

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

**DOKTORA TEZİ**

**BAZI ABİYOTİK ELİSİTÖRLERİN NAR (*Punica granatum* L.) KALLUS  
KÜLTÜRÜNDE FENOLİK BİYOSENTEZİ ve ANTİOKSİDAN KAPASİTE  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Aslı Neslihan ÖZDEN**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA**

**2018**

Prof.Dr. Bekir Erol AK danışmanlığında Aslı Neslihan ÖZDEN'in hazırladığı **“Bazı Abiyotik Elisitörlerin Nar (*Punica granatum* L.) Kallus Kültüründe Fenolik Biyosentezi ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkilerinin Araştırılması”** konulu bu çalışma 17/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof.Dr. Bekir Erol AK

Üye : Prof.Dr. İbrahim BOLAT

Üye : Prof.Dr. Hasan AKAN

Üye : Prof.Dr. Ebru KAFKAS

Üye : Prof.Dr. Engin TİLKAT

**Bu Tezin Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.**

**Prof.Dr. Halil Murat ALĞIN**  
**Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                                                                                | i   |
| ABSTRACT .....                                                                                            | ii  |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                            | iii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                      | iv  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                   | vi  |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                      | vii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                            | 1   |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....                                                                                 | 6   |
| 2.1. Narın Antioksidan İçeriği İle İlgili Çalışmalar .....                                                | 6   |
| 2.2. <i>in vitro</i> Ortamda Sekonder Metabolitlerin Eldesi İle İlgili Çalışmalar .....                   | 9   |
| 2.2.1. <i>in vitro</i> ortamda sekonder metabolit üretiminde elisitör kullanımı ile ilgili çalışmalar ... | 10  |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                                                | 14  |
| 3.1. Bitkisel Materyal.....                                                                               | 14  |
| 3.2. Yöntem.....                                                                                          | 16  |
| 3.2.1. Bitkisel materyallerin temini .....                                                                | 16  |
| 3.2.2. Pomolojik ölçümler .....                                                                           | 17  |
| 3.2.3. Bitkisel materyallerin analizlere hazırlanması .....                                               | 17  |
| 3.2.3.1. Dane örneklerinin ekstraksiyonu .....                                                            | 17  |
| 3.2.3.2. Kabuk örneklerinin ekstraksiyonu .....                                                           | 18  |
| 3.2.3.3. Çekirdek örneklerinin ekstraksiyonu .....                                                        | 18  |
| 3.2.4. Suda çözünabilir kuru madde tayini (SÇKM).....                                                     | 19  |
| 3.2.5. pH ve titrasyon asitliği tayini.....                                                               | 19  |
| 3.2.6. Hue değerlerinin belirlenmesi .....                                                                | 19  |
| 3.3. Kallus Kültürü.....                                                                                  | 20  |
| 3.3.1. Kültür ortamının hazırlanması .....                                                                | 20  |
| 3.3.2. Yaprak ayası eksplantlarının yüzey sterilizasyonu ve kültüre alınması .....                        | 21  |
| 3.3.3. Kallus çoğaltımı .....                                                                             | 22  |
| 3.4. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Uygulamalar .....                                     | 24  |
| 3.4.1. Ağır metal uygulamaları .....                                                                      | 24  |
| 3.4.2. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşiklerin uygulanmaları .....                             | 25  |
| 3.4.3. Dokularda osmotik strese neden olan kimyasalların uygulanmaları .....                              | 26  |
| 3.5. Kallus Büyüme İndekslerinin Belirlenmesi .....                                                       | 26  |
| 3.6. Kallus Örneklerinin Ekstraksiyonu .....                                                              | 26  |
| 3.7. Çalışmada Yapılan Analizler .....                                                                    | 27  |
| 3.7.1. Toplam antosiyaninlerin belirlenmesi.....                                                          | 27  |
| 3.7.2. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi .....                                                     | 27  |
| 3.7.3. Toplam flavonoidlerin belirlenmesi.....                                                            | 28  |
| 3.7.4. DPPH serbest radikalının süpürülmesi .....                                                         | 29  |
| 3.7.5. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                | 29  |
| 3.7.5.1. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                     | 29  |
| 3.7.5.2. FRAP metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                              | 30  |
| 3.7.6. İstatistiksel Analiz .....                                                                         | 31  |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....                                                                  | 32  |
| 4.1. Meyvelerden Elde Edilen Bulgular .....                                                               | 32  |
| 4.1.1. Meyvelerin pomolojik özellikleri .....                                                             | 32  |
| 4.1.2. Suda çözünabilir kuru madde tayini (SÇKM).....                                                     | 33  |
| 4.1.3. pH ve titrasyon asitliği tayini.....                                                               | 34  |
| 4.1.4. Hue değerlerinin tayini .....                                                                      | 35  |
| 4.1.5. Meyvelerin toplam antosiyanin kapsamları .....                                                     | 35  |
| 4.1.6. Meyvelerin toplam fenolik bileşik kapsamları.....                                                  | 36  |
| 4.1.7. Meyvelerin toplam flavonoid kapsamları .....                                                       | 37  |

|                                                                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.8.DPPH radikalini süpürme kapasitesi .....                                                                                                                          | 38  |
| 4.1.9.Meyvelerin toplam antioksidan kapasiteleri .....                                                                                                                  | 39  |
| 4.1.9.1.Fosfomolibden metodu ile belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri.....                                                                                        | 39  |
| 4.1.9.2.FRAP metodu ile belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri.....                                                                                                 | 40  |
| 4.2.Yaprak ayası eksplantlarından kallus eldesi.....                                                                                                                    | 42  |
| 4.3. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Ağır Metallerden Gümüş Nitrat, Kobalt Klorür ve Kadmiyum Klorür Uygulamaları .....                                  | 43  |
| 4.3.1. Kallus büyüme indekslerinin belirlenmesi.....                                                                                                                    | 43  |
| 4.3.2. Toplam antosiyaninlerin belirlenmesi.....                                                                                                                        | 46  |
| 4.3.3. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi .....                                                                                                                   | 48  |
| 4.3.4. Toplam flavonoidlerin belirlenmesi.....                                                                                                                          | 50  |
| 4.3.5. DPPH serbest radikalının süpürülmesi .....                                                                                                                       | 52  |
| 4.3.6. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                                              | 54  |
| 4.3.6.1. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                   | 54  |
| 4.3.6.2. FRAP metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                            | 56  |
| 4.4. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Bitki Savunma Sistemi İçindeki Sinyal Bileşiklerden Salisilik Asit (SA) ve Metil Jasmonat (MeJA) Uygulanmaları..... | 59  |
| 4.4.1. Kallus büyüme indekslerinin belirlenmesi.....                                                                                                                    | 59  |
| 4.4.2. Toplam antosiyaninlerin belirlenmesi.....                                                                                                                        | 61  |
| 4.4.3. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi .....                                                                                                                   | 62  |
| 4.4.4. Toplam flavonoidlerin belirlenmesi.....                                                                                                                          | 64  |
| 4.4.5. DPPH serbest radikalının süpürülmesi .....                                                                                                                       | 65  |
| 4.4.6. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                                              | 67  |
| 4.4.6.1. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                   | 67  |
| 4.4.6.2. FRAP metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                            | 68  |
| 4.5. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Olarak Dokularda Osmotik Strese Neden Olan Polietilen Glikol (PEG), Sorbitol ve Sakkaroz Uygulanmaları .....        | 70  |
| 4.5.1. Kallus büyüme indekslerinin belirlenmesi.....                                                                                                                    | 70  |
| 4.5.2. Toplam antosiyaninlerin belirlenmesi.....                                                                                                                        | 73  |
| 4.5.3. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi .....                                                                                                                   | 75  |
| 4.5.4. Toplam flavonoidlerin belirlenmesi.....                                                                                                                          | 77  |
| 4.5.5. DPPH serbest radikalının süpürülmesi .....                                                                                                                       | 79  |
| 4.5.6. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                                              | 81  |
| 4.5.6.1. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                   | 81  |
| 4.5.6.2. FRAP metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....                                                                                            | 83  |
| 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....                                                                                                                                            | 85  |
| 5.1. Sonuçlar .....                                                                                                                                                     | 85  |
| 5.2.Öneriler .....                                                                                                                                                      | 92  |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                                                                         | 95  |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                                                          | 101 |
| EKLER.....                                                                                                                                                              | 102 |

## ÖZET

### Doktora Tezi

#### BAZI ABİYOTİK ELİSİTÖRLERİN NAR (*Punica granatum* L.) KALLUS KÜLTÜRÜNDE FENOLİK BİYOSENTEZİ ve ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aslı Neslihan ÖZDEN

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bekir Erol AK

Yıl:2018, Sayfa:106

Bu araştırmada Şanlıurfa'da yetiştirilen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar çeşitlerinin hasat olumunda sahip olduğu sekonder metabolit miktarları ve antioksidan kapasiteleri *in vitro* koşullarda elde edilen kallus eksraktlarıyla karşılaştırılmıştır. Öte yandan yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslarda sekonder metabolit üretimini artırıcı uygulamaların etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; yapraklardan elde edilen kalluslara ağır metaller ( $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$  ve  $\text{CoCl}_2$ ), bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikler (Salisilik asit (SA), metil jasmonat (MeJA)) veya dokularda osmotik stres yaratan bileşikler (Sakkaroz, Polietilen Glikol (PEG), Sorbitol) uygulanmasının sekonder metabolit üretimi ve antioksidan kapasiteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmada kullanılan nar çeşitlerinin meyve kabuklarının fenolik ve flavonoid kapsamları dane ve çekirdeğe göre daha yüksek ölçülmüş olup bu sonuca paralel olarak nar çeşitleri ve meyve kısımlarının antioksidan aktiviteleri paralellik göstermiştir. Araştırma sonuçlarına göre çalışmada kullanılan ağır metallerin varlığı kallus büyüme indeksini kontrole göre düşürürken sadece Suruç karasında  $\text{AgNO}_3$ 'ın tüm dozları kontrole göre nar kalluslarında ağırlık artışına neden olmuştur. Bütün ağır metal dozları kontrole göre nar kalluslarının toplam antosiyanin kapsamlarını arttırmıştır. Besi ortamına ilave edilen ağır metaller üç çeşidin kalluslarının toplam fenolik kapsamlarını artırırken,  $\text{AgNO}_3$  ilavesi kallusların flavonoid kapsamlarını arttırmış ancak besiy ortamına  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  ilavesi Suruç çeşidinin toplam flavonoid kapsamını olumsuz etkilemiştir. Tüm ağır metaller üç çeşidin yaprak kökenli kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasitesini ve antioksidan kapasitelerini arttırmıştır. Besi ortamına SA ve MeJA ilavesi üç çeşidin kalluslarının ağırlık artış indekslerinde kontrole göre önemli seviyede düşüşe sebep olmuştur. MeJA varlığı tüm çeşitlerin toplam antosiyanin kapsamlarını olumlu etkilerken, toplam fenolik ve flavonoid kapsamlarını olumsuz etkilemiştir. Ölçülen parametreler üzerine SA uygulamaları her çeşitte farklı etki yapmıştır. Suruç çeşidi kalluslarının sentetik DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri ve antioksidan kapasite üzerine en etkili SA dozu  $10 \mu\text{M}$  olarak belirlenirken, besiy ortamında SA varlığı Hicaz ve Suruç karası çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri ve antioksidan kapasiteleri üzerine olumsuz etki etmiştir. Nar kallus kültürlerinde MeJA uygulamalarının, çalışmada kullanılan üç nar çeşidinin kalluslarında toplam antioksidan kapasitelerini azalttığı ve  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kapasitelerini çok olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Besi ortamına ilave edilen  $20 \text{ g/l}$  sakkaroz dozu tüm çeşitlerde en yüksek nisbi kallus ağırlık artışına neden olmuştur. Tüm nar çeşitlerinde  $20 \text{ g/l}$  Sorbitol ve PEG'in ölçülen parametreler için en etkili doz olduğu bulunmuştur. Sakkarozun farklı dozlarının nar kalluslarının toplam flavonoid kapsamları üzerindeki etkisi önemli bulunurken, uygulanan dozlar nar kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları üzerine her çeşitte farklı etki yapmıştır. Araştırmada kullanılan elisitörler arasında fenolik bileşik sentezi bakımından en etkili elisitörler ağır metaller olmuştur. Ağır metaller arasında da  $5 \mu\text{M}$ 'lık  $\text{CdCl}_2$  fenolik bileşik sentezi bakımından en etkin kimyasal olarak belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** *Punica granatum* L., abiyotik elisitör, sekonder metabolit, kallus kültürü

## ABSTRACT

### PhD Thesis

#### The INVESTIGATION of EFFECTIVENESS of SOME ABIOTIC ELICITORS on PHENOLIC BIOSYNTHESIS and ANTIOXIDANT CAPACITY in POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) CALLUS CULTURE

Aslı Neslihan ÖZDEN

Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Bekir Erol AK

Year: 2018, Page:106

In this study, the amounts of the secondary metabolites and antioxidant capacities of Suruç, Hicaz and Suruç Karası pomegranate cultivars grown in Şanlıurfa at harvest were determined and compared with the callus extracts obtained in vitro conditions. On the other hand, it was aimed to determine the effects of different applications enhancing synthesizing of secondary metabolites in calli derived from the pomegranate leaf explants. For this purpose; effectiveness of heavy metals ( $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$  and  $\text{CoCl}_2$ ), signal compounds (Salicylic Acid, Methyl Jasmonate) in plant defense system and some compounds causing osmotic stress (Sucrose, Polyethylene Glycol, Sorbitol) on calli derived from the leaf explants were examined. Total phenolic and flavonoid contents of fruit peel of pomegranate cultivars used in the research were higher than arils and seeds. Parallel to this result, antioxidant activities of pomegranate varieties and fruit parts were similar. According to the results, presence of heavy metals used in the study decreased the callus growth index compared to the control, but just  $\text{AgNO}_3$  doses in the case of Suruç caused an increase in callus weight compared to the control. All heavy metal doses used increased the total anthocyanin contents of pomegranate calli to control. The heavy metals added to the culture medium increased the total phenolic contents of the calli for the three pomegranate cultivars, whereas the addition of  $\text{AgNO}_3$  increased the flavonoid contents of the calli. However, supplement of  $\text{CoCl}_2$  and  $\text{CdCl}_2$  to the culture media adversely affected the total flavonoid content of the Suruç variety. All heavy metals used in the study increased 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging capacity and antioxidant activities of calli obtained from three pomegranate cultivars. The addition of SA and MeJA to the culture medium resulted in a significant decrease in the callus growth index of the fruit cultivars compared to the control. MeJA has a positive effect on the total anthocyanin content of all pomegranate cultivars, while it negatively affects the total phenolic and flavonoid content of the samples. The salicylic acid applications on the measured parameters have different effects in all cultivars. The presence of salicylic acid in the tissue culture medium affected DPPH free radical scavenging capacities and antioxidant activities of the Hicaz and Suruç cultivars, while the most effective salicylic acid dose on the DPPH radical scavenging capacities and the antioxidant activities of Suruç cultivars were determined to be 10  $\mu\text{M}$ . It has been determined that MeJA applications in pomegranate callus cultures reduced the total antioxidant capacity of callus of three pomegranate cultivars used in the study and negatively affected the  $\text{Fe}^{+3}$  reduction capacities. The 20 g/l sucrose concentration supplemented to the culture medium caused the highest relative callus weight increase in all pomegranate cultivars used in the study. In all pomegranate cultivars, 20 g/l Sorbitol and PEG applications were found to be the most effective doses for the measured parameters. While the effect of different sucrose concentrations on the total flavonoid content of pomegranate callus were significant, sucrose concentrations applied had different effects on total flavonoid content of pomegranate callus extracts. Among the elicitors used in the research, the most effective elicitors in the synthesis of phenolic compounds were the heavy metals. Among heavy metals, 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  was also found to be the most effective chemical.

**KEYWORDS:** *Punica granatum* L., abiotic elicitor, seconder metabolites, callus culture

## TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı yapan Sayın Prof.Dr. Bekir Erol AK’a tez çalışmamın konusunun belirlenmesi sırasında göstermiş oldukları anlayış ve çalışmalarına katkılarından dolayı teşekkür ederim. TİK komisyonundaki değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. İbrahim BOLAT ve Sayın Prof.Dr. Hasan AKAN’a tezime vermiş oldukları katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım. Uzun süren çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve çok değerli bilimsel katkılarda bulunan sevgili eşim Sayın Doç.Dr. Mustafa ÖZDEN’e ve manevi destekleri ile sürece katkıda bulunan sevgili ailem Sayın Hatice Bedriye KAYMAZ ve Sayın Mustafa KAYMAZ ile bana her konuda enerji veren, annelerinin tez çalışmasının bitmesini sabırla bekleyen canım çocuklarım Onur ve Özgür ÖZDEN’e göstermiş oldukları fedakarlıklardan dolayı çok teşekkür ederim.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3. 1. Araştırmada kullanılan nar çeşitleri .....                                                                                                                | 14 |
| Şekil 3. 2. Suruç nar çeşidinin meyvesi.....                                                                                                                          | 15 |
| Şekil 3. 3. Hicaz nar çeşidinin meyvesi.....                                                                                                                          | 15 |
| Şekil 3. 4. Suruç karası nar çeşidi .....                                                                                                                             | 16 |
| Şekil 3. 5. Nar meyve danelerinin etanolik ekstraksiyonları .....                                                                                                     | 17 |
| Şekil 3. 6. Nar meyve kabuklarının etanolik ekstraksiyonları .....                                                                                                    | 18 |
| Şekil 3. 7. Nar çekirdeklerinin etanolik ekstraksiyonları .....                                                                                                       | 19 |
| Şekil 3. 8. Hue açısını gösteren renk dairesi .....                                                                                                                   | 20 |
| Şekil 3. 9. Altı farklı besi ortamında kültüre alınan yaprak eksplantları .....                                                                                       | 22 |
| Şekil 3. 10. Yaprığın kesik kenarlarında kallus oluşumu .....                                                                                                         | 23 |
| Şekil 3. 11. Kallus çoğaltma ortamına aktarılmış kalluslar .....                                                                                                      | 23 |
| Şekil 3. 12. Alt kültüre alınacak kalluslar .....                                                                                                                     | 23 |
| Şekil 3. 13. Farklı konsantrasyonlarda $AgNO_3$ içeren MS kültür ortamlarına kallus ekimi.....                                                                        | 24 |
| Şekil 3. 14. Farklı konsantrasyonlarda $CoCl_2$ içeren MS kültür ortamlarına kallus ekimi .....                                                                       | 25 |
| Şekil 3. 15. Farklı konsantrasyonlarda $CdCl_2$ içeren MS kültür ortamlarına kallus ekimi .....                                                                       | 25 |
| Şekil 3. 16. Gallik asit standart grafiği .....                                                                                                                       | 28 |
| Şekil 3. 17. Kateşin standart grafiği .....                                                                                                                           | 29 |
| Şekil 3. 18. Askorbik asit antioksidan kapasitesi standart grafiği .....                                                                                              | 30 |
| Şekil 3. 19. Butilhidroksitolün standart grafiği .....                                                                                                                | 31 |
| Şekil 4.1. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar çeşitlerinin toplam antosiyanin kapsamları. ....                                                                          | 35 |
| Şekil 4.2. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar çeşitlerinin toplam fenolik kapsamları. ....                                                                              | 37 |
| Şekil 4.3. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar çeşitlerinin toplam flavonoid kapsamları. ....                                                                            | 37 |
| Şekil 4.4. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar dane, kabuk ve çekirdek ekstraktlarının DPPH radikali<br>süpürme aktivitesi. ....                                         | 38 |
| Şekil 4.5. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar dane, kabuk ve çekirdek ekstraktlarının Fosfomolibden<br>metodu ile toplam antioksidan kapasiteleri .....                 | 39 |
| Şekil 4.6. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar dane, kabuk ve çekirdek ekstraktlarının FRAP metodu<br>ile toplam antioksidan kapasiteleri. ....                          | 40 |
| Şekil 4.7. Yaprak ayası eksplantlarının kesik yüzeylerinde kallus oluşumu. ....                                                                                       | 42 |
| Şekil 4.8. Yaprak ayası eksplantında yüksek BA ve NAA dozlarından kaynaklanan nekroz ve kök<br>oluşumu .....                                                          | 43 |
| Şekil 4.9. Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik ağır metal uygulamaları. ....                                                                               | 43 |
| Şekil 4.10. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kalluslarının Büyüme İndeksi. ....                                                                | 45 |
| Şekil 4.11. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam<br>Antosiyanin Kapsamları. ....                                  | 47 |
| Şekil 4.12. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam<br>fenolik kapsamları. ....                                      | 49 |
| Şekil 4.13. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam<br>flavonoid kapsamları. ....                                    | 51 |
| Şekil 4.14. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı DPPH<br>radikali süpürme aktiviteleri.....                              | 53 |
| Şekil 4.15. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Mo (VI)<br>indirgeme kuvveti.....                                       | 55 |
| Şekil 4.16. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı $Fe^{+3}$<br>indirgeme kuvveti.....                                     | 58 |
| Şekil 4.17. Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik bitki savunma sistemi içindeki sinyal<br>bileşiklerden salisilik asit ve metil jasmonat uygulamaları. .... | 59 |
| Şekil 4.18. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kalluslarının büyüme indeksi. ....                                                                | 60 |
| Şekil 4.19. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam<br>antosiyanin kapsamları. ....                                  | 62 |
| Şekil 4.20. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam<br>fenolik kapsamları. ....                                      | 63 |

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.21. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam flavonoid kapsamları. ....                                       | 65 |
| Şekil 4.22. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı DPPH radikali süpürme aktiviteleri.....                                 | 66 |
| Şekil 4.23. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Mo (VI) indirgeme kuvveti.....                                          | 68 |
| Şekil 4.24. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Fe <sup>+3</sup> indirgeme kuvveti.....                                 | 69 |
| Şekil 4.25. Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik olarak dokularda osmotik strese neden olan polietilen glikol (PEG), sorbitol ve sakkaroz uygulamaları..... | 70 |
| Şekil 4.26. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kalluslarının büyüme indeksi. ....                                                                | 72 |
| Şekil 4.27. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam antosiyanin kapsamları. ....                                     | 74 |
| Şekil 4.28. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam fenolik kapsamları. ....                                         | 76 |
| Şekil 4.29. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı toplam flavonoid kapsamları. ....                                       | 78 |
| Şekil 4.30. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı DPPH radikali süpürme aktiviteleri.....                                 | 80 |
| Şekil 4.31. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Mo (VI) indirgeme kuvveti.....                                          | 82 |
| Şekil 4.32. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Fe <sup>+3</sup> indirgeme kuvveti.....                                 | 84 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3. 1. MS Kültür ortamının bazal tuz ve vitamin içeriği .....                                                             | 21 |
| Çizelge 3. 2. Farklı konsantrasyon ve kombinasyonda BA ve NAA içeren MS kültür ortamları .....                                   | 21 |
| Çizelge 4. 1. Nar çeşitlerinin meyve ve dane ağırlıkları, meyve suyu, meyve kabuğu ekstraktları<br>ortalama Hue° değerleri ..... | 33 |
| Çizelge 4. 2. Çeşitlerin suda çözünebilir kuru madde miktarları, pH ve titrasyon asitliği .....                                  | 34 |



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                                     |
|-------------------|-----------------------------------------------------|
| AE                | Askorbik Asit Eşdeğeri                              |
| AgNO <sub>3</sub> | Gümüş Nitrat                                        |
| BHT               | Bütil Hidroksi Toluen                               |
| CdCl <sub>2</sub> | Kadmiyum Klorür                                     |
| CoCl <sub>2</sub> | Kobalt Klorür                                       |
| DPPH              | 1,1- difenil- 2- pikrilhidrazil                     |
| FRAP              | Fe <sup>+3</sup> İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü |
| GAE               | Gallik Asit Eşdeğeri                                |
| HCl               | Hidroklorik Asit                                    |
| KE                | Kateşin Eşdeğeri                                    |
| KCl               | Potasyum Klorür                                     |
| MS                | Murashige ve Skoog                                  |
| PEG               | Polietilen glikol                                   |
| SÇKM              | Suda Çözünebilir Kuru Madde                         |
| μM                | Mikro Molar                                         |

## 1.GİRİŞ

Son yıllarda biyomedikal araştırma alanındaki hızlı ilerlemelerle birlikte, geçmişten günümüze insan beslenmesinde doğal olarak kullanılan bitkisel ürünlerin önemli özelliklerinin ortaya çıkartılması konusu araştırmacılar için ilgi odağı olmuştur. Bundan dolayıdır ki birçok doğal bileşiğin hastalık önleme veya tedavisindeki potansiyel etkilerinin belirlenmesi için detaylı araştırmalar yürütülmektedir.

Günümüzde üzerinde en fazla çalışılan doğal bileşikler; bitki sekonder metabolitleri olan alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşiklerdir (Oskay ve Oskay, 2009). Sekonder metabolitlerin bitki yaşamında savunma, korunma, ortama uyum sağlama, hayatta kalma ve neslini devam ettirme gibi fizyolojik olaylarda önemli işlevleri vardır. Bu işlevlerle bağlantılı olarak bitkilerde sentezlenen sekonder metabolitlerin miktarları ve tipleri değişiklik gösterir. Bitkilerdeki işlevlerinin yanı sıra sekonder bileşikler günlük yaşamımızda öncelikle ilaç sanayi olmak üzere, gıda, kozmetik sanayi ve zirai mücadele sektörlerinde hammadde olarak kullanılmaktadır.

Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan sekonder metabolitler, meyve, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövde gibi bitkinin farklı organlarında bulunabilirler (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Coşkun, 2006; Aydın ve Üstün, 2007). Yapılan araştırmalar, nar suyu, nar kabuğu ve tohumlarının sekonder metabolitler bakımından oldukça zengin olduklarını göstermiştir (Elfalleh ve ark., 2012; Türkyılmaz, 2013; Manasathien ve ark., 2012; Yasoubi ve ark., 2007; Fischer ve ark., 2011).

Gen merkezi Ön Asya olan, sistematikte *Myrtales* takımı, *Punicaceae* familyası içinde yer alan ve kültür tarihi 5000 yıl öncesine dayanan nar (*Punica granatum* L.), Afganistan, Fas, Filistin, Irak, İran, Kıbrıs, Mısır, Suriye, Suudi Arabistan, Tunus, Türkiye, Hindistan ABD, Çin, İspanya, İsrail, İtalya ve Tayland başta olmak üzere, dünyanın birçok ülkesinde yetiştirilmektedir (Gündoğdu ve Yılmaz, 2013).

Ülkemizde 2015 yılı verilerine göre 57 ilimizde nar yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu illerin 25'i Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan illerdir (Şimşek ve Gülsoy, 2017). Güneydoğu Anadolu Bölgesinin toplam nar üretim payı içerisinde ki değeri % 11.62'dir. Ülkemiz nar üretiminde ilk beş sırada yer alan iller sırasıyla Antalya (107.237 ton), Mersin (45.594 ton), Denizli (39.715 ton), Adana (20.769 ton) ve Hatay (20.769 ton)'dır. Nar üretim miktarı dikkate alınarak bölgeler sıralandığında, 234.609 ton ile Akdeniz Bölgesi birinci, 146.080 ton ile Ege Bölgesi ikinci ve 51.790 ton ile Güneydoğu Anadolu Bölgesi üçüncü sırada yer almaktadır (TUİK, 2015).

