

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO ŞARTLARDA ÜRETİLEN *Inula helenium* L.
BİTKİSİNDE ELİSİTÖR VE STRESÖR UYGULAMALARININ
ETKEN MADDE ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Gökhan AKÇURA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Musa TÜRKER

Şubat, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***İN VİTRO* ŞARTLARDA ÜRETİLEN *Inula helenium L.*
BİTKİSİNDE ELİSİTÖR VE STRESÖR UYGULAMALARININ
ETKEN MADDE ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gökhan AKÇURA tarafından hazırlanan tez çalışması 18.02.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Musa TÜRKER
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Musa TÜRKER, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR, Üye
Bingöl Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Musa TÜRKER sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “*In vitro* şartlarda üretilen *Inula helenium* L. bitkisinde elisitör ve stresör uygulamalarının etken madde üretimine etkilerinin araştırılması” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Gökhan Akçura

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana her türlü bilgiyi, çalışma ortamını ve desteği sağlayan, her konuda yardımını esirgemeyen kıymetli danışmanım Prof. Dr. Musa TÜRKER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarına destek veren ve analizlerin gerçekleşmesini sağlayan, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'nin değerli öğretim üyesi Doç. Dr. Abdullah DALAR'a teşekkürü bir borç bilirim. *Inula helenium* L. bitkisinin tohumlarını hibe eden Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi yetkililerine ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan annem Asuman AKÇURA'ya, babam Nusret AKÇURA'ya ve abim Korhan AKÇURA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Büşra İkbâl TUNCA, Eda TOPTAŞ ÇAKIROĞLU ve Nuran ÇALIMLI'ya teşekkür ederim. Deneylerime katkı sağlayan lisans öğrencileri; Ayşegül COŞKUN, Armita SAFARİ, Aybüke CANIM, Buket KORKMAZ, Eylül ER, Hazan ÖZPEHLİVAN, Muhammed GYLYJOV, Ozan AYDIN ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Gökhan AKÇURA

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 LİTERATÜR ÖZETİ.....	1
1.2 AMAÇ.....	2
1.3 HİPOTEZ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ.....	4
2.1.1 Bitki Doku Kültürü Yöntemleri.....	5
2.1.2 Bitki Doku Kültürünün Aşamaları.....	6
2.2 BİTKİ SEKONDER METABOLİTLERİ.....	7
2.2.1 Bitki Sekonder Metabolitlerinin Sınıfları.....	8
2.2.2 Sekonder Metabolitlerin Üretimi.....	12
2.3 <i>INULA HELENİUM L.</i>	13
3 MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 MATERYAL.....	17
3.2 YÖNTEM.....	19
3.2.1 Malzeme ve Çalışma Yeri Sterilizasyonu.....	19
3.2.2 Besiyeri Hazırlanması Ve Sterilizasyonu.....	20
3.2.3 Bitki Tohumunun Sterilizasyonu ve Ekimi.....	20
3.2.4 Eksplant ve Kallus Kültürü.....	21
3.2.5 Stres ve Elisitör Uygulamaları.....	21
3.2.6 Liyofilizasyon ve Ekstraksiyon.....	21
3.2.7 HPLC-DAD Analizi.....	22
3.2.8 İstatiksel Analiz.....	23

4 DENEYSEL VERİLER	24
4.1 TOHURLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ	24
4.2 <i>İN VİTRO</i> BİTKİ REJENERASYONU.....	26
4.3 <i>İN VİTRO</i> ORTAMDA ÇİMLENDİRİLMİŞ BİTKİLERİN EKSPANTLARININ <i>İN VİTRO</i> UYGULAMALARI.....	28
4.4 <i>İN VİTRO</i> 'DA REJENERE EDİLEN BİTKİ VE KALLUSLARA STRES VE ELİSİTÖR UYGULAMALARI.....	39
4.5 BİTKİ SEKONDER METABOLİT ANALİZİ SONUÇLARI	46
4.5.1 Toprakta ya da <i>in vitro</i> ortamda çimlendirilen veya rejenere edilen bitki örneklerinin sekonder metabolit değerleri	48
4.5.2 Kallus örneklerinin sekonder metabolit değerleri.....	50
4.5.3 Stres veya elisitör uygulanmış kallus örneklerinin sekonder metabolit değerleri	53
4.5.4 Stres veya elisitör uygulanmış bitki örneklerinin sekonder metabolit değerleri	56
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKÇA	69
A KROMATOGRAM SONUÇLARI	75
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	86

SİMGE LİSTESİ

atm	Atmosfer basıncı
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
m	Metre
mm	Milimetre
M	Molarite
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
nm	Nanometre
pH	Power of Hydrogen (Hidrojen Gücü)
rpm	Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
sa	Saat
sn	Saniye
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
SS	Standart Sapma
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

A	Yaprak Ayası Eksplantı
ABA	Absisik Asit
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
BAP	6-Benzilaminopurin
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
CuCl ₂	Bakır (ii) Klorür
CuSO ₄	Bakır Sülfat
DAD	Diode Array Detektörü
G	Gövde Eksplantı
GABA	Gama Aminobütirik Asit
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometre
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IBA	İndol-3-Bütirik Asit
K	Kök Eksplantı
KN	Kinetin
Ko	Kotiledon Eksplantı
Mela	Melatonin
MS	Murashige ve Skoog
NAA	1-Naftalenetik Asit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NMDA	N-Metil-D-Aspartik Asit
TFB	Toplam Fenolik Bileşik
UV	Ultraviyole
Y	Yaprak Eksplantı
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 <i>Inula helenium</i> L. bitkisi.....	14
Şekil 4.1 Toprakta çimlendirilen <i>Inula helenium</i> L.	24
Şekil 4.2 <i>İn vitro</i> koşulda BBD'siz ortamda çimlendirilen <i>Inula helenium</i> L.	26
Şekil 4.3 Toprakta yetiştirilen bitkiden eksplant ile rejenere edilmiş kalluslar, 2 mg/L 2,4-D (16/8 fotoperiyot).....	27
Şekil 4.4 <i>İn vitro</i> besin ortamlarına ekilmiş eksplantlar.....	28
Şekil 4.5 Karanlıkta 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren MS ortamında gelişen kalluslar örnekleri.....	31
Şekil 4.6 Karanlıkta farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ve KN içeren besin ortamlarında gelişmiş kallus örnekleri.....	33
Şekil 4.7 Karanlıkta farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ve KN içeren besin ortamlarında kök eksplantlarından gelişmiş kallus örnekleri.....	34
Şekil 4.8 16/8 fotoperiyotta 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA içeren besin ortamlarında gelişmiş kallus örnekleri.....	35
Şekil 4.9 16/8 fotoperiyotta ve karanlıkta 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA içeren besin ortamlarında gelişmiş kallus örnekleri.....	36
Şekil 4.10 Farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BAP, NAA ve IBA eklenmiş besin ortamlarında sürgün örnekleri	37
Şekil 4.11 Kalluslar için altkültür çalışmaları.....	38
Şekil 4.12 Kalluslarda stres ve elisitör uygulamaları.....	42
Şekil 4.13 Bitkilerde stres ve elisitör uygulamaları.....	44
Şekil 6.1 Topraktaçimlendirilen <i>Inula helenium</i> L. bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....	75
Şekil 6.2 <i>İn vitro</i> ortamda çimlendirilen <i>Inula helenium</i> L bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....	75

- Şekil 6.3** *İn vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta *Inula helenium L.* bitkinin gövde eksplantıyla organogenez yolu ile rejenere edilen bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....76
- Şekil 6.4** *İn vitro* ve karanlık ortamda 2 mg/L 2,4-D içeren besin ortamında rejenere edilen *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....76
- Şekil 6.5** *İn vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında rejenere edilen *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....77
- Şekil 6.6** *İn vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA içeren besin ortamında rejenere edilen *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....77
- Şekil 6.7** *İn vitro* ortamda 0,5 mg/L BAP + 1 mg/L NAA içeren besin ortamında rejenere edilen *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....78
- Şekil 6.8** *İn vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 1/2 MS besin stresi uygulanmış *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....78
- Şekil 6.9** *İn vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 1/4 MS besin stresi uygulanmış *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....79
- Şekil 6.10** *İn vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 25 µM gümüş nitrat stresi uygulanmış *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....79

- Şekil 6.11** *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren MS besin ortamında 25 µM bakır sülfat stresi uygulanmış *Inula helenium L.* örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....80
- Şekil 6.12** *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 25 µM bakır klorür stresi uygulanmış *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....80
- Şekil 6.13** *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 100 µM absisik asit uygulanmış *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....81
- Şekil 6.14** *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 35 µM melatonin uygulanmış *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....81
- Şekil 6.15** *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 1/2 MS besin stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....82
- Şekil 6.16** *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 1/4 MS besin stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....82
- Şekil 6.17** *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 25 µM gümüş nitrat stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....83
- Şekil 6.18** *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 25 µM bakır sülfat stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....83

Şekil 6.19 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 25 µM bakır klorür stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....84

Şekil 6.20 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 100 µM absisik asit uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....84

Şekil 6.21 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 35 µM melatonin uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu.....85



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 <i>Inula helenium</i> L. bitkisinin genel özellikleri.....	16
Tablo 3.1 Deneyler sırasında kullanılan kimyasallar listesi.....	17
Tablo 3.2 Deneyler sırasında kullanılan cihazlar ve ekipmanların listesi.....	18
Tablo 3.3 HPLC analizlerinde kullanılan ekipmanlar, kimyasallar ve ayarlar.....	23
Tablo 3.4 HPLC analizlerinde kullanılan gradient programı.....	23
Tablo 4.1 MS ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin (BBD) kombinasyonları ve konsantrasyonları.....	29
Tablo 4.2 MS ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin (BBD) çeşitli eksplantlar üzerindeki etkileri.....	30
Tablo 4.3 Bitkilerde ve kalluslarda biyoaktif maddelerin değişimlerini gözlemek için yapılan stres ve elisitör uygulamaları.....	40
Tablo 4.4 Kalluslarda stres ve elisitör uygulamaları ve kallus gelişimine etkileri ...	41
Tablo 4.5 Bitkilerde stres ve elisitör uygulamaları ve bitki gelişimine etkileri.....	43
Tablo 4.6 HPLC’de bitki sekonder metabolit analizi yapılmış örnekler.....	47
Tablo 4.7 Toprakta ya da laboratuvarında çimlendirilen veya rejenere edilen bitki örneklerinin (kontrol) toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin değerleri.....	48
Tablo 4.8 Farklı BBD’ler ile rejenere edilen kallus örneklerinin, kontrol örnekleri ile birlikte toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin değerleri.....	50
Tablo 4.9 Stres ve elisitör uygulaması yapılmış kallus örneklerinin, kontrol örnekleri ile birlikte toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin değerleri.....	53
Tablo 4.10 Stres ve elisitör uygulaması yapılmış bitki örneklerinin, kontrol örnekleri ile birlikte toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin değerleri.....	56
Tablo 4.11 HPLC analizi yapılmış bütün örneklerin analiz sonuçları.....	59

***In vitro* Şartlarda Üretilen *Inula helenium* L. Bitkisinde Elisitör Ve Stresör Uygulamalarının Etken Madde Üretimine Etkilerinin Araştırılması**

Gökhan AKÇURA

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Musa TÜRKER

Bu çalışmada tıbbi açıdan önemli bir bitki olan *Inula helenium* L. bitki tohumları çimlendirilmiştir. *In vitro* ortamlarda çimlenen bitkilerden elde edilen eksplantlar, farklı Bitki Büyüme Düzenleyicileri (BBD) kullanılarak, organogenez yöntemiyle tam bitki ve kallus hücre serileri elde edilmiştir. *In vitro* koşullarda rejenere edilen *Inula helenium* L. bitkilerine ve kalluslara farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BBD, stres faktörleri ve elisitörler uygulanarak bitkinin biyoaktif bileşiklerinin değişimleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yaprak, yaprak ayası, gövde ucu ve kotiledon eksplantlarında en iyi kallus oluşumu gösteren ortamın 30±2 günün sonunda karanlık koşullarda, 25±2 °C’de 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ile desteklenmiş MS besin ortamı; kök için en iyi kallus oluşumu gösteren ortamın 16/8 fotoperiyotta 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA ile desteklenmiş MS besin ortamı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA ile desteklenmiş MS besin ortamında gövde ucu eksplantlarından organogenez yoluyla sürgün gelişimi gerçekleştirilmiştir.

In vitro BBD'den yoksun ortamda tohumdan gelişen bitkilere ve 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ile desteklenmiş MS ortamında gelişen kallus hücre serilerine, Bakır Sülfat (25 µM), Bakır Klorür (25 µM), Gümüş Nitrat (25 µM), Absisik Asit (100 µM), azaltılmış MS besin ortamı (½, ¼ MS) ve Melatonin (35 µM) stresör ve elisitörleri uygulanarak diğer bitki ve kallus örneklerine göre toplam fenolik bileşik (TFB), klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin konsantrasyonlarının karşılaştırmalı olarak değişimleri incelenmiştir. En yüksek toplam TFB, 16/8 fotoperiyotta 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA ile desteklenmiş MS besin ortamında rejenere olan kalluslarda tespit edilmiştir. En yüksek klorojenik asit konsantrasyonu, karanlık koşullarda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ile desteklenmiş ve 35 µM melatonin içeren MS besin ortamında rejenere olan kalluslarda bulunmuştur. En yüksek kafeik asit konsantrasyonu, toprakta çimlendirilen bitkilerde olup, bütün *in vitro* koşullarda elde edilen bitki, sürgün ve kalluslarda kafeik asit oranının düştüğü belirlenmiştir. En yüksek rutin konsantrasyonu, karanlık koşullarda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ile desteklenmiş ve 25 µM gümüş nitrat stresi içeren MS besin ortamında rejenere olan kalluslarda saptanmıştır. En yüksek kuersetin konsantrasyonu ise karanlık koşullarda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ile desteklenmiş ve 35 µM melatonin içeren MS besin ortamında rejenere olan kalluslarda belirlenmiştir. Stres ve elisitör uygulanmış, *in vitro* şartlarda geliştirilen *Inula helenium* L. bitki ve kallus hücre serilerindeki biyoaktif maddelerin doğal ortamda yetiştirilen *Inula helenium* L. bitki örneklerinden elde edilen biyoaktif maddelerden yüksek olması, biyoaktif maddelerin tabiat koşullarına bağlı kalınmadan kontrollü ortamlarda kitlesel miktarda üretilerek eczacılık sektörüne kazandırılabilme potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif bileşik, elisitör, *Inula helenium* L., kallus, stres

Investigation of the Effects of Elicitor and Stressor Applications over Active Substance Production in *Inula helenium* L. Plant Regenerated *In vitro* Condition

Gökhan AKÇURA

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Musa TÜRKER

In the present study, the seeds of *Inula helenium* L., a noteworthy medical plant, were germinated. Whole plant and callus cell line were regenerated from explant in MS medium supplemented with different Plant Growth Regulators (PGR). *In vitro* regenerated plants and callus cell lines were exposed to different concentrations and combinations of PGR, stress factors and elicitors and the changes in the concentration of bioactive compounds were compared. The best callus growth on leaf, petiole, shoot tip and cotyledon explants was determined in MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN at 25±2 °C in dark condition; meanwhile, the best callus growth on root explants was determined in MS medium supplemented with 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA in daylight condition. In addition, whole plant regeneration was provided from shoot tip explant via direct organogenesis in MS medium supplemented with 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA.

Copper Sulphate (25 µM), Copper Chloride (25 µM), Silver Nitrate (25 µM), Abscisic Acid (100 µM), reduced MS nutrient medium (½, ¼ MS) and Melatonin (35 µM) stressor and elicitors were applied on callus grown in MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D + 0.3 mg/L KN and on plants germinated *in vitro* PGR-free MS medium. The changes in concentration of total phenolic compound (TPC), chlorogenic acid, caffeic acid, rutin and quercetin were evaluated under different stress condition. The highest TPC concentration was determined at callus samples that regenerated in MS nutrient medium supplemented with 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA in daylight condition. The highest chlorogenic acid concentration was determined at callus samples that regenerated in MS nutrient medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D + 0.3 mg/L KN and 35 µM melatonin stress in dark condition. The highest concentration of caffeic acid was determined at plant samples that germinated in soil. It was found that the concentration of caffeic acid decreased at all *in vitro* seedling, regenerated plants and callus samples. The highest rutin concentration was determined at callus samples that regenerated in MS nutrient medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D + 0.3 mg/L KN and 25 µM silver nitrate stress in dark condition. The highest quercetin concentration was determined at callus samples that regenerated in MS nutrient medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D + 0.3 mg/L KN and 35 µM melatonin stress in dark condition. It was discovered that the bioactive substances in plant and callus cell lines of *Inula helenium* L. regenerated *in vitro* conditions were in higher concentration than that of bioactive substances in *Inula helenium* L. plants grown in nature. Thanks to this discovery, it was understood that mass production of bioactive substances of *Inula helenium* L. *in vitro* environment has the potential to be used at the pharmaceutical industry without being dependent on natural conditions.

Keywords: Bioactive compound, callus tissue, elicitor, *Inula helenium* L., stress

1.1 Literatür Özeti

Pek çok bitki insanlık tarihi boyunca hastalıklara şifa olması amacıyla kullanılmıştır. Bu şifalı bitkilerden biri de *Inula helenium* L. (Andızotu) bitkisidir. *Inula helenium* L. bitkisi, *Inula* cinsinde ve Asteraceae familyasında bulunmaktadır. Büyük ölçüde yetiştiği yerler Türkiye dahil Avrupa, Asya, Afrika ve Kuzey Amerika kıtalarıdır. *Inula helenium* L bitkisinin sivilceye, kaşıntıya, öksürüğe, balgama, sindirime iyi geldiği bilinmektedir. Ayrıca terletici, idrar söktürücü, iştah açıcı, tonik, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antikanser etkilerinin olduğu da bilinmektedir [22, 23]. *Inula helenium* L bitkisinin köklerinde eudesmane tipi seskiterpen laktonlar, timol ve türevleri, terpenler, steroller ve polisakkarit türü inülin; *Inula helenium* L bitkisinin yapraklarında ve yapraktan elde edilen kalluslarında ise hidroksisinnamik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve türevlerini ve kafeoilaldarik asit içerdiği saptanmıştır [28, 29].

Inula helenium L. bitkisini önemli kılan içerdiği sekonder metabolitleridir. Primer metabolitler protein, yağ ve karbonhidrat gibi bitkinin temel kimyasallarıdır. Sekonder metabolitler ise bitkinin yaşamına doğrudan etki eden savunma, üreme, hayatta kalma ve direnç geliştirme konusunda önemli bileşiklerdir. Başlıca fenolik bileşikler, alkaloidler, terpenler, glikozitler, bitki aminleri vs. olmak üzere birçok bitkide ekonomik açıdan değerli sekonder metabolitleri bulunmaktadır [8].

Bir bitki sekonder bileşiği olan fenolik bileşikler, yapısında aromatik halkalardaki karbon atomlarıyla bağlanmış bir ya da birkaç tane hidroksil grupları bulunan bileşenlerdir. Eğer bir hidroksil grubu bağlanmış ise fenol, ikiden fazla hidroksil grubuna bağlı ise polifenol olarak adlandırılırlar. Fenolik bileşiklerin antikanser, antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve serbest radikal temizleme gibi etkileri olduğu bilinmektedir. Bir fenolik bileşik türü olan flavonoidler, polifenolik antioksidanlardır [8, 10].

Klorojenik asit gıdalarda en çok karşılaşılan fenolik bileşiklerden biridir. Başta antidiyabetik, antimikrobiyal ve antiviral özellikleri olmak üzere birçok yararları bulunmaktadır [11]. Kafeik asit fenilpropanoid çeşididir ve lignin sentezinde prekürsördür. Stres, enfeksiyon ve reaktif oksijen türleri karşısında bitki hücrelerini korumakta önemli görevi bulunmaktadır [45]. Rutin bir flavonoid olup antioksidan,

antimikrobiyal, antiinflamatuvar yararları bulunmaktadır [12, 14]. Kuersetin bir flavonoiddir ve bitkiler tarafından enfeksiyonlara ve streslere karşı antibakteriyel ve antioksidan olarak kullanılmaktadır [16]. Kuersetinin antioksidan, antiinflamatuvar, kalp koruyucu, anti-hipertansif ve anti-konvülsan etkileri bulunmaktadır [12, 18].

Bitki doku kültürü bitki sekonder bileşiklerin üretimi için ucuz ve pratik bir yöntemdir. Bitki doku kültürü, geleneksel tarım yöntemlerine göre iklim şartlarından, büyüme koşullarından ve coğrafi konumdan etkilenmez [20]. Bitki sekonder kültürü, bitkilerden alınan eksplantların sterilize edilmesinden sonra aseptik ve kapalı bir besin kültürüne ekilmesi ve elverişli koşullarda o kültürün inkübe edilmesi işlemleridir. Bitki doku kültürünün temeli, bitkinin her hücresinin bütün bir bitkiyi oluşturma potansiyeline sahip olduğunu öne süren “totipotensi” teorisine dayanmaktadır [2]. Bitki doku kültürü bitki sekonder bileşiklerinin üretimi dışında mikroçoğaltım, kitlesel bitki üretimi gibi başka amaçlarda kullanılmaktadır [6]. Embriyo kültürü, meristem kültürü, kallus kültürü gibi farklı üretim yöntemleri vardır [2]. Bitki doku kültürünün aşamaları sırasıyla; donör bitkinin hazırlanması, başlangıç aşaması, çoğaltım, köklendirme ve iklimlendirme şeklindedir [7].

Bitki doku kültürü ile sekonder metabolit üretilirken kültürlerdeki sekonder metabolit verimi çeşitli yollar ile arttırılabilmektedir. Öncelikle kalluslarda en fazla bitki sekonder metabolit üretildiği zamanın kallus büyümesinin durduğu plato fazı olduğu göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Buna ilaveten kültür ortamlarına elisitör, abiyotik stres uygulaması ve öncü (prekürsör) eklenmesi sekonder metabolit artışına sebep olabileceği bildirilmiştir [20, 21].

1.2 Amaç

Literatürde *Inula helenium* L. (Andızotu) bitkisinin astım, öksürük, bronşit, akciğer rahatsızlıkları, tüberküloz tedavisi, cilt enfeksiyonları ve helmintik hastalıklara iyi geldiği bildirilmiştir. Aynı zamanda geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır [1]. Literatürde *Inula helenium* L. bitkisi eksplantlarından kallus elde edilmiş ve sekonder metabolit analizleri yapıldığı bildirilmiştir. Ancak *In vitro* ortamda sekonder metabolit miktarının arttırılmasına yönelik çalışmalar çok azdır. Tez çalışmasının temel amacı, doku kültürü ortamında elde edilen kallus hücre serilerini ve *in vitro* ortamda çimlendirilen bitki örneklerini farklı stres koşullarına maruz bırakarak *Inula helenium* L. bitkisinde bulunan sekonder metabolitlerin miktarını arttırmaktır. Bu çalışmada, bakır sülfat, bakır klorür, gümüş nitrat, besin kısıtlaması (MS) stresör olarak; melatonin ve

absisik asit ise elisitör olarak *Inula helenium* L. bitkisinin yaprak, gövde ucu, kök, yaprak ayası ve kotiledon eksplantlarından elde edilen kalluslara ve *in vitro* ortamda çimlendirilmiş bitki örneklerine uygulanmıştır. HPLC analizleri sonucunda *Inula helenium* L. bitkisinin *in vitro* şartlarda rejenere edilen kallus ve *in vitro* şartlarda çimlendirilen bitki örneklerinde stres ve elisitör uygulamaları ile sekonder metabolit miktarının arttığı ortaya konmuştur.

1.3 Hipotez

Bitki bünyesinde stresör uygulamaları serbest radikaller üretir. Bitki serbest radikaller ve besin stresine karşı koyabilmek ve hayatta kalabilmek için, serbest radikal süpürücü biyoaktif bileşikler üretir veya konsantrasyonunu artırır. Ayrıca biyoaktif maddelerin sentez yollarını tetikleyen elisitör maddeler de yine biyoaktif maddelerin sentezini artırır. Bilimsel çalışmalar ve literatür ışığında bu gerçeklerden yola çıkarak, tabiata bağlı kalınmadan tıbbi öneme sahip *Inula helenium* L. bitkisindeki biyoaktif maddelerin elisitör ve stresör uygulamaları ile *in vitro* şartlarda rejenere edilmiş kallus ve *in vitro* ortamda çimlendirilmiş bitki örneklerinde artabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla bitkiye *in vitro* koşullarda bakır sülfat, bakır klorür, gümüş nitrat, besin eksikliği (MS), melatonin ve absisik asit uygulanarak bitkinin sekonder metabolit içeriğine etkilerinin gözlemlenmesi hedeflenmiştir. Bitkilerin sentezlediği ikincil metabolitlerin rolleri genellikle yabancı organizmalara karşı savunma, diğer bitki türleri ile rekabete girme, abiyotik streslerden korunma ve virüs, bakteri ve mantar gibi zararlılara karşı koyma amaçlıdır. Bu tür çevresel etkilere maruz kaldığında bitki, sekonder metabolit miktarını arttırmaktadır veya sadece özel şartlarda bazı sekonder bileşikler üretmektedir. Bu maddeler genellikle tıbbi, eczacılık ve endüstriyel açıdan önemli bileşiklerdir. Bu nedenle, tıbbi ve ekonomik öneme sahip bileşiklerin elisitör ve stres uygulamaları yolu ile artırılması amaçlanmıştır. Bitki doku kültüründe daha fazla elde edilebilen sekonder metabolitler, biyoreaktörlerde kitlesel olarak üretilip ilaç hammaddesi olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

2.1 Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü ışık, nem ve sıcaklık kontrollü ortamlarda ve aseptik koşullarda bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının kültür ortamında yetiştirilmesi tekniğidir [3]. Bitki doku kültürüne ayrıca “mikroüretim” ya da “aseptik kültür”de denilmektedir [2]. Bitki doku kültürü tekniğinin gelişimi bitki hormonlarının keşfi ile ve bitkilerinin nasıl büyüüp geliştiğini anlamamızla yakından bağlantılıdır. Bitki doku kültürünün getirdiği kolaylıklar sayesinde tarımda ve bitkisel kimyasalların üretiminde birçok pratik uygulama gelişmiştir ve ayrıca bitki genetik mühendisliğine ön ayak olmuştur [3].

“Totipotensi” (toplam güç) teorisi ile bitkisel hücreler ile yapay bitki embriyoları geliştirilebileceğini düşünülmüştür [4]. Bu teoriye göre, her bitkinin başlangıcı bir bitkinin bütün genetik potansiyelini içeren bir zigot hücresidir. Bu zigot hücrelerinin mitoz yoluyla bölünmesi ile genler olduğu gibi yavru hücrelere aktarılır, bu yolla bitkinin gelişmesi sağlanır. Bu sebepten dolayı bitkilerdeki bütün hücreler zigotta olan totipotensiye sahiptir ve bu hücrelere uygun şartlar verildiği zaman yeniden bütün bir bitki elde etmek mümkündür [2]. Bu düşüncüyü ortaya atan Golliob Haberlandt bitki doku kültürünün babası sayılmaktadır [4].

Bitki doku kültürünün birçok kullanım alanı bulunmaktadır;

- Hızlı klonal çoğaltım ya da mikroçoğaltım
- Hastalıkların bertaraf edilmesi
- Haploid bitki oluşturması için anter ve yumurta kültürü
- Hibrit bitki üretimi için protoplast izolasyonu
- Embriyo kültürü
- Botanik maddelerin üretimi
- Hücre seçilimi ve mutasyonu
- Temel bitki anatomisi, gelişimi ve beslenmesi araştırmaları
- Bitki biyoteknolojisi
- Somatik embriyogenez
- Sentetik tohum üretimi
- Kallus kültürü
- Çiçek kültürü [6]

Bitki doku kültürü ticari anlamda pek çok sebepten dolayı uygulanmaktadır. Bazı belli başlı bitkilerde aşağıdaki çeşitli nedenlerden dolayı tohumdan veya çelik yolu ile yetiştirilmesi mümkün olmamaktadır ya da pratik değildir;

- Tohumdan yetiştirilen ürünlerin tekbiçimde olmaması
- Tohumdan yetiştirilen ürünlerin türünün özelliklerini taşınamaması
- Tohumların olgun bitki olarak büyümelerinin uzun zaman alması
- Tohumların zor elde edilmesi
- Tohumların elde edilebilir olmaması
- Çeliklerin çok yavaş büyümesi
- Çeliklerin hastalıklara karşı zayıf olması
- Çelik alınabilecek (Hibrit, virüssüz, istenen mutasyonda) stok bitkilerin kıt miktarda olması
- Stok bitkiler için yer bulunamaması
- Stok bitkilerin elde bulundurmanın masrafına değmemesi [6]

2.1.1 Bitki Doku Kültürü Yöntemleri

Çeşitli bitki doku yöntemleri bulunmaktadır ve bunlar kullanılan eksplanta göre adlandırılmıştır. Bitki doku kültürü yöntemleri aşağıdaki gibidir;

1. Embriyo kültürü: Çiçeğin yumurtalığındaki ya da tohum içerisindeki embriyonun eksplant olarak kullanıldığı yöntemdir [2].
2. Meristem kültürü: Sürekli mitoz bölünme ile çoğalma kabiliyetine sahip meristem dokularının eksplant olarak kullanıldığı yöntemdir [2].
3. Kallus kültürü: Bitkilerde yaralanma durumunda oluşan farklılaşmamış doku hücrelerine kallus adı verilmektedir. Oksin ve sitokininin kültür ortamına eklenmesi ile büyük kallus dokuları elde edilebilir [5]. Kallus kültürü bitkilerin kesik yüzeyinden oluşan kallusların kullanıldığı kültür tekniğidir [2].
4. Hücre kültürü
 - a. Hücre süspansiyon kültürü: Bitki hücrelerinin ve kallus dokularının döner çalkayıcıya yerleştirilmiş sıvı kültürü ile çoğaltıldığı kültür tekniğidir [5].
 - b. Tek hücre kültürü: Hücre süspansiyonu kültürü ile çoğaltılan hücrelerin tek hücre olarak besin ortamına aktarıldığı ve bu tek hücreler ile kallus dokuları rejeneredildiği kültür tekniğidir [2].

5. Haploid kültürler
 - a. Anter kültürü: Haploid bitki elde etmek için çiçekteki anterlerin eksplant olarak kullanıldığı tekniktir [2].
 - b. Ovaryum kültürü: Haploid bitki elde etmek için çiçekteki yumurtalığın (Ovaryum) veya tohum taslağının (Ovul) eksplant olarak kullanıldığı tekniktir [2].
6. Protoplast kültürü: Hücre duvarı izole edilmiş bitki hücreleri olan protoplast hücrelerinin eksplant olarak kullanıldığı kültür yöntemidir [2].

