cynara scolymus* L.) as affected by methyl jasmonate and salicylic acid. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(12): 991-996.
- Trajtemberg, S.P., Apóstolo, N.M. and Fernández, G. 2006. Calluses of *Cynara cardunculus* var. *cardunculus* Cardoon Determination of Cynarine and Chlorogenic Acid by Automated Capillary Electrophoresis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 42: 534-537.
- Uğur, A. 2005. Enginarın hızlı çoğaltılmasında bazı vegetatif yöntemlerin kullanılma imkânlarının araştırılması. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 197 s.
- Umesh, T. 2014. *In vitro* callus induction and antioxidant potential of *Decalepis hamiltonii* (wight and arn). *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(6): 452-456.

- Upadhyaya, A., Narendra, S., Weber, D.J. and Smith, B.N. 1985. *In vitro* propagation of rubber-producing desert shrub. *Hort. Sci.*, 20(5): 864 – 865.
- Uslu Kiran, S., Ellialtıoğlu, Ő., Dolar, F.S., Üstün, A.S., Mehmetođlu, Ü. ve Bayraktar, H. 2007. Patlıcanda *Verticillium* solgunluğuna dayanıklılık ile kallus kùltüründe solavetivon birikimi arasındaki iliŐkinin incelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(1): 45-53.
- Üstün, S., Erbay, D., Ellialtıoğlu, Ő. and Mehmetoğlu, Ü. 2004. The Effects of Biotic and Abiotic Elicitors on the Capsidiol Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Capsicum annuum* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 18(1): 47-53. doi: 10.1080/13102818.2004.10819229
- Vázquez-Flota, F., Hernández-Domínguez, E., de Lourdes Miranda-Ham, M., Monforte-González, M. 2009. A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus in vitro* cultures. *Biotechnol Lett.*, 31(4): 591–595. doi: 10.1007/s10529-008-9881-4
- Veraplakorn, V. 2016. Micropropagation and callus induction of *Lantana camara* L. - A medicinal plant. *Agriculture and Natural Resources*, 50(5): 338-344.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev.*, 1: 13–25.
- Visioli, F., Bogani, P., Grande, S. and Galli, C., 2005. Mediterranean food and health: building human evidence. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(1): 37–49.
- Vural, H., EŐiyok, D. ve Duman, İ. 2000. Kùltür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 440 s.
- Wahba, H.E., Sarhan, A.Z., Salama, A.B., Sharaf-Eldin, M.A. and Gad, H.M. 2016. Growth response and active constituents of *Cynara cardunculus* plants to the number of leaves harvests. *Europ. J. Agronomy*, 73: 118–123.
- Wahba, H.E., Sarhan, A.Z., Salama, A.B., Sharaf-Eldin, M.A. and Gad, H.M. 2017. Effect of Seasonal Variation on the Growth and Chemical Composition of *Cynara cardunculus* L. Plants. *JMES*, 8(1): 318-323.
- Wang, M., Simon, J.E., Aviles, I.F., He, K., Zheng, Q.Y. and Tadmor, Y. 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51(3): 601–608.
- Wani, S., Kaloo, Z., Shah, M. and Banday, S. 2018. Influence of explant and plant growth regulators on callus mediated regeneration in *Lavatera cashmeriana*, Cambess. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3): 326-336.
- Wiktorowska, E., Długosz, M. and Janiszowska, W. 2010. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1): 14–20.

- Wink, M. 2009. Introduction, Chapter 1. In: Wink, M. (Ed.). Annual Plant Reviews Volume 39, Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, Second edition, Annual Plant Reviews 39: 1–20. doi: 10.1002/9781444318876.ch1.
- Wiklund, A. 1992. The genus *Cynara* L. (*Asteraceae-Cardueae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 109(1): 75-123.
- Yalçın, N.Y. 1992. Enginarın *in vitro* çoğaltılmasında besin ortamına katılan NAA, IBA, Riboflavin ve aktif karbonun köklenme üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 47 s.
- Yasmin, S., Nasiruddin, K.M., Begum, R., Talukder, S.K. 2003. Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. *Asian J. Plant Sci.*, 2(12): 936-940.
- Zaragoza-Martínez, F., Lucho-Constantino, G.G., Ponce-Noyola, T., Esparza-García, F., Poggi-Varaldo, H., Cerda-García-Rojas, C.M., Trejo-Tapia, G. and Ramos Valdivia, A.C. 2016. Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 127: 47–56. DOI 10.1007/s11240-016-1028-z.
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M. and Franco, C. 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, 162(3): 459–468.
- Zhu, X., Zhang, H., Lo, R. 2004. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J. Agric. Food Chem.*, 52(24): 7272–7278.
- Zhu, X.F., Zhang, H.X. and Lo, R. 2005. Antifungal activity of *Cynara scolymus* L. extracts. *Fitoterapia*, 76(1): 108–111.
- Zucchi, M.I., Arizono, H., Morais, V.A., Pelegrinelli Fungaro, M.H., Carneiro Vieira, M.L., 2002. Genetic instability of sugarcane plants derived from meristem cultures. *Genet. Mol. Biol.*, 25(1): 91–96.