Bütün illerinde nar yetiştiriciliği yapılan Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde nar üretimi bakımından Gaziantep birinci, Kilis ikinci, Şanlıurfa üçüncü sırada yer alır. Bölgesinin standart veya önemli yerel çeşitleri arasında Zivzik narı, Hicaz narı, Katırbaşı, Dicle narı, Bori, Şekerek, Mayhoş, Barut, Urfa narı, Karaköprü narı, Seyfi narı, Katina narı, Derik narı ve Oğuzeli narı sayılabilir (Şimşek ve Gülsoy, 2017).

Nar insan beslemesinde önemli yeri olan bir meyve türü olup çok eskilerden bu yana kök, meyve kabuğu ve meyve suyundan elde edilen geleneksel ilaçlar ile kolik, kolit, dizanteri, felç, baş ağrısı, kısırlık, epilepsi gibi hastalıkların tedavi edildiği bilinmektedir (Sadeghi, 2009; Haque ve ark., 2015). Ayrıca narın çeşitli kısımlarından elde edilen geleneksel ilaçlar kanama durdurucu, şeker dengeleyici, kanser ve iltihaplanma önleyici, parazit dökücü olarak da kullanılmıştır (Dipak ve ark., 2012). Nar suyunun serinletici etkisi, tansiyon düşürücü, ateş düşürücü ve hazmı kolaylaştırıcı, bağışıklık sistemini güçlendirici özelliklerinden dolayı taze tüketimi önerilmektedir (Ak ve ark., 2016). Nar meyvelerinin sofralarda taze meyve, meyve suyu, şarap ve reçel olarak tüketilmesinin yanı sıra, çeşitli kısımlarından elde edilen tanen, sitrik asit, pektin, sirke, yağ, boya ve mürekkep hammaddeleri gıda, kozmetik ve ilaç sanayilerinde kullanılmaktadır (Holland ve ark., 2009; Ak ve ark., 2013b).

Nar sularında bulunan fenol bileşikleri fenol asitleri, hidrolize olabilir tanenler ve antosiyaninler olarak gruplandırılmaktadır (Perez ve ark., 2002; Mertenz-Talcott ve ark., 2006). Gallik asit, elajik asit, protokateşik asit, klorojenik asit, kaffeik asit,

ferulik asit ve kumarik asit nar suyunda en fazla bulunan fenol asitleridir (Mertenzen-Talcott ve ark., 2006; Poyrazoğlu ve ark., 2002).  $\alpha$ -punikalajin ve  $\beta$ -punikalajin, nar suyunda bulunan hidrolize olabilir tanenlerdendir ve bu bileşikler, narlardaki yüksek antioksidan kapasitesinden sorumludurlar (Gil ve ark., 2000; Tezcan ve ark., 2009). Antosiyaninler, nar suyundaki temel renk pigmentleridir. Bu pigmentler narların kendilerine özgü kırmızı, mavi ve mor tonlardaki renklerini veren, suda ve şırada az ve alkolde çok çözünen doğal renk maddeleridir. Nar sularında delfinidin-3,5-diglikozit, siyanidin-3,5-diglikozit, pelargonidin-3,5-diglikozit, siyanidin-3-glikozit, delfinidin-3-glikozit, pelargonidin-3-glikozit olmak üzere toplam 6 adet antosiyanin bileşiğı belirlenmiştir (Perez ve ark., 2002; Alighourchi ve ark., 2008; Kelebek ve Canbaş, 2010). Sekonder metabolitlerden antosiyaninlerin üretimi büyük önem taşır. Bunun en önemli nedeni, doğal kırmızı renklenmeyi sağlayarak, yiyecek ve içeceklerin çekiciliğini artırmak için doğal gıda katkı maddesi olarak kullanılmasıdır. Antosiyaninler insan sağlığı üzerinde de antikanserojen etkiler göstermektedirler. Bugün bilinen 22 farklı antosiyanin türü olmakla birlikte bunlardan en önemlileri delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin ve siyanidindir.

Meyve kabuğı yüksek oranda tanen içeriğinden dolayı, özellikle deri işleme sanayinde, meyve sularının durultulmasında ve çinko zehirlenmelerinin önlenmesinde tanen kaynağı olarak kullanılmaktadır (Ak ve ark., 2013 a; Ak ve ark., 2016)

Sekonder metabolitlerin bitki bünyesindeki işlevlerinin oldukça karmaşık olması, araştırmacıların bu bileşikler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu alanda yapılan çalışmalar, hem bu bileşiklerin kontrollü şartlar altında elde edilme metotlarının geliştirilmesine, hem de etki mekanizmalarının belirlenmesine yönelik olarak sürdürülmektedir. Özellikle sekonder bileşikler içinde yer alan fenolik bileşikler ile tokoferollerin, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin belirlenmesi ile bu yönde yapılan çalışmaların son yıllarda büyük bir popülarite kazandığı görülmektedir (Çetin, 2010). Bitkilerin farklı kısım ve meyvelerinde bulunan sekonder metabolitler uzun yıllar geleneksel yollarla, yani doğadan toplanarak ekstrakte edilerek elde edilmiş olup, bu metotla üretimin halen sürdürüldüğü

bilinmektedir. Bununla birlikte bu metot pek çok güçlüğü de beraberinde getirmektedir. Örneğin araziye ve mevsime bağımlılık söz konusudur, bakteri, mantar ya da böcek gibi zararlılardan dolayı elde edilen ürün miktarında sabitlik sağlanamamaktadır ve oldukça yüksek işgücü gerekmektedir. Bununla birlikte özellikle ender bulunan bitkilerin doğadan fazla miktarlarda toplanması sonucu bazı türlerin yok olması tehlikesi söz konusudur (Çetin, 2010).

Sekonder metabolit elde etme çalışmalarında karşılaşılan güçlüklerden dolayı son yıllardaki çalışmalar bu bileşiklerin *in vitro* ortamda kallus ya da hücre süspansiyon kültürleri yoluyla elde edilmesi konularında yoğunlaşmıştır. Bitki hücre ve doku kültürü teknikleri sekonder metabolitlerin homojen ve yüksek saflıkta elde edilebilmeleri açısından büyük önem taşımaktadır (Zhang ve Furusaki, 1999; Saje ve ark., 2000; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Qu ve ark., 2006). Bitki hücre ve doku kültürü tekniklerinin kullanılması sayesinde geleneksel yöntemlerden kaynaklanan bazı problemler ortadan kalkmakta ve uygun şartlar sağlanabildiğinde yılın her döneminde yüksek miktarlarda ve yüksek saflıkta ürün eldesi mümkün olabilmektedir (Dornenburg ve Knorr, 1997; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Matkowski, 2008; Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Ayrıca hücre kültürleri ile araziden bağımsız, çevre faktörlerinin etkisi altında kalmaksızın üretimin söz konusu olması ve özellikle belli bir doku ve organda üretilen bir maddenin bitkinin diğer kısımlarında da üretilebilme olanağının bulunması, bu tekniklerin diğer üstün taraflarını oluşturmaktadır.

Özellikle 2000’li yıllardan itibaren birçok bitki tür ve çeşidi için doku kültürü rejenerasyon protokolleri oluşturulmuş, daha sonra ilgili tür veya çeşit için uygun besi ortamı seçilerek veya besi ortamı bileşenleriyle çevresel faktörler değiştirilerek istenilen kimyasal bileşikler üretilmeye çalışılmıştır. Bitkilerin doğal yetiştirme koşullarında maruz kaldığı abiyotik stres faktörleri, *in vitro* kültür ortamlarında manipüle edilerek üretim maliyetinin düşürülmesi, kalite ve kantitenin artırılması gibi avantajlar sağladığından sekonder ürünlerin biyoteknolojikolarak üretilmesi karlı bir üretim yöntemi olarak değerlendirilebilir. Geçmişte yapılan çalışmalar genellikle bu bileşiklerin bitkilerden nasıl ekstrakte edildiği ile ilgili iken günümüzdeki

çalışmalar bitkiler tarafından sentezlenen sekonder metabolitlerin tip ve miktarlarını etkileyen faktörlerin araştırılması üzerinde yoğunlaşmıştır.

Bu doktora tez çalışmasında, Şanlıurfa'da yetiştirilen Suruç narı, Hicaz narı ve Suruç karası nar çeşitlerinin hasat olumunda sahip olduğu sekonder metabolit miktarları ve antioksidan kapasiteleri *in vitro* koşullarda elde edilen kallus eksraktlarıyla karşılaştırılmıştır. Öte yandan yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslarda sekonder metabolit üretimini artırıcı uygulamaların etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; yapraklardan elde edilen kalluslara ağır metaller (kadmiyum klorür ( $\text{CdCl}_2$ ), gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) ve kobalt klorür ( $\text{CoCl}_2$ )), bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikleri (salisilik asit, metil jasmonat), dokularda osmotik stres yaratan bileşikler (sakkaroz, polietilen glikol (PEG), sorbitol) uygulanmasının sekonder metabolit üretimi ve antioksidan kapasiteleri üzerine etkinlikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara bağlı olarak nardan sekonder metabolitlerin üretiminde doku kültürü yöntemlerinin kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Narın Antioksidan İçeriği İle İlgili Çalışmalar

Yasoubi ve ark. (2007)'nin nar kabukları ile yaptıkları çalışmada nar ekstraktları beş farklı çözücü ile iki farklı metotla elde etmişlerdir. Aseton, metanol, etanol, su ve etil asetatın kullanıldığı çalışmada en iyi çözücünün aseton olduğu belirlenmiştir. Konsantre kabuk ekstaktlarının, soya yağının ısı karşısında stabilizasyonundaki etkinliğinin sentetik antioksidantlardan daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Fischer ve ark. (2011), nar meyvelerinin içerdiği fenolik bileşiklerin cinslerini ve miktarlarını belirlemek için yaptıkları çalışmada narın kabuk, meyve ve meyve suyunda 9 tip antosiyanin, 2 tip gallotanins, 22 tip ellagitannins, 2 tip gallagyl esters, 4 tip hydroxybenzoic asit, 7 tip hydroxycinnamic asit ve 1 dihydroflavonolden oluşan 48 farklı fenolik bileşik olduğunu belirlemişlerdir.

Elfalleh ve ark. (2012)'nin yaptığı çalışmada Tunus'ta çok tüketilen yerel bir çeşit olan 'Gabsi' nar çeşidinin antioksidan içeriğini belirlemişlerdir. Nar kabuğunun, tohumların, yaprakların ve çiçeklerin kullanıldığı çalışmada en yüksek toplam polifenol içeriğinin 85.60 mg GAE/g ile nar kabuğunda olduğu; onu sırasıyla çiçek, yaprak ve tohumun onu izlediği saptanmıştır. Kabuk ve çiçeklerden elde edilen ekstraktların antioksidant aktivitesinin tohum ve yapraklardan elde edilenlere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Manasathien ve ark. (2012), nar meyvesinin kabuğundan ve tohumlarından elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik madde miktarları, flavonoid miktarları, antioksidant sitotoksiteleri ve antiproliferasyon aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Ekstraksiyonda etanol, ve su kullanılan örneklerde etanolün daha etkili olduğu belirlenmiştir. Nar kabuğunun toplam fenolik madde içeriği ile flavonoid miktarlarının tohumdan daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Türkyılmaz (2013), İzmir 1255, 1264, 1473, 1477, 1478, 1479, 1508, 1513 ve Hicaznar'dan oluşan 9 nar çeşidi ile yaptığı çalışmada meyve sularının antosiyanin ve organik asit içerikleri ile bazı fiziko-kimyasal özelliklerini karşılaştırmıştır. Antosiyanin içerikleri, organik asit çeşit ve miktarları, pH, suda çözünebilir kuru madde miktarları çeşitlere bağlı olarak büyük farklılıklar göstermiştir. Dokuz çeşidin antosiyanin içerikleri 28 ila 447 mg/l arasında farklılık gösterirken en yüksek ve en düşük antosiyanin seviyeleri sırasıyla İzmir 1513 ve İzmir 1508 çeşidinde belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan nar çeşitlerinin sitrik asit, malik asit, sukkinik asit ve tartarik asitten oluşan organik asit içerikleri 8.13-25.40 mg/l arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek değer İzmir 1477'den elde edilirken en düşük değer İzmir 1473'ten elde edilmiştir.

Turgut ve Seydim (2013), Antalya Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Kayaburnu-Serik meyvecilik birimi nar parsellerinde yetiştirilen BATEM Onurnar, BATEM Yılmaznar, BATEM Hicrannar, BATEM Hicaznar, BATEM Esinnar çeşitleri ve 17-64, 17-180, 17-183 18-19, 19-12, 20-138 genotipleri üzerinde yürüttükleri çalışmada adı geçen narların toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, toplam antosiyanin miktarı ile antioksidan aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda nar çeşit ve genotiplerinin toplam fenolik madde miktarı 81.515-138.000 mg GAE/100 ml, toplam flavonoid miktarları 5.898-19.438 mg KE/100 ml, toplam antosiyanin miktarları 9.892-34.616 mg siyanidin -3-glikozit/100 ml, trolox eşdeğeri antioksidan aktiviteleri 1.004-1.641 mmol TE/100 ml olarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite değerinin 17-64 genotipi ve Hicaznar çeşidi meyve suyu ekstraktlarından elde edildiği belirtilmiştir.

Mansour ve ark. (2013), nar meyvelerinin toplam fenolik madde kapsamı, antioksidan aktiviteleri ve antibakteriyal özelliklerini belirlemek üzere 21 Tunus nar genotipi ile çalışma yapmışlardır. Çalışmada kullanılan nar genotiplerinin meyve kabuğundan elde edilen ekstraktlarda en baskın gallik asit olmak üzere ellajik asit, kafeik asit, kumarik asit, vanilik asit ve kuersetinden oluşan altı fenolik madde belirlenmiştir. Çözücü olarak metanol kullanılan nar meyve kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri (82.0-230.4 mg GAE/g DW) çözücü olarak su kullanılan

ekstraktlardan yaklaşık 2-4 kat yüksek ölçülmüştür (40.8-59.8 mg GAE/g DW). Methanol veya su ile hazırlanan tüm ekstraktlar test edilen beş bakteriye (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus epidermidis*) karşı antibakteriyal özellik göstermişlerdir.

Akhavan ve ark. (2015), İran'da yetiştirilen on nar çeşidinin sadece danelerinden ya da meyvelerin tamamından elde ettikleri meyve sularının fenolik madde içerikleri ve antioksidan kapasitelerini karşılaştırdıkları çalışmada punikalajin A, punikalajin B ve ellajik asitin sözü edilen çeşitlerin meyve sularında baskın fenolik maddeler olduğunu vurgulanmıştır. Çeşitlerin sadece danelerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde kapsamları 220-1267 mg GAE/l iken bütün meyvelerden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde kapsamları 943-2931 mg GAE/l olarak ölçülmüştür. En yüksek fenolik madde içeriğine 2931 mg GAE/l ile Gorche Shahvar Yazdi (GSY) çeşidinin sahip olduğu ve çeşitlerin fenolik madde kapsamları ile antioksidan kapasiteleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirtilmiştir.

Li ve ark. (2015), Çin'de yetiştirilen on nar çeşidinin dane ekstraktlarının polifenol içerikleri, antioksidan kapasiteleri ve fizikokimyasal özelliklerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada örneklerin toplam flavonoid kapsamlarının 0.045-0.335 QuE mg/ml, toplam polifenol miktarlarının 3.151- 7.429 GAE mg/ml olduğunu belirtmişlerdir.

İspanya'da Miguel Hernandez Üniversitesi bünyesinde bulunan Avrupanın en önemli nar gen bankasından seçtikleri 19 nar çeşidinin danelerinden elde ettikleri ekstraktların antioksidan kapasitelerini, fenolik madde içeriklerini, kimyasal kompozisyonlarını belirlemek amacıyla Legua ve ark. (2016)'nın yürütmüş oldukları çalışmada, kullanılan nar çeşitlerinin meyve sularının toplam fenolik madde içeriğinin 90-145 mg GAE/100 ml arasında olduğunu ve en yüksek toplam fenolik madde miktarı Hicaznar çeşidinde belirlemişlerdir. Yapılan analizlerde seçilen çeşitlerin meyve suyu ekstraktlarında on farklı fenolik madde ve altı farklı antosiyanin belirlenmiştir. Hicaznar ve Wonderful çeşitlerinin antioksidan

aktiviteleri sırasıyla 172-149 mg Trolox/100 ml olup, seçilen çeşitlerde ölçülen en yüksek değerlerdir.

Kanada’da marketten satın alınan ABD Kaliforniya eyaletinde yetiştirilen narlar kullanılarak yapılan çalışmada çekirdek ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamlarının ve antioksidan aktivitelerinin meyve suyu ekstraktlarında ölçülenden daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Ambigaipalan ve ark., 2017). Çekirdek ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamı (3.39 mg GAE/g) meyve suyu ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamının (1.03 mg GAE/g) yaklaşık üç katıdır. Yapılan çalışmada meyve suyu ve çekirdek ekstraktlarında toplam 47 adet fenolik madde belirlenmiş olup bunlardan bazılarının (pro-kateşik asit, brevifolin karboksilik asit, valoneik asit bilactone gibi) varlığı ilk kez rapor edilmiştir.

## 2.2. *in vitro* Ortamda Sekonder Metabolitlerin Eldesi İle İlgili Çalışmalar

Tanveer ve ark. (2012), *in vitro* koşullarda elde ettikleri tıbbi bitki olan *Citrullus colocynthis* L. fidelerinin yaprak ve boğum arası kalluslarından toluene,  $\alpha$ -spinosterol, tetradekane, pentadekane, heksadekane, oktadekane, henriakton sekonder metabolitlerinin elde edildiğini belirlemişlerdir. Kallus oluşumu ve kallustan elde edilecek sekonder metabolitlere büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin de incelendiği araştırmada en iyi kallus oluşumu 2 mg/l BAP + 3 mg/l NAA yada 3 mg/l BAP + 2 mg/l NAA eklenen MS besin ortamında elde edilmiştir.

Chakraborty ve ark. (2013) withanolides ve withaferin gibi çok önemli sekonder metabolitlerin kaynağı olan tıbbi bitki *Withania somnifera* L. ile yaptıkları çalışmada kallus kültürü ile sekonder metabolit üretimi ve sürgün rejenerasyonu üzerine büyümeyi düzenleyici maddelerin etkisini araştırmışlardır. En iyi sürgün gelişimi BAP ve IBA içeren besin ortamlarında, yeşil renkli sert kallustan elde edilirken, 0.5 mg/l 2,4 D ile 0.2 mg/l Kinetin içeren MS besin ortamında % 98 oranında kallus elde ettiklerini bildirmişlerdir.

### 2.2.1. *in vitro* ortamda sekonder metabolit üretiminde elisitör kullanımı ile ilgili çalışmalar

Biyotik yada abiyotik stres koşulları altındaki bitkiler savunma mekanizmalarını uyaran bir takım endojen bileşikler üretmektedir. Bu sinyallerden bazıları; salisilik asit (Malamy ve Klessig, 1992; Patel ve Krishnamurthy, 2013), etilen (Ohtsubo ve ark., 1999) ve jasmonatlardır (Farmer ve Ryan, 1992; Gundlach ve ark., 1992; Hiraga ve ark., 2000). Jasmonik asit ile onun metil esteri olan metil jasmonatın yüksek yapılı bitkilerde aktif savunma mekanizmasında rol alan önemli fitoaleksinler olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. (Sökmen ve Gürel, 2001; Theis ve Lerdau, 2003; Patel ve Krishnamurthy, 2013). Hücre kültürlerinde büyümeyi düzenleyici maddelerin sekonder metabolit birikiminde etkili oldukları belirlenmiş olup, bu yönde de çalışmalar yapılmıştır. Büyümeyi düzenleyici maddelerin hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin birikimi üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada, Narayan ve ark. (2005), Nantes Scarlet 104 havuç çeşidine ait kültürlerde antosiyanin sentezi üzerine 2,4-D, NAA, indol asetik asit (IAA), indol bütirik asit (IBA), kinetin, BAP, ve 2-isopentiladeninin etkilerini incelemişlerdir. Kullanılan tüm büyümeyi düzenleyici maddelerin, antosiyanin sentezini belli bir noktaya kadar düzenli olarak artırdığı, maksimum antosiyanin birikiminin ise 2.5 mg/l IAA'nın kullanıldığı ortamdan elde edildiği ve bu ortamı 1.0 mg/l NAA kullanılan ortamın takip ettiği bildirilmiştir.

Hücre süspansiyon kültüründe cin biberine (*Capsicum frutescens* Mill) salisilik asit ve ya metil jasmonatın tek başına yada birlikte uygulanmalarının kapsaisin üretimindeki etkinliğinin belirlendiği çalışmada her iki maddenin tek başına uygulanmasının birlikte uygulanmasından daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Kültür ortamına 0.05 µM MeJA ve ya 200 µM salisilik asit ayrı ayrı ilave edildiklerinde biberin kapsaisin miktarının kontrole kıyasla daha yüksek (1.5 kat) olduğu belirlenmiştir. Kültürün 12. gününde kapsaisin miktarının en yüksek seviyede olduğu kaydedilmiştir (Sudha and Ravishankar, 2003).

Pasqua ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada tıbbi bitkilerden *Camptotheca acuminata* bitkisine ait hücre kültürlerinde antosiyanin üretimi üzerine büyümeyi düzenleyici maddelerin ve sakkarozun etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Büyümeyi düzenleyici maddelerin etkilerini belirlemek amacıyla 117 mM sakkaroz içeren B5 besin ortamına farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda 2,4-D, kinetin, BAP, NAA ilave edilmiştir. Sakkarozun etkisini belirlemek amacı ile farklı konsantrasyonlarda (117, 292, 350 ve 438 mM) sakkaroz, 4.5 µM 2,4-D ve 2.3 µM kinetin içeren ortam kullanılmıştır. Araştırma sonucunda, sakkarozun antosiyanin üretimini artırıcı yönde etkisinin bulunduğu ayrıca antosiyanin sentezinin artırılmasında kinetin önemli bir bitki büyüme düzenleyici olduğu belirlenmiştir.

Kekik bitkisinin thymol içeriğine bazı abiyotik elisitörlerin (sakkaroz, NaCl, prolin) etkilerinin araştırıldığı çalışmada farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda 2,4-D, NAA, BA ve kinetin içeren MS besin ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarından en iyi kallus oluşumunun 0.5 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l BA ilave edilen besin ortamlarında elde edildiği belirtilmiştir. Elisitörlerin ilave edildiği kültürlerde kallusların kontrol gruplarına kıyasla daha küçük kaldığı görülmüştür. Kallusların küçülmesine sebep olan prolin ve sakkarozun örneklerdeki thymol miktarını artırdığı ancak NaCl uygulamasının thymol miktarını yaklaşık yarı yarıya azalttığı belirlenmiştir (Al-Jibouri ve ark., 2012).

Çetin ve ark. (2013), Öküzgözü üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde bazı fenolik bileşiklerin üretimine kadmiyum klorür uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, B5 (Gamborg ve ark., 1968) besin ortamının makro elementleri, MS ortamının mikro elementleri, Morel (Morel, 1970) ortamının vitaminleri ile 0.1 mg/l NAA, 0.2 mg/l kinetin ve 250 mg/l kazain hidrolizat katkılı sıvı besin ortamında kültüre alınan kalluslara bir hafta sonunda 1.0 ve 1.5 mM kadmiyum klorür uygulanmıştır. Araştırmada kadmiyum klorür uygulamalarının incelenen tüm fenolik bileşik miktarlarını olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.

Mendhulkar ve Vakil (2013) tarafından yürütülen çalışmada hint ekinezyasına (*Andrographis paniculata*) biyotik ve abiyotik elisitör uygulayarak toplam flavonoid

kapsamındaki değişimi belirlemiştir. Hücre kültüründe salisilik asit dört farklı doz (kontrol, 0.05, 0.5, 1.5 mM) ve üç farklı sürede (24, 48 yada 72 saat) uygulanmıştır. 0.05 mM konsantrasyondaki 24 saat salisilik asit uygulamasının hint ekinezyası bitkisinin toplam flavonoid kapsamını kontrol grubuna göre 1.39 kat fazla artırmıştır.

Mahalakshmi ve ark. (2013) biyo-yakıt üretiminde kullanılan hint fıstığı (*Jatropha curcas* L.) bitkisinin kalluslarına *in vitro* koşullarda salisilik asit uygulayarak alkan ve yağ asitleri miktarına etkisini belirlemeyi amaçlamışlardır. NAA (0.5 mg/l) ve KN (0.1 mg/l) içeren MS besin ortamında kültüre alınan kalluslara hücre süspansüyon kültüründe 15 gün, karanlık ortamda 200, 300, 400 ve 500 µM dozunda SA uygulanmıştır. Kalluslara 200 µM dozunda SA uygulandığında plastik, boya, zirai ilaç, kozmetik ve deterjan sanayileri için önemli bir hammadde olan alkanların kalluslardaki seviyesi kontrole kıyasla 2 kat fazla ölçülürken uygulanan doz 300 µM ın üzerine çıktığında alkan üretiminin olmadığı bildirilmiştir. Kalluslardan elde edilen yağ asidi miktarının 200 µM dozunda SA uygulandığında kontrole kıyasla 5.6 kat fazla olduğu kaydedilmiştir.

Kikowska ve ark. (2015) *in vitro* koşullarda, tıbbi ve aromatik bitki grubunda yer alan *Eryngium planum* L. bitkisinde rozmarinik asit, klorjenik asit ve kafeik asit sentezine olan etkilerini araştırmak amacıyla sürgün kültürlerine metil jasmonat, maya ekstraktı ve sakkaroz uygulamışlardır. Araştırmada 1.0 mg/l BA ve 0.1 mg/l IAA içeren sıvı MS besin ortamındaki *Eryngium planum* L. sürgünlerine 48 saat uygulanan 100 µM MeJA dozunun en etkili uygulama olduğu ve fenolik asitlerin üretimini 4.5 kat artırdığı belirlenmiştir.

Piatczak ve ark. (2016) Çin, Japonya ve Kore’de doğal olarak yetişen 50 önemli tıbbi bitkiden biri olan Çin yüksük otuna (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) *in vitro* koşullarda SA ve MeJA’nın sekonder metabolit üretimine olan etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla sıvı WPM (Woody Plant Media) besin ortamında kültüre alınan köklere 72 ya da 120 saat 50, 100, 150 ve 200 µM dozunda MeJA, SA ya da her iki elisitörün 50 µM MeJA + 50 µM SA, 100 µM MeJA + 100 µM SA

kombinasyonları kullanılarak en uygun elisitör dozu ve uygulama süresi belirlenmeye çalışılmıştır.