2.1.2 Bitki Doku Kültürünün Aşamaları

1. Donör bitkinin hazırlanması: Öncelikle bitki doku kültüründe kullanılacak eksplant için sağlıklı ve dinç bir ana bitki seçilmelidir. İhtiyaca göre bitkinin her parçası (Yaprak, apikal meristem, filiz, kök vs.) eksplant olarak kullanılabilir. *In vitro* ortamda yetiştirilmiş ana bitkinin kullanılması kontaminasyon riskini azaltır.
2. Başlangıç aşaması: Bu aşamada, eksplantlara yüzeysel sterilizasyon yapılır ve besin ortamına yerleştirilir. Eksplantların kimyasal solüsyonlar ile yüzey sterilizasyonu, bitki hücrelerinin kendisine az zarar vererek kontaminantların temizlenmesi için önemli bir adımdır. Yüzey sterilizasyonu için hem bakteri öldürücü hem de mantar öldürücü kullanılması önerilmektedir. Sterilizasyon ürünleri kullanılacak eksplantların türüne bağlıdır. En yaygın kullanılmakta olan dezenfektanlar etil alkol, sodyum hipoklorit, kalsiyum hipoklorit ve cıva klorürdür. Hazırlanan kültürler büyüme odasında gerekli ışık koşullarında inkübe edilir.
3. Çoğaltım aşaması: Burada amaç kültürde oluşmakta olan bitkilerin sayısını artırmaktır. Bitkiler arzulanan (ya da planlanan) sayıya ulaşıncaya kadar tekrarlı olarak alt kültür uygulaması yapılır.
4. Köklenme aşaması: Köklenme süreci bitkilerin çoğaltım aşaması ile aynı anda gerçekleşebilir. Ama bazı durumlarda kök büyümesini teşvik etmek için eksplantların farklı besinlerin ya da büyüme düzenleyicilerin ortama eklenmesi gerekebilir.
5. İklimlendirme aşaması: Artık *in vitro* ortamda büyütülmüş bitkiler dış ortam için hazırlanır. Dış ortama alıştırmaya süreci kademeli olarak çok nemli ortamdan az nemli ortama ve az güçte ışıktan güçlü ışığa doğru gerçekleştirilir. Sonrasında bitkiler

(kum, turba, kompost gibi) uygun bir malzemeye dikilir ve serada iklimlendirme sürecine devam edilir [7].

2.2 Bitki Sekonder Metabolitleri

Organizmalarda değişikliğe uğrayan bileşenlere metabolitler denir. Alman fizyolog Albrecht Kossel 1891 yılında bitki metabolitlerini birinci (primer) ve ikincil (sekonder) olarak ikiye ayırmıştır. Primer metabolitler bitkiler tarafından üretilen protein, yağ ve karbonhidrat gibi temel kimyasal maddelerdir [8]. Diğer yandan sekonder metabolitler, doğadan bulunan bitkilerin sentezlediği fakat bitkinin gelişim metabolizmasındaki işlevleri henüz tam keşfedilememiş kimyasallardır. Bitkideki sekonder metabolitler bitkinin savunma, üreme, hayatta kalma ve direnç geliştirmesi yani yaşamına doğrudan etki eden önemli bileşiklerdir. Her bir sekonder metabolit bitkinin çeşitli bölümlerinde belirli enzimler ve yolaklar ile sentezlenmektedir. Bitkilerin kuru ağırlıklarının %1 ile %3'ünü sekonder metabolitler oluşturmaktadır. Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması; kimyasal yapılarına, içeriklerine, sentez yolaklarına veya farklı çözücüler ile çözünebilirliğine göre yapılmaktadır. Sekonder metabolitler sayesinde bitkiler yeni çevre koşullarına ayak uydurabilir veya etkisi altında oldukları streslerle baş edebilmektedir. Ancak bütün sekonder metabolitlerin her strese karşı eşit bir tepki oluşturmadığı bilinmektedir [9].

Mevcutta 100.000'in üzerinde bitki sekonder metabolit bileşeni bilinmektedir. Pek çok bitkide ekonomik açıdan değer taşıyan (alkaloid, fenolik bileşik, terpen, bitki aminleri, glikozitler, nadir aminoasitler gibi) bitki sekonder metabolitleri bulunmaktadır. Bu sekonder metabolitler türlü bilimsel, teknolojik ve ticari alanlarda hammadde olarak kullanılmaktadır. Örnek olarak doğal plastik, yapışkan, balmumu, boya ve ilaç endüstrilerinde özellikle bitkilerden elde edilen yağlar, taninler ve saponinler kullanılmaktadır. İlaç endüstrisi tarafından kullanılmakta olan başlıca sekonder metabolitler; söğüt ağacı kabuğundan salisin, porsuk ağacından taxol ve haşhaş bitkisinden morfindir [8].

2.2.1 Bitki Sekonder Metabolitlerinin Sınıfları

2.2.1.1 Fenolik Bileşik

Fenolik bileşikler bitki sekonder bileşiklerin içerisinde en geniş olanıdır. Bütün fenolik bileşiklerin yapısında bir ya da daha fazla fenol grubu bulundurmaktadır. Bir hidroksil grubu bağlanmış fenolik bileşikler fenol, ikiden fazla hidroksil grubuna bağlı fenolik bileşikler ise polifenol olarak adlandırılırlar. Fenolik bileşikler yapılarına ya da sentez yollarına göre türlerine ayrılmaktadır. Fenolik bileşiklerin bitkilerde tat, renk ve koku oluşmasına büyük katkısı olmaktadır [10]. Bitkiler arasında en çok miktarda fenolik madde içeren bitki çay bitkisi (*Camellia sinensis*), özellikle yeşil çaydır. Fenolik bileşikler çok yaygın olduklarından dolayı aşağı yukarı her meyve ve sebze çeşitli miktarlarda bulunmaktadır. Bazı fenolik bileşikler meyvelerin ve sebzelerin tatlarını vermektir. Özellikle acılık ve burukluk tatlarının sebebi içerdikleri fenolik bileşiklerdir [8].

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler küçük moleküllü olup genelde uçucu formda oluşmaktadır. Fenolik bileşikler oksidasyon, redüksiyon reaksiyonlarında ve fotosentez ile solunum olaylarındaki elektron-transport zincirlerinde elektron ve proton transferlerinde görev aldıklarından dolayı bitkinin enerji işlemlerinde önemli yer tutmaktadır. Ayrıca fenolik bileşikler bitkinin uzamasını ve tohum gelişimini teşvik edebilir ya da inhibe edebilirler. Özellikle zorlu iklim koşullarında bitki tarafından bol miktarda sentezlenerek bitkinin boy gelişimini ve UV ışımına karşı koruma gibi iklim şartlarına karşı dayanıklılıklarını etkileyebilirler. Ek olarak fenolik bileşikler antibakteriyel ve antifungal aktiviteler gibi organizmalar arası kimyasal etkileşimlerde de rol almaktadır, böylelikle enfeksiyonel hastalıklara karşı bitkinin direncini arttırmaktadırlar [8].

Yapılan araştırmalara göre fenolik bileşiklerin başta kanser ve koroner kalp hastalıkları olmak üzere ölümcül hastalıklara karşı koruyuculuk özelliği bulunmaktadır [8]. Ayrıca fenolik bileşiklerin antiinflamatuar, karaciğer koruyuculuk, fitoöstrojeniklik, böcek öldürücülük, antioksidanlık ve serbest radikal temizleyicilik gibi çeşitli yararları bildirilmiştir [10].

2.2.1.2 Flavonoidler

Flavonoidler 2000 farklı çeşidi ile en geniş doğal polifenol çeşididir. Flavonoidlerin yapılarında bir aromatik halka ve ona bağlı kroman halka bulunmaktadır [10]. Flavonoidler birçok çayın, meyvenin ve sebzenin doğal yapısında bulunmaktadır. İsmi sarı renkli olmasından dolayı Latince sarı anlamına gelen “flavus” kelimesinden almıştır [8]. Flavonoidlerin antienflamatuar, antialerjik, antikanser, antitrombotik, damar koruyuculuk ve mide mukozası koruyuculuk gibi yararları olduğu bilinmektedir [10].

2.2.1.3 Monoterpen ve Seskiterpen

Terpenler bitki sekonder metabolitleri arasında geniş çeşitliğe sahip metabolitlerdir. Bütün terpen türlerinin yapısında 5 karbondan oluşan izoprenler bulunmaktadır ve çeşitli kombinasyonları sonucunda farklı çeşitler oluşmaktadır. Terpenler içerdikleri izopren sayılarına göre gruplandırılmaktadır [10]. Monoterpen, seskiterpen, diterpen ve sesterpenler baş ve kuyruk biçiminde bağlanmış isoprenlerden oluşmaktadır. Adını Çamgillerin salgıladığı hoş kokulu terebentin yağından almaktadır [8].

Monoterpenler, 2 izoprenden oluşmaktadır ve genel moleküler formülü $C_{10}H_{16}$ şeklindedir. Monoterpenler bitkilerde esans yağlarının ve uçucu yağların önemli bileşenleridir. Monoterpenlerin tahriş önleyici, kaşıntı önleyici, parazit solucan öldürücü ve damar genişletici özellikleri gibi birçok tıbbi yararı keşfedilmiştir [10].

Seskiterpenler ise yapısında 3 tane izopren bulunduran ve genel formülü $C_{15}H_{24}$ olan terpen bileşiklerdir. Doğada 3000 civarı seskiterpen ve türevi bulunmaktadır. Bir bitki büyüme düzenleyicisi olan absisik asitte bir seskiterpenoid (yapısında oksijen atomları bulunan terpen) örneğidir. Antibakteriyel özelliğinden dolayı parfümeri endüstrisinde kullanılmaktadır [8] Seskiterpenin diğer keşfedilmiş yararları, antifungal, anti-protozoal, anti-amibik, antienflamatuar, idrar sökücü, ağrı kesici ve kardiyotonik özellikleri olarak sıralanmaktadır [10].

2.2.1.4 Klorojenik Asit

Klorojenik asit (CGA) başta çay ve kahve olmak üzere yiyeceklerde en çok karşılaşılan fenolik bileşiklerden biridir. Bir klorojenik asit izomerleri olan kafeoil kinik asitler (CQA) Asteraceae ve Lamiaceae bitki ailelerinde bol olduğu bildirilmiştir. Klorojenik asitin antimikrobiyal, antifungal, antienflamatuar, antioksidan, antidiyabetik, anti-hipertansiyon, anti-obezite, damar koruyuculuk, sinir sistemi koruyuculuk, karaciğer

koruyuculuk, antitümör, ağrı kesici ve hatta antiviral tıbbi yararları olduğu rapor edilmiştir [11].

Yapılan çeşitli çalışmalarda klorojenik asitin glikoz ve yağ metabolizmasını etkilediği; bu nedenle anti-obezite, antidiyabetik gibi özelliklerinin olduğu düşünülmektedir. Klorojenik asitin antimikrobiyal özelliğinden dolayı iyi bir gıda koruyucusu ve katkısı olabileceği araştırmalar ile ortaya konmuştur. Yapılan bazı araştırmalara göre klorojenik asitin (ve kafeik asitin) HSV-1, HSV-2, HIV, adenovirüs ve hatta Ebola virüsüne karşı etkili bir antiviral ve antioksidan olabileceği tespit edilmiştir [11].

2.2.1.5 Kafeik Asit

Kafeik asit bir sinnamik asit türevi olup bir fenilpropanoid çeşididir. Prekürsör (öncül) olarak bitkilerdeki lignin bileşiğinin sentezlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca hücreleri genişlemesini, turgor basıncını, fototropizmi ve büyümeyi organize etmektedir. Kafeik asitin biyotik ve abiyotik stres direncini arttırdığını gösteren birçok araştırma bulunmaktadır. Strese karşı toleransı olan bitkilerin bol miktarda kafeik asit sentezlediği bildirilmiştir [45].

Bitkiler biyotik veya abiyotik strese girdiğinde bunlara karşı kafeik asit ve türevlerinin sentezlenmesini aktive etmektedir. Kafeik asit ihtiyaca göre ferulik asit, klorojenik asit, lignin gibi başka sekonder bileşiklere metabolizma tarafından dönüştürülebilmektedir. Çeşitli araştırmalar özellikle kafeik asit olmak üzere hidroksisinnamatların güçlü antioksidan özellikleri olduğunu göstermiştir. Bitkilerde bir enfeksiyon olduğu zaman kafeik asit istilacının enzim sistemini inhibe ederek ya da odunlaştırma yöntemi ile hücreleri koruyarak hastalıklara müdahale edebilmektedir. Bitki ağır metal stresi ile karşılaştığı durumda bitkilerin yine bol miktarda kafeik asit sentezlediği gözlemlenmiştir. Bitki kafeik asit sayesinde lignin sentezleyerek hücrelerinin hücre duvarlarını güçlendirerek onları ağır metal hasarına fiziksel bir bariyer sağlamaktadır. Ayrıca kafeik asit ve türevleri ağır metal stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türlerine karşı etkili olduğu incelenmiştir [45].

2.2.1.6 Rutin

Rutin bir flavonoid metabolittir ve karabuğday, elma ve siyah çayda bol bulunmaktadır. Rutinin (ve kuersetinin) antioksidan, antikanser, antitrombotik, hücre koruyucu, damar koruyucu, kalp koruyucu ve sinir koruyucu özellikleri olduğu tespit edilmiştir. Rutin suda çözülebilen bir metabolittir ve damardan kan akışına geçtiğinde kuersetine dönüştüğü

görülmüştür [12]. Bitkilerdeki rutin konsantrasyonunun bitkinin türüne göre, bitkinin bölümüne göre ve ultraviyole (UV) gibi dış etkenlere değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir [13].

Rutin kardiyovasküler anlamda kurbağa kalbinde yapılan deneyde kalp atım hacminin artmasına sebep olduğu görülmüştür. Rutinin ayrıca kılcal damarların kırılma ve kanama hastalıklarından dolayı olan hipertansiyonu tedavi ettiği tespit edilmiştir. Rutinin hemofili gibi bazı kanama hastalıklarına tedavi edebildiği bildirilmiştir [15]. Rutin, serbest radikal temizleyici olarak antioksidan özelliğinden dolayı anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antitümör ve anti-astım yararlarını göstermektedir. Rutin enfeksiyonlar karşısında stres mekanizmasındaki proteinlerin sentezini düzenleyerek, ayrıca karbonhidrat ve amino asit metabolizmalarını, protein sentezini ve hücre duvarlarının bütünlüğünü etkileyerek bitkinin antimikrobiyal tepkisine yardımcı olduğu görülmüştür. Enflamasyon durumunda rutin enflamasyona sebep olan bazı anahtar enzimleri inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Rutinin kanser hücrelerine karşı onların hücre döngüsünü durduğu ve birçok insan kanser hücresinin apoptoz geçirmesini sağladığı tespit edilmiştir. Rutin ayrıca Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, kronik venöz yetmezliği ve depresyon tedavisinde potansiyel kullanımları bildirilmiştir [14].

2.2.1.7 Kuersetin

Bir flavonoid olarak kuersetin, 2 benzen halkası arasında bir oksijen içeren halka yapısındadır [16]. Kuersetin elma, turna yemişi, kiraz, üzüm gibi meyvelerde; soğan, biber, kuşkonmaz gibi sebzelerde ve hatta siyah, yeşil çayda ve şarapta bulunmaktadır [17]. Araştırmalara göre en fazla kuersetin içeren gıda konserve kapari olduğu görülmüştür. Kuersetin doğada birçok formda bulunmaktadır; genellikle meyvelere, sebzelere ve çiçeklere renk vermekte olan kuersetin-3-O-glukozit şeklinde rastlanmaktadır. Kuersetin bitkilerde antibakteriyel ve antioksidan olarak kullanılmaktadır ancak tohum çimlendirmesini düşürdüğü görülmüştür [16].

In vitro ve hayvanlarda yapılan çalışmalara göre kuersetinin antioksidan, anti-inflamatuar, kalp koruyucu ve anti-hipertansif etkilerinin olduğunu bildirilmiştir [18]. Kuersetinin GABA reseptörlerini kontrol ettiği ve NMDA reseptörleri bloke ederek anti-konvülsan gibi çalıştığı ve bu yüzden de epilepsi hastalığının tedavisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir [12]. Kuersetin antioksidan ve serbest radikal temizleyici olduğundan dolayı damar tıkanıklığına önleyici olabileceği düşünülmüştür. Birçok kanser hücresi hattına karşı kuersetinin anti-mutajenik ve anti-proliferik özelliği olduğu bildirilmiştir [19].

Araştırmalar kuersetinin birçok kanser hucresi serisinde mitokondriyal apoptoza sebebiyet verdiğini, buna karşılık sağlıklı hucrelerin oksidan stresi kaynaklı apoptoza inhibe ettiğini göstermiştir. Kuersetinin ayrıca fitoöstrojen olarak sınıflandırılmıştır. Kuersetin mast hucrelerinin antijenlere karşı histamin salgılamasını inhibe ederek alerjik tepkileri engellediği gözlemlenmiştir. Dşuk dozlarda kuersetin antioksidan aktivitesi gösterirken, yüksek dozlarda oksidan olduğu ve DNA'yı parçaladığı grlmştir. Kuersetinin ayrıca ısı şoku şaperonu gibi şaperonların sentezini ve metal iyonlarını baskılayan enzimleri inhibe ettiği gözlemlenmiştir [16].

2.2.2 Sekonder Metabolitlerin retimi

Bitki doku kültürü sayesinde 30000'den fazla sekonder metabolit retilenmektedir. Bitki doku kültürü ile üretilen sekonder metabolit miktarı mikroorganizmalar ile üretilen biyolojik aktif kimyasalların miktarından daha fazladır. Bitki sekonder metabolitleri tarımsal yetiştirme yöntemleri ile de retilenmektedir. Fakat tarımsal yetiştirme yönteminde mevsim, iklim koşulları, coğrafi konum ve büyüme koşulları gibi müdahale edilemeyen değişkenler bulunmaktadır. Örneğin *Hypericum perforatum* ve *Arnica montana* bitkileri patojenlere olan hassasiyetlerinde dolayı (antraknoz hastalığı gibi) büyük ölçekli tarlalarda yetiştirilememektedir. Bitki doku kültürü ile sekonder metabolitlerin üretilmesi konusundaki araştırmalar son yıllarda artış göstermiştir. Birçok işlevsel bitki sekonder metaboliti bu araştırmalara konu olmuştur [20, 21].

Genellikle kallusların en çok bitki sekonder metaboliti ürettiği ve bulundurduğu zaman, kallus büyümesinin durduğu zamandır (Plato Fazı). Çünkü büyüme fazı sırasında (zellikle erken safhalarda) hücreler bütün karbon paylaşımını primer metabolitlerin üretilmesine harcamaktadır. Ne zaman ki kallus kültürü büyüme fazından plato fazına geçtiğinde artık fazla primer metabolit üretimine gerek kalmadığından dolayı kallus kültürü daha aktif bir şekilde sekonder metabolit sentezi yapmaktadır. Ancak bazı büyüme ile alakalı bitki sekonder metabolitleri bu durum için istisnadır (betalainler ve carotenoidler gibi) [21].

Bitki doku kültürü ile bitki sekonder metabolitinin üretilmesinde verimi artırıcı yöntemlerde bulunmaktadır. Bitki sekonder metabolit üretimini en iyi arttıran yöntemin kültür ortamına elisitör eklenmesi veya abiyotik stres uygulanması olduğunu bildirilmiştir [21]. Stres canlı yaşamının optimum durumundan çıkmasına sebep olan farklılıklardır. Stres, bitkide serbest radikal ve diğer oksidatif moleküllerin artışına sebep olmaktadır

[20]. Elisitör ise stres uyarısını taklit eden biyotik ya da abiyotik bileşiklerdir [46]. Kültür ortamına stres veya elisitör uygulanması ile birlikte var olan sekonder metabolitlerde artış görülebilmekte hatta bitkinin normal şartlarda üretmediği bitki sekonder metabolitleri de gözlemlenebilmektedir. Bitkilere stres uygulanması durumunda hayatta kalma becerisi dahilinde bitkilerde bazı mekanizmalar aktifleşmektedir. Bu mekanizmalar sonucunda sekonder metabolitlerde artışlar gerçekleşir ya da bitkinin genomunda gizli yeni sekonder metabolitler ortaya çıkabilir. Stres yöntemi biyotik stresörler (virüs, bakteri, mantar) abiyotik stresörler (hava kirliliği, UV ışını, ağır metaller vb.) ya da elisitörler (sentetik kimyasal faktörler, melatonin ve absisik asit gibi bitki hormonları vb.) aracılığıyla yapılmaktadır [20, 21, 46].

Bir diğer sekonder metabolit verimini arttıran yöntem ise sekonder metabolitin öncü (prekürsör) metabolitini kültürü ortamına eklemektir. İstenilen sekonder metabolitin biyosentez yolu araştırılarak o sekonder metabolitin üretimini kısıtlayan adım bulunabilmekte ve o adımdaki sentezin ürünü öncü metabolit kültür ortamına verilerek kültürün üretim verimi artırılabilir. Ancak bu yöntemde öncü metabolitin bol miktarda bulunması sentezin negatif bildirimini aktif olmasına ve dolayısıyla sekonder metabolitin sentezinin inhibe olmasına sebep olabilir [21].

2.3 *Inula helenium* L.

Inula helenium L. bitkinin (Şekil 2.1) dahil olduğu *Inula* cinsi yaklaşık 100 farklı tür ile birlikte Asteraceae familyasının içerisinde [22]. Halk arasında adı andız ve atgözü otu olarak da geçmektedir. Bitkinin İngilizcesi “Elecampane”, Almancası “Echter Alant” ve Fransızcası “Aunée officinale” veya “Grande Aunée” olarak geçmektedir [23]. Bitkinin Yunanca ismi “Helenion” ismi İlyada destanından “Truvalı Helen”den gelmektedir ve isim daha sonra Latince hali olan “helenium”a dönüşmüştür [25, 27]. Bitkinin tarihsel kullanımı Hipokrat’a kadar uzanmaktadır [26].



Şekil 2.1 *Inula helenium* L. bitkisi

Türkiye dahil olmak üzere (özellikle Karadeniz ve Doğu Anadolu) büyük ölçüde Avrupa, Afrika, Asya ve Kuzey Amerika kıtalarında yetişmektedir. Türkiye’de 8 tanesi endemik olmak üzere 28 tür ve 33 alttür *Inula* bulunmaktadır. Doğada 1000-2600 metre yükseklikte göl ve akarsu kenarlarında, orman alanlarında, nemli çayırarda büyümektedir. Serin, bol güneşli yerleri seven *Inula helenium* L. süzek, nemli ve gübreli toprakta en verimli şekilde yetişmektedir. İlkbahar ve sonbahar mevsimlerinde tohumdan ya da ana bitkiden ayrılan toprakaltı organlarıyla çoğalmaktadırlar. Tohumlar soğuk hava şartlarında 3 veya 4 haftada, iç mekân şartlarında 1 ile 3 hafta içinde çimlenmektedir. *Inula helenium* L. yaz aylarında sarı renkteki çiçeklerini açmaktadır. *Inula helenium* L. bitkisi çok yıllık bir bitki olup bitki 2 metre yüksekliğe kadar büyüebilmektedir. Taban yaprakları uzun saplı, oval ya da eliptik olup seyrek olarak tüylü ve kenarı hafif dişlidir. Diğer yandan gövde yaprakları ise daha küçük ve sapsız olmaktadır. Gövde tabanı odunsudur ve diktir, bazen üste doğru dallanabilmektedir. Kökler ise etli ve kokuludur [23, 24]. *Inula helenium* L. bütün genel özellikleri tablo 2.1’de gösterilmektedir.

Inula helenium L. antik çağlardan beri birçok hastalığa çare olmaktadır. Antik Minos (Girit), Miken, Mısır ve Asur farmakoterapisinde tümörlere, yaraya, sivilcelere ve saç

kepeğine iyi geldiği geçmektedir. Geleneksel Çin tıbbında balgam söktürücü, öksürük kesici, terletici, antiemetik ve bakteri öldürücü ilaçların yapımında kullanılmıştır. Hipokrat *Inula helenium* L. bitkisinin kronik cilt döküntüleri ve kaşıntılara karşı iyi geldiğini yazmıştır [1]. Günümüzde sivilce karşıtı, kaşıntı önleyici, öksürük kesici, terletici, idrar yapıcı, balgam sökücü, iştah açıcı, tonik, sindirim kolaylaştırıcı, antikanser, antiinflamatuvar ve antibakteriyel etkileri için kullanılmaktadır. Ayrıca veterinerlikte kullanılmaktadır [23].

Inula helenium L. bitkisinin kökleri %5 oranına kadar eudesmane tipi seskiterpen laktonlar (çoğunlukla alantolakton ve izoalantolakton), timol ve türevleri, terpenler, steroller ve %44 oranına kadar polisakkarit inülin içermektedir [28]. Ayrıca *Inula helenium* L. bitkisinin yapraklarında ve yaprak kalluslarında bol miktarda kafeik asit ve türevleri, ayrıca klorojenik asit ve kafeoilaldarik asit olduğu tespit edilmiştir [29].

Inula helenium L. bitkisi ile ilgili doku kültürü çalışmaları sınırlıdır. Stojakowska'nın 2004 yılındaki araştırmasında kök kalluslarındaki ve *in vitro* ortamda yaprak eksplantından rejenere edilmiş köklerindeki timol içeriği araştırılmış ve *Inula helenium* L. bitkisinin köklerinde bulunan başlıca bitki sekonder metaboliti olan iki timol türevi tespit edilmiştir. Stojakowska'nın 2016 yılındaki araştırmasında ise yaprak kallusları elde edilip hidroksisinnamik asit içeriğine araştırılmıştır ve bu çalışmada *Inula* türü içerisinde ilk defa kafeoilaldarik asitlerin varlığı gözlemlenmiştir [28, 29].

Tablo 2.1 *Inula helenium* L. bitkisinin genel özellikleri

Alem	Plantae (bitkiler)
Alt alem	Tracheophyta/trakeofitler (damarlı bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta/anjiyospermiler (kapalı tohumlu bitkiler)
Sınıf	Magnoliopsida/ödikotlar (iki çenekliler)
Alt sınıf	Asterid
Takım	Asterales
Familiya	Asteraceae (papatyagiller)
Cins	<i>Inula</i>
Tür	<i>Inula helenium</i> L.
Halk arasındaki adı	Andızotu, atgözü otu
Yetiştirme ortamı	Akarsu/göl kenarları, nemli çayır, ormanlık alan, hendek içi
Habitat	1000 m – 2600 m
Yayılış	Avrupa, Asya, Afrika, Kuzey Amerika (Türkiye; genellikle Karadeniz ve Doğu Anadolu)
Ömür	Çok yıllık
Vejetasyon Dönemi	İlkbahar veya sonbahar
Toplanma Dönemi	Yaz veya sonbahar
Yapı	Otsu
Kullanım Amacı	Sivilce karşıtı, kaşıntı önleyici, öksürük kesici, terletici, idrar yapıcı, balgam sökücü, iştah açıcı, tonik, sindirim kolaylaştırıcı, antikanser, antiinflamatuvar ve antibakteriyel
Kullanım Şekli	Toz (demleme ya da haşlama)
Endemizm durumu	Endemik değil.

3.1 Materyal

Aşağıdaki tablo 3.1 ve tablo 3.2’de çalışmalar sırasında kullanılmış materyaller yer almaktadır.

Tablo 3.1 Deneyler sırasında kullanılan kimyasallar listesi

Kimyasal	Marka	CAS Numarası
Murashige ve Skoog (MS) with Vitamins	Caisson Labs	
Bitki Doku Kültürü Agarı	Neogen	9002-18-0
Sükroz (ACS sınıf)	Caisson Labs	57-50-1
2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (2,4-D)	Bio-Basic	94-76-7
6-Benzilaminopurin (BAP)	Caisson Labs	1214-39-7
Kinetin (KN)	Caisson Labs	525-79-1
1-Naftalenetik asit (NAA)	Caisson Labs	86-87-3
İndol-3-bütirik asit (IBA)	Caisson Labs	133-32-4
Melatonin	Sigma	73-31-4
İzopropil Alkol (C ₃ H ₇ OH, %99,9)	Ekiciler	67-63-0
Etanol (C ₂ H ₅ OH, %99,8)	Sigma	64-17-5
Gümüş Nitrat (AgNO ₃)	Isolab	7761-88-8
Bakır Sülfat (CuSO ₄)	Merck	7756-99-8
Bakır Klorür (CuCl ₂)	Merck	10125-13-0
Absisik Asit (ABA)	Sigma	21293-29-8

Tablo 3.1 Deneyleer sırasında kullanılan kimyasallar listesi (devamı)

Çamaşır Suyu (%0,4 NaOCl)	ticari	
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck	7647-01-0
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck	1310-73-2
Metanol (CH ₃ OH, %99)	Sigma	67-56-1

Tablo 3.2 Deneyleer sırasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar listesi

Cihaz ve Ekipmanlar	Marka
HPLC-DAD	Agilent
HPLC Kolonu	Zorbax
Tüp Karıştırıcı	Heidolph
Sonikatör	Qsonica
Santrifüj	Sigma
Manyetik Karıştırıcı	DLAB
Laminer Akışlı Kabin	Nüve
Su Saflaştırma Sistemi	MerckMillipore
10- 1000 µL'lik Mikro Pipetler	Eppendorf
pH Metre	Ohaus Corp. ST3100
Hassas Tartı	Ohaus Corp. PA214C
Cam Boncuklu Sterilizatör	Comnail
Buzdolabı	Regal

Tablo 3.2 Deneyler sırasında kullanılan cihazlar ve ekipmanlar listesi (devamı)

Otoklav	Hirayama HV-50L
Mikroskop	Olympus
Klima	Vestel
Liyofilizatör	Teknosem TRS 2/2V
Petri	Fıratmed
Parafilm	Bemis NA
Steril Bisturi Ucu	Armo Line

Deneylerde ayrıca bisturi, mutfak çakmağı, pens, beher, erlenmeyer, mezür, cam kavanoz, otoklavlanabilir cam şişe, eppendorf tüp, pastör pipeti, mikro pipet ucu ve cam çubuk kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Malzeme ve Çalışma Yeri Sterilizasyonu

1 atm basınca ve 121 °C sıcaklığa ayarlı otoklav ile deney boyunca kullanılan metal, cam, otoklavlanabilir plastik malzemeler, sterilizasyon aşamasında kullanılan distile su ve filtre kağıtları alüminyum folyoya sarılarak steril edilmiş olup laminar hava akışlı kabin içerisinde kullanılmıştır. Laminar hava akışlı kabinin yüzeyleri %70 etanol/izopropil alkol ile temizlenmiştir. Ardında 15 dk boyunca kabinin için UV ışık ile sterilize edilmiştir. Besiyerlerini hazırlarken ve kabinin içinde çalışırken pudrasız nitril eldiven kullanılmıştır. Laminar hava akışlı kabine yerleştirilen her türlü cihaz ve malzeme, kabine alınmadan önce %70 etanol/izopropil alkol ile temizlenmiştir. Kabinde çalışmadan önce eldiven giyili eller %70 etanol/izopropil alkol ile temizlenmiştir. Metal malzemeler ve besiyeri içeren kavanozların ağızları her kullanımda önce ve sonra mutfak çakmağı ya da cam boncuklu sterilizatör ile ısıtılarak sterilize edilmiştir.