ÖZGEÇMİŞ

TUĞÇE ÖZSAN

tugceozsan@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2014-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2011-2014	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2005-2010	Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya
Lisans 2006-2011	Anadolu Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi, İşletme Bölümü

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2011-2019	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya
----------------------------------	---

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Ozsan, T., Vural, G.E. and Onus, A.N. 2019. Do Jasmonic Acid and Activated Charcoal Increase the *in vitro* Development of Orange Carrot (*Daucus carota* L.) and Purple Carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.)? Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus (kabul edildi).
- 2- Ozsan T., Onus A.N. (2019). A protocol on *in vitro* rooting of 'Bayrampaşa' artichoke (*Cynara scolymus* L.). Mediterranean Agricultural Sciences, 32, 129-134.
- 3- Vural G.E., Ozsan T., Gözen V. , Onus A.N. (2018). *In Vitro* Micro Tuber Formation in Potato (*Solanum tuberosum* L.): is there any Relation between Methyl Jasmonate, Sugars, and Explants?. International Journal of Biotech Trends and Technology, 8, 1-8.
- 4- Ozsan T., Onus A.N. (2018). Does Glutamine Promote the Development of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers *in vitro*?. Journal of Scientific and Engineering Research, 11, 228-236.
- 5- Kanmaz M.G., Ozsan T., Esen O., Onus A.N (2018). Effects of Different Organic Extracts on Seed Germination of Some Carrot (*Daucus carota* L.) Cultivars. International Journal of Agricultural and Natural Sciences, 1, 1-4.
- 6- Ozsan T., Kanmaz M.G., Onus A.N. (2018). *In vitro* Carrot (*Daucus carota* L.) Regeneration: A Study on the Use of 2,4-D and Activated Charcoal. International Journal of Agricultural and Natural Sciences, 1, 1-4.
- 7- Ozsan T., Gözen V., Onus A.N. (2017). Cucumber Gynogenesis: Effects of 8 Different Media on Embryo and Plant Formation. International Journal of Agriculture Innovations and Research, 6, 419-422.
- 8- Ozsan T., Onus A.N. (2017). *In vitro* Pepper (*Capsicum annuum* L.) Anther Culture: Can Be Affected Via Vitamins B?. Biotechnology Journal International, 1-13.
- 9- Özsan T., Vural G.E., Onus A.N. (2017). Kök Kerevizinde (*Apium graveolens* L.) Metil Jasmonat ve Aktif Kömürün *in vitro* Etkisi. Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Dergisi, 1-5.
- 10- Özsan T., Onus A.N. (2016). Bakır Sülfatın Biberde (*Capsicum annuum* L.) Embriyogenesis Üzerine Etkisi", Bahçe, cilt.45, 314-317.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Özsan T., Vural G.E., Onus A.N. (2017). Patateste (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* Tohumluk Mikro Yumru Oluşumu. 6. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Adana, Türkiye, 5-7 Ekim 2017, ss.59-59

2- Secim A., Ozdemir B. Ozsan T., Onus A.N. (2017). Characterization of some melon (*Cucumis melo* L.) pure lines and their hybrid combinations and resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. V. Uluslararası Cucurbitaceae Sempozyumu, Cartagena, İSPANYA, 22-26 Haziran 2015, pp.1-1.

3- Özsan T., Onus A.N., Tantawy İ. , Çetinkaya E. (2014). Gümüş Nitrat ($AgNO_3$)'ın Marul (*Lactuca sativa* L.) Kotiledon Eksplantlarında Direkt ve İndirekt Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu, TEKİRDAĞ, TÜRKİYE, 2-4 Eylül 2014, ss.222-225.

4- Özsan T., Onus A.N., Çetinkaya E. (2014). Farklı Yetiştirme Sistemlerinin Brokolide (*Brassica oleracea* var. *italica*) Androgenesis Üzerine Etkisi. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu, TEKİRDAĞ, TÜRKİYE, 2-4 Eylül 2014, ss.297-301.

5- Özsan T., Onus A.N. (2012). Sebzelerdeki Sekonder Metabolitler ve Konsantrasyonlarının Arttırılması. 9. Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu, KONYA, TÜRKİYE, 12-14 Eylül 2012, ss.1-1.