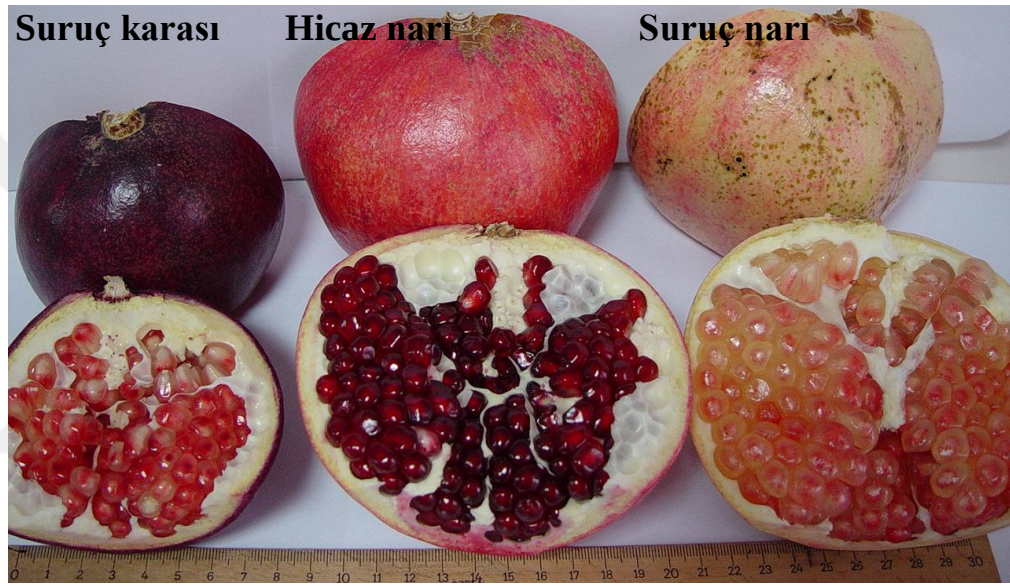
Çetin ve Baydar (2016) üç üzüm çeşidinin (Gamay, Kalecik karası ve Öküzgözü) yaprak saplarından elde ettikleri hücre süspansiyon kültürlerine farklı dozlarda  $CdSO_4$ , MeJA, sakkaroz ve floresan radyasyonu uygulaması yaparak adı geçen elisitörlerin, kallus fenolik bileşik üretimine etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda kullanılan elisitörlerin üzümde fenolik madde üretimini artırdığı ortaya konulmuştur.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada Hicaz narı, Suruç narı ve Suruç karası olmak üzere 3 farklı nar çeşidinin meyveleri ve kallus elde etmek üzere bu çeşitlerin yaprakları materyal olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Araştırmada kullanılan nar çeşitleri

Meyve renkleri farklı üç nar çeşidinin yaprak kallus kültürlerinde sekonder metabolit üretim düzeyi ile narların meyve ekstraktlarındaki sekonder metabolit kapsamalarının karşılaştırıldığı bu doktora tez çalışmasındaki bitkisel materyaller, Suruç'taki üretici bahçelerinden meyvelerin tam olgunluğa ulaştıkları dönemde hasat edilmiştir (Şekil 3.1).

**Suruç Narı:** Şanlıurfa'nın Suruç ilçesinde yetiştirilen yerel çeşitlerdendir. Kabuk zemin rengi sarıdır olgunlukla birlikte yer yer pembeleşir. Meyveler çok iridir. Daneler iri ve pembe, meyve mayhoş-tatlıdır, çekirdekler iri ve orta serttir. Meyve kabuğu incedir, kolay çatlar.



Şekil 3. 2. Sulu nar çeşidinin meyvesi

**Hicaz Narı:** Ülkemizde Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde nar bahçesi tesisinde öncelikle Hicaz çeşidi tercih edilmektedir. Bu çeşit kabuk ve dane renginin koyu olmasından dolayı yüksek albeniye sahiptir. Yola ve depolamaya dayanımı çok yüksektir. Daneler küçük, meyve mayhoş-ekşidir, çekirdekler serttir, meyve kabuğu kalın ve çatlamaya orta derecede dayanıklıdır.



Şekil 3. 3. Hicaz nar çeşidinin meyvesi

**Sulu Karası:** Şanlıurfa'nın Sulu ilçesinde yetiştirilen yerel çeşitlerdendir. Kabuk rengi siyaha yakın bordodur. Meyveler küçük ve çok ekşi olduğundan pazar değeri yoktur. Daneler küçük, beyaz-kırmızıdır, çekirdekler büyük ve çok serttir. Meyve kabuğu çok kalın ve çatlamaya dayanıklıdır.



Şekil 3. 4. Suruç karası nar çeşidi (Kaynak: [www.nizip.com](http://www.nizip.com))

### 3.2. Yöntem

Araştırmada kullanılan çeşitlere ait meyvelerin sekonder metabolit seviyeleriyle *in vitro* koşullarda üretilerek farklı uyarıcılarla (elisitörler) oluşturulan abiyotik strese maruz bırakılmış kallusların sekonder metabolit seviyeleri ve buna bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin incelendiği bu tez çalışmasının birbirini takip eden aşamaları şunlardır:

#### 3.2.1. Bitkisel materyallerin temini

Araştırmada materyal olarak Şanlıurfa'nın Suruç ilçesindeki üreticilere ait kapama nar bahçelerinden temin edilen Suruç, Hicaz ve Suruç karası çeşitlerine ait narlar kullanılmıştır. Meyveler 18.10.2013 tarihinde her bir çeşide ait sağlıklı 10'ar ağaçtan en az 4'er tane olacak şekilde hasat edilerek hemen Harran Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarına getirilmiştir.

### 3.2.2. Pomolojik ölçümler

Laboratuvara getirilen meyveler yıkanıp kurulandıktan sonra homojen gruplar oluşturularak üzerlerinde pomolojik ölçümler yapılmıştır. Çeşitlerin meyve ağırlıkları ve 100 tane ağırlıkları belirlemiştir.

### 3.2.3. Bitkisel materyallerin analizlere hazırlanması

Her bir çeşidi temsil edecek şekilde seçilen meyveler danelenerek suda çözünebilir kuru madde (SÇKM), pH ve titrasyon asitliklerinin ölçülebilmesi için hazırlanmıştır.

#### 3.2.3.1. Dane örneklerinin ekstraksiyonu

Örneklerin ekstraksiyonu için, çekirdekleri çıkarılarak soğuk blender içerisinde püre haline getirilen 20 g daneden elde edilen homojenat, % 0.1 HCl içeren 100 ml etanol içerisinde 24 saat karanlıkta maserasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra ekstraktlar Whatman No.1 kağıdından vakum altında filtre edildikten sonra, posa renksiz oluncaya kadar aynı çözücü ile ekstraksiyona devam edilmiştir. Ekstraksiyonun 10 ml'lik kısmı toplam antosiyanin analizinde kullanılmak üzere ayrılmış, kalan ekstraktlar rotary evaporatörde, 50 °C'de alkollerini uçurularak konsantre hale getirilerek fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. Nar meyve danelerinin etanolik ekstraksiyonları

### 3.2.3.2. Kabuk örneklerinin ekstraksiyonu

Örneklerin ekstraksiyonu için, soğuk blender içerisinde püre haline getirilen 20 g kabuktan oluşan homojenat, % 0.1 HCl içeren 100 ml etanol içerisinde 24 saat karanlıkta maserasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra ekstraktlar Whatman No.1 kağıdından vakum altında filtre edildikten sonra, posa renksiz oluncaya kadar aynı çözücü ile ekstraksiyona devam edilmiştir (Şekil 3.6). Ekstraksiyonun 10 ml'lik kısmı toplam antosiyanin analizinde kullanılmak üzere ayrılmış, kalan ekstraktlar rotary evaporatörde, 50 °C'de alkollerini uçurularak konsantre hale getirilerek fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3. 6.Nar meyve kabuklarının etanolik ekstraksiyonları

### 3.2.3.3.Çekirdek örneklerinin ekstraksiyonu

Örneklerin ekstraksiyonu için, soğuk blender içerisinde püre haline getirilen 2.5 g çekirdekten oluşan homojenat, % 0.1 HCl içeren 100 ml etanol içerisinde 24 saat buzdolabında maserasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra ekstraktlar Whatman No.1 kağıdından vakum altında filtre edildikten sonra, posa renksiz oluncaya kadar aynı çözücü ile ekstraksiyona devam edilmiştir (Şekil 3.7). Ekstraksiyonun 10 ml'lik kısmı toplam antosiyanin analizinde kullanılmak üzere ayrılmış, kalan ekstrakt rotary evaporatörde, 50 °C'de alkollerini uçurularak konsantre hale getirilerek fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3. 7. Nar çekirdeklerinin etanolik ekstraksiyonları

### 3.2.4. Suda çözünabilir kuru madde tayini (SÇKM)

Örneklerde suda çözünür kuru madde (briks), el refraktometresi (Atago, N-50E, Tokyo, Japonya) yardımıyla belirlenmiştir.

### 3.2.5. pH ve titrasyon asitliği tayini

pH değeri, pH-metre (ProLine Plus Dijital pH meter) kullanılarak saptanmıştır. Bu amaçla, 10 g nar danesi 100 ml dH<sub>2</sub>O ilave edilerek soğuk blender içerisinde parçalandıktan sonra pH değeri belirlenmiştir. Takiben, 0.1 N NaOH ile pH 8.1'e ulaşıncaya kadar titre edilmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında yapılmıştır. Titre edilebilir asit (TA) miktarı, 10 ml nar suyunu 0.1 N NaOH ile pH 8.1'e kadar titre edilerek harcanan NaOH miktarından hesaplanmıştır ve g sitrik asit/100 ml olarak ifade edilerek (Cemeroğlu, 2007), titre edilebilir asitlik aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (3.1).

$$\text{Titre Edilebilir Asitlik (\%)} = (V)(E)(100)/M \quad (3.1)$$

V: Harcanan 0.1N NaOH miktarı (ml)

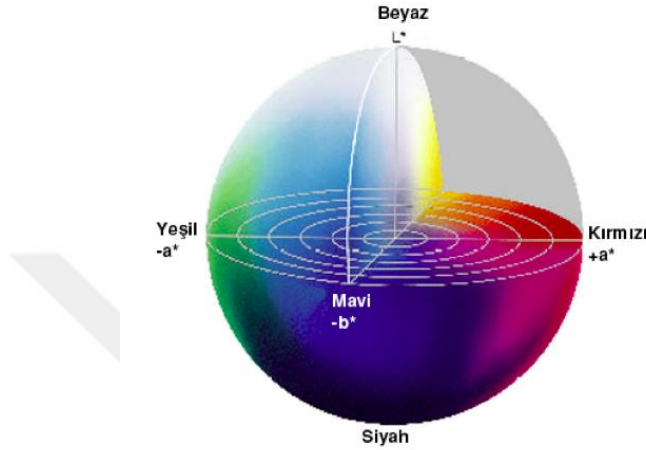
E: 1 ml 0.1 N NaOH'in eşdeğeri asit miktarı (g)

M: Titre edilen örneğin gerçek miktarı (ml)

### 3.2.6. Hue değerlerinin belirlenmesi

Meyve ekstraktlarının renk ölçümleri için Colour Quest XE, USA cihazı kullanılmıştır. CIE L\*, a\* ve b\* renk düzleminde L\*, a\*, ve b\* cinsinden hue açısı

( $h^0 = \tan^{-1} \times b^* / a^*$ ) değerlerine dönüştürülerek hesaplanmıştır. Kullanılan düzlemde  $a^*$  değeri, kırmızılık-yeşillik,  $b^*$  değeri sarılık-mavilik olarak ifade edilmektedir. Hue açısı bir renk dairesi olup kırmızı-mor renkler  $0^\circ - 360^\circ$  arasındaki açı değerini almakta iken, sarı  $90^\circ$  açı değerini, mavimsi-yeşil renkler ise  $180^\circ - 270^\circ$  arasındaki açı değerini almaktadır (McGuire, 1992; Öztürk ve ark., 2013). (Şekil 3.8)



Şekil 3.8. Hue açısını gösteren renk dairesi (www. cmyklinik.com /cms/index.php?option=com\_content&view=article&id=56:renk-evren-modellerinin-matbaacık-sektoerundeki-kullanım Erişim tarihi: 04.04.2018)

### 3.3. Kallus Kültürü

#### 3.3.1. Kültür ortamının hazırlanması

Kallusların elde edileceği MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamına (Çizelge 3.1) 30 g/l sakkaroz, 6 g/l agar ve bitki büyüme düzenleyicileri (benzil amino pürin, naftalen asetik asit) ilave edilerek ortamın pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 500 ml'lik erlenlere 250 ml olacak şekilde bölünen besin ortamları,  $121^\circ\text{C}$  sıcaklıkta ve 1.2 atm'deki otoklavda 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Ardından 9 cm çaplı steril plastik petrilere yaklaşık 20'şer ml besi ortamı gelecek şekilde dağıtılmıştır. MS kültür ortamına Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BA (benzil amino pürin) ve NAA (naftalen asetik asit) ilave edilerek kallus eldesi ve çoğaltımı için en uygun besi ortamı içeriğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 3. 1. MS Kültür ortamının bazal tuz ve vitamin içeriği

| MS Bazal Tuz ve Vitamin Karışımı                                                                                                                                                                                                      |                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Stok Solüsyonlar                                                                                                                                                                                                                      |                                |
| (gr/l)                                                                                                                                                                                                                                |                                |
| <b>Stok solüsyon A (x20)</b><br>NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1650 (mg/l)                                                                                                                                                           | 82.5                           |
| <b>Stok solüsyon B (x20)</b><br>KNO <sub>3</sub> 1900 (mg/l)                                                                                                                                                                          | 95.0                           |
| <b>Stok solüsyon C (x20)</b><br>Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O 37.3 (mg/l)<br>FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 27.8 (mg/l)                                                                                                 | 1.865<br>1.390                 |
| <b>Stok solüsyon D (x5)</b><br>CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O 440 (mg/l)                                                                                                                                                         | 88.0                           |
| <b>Stok solüsyon E (x5)</b><br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 170 (mg/l)                                                                                                                                                             | 34.0                           |
| <b>Stok solüsyon F (x5)</b><br>H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6.2 (mg/l)<br>Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O 0.25 (mg/l)<br>CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O 0.025 (mg/l)<br>KI 0.83 (mg/l)                      | 1.24<br>0.05<br>0.005<br>0.166 |
| <b>Stok solüsyon G (x5)</b><br>MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 370 (mg/l)<br>MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 16.9 (mg/l)<br>ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O 8.6 (mg/l)<br>CuSO <sub>5</sub> 5H <sub>2</sub> O 0.025 (mg/l) | 74.0<br>3.38<br>1.725<br>0.005 |
| <b>Vitamin</b><br><b>Stok solüsyonu H (x1)</b>                                                                                                                                                                                        | gr/100 ml                      |
| Nikotinic asit 0.5 (mg/l)                                                                                                                                                                                                             | 0.05                           |
| Pyrodoxin HCl 0.5 (mg/l)                                                                                                                                                                                                              | 0.05                           |
| Thiamine HCl 0.1 (mg/l)                                                                                                                                                                                                               | 0.01                           |
| Myo-inositol 100 (mg/l)                                                                                                                                                                                                               | 10                             |
| Glisin 2 (mg/l)                                                                                                                                                                                                                       | 0.2                            |

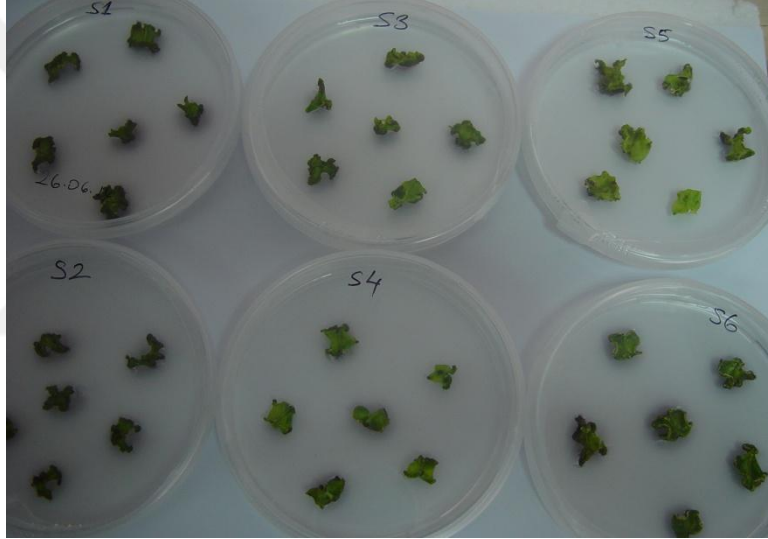
Çizelge 3. 2. Farklı konsantrasyon ve kombinasyonda BA ve NAA içeren MS Kültür Ortamları

| MS Besi Ortamı Numarası | BA (mg/l) | NAA (mg/l) |
|-------------------------|-----------|------------|
| 1                       | 1         | 0.4        |
| 2                       | 1         | 0.8        |
| 3                       | 2         | 0.4        |
| 4                       | 2         | 0.8        |
| 5                       | 3         | 0.8        |
| 6                       | 3         | 1.6        |

### 3.3.2. Yaprak ayası eksplantlarının yüzey sterilizasyonu ve kültüre alınması

Suruç, Hicaz ve Suruç karası nar çeşitlerine ait 15-20 cm boyundaki taze sürgünler laboratuvara getirilerek akan su altında 30 dakika bekletildikten sonra 4-5

yaprak taşıyan sürgün uçları alınarak 1-2 damla Tween 20 içeren % 10 luk sodyum hipoklorit (% 0.5 NaOCl) çözeltisinde 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 5'er dakika 3 defa steril dH<sub>2</sub>O ile durulanarak eksplantların yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Steril kabin içinde steril kurutma kağıdı üzerine alınan yaprak ayaları 5x5 mm'lik parçalara ayrılarak içeriği Çizelge 3.2'de verilen 6 farklı besi ortamına üst yüzeyleri ortama temas edecek şekilde petrilere yerleştirilmiştir. Her bir petriye 6'şar yaprak yerleştirilmiş ve her bir ortam için 12'şer petri kullanılmıştır (Şekil 3.9). Daha sonra yaprak eksplantları 25°C'de ve serin beyaz ışık veren floresan lambaları (3000 lüks) ile aydınlatılan, 16 saat gün uzunluğuna sahip iklim odasında kültüre alınmıştır.



Şekil 3. 9. Altı farklı besi ortamında kültüre alınan yaprak eksplantları

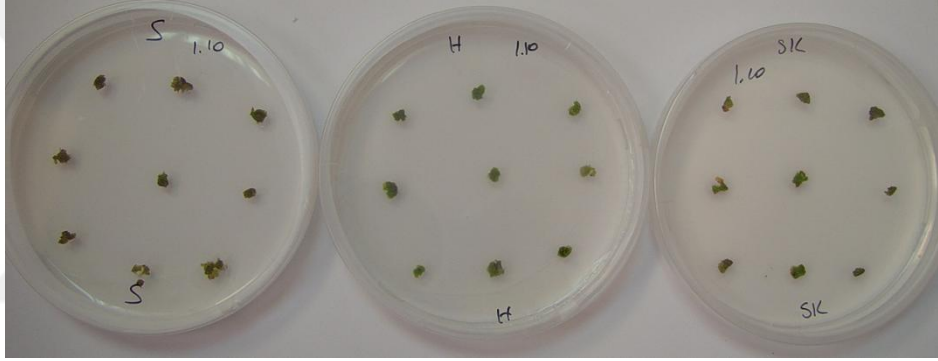
### 3.3.3. Kallus çoğaltımı

Altı hafta sonunda, yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslar (Şekil 3.10), 1 mg/l BA ve 0.4 mg/l NAA içeren MS (Murashige ve Skoog) kallus çoğaltma ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.11). 30 g/l sakkaroz ve 6 g/l agar eklenen besi ortamının pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 500 ml'lik erlenlere 250 ml olacak şekilde bölünen besin ortamları, 121°C sıcaklıkta ve 1.2 atm'deki otoklavda 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir.



Şekil 3. 10. Yaprığın kesik kenarlarında kallus oluşumu (Hicaz narı)

Ardından 9 cm çaplı steril plastik petrilere yaklaşık 20’şer ml kültür ortamı gelecek şekilde dağıtılmıştır. Denemelerde kullanılan yeterli kallus üretimine ulaşıncaya kadar üç alt kültür işlemi tekrarlanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3. 11. Kallus çoğaltma ortamına aktarılmış kalluslar

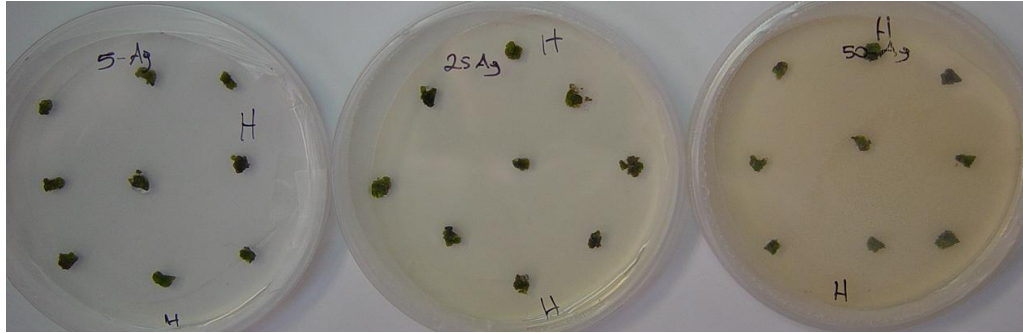


Şekil 3. 12. Alt kültüre alınacak kalluslar

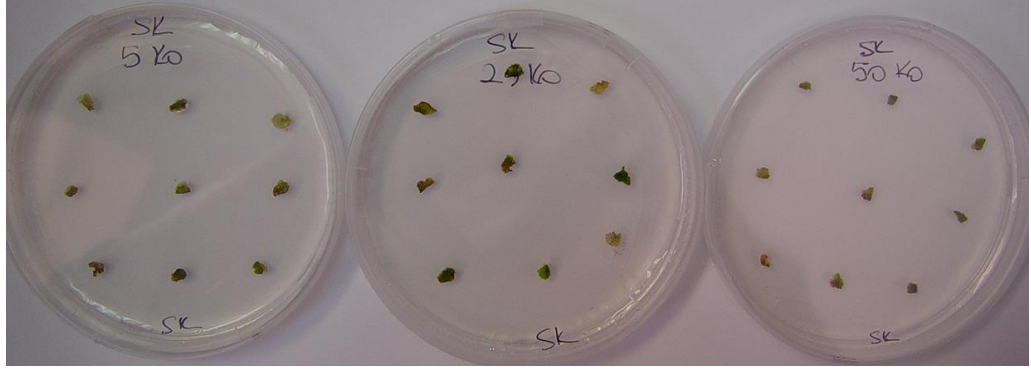
### 3.4. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Uygulamalar

#### 3.4.1. Ağır metal uygulamaları

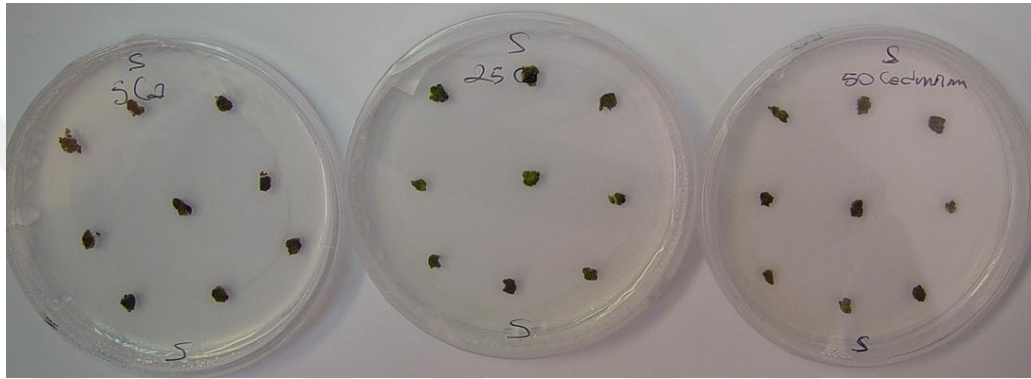
Kallus çoğaltım besi ortamı ile aynı içeriğe sahip MS besi ortamına 0 (kontrol), 5, 25 ve 50  $\mu\text{M}$  olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  ilave edilerek ortamın pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 500 ml'lik erlenlere 250 ml olacak şekilde bölünen besin ortamları, 121°C sıcaklıkta ve 1.2 atm'deki otoklavda 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Ardından 9 cm çaplı steril plastik petrilere yaklaşık 20'şer ml besi ortamı gelecek şekilde dağıtılmıştır. Kalluslar uygun büyükte kesilerek her bir petriye 9'ar adet yerleştirilmiştir (Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15). Her bir uygulama için 12 adet petri kullanılmıştır. Kallus kültürleri 25°C'de ve serin beyaz ışık veren floresan lambaları (3000 lüks) ile aydınlatılan, 16 saat gün uzunluğuna sahip iklim odasında 6 hafta kültüre alınmıştır. Daha sonra fiziksel yapıları incelenen kallusların büyüme indeksleri belirlenmiştir. Kallus örneklerinin ekstraksiyonunda kullanılmak üzere her bir uygulamadan 2.5 g'lık örnekler hazırlanmıştır.



Şekil 3. 13. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{AgNO}_3$  (5, 25 ve 50  $\mu\text{M}$ ) içeren MS kültür ortamlarına kallus ekimi



Şekil 3. 14. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CoCl}_2$  (5, 25 ve 50  $\mu\text{M}$ ) içeren MS kültür ortamlarına kallus ekimi



Şekil 3. 15. Farklı konsantrasyonlarda  $\text{CdCl}_2$  (5, 25 ve 50  $\mu\text{M}$ ) içeren MS kültür ortamlarına kallus ekimi

### 3.4.2. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşiklerin uygulanmaları

Kallus çoğaltım besi ortamı ile aynı içeriğe sahip MS besi ortamına 0 (kontrol), 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda salisilik asit ve metil jasmonat ilave edilerek ortamın pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 500 ml'lik erlenlere 250 ml olacak şekilde bölünen besin ortamları, 121°C sıcaklıkta ve 1.2 atm'deki otoklavda 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Ardından 9 cm çaplı steril plastik petrilere yaklaşık 20'şer ml besi ortamı gelecek şekilde dağıtılmıştır. Kalluslar uygun büyükte kesilerek her bir petriye 9'ar adet yerleştirilmiştir. Her bir uygulama için 12 adet petri kullanılmıştır. Kallus kültürleri 25°C'de ve serin beyaz ışık veren floresan lambaları (3000 lüks) ile aydınlatılan, 16 saat gün uzunluğuna sahip iklim odasında 6 hafta kültüre alınmıştır. Daha sonra fiziksel yapıları incelenen kallusların büyüme indeksleri belirlenmiştir. Kallus örneklerinin ekstraksiyonunda kullanılmak üzere her bir uygulamadan 2.5 g'lık örnekler hazırlanmıştır.

### 3.4.3. Dokularda osmotik strese neden olan kimyasalların uygulanmaları

Kallus çoğaltım besi ortamı ile aynı içeriğe sahip MS besi ortamına 0 (kontrol), 20, 40 ve 60 g/l olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda sorbitol, sakkaroz veya polietilen glikol (PEG) ilave edilerek ortamın pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 500 ml'lik erlenlere 250 ml olacak şekilde bölünen besin ortamları, 121°C sıcaklıkta ve 1.2 atm'deki otoklavda 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Ardından 9 cm çaplı steril plastik petrilere yaklaşık 20'şer ml besi ortamı gelecek şekilde dağıtılmıştır. Kalluslar uygun büyükte kesilerek her bir petriye 9'ar adet yerleştirilmiştir. Her bir uygulama için 12 adet petri kullanılmıştır. Kallus kültürleri 25°C'de ve serin beyaz ışık veren floresan lambaları (3000 lüks) ile aydınlatılan, 16 saat gün uzunluğuna sahip iklim odasında 6 hafta kültüre alınmıştır. Daha sonra fiziksel yapıları incelenen kallusların büyüme indeksleri belirlenmiştir. Kallus örneklerinin ekstraksiyonunda kullanılmak üzere her bir uygulamadan 2.5 g'lık örnekler hazırlanmıştır.