3.2.2 Besiyeri Hazırlanması Ve Sterilizasyonu

Doku kültürü için kullanılacak besiyerleri 4.43 g/L MS ortamı, 30 g/L sükröz, 6 g/L agar içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerin (BBD) stok çözeltileri 1 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır. Her bir besi ortamı için gerekli bitki büyüme düzenleyiciler çeşitli konsantrasyonlarda eklenmiştir. Besiyerinin hazırlanmasında kullanılan bütün malzemeler eklendikten sonra pH değeri 5,5 – 5,8'e ayarlanmıştır. Besiyerleri 1 atm basınçta 121°C sıcaklığında 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Steril besiyerleri laminar hava akışlı kabinin içinde petrilere veya kavanozlara dökülmüştür ve 15 ile 30 dakika boyunca katılaşması beklenmiştir. Besin ortamı içeren petrilere ve kavanozlar streç film ile sarılarak kullanılmak üzere buzdolabında (4 °C) saklanmıştır.

3.2.3 Bitki Tohumunun Sterilizasyonu ve Ekimi

Bitki doku kültüründe kullanılacak *Inula helenium* L. tohumları Zeytinburnu Şifalı Bitkiler Bahçesinden temin edilmiştir. Tohumlar 12 saat boyunca musluk suyunda bekletildikten sonra, sadece suda batmış olan tohumlar kullanılmıştır. Tohumlar laminar hava akışlı kabinde %70 izopropil alkol ile 2 dakika boyunca ve ardından %10 ticari çamaşır suyu ile 75 dk sterilize edilmiştir. Son olarak 3 defa 1 dk distile suda bekletilerek dezenfektanlardan temizlenmiştir. Tohumlar petrilere veya kavanozlara aralarında mesafe olacak bir şekilde 5'li gruplarla ekimi gerçekleştirilmiştir. Petrilere iklimlendirme odasında (25±2 °C) inkübe edilmiştir.

Inula helenium L. bitkisi, besiyerinde yetiştirilen bitkiler ve kalluslarla karşılaştırmak ve eksplant olarak kullanılmak amacıyla toprakta da yetiştirilmiştir. Tohumlar, içerisine bir miktar saksı toprağı veya torf doldurulmuş buzdolabı poşetlerine serpilmiştir. Toprak yeterince sulandıktan sonra buzdolabı poşetinin ağzı kapatılmıştır ve içerisi hava alabilsin diye ağzının bir kenarına pamuk yerleştirilmiştir. Poşetler güneş alacak şekilde pencere önlerine yerleştirilmiştir. Bu şekilde toprağa devamlı sulama gerekmeden tohumların çimlenmesi ve yetişmesi sağlanmıştır.

3.2.4 Eksplant ve Kallus Kùltürü

Besiortamında *in vitro* ve aseptik koşullarda çimlendirilen fideler, eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. En az 1 aylık olan bitkiler yaprak, yaprak ayası, gövde ucu, kotiledon ve kök şekillerinde kesilerek hazırlanmış olan çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren (tablo 4.1) besin ortamlarına ekilmiştir. Eksplant kültürleri iklimlendirme odasında (25 ± 2 °C) 16/8 fotoperiyotta ya da karanlıkta inkübe edilmiştir. 1 ayın sonunda kallus gelişimi gözlemlenen kültürlere, kallusların canlılığına göre yine aynı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamına daha küçük parçalara ayrılarak alt kültür işlemi gerçekleştirilmiştir. Sürgün gelişimi gözlemlenen kültürler, kök gelişimi için 2 mg/L IBA içeren besin ortamlarına aktarılmıştır.

3.2.5 Stres ve Elisitör Uygulamaları

Deneyin ilerleyen aşamasında bazı aseptik filizler ve karanlık ortamda tutulan 1 mg/L BAP + 0,3 mg/L KN BBD kombinasyonu içeren besin ortamında yetiştirilmiş kallus kültürleri stresör veya elisitör içeren besin ortamlarına transfer edilmiştir (tablo 4.3). Stresörlü, elisitörlü ve kontrol aseptik filiz kültürleri 16/8 fotoperiyotta 2 hafta boyunca, bakır sülfat, bakır klorür ve gümüş nitrat stresörlü kültürler 1 hafta boyunca, stresörlü, elisitörlü ve kontrol kallus kültürleri karanlık ortamda 1 hafta boyunca, Besin Stresleri 2 hafta boyunca iklimlendirme odasında inkübe edilmiştir. 1 haftanın sonunda kültürler hasat edilmiştir ve hasat edilen örnekler bir sonraki işleme kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklanmıştır.

3.2.6 Liyofilizasyon ve Ekstraksiyon

Örnekler -20 °C'de dondurulmuş olarak, miktarlarına göre beherlere, cam şişelere ya da cam petrilere yerleştirilmiştir. Örnekler ağızları açık olacak bir şekilde liyofilizasyon cihazına yerleştirilmiştir ve 48 saat boyunca -40 °C ile -55 °C arasında 7×10^{-2} mBar basınç altında liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilmiş kalluslar cam çubuk aracılığıyla toz haline getirilmiştir. Örnekler ekstraksiyona kadar 4°C de saklanmıştır.

3.2.7 HPLC-DAD Analizi

Hidrofilik sıvı metanol ekstraksiyonlarının hazırlanması işlemleri Dalar vd. (2012)'ye göre yapılmıştır [31]. Pudra tozu haline getirilmiş numuneler en az 3 tekrarlı olmak üzere 50 mg olarak tartılarak 2 ml'lik eppendorf tüplerine konulmuştur ve 1 ml asidifik metanol (%80 metanol + %1 HCl + %19 ultra saf su) ile ekstraksiyonu yapılmıştır. Örnekler tüp karıştırıcı yardımı ile iyice çalkaladıktan sonra, homojenizasyon için 15 dakika boyunca sonikatörde bekletilmiştir. Homojenize edilen örnekler, santrifüj cihazına yerleştirilmiştir ve 10000 rpm'de, 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Ardından elde edilen supernatant, 5 ml'lik temiz küçük şişelere aktarılmıştır. Arta kalan bitki çökeltileri, aynı ekstraksiyon işlemlerine 2 defa daha tabi tutulmuştur. Elde edilen tüm supernatantlar birleştirilmiş ve HPLC analiz işlemlerine başlayana kadar derin dondurucuda (-20 °C) saklanmıştır.

Ekstrelerde bulunan fenolik bileşiklerin tanımlanması ve konsantrasyonlarının belirlenmesi işlemleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı kullanılarak Dalar ve Konczak (2013) ve Gomes vd. (1999) metotları modifiye edilmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir. Analitik yüksek basınçlı sıvı kromatografisi 30 °C'de yürütülmüştür ve örnekler 250 nm, 280 nm, 326 nm, 370 nm ve 520 nm dalga boylarında kontrol edilmiştir [30, 31]. HPLC analizlerinde kullanılan sistemler (Tablo 3.3) ve gradient programı (Tablo 3.4) aşağıda sunulduğu şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada HPLC'ye özgü fenolik bileşik standartları kullanılmıştır. Analiz işlemi için HPLC'ye yüklenen tüm ekstreler ve standartlar enjektör yardımı ile 0.22 µm'lik hidrofilik filtreden geçirilerek filtre edilmiştir.

Fenolik bileşiklerin tanımlanması işlemi, ko-kromatografi, fenolik bileşik standartlarının spektral karakteristikleri ve geliş zamanları ile karşılaştırılması sonucu gerçekleştirilmiştir. Kantitatif analizler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini yapılan bileşiklere (kafeik asit, klorojenik asit, rutin ve kuersetin) ait standart eğrisi kullanılarak, mg fenolik bileşik / g ekstre olarak hesaplanmıştır. Total fenolik bileşik içeriği kromatogramdaki bileşiklerin total absorpsiyonlarının mg Gallik asit Eşdeğeri/g kuru ağırlık cinsinden karşılığı olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.4 HPLC analizlerinde kullanılan ekipmanlar, kimyasallar ve ayarlar

Sistem	Özellikleri
Detektör	DAD (SPD-M20A)
Oto enjektör	SIL-10ASVP
Sistem kontrolcüsü	SCL-10A
Pompa	LC-20AT
Degaze	DGU-12A
Kolon fırını	CTO-1-ADVP
Kolon	Zorbax C18 (250*4,6 mm, 5 mikron)
Mobil faz	A: %3 Formik asit + %97 Ultra saf su. B: %0,5 TFA + %4,5 Ultra saf su + %95 Asetonitril.
Akış hızı	1 ml/da.
Enjeksiyon hacmi	10 µl
Kolon sıcaklığı	30 °C

Tablo 3.5 HPLC analizlerinde kullanılan gradient programı

Zaman (dakika)	A ¹ (%)	B ² (%)
3	93	7
28	72	28
60	67	33
62	60	42
70	50	50
75	30	70
80	10	90
90	0	100
90.01	0	100

¹ %0,5 Formik asit, ² %0,5 TFA + %4,5 Ultra saf su + %95 Asetonitril

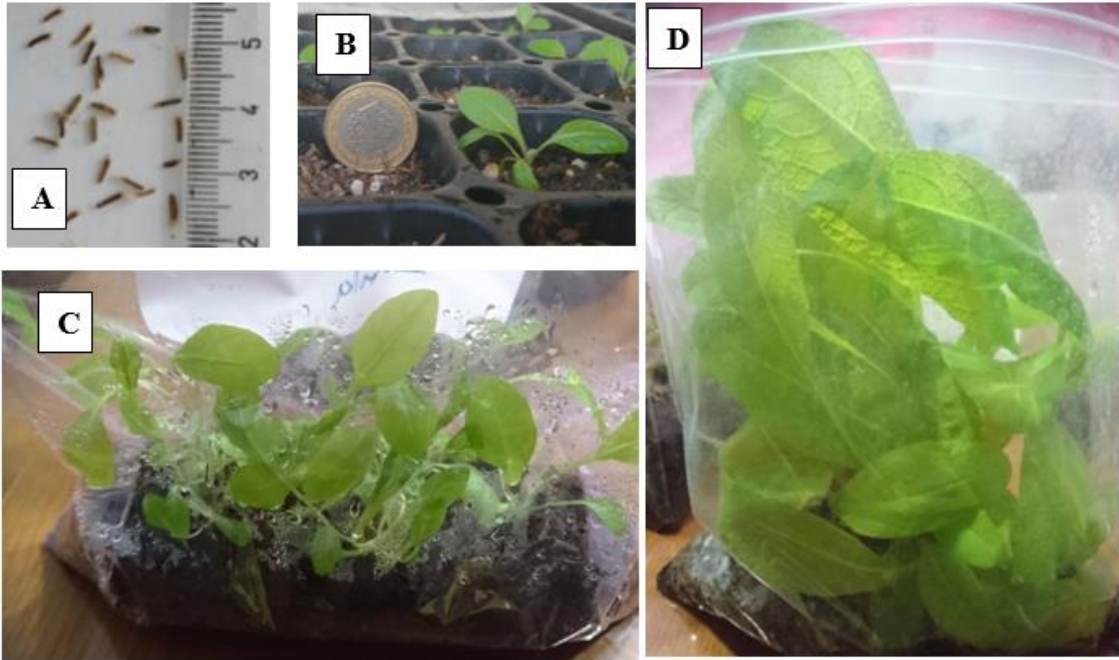
3.2.8 İstatiksel Analiz

HPLC analizi her örnek için 3 kez tekrar edilmiş olup hesaplamalarda istatistiksel olarak anlamlılık $p < 0,05$ olarak alınmıştır. İstatistiksel olarak varyans analizi One-Way Anova Bonferoni post hoc testine göre yapılmıştır.

4.1 Tohumların Çimlendirilmesi

Inula helenium L. tohumları eksplant elde etmek ve HPLC analizi sonuçlarında diğer bitkilere kontrol değeri olması amacıyla toprakta geliştirilmiştir. Öncelikle tohumlar bir gece (~12 saat) suda bekletilmiştir. Bu işlem sayesinde tohumların suda bekletilmeden doğrudan ekilen tohumlara göre daha hızlı çimlendiği görülmüştür.

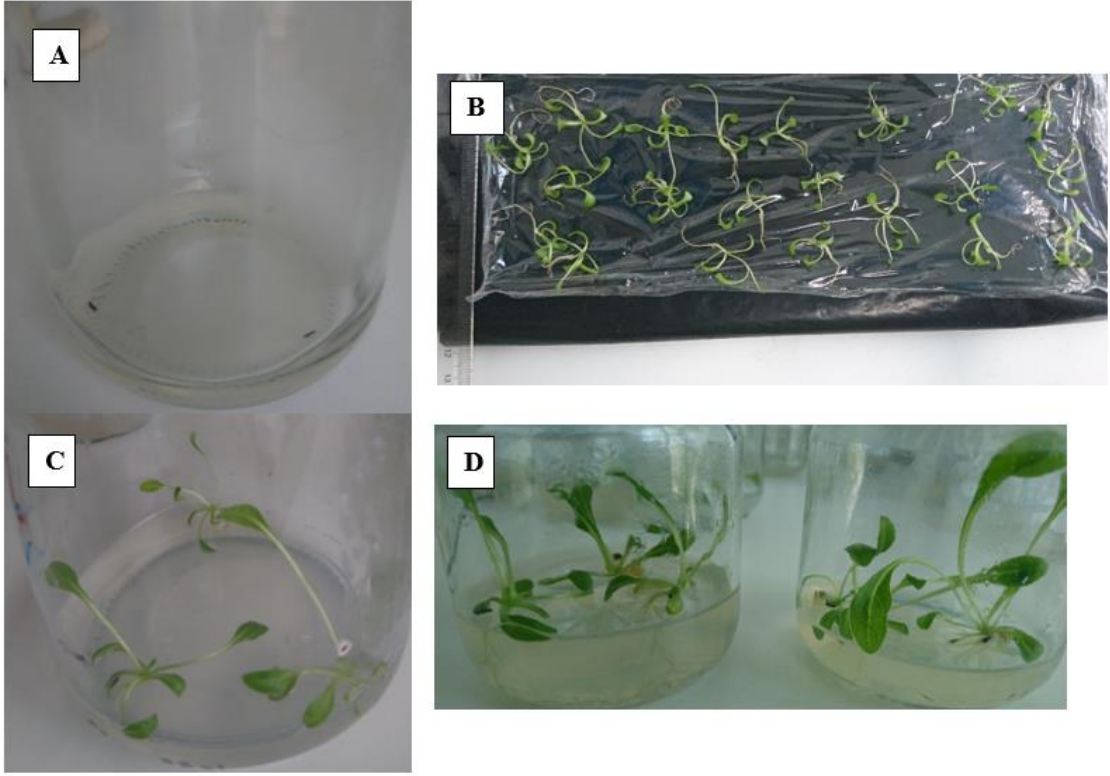
Daha sonrasında tohumlar içi torf ya da saksı toprağı dolu plastik kilitli buzdolabı poşetlerine ekilmiştir. Tohumlar eşit bir şekilde toprağı serpiştirildikten sonra tohumlar ince bir toprak örtüsüyle gömülmüştür ve toprak her yeri ıslanacak şekilde nemlendirilmiştir. Poşetlerin ağzı büyük ölçüde kapatılmıştır ve açık kalan kısmına içerisinde hava sirkülasyonunu sağlasın diye pamuk yerleştirilmiştir. Poşetler güneş ışığını doğrudan alan yerlere yerleştirilmiştir. Tohumların 2-3 gün içerisinde çimlendiği görülmüştür. Eksplant ve analizler için 1 aylık fideler kullanılmıştır. -Kullanılan torf ve saksı toprakları arasında bitkinin gelişimi üzerine bir fark gözlenmemiştir. Poşette çimlendirilmiş bitkiler şekil 4.1 gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Toprakta çimlendirilen *Inula helenium* L. A) *Inula helenium* L. tohumu B) Viyolde çimlendirilen bitkiler C) Poşette çimlendirilen bitkiler (1 aylık) D) Poşette çimlendirilen bitkiler (3 aylık)

Inula helenium L bitkisi ayrıca HPLC analizinde *in vitro* bitki kaynağı, kallus ve organogenik bitki rejenerasyonu için aseptik eksplant eldesi amacıyla *in vitro* ortamda da çimlendirilmiştir. Öncelikle tohumlar çimlenmelerini hızlandırmak amacıyla ve yüzen boş tohumları batan dolu tohumlardan ayırmak amacıyla bir gece (~12 saat) suda bekletilmiştir. Tohumların suda 1 günden fazla bekletilmesi durumunda çimlenme oranının düştüğü gözlemlenmiştir. Tohumların sterilizasyonu için birçok farklı yöntem, sterilize edici, konsantrasyon ve süre denenmiştir olup en verimli sterilizasyon yönteminin tohumların 2 dakika boyunca %70 izopropil alkolde bekletip sonrasında 1 saat 10 dakika boyunca %10 çamaşır suyunda (NaOCl) bekletilmesi ve ardından tohumları, alkolün ve çamaşır suyunun tohumdan arındırılması için, 3 kez 1 dakika boyunca saf suda bekletilmesi olduğu görülmüştür. Bu yöntem ile tohumlarda %50 oranında çimlenme elde edilmiş olup tohumlarda kontaminasyon engellenmiştir.

Sterilize olmuş *Inula helenium* L. tohumları MS ortamı içeren petrilere ve kavanozlara ekilmiştir. Olası kontaminasyonların diğer tohumları etkilememesi için ve çimlenen bitkilerin büyümesinde yer oluşması için tohumlar geniş aralıkla ile petrilere ve kavanozlara 5'li şekilde ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamında kontaminasyon gözlenmesi sonucunda kontaminasyon teması olmayan tohumlar yeni bir kültür ortamına aktarılmıştır ve onlarda önceki kontaminasyondan bir bulaşı gözlemlenmemiştir. İçine tohum ekilmiş olan petrilere ve kavanozlar parafilm ile sarılmıştır. İçlerinde tohumlar bulunan petrilere ve kavanozlar, 25 °C'de iklim kontrollü odaya yerleştirilmiştir. HPLC analizinde ve eksplant olarak kullanılmak amacıyla en az 1 ay, bitki stresinde kullanılmak amacıyla 2 hafta bitkilerin gelişim göstermesi beklenmiştir. *In vitro* koşullarda büyütülmüş *Inula helenium* L. şekil 4.2'de gösterilmektedir.

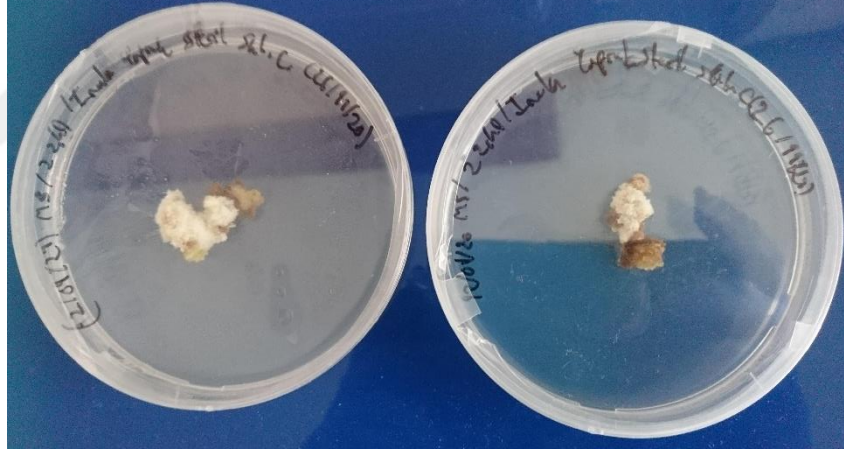


Şekil 4.2 *In vitro* koşullarda BBD'siz ortamda çimlendirilen *Inula helenium* L.
A) Çimlenmesi beklenen aseptik tohumlar B) Hasat edilmiş bitki fideleri (1 aylık)
C) Kavanozdaki bitki fideleri (1 aylık) D) Kavanozdaki bitki fideleri (2 aylık)

4.2 *In vitro* Bitki Rejenerasyonu

Kilitli poşette büyütülen bitkiler en az 1 aylık olduklarında *in vitro* koşullarda kallus ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında kullanılmak amacıyla eksplant olarak kullanılmıştır. Bitkiler sterilizasyon işleminden önce yaprak, yaprak ayası, gövde ucu, kotiledon ve kök olmak üzere eksplant parçalarına ayrılmıştır. Eksplantların sterilizasyonu için farklı birçok sterilizatör, teknik, konsantrasyon ve süre denenmiştir ama sonuç olarak verimli bir sterilizasyon prosedürü bulunamamıştır. Yapılan sterilizasyon denemelerinin çoğunluğu ya kontaminasyonla ya eksplantın ölümüyle sonuçlanmıştır. Özellikle kök eksplantları kökün toprak altında bulunmasında dolayı yüksek miktarda biyolojik kontaminant bulundurmasından dolayı sürekli kontaminasyona sebep olduğu gözlemlenmiştir. Başarılı olan sterilizasyonlarda kallusların fazla gelişmeden ölmesi ile sonuçlandığı için veya çok kaynak israf ettiği için kullanılmaktan vazgeçilmiştir. Çalışmalara *in vitro* ortamda çimlendirilmiş bitkilerden aseptik eksplantlar alınması ile devam edilmiştir.

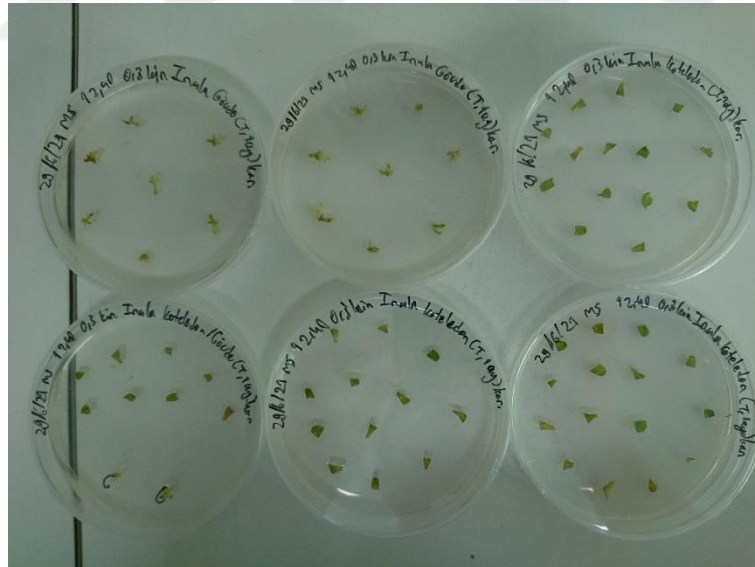
Yapılan en başarılı sterilizasyon denemesinde öncelikle yaprak ve gövde ucu eksplantları musluk suyunda yıkanmıştır. Sonrasında yaprak eksplantları 30 saniye etil alkolde, ardında 15 dakika %10 çamaşır suyunda (NaOCl) bekletilmiştir. Gövde ucu eksplantları ise 1 dakika etil alkolde, ardında 20 dakika %10 çamaşır suyunda (NaOCl) bekletilmiştir. Eksplantlar alkolün ve çamaşır suyunun uzaklaştırılması için 3'er kez 1 dakika steril suda bekletilmiştir. Yaprak eksplantlarının sterilizasyon sonunda yanan kısımları kesilmiş olup eksplantlar küçük parçalara bölünerek ortamlara ekilmiştir. 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ortamına ekilmiş olan yaprak eksplantlarında %10 oranında kallus gelişimi gözlemlenmiştir ve bu kalluslar 1 ay sonra gerçekleştirilen altkültür çalışmasına kadar gelişimlerini sürdürmüşlerdir. 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA ortamında ekilmiş olan gövde ucu eksplantlarında %15 oranında yaprak rejenerasyonu gerçekleşmiştir ve bu organogenik bitkiler 1 ay sonra gerçekleştirilen altkültür çalışmasına kadar gelişimlerini sürdürmüşlerdir. Daha sonra durgun suda ya da durgun sabunlu suda bekletilmesi yöntemleri denenmiştir ama o yöntemlerden başarı sağlanamamıştır. Toprakta yetiştirilen bitkiden eksplant alınarak yapılan çalışmalar şekil 4.3'de gösterilmektedir.



Şekil 4.3 Toprakta yetiştirilen bitkiden eksplant ile rejenere edilmiş kalluslar, 2 mg/L 2,4-D (16/8 fotoperiyot)

4.3 *In vitro* Ortamda Çimlendirilmiş Bitkilerin Eksplantlarının *In vitro* Uygulamaları

In vitro ve BBD'siz ortamda çimlendirilen aseptik bitkiler, 1 aylık gelişme süreçlerinden sonra kallus ve bitki rejenerasyonunda kullanılmak amacıyla yaprak, yaprak ayası, gövde ucu, kotiledon ve kök eksplantları olarak parçalara ayrılmışlardır. Bu eksplantlar tablo 4.1 bulunan çeşitli BBD konsantrasyonları ve kombinasyonları içeren MS besin ortamına alınmıştır (Şekil 4.4). Kültürler 1 ay süre ile 25 °C'de iklim kontrollü odada 16/8 sa fotoperiyotta ya da karanlık ortamda inkübe edilmişlerdir.



Şekil 4.4 *In vitro* besin ortamlarına ekilmiş eksplantlar

Tablo 4.1 MS ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin (BBD) kombinasyonları ve konsantrasyonları

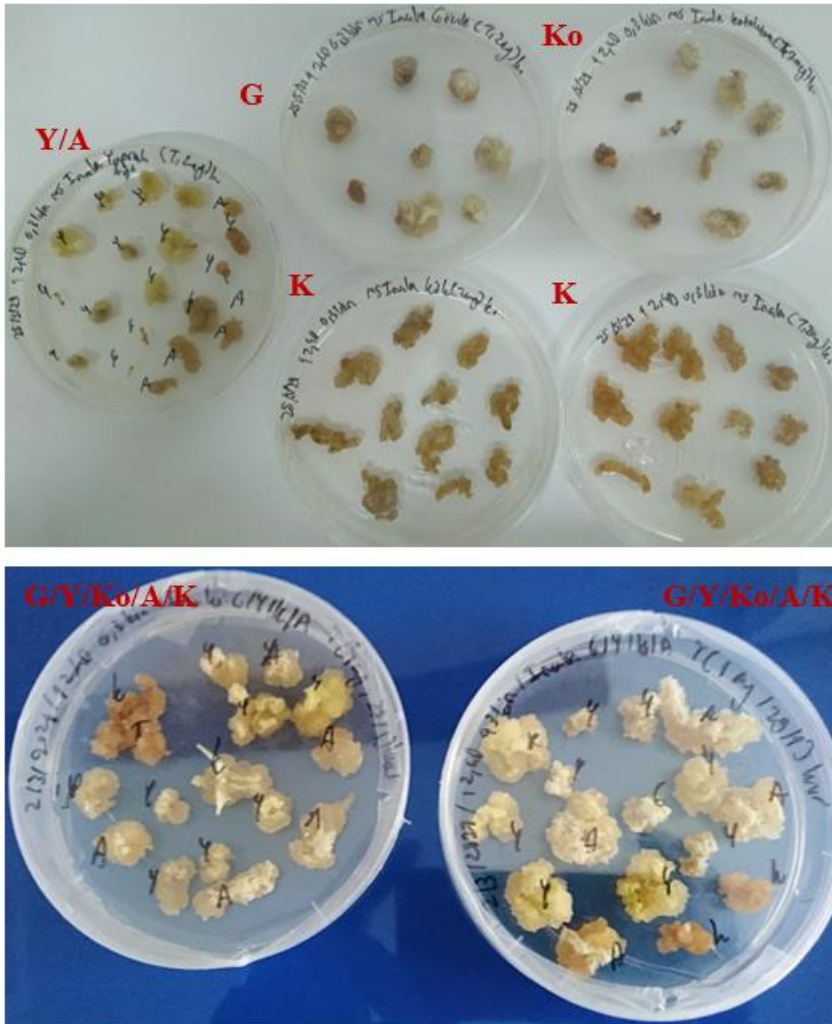
Ortam	2,4-D	IBA	BAP	NAA	KN
1	1	-	-	-	-
2	2	-	-	-	-
3	3	-	-	-	-
4	1	-	-	-	0,1
5	1	-	-	-	0,3
6	1,5	-	-	-	0,3
7	2	-	-	-	0,3
8	3	-	-	-	0,3
9	1	-	-	-	0,6
10	1	-	-	-	1
11	2	-	5	-	-
12	-	2	-	-	-
13	-	1	1	-	-
14	-	-	1	-	-
15	-	-	1	0,1	-
16	-	-	0,5	2	-
17	-	-	--	0,02	1
18	-	-	-	-	1

Tablo 4.2 MS ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin (BBD) çeşitli eksplantlar üzerindeki etkileri

BBD (mg/L)	Yaprak	Yaprak Ayası	Kotiledon	Gövde Ucu	Kök
1 2,4-D	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
2 2,4-D	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
3 2,4-D	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
1 2,4-D + 0.1 KN	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
1 2,4-D + 0.3 KN	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
1,5 2,4-D + 0,3 KN	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
2 2,4-D + 0.3 KN	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
3 2,4-D + 0.3 KN	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
1 2,4-D + 0.6 KN	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
1 2,4-D + 1 KN	X	X	X	X	Kallus
1 BAP	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
1 BAP + 1 IBA	Yok	Yok	Yok	Sürgün	Yok
5 BAP + 2 2,4-D	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
1 BAP + 0,1 NAA	Kallus	Kallus	Kallus	Sürgün	Kallus
2 NAA + 0,5 BAP	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus	Kallus
1 KN + 0,02 NAA	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
1 KN	X	X	X	X	Kallus

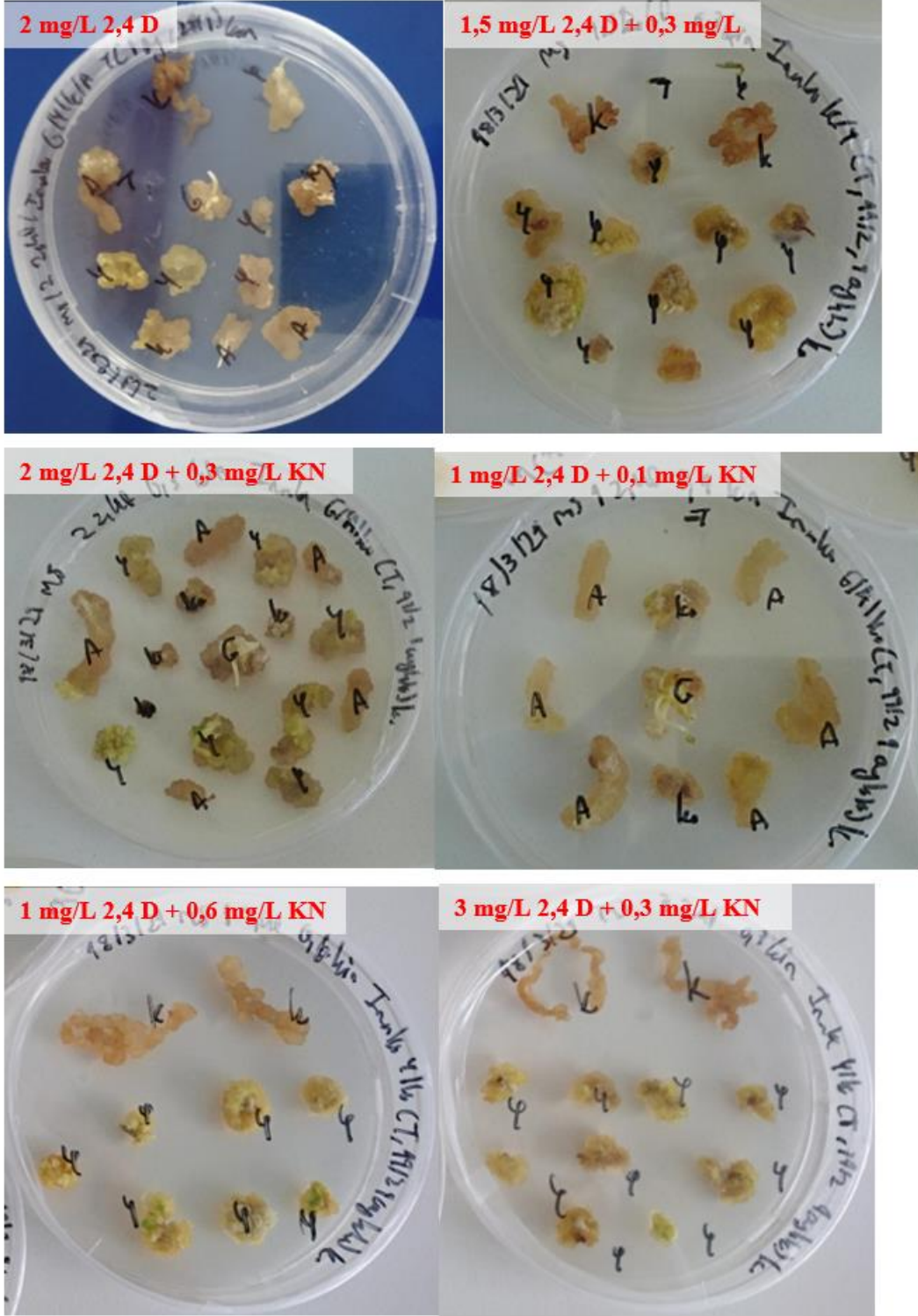
Yok = Kallus ya da sürgün oluşumu yok, X = Yapılmamış

Tablo 4.2’de gösterildiği üzere denenmiş birçok BBD kombinasyonunda kallus rejenerasyonu olduğu tespit edilmiştir. 2 farklı BBD kombinasyonun sadece gövde eksplantında başarılı bir şekilde sürgün rejenerasyonu gözlemlenmiştir. En verimli kallus rejenerasyonunu sağlayan BBD kombinasyonlarında biri 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) kombinasyonudur. Bu BBD kombinasyonunu bulunduran kültür ortamında yetiştirilen gövde ucu ve yaprak eksplantları en verimli kallusları rejenere etmiştir. Ayrıca yaprak ayası kallusu verimin de yüksek olduğu görülmüştür. 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) ortamında rejenere edilmiş kalluslar şekil 4.5’de gösterilmektedir.