### 3.5. Kallus Büyüme İndekslerinin Belirlenmesi

Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda AgNO<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub> ve CdCl<sub>2</sub> (0, 5, 25 ve 50 µM); salisilik asit veya metil jasmonat (0, 10, 50 ve 100 µM); sorbitol, sakkaroz veya polietilen glikol (PEG) (0, 20, 40 ve 60 g/L) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Başlangıçta her petriye 20 mg'lık 9 adet kallus yerleştirilmiş, yaklaşık 6 hafta sonunda kallusların ilk ve son ağırlıkları karşılaştırılarak nar kalluslarının büyüme indeksleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (3.2).

$$\text{Büyüme İndeksi (g): Son Ağırlık (g) - İlk Ağırlık (g) / İlk Ağırlık (g)} \quad (3.2)$$

### 3.6. Kallus Örneklerinin Ekstraksiyonu

Örneklerin ekstraksiyonu için, porselen havanda püre haline getirilen 2.5 g kallustan elde edilen homojenat, % 0.1 HCl içeren 25 ml etanol içerisinde 24 h karanlıkta maserasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra ekstraktlar Whatman No.1 kağıdından vakum altında filtre edildikten sonra, posa renksiz oluncaya kadar aynı

çözücü ile ekstraksiyona devam edilmiştir. Ekstraksiyonun 5 ml'lik kısmı toplam antosiyanin analizinde kullanılmak üzere ayrıldıktan sonra kalan ekstraktlar diğer analizlerde kullanılmak üzere rotary evaporatörde, 50°C'de alkollerini uçurularak konsantre hale getirilmiştir.

### 3.7. Çalışmada Yapılan Analizler

#### 3.7.1. Toplam antosiyaninlerin belirlenmesi

Ekstraktların TA içerikleri Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından belirtilen pH-differansiyel yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu yöntemine göre, 0.025 M KCl tamponu (2.5 ml) (pH 1.0) ve 0.4 M CH<sub>3</sub>COONa tamponu (pH 4.5) içinde 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona tabi tutulan ekstraktların (0.5 ml) spektrofotometrik absorpsiyonları 520 ve 700 nm de ölçülecek ve absorbans değerleri aşağıdaki formülle bulunmuştur (3.3).

$$A = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH 1.0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH 4.5} \quad (3.3)$$

Wrolstad (1976)'a göre toplam antosiyanin miktarı ise aşağıda belirtildiği gibi hesaplanmıştır (3.4).

$$TA \text{ (mg/kg)} = A \times MA \times SF \times 1000 / \epsilon \times l \quad (3.4)$$

A: absorbans

MA: siyanidin-3-glukosid'in moleküler ağırlığı (449.2 g/mol)

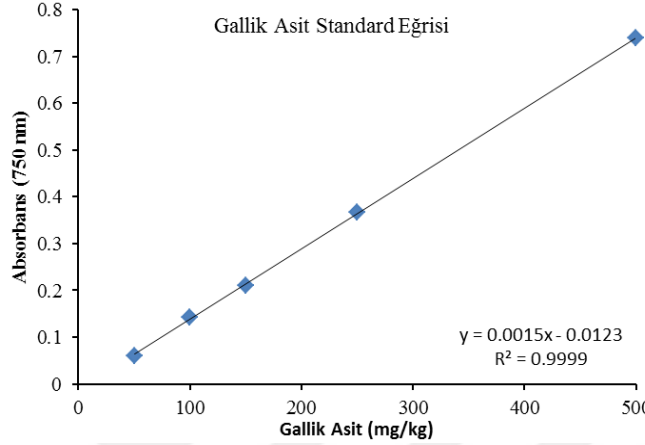
SF: seyreltme faktörü

$\epsilon$ : molar absorpsiyon katsayısı (26.900)

#### 3.7.2. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Nar kallus ekstraktlarının TP içerikleri Slinkard ve Singleton (1977) metodunun modifikasyonu ile belirlenmiştir. Test tüplerindeki (0.02 ml) örneklerle sırasıyla 2.480 ml dH<sub>2</sub>O ve 0.2 ml Folin-Ciocalteu's ayracı eklenmiştir. Yaklaşık 8

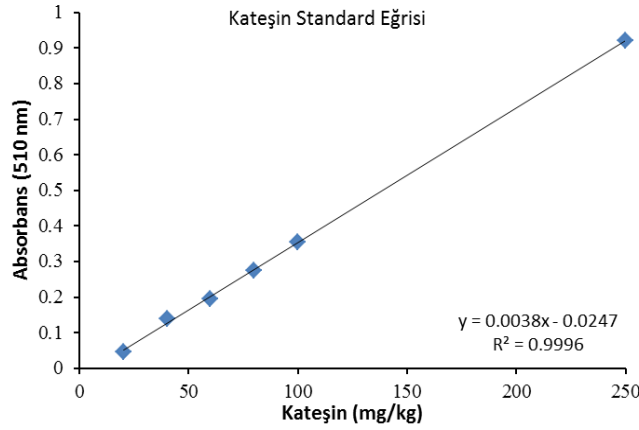
dakika sonra karışımlara  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.30 ml) ilave edilerek homojen şekilde karışımı sağlanmıştır. Daha sonra karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra örneklerin absorbans değerleri 750 nm’de okunmuş ve kallus ekstraktlarındaki toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları (mg/kg), gallik asit standart grafiği kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3. 16. Gallik asit standart grafiği

### 3.7.3. Toplam flavonoidlerin belirlenmesi

Örneklerin toplam flavonoid içerikleri Zhishen metodu (Zhishen ve ark., 1999) olarak belirtilen alüminyum klorid kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir. Bu metoda göre, 10 ml’lik ölçü silindirine 1 ml kallus ekstraktı, kalibrasyon için ise; standart kateşin solüsyonu (20, 50 80, 100, 250 mg/l) konulduktan sonra 4 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , % 5’lik  $0.3 \text{ ml NaNO}_2$  ilave edilmiştir. 5 dakika sonra, karışıma % 10’luk  $\text{AlCl}_3$  dan 0.3 ml eklenmiştir. Daha sonra 6. Dakikada karışıma 1 M  $\text{NaOH}$  den 2 ml ilave edilerek toplam hacim 10 ml’ye  $\text{dH}_2\text{O}$  ile tamamlanmıştır. Solüsyon iyice karıştırıldıktan sonra örneklerin absorbansları spektrofotometrenin 510 nm dalga boyunda ekstrakt içermeyen köre karşı okunmuştur. Örneklerin toplam flavonid içerikleri mg kateşin eşdeğeri (KE)/kg taze ağırlık olarak ifade edilmiştir (Şekil 3.17)



Şekil 3. 17. Kateşin standart grafiği

### 3.7.4. DPPH serbest radikalini süpürülmesi

Örneklerin DPPH serbest radikalini süpürme gücü, Blois (1958) tarafından önerilen 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) metodu ile ölçülmüştür. Etanol ile seyreltilerek elde edilen değişik konsantrasyonlardaki kallus ekstraktlarına 2.9 ml DPPH (0.1 mM) eklendikten sonra karışımın absorbans değeri 517 nm de 15 dk sonunda ölçülmüştür. Her bir uygulamaya ait örneğin serbest radikali indirgeme kapasitesi aşağıda belirtilen formül aracılığıyla % olarak belirlenmiştir (3.5).

$$\text{DPPH İnhibasyonu (\%)} = [(A_k - A_ö) / A_k \times 100] \quad (3.5)$$

$A_k$ : Kontrol absorbansı

$A_ö$ : Örneklerin absorbansı

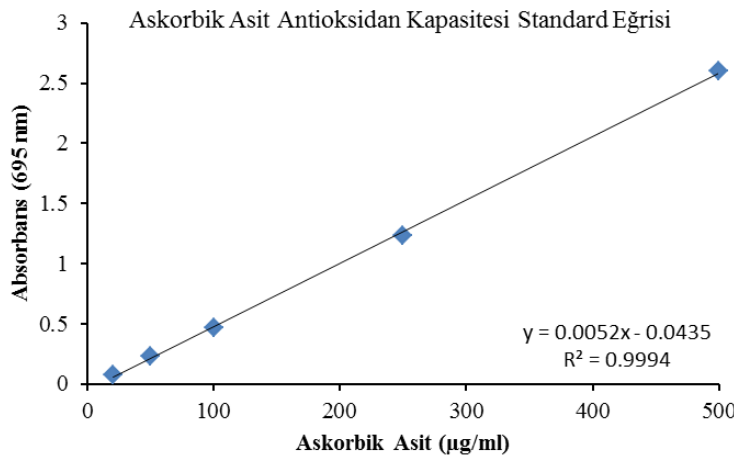
### 3.7.5. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Araştırmada örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri Fosfomolibden ve FRAP metodlarıyla belirlenmiştir.

#### 3.7.5.1. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Fosfomolibden metodunun temel prensibi, bitki ekstraktları tarafından Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenerek asidik ortamda yeşil fosfat Mo (V) bileşiğinin oluşmasıdır. Prieto ve ark., (1999) metoduna göre 0.3 ml (20 µg/ml) kallus ekstraktı 3

ml ayraç solüsyonu ile karıştırılarak reaksiyon solüsyonu (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat, 4 mM amonyum molibdat) 95°C'de 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra örnekler hızlıca kırık buz içinde soğutularak 695 nm'de absorbansları okunmuştur. Elde edilen değerler, pozitif kontrol olarak kullanılan Askorbik asidin farklı konsantrasyonlarda (20-250 mg/ml) hazırlanan askorbik asit standart eğrisinden yararlanılarak µg askorbik asit eşdeğeri (mg AE/ml) olarak ifade edilmiştir (Şekil 3.18).

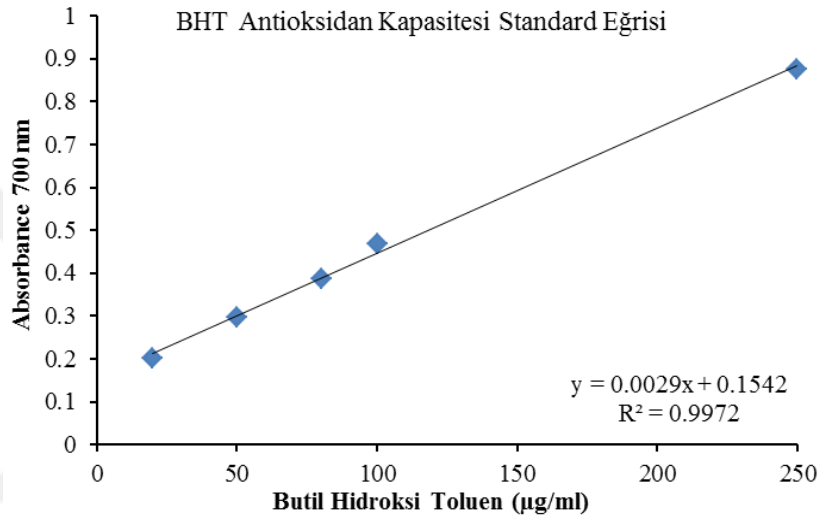


Şekil 3. 18. Askorbik asit antioksidan kapasitesi standart grafiği

### 3.7.5.2. FRAP metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

İndirgeme Kuvveti Tayini (FRAP), araştırmada elde edilen etanolik kallus ekstraksiyonlarının indirgeme gücü Oyaizu (1986) metoduna göre yapılmıştır. Farklı indirgeme potansiyeline sahip ekstraktlar potasyum ferrisiyanat ( $[K_3Fe(CN)_6]$ ) ile reaksiyona girdiğinde  $Fe^{+3}$  iyonları indirgenerek potasyum ferrosiyanat ( $Fe^{+2}$ ) oluşur. Daha sonra potasyum ferrosiyanat,  $FeCl_3$  ile reaksiyona girdiğinde maksimum absorpsiyonu 700 nm olan ferric ferrous kompleksi oluşur. Oyaizu metoduna göre, indirgeme potansiyeline sahip 1 ml'lik etanolik kallus ekstraktları (20 µg/ml), 2.5 ml fosfat tampon çözeltisi (0.2 pH:6.6) ve 2.5 ml % 1'lik potasyum ferrisiyanat ( $[K_3Fe(CN)_6]$ ) çözeltisi 15 ml'lik falkon tüplerinde karıştırılmıştır. Karışım 50°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra kırık buz içinde hızlıca soğutulmuştur. Daha sonra karışımlara 2.5 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edilerek 2000 rpm de 15

dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süzektan alınan 2.5 ml'lik süpernatantın seyreltilmesiyle elde edilen karışıma 0.5 ml % 0.1'lik  $\text{FeCl}_3$  ilave edildikten sonra 700 nm'de absorbanans değerleri okunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan farklı konsantrasyonlardaki Butilhidroksitolünün (BHT) (20-250 mg/ml) kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerin indirgeme kuvveti  $\mu\text{g}$  BHT/ mg taze ağırlık olarak ifade edilmiştir. Konsantrasyon arttıkça artan absorbanans değeri örneklerin indirgeme yeteneğini göstermektedir (Şekil 3.19).



Şekil 3. 19. Butilhidroksitolün Standart grafiği

### 3.7.6. İstatistiksel Analiz

Gerek meyve gerekse nar kallusları üzerinde yapılan ölçüm ve analizler arasındaki farklılığı belirlemek için tüm ölçüm ve analiz parametreleri için her bir çeşide ait örnekler 3 tekerrürlü her tekerrürde en az 3 ölçümün ortalaması alınmıştır. Elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuş ve çeşitler arasındaki farklılığı belirlemek için Least Significant Difference (LSD) testi ( $P \leq 0.05$ ). (SAS Institute, 1995) kullanılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Meyvelerden Elde Edilen Bulgular

Hasatla birlikte aynı gün laboratuvara getirilen meyveler üzerlerinde pomolojik ölçümler yapılmıştır. Çeşitlerin meyve ağırlıkları ve 100 tane ağırlıkları belirlenmiştir. Danelerden elde edilen örneklerde suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği ölçümleri yapılarak, dane, kabuk ve çekirdek örneklerinin ekstraksiyonları hazırlanmıştır. Antosiyanin analizi yapıldıktan sonra örnek ekstraksiyonlarının alkollerle uçurularak toplam fenolik bileşik ve toplam flavonoid kapsamı, DPPH radikalini süpürme kapasiteleri ve toplam antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir.

#### 4.1.1.Meyvelerin pomolojik özellikleri

Araştırmada kullanılan çeşitlerin ortalama meyve ağırlıkları 330.22 ile 633.75 g arasında değişmiştir (Çizelge 4.1). Ortalama meyve ağırlığı bakımından Suruç ve Hicaz çeşitleri arasında istatistiksel fark bulunmazken, Suruç Karası ortalama meyve ağırlığı ile diğerleri arasındaki fark önemli bulunmuştur. Çeşitler arasında en yüksek ortalama meyve ağırlığı 633.75 g ile Suruç çeşidinde ölçülürken, en düşük değer 330.22 g ile Suruç Karasında ölçülmüştür. Hicaz çeşidine ait ortalama meyve ağırlığı 621.42 g olarak belirlenmiştir. Ortalama meyve ağırlığı sıralaması büyükten düşüğe doğru Suruç, Hicaz ve Suruç Karası olarak belirlenmiştir. İkinci ve Kılıç (2016) tarafından Şanlıurfa'da yürütülen çalışmada Siverek ilçesinde yetiştirilen yerel çeşitlerden seçilen 15 nar genotipinde meyve ağırlıklarının 267.72-650.56 g arasında değiştiği bildirilmiştir. Ak ve ark. (2009), Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden seçilen nar çeşitlerinin Şanlıurfa koşullarına adaptasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, Akdeniz Bölgesi'nden seçilen narlarda ortalama meyve ağırlığının 189.9-430.9 g, Ege Bölgesi'nden seçilen narlarda 194.6-312.4 g, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden seçilen narlarda ise 157.4-402.3 g arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Gündoğdu ve ark. (2015) Alata Bahçe Kùltürleri

Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen 11 standart nar çeşidi ile Pervari (Siirt) yöresinde belirledikleri 5 nar genotibi üzerinde yaptıkları çalışmada meyve ağırlıklarının 251.01-530.25 g arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Eroğlu ve ark. (2016)'nın Adıyaman ilinde yetiştirilen ekşi, mayhoş ve tatlı nar genotiplerine ait meyvelerin depolama süresince kalite değişimleri ile fizyolojik ve patolojik bozuklukların belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada tatlı nar genotibine ait meyvelerin ortalama meyve ağırlığının 498.5 g, mayhoş nar genotibine ait meyvelerin ortalama meyve ağırlığının 438.6 g iken ekşi nar genotibine ait meyvelerin ortalama meyve ağırlığının 346.9 g olduğu belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan nar meyvelerinin ortalama ağırlıklarıyla daha önce farklı nar çeşitleri üzerinde yürütülmüş çalışma sonuçlarına göre meyve ağırlıkları arasındaki farklılığın nedenleri olarak; çeşit, kültürel uygulamalar, iklim ve toprak koşulları gibi faktörlerin etkinlikleri söz konusu olabilir.

Bu araştırmada çeşitlere ait 100 dane ağırlıkları arasındaki farkın önemli olduğu, en ağır danelere sahip çeşidin Suruç, en hafif danelere sahip çeşidin ise Suruç Karası olduğu belirlenmiştir. Siverek'te yetiştirilen 15 yerel nar çeşidinin 100 dane ağırlığının ortalama ağırlıklarının 141.33-361.33 g arasında değiştiği belirlenmiştir (İkinci ve Kılıç, 2016).

Çizelge 4. 1. Nar Çeşitlerinin Meyve ve Dane Ağırlıkları, Meyve suyu, Meyve kabuğu Ekstraktları Ortalama (ort değer  $\pm$  sem) Hue° Değerleri

| Çeşitler  | Meyve Ağırlığı<br>(adet/g) | Dane Ağırlığı<br>(100 dane/g) | Dane Hue°           | Kabuk Hue°         | Meyve<br>Ekst. Ren. |
|-----------|----------------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Suruç     | 633.75 $\pm$ 32.58 a       | 61.20 $\pm$ 1.26 a            | 31.36 $\pm$ 1.97 b  | 98.96 $\pm$ 0.01 a | Pembe               |
| Hicaz     | 621.42 $\pm$ 27.26 a       | 35.56 $\pm$ 0.55 b            | 179.02 $\pm$ 1.32 a | 53.77 $\pm$ 0.17 b | Kırmızı             |
| S. Karası | 330.22 $\pm$ 6.58 b        | 32.33 $\pm$ 0.22 c            | 175.99 $\pm$ 0.25 a | 16.23 $\pm$ 0.35 c | Açık Pembe          |

Nar çeşitlerinin pomolojik özellikleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Aynı kolondaki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.1.2.Suda çözünebilir kuru madde tayini (SÇKM)

Araştırmada kullanılan çeşitlerin suda çözünebilir madde miktarları %15.16 ile % 17.50 arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). Çeşitler arasında Suruç Karası %17.50 ile en yüksek suda çözünebilir madde miktarlarına sahip iken Suruç % 15.16 ile en

düşük suda çözünebilir madde miktarlarına sahiptir. Gündoğdu ve ark. (2015)'nın yürüttükleri çalışmada kullandıkları Hicaznar, Silifke aşısı, Katırbaşı, 33N23-Çevlik, 01N04-Fellahyemez, 33N34, İzmir-26, İzmir-23, İzmir-1513, Kuş narı, 33N24 nar çeşitleri ve Pervari (Siirt) yöresine ait 56PER021, 56PER022, 56PER020, 56PER019, 56PER003 nar genotiplerinin SÇKM miktarlarının %11.50-14.62 arasında olduğu kaydedilmiştir. Li ve ark. (2015)'nın Çin'de on nar çeşidi üzerinde yapmış oldukları çalışmada SÇKM miktarları %13.97-16.30 arasında ölçülmüştür.

#### 4.1.3.pH ve titrasyon asitliği tayini

Araştırmada kullanılan çeşitlerin pH değerleri 3.06 ile 3.40 arasında olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2). En düşük pH değeri 3.06 ile Suruç Karasında ölçülürken Suruç ve Hicazın pH değerleri sırasıyla 3.40 ve 3.39 olarak belirlenmiştir. Hmid ve ark. (2017)'nin yürütmüş oldukları çalışmada, Fas'ta yetiştirilen 18 nar çeşidinden elde edilen meyve sularının pH değerleri 2.85-4.22 arasında değişmiştir.

Araştırmada kullanılan çeşitlerin titrasyon asitlikleri % 1.30 ile 2.91 arasında değişmiştir. En yüksek titrasyon asitliği 2.91 ile Suruç Karasında ölçülürken en düşük titrasyon asitliği % 1.30 ile Hicazda ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre titre edilebilir asit sıralaması Hicaz> Suruç > Suruç Karası şeklinde belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Hmid ve ark. (2017)'nin yürütmüş oldukları çalışmada, Fas'ta yetiştirilen 18 nar çeşidinden elde edilen meyve sularının titrasyon asitliği % 0.21-2.31 olarak ölçülmüştür. Li ve ark. (2015)'nin çalışmalarında kullandığı nar çeşitlerinin meyve suyu titrasyon asitliği 2.657-36.62 g/l arasında ölçülmüştür.

Çizelge 4. 2. Çeşitlerin Suda Çözünebilir Kuru Madde Miktarları (%), pH ve Titrasyon Asitliği (%)

| Çeşitler     | SÇKM (%)     | pH           | Titrasyon Asitliği (%) |
|--------------|--------------|--------------|------------------------|
| Suruç        | 15.16±0.16 a | 3.40±0.006 a | 1.34±0.02 a            |
| Hicaz        | 17.25±0.33 a | 3.39±0.005 a | 1.30±0.015 a           |
| Suruç Karası | 17.50±0.66 b | 3.06±0.016 b | 2.91±0.11b             |

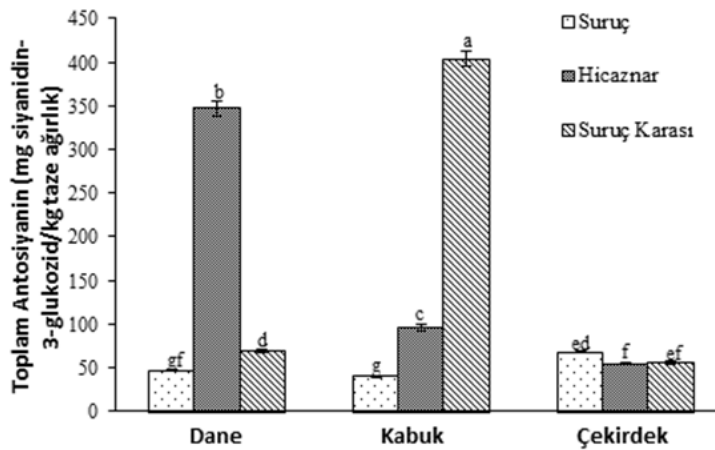
Nar çeşitlerinin pomolojik özellikleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Aynı kolondaki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.1.4.Hue değerlerinin tayini

Örneklerin etanolik dane ekstraktlarına ait hue değerleri 33.04 ile 179.02 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1). Çeşitlerin dane ekstraktı renklerine paralel olarak, çeşitler arasında en yüksek hue değeri 179.02 ile Hicaz çeşidinde ölçülürken en düşük değer 33.04 ile Suruç çeşidinde ölçülmüştür. Suruç Karasının dane ekstraktı hue değeri 175.99 olarak belirlenmiştir. Çeşitlerin etanolik kabuk ekstraktlarına ait hue değerleri ise 16.23 ile 98.97 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1). Çeşitler arasında en yüksek aç değeri 98.97 ile Suruç çeşidinde ölçülürken en düşük değer 16.23 ile Suruç Karasında belirlenmiştir. Bu durumda kabuk ekstraktlarının hue değeri yüksekten düşüğe doğru sırasıyla Suruç, Hicaz ve Suruç Karasında ölçülmüştür.

#### 4.1.5.Meyvelerin toplam antosiyanin kapsamı

Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından belirtilen pH-differansiyel yöntemi ile tayin edilmiş olan etanolik nar örneklerinin toplam antosiyanin kapsamı Şekil 4.1’de, mg siyanidin-3-glukozid/kg taze ağırlık olarak verilmiştir. Örnekler üzerinde yapılan analiz sonuçlarına göre, en yüksek (403.27 mg siyanidin-3-glukozid/kg taze ağırlık) Suruç Karası kabuklarında ölçülmüşken, bu değeri Hicaz danelerinde ölçülen antosiyanin miktarı takip etmiştir.

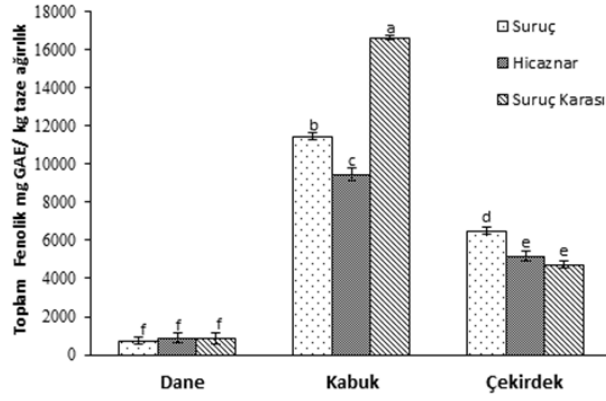


Şekil 4. 1. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası Nar Çeşitlerinin Toplam Antosiyanin (mg siyanidin-3-glukosid/kg taze ağırlık) Kapsamları. Her bir nar çeşidinin meyve, kabuk ve çekirdeklerine ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Least Significant Difference (LSD) testine ( $p \leq 0.05$ ) göre istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir

Örneklerin dane, kabuk ve çekirdeklerinde ölçülen antosiyanin kapsamı karşılaştırıldığında, Suruç Karası çeşidinin kabuk ekstraktları en yoğun renk pigmentleri içerirken bunu Hicaz çeşidinin daneleri izlemiştir. Suruç çeşidinde ekstraktların antosiyanin kapsamı yönünden sıralama çekirdek> dane> kabuk olarak belirlenmiştir. Suruç Karasında sıralama kabuk> dane> çekirdek şeklinde bulunmuştur (Şekil 4.1).

#### 4.1.6.Meyvelerin toplam fenolik bileşik kapsamı

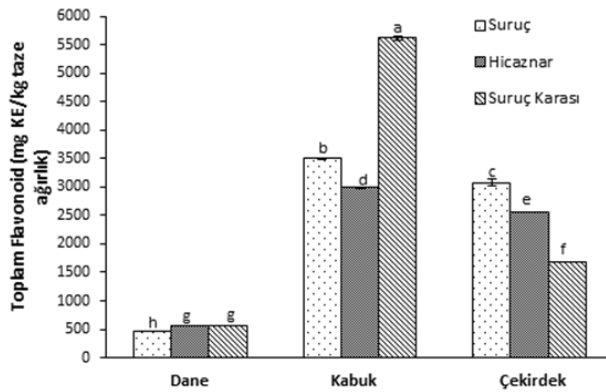
Slinkard ve Singleton (1977) metodu kullanılarak belirlenmiş olan etanolik nar ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri gallik asit standart eğrisinden yararlanılarak mg GAE/kg taze ağırlık olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.2). Farklı nar çeşitlerinin daneleri, kabuk ve çekirdeklerine ait örnekler üzerinde yapılan analiz sonuçlarına göre, en yüksek toplam fenolik madde kapsamı her üç çeşit için de kabuk örneklerinde ölçülmüş olup, Suruç Karası kabuklarının 16628.8 mg GAE/kg taze ağırlık ile en yüksek toplam fenolik bileşikler kapsamına sahip olduğu belirlenmiştir. Suruç Karası çeşidini, Suruç (11440.0 mg GAE/kg taze ağırlık) ve Hicaz (9484.4 mg GAE/kg taze ağırlık)'ın izlediği belirlenmiştir. Meyve örneklerinin kısımlarının toplam fenolik içerikleri büyükten küçüğe doğru kabuk> çekirdek> dane olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Li ve ark., (2006) Çin'de yetiştirilen narlar üzerinde yaptıkları çalışmada nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamının (294.4 mg/g) dane ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamından (24.4 mg/g) 10 kat fazla olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmalarında ABD'nde yetiştirilen narları kullanan Ambigaipalan ve ark., (2017), çekirdek ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamının (3.39 mg GAE/g) meyve suyu ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamından (1.03 mg GAE/g) yaklaşık üç kat fazla olduğunu bildirmişlerdir. Hmid ve ark. 2017, Fas'ta yetiştirilen 18 nar çeşidinden elde edilen meyve sularının toplam fenolik madde kapsamının 1385-9476 mg GAE/l olduğunu belirtmişlerdir. İspanya'da Miguel Hernandez Üniversitesi bünyesinde bulunan Avrupanın en önemli nar gen bankasından seçilen 19 nar çeşidinin kimyasal kompozisyonunu belirleyen Legua ve ark. (2016), çalışmada kullanılan nar çeşitlerinin meyve sularının toplam fenolik madde içeriğinin 90-145 mg GAE/100 ml olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4. 2. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası Nar Çeşitlerinin Toplam Fenolik (mg GAE/kg taze ağırlık) Kapsamları. Her bir nar çeşidinin meyve, kabuk ve çekirdeklerine ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Least Significant Difference (LSD) testine ( $p \leq 0.05$ ) göre istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir

#### 4.1.7. Meyvelerin toplam flavonoid kapsamları

Nar örneklerinin toplam flavonoid kapsamları Zhishen metodunda (Zhishen ve ark., 1999) belirtilen alüminyum klorit kolorimetrik yöntemle belirlenmiş ve etanolik nar ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri kateşin standart eğrisinden yararlanılarak mg KE/kg taze ağırlık olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.3). Örnekler üzerinde yapılan analiz sonuçlarına göre, en yüksek (5620.61 mg KE/kg taze ağırlık) toplam flavonoidler Suruç Karası kabuklarında ölçülmüşken, bu değeri Suruç (3502.19 mg KE/kg taze ağırlık) ve Hicaz (2984.65 mg KE/kg taze ağırlık) meyvelerinin kabuklarında ölçülen flavonoidler takip etmiştir.

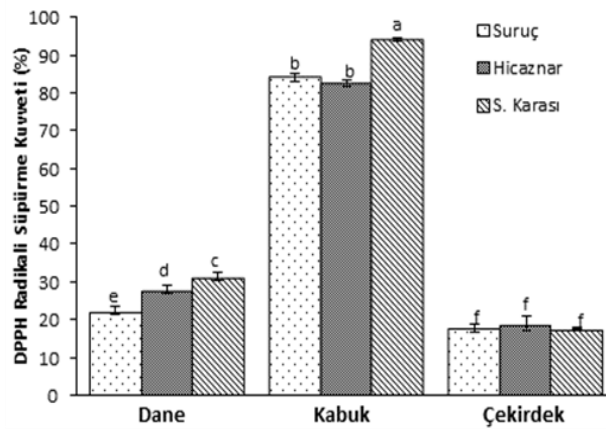


Şekil 4. 3. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası Nar Çeşitlerinin Toplam Flavonoid (mg AE/kg taze ağırlık) Kapsamları. Her bir nar çeşidinin meyve, kabuk ve çekirdeklerine ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Least Significant Difference (LSD) testine ( $p \leq 0.05$ ) göre istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir

Örneklerin dane, kabuk ve çekirdeklerinde ölçülen flavonoid kapsamı karşılaştırıldığında, en yüksek toplam flavonoid değerlerinin Sulu Karası ve Sulu Karası çeşitlerinin meyve kabuklarında ölçüldüğü, meyve kabuklarını, meyve çekirdekleri ve danelerin toplam flavonoid kapsamlarının takip ettiği belirlenmiştir.

#### 4.1.8.DPPH radikalini süpürme kapasitesi

Örneklerin serbest radikalleri süpürme aktivitesi, stabil bir serbest radikal molekülü olan 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) kullanılarak belirlenmiştir (Blois., 1958). Etanol ile seyreltilerek elde edilen değişik konsantrasyonlardaki (20-250 µl/ml) farklı nar genotiplerinin meyve kısımlarına ait örneklerin 10 dk reaksiyonu sonunda DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi belirlenmiştir. Meyve kısımlarının etanolik ekstraktlarının DPPH serbest radikalini süpürebilme kapasiteleri farklı olup en yüksek süpürme kapasitesi meyve kabukları etanolik ekstraktlarında ölçülürken bunu meyve daneleri ve çekirdekleri izlemiştir. Bu çalışmadaki bulgulara paralel olarak Sumaiya ve ark., (2018) Bangladeş'te, biokimyasal içeriklerini belirlemek amacıyla biri yerel, ikisi yabancı olmak üzere üç nar çeşidi üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda meyve kabuklarından elde edilen örneklerin antioksidan aktivitelerinin danelerden elde edilen örneklerin antioksidan kapasitelerinden kayda değer şekilde yüksek olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4. 4. Sulu, Hicaz ve Sulu Karası Nar Meyve Daneleri, Kabuk ve Çekirdek Ekstraktlarının DPPH Radikalini Süpürme Aktivitesi. Her bir nar çeşidinin meyve, kabuk ve çekirdeklerine ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Least Significant Difference (LSD) testine ( $p \leq 0.05$ ) göre istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir

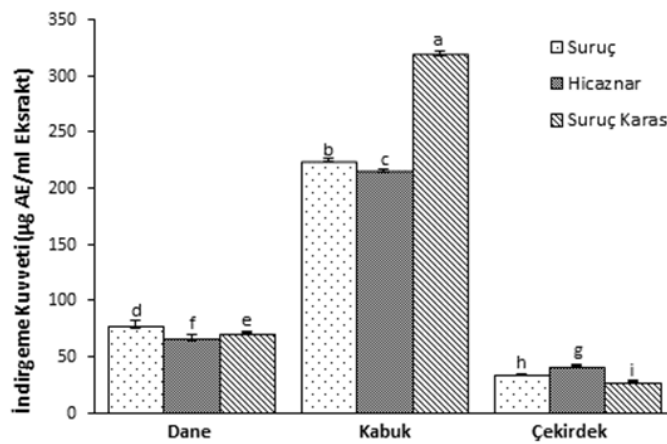
Çalışmada kullanılan çeşitlerin DPPH radikal süpürme aktivitesi karşılaştırıldığında Kabuk; Suruç Karası> Suruç> Hicaz; dane: Suruç Karası> Hicaz> Suruç olup fark önemli bulunmuş; çekirdek; Hicaz> Suruç> Suruç Karası olarak sıralanmış olmasına rağmen ortalamalar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.4).

#### 4.1.9.Meyvelerin toplam antioksidan kapasiteleri

Araştırmada örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri Fosfomolibden ve FRAP metodlarıyla belirlenmiştir.

##### 4.1.9.1.Fosfomolibden metodu ile belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri

Fosfomolibden metodu ile belirlenen örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri Şekil 4.5’de verilmiştir. Araştırmada kullanılan çeşitlere ait örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri değerlendirildiğinde, en yüksek değer 320.09  $\mu\text{g}$  AE/ml ekstrakt olarak Suruç Karası kabuk örneklerinde belirlenirken, bunu Suruç kabuk (224.96  $\mu\text{g}$  AE/ml), ve Hicaz kabuk ekstraktları izlemiştir (215.41  $\mu\text{g}$  AE/ml). Danelerin antioksidan kapasiteleri sırasıyla, Suruç> Suruç Karası> Hicaz örnekleridir.

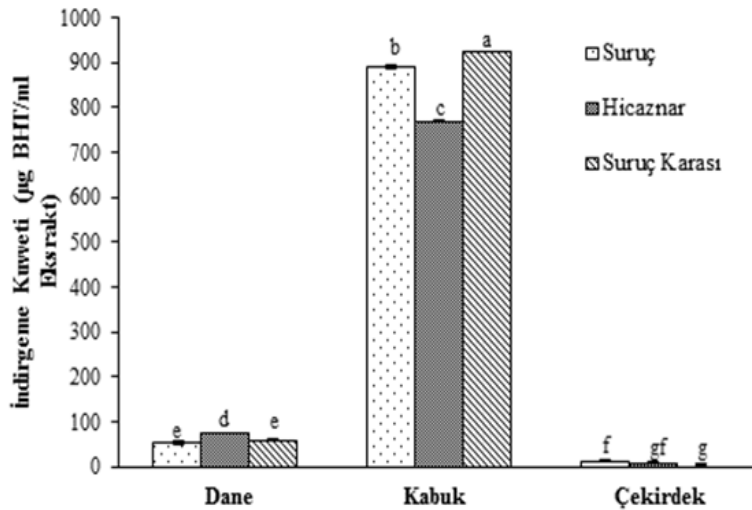


Şekil 4. 5. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası Nar Meyve Daneleri, Kabuk ve Çekirdek Ekstraktlarının Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Kapasiteleri ( $\mu\text{g}$  AE/ml ekstrakt). Her bir nar çeşidinin meyve, kabuk ve çekirdeklerine ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Least Significant Difference (LSD) testine ( $p \leq 0.05$ ) göre istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir

Her üç çeşit içinde geçerli olmak üzere antioksidant kapasite sıralaması kabuk> dane> çekirdek olarak belirlenmiştir.

#### 4.1.9.2.FRAP metodu ile belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri

Nar çeşitlerinin meyve daneleri, kabuk ve çekirdeklerinden alınan örneklerin antioksidan kapasiteleri Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) metoduyla belirlenmiş ve örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Farklı nar çeşitlerinin meyve daneleri, kabuk ve çekirdeklerinden alınan örneklerin antioksidan kapasiteleri değerlendirildiğinde en yüksek değer 924.10  $\mu\text{g}$  BHT/ml ekstrakt olarak Suruç Karası kabuk örneklerinde belirlenirken, bunu Suruç kabuk (890.8  $\mu\text{g}$  BHT/ml), ve Hicaz kabuk (769.7  $\mu\text{g}$  BHT/ml) ekstraktları izlemiştir. Danelerin antioksidan kapasiteleri sırasıyla, Hicaz> Suruç Karası> Suruç olarak belirlenmiştir. Her üç çeşit içinde geçerli olmak üzere meyve kısımlarının antioksidan kapasiteleri sırasıyla kabuk> dane> çekirdek olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Benzer şekilde Hajimahmoodi ve ark., (2008)'nin yapmış olduğu çalışmada, İran'da yetiştirilen on farklı nar çeşidinin meyve ve kabuk ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri FRAP metoduyla belirlenmiştir. Tüm çeşitlerde kabuk ekstraktlarının FRAP değerleri meyve ekstraktlarının FRAP değerlerinden yüksek bulunmuştur.



Şekil 4. 6. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası Nar Meyve Daneleri, Kabuk ve Çekirdek Ekstraktlarının FRAP Metodu ile Toplam Antioksidan Kapasiteleri ( $\mu\text{g}$  BHT/ml ekstrakt). Her bir nar çeşidinin meyve, kabuk ve çekirdeklerine ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Least Significant Difference (LSD) testine ( $p \leq 0.05$ ) göre istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir

Sadeghi ve ark., (2009)'nın İran'da yetiştirilen altı farklı nar çeşidinde yapmış olduğu çalışmada kabuk ekstraktlarının FRAP değerleri çekirdek ekstraktlarının FRAP değerlerinden yüksek bulunmuştur. Ardekani ve ark., (2011), nar kabuk ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin meyve ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinden yaklaşık on kat fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Günümüze kadar yayınlanmış birçok araştırma sonuçları meyve rengi ile meyve ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri arasında güçlü bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir. Bu sonucun aksine, mevcut araştırma sonuçları gerek meyvelerin hue değerleri gerekse antosiyanin kapsamlarıyla meyve çeşitlerinin antioksidan kapasiteleri arasında paralel bir ilişki bulunmamıştır. Hajimahmoodi ve ark., (2008) ve Sadeghi ve ark., (2009)'nın yapmış oldukları çalışmalarda, açık renkli kabuğa sahip çeşitlerin kabuk, meyve ve çekirdek ekstraktlarının FRAP değerlerinin koyu renk kabuğa sahip olanlardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çam ve ark., (2009) nar meyvelerinin antosiyanin kapsamı ile antioksidan özellikler arasındaki ilişkinin önemli olduğunu belirtirken, Tzulker ve ark., (2007), Zaouay ve ark., (2012), Fawole ve ark., (2012), Kaur ve ark., (2014), Karaaslan ve ark., (2014)'nın nar, Özden ve Vardin (2009)'nin üzüm çeşitleri üzerinde yürütmüş oldukları araştırma sonuçlarına göre meyvelerin antosiyanin kapsamlarıyla antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişkiden ziyade meyvelerin toplam fenolik ve flavonoid bileşik kapsamlarının en önemli belirleyiciler olduğu ortaya konmuştur. Araştırmada kullanılan nar çeşitlerinin meyve kabukları fenolik ve flavonoid kapsamları dane ve çekirdeğe göre daha yüksek ölçülmüş olup bu sonuca paralel olarak nar çeşitleri ve meyve kısımlarının antioksidan aktiviteleri paralellik göstermiştir. Araştırma sonuçlarına paralel olarak Özden ve Özden (2014)'nin 14 farklı meyve çeşitleri üzerinde yürütmüş olduğu araştırma sonucuna göre meyvelerin antioksidan özelliklerinin meyvelerin özellikle sahip oldukları toplam fenolik kapsamlarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda çalışmada kullanılan çeşitlerin meyve, kabuk ve çekirdeklerin toplam fenolik ve flavonoid kapsamları seviyesinde örnekler DPPH serbest radikalini süpürmüş,  $Fe^{+3}$  ve Mo (VI) iyonları indirgenmiştir.

#### 4.2.Yaprak ayası eksplantlarından kallus eldesi

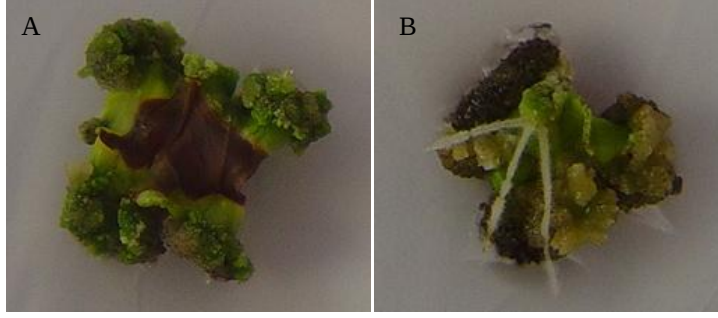
Altı farklı içeriğe sahip MS besiy ortamına yerleştirilen ve serin beyaz ışık veren floresan lambaları ile aydınlatılan, 16 saat gün uzunluğuna sahip ve sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmış iklim odasında kültüre alınan yaprak ayası eksplantlarının kesik yüzeylerinde kültüre alındıktan 2-3 hafta sonra kallus oluşumu başlamıştır (Şekil 4.7). Hicaz çeşidine ait eksplantlarda kallus oluşumu 2. haftada başlarken Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinde 3. haftada başlamıştır.



Şekil 4. 7. Yaprak ayası eksplantlarının kesik yüzeylerinde kallus oluşumu

Kallus yapıları genotiplere ve kültür ortamının kombinasyonuna bağlı olarak farklılık göstermiştir. Suruç ve Suruç Karası nar çeşidinin kalluslarının gevşek yapılı, saydam ve sarımsı renkli; Hicaz çeşidinin kalluslarının ise sert yapılı, koyu yeşil ve diğer çeşitlere göre daha hızlı büyüyen yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).

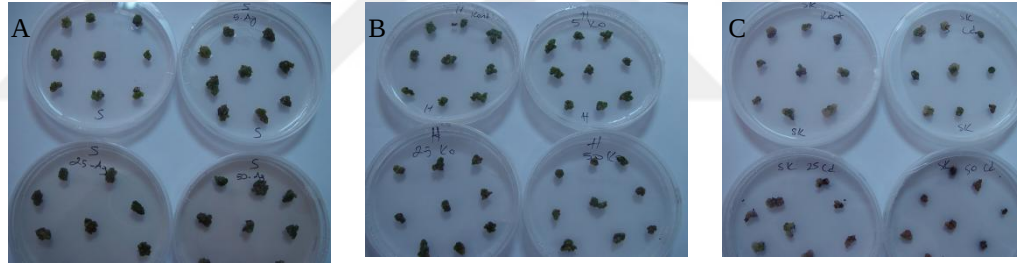
MS besiy ortamının BA ve NAA konsantrasyonları arttıkça yaprak ayası eksplantlarına toksik etkisi artmış, eksplantlarda nekrozlar olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8A). Yüksek dozlardaki BA ve NAA konsantrasyonları kallus büyüme hızını olumsuz etkilerken, NAA'ın yüksek dozları eksplantların kök oluşturmaya neden olmuştur (Şekil 4.8B). Her üç çeşitte yaprak eksplantlarından kallus oluşumu ve kallus çoğaltımı için en uygun kültür ortamı kombinasyonu 1 mg/l BA ve 0.4 mg/l NAA içeren MS olarak belirlenmiştir. Bonyanpour ve Khosh-Khui (2013), Nana nar çeşidi ile yaptıkları çalışmada 1 mg/l BA ve 0.4 mg/l NAA içeren MS besiy ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarının kallus oluşturma oranının yüksek olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4. 8. Yaprak ayası eksplantında yüksek BA ve NAA dozlarından kaynaklanan nekroz (A) ve kök oluşumu (B)

#### 4.3. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Ağır Metallerden Gümüş Nitrat, Kobalt Klorür ve Kadmiyum Klorür Uygulamaları

Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik olarak, kallus çoğaltım besi ortamı ile aynı içeriğe sahip MS besi ortamına 0 (kontrol), 5, 25 ve 50  $\mu$ M olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  ilave edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4. 9. Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik ağır metal uygulamaları. Suruç, Hicaz nar ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50  $\mu$ M) ağır metal  $\text{AgNO}_3$  (A),  $\text{CoCl}_2$  (B) ve  $\text{CdCl}_2$  (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür

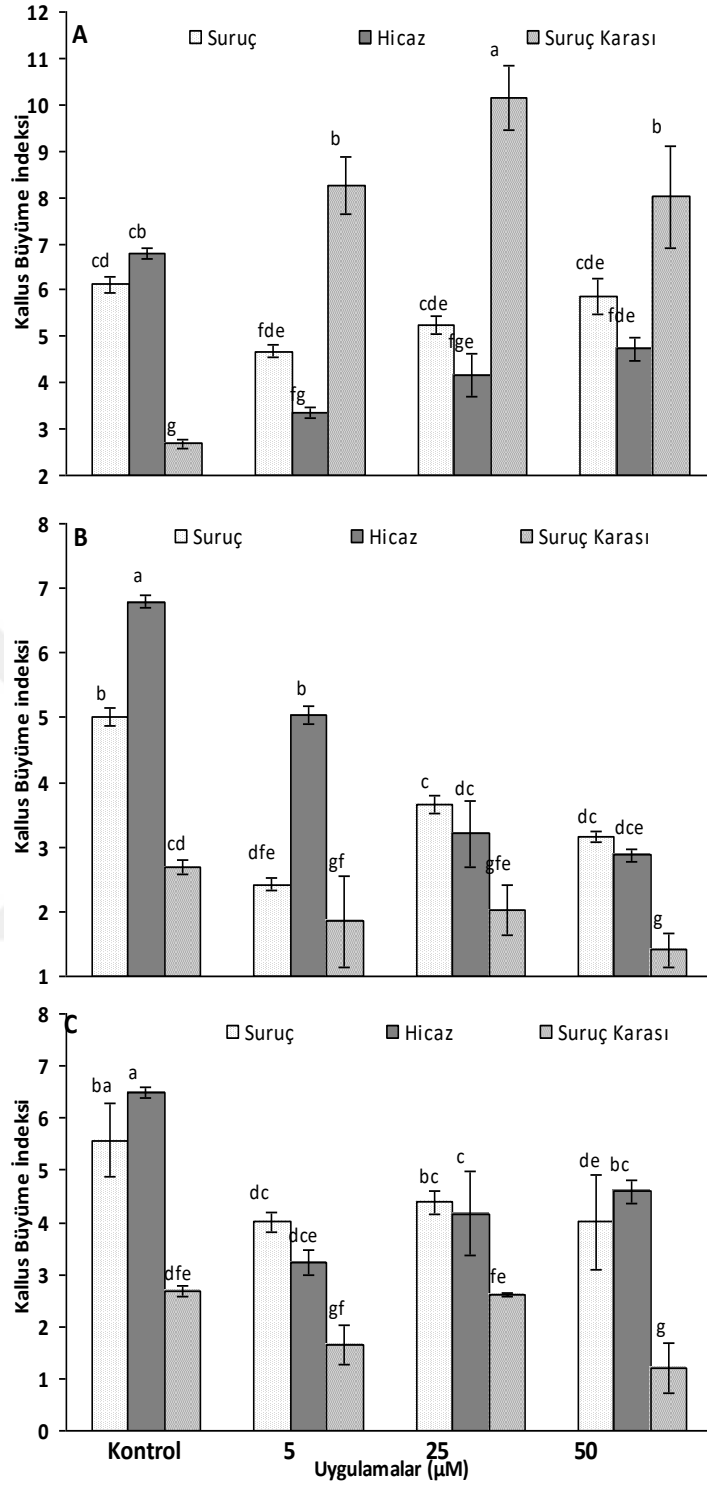
##### 4.3.1. Kallus büyüme indekslerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan nar çeşitlerinin kallusları 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA, 0, 5, 25, ve 50  $\mu$ M  $\text{AgNO}_3$  katkılı MS tuzları ve vitaminlerinden oluşan *in vitro* büyüme ortamında kültüre alınmıştır. Yaklaşık 6 hafta sonunda kallusların ilk ve son ağırlıkları karşılaştırılarak nar kalluslarının nisbi ağırlık artışları belirlenmiştir (Şekil 4.10ABC). Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunda Suruç ve Hicaz kallusları nisbi ağırlık artışları sırasıyla 6.12 ve 6.79 iken Suruç Karası kalluslarının nisbi

ağırlık artışı 2.68 olarak belirlenmiştir. Kültür ortamına eklenen 5, 25, ve 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ 'ın araştırmada kullanılan üç nar çeşidi kallusları büyüme indeksine etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucuna göre kültür ortamlarında  $\text{AgNO}_3$ 'ın varlığı Suruç ve Hicaz nar kalluslarının ağırlık artışlarını kontrole göre düşürürken, Suruç Karası nar kalluslarında önemli seviyede artışa neden olmuştur. (Şekil 4.10A).

İn vitro koşullarda yetiştirilen kontrol grubu nar genotiplerinin nisbi ağırlık artışı Hicaz > Suruç > Suruç Karası olup değerleri sırasıyla 6.79, 5.01, ve 2.68 olarak hesaplanmıştır.  $\text{AgNO}_3$ 'ın etkisinin aksine nar genotipleri *in vitro* kültür ortamlarına  $\text{CoCl}_2$  eklenmesi bütün nar çeşitleri kalluslarının nisbi büyüme indekslerini kontrole göre düşürmüştür. Kullanılan  $\text{CoCl}_2$  dozları arasında 5  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  Hicaz nar kalluslarında kontrolün dışında, en yüksek ağırlık artışına neden olurken (5.03), Suruç çeşidinde, kontrolün dışında, en yüksek ağırlık artışı 25  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  katkılı besin ortamında büyütülen kalluslardan ölçülmüştür. Suruç Karası kalluslarının besi ortamına  $\text{CoCl}_2$  ilavesi kallus ağırlık artışında düşüşe neden olurken, kullanılan dozların etkileri arasındaki fark  $P \leq 0.05$  seviyesinde önemsiz bulunmuştur. Suruç Karası kalluslarında en düşük ağırlık artış indeksi (1.40), 50  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  içeren MS ortamındaki kalluslarda ölçülmüştür (Şekil 4.10B).

$\text{CoCl}_2$ 'ün etkisine paralel olarak, *in vitro* kültür ortamlarına  $\text{CdCl}_2$  eklenmesi bütün nar çeşitleri kalluslarının nisbi büyüme indekslerini kontrole göre düşürmüştür. Suruç ve Hicaz çeşitleri kallus büyüme ortamlarına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki  $\text{CdCl}_2$  dozlarının etkileri arasındaki fark önemli bulunmazken, Suruç Karası kalluslarında en düşük ağırlık artış indeksi (1.20), 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  içeren MS ortamındaki kalluslarda ölçülmüştür (Şekil 4.10C).



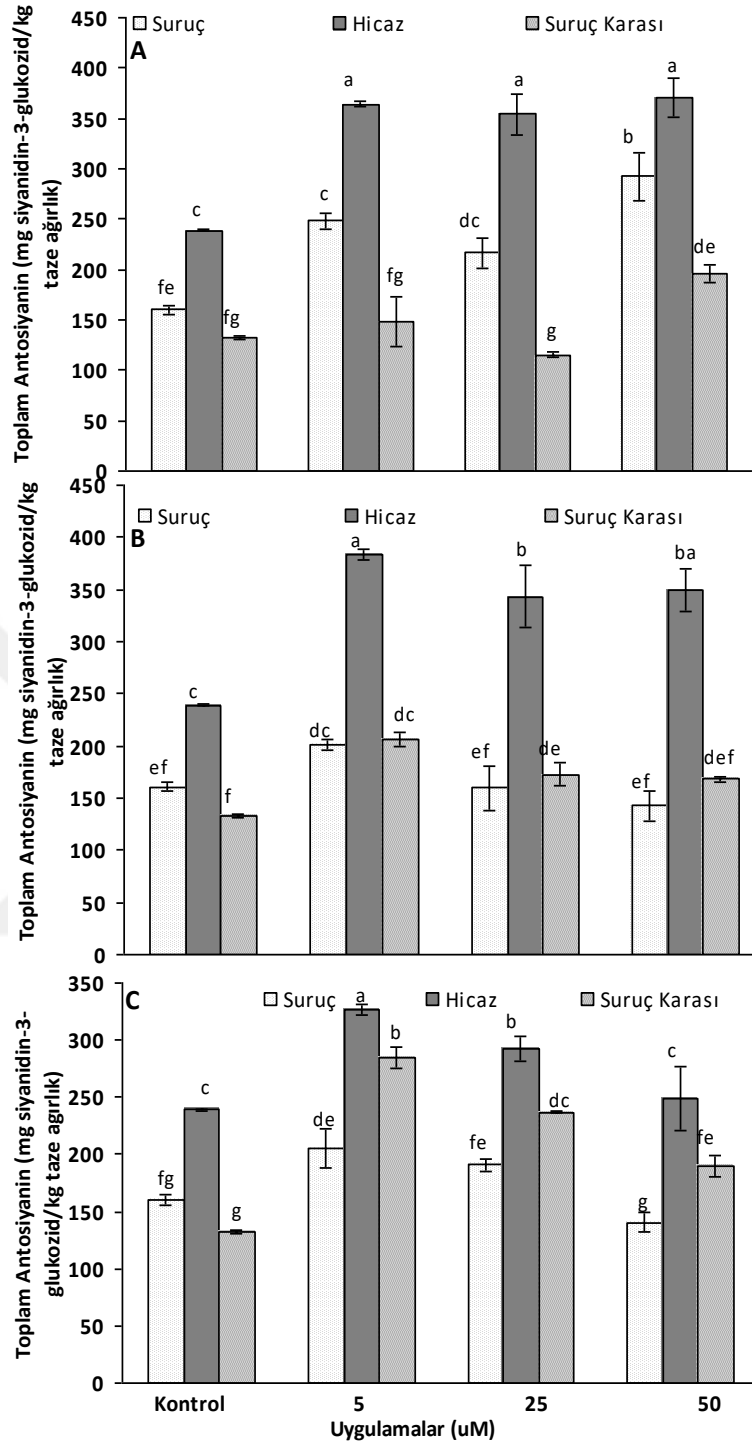
Şekil 4. 10. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kalluslarının Büyüme İndeksi. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50  $\mu M$ ) ağır metal  $AgNO_3$  (A),  $CoCl_2$  (B) ve  $CdCl_2$  (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Farklı ağır metal elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.3.2. Toplam antosiyaninlerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki ağır metal ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$ ) katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam antosiyanin kapsamları mg siyanidin-3-glukozid/kg taze ağırlık olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.11ABC). Araştırmada kullanılan bütün ağır metal dozlarının kontrole göre kallusların toplam antosiyanin kapsamlarını artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.11A). Suruç ve Suruç Karası çeşitlerine ait kallusların en yüksek antosiyanin kapsamları (292.78 mg siyanidin-3-glukozid/kg ve 195.37 mg siyanidin-3-glukozid/kg) 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  uygulamasında elde edilmiştir. Hicaz çeşidinde en yüksek antosiyanin kapsamı (370.71 mg siyanidin-3-glukozid/kg) yine 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  uygulamasında elde edilmiş fakat  $\text{AgNO}_3$  dozlarının etkileri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.11A).