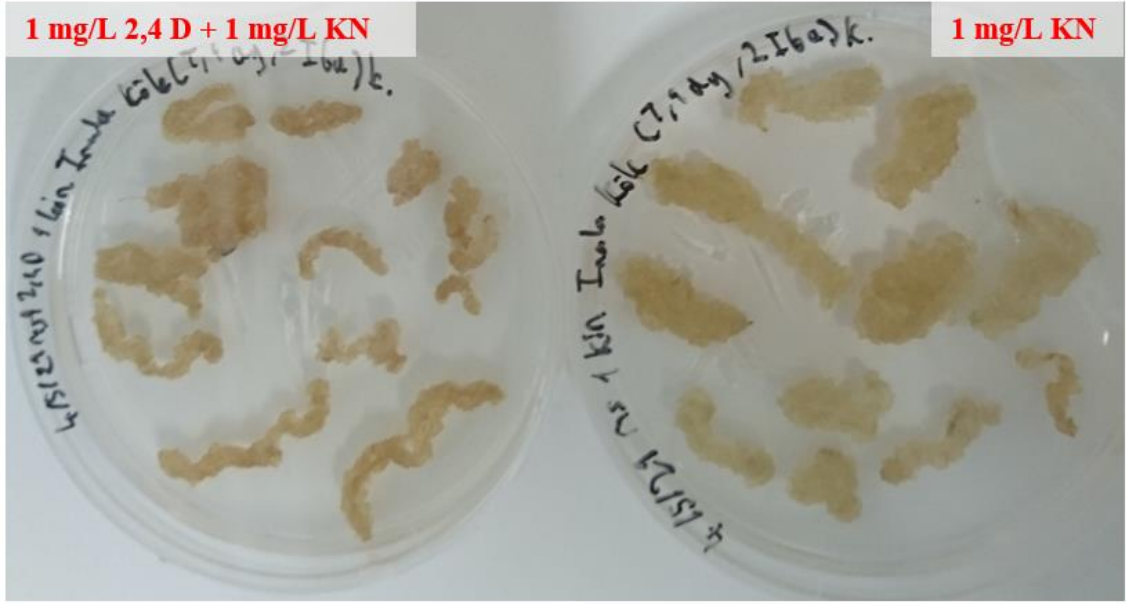


Şekil 4.5 Karanlıkta 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren MS ortamında gelişen kalluslar örnekleri; **G** = gövde, **Y** = yaprak, **Ko** = kotiledon, **A** = yaprak ayası, **K** = kök

1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN kombinasyonunun verimini arttırmak amacıyla tablo 4.2’de görülen çeşitli 2,4-D ve KN BBD konsantrasyonları denenmiştir. Sadece 2,4-D içeren ortamlarda yüksek kallus verimi elde edilmiştir (özellikle 2 mg/L 2,4-D içeren ortam). Ancak 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren ortam kadar kallus verimi oluşmadığı saptanmıştır. Sadece KN içeren ortamda (1 mg/L KN), 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ortamına göre daha fazla kallus rejenerasyonu kök eksplantından elde edilmiştir, ancak bütün ortamlarla karşılaştırıldığında en verimli olmadığı görülmüştür. Ayrıca hem 2,4-D hem de KN’nin farklı konsantrasyonlarını içeren ortamlarda hazırlanmıştır. 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN kombinasyonu ile karşılaştırıldığında; 1,5 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN, 2 mg/L 2,4-D + 0,3 KN, 1 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L KN ve 1 mg/L 2,4-D + 0,6 mg/L KN BBD kombinasyonlarında çok farklı bir kallus rejenerasyonu verimi elde edilememiştir. 3 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN kombinasyonunda ise verimsiz kallus gelişimi gözlenmiştir. 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KN BBD kombinasyonu içeren ortamda ise kök eksplantı ile kallus rejenerasyonu yapılmıştır ama sadece 1 mg/L KN içeren ortam ile karşılaştırıldığında daha az verimli bir kallus oluşumu belirlenmiştir. 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ve diğer benzer BBD de gelişen kalluslarda kök kallusu harici kallus rejenerasyonlarında zaman içinde kahverengine dönen beyaz ve yeşil kallus rejenerasyonu gözlenmiştir. Kök kallusu rejenerasyonları ise açık kahverengiden zaman içinde koyu kahverengine döndüğü görülmüştür. Bu BBD ortamlarında gerçekleşen bütün kallus rejenerasyonlarında yumuşak ve kolay dağılabilen kallus yapısı gözlemlenmiştir. Şekil 4.6’de ve Şekil 4.7’de denenmiş bazı 2,4-D ve KN hormon kombinasyonları ile rejenere edilmiş kalluslar gösterilmektedir.

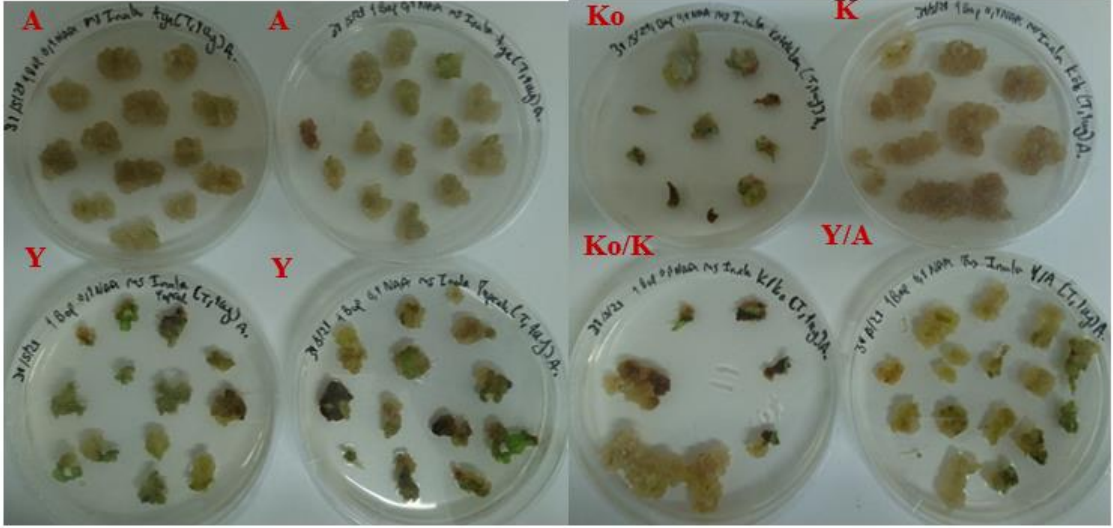


Şekil 4.6 Karanlıkta farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ve KN içeren besin ortamlarında gelişmiş kallus örnekleri



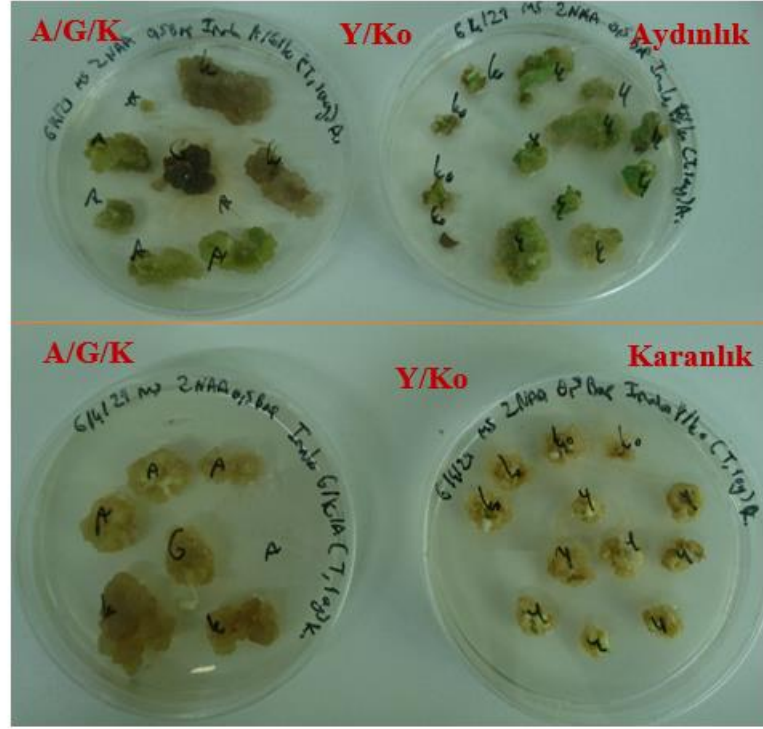
Şekil 4.7 Karanlıkta farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ve KN içeren besi ortamlarında kök eksplantlarından gelişmiş kallus örnekleri

Bir diğer verimli kallus rejenerasyonunu sağlayan BBD kombinasyonunun ise 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 fotoperiyot) BBD kombinasyonu olduğu gözlemlenmiştir. 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA içeren ortamlarda gövde eksplantlarında sürgün gelişimi ya da kalluslu sürgün gelişimi olduğu görülmüştür. 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA içeren ortamlardaki kök eksplantlarında en verimli kök kallusu rejenerasyonu olduğu belirlenmiştir. 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA içeren ortamlardaki yaprak ayası, yaprak ve kotiledon eksplantlarında ise kallus rejenerasyonu görülmüş olup diğerleri kadar verimli gelişim olmadığı belirlenmiştir. 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 fotoperiyot) BBD kombinasyonunda gelişen kök kalluslarında zamanla kahverengi olan beyaz kallus, diğer eksplantlardan rejenere edilen kalluslarda ise zaman içinde kahverengiye dönen yeşil ve beyaz kallus oluşumu gözlemlenmiştir. 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA ortamında rejenere edilmiş kalluslar şekil 4.8’de ve aynı ortamda gelişen sürgünler şekil 4.10’de gösterilmektedir.



Şekil 4.8 16/8 fotoperiyotta 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA içeren besin ortamlarında gelişmiş kallus örnekleri; **Y** = yaprak, **Ko** = kotiledon, **A** = yaprak ayası, **K** = kök

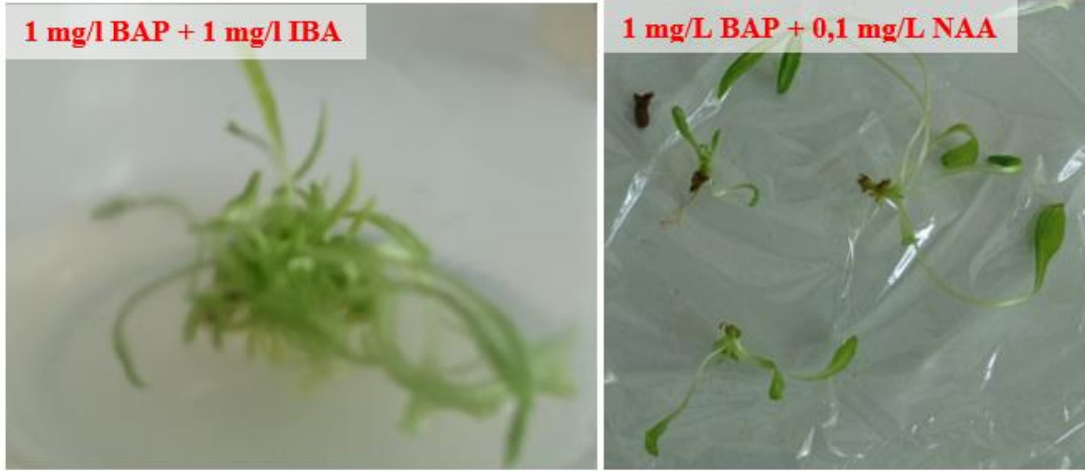
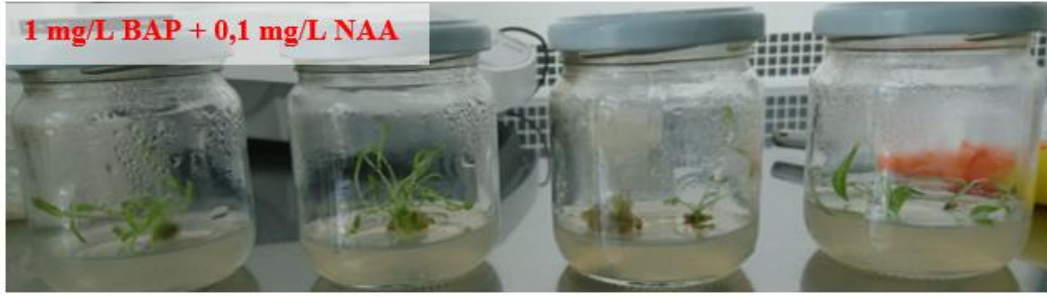
Bir başka verimli kallus rejenerasyonunu sağlayan BBD kombinasyonunun ise 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA kombinasyonu olduğu görülmüştür. 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA içeren ortamda rejenere edilen yaprak ayası ve kotiledon kallusları, bütün ortamlar arasında en verimli rejenerasyonu göstermiştir. 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA içeren ortamda ekili olan gövde eksplantları yüksek verimde kallus rejenerasyonu gösterirken, Yaprak ve kök kallus rejenerasyonlarının düşük verimde olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca karanlıkta rejenere olan 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA ortamındaki kallusların, 16/8 fotoperiyotta rejenere olan kalluslardan daha çok büyüdüğü gözlenmiştir. 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA kombinasyonlu besin ortamında ve karanlıkta rejenere olan bütün kallusların beyaz renkte olduğu görülmüştür. 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA kombinasyonlu besin ortamında 16/8 fotoperiyotta rejenere edilen yaprak, yaprak ayası ve kotiledon kalluslarının yeşil ve beyaz; kök ve gövde kalluslarının ise kahverengi olduğu gözlemlenmiştir. 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA BBD kombinasyonunda rejenere edilmiş kalluslar şekil 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9 16/8 fotoperiyotta ve karanlıkta 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA içeren besin ortamlarında rejener olmuş kallus örnekleri
G = gövde, **Y** = yaprak, **Ko** = kotiledon, **A** = yaprak ayası, **K** = kök

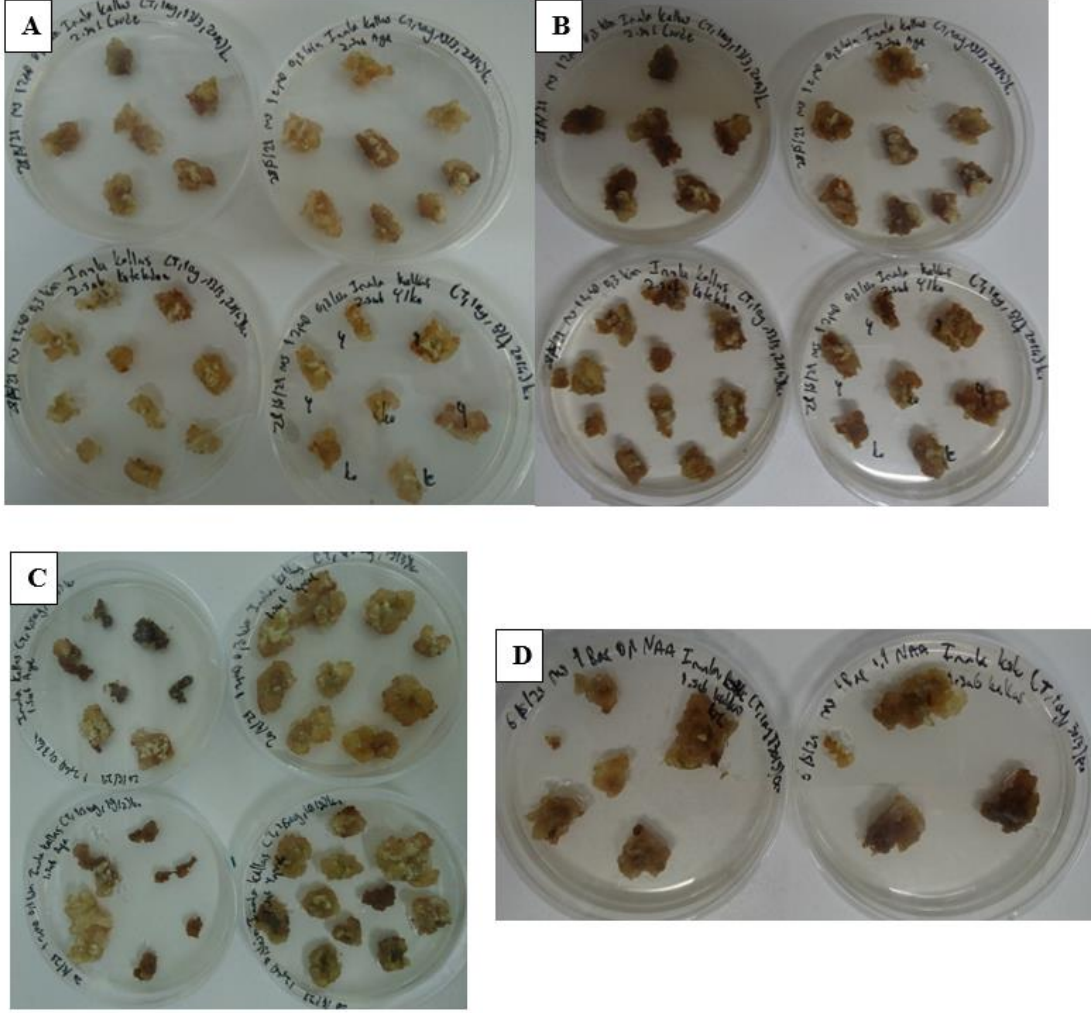
Kullanılan diğer BBD kombinasyonlarına bakıldığında; 1 mg/l BAP + 1 mg/l IBA ortamına ekilen gövde eksplantlarında sürgün gelişimi gözlenmiş olup diğer eksplantlarda hiçbir rejenerasyon gözlenmemiştir. Sadece 1 mg/l BAP içeren besin ortamında hiçbir eksplant için rejenerasyon ya da gelişim görülmemiştir. 1 mg/l KN + 0,02 mg/l NAA içeren besin ortamında yine hiçbir eksplant için rejenerasyon ya da gelişim gözlenmemiştir. 2 mg/l 2,4-D + 5 mg/l BAP kombinasyonu içeren besin ortamında bütün eksplantlarda kallus rejenerasyonu görülmüş olup diğer BBD kombinasyonlarına göre düşük verimde kallus rejenerasyonu elde edilmiştir.

1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA ve 1 mg/l BAP + 1 mg/l IBA ortamlarda gelişen bazı sürgünler 1 aylık gelişimin sonunda kök geliştirmeleri için 2 mg/l IBA içeren besin ortamına alınmışlardır. 1 aylık inkübasyon süreci sonunda bazı sürgünlerde kök gelişimi görülmüştür. Sürgün gelişimleri Şekil 4.10'da gösterilmektedir.



Şekil 4.10 Farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BAP, NAA ve IBA eklenmiş besin ortamlarında sürgün örnekleri

Verimli kallus gelişimi gözlenmiş ortamlarda hücre serisi elde etmek için kalluslara rejenera oldukları aynı ortamlarda ve koşullarda altkültür çalışmaları da yapılmıştır. Altkültür yapılacak olan kalluslar boyutlarına göre 2 ile 4 parçaya ayrılıp taze aynı BBD'li ortamlarına aktarılmışlardır. Her bir altkültür 1 ay boyunca inkübe edilmiştir. Kallusların BBD'li ortam ve koşul fark etmeksizin zaman içinde kahverengine döndüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca her altkültürden sonra önemli miktarda kallus parçasının rejenerasyonunun durduğu ve kallus hücrelerinde nekroz başladığı görülmüştür. 3. altkültürden sonra bütün kallusları öldüğü veya rejenerasyonları durdurduğu belirlenmiş olup sonuç olarak hiçbir BBD kombinasyonunda *Inula helenium* L. hücre serisi oluşturulamamıştır. Bu sebepten dolayı stres ve elisitör uygulamalarında doğrudan eksplanttan rejenera edilmiş kallus dokuları kullanılmıştır. Yapılmış bazı altkültür çalışmaları şekil 4.11'de gösterilmektedir.



Şekil 4.11 Kalluslar için altkültür çalışmaları; **A)** 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ortamında rejenere edilen kallusların aynı BBD'li ortamda (karanlık) yeni altkültüre alınması **B)** aynı kültürler, 1 ay sonra **C)** 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık), başarılı bir altkültür çalışması **D)** 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 fotoperiyot), ortamı için altkültür çalışması

4.4 *İn vitro*'da Rejenere Edilen Bitki ve Kalluslara Stres ve Elisitör Uygulamaları

Stres ve elisitör uygulaması için kullanılacak kalluslar; 1 aylık rejenerasyonun sonunda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren MS besin ortamından alınmışlardır. Bu kallusların tercih edilme sebepleri sırasıyla; ortalama en yüksek kallus verimi edilen BBD kombinasyonudur. Ayrıca aynı BBD ortamını kullanarak *Inula helenium* L. bitkisi ile kallus rejenerasyonu yapmış olan Stojakowska ve arkadaşlarının 2016 yılındaki çalışması ile karşılaştırmak amacıyla bu BBD ortamında rejenere edilen kalluslar tercih edilmiştir [29]. Ayrıca Stojakowska ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmaya paralel olarak benzer BBD kombinasyonları ve konsantrasyonları denenmiştir. Sonuçta en iyi verim bu araştırmacıların yaptığı kombinasyondan elde edilmiştir. İçerisinde tablo 4.3'deki stres ve elisitör uygulamalarını içeren ve 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN ile desteklenmiş MS besin ortamına aktarılan kalluslar 1 hafta ile 2 hafta boyunca karanlık ortamda 25 °C'de sabit olan iklim kontrollü odada inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kallus örnekleri hasat edilip HPLC analizi için hazırlanmıştır.

Stres ve elisitör uygulaması için kullanılacak bitkiler ise; 2 haftalık gelişimlerinin sonunda BBD içermeyen ortamda tohumlardan aseptik olarak çimlendirilen *Inula helenium* L. bitkileridir. Bu bitkilerin tercih edilme nedeni; 1 ay boyunca BBD'siz ortamda büyüyen kontrol bitkileri ile karşılaştırmaktır. İçerisinde tablo 4.3'deki stres ve elisitörleri içeren ama hiç BBD içermeyen besin ortamlarına aktarılan bitkiler 1 hafta ile 2 haftalık zaman boyunca 16/8 fotoperiyot olacak şekilde 25 °C'de sabit olan iklim kontrollü odada inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda bitki örnekleri hasat edilip HPLC analizi için hazırlanmıştır.

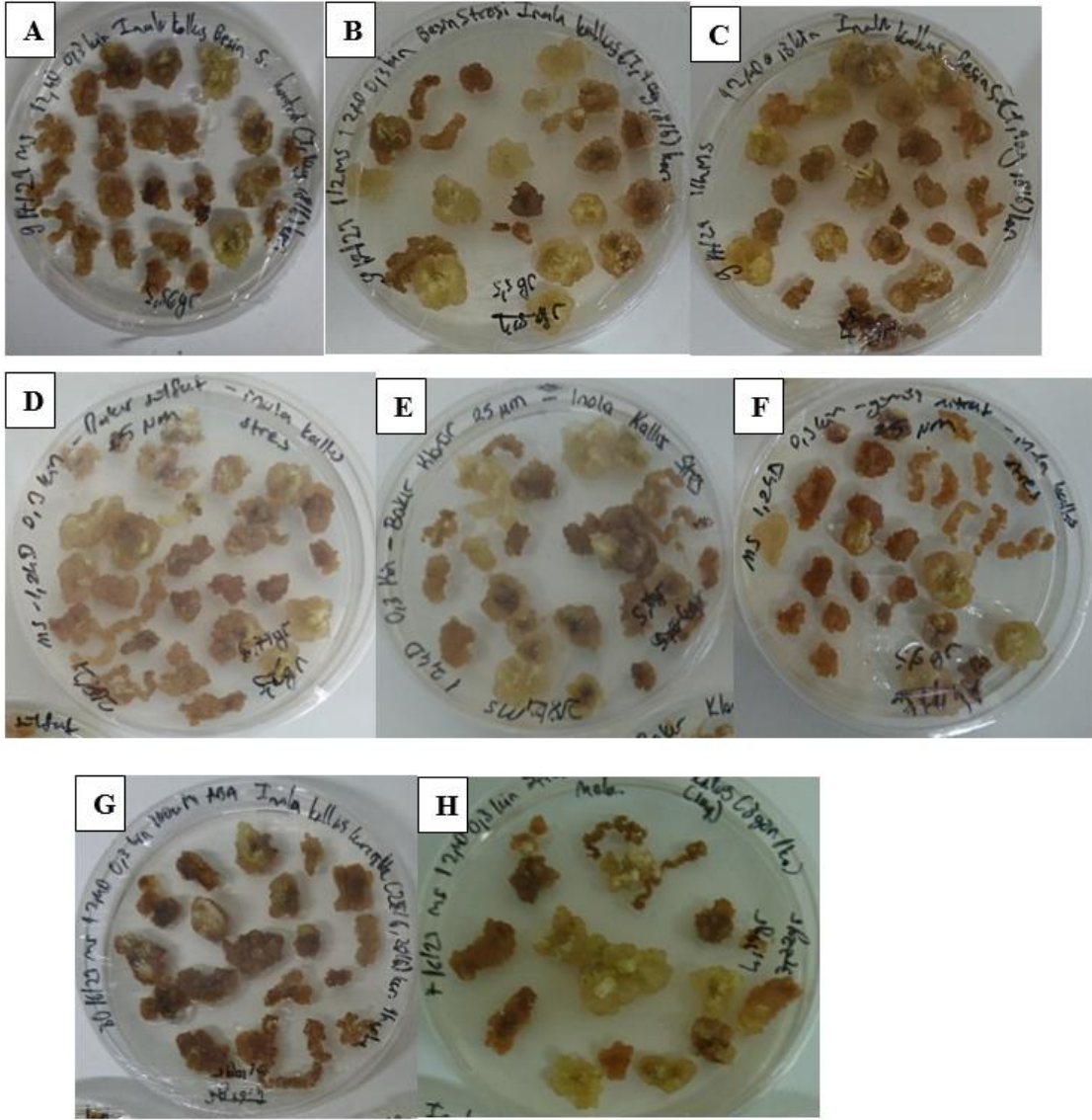
Tablo 4.3 Bitkilerde ve kalluslarda biyoaktif maddelerin değişimlerini gözlemek için yapılan stres ve elisitör uygulamaları

Stres ve Elisitör Uygulamaları		
Stres Türü	Konsantrasyon	Süre
Bakır Sülfat	25 µM	1 hafta
Bakır Klorür	25 µM	1 hafta
Gümüş Nitrat	25 µM	1 hafta
Absisik Asit	100 µM	1 hafta
Melatonin	35 µM	1 hafta
Azaltılmış MS besin ortamı	1/2	2 hafta
	1/4	2 hafta

Tablo 4.4 Kalluslarda stres ve elisitör uygulamaları ve kallus gelişimine etkileri

Stres ve Elisitör Uygulaması	İnkübasyon Süresi	Kallus Canlılığı	Kallus Rengi	Toplam Kallus Ağırlık Artışı¹
Kontrol	2 hafta	Çok canlı kallus	Beyaz ve Kahverengi	% 18.57
1/2 Azaltılmış MS Besin Ortamı	2 hafta	Çok canlı kallus	Beyaz ve Kahverengi	% 19.03
1/4 Azaltılmış MS Besin Ortamı	2 hafta	Çok canlı kallus	Beyaz ve Kahverengi	% 20.54
25 µM Bakır Sülfat	1 hafta	Canlı kallus	Beyaz ve Kahverengi	% 18,62
25 µM Bakır Klorür	1 hafta	Canlı kallus	Beyaz ve Kahverengi	% 20.02
25 µM Gümüş Nitrat	1 hafta	Canlı kallus var	Sarı	% 14.36
100 µM Absisik Asit	1 hafta	Kalluslar kararmış	Koyu Kahverengi (Kahverengi Agar)	% 6,69
35 µM Melatonin	1 hafta	Çok canlı kallus	Beyaz ve Kahverengi	% 20,65

$$^1 \text{Toplam Kallus Ağırlık Artışı} = \frac{(\text{Hasat Ağırlığı} - \text{Ekim Ağırlığı})}{\text{Ekim Ağırlığı}} \times 100 \quad (4.1)$$