Besi ortamında  $\text{CoCl}_2$  varlığının kontrole göre Hicaz ve Suruç Karası kalluslarının toplam antosiyanin kapsamlarında artışa sebep olduğu, 5  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ 'ın en etkili doz olarak belirlendiği ve  $\text{CoCl}_2$ 'un konsantrasyonu artıkça bu iki çeşidin antosiyanin kapsamlarının azaldığı ortaya konmuştur. Suruç çeşidinde ise kalluslarının toplam antosiyanin kapsamında en yüksek seviye kalluslara 5  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  uygulandığında elde edilirken diğer dozlar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.11B).

$\text{AgNO}_3$  ve  $\text{CoCl}_2$  uygulamalarının etkilerine benzer şekilde  $\text{CdCl}_2$  dozları da kontrole göre kallusların toplam antosiyanin kapsamlarında artışa sebep olmuştur. Hem uygulanan dozlar arasındaki fark hem de çeşitler arasındaki fark önemli bulunmuştur. Araştırmada kullanılan çeşitlerin antosiyanin kapsamının arttırılmasında 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  dozunun en etkili olduğu, bu doz uygulandığında çeşitlerin antosiyanin kapsamlarının en yüksekten düşüğe doğru Hicaz (326.74 mg siyanidin-3-glukozid/kg), Suruç Karası (284.99 mg siyanidin-3-glukozid/kg) ve Suruç (205.95 mg siyanidin-3-glukozid/kg) şeklinde sıralandığı belirlenmiştir (Şekil 4.11C).



Şekil 4. 11. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Antosiyanin Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50 µM) ağır metal AgNO<sub>3</sub> (A), CoCl<sub>2</sub> (B) ve CdCl<sub>2</sub> (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Farklı ağır metal elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının toplam antosiyanin kapsamları arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

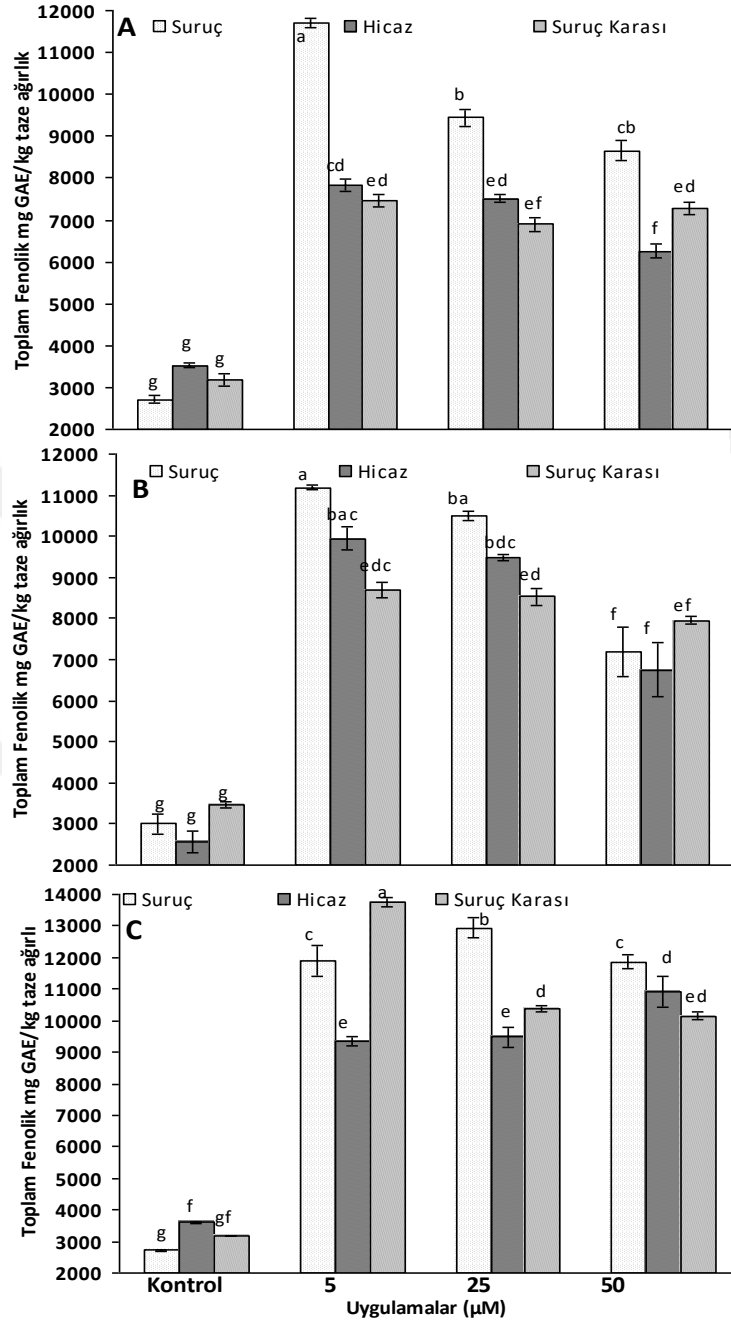
#### 4.3.3. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki ağır metal ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$ ) katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamları mg GAE/kg olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.12ABC). Araştırmada ağır metal katkısız (kontrol), 1mg/l BA ve 0.4 mg/l NAA içeren MS besi ortamındaki 6 haftalık farklı nar genotipi kalluslarının toplam fenolik kapsamları arasındaki farkların önemsiz olduğu fakat testlerde kullanılan bütün  $\text{AgNO}_3$  dozlarının kontrole göre kallusların toplam fenolik kapsamlarını artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.12A). 5  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  dozu Suruç kalluslarında en yüksek fenolik (11708 mg GAE/kg) sentezine neden olurken, doz artışı kallusların fenolik bileşik üretim düzeyini olumsuz şekilde etkilemiştir (Şekil 4.12A). Fakat Suruç Karasında  $\text{AgNO}_3$  dozlarının etkileri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.12A). Genel olarak fenolik bileşik üretiminin uyarılması açısından en düşük gümüş nitrat dozu en etkin doz olarak değerlendirilmiştir.

$\text{AgNO}_3$ 'ın nar kalluslarında fenolik bileşik sentezi üzerine etkinliğine benzer şekilde, MS kültür ortamında  $\text{CoCl}_2$ 'ün varlığı Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar kallusları fenolik içerikleri üzerine olumlu etkisi açıkça ortaya konmuştur. Suruç ve Hicaz çeşitlerinde doz artışı ile fenolik madde kapsamının ters orantılı olduğu belirlenmiştir. 5  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  seviyesinde, Suruç çeşidi nar kalluslarında 11185 mg GAE/kg, Hicaz çeşidinde 9939 mg GAE/kg, ve Suruç Karası 8692 mg GAE/kg toplam fenolik ölçülmüştür 5 ile 25  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ 'ün çeşitler üzerindeki etkisi arasındaki istatistiksel farklılık önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.12B).

Nar kallus kültüründe kadmiyum klorür uygulamalarının toplam fenolik bileşiklerin sentezini artırdığı Şekil 4.12C'de verilmiştir. 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  katkılı MS ortamındaki nar kallusları içinde en yüksek fenolik miktarı Suruç Karası çeşidinde 13752 mg GAE/kg olarak ölçülmüşken bunu Suruç (11916 mg GAE/kg) ve Hicaz (9336 mg GAE/kg) çeşitleri takip etmiştir. Suruç çeşidinde en yüksek fenolik bileşik miktarı 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  katkılı MS ortamındaki kalluslardan elde edilirken, Hicaz

çeşidinde 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , Suruç Karası çeşidinde ise 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  içeren MS ortamındaki kalluslardan elde edilmiştir (Şekil 4.12C).



Şekil 4. 12. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Fenolik Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50  $\mu\text{M}$ ) ağır metal  $\text{AgNO}_3$  (A),  $\text{CoCl}_2$  (B) ve  $\text{CdCl}_2$  (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Farklı ağır metal elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının toplam fenolik kapsamları arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

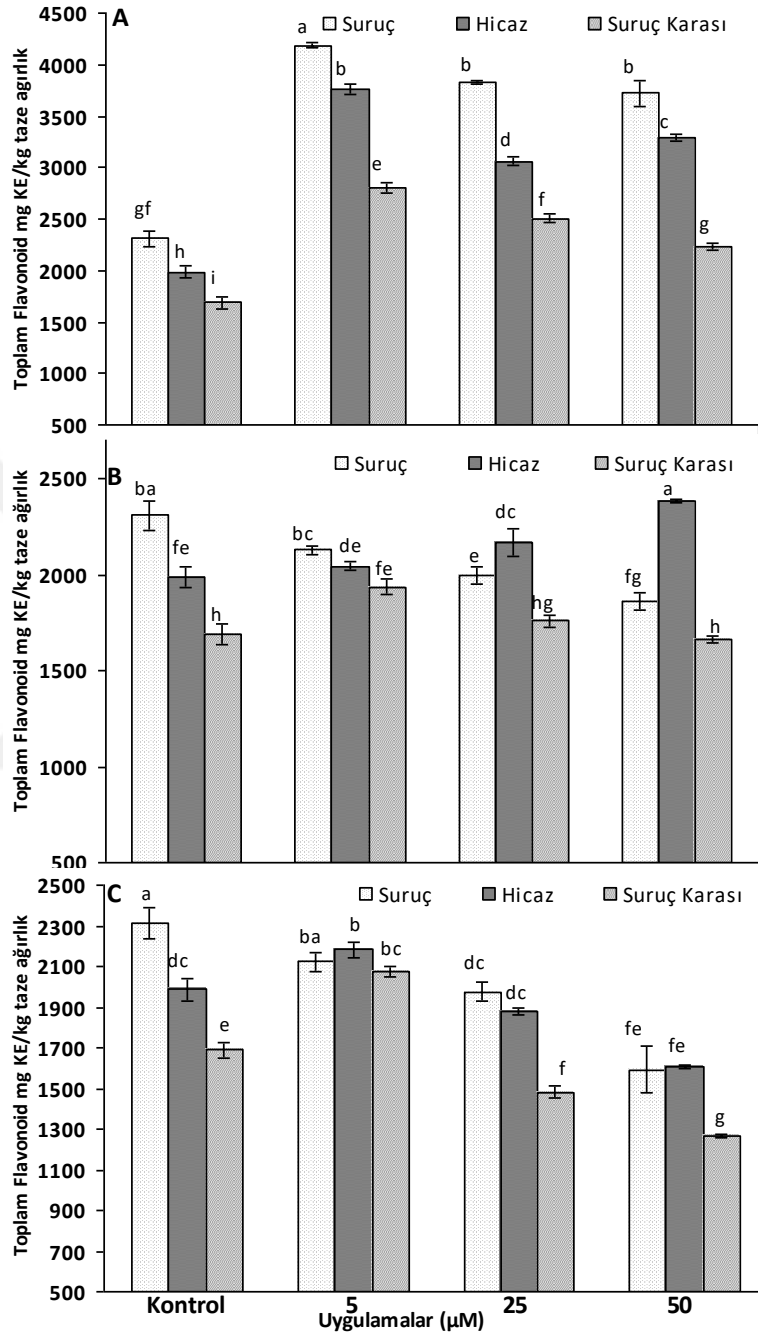
#### 4.3.4. Toplam flavonoidlerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki ağır metal ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$ ) katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları mg KE/kg olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.13ABC). MS kültür ortamında  $\text{AgNO}_3$ 'ün varlığı Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar kallusları flavonoid içerikleri üzerinde olumlu etki yapmıştır (Şekil 4.13A).  $\text{AgNO}_3$ 'ün farklı dozlarının nar kalluslarının toplam flavonoid kapsamları üzerindeki etkisi önemli bulunurken, nar kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları üzerine en etkili  $\text{AgNO}_3$  dozu 5  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan en düşük  $\text{AgNO}_3$  dozunda Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları sırası ile 4184.64 mg KE/kg, 3763.59 mg KE/kg, 2804.82 olarak belirlenmiştir.  $\text{AgNO}_3$  dozlarının yükseltilmesi ekstraktların toplam flavonoid kapsamları üzerine olumsuz etki yapmıştır (Şekil 4.13A).

$\text{CoCl}_2$ 'ün varlığı Suruç çeşidinin toplam flavonoid kapsamını olumsuz etkilerken, Hicaz ve Suruç Karası nar kalluslarının toplam flavonoid içerikleri üzerine olumlu etki yapmıştır. Araştırmada Suruç çeşidinin flavonoid üretim düzeyi ağır metal katkısız (kontrol) MS besi ortamında kültüre alınan kalluslarda en yüksek (2310.08 mg KE/kg) düzeyde bulunurken,  $\text{CoCl}_2$  dozu arttıkça çeşidin toplam flavonoid kapsamı azalmıştır. Hicaz çeşidinin toplam flavonoid kapsamı 50  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  katkılı MS ortamında en yüksek (2386.40 mg KE/kg) seviyeye ulaşırken Suruç Karası için en yüksek toplam flavonoid kapsamı (1936.40 mg KE/kg) 5  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  uygulamasından elde edilmiştir (Şekil 4.13B).

$\text{CoCl}_2$ 'ün nar kalluslarında flavonoid sentezi üzerine etkinliğine benzer şekilde,  $\text{CdCl}_2$ 'ün varlığı Suruç çeşidinin toplam flavonoid kapsamını olumsuz etkilerken, Hicaz ve Suruç Karası nar kalluslarının toplam flavonoid içerikleri üzerine olumlu etki yapmıştır. Suruç çeşidinde en yüksek flavonoid miktarı (2310.08 mg KE/kg) kontrol grubundaki kalluslardan elde edilirken, Hicaz (2181.14 mg KE/kg) ve Suruç Karası (2073.24 mg KE/kg) çeşitlerinde 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  içeren MS ortamındaki kalluslardan elde edilmiştir.  $\text{CdCl}_2$  dozlarının yükseltilmesi tüm çeşitlerde

ekstraktların toplam flavonoid kapsamları üzerine olumsuz etki yapmıştır (Şekil 4.13C).



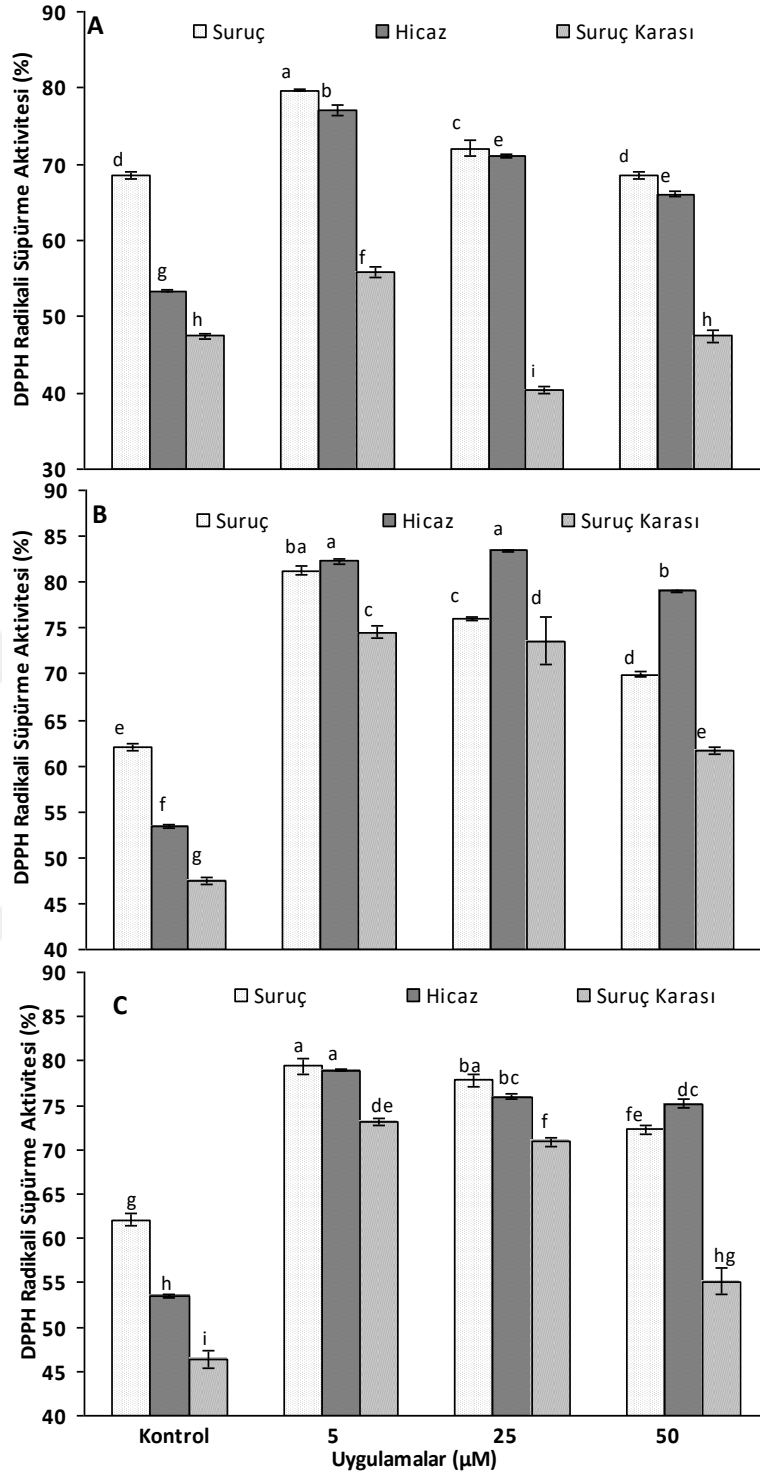
Şekil 4. 13. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Flavonoid Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50 µM) ağır metal AgNO<sub>3</sub> (A), CoCl<sub>2</sub> (B) ve CdCl<sub>2</sub> (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Farklı ağır metal elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.3.5. DPPH serbest radikalini süpürülmesi

Farklı konsantrasyonlardaki ağır metal ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$ ) katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri % olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.14ABC). Araştırmada kontrol grubundaki farklı nar genotipi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki farkların önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kullanılan bütün  $\text{AgNO}_3$  dozlarının kontrole göre kallusların DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini artırdığı ve dozlar içinde en etkilisinin  $5 \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  olduğu belirlenmiştir.  $5 \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  katkılı MS ortamındaki nar kallusları içinde en yüksek DPPH serbest radikalini süpürme kapasitesi Suruç çeşidinde %79.72 olarak ölçülmüşken bunu Hicaz (%77.11) ve Suruç Karası (%55.88) çeşitleri takip etmiştir (Şekil 4.14A).

$\text{AgNO}_3$  uygulamalarına benzer şekilde, kontrol grubundaki farklı nar genotipi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki farkların önemli olduğu ve kullanılan bütün  $\text{CoCl}_2$  dozlarının kontrole göre kallusların DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini artırdığı ortaya konmuştur. En yüksek değerler (%82.26, %83.40) Hicaz çeşidine ait kalluslarda, 5 ve  $25 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  uygulamalarında ölçülmüş olup dozlar arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.14B).

Araştırmada kullanılan Suruç, Hicaz ve Suruç Karası çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri  $5 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  uygulamasında en yüksek seviyeye ulaşarak sırasıyla %79.47, %78.95 ve %73.14 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14C).



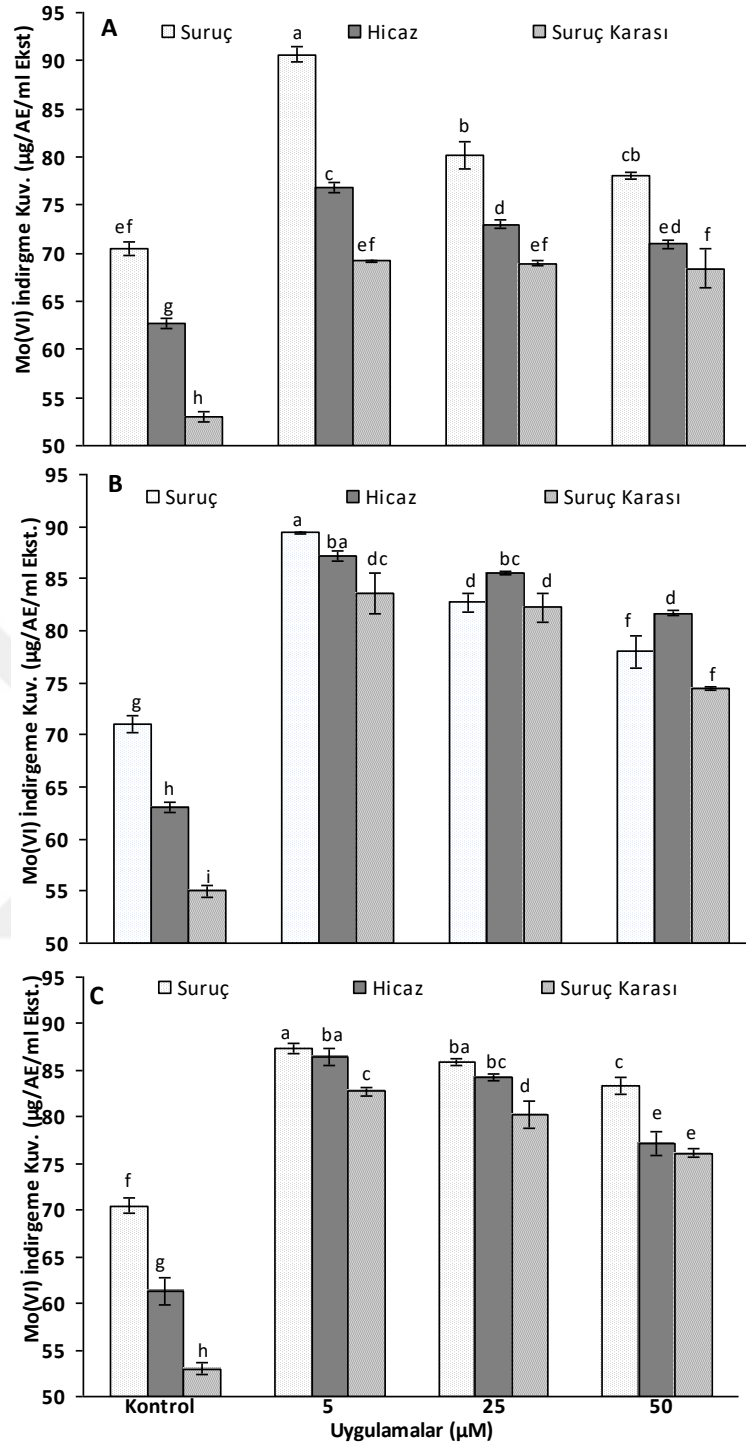
Şekil 4. 14. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı DPPH Radikali Süpürme Aktiviteleri. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50 µM) ağır metal  $\text{AgNO}_3$  (A),  $\text{CoCl}_2$  (B) ve  $\text{CdCl}_2$  (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Farklı ağır metal elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının DPPH radikali süpürme aktiviteleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.3.6. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

##### 4.3.6.1. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Değişik konsantrasyonlarda  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  katkılı MS besi ortamında büyütülen farklı nar genotipleri kallus ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri fosfomolibden metoduna göre  $\mu\text{g AE/ml}$  ekstrakt olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.15ABC). Kullanılan bütün  $\text{AgNO}_3$  dozlarının kontrole göre kallusların Mo(VI) indirgeme kuvvetini artırdığı belirlenmiştir. Araştırmada kontrol olarak kullanılan nar genotiplerinin Mo (VI) indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli olup en yüksek Mo (VI) indirgeme kuvvetine Suruç ( $70.48 \mu\text{g AE/ml}$  ekstrakt) sahip olurken bunu sırasıyla Hicaz ( $62.72 \mu\text{g AE/ml}$ ) ve Suruç Karası ( $53.00 \mu\text{g AE/ml}$ ) izlemiştir (Şekil 4.15A). Farklı  $\text{AgNO}_3$  dozları içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının Mo (VI) indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek Mo (VI) indirgeme kuvveti  $5 \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  içeren MS kültür ortamından elde edilen Suruç kallus ekstraktlarında ( $90.67 \mu\text{g AE/ml}$  ekstrakt) ölçülürken bunu yine aynı genotipin  $25 \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  etkili kallus ekstraktları ( $80.16 \mu\text{g AE/ml}$ ) takip etmiştir (Şekil 4.15A).

Farklı  $\text{CoCl}_2$  dozları içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının Mo (VI) indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek Mo (VI) indirgeme kuvveti  $5 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  içeren MS kültür ortamından elde edilen Suruç kallus ekstraktlarında ( $89.40 \mu\text{g AE/ml}$  ekstrakt) ölçülürken bunu Hicaz genotipin  $5 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  etkili kallus ekstraktları ( $87.21 \mu\text{g AE/ml}$ ) takip etmiştir. Suruç nar çeşidinin farklı  $\text{CoCl}_2$  dozlarına karşı göstermiş olduğu tepkiler arasındaki fark önemli bulunurken,  $25 \mu\text{M}$  ya da  $50 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  dozu içeren MS ortamlarında büyütülen Suruç ve Suruç Karası nar kalluslarının Mo (VI) indirgeme kuvvetleri arasında fark önemsiz bulunmuştur. Çalışmada kullanılan en yüksek  $\text{CoCl}_2$  dozunun etkisi dozlar arasında en az etkiye sahipken kontrole göre daha etkin bulunmuştur (Şekil 4.15B).



Şekil 4. 15. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Mo(VI) indirgeme kuvveti. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50 µM) ağır metal AgNO<sub>3</sub> (A), CoCl<sub>2</sub> (B) ve CdCl<sub>2</sub> (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Farklı ağır metal elisatör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının Mo(VI) indirgeme kuvvetleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

Nar kalluslarının  $\text{CdCl}_2$ 'e karşı göstermiş olduğu tepkilerin kontrole göre farklarının önemli seviyede olduğu bulunurken, dozların da çeşitler üzerindeki etkisi önemli bulunmuştur.  $\text{CdCl}_2$ 'ün nar kallus ekstraktları Mo (VI) indirgeme kuvvetleri üzerine en yüksek etkisi Suruç (87.33  $\mu\text{g AE/ml}$ ) ve Hicaz (86.37  $\mu\text{g AE/ml}$ ) çeşitleri için 5 ve 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bulunurken, Suruç Karası (82.71  $\mu\text{g AE/ml}$ ) için 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda bulunmuştur (Şekil 4.15C).