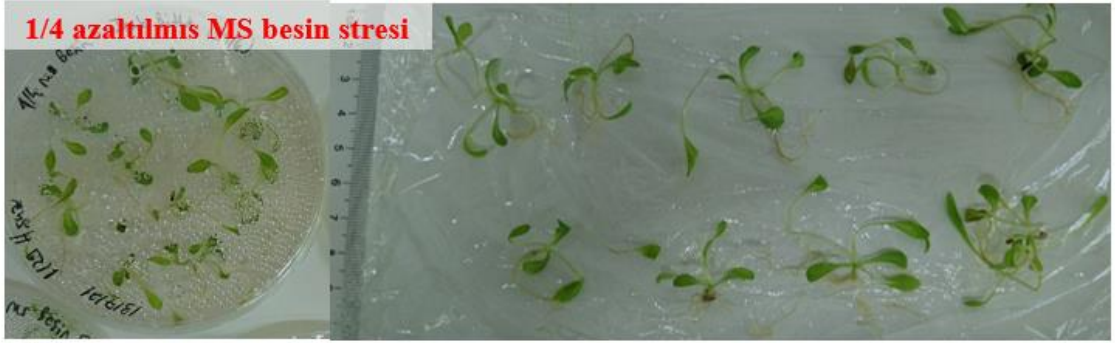
Şekil 4.12 Kalluslarda stres ve elisitör uygulamaları; **A)** Kontrol **B)** 1/2 azaltılmış MS besin stresi **C)** 1/4 azaltılmış MS besin stresi **D)** 25 µM bakır sülfat stresi **E)** 25 µM bakır klorür stresi **F)** 25 µM gümüş klorür stresi **G)** 100 µM absisik asit **H)** 35 µM melatonin

Tablo 4.4’de belirtildiği üzere azaltılmış MS ile besin stresi *Inula helenium* L. kalluslarında rejenerasyon anlamında bir farka sebep olmamıştır. Kalluslarda ağırlık anlamında kontrole yakın bir kallus rejenerasyonu gerçekleşmiş olup altkültürlerde olduğu gibi kallus kahverengileşmesi görülmüştür. Yine 25 µM bakır sülfat, 25 µM bakır klorür ve 35 µM melatonin uygulamalarının rejenerasyon ve kallus rengi anlamında gözle görülür bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. 25 µM gümüş nitrat stresinde kalluslar gümüş nitratın etkisiyle sararmıştır. 25 µM gümüş nitrat stresi kallusların ölümlerine yol açmasa da rejenerasyonları bir miktar inhibe ettiği hesaplanmıştır. 100 µM absisik asit

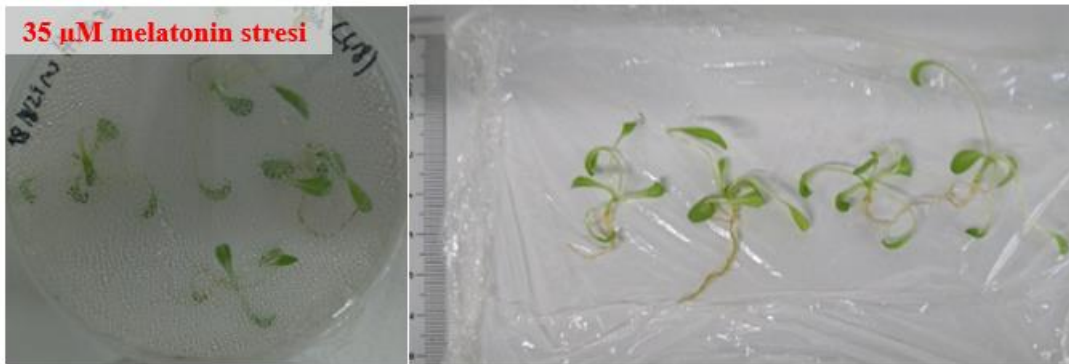
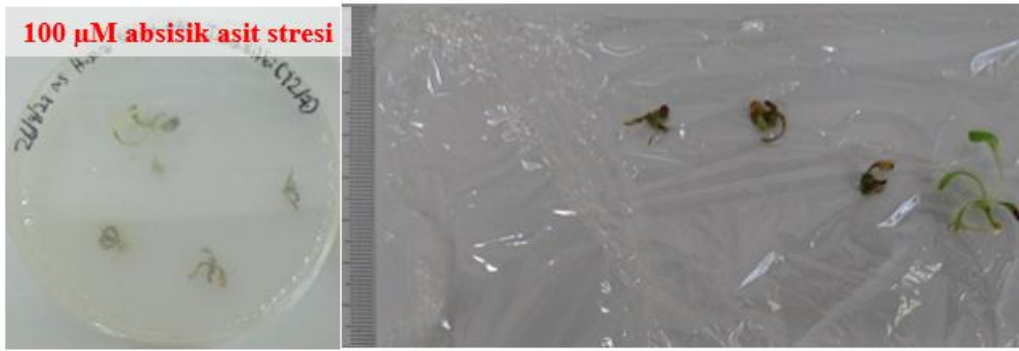
kallusları koyu kahverengine olmasına neden olup kallusların büyümesini önemli miktarda inhibe etmiştir. Sonuç olarak 25 µM gümüş nitrat ve 100 µM absisik asit uygulamaları haricindeki uygulamalar kallus gelişimine etkilememiştir. Diğer yandan 25 µM gümüş nitrat ve 100 µM absisik asit uygulaması kallus rejenerasyonunu inhibe ettiği ve kalluslarda renk değişimine sebep olduğu gözlemlenmiştir. Kalluslarda stres çalışmaları Şekil 4.12’de gösterilmektedir.

Tablo 4.5 Bitkilerde stres ve elisitör uygulamaları ve bitki gelişimine etkileri

Stres ve Elisitör Uygulaması	İnkübasyon Süresi	Bitki Canlılığı	Bitki Gelişimi	Ortalama Bitki Ağırlığı
Kontrol	2 hafta	Hepsi Canlı	Normal Gelişim	0.09 gr
1/2 Azaltılmış MS Besin Ortamı	2 hafta	Hepsi Canlı	Normal Gelişim	0.097 gr
1/4 Azaltılmış MS Besin Ortamı	2 hafta	Hepsi Canlı	Normal Gelişim	0.088 gr
25 µM Bakır Sülfat	1 hafta	Hepsi Canlı	Az Gelişim	0.075 gr
25 µM Bakır Klorür	1 hafta	Hepsi Canlı	Az Gelişim	0.07 gr
25 µM Gümüş Nitrat	1 hafta	Çoğu Soldu	Gelişim yok	0.038 gr
100 µM Absisik Asit	1 hafta	Çoğu Soldu	Gelişim yok	0.025 gr
35 µM Melatonin	1 hafta	Hepsi Canlı	Az Gelişim	0.067 gr



Şekil 4.13 Bitkilerde stres ve elisitör uygulamaları



Şekil 4.13 Bitkilerde stres ve elisitör uygulamaları (devamı)

Tablo 4.5’de belirtildiği üzere azaltılmış MS ile besin stresi *Inula helenium* L. bitkilerine büyüme anlamında değişik bir duruma sebep olmamıştır. 25 µM bakır sülfat, 25 µM bakır klorür ve 35 µM melatonin streslerindeki bitkilerin gelişimlerinin bir miktar az olmasının sebebi kontrol ve besin stresinden daha az süre inkübe edilmeleridir yani onlarında bitkilerin gelişimine etkileri olmadığı düşünülmektedir. 25 µM gümüş nitrat ve 100 µM absisik asit streslerinin ise bitkilerin büyümesini inhibe ettiği ve hatta bitkilerin solmalarına yol açtığı gözlenmiştir. Sonuç olarak azaltılmış MS ile besin stresi, 25 µM bakır sülfat, 25 µM bakır klorür ve 35 µM melatoninin bitkilerin gelişimine bir etkisi olmadığı, 25 µM gümüş nitrat ve 100 µM absisik asit uygulamaları ise bitkilerin gelişimini inhibe ettiği ve solmalarına sebep olduğu tespit edilmiştir. Bitki stres çalışmaları Şekil 4.13’de gösterilmektedir.

4.5 Bitki Sekonder Metabolit Analizi Sonuçları

Tablo 4.6’da verilen örneklerden, ekstraksiyon sonrasında HPLC analizi ile toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu (gallik asit eşdeğeri), klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin bileşiklerinin kantitatif analizleri yapılmıştır ve yapılan uygulamaların kontrole göre sekonder metabolit değişimleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.6 HPLC’de bitki sekonder metabolit analizi yapılmış örnekler

Örnek No.	Örnek Açıklama
1	Toprakta Yetiştirilen Bitkiler
2	<i>İn vitro</i> Ortamda BBD’siz Çimlendirilen Bitkiler
3	Organogenik Bitki - MS - 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (Gövde)
4	Kallus - MS - 2 mg/L 2,4-D – Karanlık
5	Kallus - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN – Karanlık
6	Kallus - MS - 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA - 16/8 sa fotoperiyot (Kök, Yaprak Ayası, Kotiledon ve Yaprak)
7	Kallus - MS - 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA
8	Kallus - 1/2 MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN
9	Kallus - 1/4 MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN
10	Kallus - 25 µM Gümüş Nitrat - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN
11	Kallus - 25 µM Bakır Sülfat - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN
12	Kallus - 25 µM Bakır Klorür - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN
13	Kallus - 100 µM Absisik Asit - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN
14	Kallus - 35 µM Melatonin - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN
15	Bitki - 1/2 MS
16	Bitki - 1/4 MS
17	Bitki - 25 µM Gümüş Nitrat - MS
18	Bitki - 25 µM Bakır Sülfat - MS
19	Bitki - 25 µM Bakır Klorür - MS
20	Bitki - 100 µM Absisik Asit - MS
21	Bitki - 35 µM Melatonin - MS

4.5.1 Toprakta ya da *in vitro* ortamda çimlendirilen veya rejenere edilen bitki örneklerinin sekonder metabolit değerleri

Tablo 4.7 Toprakta ya da laboratuvarında çimlendirilen veya rejenere edilen bitki örneklerinin (kontrol) toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin değerleri

Örnek No.	Örnek Açıklama	TFB Konsantrasyonu (HPLC) (mg Gallik asit eşdeğeri /g kuru ağırlık±SS)	Klorojenik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kafeik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Rutin (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kuersetin (mg /g kuru ağırlık±SS)
1	Toprakta Yetiştirilen Bitkiler	86,0±3,0	9,2±0,1	8,1±0,1	0,7±0,0	0,9±0,1
2	<i>In vitro</i> Ortamda BBD'siz Çimlendirilen Bitkiler	41,3±2,5	0,7±0,0	0,4±0,0	1,0±0,1	2,2±0,1
3	Organogenik Bitki MS - 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (Gövde)	129,7±3,9	8,5±0,1	0,5±0,0	6,3±0,8	33,4±1,4

Inula helenium L. bitkisinin toprakta ya da laboratuvarında *in vitro* koşullarda çimlendirilen veya rejenere edilen bitki örnekleri liyofilizasyon ile suyu uçurulup sekonder metabolit analizinde kullanılmıştır. Toprakta yetiştirilen bitkiler yıkanarak topraktan tamamen arındırılmıştır ve bitkinin tamamı HPLC analizinde kullanılmıştır. Laboratuvarında çimlendirilen veya rejenere edilen bitki örnekleri kültür ortamlarından arındırılmıştır ve bitkiler bütün olarak analizde kullanılmıştır. Örnekleri HPLC analizine hazırlamak için bitkiler önce -20 °C'de dondurulmuştur ve sonrasında örnekler liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonucunda bitki örneklerinin ~%90 oranında ağırlıklarını kaybettikleri saptanmıştır.

Tablo 4.7'de görüldüğü üzere bütün bitki örneklerinde klorojenik aside, kafeik aside, rutine ve kuersetine rastlanmıştır. En yüksek toplam fenolik bileşik değeri 129,7±3,9 mg/g ile organogenik bitki örneğinde, en düşük fenolik bileşik değeri ise 41,3±2,5 mg/g ile *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitki örneğinde görülmüştür. *In vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkiler, toprakta yetiştirilen bitkilere göre %51,98 oranında daha az fenolik bileşik içermektedir. Buna karşılık organogenik bitkiler toprakta yetiştirilen

bitkilere göre %50,81 oranında daha fazla, *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre %214,04 daha fazla fenolik bileşik içerdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak içlerinden en fazla fenolik bileşik içeren örnek organogenik bitkilerdir (Tablo 4.7).

Klorojenik asitte, en yüksek değer $9,2\pm 0,1$ mg/g ile toprakta yetiştirilen bitki örneğinde, en düşük değer ise $0,7\pm 0,0$ mg/g ile *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitki örneğinde görülmektedir. *İn vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkiler, toprakta yetiştirilen bitkilere göre %92,39 daha az klorojenik asit içermektedir. Organogenik bitkilerde ise klorojenik asit değeri açısından *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre %114,29 ile artış görülmüş ancak toprakta yetiştirilen bitkilere göre %7,61 ile azalış görülmüştür. Sonuçta en fazla klorojenik asit içeren örnek toprakta yetiştirilen bitki örneğidir (Tablo 4.7).

Kafeik asit de ise, en yüksek değer $8,1\pm 0,1$ mg/g ile toprakta yetiştirilen bitki örneğinde, en düşük değerde $0,4\pm 0,0$ mg/g ile *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitki örneğinde görülmektedir. Toprakta yetiştirilen bitki örneği ile karşılaştırıldığında, *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitki örneğinde %95,06 daha az ve organogenik bitki örneğinde %93,83 daha az kafeik aside rastlanmıştır. Kafeik asit en fazla toprakta yetiştirilen bitkilerde gözlenmiştir ve bu da *in vitro* ortamda yetişen bitkilerde kafeik asit oluşumunun çok az olduğunu göstermektedir (Tablo 4.7).

Rutin de en yüksek değer $6,3\pm 0,8$ mg/g ile organogenik bitkilerde ve en düşük değer $0,7\pm 0,0$ mg/g ile toprakta yetiştirilen bitkilerde görülmüştür. *İn vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilerde toprakta yetiştirilen bitkilere göre %42,85 rutin artışı görülmüştür. Organogenik bitkilerde ise toprakta yetiştirilen bitkilere göre %800, *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre ise %530 rutin artışı görülmüştür. Sonuçta olarak en yüksek rutin miktarı organogenik bitkilerde tespit edilmiştir (Tablo 4.7).

Kuersetin de en yüksek değer $33,4\pm 1,4$ mg/g ile organogenik bitkilerde ve en düşük değer $0,9\pm 0,1$ mg/g ile toprakta yetiştirilen bitkilerde görülmüştür. *İn vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilerde, toprakta yetiştirilen bitkilere göre %144,44 daha fazla kuersetin tespit edilmiştir. Organogenik bitkilerde ise toprakta yetiştirilen bitkilere göre %3611,11 ve *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre ise %1418,18 daha fazla kuersetin tespit edilmiştir. Bu değerler ışığında en fazla kuersetin değerinin organogenik bitkilerde olduğu saptanmıştır (Tablo 4.7).

4.5.2 Kallus örneklerinin sekonder metabolit değerleri

Tablo 4.8 Farklı BBD'ler ile rejenere edilen kallus örneklerinin, kontrol örnekleri ile birlikte toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin değerleri

Örnek No.	Örnek Açıklama	TFB Konsantrasyonu (HPLC) (mg Gallik asit eşdeğeri /g kuru ağırlık±SS)	Klorojenik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kafeik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Rutin (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kuersetin (mg /g kuru ağırlık±SS)
1	Toprakta Yetiştirilen Bitkiler	86,0±3,0	9,2±0,1	8,1±0,1	0,7±0,0	0,9±0,1
2	<i>In vitro</i> Ortamda BBD'siz Çimlendirilen Bitkiler	41,3±2,5	0,7±0,0	0,4±0,0	1,0±0,1	2,2±0,1
3	Organogenik Bitki - MS 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (Gövde)	129,7±3,9	8,5±0,1	0,5±0,0	6,3±0,8	33,4±1,4
4	Kallus – MS 2 mg/L 2,4-D Karanlık	34,4±1,8	4,3±0,1	0,9±0,1	9,5±1,2	35,6±0,9
5	Kallus - MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN - Karanlık	114,9±1,8	13,9±0,3	5,2±0,6	5,1±0,5	321±13
6	Kallus - MS - 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA 16/8 sa fotoperiyot (Kök, Yaprak Ayası, Kotiledon, Yaprak)	169,2±10,5	11,6±0,3	2,5±0,1	3±0,1	256±20
7	Kallus - MS - 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA	118,3±5,1	11,1±0,2	2,0±0,6	15,5±1,1	241±17

Laboratuvarda *in vitro* koşullarda çimlendirilen bitkilerden alınan eksplantlar BBD'li besin ortamlarına ekilmiştir. Bazı BBD kombinasyonlarından ve konsantrasyonlarından kallus rejenerasyonu sağlanmıştır. Kallusların bir ay boyunca büyümesi beklenmiş ve kallusların durumuna göre altkültür, stresli ya da elisitörlü besin ortamlarına aktarım ya da hasat işlemi gerçekleştirilmiştir. Hasat edilen ve kültür ortamından arındırılan kallus dokuları öncelikle -20 °C'de dondurulmuş olup sonrasında HPLC analizi için liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonucunda kallusların ~%90 oranında ağırlıklarını kaybettikleri gözlemlenmiştir.

Tablo 4.8’de gösterildiği üzere, bütün kallus örneklerinde klorojenik aside, kafeik aside, rutine ve kuersetine rastlanmıştır. Kallus örnekleri arasında en yüksek fenolik bileşik konsantrasyonu $169,2 \pm 10,5$ mg/g ile 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 sa fotoperiyot), en düşük fenolik bileşik konsantrasyonu $34,4 \pm 1,8$ mg/g ile 2 mg/L 2,4-D’de (karanlık) inkübe edilen ortamdaki kalluslarda olduğu gözlemlenmiştir. 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 sa fotoperiyot) ortamında gelişen kalluslarda, toprakta yetiştirilen bitkilere göre %96,74 fenolik bileşik konsantrasyonu artışı, eksplant olarak kullanılan *in vitro* ortamda BBD’siz çimlendirilen bitkilere göre ise %309,69 fenolik bileşik konsantrasyonu artışı olduğu görülmüştür. Ayrıca gövde ucu eksplantının aynı BBD’de (1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA) inkübe edilmesi ile gelişen organogenik bitkiye göre ise %30,45 fenolik bileşik konsantrasyonu artışı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak kontrol ve kallus örnekleri arasında en yüksek fenolik bileşik konsantrasyonu içeren örneğin 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 sa fotoperiyot) olduğu gösterilmektedir (Tablo 4.8).

Kallusların klorojenik asit değerlerine bakıldığında; en yüksek değer $13,9 \pm 0,3$ mg/g ile 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN’de (karanlık) inkübe edilen kallus örneğinde, en düşük değer ise $4,3 \pm 0,1$ mg/g ile 2 mg/L 2,4-D’de (karanlık) inkübe edilen kallus örneğinde olduğu görülmüştür. Klorojenik asit içeriklerine göre; 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) ortamında gelişen kalluslarda, toprakta yetiştirilen bitkilere göre %51,09 artış, eksplant olarak kullanılan *in vitro* ortamda BBD’siz çimlendirilen bitkilere göre ise %1885,71 artış olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol ve kallus örneklerinin klorojenik asit miktarları karşılaştırıldığında en yüksek miktarın 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) ortamında gelişen kalluslarda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

Kalluslarda bulunan kafeik asit miktarları karşılaştırıldığında; en yüksek miktar $5,2 \pm 0,6$ mg/g ile 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) ortamında yetişen kalluslarda, en düşük miktar ise $0,9 \pm 0,1$ mg/g ile 2 mg/L 2,4-D (karanlık) ortamında yetişen kalluslarda olduğu gözlemlenmiştir. Kafeik asit değerlerine bakıldığında, 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) kallus örneklerinde toprakta yetiştirilen bitkilere göre kafeik asit değerinde %35,8 azalma, eksplant olarak kullanılan *in vitro* ortamda BBD’siz çimlendirilen bitkilere göre ise kafeik asit değerinde %1200 artış olduğu tespit edilmiştir. Kontrol ve kallus örnekleri karşılaştırıldığında en yüksek kafeik asit miktarının toprakta yetiştirilen bitkilerde olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.8).

Kalluslardaki rutin değerlerine bakıldığında; en yüksek rutin değeri 15,5±1,1 mg/g ile 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA ortamında gelişen kalluslarda, en düşük rutin değeri ise 3±0,1 mg/g ile 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 sa fotoperiyot) ortamında gelişen kalluslarda olduğu görülmüştür. Rutin değeri karşılaştırıldığında; 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA ortamında gelişen kalluslarda toprakta yetiştirilen bitkilere göre %2114,29 oranında rutin artışı, eksplant olarak kullanılan *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre ise %1450 oranında rutin artışı görülmüştür. Kontrol ve kallus örnekleri arasında en çok rutin içeren örneğin 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA ortamında gelişen kallus örneği olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.8).

Kallus örneklerinde kuersetin miktarları karşılaştırıldığında; en yüksek kuersetin değeri 321±13 mg/g ile 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) besin ortamında rejenere olan kalluslarda, en düşük kuersetin değerinin ise 35,6±0,9 mg/g ile 2 mg/L 2,4-D (karanlık) besin ortamında rejenere olan kalluslarda olduğu gözlenmiştir. Kuersetin değerleri kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında; 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) besin ortamında rejenere olan kalluslarda toprakta yetiştirilen bitkilere göre %35566,7 oranında artış, eksplant olarak kullanılan *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre %14490,9 oranında artış olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak kontrol ve kallus örnekleri karşılaştırması sonucunda en yüksek kuersetin konsantrasyonu içeren örneğin 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) besin ortamında rejenere olan kalluslar olduğu görülmüştür (Tablo 4.8).

4.5.3 Stres veya elisitör uygulanmış kallus örneklerinin sekonder metabolit değerleri

Tablo 4.9 Stres ve elisitör uygulaması yapılmış kallus örneklerinin, kontrol örnekleri ile birlikte toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin değerleri

Örnek No.	Örnek Açıklama	TFB Konsantrasyonu (HPLC) (mg Gallik asit eşdeğeri /g kuru ağırlık±SS)	Klorojenik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kafeik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Rutin (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kuersetin (mg /g kuru ağırlık±SS)
1	Toprakta Yetiştirilen Bitkiler	86,0±3,0	9,2±0,1	8,1±0,1	0,7±0,0	0,9±0,1
2	<i>İn vitro</i> Ortamda BBD'siz Çimlendirilen Bitkiler	41,3±2,5	0,7±0,0	0,4±0,0	1,0±0,1	2,2±0,1
3	Organogenik Bitki - MS 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (Gövde)	129,7±3,9	8,5±0,1	0,5±0,0	6,3±0,8	33,4±1,4
5	Kallus - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN - Karanlık	114,9±1,8	13,9±0,3	5,2±0,6	5,1±0,5	321±13
8	Kallus - 1/2 MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	108,1±4,8	1,5±0,1	0,8±0,1	13,9±1,0	88±4
9	Kallus - 1/4 MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	89,3±4,5	17,4±0,4	6,1±0,9	4±1	19,3±0,8
10	Kallus - 25 µM Gümüş Nitrat - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	53,4±2,9	19,3±0,2	2,7±0,5	29,9±2,2	67±8
11	Kallus - 25 µM Bakır Sülfat - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	64,9±1,6	8,7±0,2	1,0±0,5	11,0±1,3	49±3
12	Kallus - 25 µM Bakır Klorür - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	81,8±5,9	10,6±0,7	3,1±0,8	13,4±0,8	66±4
13	Kallus - 100 µM Absisik Asit - MS - 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	140,4±8,7	24,1±0,3	4,6±0,5	17,8±1,2	312±15
14	Kallus - 35 µM Melatonin - MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	138,1±8,2	31,7±0,3	2,3±0,2	6,2±0,8	388±17

In vitro koşullarda 1 ay boyunca 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN BBD'li besin ortamında rejenere edilen kalluslar, yine 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN BBD'si içeren ve tablo 4.3'deki stres veya elisitör koşullarının sağlandığı besin ortamlarına transfer edilmişlerdir. Stres veya elisitör içeren besin ortamındaki kalluslar 1 hafta ile 2 hafta arasında iklim kontrollü oda da karanlık ortamda inkübe edilmişlerdir. Sonrasında hasat edilen kallus örnekleri; sırasıyla kültür ortamından arındırma, -20 °C'de dondurma ve HPLC analizi için liyofilizasyon işlemleri yapılmıştır. Liyofilizasyon işlemi sonucunda kallusların ~%90 oranında ağırlıklarını kaybettikleri gözlemlenmiştir.

Tablo 4.9 belirtildiği üzere bütün stres veya elisitör uygulanmış kallus örneklerinde klorojenik aside, kafeik aside, rutine ve kuersetine rastlanmıştır. Stres veya elisitör uygulanmış kalluslar arasından en yüksek fenolik bileşik konsantrasyonu 140,4±8,7 mg/g ile 100 µM absisik asit uygulanmış kalluslar, en düşük fenolik bileşik konsantrasyonu ise 53,4±2,9 mg/g ile 25 µM gümüş nitrat stresi uygulanmış kalluslar olduğu görülmüştür. Fenolik bileşik konsantrasyonu bakımından; absisik asit uygulanmış kallus örneklerinde toprakta yetiştirilen bitki örneğine göre %63,26 artış, eksplant olarak kullanılan *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitki örneğine göre %242,44 artış olduğu ve kontrol kallus örneği olarak karşılaştırılan 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere olan kallus örneğine göre ise %22,19 artış olduğu gözlemlenmiştir. Değerler incelendiğinde kontrol örnekleriyle stres veya elisitör uygulanmış kalluslar arasında en fazla fenolik bileşik konsantrasyonu içeren örneğin 100 µM absisik asit uygulanmış kalluslar olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4.9).

Stres veya elisitör uygulanmış kallus örneklerinin arasında en fazla klorojenik asit değerlerinin 31,7±0,3 mg/g ile 35 µM melatonin uygulanmış kalluslarda, en az klorojenik asit değerlerinin ise 8,7±0,2 mg/g ile 25 µM bakır sülfat stresi uygulanmış kalluslarda olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol örnekleriyle ile melatonin uygulanmış kallus örneği karşılaştırıldığında; toprakta yetiştirilen bitki örneğine göre %244,57 klorojenik asit artışı, eksplant olarak kullanılan *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitki örneğine göre %4428,57 klorojenik asit artışı ve kontrol kallus örneği olarak karşılaştırılan 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere olan kallus örneğine göre ise % 128,06 klorojenik asit artışı gerçekleştiği tespit edilmiştir. Kontrol örnekleri ile stres veya elisitör uygulanmış kallus örnekleri karşılaştırıldığında, en fazla klorojenik asit konsantrasyonunu 35 µM melatonin uygulanmış kallus örneğin olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Stres veya elisitör uygulanmış kallus örnekleri kafeik asit bakımından karşılaştırıldığında; en fazla kafeik asit konsantrasyonu $6,1\pm 0,9$ mg/g ile 1/4 MS besin stresi uygulanmış kallus örneğinde, en düşük kafeik asit konsantrasyonu ise $0,8\pm 0,1$ mg/g ile 1/2 MS besin stresi uygulanmış kallus örneğinde olduğu gösterilmektedir. Kafeik asit konsantrasyonları bakıldığında; 1/4 MS besin stresi uygulanmış kalluslarda toprakta yetiştirilen bitkilere göre %24,69 azalış, eksplant olarak kullanılan ve *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre %1425 artış ve kontrol kallus örneği olarak karşılaştırılan 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere olan kalluslara göre ise %17,31 artış olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol örnekleri ile stres veya elisitör uygulanmış kallus örnekleri arasından en fazla kafeik asit içeren örneğin toprakta yetiştirilen bitki örnekleri olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Stres veya elisitör uygulanmış kallus örneklerinde en fazla ve en az rutin içeren örnekler sırasıyla; $29,9\pm 2,2$ mg/g ile 25 μ M gümüş nitrat stresi uygulanmış kallus örnekleri ve 4 ± 1 mg/g ile 1/4 MS besin stresi uygulanmış kallus örnekleri olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol örneklerine göre rutin konsantrasyonu artışlarına bakıldığında; 25 μ M gümüş nitrat stresi uygulanmış kalluslarda toprakta yetiştirilen bitkilere göre %4171,43 artış, eksplant olarak kullanılan ve *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre %2890 artış ve kontrol kallus örneği olarak karşılaştırılan 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere olan kalluslara göre ise %486,28 artış saptanmıştır. Kontrol örneklerine ve stres veya elisitör uygulanmış kallus örneklerine bakıldığında 25 μ M gümüş nitrat stresi uygulanmış kallus örneklerinin en fazla rutin içerdiği görülmüştür (Tablo 4.9).

Stres veya elisitör uygulanmış kalluslar arasında en fazla kuersetin miktarı 388 ± 17 mg/g ile 35 μ M melatonin uygulanmış kalluslarda, en az kuersetin miktarı ise $19,3\pm 0,8$ mg/g ile 1/4 MS besin stresi uygulanmış kalluslarda olduğu analiz edilmiştir. Kontrol örnekleriyle en fazla kuersetin içeren 35 μ M melatonin uygulanmış kallus örneği karşılaştırıldığında; toprakta yetiştirilen bitkilere göre %4211,11 artış, eksplant olarak kullanılan ve *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitkilere göre %1663,64 artış ve kontrol kallus örneği olarak karşılaştırılan 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere olan kalluslara göre ise %20,87 artış gösterilmektedir. Sonuç olarak kontrol örnekleri ve stres veya elisitör uygulanmış kallus örnekleri arasında en fazla kuersetin içeren örneğin 35 μ M melatonin uygulanmış kallus örneği olduğu saptanmıştır (Tablo 4.9).

4.5.4 Stres veya elisitör uygulanmış bitki örneklerinin sekonder metabolit değerleri

Tablo 4.10 Stres ve elisitör uygulaması yapılmış bitki örneklerinin, kontrol örnekleri ile birlikte toplam fenolik bileşik (TFB) konsantrasyonu, klorojenik asit, kafeik asit, rutin ve kuersetin değerleri

Örnek No.	Örnek Açıklama	TFB Konsantrasyonu (HPLC) (mg Galik asit eşdeğeri /g kuru ağırlık±SS)	Klorojenik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kafeik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Rutin (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kuersetin (mg /g kuru ağırlık±SS)
1	Toprakta Yetiştirilen Bitkiler	86,0±3,0	9,2±0,1	8,1±0,1	0,7±0,0	0,9±0,1
2	<i>İn vitro</i> Ortamda BBD'siz Çimlendirilen Bitkiler	41,3±2,5	0,7±0,0	0,4±0,0	1,0±0,1	2,2±0,1
3	Organogenik Bitki - MS 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (Gövde)	129,7±3,9	8,5±0,1	0,5±0,0	6,3±0,8	33,4±1,4
15	Bitki - 1/2 MS	23,9±0,7	0,1±0,0	0,05±0,00	0,05±0,00	1,4±0,1
16	Bitki - 1/4 MS	20,8±1,8	0,2±0,0	0,1±0,0	0,9±0,0	11±1
17	Bitki - 25 µM Gümüş Nitrat - MS	15,0±0,2	0,1±0,0	0,04±0,00	0,02±0,00	0,9±0,1
18	Bitki - 25 µM Bakır Sülfat - MS	16,6±1,1	0,1±0,0	0,05±0,00	0,03±0,00	3,1±0,1
19	Bitki - 25 µM Bakır Klorür - MS	16,0±2,3	0,1±0,0	0,03±0,00	0,03±0,00	1,2±0,1
20	Bitki - 100 µM Absisik Asit - MS	13,6±0,3	0,1±0,0	0,05±0,00	0,01±0,00	1,9±0,1
21	Bitki - 35 µM Melatonin - MS	21,9±1,7	0,1±0,0	0,06±0,00	0,01±0,00	1,8±0,1

İn vitro koşullarda 2 hafta boyunca BBD'siz besin ortamında büyütülmüş bitkiler, yine BBD'siz olan ve tablo 4.3'deki stres veya elisitör koşullarının sağlandığı besin ortamlarına transfer edilmişlerdir. Stres veya elisitör içeren besin ortamındaki bitkiler 1 hafta ile 2 hafta arasında iklim kontrollü odada 16/8 fotoperiyotta inkübe edilmişlerdir.

Sonrasında hasat edilen bitki örneklerine; sırasıyla kültür ortamından arındırma, -20 °C’de dondurma ve HPLC analizi için liyofilizasyon işlemi yapılmıştır. Liyofilizasyon işlemi sonucunda bitkilerin ~%90 oranında ağırlıklarını kaybettikleri gözlemlenmiştir.

Tablo 4.10’de gözlemlendiği üzere bütün stres veya elisitör uygulanmış bitki örneklerinde klorojenik aside, kafeik aside, rutine ve kuersetine rastlanmıştır. Stres veya elisitör uygulanmış bitki örnekleri fenolik bileşik konsantrasyonu bakımından karşılaştırıldığında, en çok fenolik bileşik konsantrasyonu $23,9 \pm 0,7$ mg/g ile 1/2 MS besin stresi uygulanmış bitki örneğinde, en az fenolik bileşik konsantrasyonu ise $13,6 \pm 0,3$ mg/g ile 100 µM absisik asit uygulanmış bitki örneğinde olduğu gösterilmektedir. 1/2 MS besin stresi uygulanmış bitki örneği, kontrol örneklerinin fenolik bileşik konsantrasyonları ile karşılaştırıldığında; toprakta yetiştirilen bitki örneğine göre %72,21 azalış, *in vitro* ortamda BBD’siz çimlendirilen bitki örneklerine göre %42,13 azalış ve organogenik bitki örneklerine göre ise %81,57 azalış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak kontrol örnekleri ve stres veya elisitör uygulanmış bitki örnekleri arasında en yüksek fenolik bileşik konsantrasyonuna sahip örneğin organogenik bitki örnekleri olduğu görülmüştür (Tablo 4.10).

Stres veya elisitör uygulanmış bitki örneklerinde en fazla klorojenik asit içeren örnek 0,2 mg/g ile 1/4 MS besin stresi uygulanmış bitki örneği olduğu gösterilmektedir. Diğer bütün stres veya elisitör uygulanmış bitki örneklerinde klorojenik asit miktarı 0,1 mg/g olduğu tespit edilmiştir. 1/4 MS besin stresi uygulanmış bitki örneğinin kontrol örneklerine göre klorojenik asit konsantrasyonu değişimine bakıldığında; toprakta yetiştirilen bitki örneğine göre %97,83 azalma, *in vitro* ortamda BBD’siz çimlendirilen bitkilere göre %50 azalma ve organogenik bitki örneği göre ise %97,65 oranında azalma belirlenmiştir. Kontrol örneklerine ve stres veya elisitör uygulanmış bitki örnekleri karşılaştırıldığında en yüksek klorojenik asit miktarı toprakta yetiştirilen bitki örneğinde analiz edilmiştir (Tablo 4.10).

Stres veya elisitör uygulanmış bitkiler arasında en fazla kafeik asit miktarı 0,1 mg/g ile 1/4 MS besin stresi uygulanmış bitkiler, en az kafeik asit miktarı ise 0,03mg/g ile 25 µM bakır klorür stresi uygulanmış bitki olduğu belirlenmiştir. Kontrol örnekleriyle en fazla kafeik asit miktarı içeren 1/4 MS besin stresi uygulanmış bitkiler karşılaştırıldığında; toprakta yetiştirilen bitkilere göre %99,38 azalış, *in vitro* ortamda BBD’siz çimlendirilen bitkilere göre %87,5 azalış ve organogenik bitkilere göre ise %90 azalış gösterilmektedir. Sonuçta kontrol örnekleri ve stres veya elisitör uygulanmış kallus

örnekleri arasında en çok kafeik asit konsantrasyonu toprakta yetiştirilen bitkilerde olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 4.10).

Stres veya elisitör uygulanmış kallusların arasından en yüksek rutin konsantrasyonu 0,9 mg/g ile 1/4 MS besin stresi uygulanmış bitkilerde, en düşük rutin konsantrasyonu ise 0,01 mg/g ile 100 µM absisik asit uygulanmış bitkilerde ve 35 µM melatonin uygulanmış bitkilerde gösterilmektedir. Rutin konsantrasyonu bakımından; 1/4 MS besin stresi uygulanmış bitki örneklerinde toprakta yetiştirilen bitki örneğine göre %28,57 artış, *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitki örneği göre %10 azalış ve organogenik bitki örneği göre ise %85,71 azalış gözlemlenmiştir. Rutin değerleri incelendiğinde kontrol örnekleriyle stres veya elisitör uygulanmış bitkiler arasında en fazla rutin konsantrasyonu içeren örneğin organogenik bitki örneği olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.10).

Stres veya elisitör uygulanmış bitki örnekleri kuersetin bakımından karşılaştırıldığında; en fazla kuersetin 11 ± 1 mg/g ile 1/4 MS besin stresi uygulanmış bitki örneklerinde ve en az kuersetin ise $0,9 \pm 0,1$ mg/g ile gümüş nitrat stresi uygulanmış bitki örneklerinde olduğu gösterilmektedir. 1/4 MS besin stresi uygulanmış bitkilerinin kuersetin konsantrasyonu kontrol örneklerinin kuersetin konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında; toprakta yetiştirilen bitki örneğine göre %1122,22 artış, *in vitro* ortamda BBD'siz çimlendirilen bitki örneği göre %400 artış ama organogenik bitki örneğine göre ise %96,71 azalış gözlenmiştir. Kontrol örneklerine ve stres veya elisitör uygulanmış bitki örneklerine bakıldığında organogenik bitki örneklerinde en yüksek kuersetin konsantrasyonu olduğu gösterilmektedir (Tablo 4.10).

Tablo 4.11 HPLC analizi yapılmış bütün örneklerin analiz sonuçları

Örnek No.	Örnek Açıklama	TFB Konsantrasyonu (HPLC) (mg Gallik asit eşdeğeri /g kuru ağırlık±SS)	Klorojenik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kafeik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Rutin (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kuersetin (mg /g kuru ağırlık±SS)
1	Toprakta Yetiştirilen Bitkiler	86,0±3,0	9,2±0,1	8,1±0,1	0,7±0,0	0,9±0,1
2	<i>İn vitro</i> Ortamda BBD'siz Çimlendirilen Bitkiler	41,3±2,5	0,7±0,0	0,4±0,0	1,0±0,1	2,2±0,1
3	Organogenik Bitki MS - 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (Gövde)	129,7±3,9	8,5±0,1	0,5±0,0	6,3±0,8	33,4±1,4
4	Kallus - MS 2 mg/L 2,4-D Karanlık	34,4±1,8	4,3±0,1	0,9±0,1	9,5±1,2	35,6±0,9
5	Kallus - MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN Karanlık	114,9±1,8	13,9±0,3	5,2±0,6	5,1±0,5	321±13
6	Kallus - MS 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA 16/8 sa fotoperiyot (Kök, Yaprak Ayası, Kotiledon, Yaprak)	169,2±10,5	11,6±0,3	2,5±0,1	3±0,1	256±20
7	Kallus - MS 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA	118,3±5,1	11,1±0,2	2,0±0,6	15,5±1,1	241±17
8	Kallus - 1/2 MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	108,1±4,8	1,5±0,1	0,8±0,1	13,9±1,0	88±4
9	Kallus - 1/4 MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	89,3±4,5	17,4±0,4	6,1±0,9	4±1	19,3±0,8
10	Kallus - 25 µM Gümüş Nitrat - MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	53,4±2,9	19,3±0,2	2,7±0,5	29,9±2,2	67±8
11	Kallus - 25 µM Bakır Sülfat - MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	64,9±1,6	8,7±0,2	1,0±0,5	11,0±1,3	49±3

Tablo 4.11 Örneklerin HPLC analiz sonuçları (Devamı)

Örnek No.	Örnek Açıklama	TFB Konsantrasyonu (HPLC) (mg Gallik asit eşdeğeri /g kuru ağırlık±SS)	Klorojenik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kafeik asit (mg /g kuru ağırlık±SS)	Rutin (mg /g kuru ağırlık±SS)	Kuersetin (mg /g kuru ağırlık±SS)
12	Kallus - 25 µM Bakır Klorür MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	81,8±5,9	10,6±0,7	3,1±0,8	13,4±0,8	66±4
13	Kallus - 100 µM ABA - MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	140,4±8,7	24,1±0,3	4,6±0,5	17,8±1,2	312±15
14	Kallus - 35 µM Melatonin MS 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN	138,1±8,2	31,7±0,3	2,3±0,2	6,2±0,8	388±17
15	Bitki - 1/2 MS	23,9±0,7	0,1±0,0	0,05±0,00	0,05±0,00	1,4±0,1
16	Bitki - 1/4 MS	20,8±1,8	0,2±0,0	0,1±0,0	0,9±0,0	11±1
17	Bitki - 25 µM Gümüş Nitrat - MS	15,0±0,2	0,1±0,0	0,04±0,00	0,02±0,00	0,9±0,1
18	Bitki - 25 µM Bakır Sülfat - MS	16,6±1,1	0,1±0,0	0,05±0,00	0,03±0,00	3,1±0,1
19	Bitki - 25 µM Bakır Klorür - MS	16,0±2,3	0,1±0,0	0,03±0,00	0,03±0,00	1,2±0,1
20	Bitki - 100 µM ABA- MS	13,6±0,3	0,1±0,0	0,05±0,00	0,01±0,00	1,9±0,1
21	Bitki - 35 µM Melatonin - MS	21,9±1,7	0,1±0,0	0,06±0,00	0,01±0,00	1,8±0,1

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Tohumların çimlendirilmesi sırasında suda bekletilmiş tohumların daha hızlı çimlendiği gözlenmiştir. Dezfuli ve arkadaşları mısır tohumları ile yaptığı çalışmada aynı sonuca vardığı görülmüştür. Hidropriming adı ile geçmekte olan bu teknik ile suda bekletilen mısır tohumlarının daha hızlı ve güçlü çimlendiği görülmüştür. Hidropriming yöntemi ile tohumlar metabolik olaylarının başlayabilmesi için yeterince su emmiş olmaktadır. Bu çalışmada da 12 saatlik suda bekletmenin çimlendirmeyi hızlandırdığı görülmüş ama en iyi sürenin 36 saat olduğu tespit edilmiştir [32].

Çalışmalar sırasında toprakta yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların *in vitro* kültürü için verimli bir sterilizasyon yöntemi bulunamamıştır. Sterilize edilen ve *in vitro* kültüre ekilen eksplantların çoğunluğunda ya kontaminasyon gözlenmiştir ya da ölüm gerçekleşmiştir. Çok az sayıda elde edilen kalluslar ise sterilizasyonda hücreler zarar gördüğü için kısa ömürlü olmuştur. Kontaminasyonlar büyük çoğunlukla eksplant ve etrafından görüldüğünden dolayı ve ayrıca tohumların başarılı bir şekilde sterilize edilebilmesinden dolayı kontaminasyon kaynağının topraktan yetişen bitkilerden elde edilen eksplantın kendisi olduğu düşünülmektedir. Bu kontaminasyonların bir sebebinin Bunn ve Tan'a göre endofitler olabileceği yönündedir. Endofitler toprakta yetişen bitkilerde bulunan bitkinin içerisine bir şekilde yerleşmiş ama bitkiye bir zararı olmayan mikroorganizmalardır. Bazı endofitler bitkilerde doğal ya da yaralanma sonuna oluşan yarıklardan içeri girerken bazı mikroorganizmalar selüloz ve pektinaz üreterek bitkinin içerisine sızabilirler. Ayrıca toprakta daha fazla mikroorganizma olacağından köklerde doğal olarak daha çok endofit bulunmaktadır ve bu sebepten kök eksplantlarının kontaminasyon olasılığı daha yüksektir. Bu sebeplerden dolayı endofitlerin yüzey sterilizasyonu ile kolaylıkla elimine edilmesi beklenilmemelidir [33]. Kontaminasyonların başka bir sebebi, kontaminantlar için yetersiz olan ama bitki hücrelerine zarar vermekte olan sterilizasyon yöntemi olabilir. Bunn ve Tan'a göre doğadan toplanmış bitkilere uygulanan sterilizasyonların bazen verimli bazen ise verimsiz gerçekleştiği belirtilmiştir [33]. Sonuç olarak başka çalışmalarda geçerli olan bitki sterilizasyon tekniklerinin bu bitki için uygun olmadığı, en iyi yöntemin sterilize edilmiş tohumlardan *in vitro* ortamda çimlendirilmiş bitkilerin eksplant kaynağı olarak

kullanılması olduğu sonucuna varılmıştır. İleriki çalışmalar için bu çalışmadan farklı olarak daha verimli bir sterilizasyon için Tween-80 gibi yüzey aktif maddesi ya da Cıva(II) Klorür ($HgCl_2$) gibi sterilizatörler kullanılabilir. Ayrıca sterilizasyonun eksplantların içlerinde daha etkili olması için sterilizasyon sırasında örneklere vakum uygulanabilir. Başka bir seçenek ise bu çalışmada olduğu gibi tohumların *in vitro* çimlendirilmesi sağlanıp doğrudan aseptik eksplantlar elde edilebilir.

Kallus rejenerasyonu deneyleri için birçok BBD kombinasyonu denenmiştir ve 2 mg/L 2,4-D, 3 mg/L 2,4-D, 1,5 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN, 2 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN, 3 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN, 1 mg/L 2,4-D + 0,6 mg/L KN, 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KN, 1 mg/L KN ve 1 mg/L BAP + 1 mg/L IBA kombinasyonlarının uygulanması *Inula* türü bitkilerde ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN, 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA, 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA ve 2 mg/L 2,4-D kombinasyonları başta olmak üzere birçok BBD'li ortamdan kallus rejenerasyonu gözlenmiştir. Literatürde kullanılan 1 mg/L 2,4-D [47, 48] kombinasyonu ve benzer kombinasyonlar olan 2 mg/L 2,4-D ve 3 mg/L 2,4-D içeren kültürde kallus rejenerasyonu gerçekleştirmiştir ancak içeriden en iyi sonucu bu çalışmaya özgü olan 2 mg/L 2,4-D vermiştir. Literatürde kullanılan 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN [28, 29] ve 1 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L KN [47] kombinasyonları ve benzer kombinasyonlar olan 1,5 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN, 2 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN, 3 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN, 1 mg/L 2,4-D + 0,6 mg/L KN, 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L KN içeren kültürde kallus rejenerasyonu gerçekleştirmiştir ancak içeriden en iyi sonucu Stojakowska ve arkadaşlarının kullandığı 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN vermiştir. 5 mg/L BAP + 2 mg/L 2,4-D kombinasyonunda literatürdeki benzer kombinasyonla yapılan çalışmalarla belirttiği gibi kallus rejenerasyonu gözlenmiş ama sürgün gelişimi olmamıştır [49, 50]. 2 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP kombinasyonunda literatürde belirttiği gibi kallus rejenerasyonu gözlenmiştir [47]. Ayrıca 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA ve 1 mg/L BAP + 1 mg/L IBA kombinasyonu içeren ortamlardaki gövde eksplantlarında sürgün gelişimi gözlenmiştir. Ancak 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA kombinasyonunda literatüre nazaran sadece gövde ucu eksplantında sürgün gelişimi görülmüştür [51]. Literatüre çelişkili bir şekilde 1 mg/L BAP kombinasyonunda hiç kallus ya da sürgün gelişimi gözlenmemiştir [47, 52]. Verimli ortamlar çoğunlukla hem oksin (2,4-D, IBA ve NAA) hemde sitokinin (KN ve BAP) kombinasyonları içeren ortamlar olmuştur. Oksin BBD'leri olan 2,4-D ve NAA kallus oluşumuna teşvik ederken IBA ise kök gelişimini teşvik etmektedir. Sitokinin BBD'si olan KN ise hücre bölünmesi teşvik

ederken BAP ise sürgün gelişimine teşvik eder [6]. Bu bilgilerden yola çıkarak kallus gelişimini teşvik edici 2,4-D ve yine hücre bölünmesini artıran KN içeren kültürün en verimli kallus rejenerasyonunu vermesi şeklinde açıklanmaktadır. 2,4-D tek başına bile verimli bir şekilde kallus rejenerasyonu sağlayabilmektedir [35]. BAP tek başına bir sonuç yaratmamış olsa da NAA ve IBA gibi bir oksin ile birlikte kullanıldığında kallus veya sürgün gelişimi verdiği gösterilmektedir. BAP bir sitokinin olarak eksplantlarda oksin transportunu olumlu bir şekil etmiş olabileceği düşünülmektedir [6, 34]. Oksin ve sitokinin aynı ortam kullanıldığında birbirlerinin etkilerini güçlendirdiği gibi birbirlerinin bazı etkilerini inhibe de edebilmektedir [34]. Bu durum 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA içeren ortamda sürgün gelişimi gözlenirken 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA içeren ortamda sadece kallus gözlenmesine açıklık getirmektedir. İleriki çalışmalar için daha fazla farklı oksin ve sitokinin kombinasyonu içeren ortamların denenmesi ile daha verimli kallus ve sürgün oluşumu sağlayan besin ortamları yaratılabilir.

Bu çalışmada altkültürden sonra kallusların büyük bölümünün büyümesinin durup kahverengileştiği gözlemlenmiştir. Oksinler kültürde bitki hücrelerinde etilen gazının sentezlenmesini teşvik etmektedir. Etilen gazı meyvelerin olgunlaşmasına, yaprak dökülmesine ve yaşlanmaya sebep olmaktadır. Az miktarda etilen gazı oksinin etkilerini artırırken, fazlası kallus kültürlerinin büyümesini inhibe edebilmekte, sürgün ve kök oluşumunu engellenmektedir. Altkültürden sonra etilen gazını kültürdeki örneklerin büyümesini ve organogenezi teşvik edebildiği ya da inhibe edebildiği bildirilmiştir [34]. Bu çalışmada altkültürden sonra kallusların büyümesinin durup kahverengileşme durumunun etilen gazı sebebi ile olduğu düşünülebilir. Kalluslar altkültüre alındığında büyük ölçüde etilen gazı sentezlemiş ve bu kallusların büyümesini inhibe etmiş olabileceği düşünülebilir. Etilen gazının kallus üzerindeki etkilerinin önlenmesi için besiyerine etilen gazının oluşumunu engelleyici ya da etkilerini inhibe edici kimyasallar eklenebilir [34].

Absisik asit içeren kültür ortamında inkübe edilen kallus ve bitki örneklerinin diğer örneklere nazaran çok az geliştiği ya da hiç gelişmediği gözlenmemiştir. Absisik asit oksinin etkilerini inhibe ettiği, stomaların kapanmasına sebep olduğu, bazı durumlarda yaprak dökülmesine ve yaşlanmaya sebep olduğu bilinmektedir. Absisik asit bitki doku kültüründe yüksek konsantrasyonlarda kullandığında kallus büyümesini ve organogenezi inhibe ettiği bildirilmiştir [34]. Bu açıklamalar 100 µM absisik asidin kallus ve bitki örneklerinin büyümesini inhibe etmesi sonucunu desteklenmektedir. Sonraki

çalışmalarda daha az konsantrasyondaki absisik asidin *Inula helenium* L. bitkisi ve kallusu üzerindeki etkileri incelenebilir.

Melatonin bitkilerde strese karşı toleransı artıran; büyüme, gelişimi ve sirkadiyen ritmi düzenleyen bir bileşiktir. 100 µM ve 200 µM melatonin konsantrasyonunun kallus rejenarasyonunu kısmen inhibe ettiği bildirilmiştir. Bunun sebebi yüksek konsantrasyonda melatoninin sekonder metabolit üretimini artması olarak gösterilmektedir [53]. Ancak 1 µM melatonin konsantrasyonunun kallus rejenarasyonunu arttığı bildirilmiş olup bunun sebebinin melatoninin oksin gibi davranması gösterilmektedir [54]. Bu açıklamalar iki çalışma arasında bir konsantrasyon olan 35 µM melatonin *Inula helenium* L. kallus rejenerasyonuna ve *in vitro* bitki gelişimine belirgin bir etkisi olmamasını açıklamaktadır. Sonraki çalışmalarda daha az ve daha çok konsantrasyondaki melatoninin *Inula helenium* L. bitkisi ve kallusu üzerindeki etkileri incelenebilir.

Bu çalışmanın sonucunda toplam TFB konsantrasyonu en yüksek çıkan örneğin 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 sa fotoperiyot) ortamında gelişen kalluslar olduğu görülmüştür. Ayrıca 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere edilmiş 35 µM melatonin uygulanmış kalluslarda ve 100 µM absisik asit uygulanmış kalluslarda önemli miktarda TFB konsantrasyonu artışı gözlemlenmiştir. BAP ve NAA kombinasyonunun, güneş ışığının, melatoninin ve absisik asitin fenolik bileşik üretime yol açtığı düşünölmektedir (Tablo 4.11). Cingöz ve Karakaş'ın *Bellis perennis* L. kallusu üzerinde yaptığı araştırmada özellikle ½ MS besin stresi olmak üzere besin stresinin fenolik bileşik sentezini 10 kat arttırdığı bildirilmiştir. Bu artışın sebebinin bitkinin kendisini abiyotik stresten korumak olduğu düşünölmektedir [36]. Cui ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise *Hypericum perforatum* L. bitkinin kök kültürüne (½ ve ¼ MS) besin stresi uygulandığında yine fenolik bileşik ve flavonoid artışı olduğu analiz edilmiştir [37]. *Inula helenium* L. kallusu üzerinde yapılan ½ MS ve ¼ MS besin stresinin ~%33 kadar TFB artışına sebep olduğu belirlenmiştir. Ancak diğer artış gözlemlenen örneklere göre daha fazla olmadığı görülmüştür. Mehrizi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre tuz stresindeki biberiye yapraklarına bakır uygulandığında TFB miktarının arttığı gözlemlenmiştir [41]. *Inula helenium* L. kallus üzerinde yapılan 25 µM Bakır klorür stresi ve 25 µM Bakır Sülfat stresi ise kalluslarda TFB konsantrasyonunun azalmasına sebep olduğu belirlenmiştir. Al Khayri çalışmasında gümüş iyonunun fenolik bileşik üretimi için etkili bir elisitör olduğunu bildirmiştir [44].

Ancak 25 µM gümüş nitrat stresine maruz kalan kalluslarda TFB'nin 1/3 oranına düştüğü gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin 25 µM gümüş nitratin kalluslar için üstesinden gelinemeyecek ağır metal toksisitesine veya serbest radikal üretimine yol açmış olabileceği düşünülebilir. Coşkun ve arkadaşlarının çalışmasında *Rosmarinus officinalis* bitkisinde 100 µM ve 200 µM melatonin uygulanmasının yaprak kalluslarında TFB konsantrasyonunda artışa sebep olduğu gözlenmiştir [53]. Ayrıca Riaz ve arkadaşlarının *Catharanthus roseu* üzerinde yaptığı çalışmada 1 µM melatonin uygulanmasının yaprak kalluslarında TFB konsantrasyonunda artışa sebep olduğu bildirilmiştir [54]. Bu çalışmalar melatonin uygulamasının *Inula helenium* L. kallus örneklerinde toplam fenolik bileşik konsantrasyonu, klorojenik asit ve kuersetin artışını açıklamaktadır. Bu artışın sebebinin melatoninin bitkilerde stres direncini artırması olduğu düşünülmektedir [53]. Bu bulgu Coşkun ve Riaz çalışmalarını desteklemektedir.

Bu çalışmanın neticesinde en yüksek toplam klorojenik asit konsantrasyonu 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere edilmiş, 35 µM melatonin uygulanmış kalluslarda tespit edilmiştir. Ayrıca 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere edilmiş 100 µM absisik asit, 25 µM gümüş nitrat ve 1/4 MS besin stresi uygulanmış kalluslarda da ciddi miktarda klorojenik asit artışı görülmüştür. Stojakowska ve arkadaşları 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında ve 16/8 fotoperiyotta rejenere edilmiş *Inula helenium* L. yaprak kalluslarında yüksek konsantrasyonlarda klorojenik asit ve türevleri olduğunu tespit etmiştir [29]. Cingöz ve Karakaş'ın *Bellis perennis* L. kallusları üzerinde yaptığı araştırmaya göre özellikle 1/2 MS ve 1/4 MS besin stresi klorojenik asit miktarını 2,5 kat arttırmıştır [36]. *Inula helenium* L. kalluslarında ise 1/4 MS besin stresinin klorojenik asit miktarını 2 kat arttırmış olduğu ancak 1/2 MS besin stresinin ise klorojenik asit miktarını 5 kat düşürdüğü gözlemlenmiştir ve bu durum Cingöz ve Karakaş'ın bulgusunu kısmen desteklemektedir. Torres-Contreras ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yaralanmış patates meyvelerinin klorojenik asit sentezlediği gözlenmiştir [42]. Kallusların bitkilerin yaralı yüzeylerini kapatmak için kullandığı organize olmamış hücreler olduğunu düşündüğümüzde [2], bu çalışmadaki kallus kültürlerindeki klorojenik artışının diğer faktörlere ek olarak eksplant elde etmek için bitkinin parçalanması sonucunda kallusların verdiği bir tepki olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda en yüksek kafeik asit konsantrasyonu toprakta yetiştirilen bitkilerde analiz edilmiştir. Bütün *in vitro* örnekler kafeik asit konsantrasyonu bakımında

toprakta yetiştirilen *Inula helenium* L. bitkisinin altında kalmıştır. Ancak MS besin stresinin 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere edilen kalluslardaki kafeik asit konsantrasyonunu arttırdığı görülmüştür. Cingöz ve Karakaş'ın *Bellis perennis* L. kallusu üzerinde yaptığı araştırmaya göre özellik ½ MS ve ¼ MS besin stresi yaklaşık 2,5 kat artmıştır [36]. Ancak *Inula helenium* L. kalluslarında ise ¼ MS besin stresi kafeik asit miktarını sadece %10 artırdığı diğer yandan ½ MS besin stresinin ise kafeik asit miktarını ciddi miktarda düşürdüğü görülmüştür. Açıkgöz ve arkadaşlarının *Echinacea purpurea* L. kalluslarının üzerinde yaptığı çalışmaya göre ışığa maruz kalmış kalluslarda karanlıkta inkübe edilen kalluslara göre kafeik asit türevlerinin konsantrasyonlarında artış görülmüştür [38]. Karanlıkta inkübe edilen *Inula helenium* L. kalluslarında güneş ışığı ile inkübe edilen kalluslarda göre daha fazla kafeik asit konsantrasyonuna rastlanmıştır ancak güneş ışığının sonucunda kafeik asitin türevlerine sentezlenmiş olabileceği düşünülmektedir. Riaz'ın bildirdiğine göre kafeik asit lignin sentezinin prekürsör bileşimidir ve lignin bitki hücrelerinde hücre duvarının güçlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır [45]. Bu nedenle rejenere edilen *in vitro Inula helenium* L. bitkilerinin ve kalluslarının toprakta yetişen bitkilere nazaran daha az büyüme gösterdiği için daha az lignin sentezlediği ve dolayısıyla daha az kafeik asit sentezlediği düşünülebilir.

Bu çalışmanın neticesinde en yüksek rutin konsantrasyonu 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere edilmiş 25 µM gümüş nitrat uygulanmış kalluslarda gözlemlenmiştir. Ayrıca 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere edilmiş 100 µM absisik asit uygulanmış kalluslarda ve 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA ortamında gelişen kalluslarda önemli miktarda rutin artışı görülmüştür. Lee ve arkadaşlarının *Morus alba* L. kallusları üzerinde yaptığı çalışmada sitokininin rutin sentezini inhibe ettiği tespit edilmiştir [39]. Ancak Han ve arkadaşlarının *Morus bombycis* bitkisi kallusları üzerinde yaptığı çalışmada 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l KN içeren ortamda rejenere edilen kalluslarda yani az miktar sitokinin içeren ortamdaki kalluslarda en fazla rutin görülmüştür [40]. *Inula helenium* L. kalluslarında ise sitokinin içermeyen ya da düşük konsantrasyonda sitokinin içeren kültür ortamlarındaki kallusların yüksek konsantrasyonda sitokinin içeren kültür ortamlarındaki kalluslara göre daha çok miktar rutin içerdiği saptanmıştır, dolayısı ile Lee'ın ve Han'ın çalışmalarının sonucu desteklenmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda en yüksek kuersetin konsantrasyonu 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) BBD'li besin ortamında rejenere edilmiş 35 µM melatonin uygulanmış kalluslarda belirlenmiştir. Ayrıca 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) içeren besin ortamında rejenere edilmiş ve stres uygulanmamış kalluslarda; 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 sa fotoperiyot) ortamında gelişen kalluslarda ve 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA ortamında gelişen kalluslarda yani hem oksin hem de sitokinin içeren kültür ortamında büyüyen kalluslarda önemli miktarda kuersetin artışı analiz edilmiştir. Riaz ve arkadaşlarının *Catharanthus roseu* üzerinde yaptığı çalışmada melatonin uygulanmasının yaprak kalluslarında kuersetin ve toplam flavonoid konsantrasyonun artışa sebep olduğu bildirilmiştir [54]. Bu artışa melatoninin bitkilerde stres toleransının artırması olduğu düşünülmektedir [53]. 35 µM melatonin uygulanmış *Inula helenium* L. kallusların en yüksek kuersetin konsantrasyonuna sahip olması Riaz'ın çalışmasını desteklemektedir.