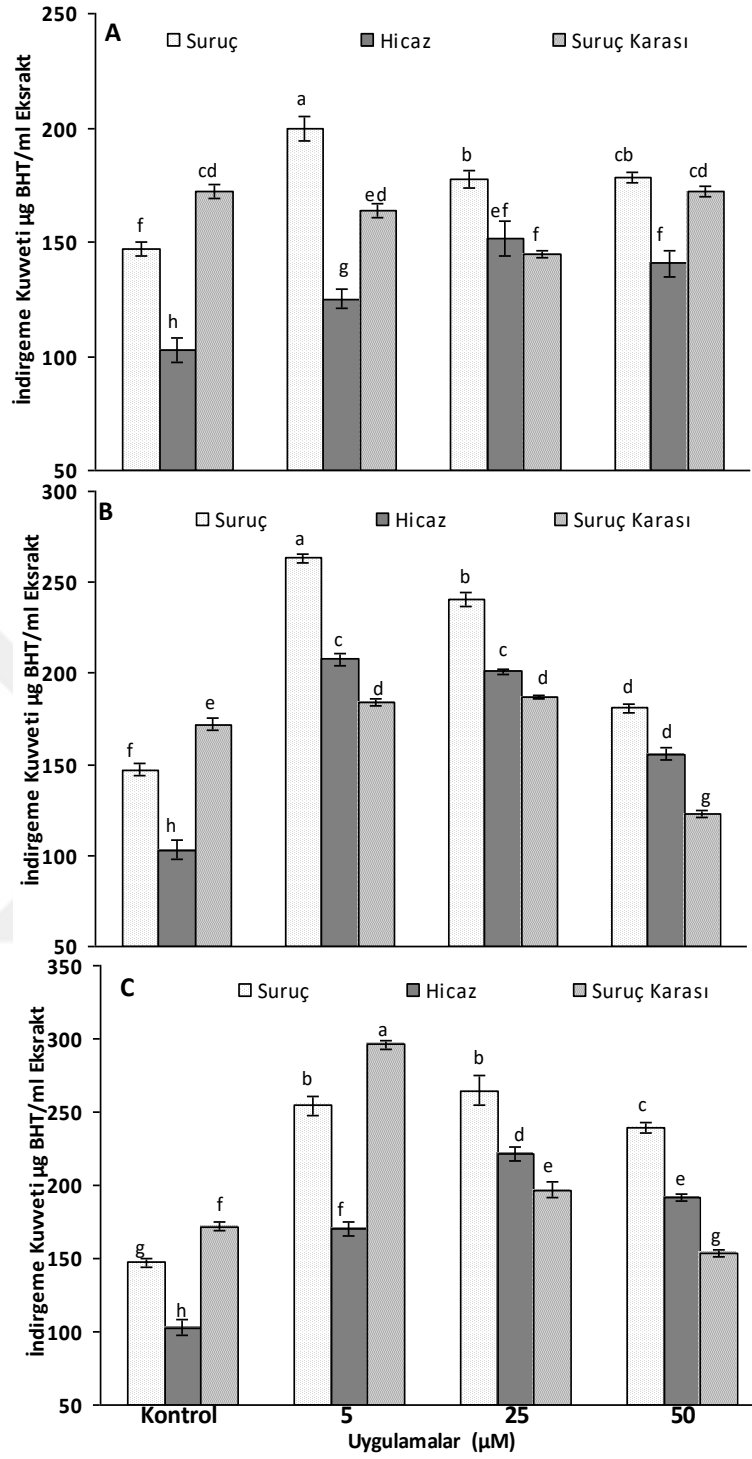
#### 4.3.6.2. FRAP metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Değişik konsantrasyonlarda  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  katkılı MS besi ortamında büyütülen farklı nar genotipleri kallus ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri FRAP metoduna göre  $\mu\text{g BHT/ml}$  ekstrakt olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.16ABC). Araştırmada kontrol olarak kullanılan nar genotiplerinin  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli olup en yüksek  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetine Suruç Karası (172.00  $\mu\text{g BHT/ml}$  ekstrakt) sahip olurken bunu sırasıyla Suruç (147.17  $\mu\text{g BHT/ml}$ ) ve Hicaz (102.91  $\mu\text{g BHT/ml}$ ) izlemiştir (Şekil 4.16A). Farklı  $\text{AgNO}_3$  dozları içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvveti 5  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  içeren MS kültür ortamından elde edilen Suruç kallus ekstraktlarında (199.81  $\mu\text{g BHT/ml}$  ekstrakt) ölçülürken bunu yine aynı genotipin 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  etkili kallus ekstraktları (177.40  $\mu\text{g BHT/ml}$ ) takip etmiştir. Çalışmada kullanılan  $\text{AgNO}_3$  dozlarının nar genotipleri üzerinde etkinliği değerlendirildiğinde, Suruç için en yüksek etkinliğe sahip dozun 5  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , Hicaz çeşidi için 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  olduğu belirlenirken, Suruç Karasında  $\text{AgNO}_3$  dozlarının etkileri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.16A).

Farklı  $\text{CoCl}_2$  dozları içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvveti 5  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  içeren MS kültür ortamından elde edilen Suruç kallus ekstraktlarında (263.15  $\mu\text{g BHT/ml}$  ekstrakt) ölçülürken bunu yine aynı genotipin 25  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  etkili kallus ekstraktları (240.39  $\mu\text{g BHT/ml}$ ) takip etmiştir. Suruç nar çeşidinin 5 ve 25  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  dozlarına karşı göstermiş olduğu tepkiler arasındaki fark önemli bulunurken, Hicaz ve Suruç Karası için önemsiz bulunmuştur

(Şekil 4.16B). Çalışmada kullanılan en yüksek  $\text{CoCl}_2$  dozunun etkisi dozlar arasında en az etkiye sahipken kontrole göre daha etkin bulunmuştur. Buna ek olarak,  $50 \mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  dozu içeren MS ortamlarında büyütülen Suruç ve Hicaz nar kalluslarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetleri arasında fark bulunmazken,  $\text{CoCl}_2$ 'ün en az etkinliği en yüksek dozda Suruç Karası kalluslarında belirlenmiştir ( $122.68 \mu\text{g BHT/ml}$ ) (Şekil 4.16B).

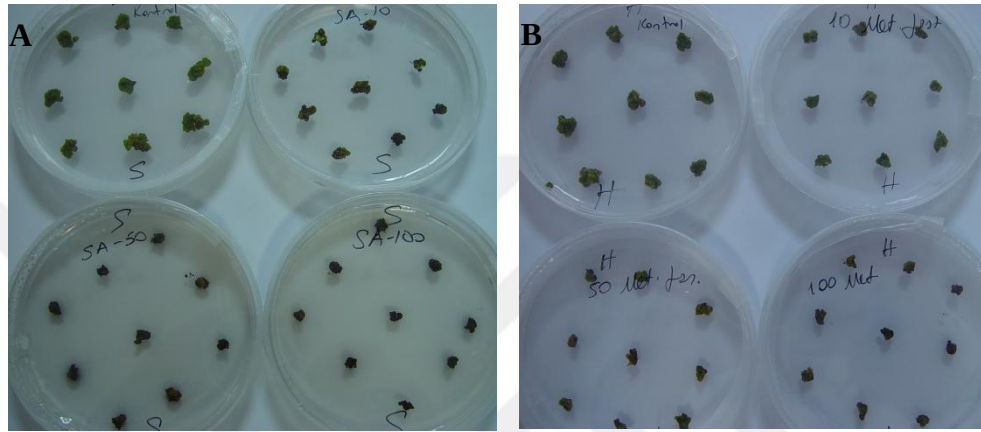
Nar kalluslarının  $\text{CdCl}_2$ 'e karşı göstermiş olduğu tepkilerin kontrole göre farklarının önemli seviyede olduğu bulunurken, dozların çeşitler üzerindeki etkisi de önemli bulunmuştur (Şekil 4.16C).  $\text{CoCl}_2$ 'ün nar kallus ekstraktları  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetleri üzerine en yüksek etkisi Suruç çeşidi için  $5$  ve  $25 \mu\text{M}$  konsantrasyonlarında bulunurken, Hicaz için  $25 \mu\text{M}$ , Suruç Karası için  $5 \mu\text{M}$  konsantrasyonunda bulunmuştur.  $25 \mu\text{M}$ 'dan daha yüksek  $\text{CdCl}_2$  dozunun bütün nar kalluslarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetini düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.16C).



Şekil 4. 16. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvveti. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50  $\mu\text{M}$ ) ağır metal  $\text{AgNO}_3$  (A),  $\text{CoCl}_2$  (B) ve  $\text{CdCl}_2$  (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Farklı ağır metal elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.4. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Bitki Savunma Sistemi İçindeki Sinyal Bileşiklerden Salisilik Asit (SA) ve Metil Jasmonat (MeJA) Uygulanmaları

Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik olarak, kallus çoğaltım besi ortamına 0 (kontrol), 10, 50 ve 100  $\mu$ M olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda salisilik asit (SA) ve ya metil jasmonat (MeJA) ilave edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4. 17. Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşiklerden salisilik asit ve metil Jasmonat uygulamaları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100  $\mu$ M) Salisilik asit (A) ve Metil Jasmonat (B) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür

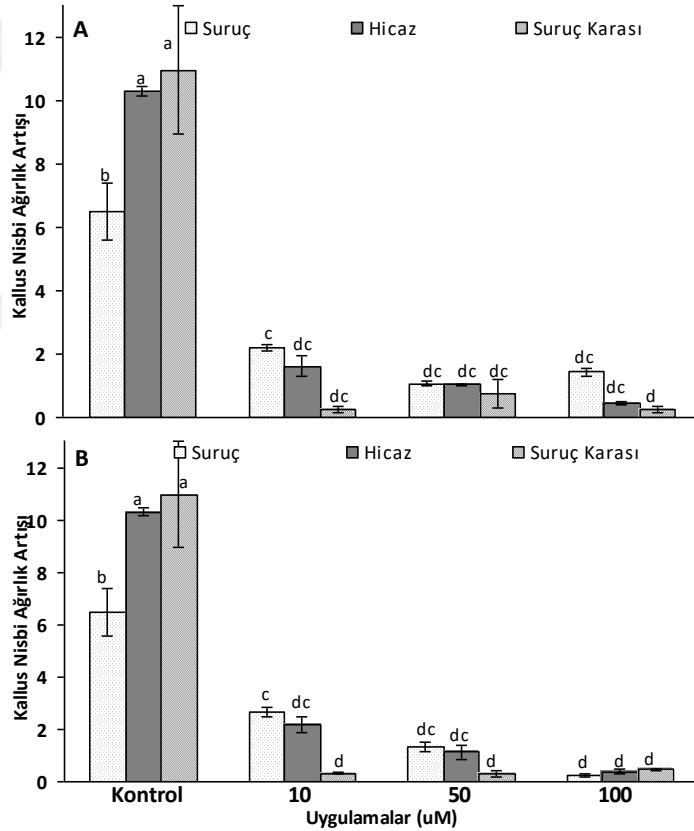
##### 4.4.1. Kallus büyüme indekslerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan nar çeşitlerinin kallusları 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100  $\mu$ M) salisilik asit ve ya metil jasmonat içeren MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Altı hafta sonunda kallusların ilk ve son ağırlıkları karşılaştırılarak nar kalluslarının nisbi ağırlık artışları belirlenmiştir (Şekil 4.18AB). Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunda Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kalluslarının nisbi ağırlık artışları sırasıyla 6.48, 10.29 ve 10.96 olarak belirlenmiştir.

Kültür ortamına eklenen 10, 50 ve 100  $\mu$ M salisilik asidin araştırmada kullanılan üç nar çeşidi kallusları büyüme indeksine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kültür ortamlarında salisilik asidin varlığı tüm çeşitlerin kalluslarının ağırlık artışlarında kontrole göre önemli seviyede düşüşe neden

olmuştur (Şekil 4.18A). Hicaz ve Suruç Karası kalluslarının besi ortamına ilave edilen salisilik asit dozları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Kontrol dışında, en yüksek kallus nisbi ağırlık artış indeksi (2.20), 10  $\mu$ M salisilik asit uygulanan Suruç çeşidinin kalluslarında ölçülürken, en düşük kallus nisbi ağırlık artış indeksi (0.24), 100  $\mu$ M salisilik asit uygulanan Suruç Karası çeşidinin kalluslarında ölçülmüştür.

Nar kalluslarına *in vitro* koşullarda salisilik asit uygulaması ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde *in vitro* kültür ortamlarına metil jasmonat eklenmesi bütün nar çeşitleri kalluslarının nisbi büyüme indekslerini kontrole göre önemli ölçüde düşürmüştür.



Şekil 4. 18. *In vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kalluslarının Büyüme İndeksi. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100  $\mu$ M) Salisilik Asit (A) ve Metil Jasmonat (B) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikleri elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

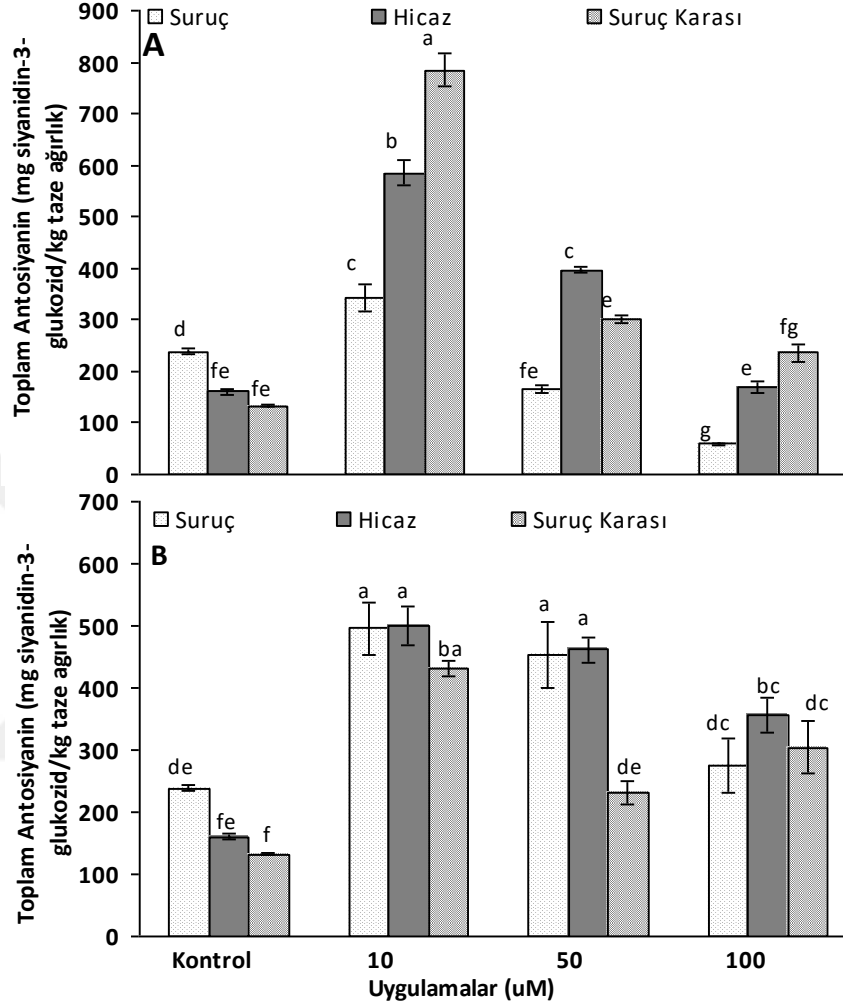
Aynı şekilde Hicaz ve Suruç Karası kalluslarının besi ortamına ilave edilen metil jasmonat dozları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. En düşük kallus nisbi ağırlık artış indeksi (0.24), 100  $\mu$ M metil jasmonat uygulanan Suruç çeşidinin kalluslarında ölçülmüştür. Araştırmada 100  $\mu$ M dozunda metil jasmonat uygulanan üç çeşidin kallus nisbi büyüme indeksleri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.18B).

#### 4.4.2. Toplam antosiyaninlerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki salisilik asit ve ya metil jasmonat katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam antosiyanin kapsamları mg siyanidin-3-glukozid/kg taze ağırlık olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.19AB). Araştırmada kullanılan salisilik asidin tüm dozlarının kontrole göre Hicaz ve Suruç Karası çeşitlerinin kalluslarının toplam antosiyanin kapsamlarını artırdığı ancak Suruç çeşidinin kalluslarına uygulanan 50 ve 100  $\mu$ M salisilik asidin kallusların toplam antosiyanin kapsamlarını düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.19A). Kalluslara uygulanan salisilik asit dozlarından en etkilisinin 10  $\mu$ M olduğu belirlenmiştir. En yüksek antosiyanin kapsamı (784.29 mg siyanidin-3-glukozid/kg) 10  $\mu$ M salisilik asit uygulamasında Suruç Karasının kalluslarında elde edilirken bunu sırasıyla Hicaz çeşidi (584.46 mg siyanidin-3-glukozid/kg) ve Suruç çeşidi (343.44 mg siyanidin-3-glukozid/kg) takip etmiştir. Araştırmada kullanılan çeşitlerin kalluslarına uygulanan salisilik asit dozu artırıldıkça tüm çeşitlerde toplam antosiyanin kapsamlarının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.19A).

Besi ortamında metil jasmonatın varlığı tüm çeşitlerin toplam antosiyanin kapsamlarını olumlu etkilemiştir. En yüksek toplam antosiyanin kapsamları 10 ve 50  $\mu$ M dozlarında metil jasmonat uygulanan Suruç ve Hicaz çeşitlerinin kalluslarında elde edilirken bu dozlarda adı geçen iki çeşidin toplam antosiyanin kapsamları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.19B). En yüksek toplam antosiyanin kapsamı (500.41 mg siyanidin-3-glukozid/kg) 10  $\mu$ M dozunda metil jasmonat uygulanan Hicaz çeşidinin kalluslarında elde edilirken, en düşük toplam antosiyanin kapsamı (132.48 mg siyanidin-3-glukozid/kg) kontrol grubunda Suruç Karası çeşidinin kalluslarında elde edilmiştir. Araştırmada 100  $\mu$ M dozunda metil jasmonat

uygulanan Suruç ve Suruç karası çeşitlerinin kalluslarının toplam antosiyanin kapsamları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.19B).

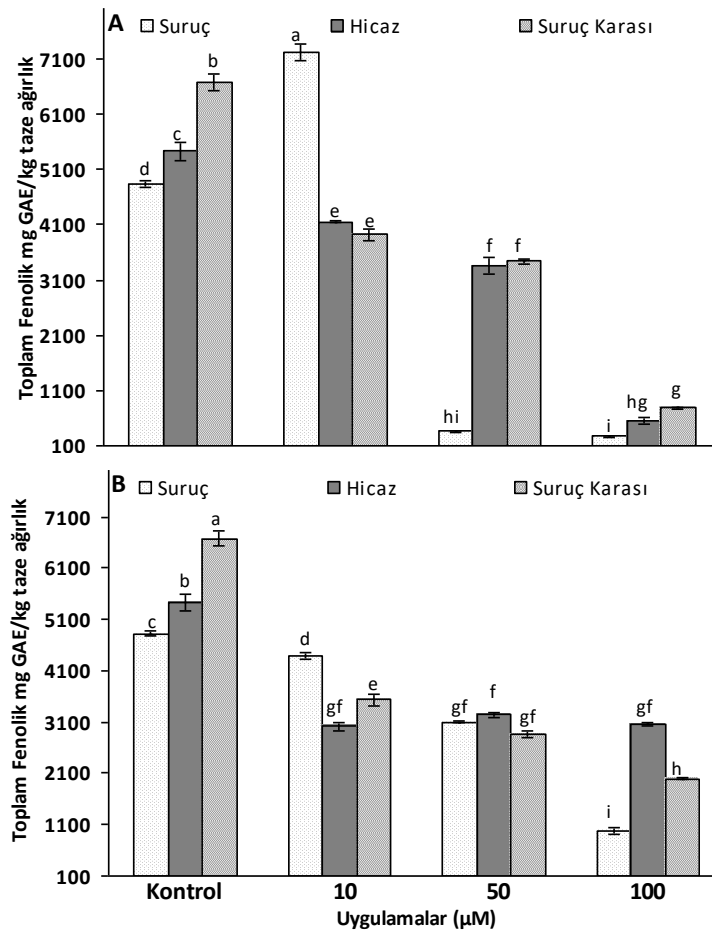


Şekil 4. 19. *İn vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Antosiyanin Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100 µM) Salisilik Asit (A) ve Metil Jasmonat (B) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikleri elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının toplam antosiyanin kapsamları arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.4.3. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki salisilik asit ve ya metil jasmonat katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam

fenolik kapsamları mg GAE/kg olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.20AB). Nar çeşitlerinin kontrol grubu kallus ekstraktlarının toplam fenolik kapsamları Suruç Karası > Hicaz > Suruç olup değerleri sırasıyla 6676.8, 5425.7, 4830.2 mg GAE/kg olarak hesaplanmıştır. Nar kallusları içinde en yüksek fenolik miktarı 10  $\mu$ M salisilik asit katkılı MS ortamındaki Suruç çeşidinde 7225.7 mg GAE/kg olarak ölçülmüşken, uygulanan SA dozu artırıldıkça toplamfenolik miktarı azalmıştır. En düşük fenolik miktarı 50 ve ya 100  $\mu$ M salisilik asit katkılı MS ortamındaki Suruç (363.5 mg GAE/kg, 270.2 mg GAE/kg) çeşidinde ölçülmüştür (Şekil 4.20A).



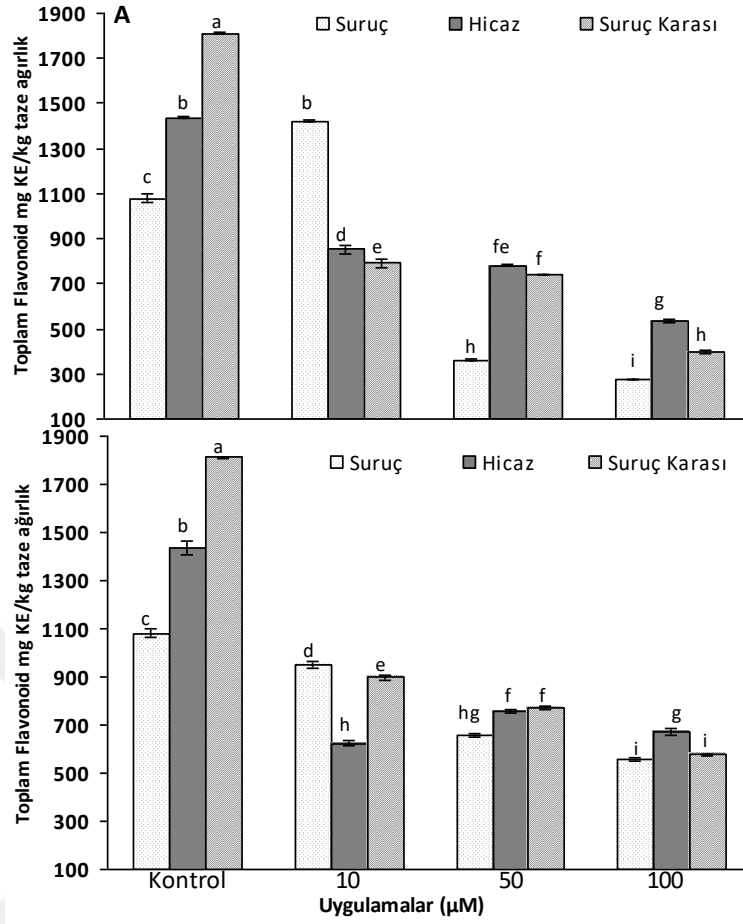
Şekil 4. 20. *In vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Fenolik Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100  $\mu$ M) Salisilik Asit (A) ve Metil Jasmonat (B) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikler elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının toplam fenolik kapsamları arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

MS kültür ortamında metil jasmonatın varlığı tüm çeşitlerin kalluslarının toplam fenolik kapsamlarını olumsuz etkilemiştir. Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin kalluslarına uygulanan metil jasmonat konsantrasyonu artırıldıkça toplam fenolik kapsamlarında azalma olurken, Hicaz çeşidinde 10, 50 veya 100  $\mu$ M dozlarında metil jasmonat uygulanan kallusların toplam fenolik kapsamları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 3.3B). En yüksek fenolik kapsamı (6676.8 mg GAE/kg) kontrol grubunda Suruç Karası çeşidinin kalluslarında elde edilirken en düşük fenolik kapsamı (988 mg GAE/kg) 100  $\mu$ M dozunda metil jasmonat uygulanan Suruç çeşidinin kalluslarında ölçülmüştür (Şekil 4.20B).

#### 4.4.4. Toplam flavonoidlerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki salisilik asit ve ya metil jasmonat katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları mg KE/kg olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.21AB). Salisilik asidin farklı dozlarının nar kalluslarının toplam flavonoid kapsamları üzerindeki etkisi önemli bulunurken, uygulanan dozlar artırıldığında Hicaz ve Suruç Karası nar çeşitlerinin kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları azalmıştır. Suruç çeşidinin kalluslarında en yüksek toplam flavonoid kapsamı (1423.2 mg KE/kg) 10  $\mu$ M dozunda salisilik asit uygulanan kalluslarda ölçülürken, uygulanan SA dozu artırıldıkça toplam flavonoid kapsamı azalmıştır. En düşük toplam flavonoid kapsamı (270.2 mg KE/kg) 100  $\mu$ M dozunda SA uygulanan Suruç çeşidinin kalluslarında ölçülmüştür (Şekil 4.21A).

Nar kallus kültürlerinde metil jasmonat uygulamalarının, çalışmada kullanılan üç nar çeşidinin kalluslarında toplam flavonoid sentezini azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.21B). En yüksek toplam flavonoid kapsamı 1811.8 mg KE/kg ile kontrol grubunda Suruç Karası çeşidinin kalluslarında elde edilirken bunu sırası ile 1434.2 mg KE/kg ve 1079.3 mg KE/kg ile kontrol grubunda Hicaz ve Suruç çeşitleri izlemiştir (Şekil 4.21B).



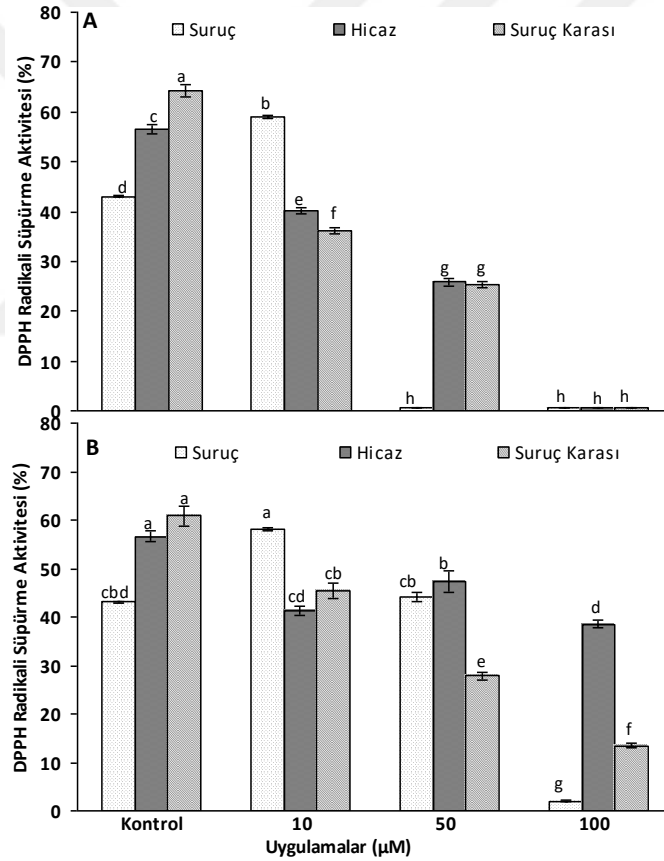
Şekil 4. 21. *In vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Flavonoid Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100 µM) Salisilik Asit (A) ve Metil Jasmonat (B) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikler elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.4.5. DPPH serbest radikalini süpürülmesi

Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit ve ya metil jasmonat katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri % olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.22AB). Araştırmada kontrol olarak kullanılan nar çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki fark önemli olup en yüksek değere Suruç Karası (% 64.12) sahip olurken bunu sırasıyla Hicaz (% 56.58) ve Suruç (% 43.08) izlemiştir. Araştırmada kullanılan Hicaz ve Suruç Karası çeşitlerinin DPPH serbest radikalini

süpürme kapasiteleri kontrol grubunda en yüksek seviyelerde iken MS besisi ortamına salisilik asit ilave edilmesi bu iki çeşidin DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini olumsuz etkilemiştir. Suruç çeşidi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri üzerine en etkili salisilik asit dozu 10  $\mu$ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.22A).