Stres uygulanan *in vitro* bitki örneklerinde kuersetin konsantrasyonu hariç neredeyse bütün değerler toprakta yetişen bitki örneğinde düşük çıktığı gözlemlenmiştir. Kayda değer tek örneğin rutin ve büyük miktar kuersetin artışı gözlemlenen ¼ MS Besin stresine maruz bırakılan bitki örnekleridir. Asif ve arkadaşlarının buğday filizlerinde yaptığı çalışmada tuz ve bakır sülfat stresleri filizlerinin büyümesini ve gelişmesini olumsuz yönde etkilediği gözlemlenmiştir [43]. Strese maruz kalan *Inula helenium* L. bitkilerinde stresten dolayı gelişemediği dolayısı ile sekonder metabolit sentezleyemediği düşünülmektedir.

Bu çalışma ile 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 fotoperiyot) kombinasyonunun, 100 µM absisik asit ve 35 µM melatonin uygulanmalarının toplam fenolik bileşik konsantrasyonunu; ¼ MS besin stresi, 25 µM gümüş nitrat stresi, 100 µM absisik asit ve 35 µM melatonin uygulanmalarının klorojenik asit konsantrasyonunu; 0,5 mg/L BAP + 2 mg/L NAA kombinasyonunun, 25 µM gümüş nitrat stresi ve 100 µM absisik asit uygulamalarının rutin konsantrasyonunu; 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA (16/8 fotoperiyot) ve 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN (karanlık) kombinasyonlarının, 25 µM gümüş nitrat stresi, ve 35 µM melatonin uygulanmalarının kuersetin konsantrasyonunu *Inula helenium* L. kallus dokularında arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca ¼ MS besin stresi uygulamasının *in vitro* bitkilerde kuersetin konsantrasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak *Inula helenium* L. bitkisi farklı streslere farklı sekonder metabolit cevabı vermektedir. Stres sonucunda bitkilerde reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller oluşmaktadır. Bitkiler tehditlere karşı sekonder metabolitler sentezlenmektedir [45].

Literatürlerde belirtildiği üzere her bitki türü bu tehditlere karşı farklı cevaplar geliştirmiştir. Hatta aynı türdeki bitkilerde bile farklı sonuçlar gözlemlenmektedir. Bu çalışmada çıkan sonuçlar bu deney sırasında kullanılan *Inula helenium* L. tohumlarının genotipine, kimyasalların farklılıklarına, hatta mekâna ve zamana bağlanabilir.

Bu çalışmada *Inula helenium* L. bitkisinin farklı BBD'ler kullanılarak kallus hücreleri üretilmiştir ayrıca kallusların ve bitkilerin besin, metal, absisik asit ve melatonin gibi çeşitli uygulamalara ne tür cevaplar verdiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile *Inula helenium* L. bitkisinin *in vitro* şartlarda stres ve elisitör uygulamaları ile kallus ve *in vitro* ortamda rejenere edilen bitki örneklerinde sekonder metabolit miktarının artırabileceği tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar *Inula helenium* L. bitkisinin içerisindeki sekonder metabolitlerin kontrollü biyoreaktör ortamında kitlesel olarak üretimine; eczaya ve endüstriye katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

- [1] Seca, A. M. L., Grigore, A., Pinto, D. C. G. A., ve Silva, A. M. S. (2014). The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(2), 286-310. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.010>
- [2] Kocaçalışkan, İ. (2017). *Doku ve Hücre Kültürü Teknikleri (Birinci Baskı)*. Nobel.
- [3] Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, 17(8), 759-767. <https://doi.org/10.1007/s12045-012-0086-8>
- [4] Loyola-Vargas, V. M., ve Vázquez-Flota, F. (Ed.). (2006). *Plant cell culture protocols (2nd ed)*. Humana Press.
- [5] Mineo, L. (1990). Plant Tissue Culture Techniques. In *Tested Studies for Laboratory Teaching, Proceedings of the Eleventh Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, 11, 151-174.
- [6] Kyte, L., Kleyn, J., Scoggins, H., ve Bridgen, M. (2013). *Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation (Fourth Edition)*. Timber Press.
- [7] Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., ve Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In A. Leva (Ed.), *Recent Advances in Plant *In vitro* Culture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50568>
- [8] Mammadov, R. (2014). *Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler (İlk Basım)*. Nobel.
- [9] Alaca, F., ve Arslan, N. (2012). Sekonder Metabolitlerin Bitkiler Açısından Önemi. *Ziraat Mühendisliği*, 358, 48-55.
- [10] A. Hussein, R., ve A. El-Anssary, A. (2019). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. İçinde P. F. Builders (Ed.), *Herbal Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>

- [11] Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., ve XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- [12] Ancy, P., Padmaja, V., Rajkumar, R., Shiji Kumar, P. S., ve Nithin Manohar, R. (2020). Anticonvulsant and Antianxiety Effects of Quercetin and Rutin. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Science*, 9(9), 2410-2418. <https://doi.org/10.20959/wjpps20209-17218>
- [13] Habtemariam, S., ve Varghese, G. (2015). Extractability of Rutin in Herbal Tea Preparations of *Moringa stenopetala* Leaves. *Beverages*, 1(3), 169-182. <https://doi.org/10.3390/beverages1030169>
- [14] Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., ve Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science ve Technology*, 67, 220-235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.008>
- [15] Humphreys, F. R. (1964). The occurrence and industrial production of Rutin in Southeastern Australia. *Economic Botany*, 18(3), 195-253. <https://doi.org/10.1007/BF02908118>
- [16] Miles, S. L., McFarland, M., ve Niles, R. M. (2014). Molecular and physiological actions of quercetin: Need for clinical trials to assess its benefits in human disease. *Nutrition Reviews*, 72(11), 720-734. <https://doi.org/10.1111/nure.12152>
- [17] Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-Ernst, K. I., ve Lampen, A. (2018). Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Molecular Nutrition ve Food Research*, 62(1), 1700447. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700447>
- [18] Dabeek, W. M., ve Marra, M. V. (2019). Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. *Nutrients*, 11(10), 2288. <https://doi.org/10.3390/nu11102288>
- [19] Graefe, E. U., Derendorf, H., ve Velt, M. (1999). Pharmacokinetics and bioavaibility of the flavonol quercetin in humans. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 37(5), 219-233.
- [20] Güven, A., ve Gürsul, I. (2014). Secondary Metabolite Synthesis in Plant Tissue Cultures. *Gida /The Journal of Food*, 1-8. <https://doi.org/10.15237/gida.GD13060>

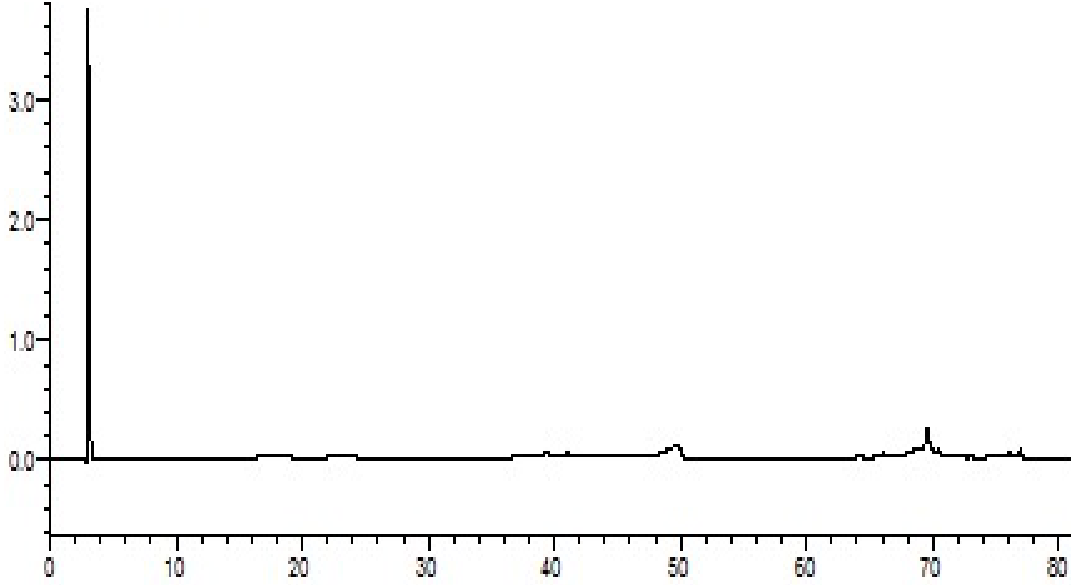
- [21] Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., ve Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- [22] Aytas Akcin, T., ve Akcin, A. (2017). Anatomy and Micromorphology of *Inula helenium* subsp. *Orgyalis* and *I. ensifolia* (Asteraceae) from Turkey. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(1), 104-109. <https://doi.org/10.15835/nsb919950>
- [23] Alpınar, K., Küçük, İ., ve Çekin, M. (2015). Zeytinburnu tıbbi bitkiler bahçesi (1. baskı). Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi : Zeytinburnu Belediyesi.
- [24] Çınar, A. E., ve Albayrak, S. (2012). Türkiye’de Yetişen *Inula helenium* L. (Asteraceae) Taksonlarının Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi.
- [25] Grieve, M. (1971). Elecampane. İçinde A Modern Herbal (s. 1056). Dover Publications. <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/e/elecam07.html>
- [26] Ghedira, K., Goetz, P., ve Le Jeune, R. (2011). *Inula helenium* L. (Asteraceae): Aunée. *Phytothérapie*, 9(3), 176-179. <https://doi.org/10.1007/s10298-011-0631-8>
- [27] Toby, G., Denham, A., ve Whitelegg, M. (2011). *Inula helenium*, elecampane. İçinde *Medical Herbs* (ss. 201-210). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10344-5.00025-2>
- [28] Stojakowska, A., Malarz, J., ve Kisiel, W. (2004). Thymol Derivatives from a Root Culture of *Inula helenium*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 59(7-8), 606-608. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-827>
- [29] Stojakowska, A., Malarz, J., ve Kiss, A. K. (2016). Hydroxycinnamates from elecampane (*Inula helenium* L.) callus culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(2), 41. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2069-y>
- [30] Gomes, T., Caponio, F., Alloggio, V. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64, 203-209.
- [31] Dalar, A., Konczak, I., 2013. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Industrial Crops and Products*, 44, 383–390.
- [32] Dezfuli, P. M., Sharif-zadeh, F., ve Janmohammadi, M. (2008). Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines. *ARNP Journal of Agricultural and Biological Science*, 3(3), 4.

- [33] Bunn, E., ve Tan, B. (2004). Microbial Contaminants in Plant Tissue Culture Propagation. İçinde K. Sivasithamparama, K. W. Dixon, ve R. L. Barrett (Ed.), *Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity* (ss. 307-335). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9_12
- [34] Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., ve Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular ve Developmental Biology - Plant*, 32(4), 272-289. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- [35] Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., ve Vasil, I. K. (1976). Plant Tissue Culture Media. *Society for In vitro Biology*, 7.
- [36] Cingöz, G., ve Karakaş, F. P. (2016). The effects of nutrient and macronutrient stress on certain secondary metabolite accumulations and redox regulation in callus cultures of *Bellis perennis* L. *Turkish Journal of Biology*, 8. <https://doi.org/10.3906/biy-1603-737>
- [37] Cui XH, Charkrabarty D, Lee EJ, Paek KY (2010). Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Biores Technol* 101: 4708-4716.
- [38] Açıkgöz, M. A., Kara, Ş. M., Bati Ay, E., ve Odabaş, S. (2018). Effect of light on biosynthesis of alkamide, caffeic acid derivatives and echinacoside in *Echinacea purpurea* L. callus cultures. *Akademik Ziraat Dergisi*, 179-184. <https://doi.org/10.29278/azd.476349>
- [39] Lee, Y., Lee, D.-E., Lee, H.-S., Kim, S.-K., Lee, W. S., Kim, S.-H., ve Kim, M.-W. (2011). Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(1), 9-19. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9832-3>
- [40] Han, K.-L., Lee, Y., Song, J.-H., Hwang, Y.-S., Lee, W. S., Kim, M.-W., ve Kim, S.-H. (2012). Enhanced production and secretion of rutin and GABA in immobilized cells of mulberry tree (*Morus bombycis* K.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108(3), 513-520. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0028-2>
- [41] Mehrizi, M. H., Shariatmadari, H., Khoshgoftarmanesh, A. H., & Dehghani, F. (2012). Copper Effects on Growth, Lipid Peroxidation, and Total Phenolic Content of Rosemary Leaves under Salinity Stress. *14(1)*, 205-212.

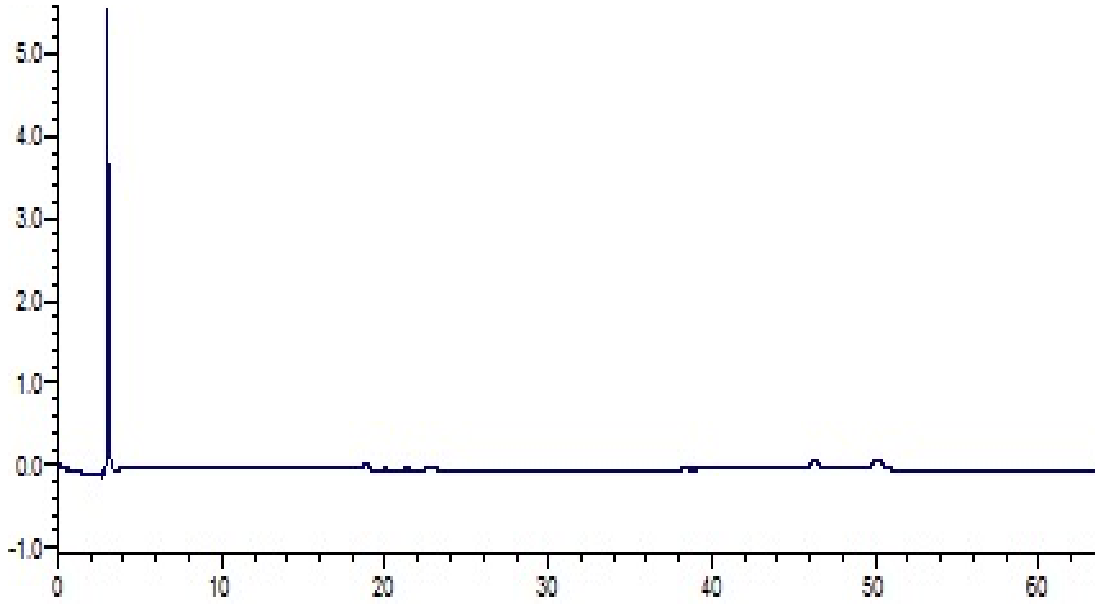
- [42] Torres-Contreras, A. M., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., ve Jacobo-Velázquez, D. A. (2014). Plants as biofactories: Stress-induced production of chlorogenic acid isomers in potato tubers as affected by wounding intensity and storage time. *Industrial Crops and Products*, 62, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.018>
- [43] Asif, S., Ali, Q., ve Malik, A. (2020). Evaluation of salt and heavy metal stress for seedling traits in wheat. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2020(1). <https://doi.org/10.54112/bcsrj.v2020i1.5>
- [44] M. Al Khayri, J., ve M. Naik, P. (2016). Impact of Abiotic Elicitors on *In vitro* Production of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 1(2), 1-7. <https://doi.org/10.15226/2475-4714/1/2/00102>
- [45] Riaz, U., Kharal, M. A., Murtaza, G., Zaman, Q. uz, Javaid, S., Malik, H. A., Aziz, H., ve Abbas, Z. (2018). Prospective Roles and Mechanisms of Caffeic Acid in Counter Plant Stress: A Mini Review. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 32(1), 8-17. <https://doi.org/10.17582/journal.pjar/2019/32.1.8.19>
- [46] Chakraborty, N., Sarkar, A., & Acharya, K. (2019). Elicitor-mediated Amelioration of Abiotic Stress in Plants. İçinde A. Roychoudhury & D. Tripathi (Ed.), *Molecular Plant Abiotic Stress* (1. bs, ss. 105-122). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119463665.ch6>
- [47] Kapoor, S. (2018). *Inula racemosa*: An Insight into Callus Induction, Secondary Metabolites and its Therapeutic Potential. *The Pharma Innovation Journal*, 7(6), 27-32.
- [48] Bucchini, A., Giamperi, L., & Ricci, D. (2013). Total Polyphenol Content, *in vitro* Antifungal and Antioxidant Activities of Callus Cultures from *Inula crithmoides*. *Natural Product Communications*, 8(11), 1587-1590. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300801122>
- [49] Amin, S., Kaloo, Z. A., & Singh, S. (2015). *In vitro* propagation strategies for ex-situ conservation of *Inula royleana* DC., a threatened medicinal plant of Kashmir Himalaya. *Discovery Biotechnology*, 6(16), 16-29.
- [50] Amin, S., Kaloo, Z. A., & Singh, S. (2014). Rapid *in vitro* propagation of *Inula royleana* DC. through embryo culture. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3(2), 203-206. <https://doi.org/2320-4818>

- [51] Trejgell, A., Kamińska, M., Lisowska, K., & Tretyn, A. (2018). Micropropagation of *Inula germanica* L. from the Seedlings Explants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 52-57. <https://doi.org/10.15835/nbha46110810>
- [52] Kaur, R., Kashyap, A., Majeed, S., Chauhan, N. S., & Bhardwaj, S. B. (2010). *In vitro* Propagation and Conservation of *Inula racemosa* Hook. f. an Endangered Medicinal Plant of Temperate Origin. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 1(1), 67-70.
- [53] Coskun, Y., Duran, R. E., & Kilic, S. (2019). Striking effects of melatonin on secondary metabolites produced by callus culture of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(1), 89-95. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01605-7>
- [54] Riaz, H. R., Hashmi, S. S., Khan, T., Hano, C., Giglioli-Guivarc'h, N., & Abbasi, B. H. (2018). Melatonin-stimulated biosynthesis of anti-microbial ZnONPs by enhancing bio-reductive prospective in callus cultures of *Catharanthus roseus* var. Alba. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(2), 936-950. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1473413>

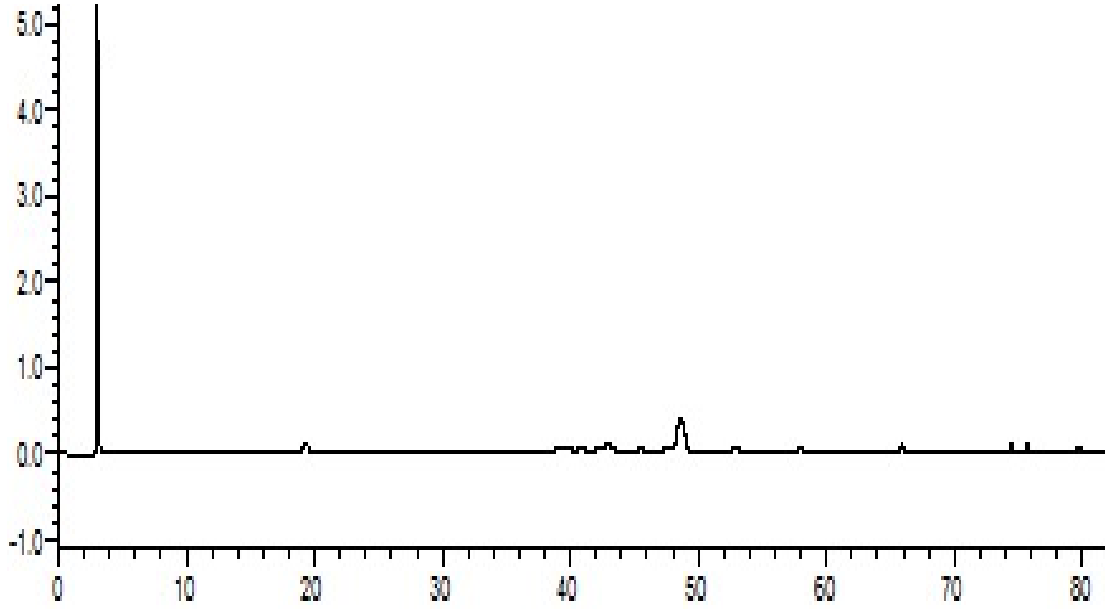
KROMATOGRAM SONUÇLARI



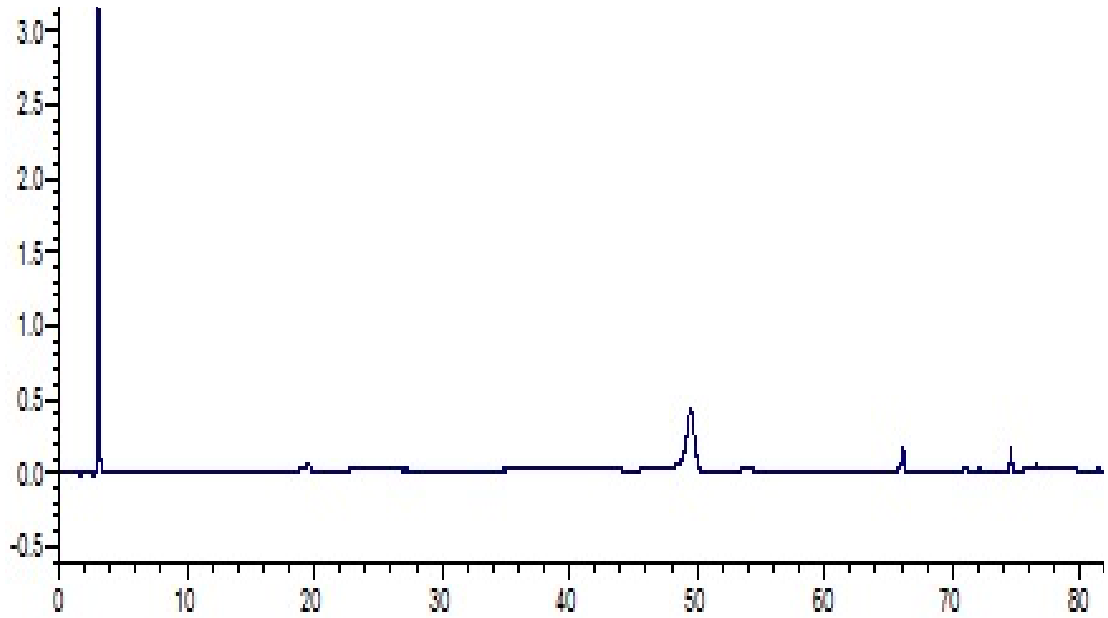
Şekil 6.1 Toprakta çimlendirilen *Inula helenium* L. bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



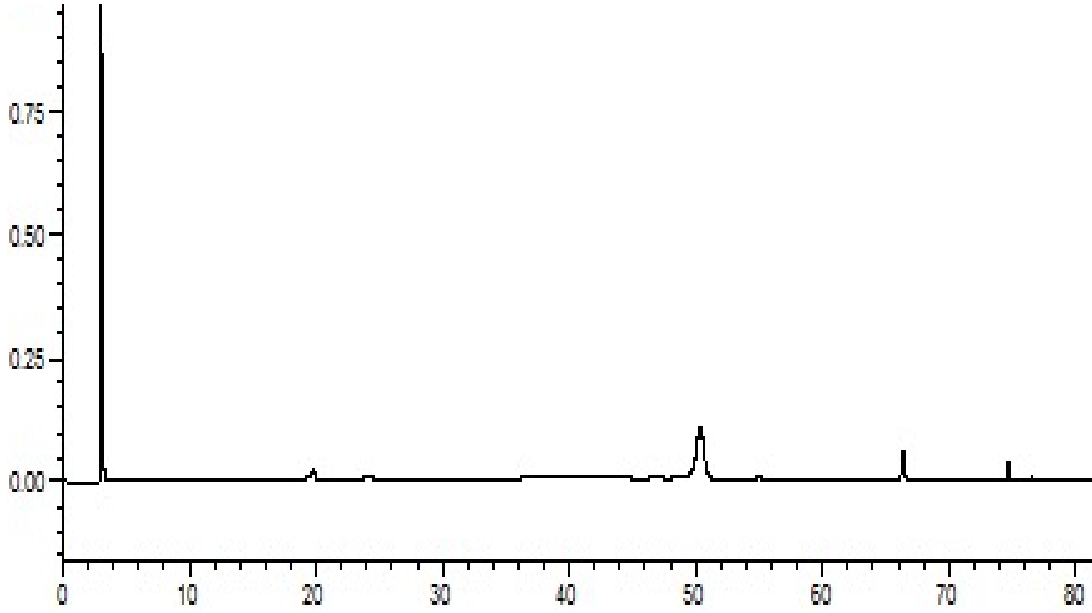
Şekil 6.2 *In vitro* ortamda çimlendirilen *Inula helenium* L. bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



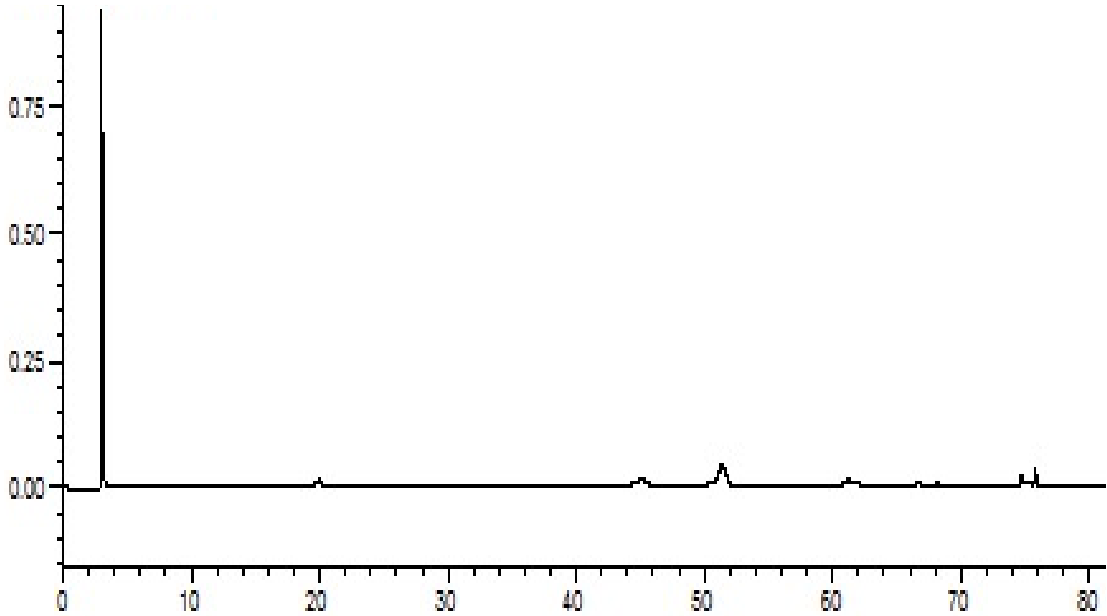
Şekil 6.3 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta *Inula helenium* L. bitkinin gövde eksplantıyla organogenez yolu ile rejenere edilen bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



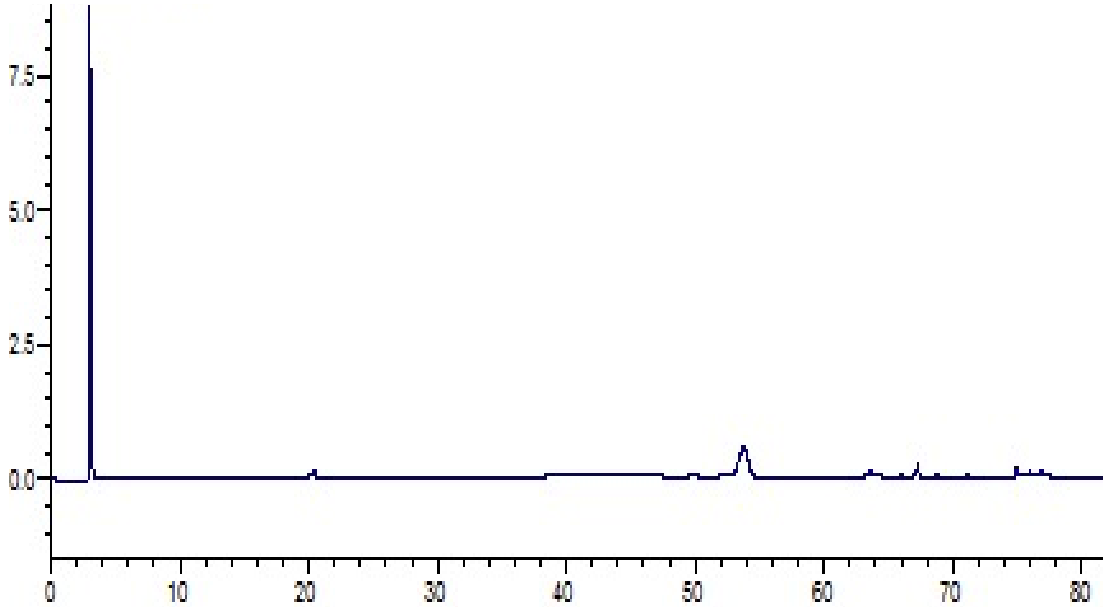
Şekil 6.4 *In vitro* ve karanlık ortamda 2 mg/L 2,4-D içeren besin ortamında rejenere edilen *Inula helenium* L. kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



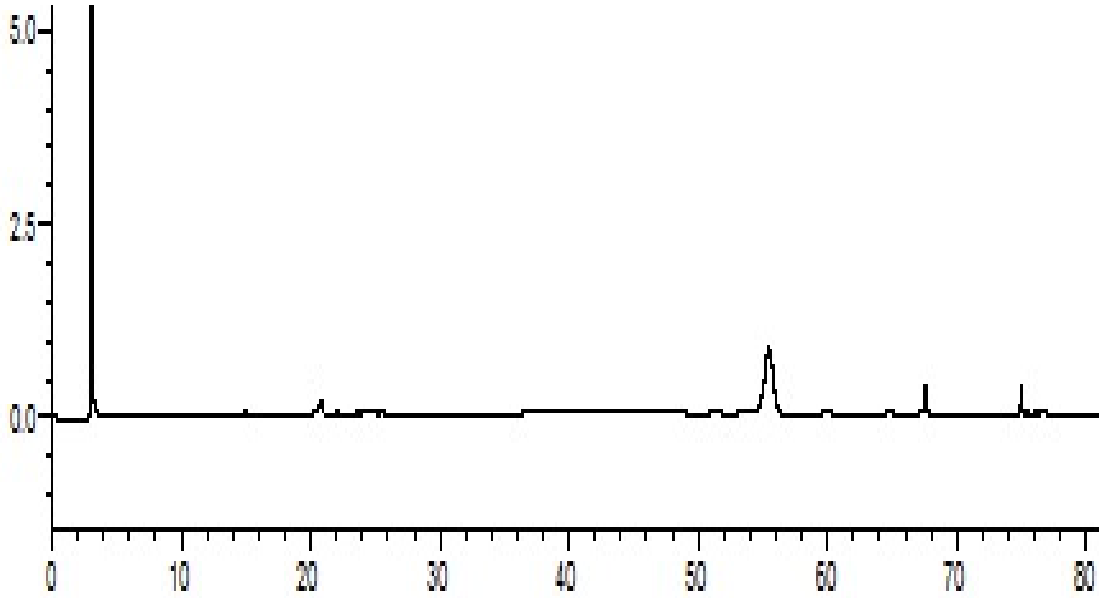
Şekil 6.5 *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında rejenere edilen *Inula helenium* L. kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



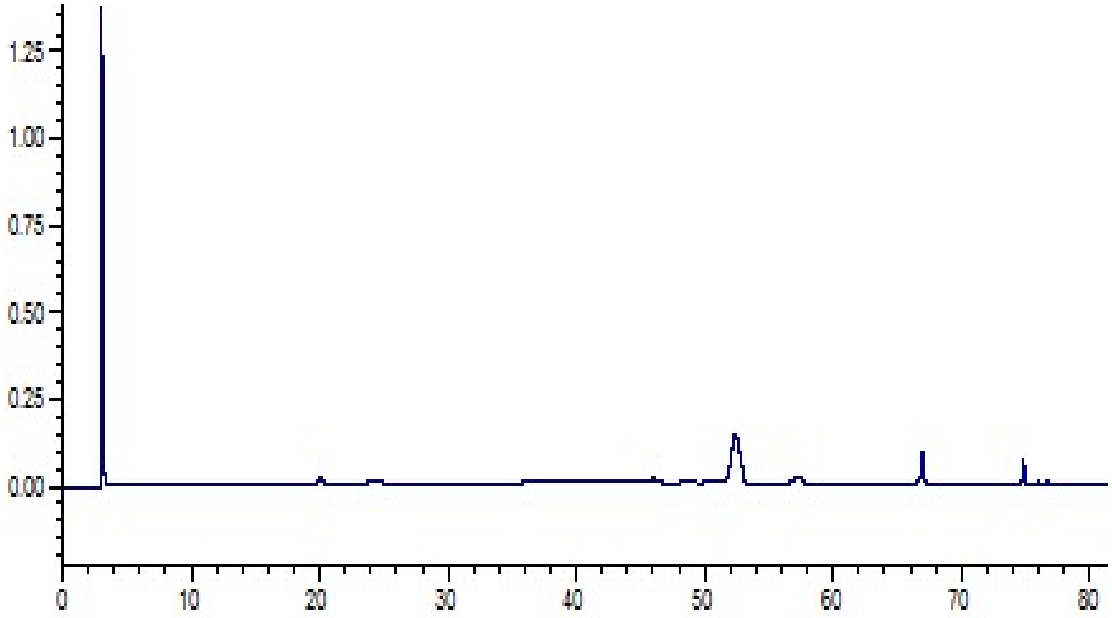
Şekil 6.6 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA içeren besin ortamında rejenere edilen *Inula helenium* L. kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



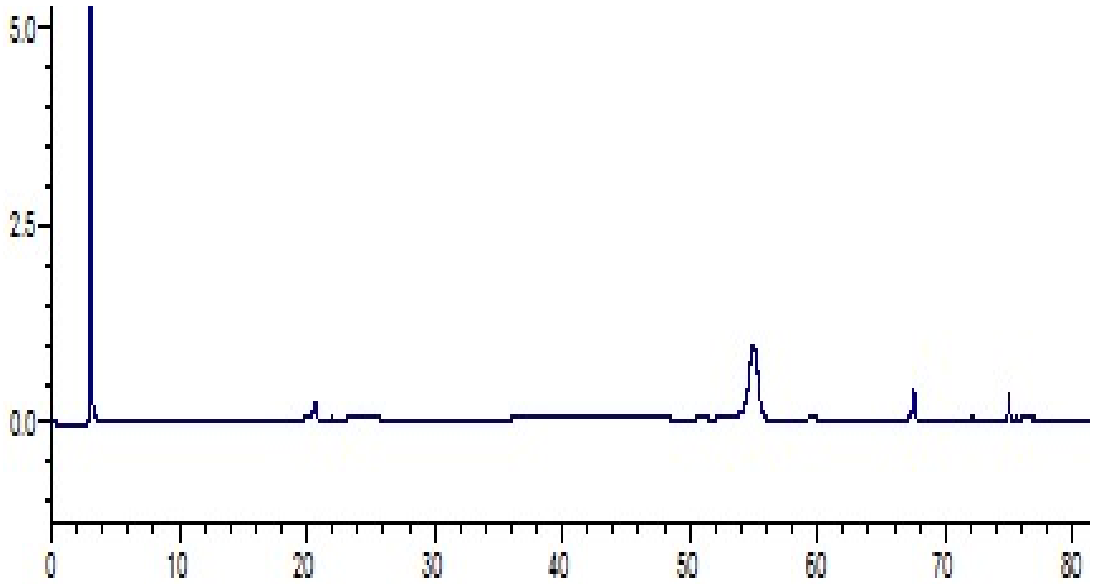
Şekil 6.7 *In vitro* ortamda 0,5 mg/L BAP + 1 mg/L NAA içeren besin ortamında rejenere edilen *Inula helenium* L. kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



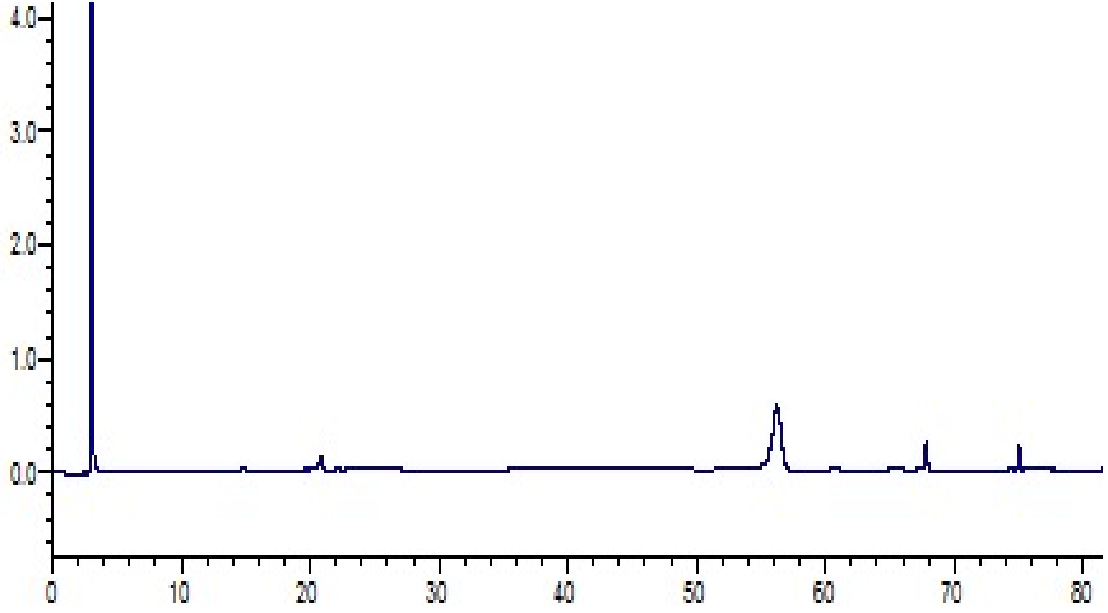
Şekil 6.8 *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 1/2 MS besin stresi uygulanmış *Inula helenium* L. kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



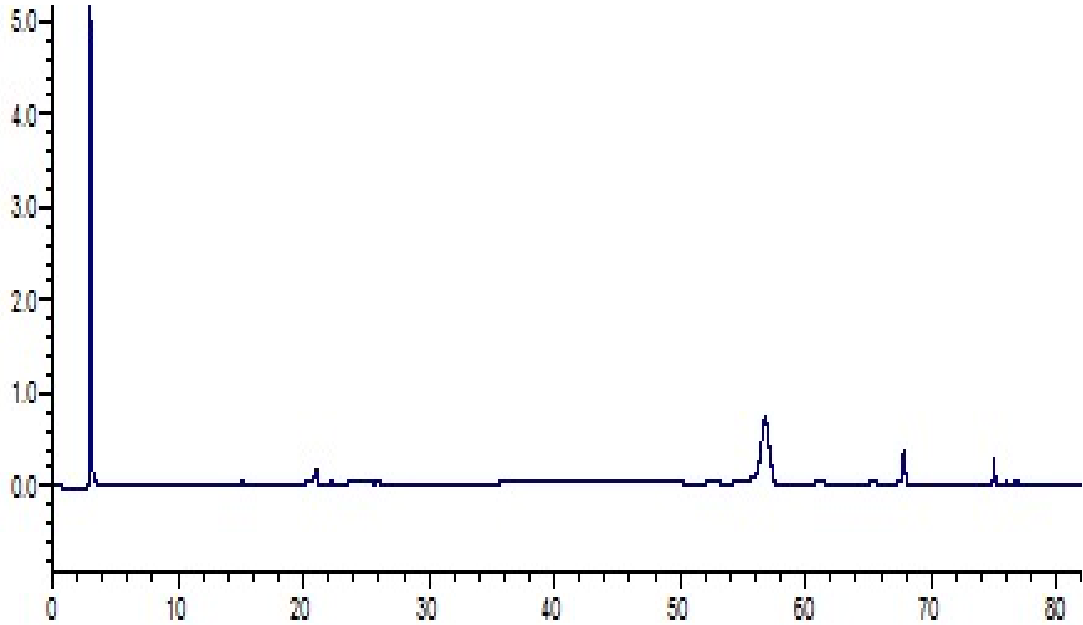
Şekil 6.9 *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 1/4 MS besin stresi uygulanmış *Inula helenium* L. kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



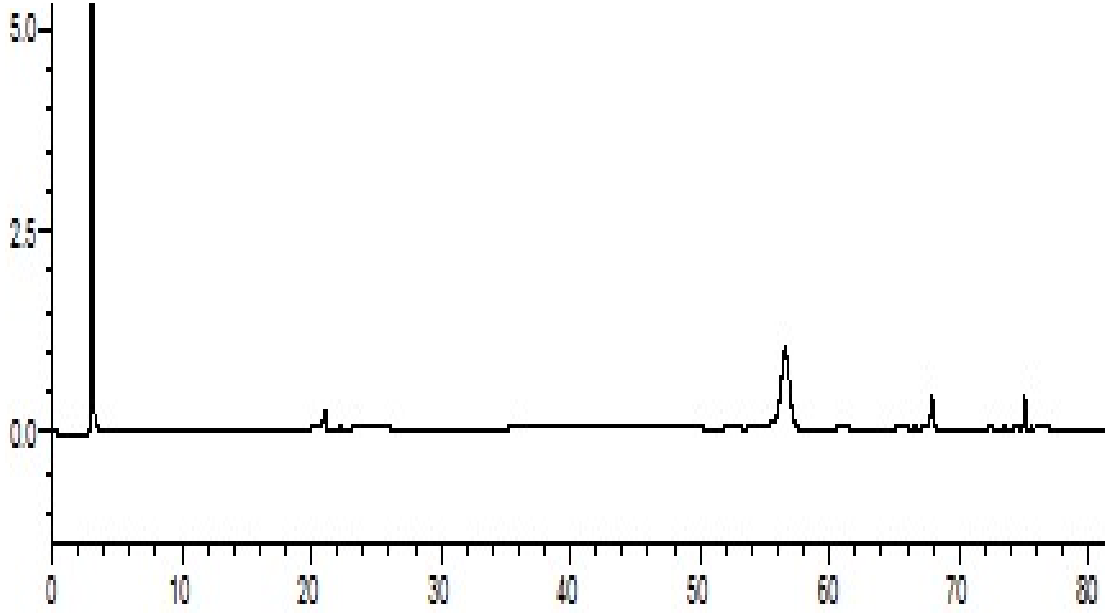
Şekil 6.10 *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 25 µM gümüş nitrat stresi uygulanmış *Inula helenium* L. kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



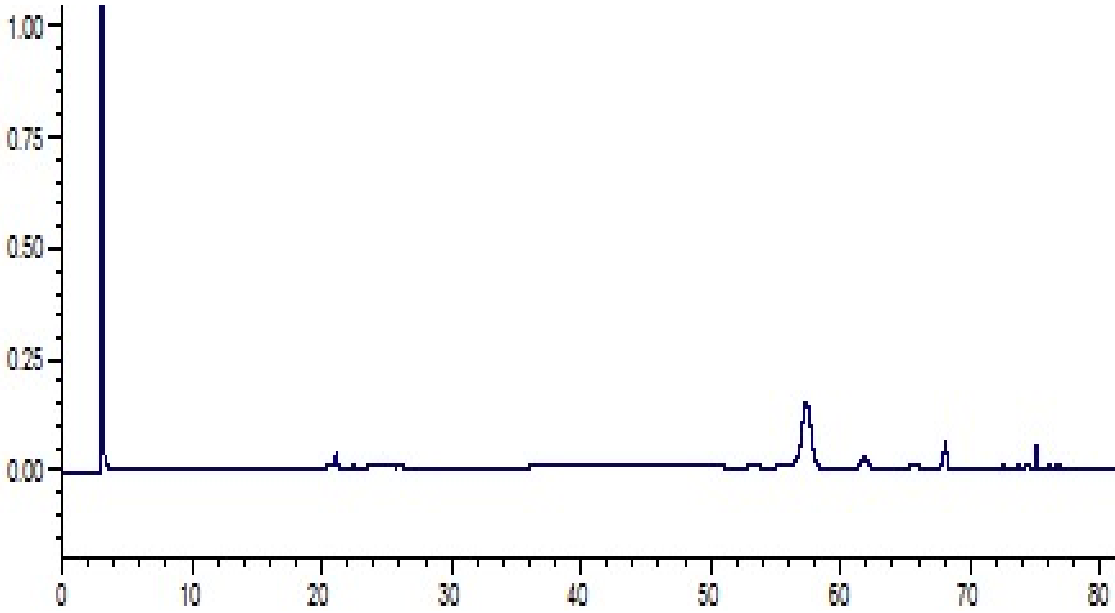
Şekil 6.11 *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren MS besin ortamında 25 µM bakır sülfat stresi uygulanmış *Inula helenium* L. örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



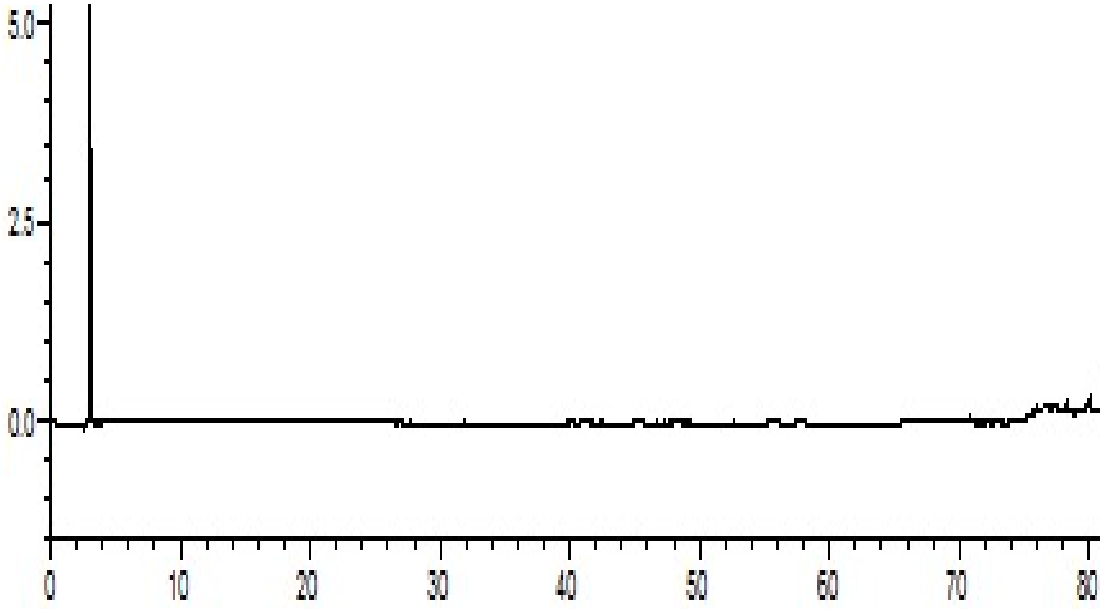
Şekil 6.12 *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 25 µM bakır klorür stresi uygulanmış *Inula helenium* L. kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



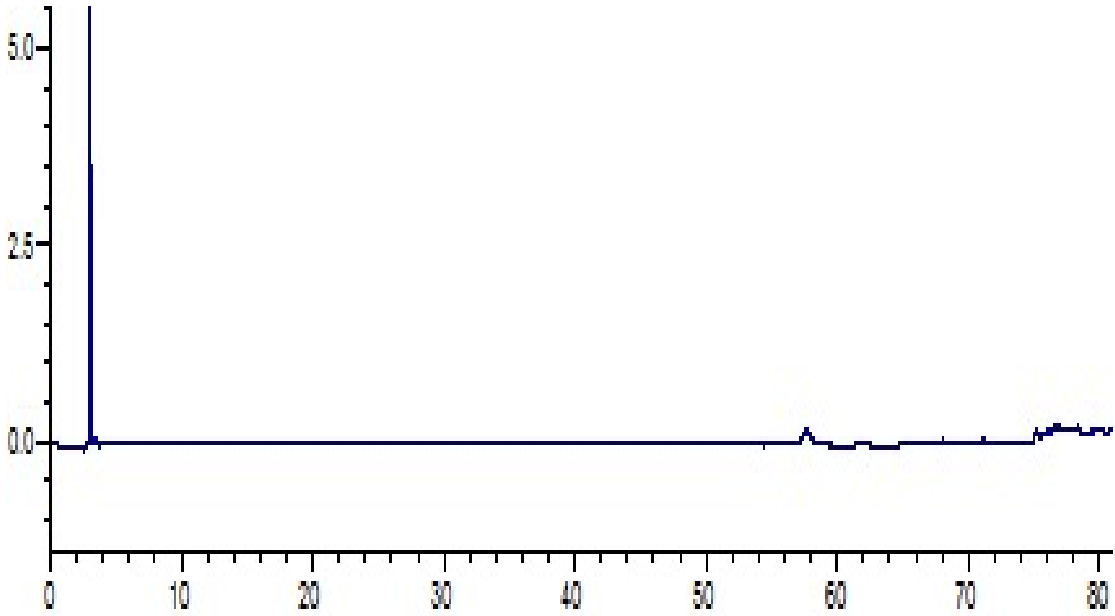
Şekil 6.13 *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 100 µM absisik asit uygulanmış *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



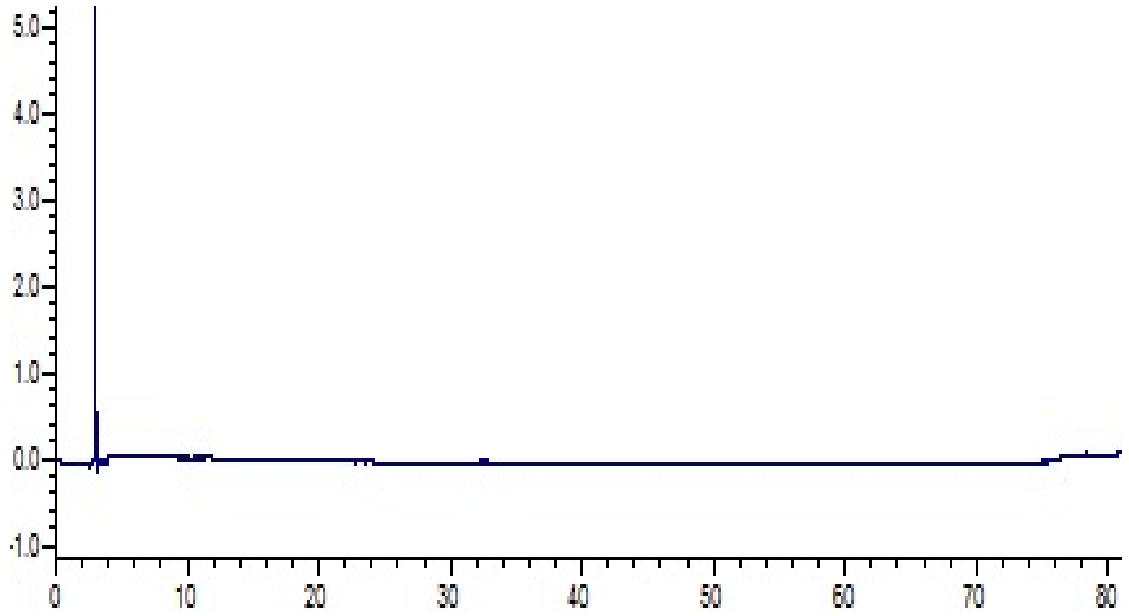
Şekil 6.14 *In vitro* ve karanlık ortamda 1 mg/L 2,4-D + 0,3 mg/L KN içeren besin ortamında 35 µM melatonin uygulanmış *Inula helenium L.* kallus örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



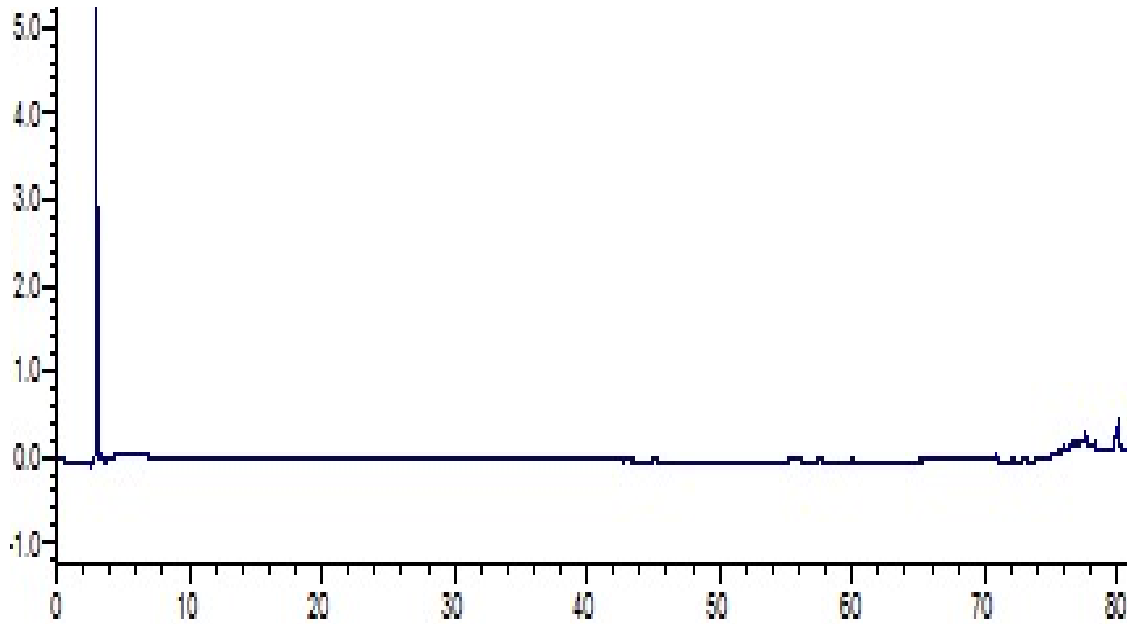
Şekil 6.15 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 1/2 MS besin stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



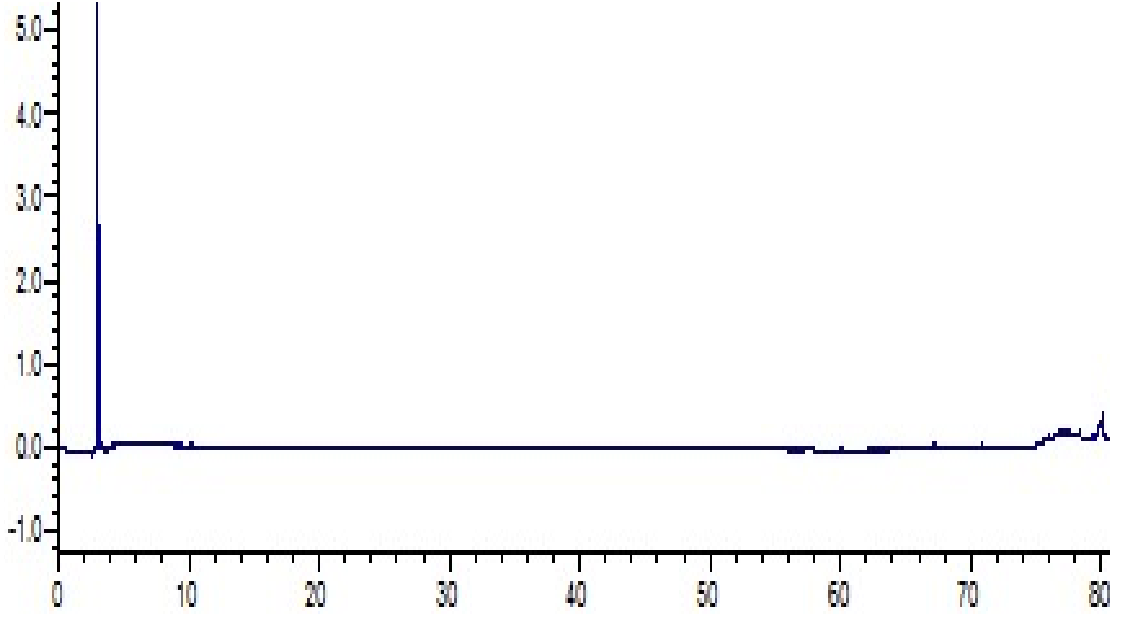
Şekil 6.16 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 1/4 MS besin stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



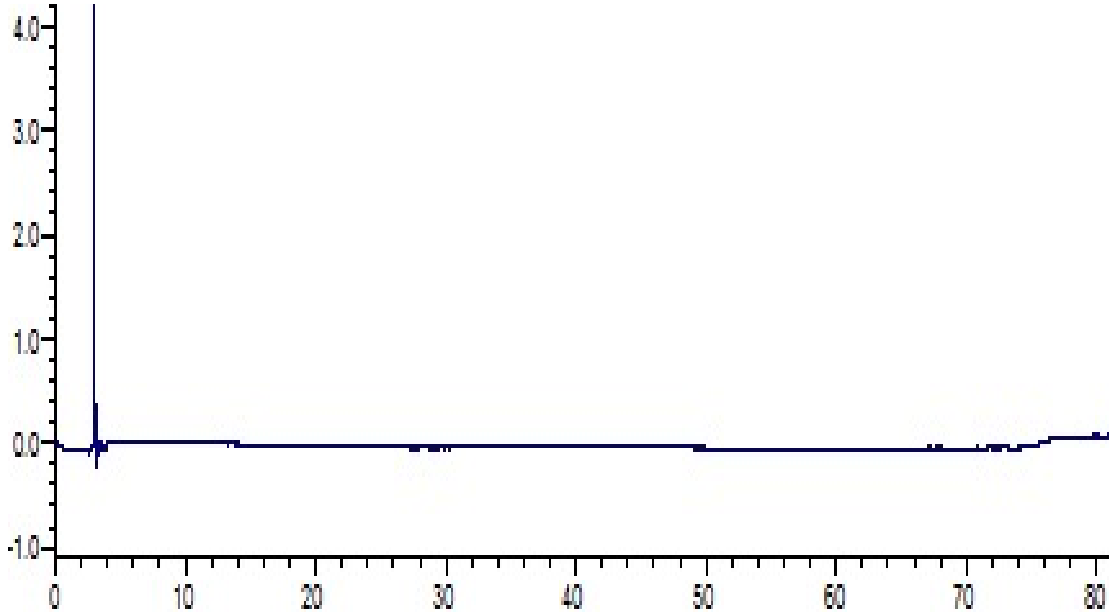
Şekil 6.17 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 25 μ M gümüş nitrat stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



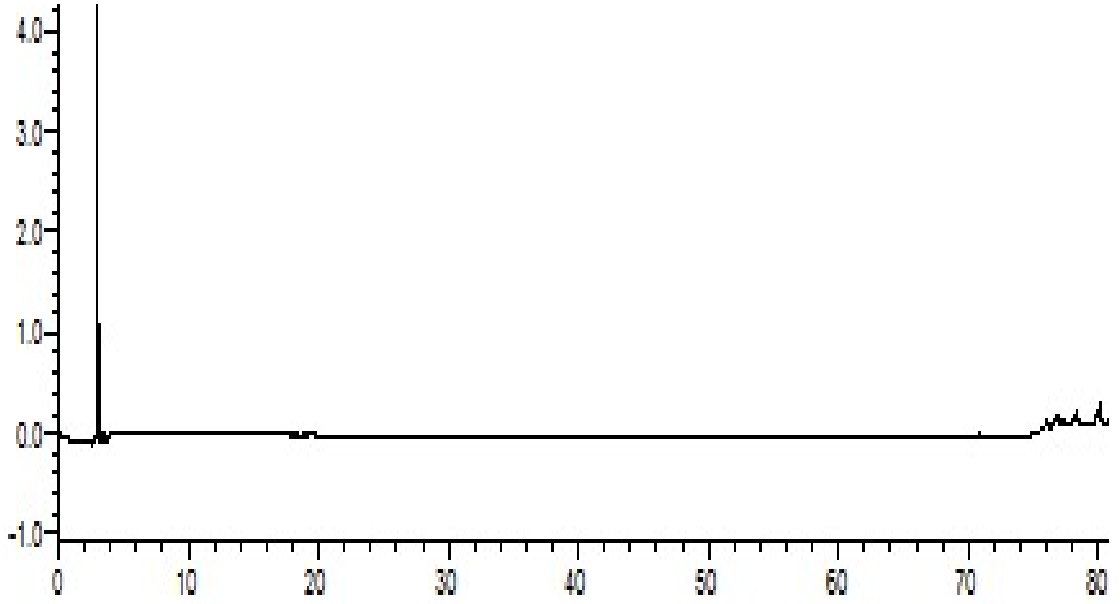
Şekil 6.18 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 25 μ M bakır sülfat stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



Şekil 6.19 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 25 μ M bakır klorür stresi uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



Şekil 6.20 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 100 μ M absisik asit uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu



Şekil 6.21 *In vitro* ortamda 16/8 fotoperiyotta BBD'siz besin ortamında 35 μ M melatonin uygulanmış *Inula helenium L.* bitki örneklerinde HPLC analizi ile elde edilmiş metabolitlerin miktarını gösteren kromatogram sonucu

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Akçura G., Türker M.,” *In vitro* Koşullarda Rejenere Edilen *Inula helenium* L. Bitkisi ve Kallus Hücre Serilerinde Stresörlerin Biyoaktif Madde Miktarı Üzerine Etkileri”, *1st International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences*, Kasım 2021.