MS besisi ortamında metil jasmonat varlığı Hicaz ve Suruç Karası çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini olumsuz etkilerken, 10  $\mu$ M dozunda uygulanan metil jasmonat Suruç çeşidi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri üzerine olumlu etki yapmıştır (Şekil 4.22B).



Şekil 4. 22. İn vitro koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı DPPH Radikali Süpürme Aktiviteleri. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100  $\mu$ M) Salisilik Asit (A) ve Metil Jasmonat (B) katkılı MS besisi ortamında büyütülmüştür. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikler elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının DPPH radikali süpürme aktiviteleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

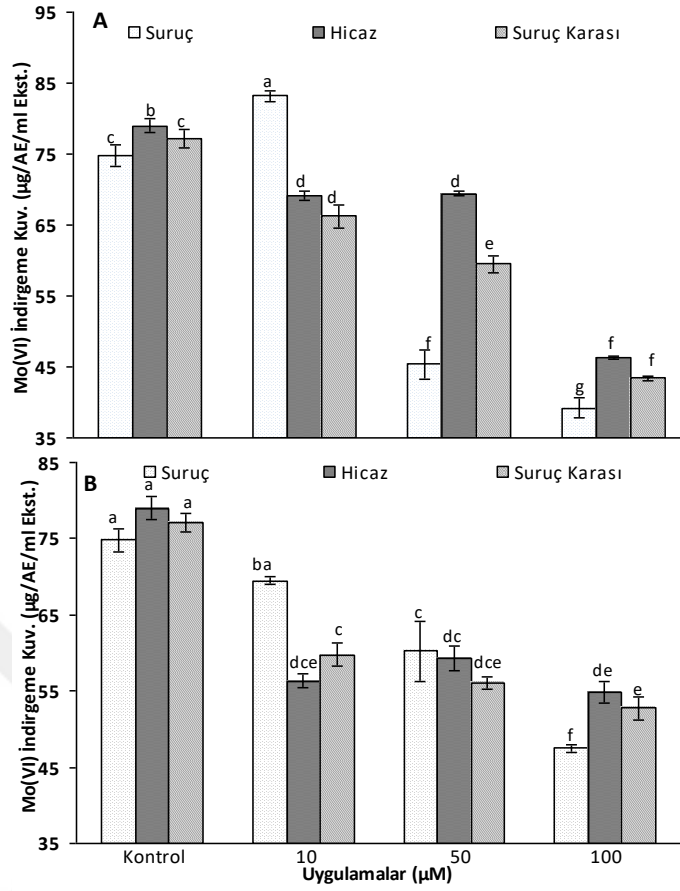
Araştırmada kontrol olarak kullanılan Hicaz ve Suruç Karası nar çeşitlerinin kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Aynı şekilde 10  $\mu$ M dozunda metil jasmonat uygulanan Hicaz ve Suruç Karası nar çeşitlerinin kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.22B).

#### **4.4.6. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi**

##### **4.4.6.1. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi**

Değişik konsantrasyonlarda salisilik asit ve ya metil jasmonat katkılı MS besi ortamında büyütülen farklı nar genotipleri kallus ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri fosfomolibden metoduna göre  $\mu$ g AE/ml ekstrakt olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.23AB). Araştırmada kontrol olarak kullanılan Suruç ve Suruç Karası nar çeşitlerinin Mo (VI) indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli bulunmamıştır. En yüksek toplam antioksidan kapasitesi (83.17  $\mu$ g AE/ml ekstrakt) 10  $\mu$ M dozunda salisilik asit uygulanan Suruç çeşidi kalluslarında ölçülürken, kalluslara uygulanan salisilik asit dozu artırıldıkça toplam antioksidan kapasitelerinin azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.23A).

Nar kallus kültürlerinde metil jasmonat uygulamalarının, çalışmada kullanılan üç nar çeşidinin kalluslarında toplam antioksidan kapasitelerini azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.23B). En yüksek toplam antioksidan kapasiteleri tüm çeşitlerde kontrol grubu kalluslarında elde edilirken, kontrol grubunda toplam antioksidan kapasiteleri yönünden çeşitler arasındaki fark önemli bulunmamıştır (Şekil 4.23B).

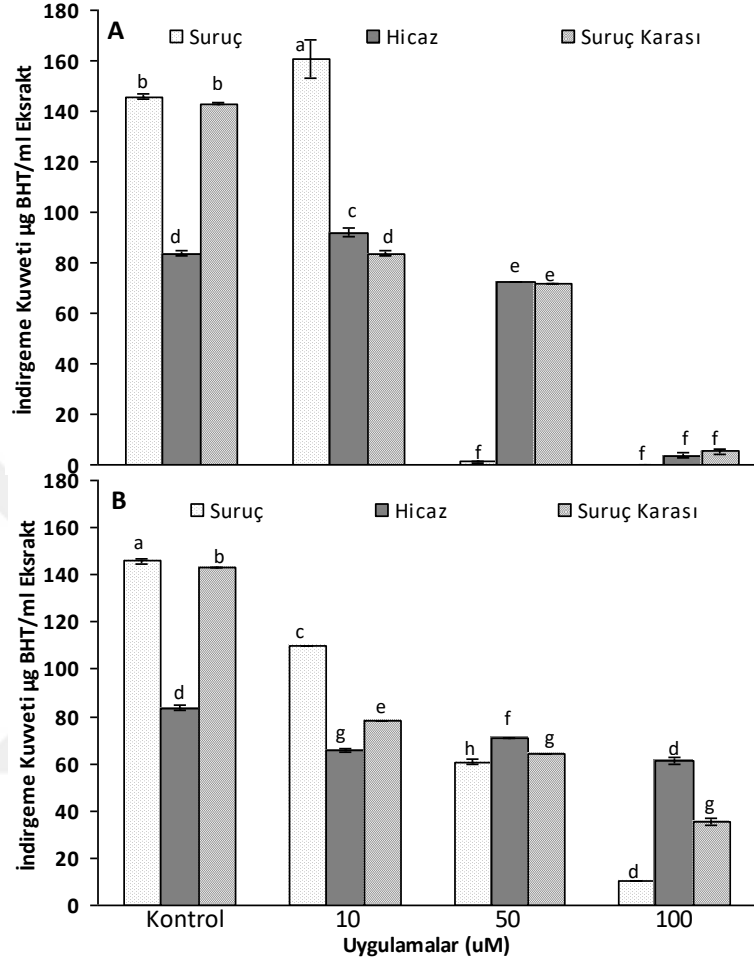


Şekil 4. 23. *İn vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Mo (VI) indirgeme kuvveti. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100 µM) Salisilik Asit (A) ve Metil Jasmonat (B) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikleri elisatör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının Mo(VI) indirgeme kuvvetleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.4.6.2. FRAP metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda salisilik asit ve ya metil jasmonat katkılı MS besi ortamında büyütülen üç farklı nar çeşidinin kallus ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri FRAP metoduna göre µg BHT/ml ekstrakt olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.24AB). Araştırmada kontrol olarak kullanılan Suruç ve Suruç Karası nar çeşitlerinin  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli bulunmazken Hicaz nar çeşidinin  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvveti daha düşük hesaplanmıştır. Salisilik asidin nar kallus ekstraktları  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetleri üzerine en etkili dozu Suruç ve Hicaz

çeşitleri için 10  $\mu\text{M}$  olarak belirlenirken, Suruç Karası için kontrol grubu belirlenmiştir (Şekil 4.24A).



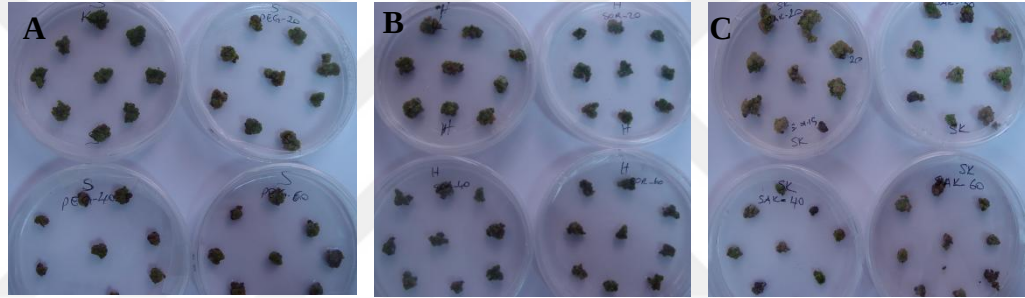
Şekil 4. 24. *In vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı  $\text{Fe}^{+3}$  İndirgeme Kuvveti. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ ) Salisilik Asit (A) ve Metil Jasmonat (B) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Bitki savunma sistemi içindeki sinyal bileşikleri elisitör uygulamalarından elde edilen nar kallus etanolik ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

Farklı metil jasmonat dozları içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvveti kontrol grubunda Suruç ve Suruç Karası kallus ekstraktlarında (145.79 ve 143.03  $\mu\text{g BHT/ml}$  ekstrakt) ölçülürken bunları 10  $\mu\text{M}$  metil jasmonat uygulanan Suruç çeşidinin kallus ekstraktları (110.27  $\mu\text{g BHT/ml}$ )

takip etmiştir. MS besisi ortamına metil jasmonat ilave edilmesi nar kallus ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetlerini çok olumsuz etkilemiştir (Şekil 4.24B).

#### 4.5. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Olarak Dokularda Osmotik Strese Neden Olan Polietilen Glikol (PEG), Sorbitol ve Sakkaroz Uygulanmaları

Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik olarak, kallus çoğaltım besisi ortamı ile aynı içeriğe sahip MS besisi ortamına 0 (kontrol), 20, 40, 60 g/l olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda polietilen glikol (PEG), sorbitol ve sakkaroz ilave edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4. 25. Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik olarak dokularda osmotik strese neden olan polietilen glikol (PEG), sorbitol ve sakkaroz uygulamaları. Suruç, Hicaz ve Suruç karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 ve 60 g/l) PEG (A), Sorbitol (B) ve Sakkaroz (C) katkılı MS besisi ortamında büyütülmüştür

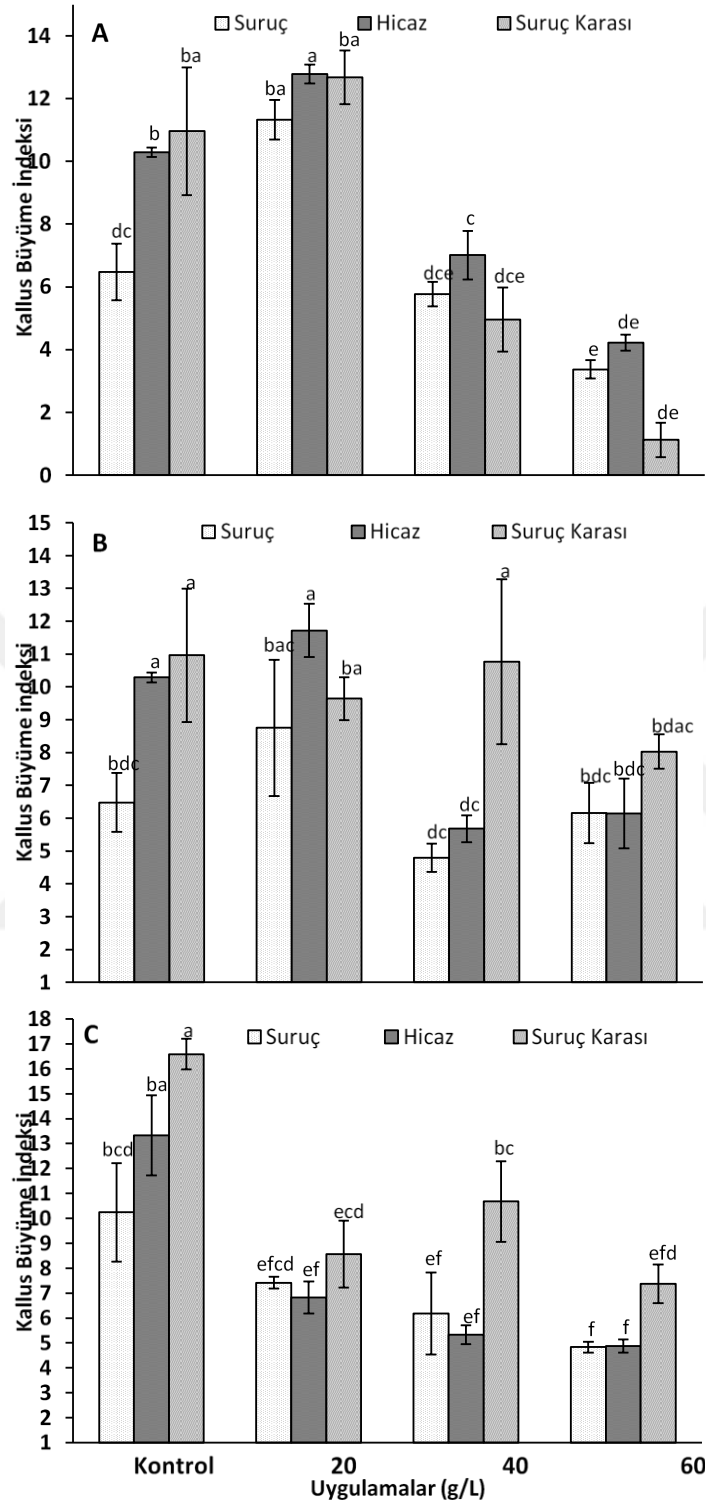
##### 4.5.1. Kallus büyüme indekslerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan nar çeşitlerinin kallusları 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA katkılı MS tuzları ve vitaminlerinden oluşan ve 0 (kontrol), 20, 40 ve 60 g/l sorbitol, sakkaroz ve ya polietilen glikol (PEG) ilave edilen *in vitro* büyüme ortamında kültüre alınmıştır. Altı hafta sonunda kallusların ilk ve son ağırlıkları karşılaştırılarak nar kalluslarının nisbi ağırlık artışları belirlenmiştir (Şekil 4.26ABC). Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunda Suruç ve Hicaz kallusları nisbi ağırlık artışları sırasıyla 6.48 ve 10.29 iken Suruç Karası kalluslarının nisbi ağırlık artışı 10.96 olarak belirlenmiştir. Kültür ortamına eklenen 20, 40, ve 60 g/l sakkarozun araştırmada kullanılan üç nar çeşidi kallusları büyüme indeksine etkileri araştırılmıştır. Araştırma

sonucuna göre kültür ortamlarına eklenen 20 g/l sakkaroz Suruç ve Hicaz çeşitlerinin kalluslarının ağırlıklarında kontrole göre artışa sebep olurken, Suruç Karası nar kalluslarındaki nisbi ağırlık artışı kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki fark önemsiz bulunmuştur. Tüm çeşitlerin kalluslarındaki en yüksek nisbi kallus ağırlık artışı 20 g/l sakkaroz uygulamasından elde edilirken sakkaroz dozu artırıldıkça kallus ağırlıkları azalmıştır. Suruç Karası kalluslarında en düşük ağırlık artış indeksi (1.12), 60 g/l sakkaroz içeren MS ortamındaki kalluslarda ölçülmüştür (Şekil 4.26A).

İn vitro koşullarda yetiştirilen kontrol grubu nar genotiplerinin nisbi ağırlık artışı Suruç Karası > Hicaz > Suruç olup değerleri sırasıyla 10.96, 10.29, ve 6.48 olarak hesaplanmıştır. Nar genotipleri *in vitro* kültür ortamlarına 20 g/l dozunda PEG eklenmesi Hicaz çeşidi kalluslarının nisbi büyüme indeksinde kontrole göre fark yaratmazken, Suruç çeşidinde kallus büyüme indeksi yükselmiş, Suruç Karası çeşidinde kallus büyüme indeksi kontrole kıyasla düşmüştür. 40 g/l PEG katkılı besin ortamında büyütülen Suruç ve Hicaz çeşitlerinin kallus büyüme indekslerinde kontrole kıyasla düşüş belirlenirken, kontrolle karşılaştırıldığında Suruç Karası çeşidinin kallus indeksindeki değişim önemsiz bulunmuştur. Kalluslara uygulanan 60 g/l PEG Hicaz ve Suruç Karası çeşitlerinin kallus büyüme indekslerinde kontrole kıyasla düşüş belirlenirken, kontrolle karşılaştırıldığında Suruç çeşidinin kallus indeksindeki değişim önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.26B).

İn vitro koşullarda yetiştirilen kontrol grubu nar genotiplerinin nisbi ağırlık artışı Suruç Karası> Hicaz > Suruç olup değerleri sırasıyla 16.59, 13.33 ve 10.24 olarak hesaplanmıştır. İn vitro kültür ortamlarına sorbitol eklenmesi üç nar çeşidinin kalluslarının nisbi büyüme indekslerini kontrole göre düşürmüştür. Suruç ve Hicaz çeşitlerinin kalluslarında en düşük ağırlık artış indeksi (4.83 ve 4.88) 60 g/l sorbitol içeren MS ortamındaki kalluslarda ölçülmüştür (Şekil 4.26C).



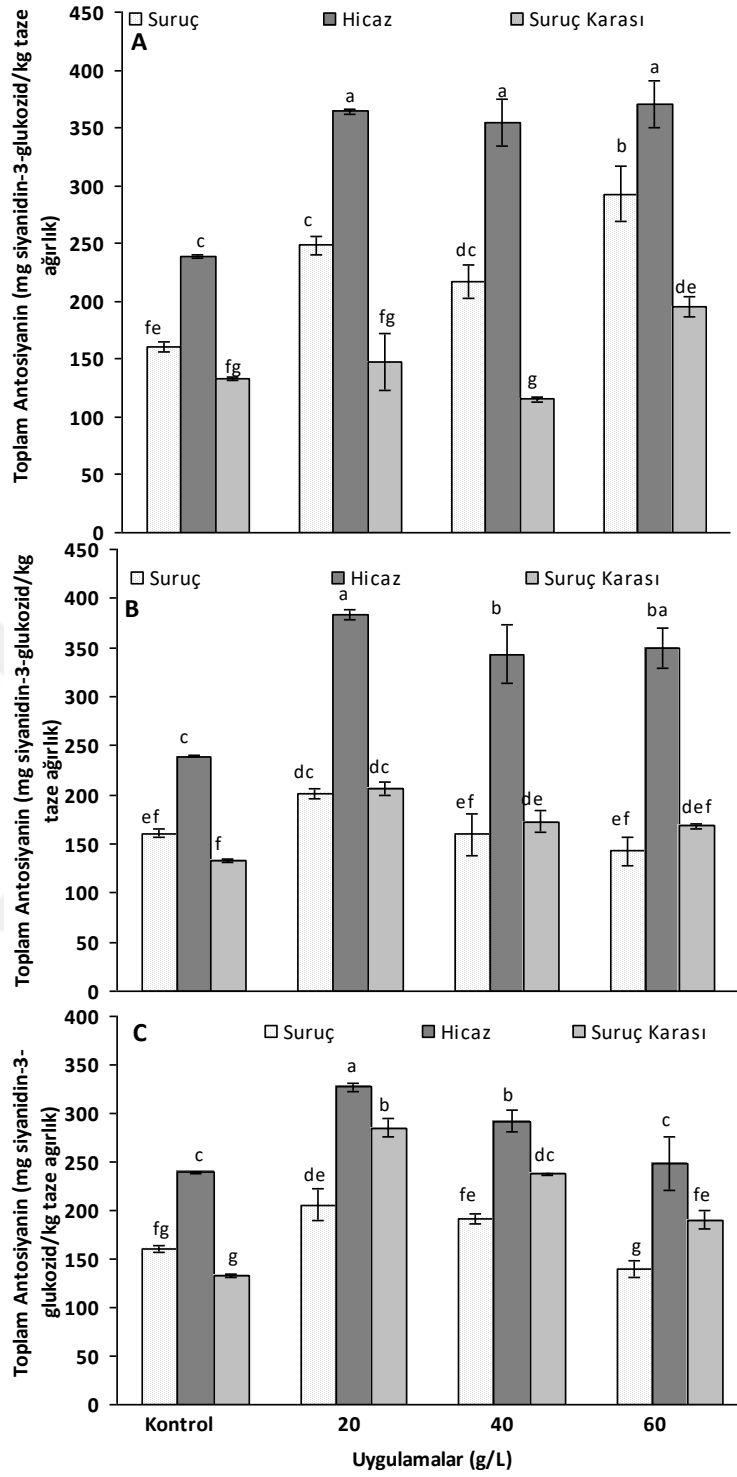
Şekil 4. 26. *In vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kalluslarının Büyüme İndeksi. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 ve 60 g/l) Sakkaroz (A), Polietilen Glikol (PEG) (B) ve Sorbitol (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Dokularda ozmotik strese neden olan farklı elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.5.2. Toplam antosiyaninlerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki sorbitol, sakkaroz ve ya PEG katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam antosiyanin kapsamları mg siyanidin-3-glukozid/kg taze ağırlık olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.27ABC). Araştırmada kullanılan sakkaroz dozlarının Suruç ve Hicaz çeşitlerinde kontrole göre kallusların toplam antosiyanin kapsamlarını artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.27A). Suruç Karası çeşidine ait kallusların antosiyanin kapsamı kontrol ile kıyaslandığında 20 g/l sakkaroz uygulamasında fark önemsiz bulunurken, 40 g/l sakkaroz dozu antosiyanin kapsamını azaltmış ancak 60 g/l sakkaroz dozu antosiyanin kapsamını arttırmıştır (Şekil 4.27A).

Nar çeşitlerinin kontrol grubu kallus ekstraktlarının toplam antosiyanin kapsamları Hicaz > Suruç > Suruç Karası olup değerleri sırasıyla 238.79, 160.30, 132.47 mg siyanidin-3-glukozid/kg olarak hesaplanmıştır. Tüm çeşitlerde 20 g/l PEG uygulaması kontrole göre kallusların toplam antosiyanin kapsamlarında artışa sebep olmuştur. En yüksek antosiyanin kapsamı 383.51 mg siyanidin-3-glukozid/kg 20 g/l PEG uygulamasında Hicaz çeşidinin kalluslarında elde edilirken 20 g/l PEG'in tüm çeşitler için en etkili doz olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.27B).

Besi ortamında sorbitol varlığının kontrole göre üç çeşidin kalluslarının toplam antosiyanin kapsamlarında artışa sebep olduğu, 20 g/l sorbitolun en etkili doz olarak belirlendiği ve sorbitol konsantrasyonu arttıkça üç çeşidin de antosiyanin kapsamlarının azaldığı ancak yine de kontrolden yüksek olduğu ortaya konmuştur. 60 g/l sorbitol uygulanan Hicaz çeşidine ait kallusların antosiyanin kapsamı kontrol ile kıyaslandığında aradaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.27C).



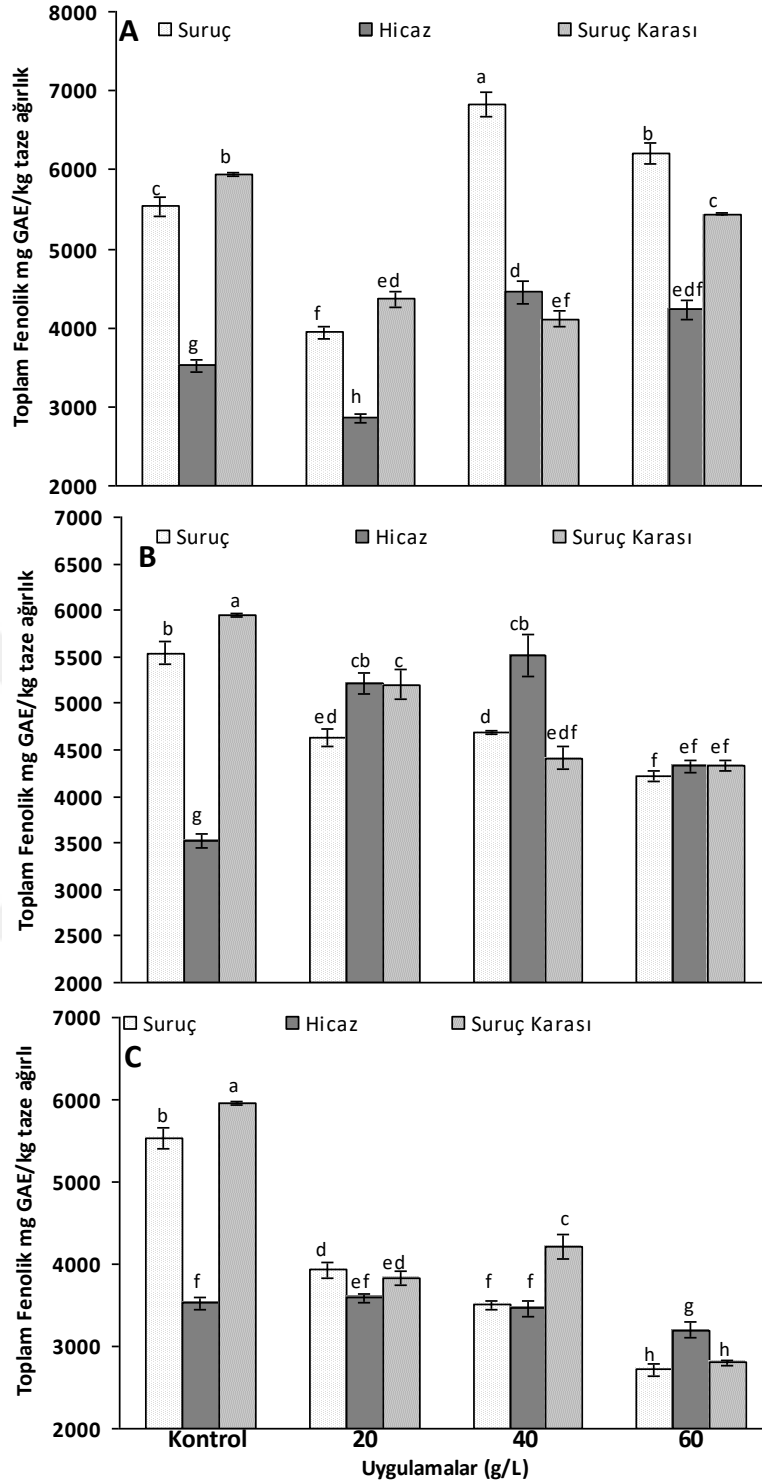
Şekil 4. 27. *İn vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Antosiyanin Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 ve 60 g/l) Sakkaroz (A), Polietilen Glikol (PEG) (B) ve Sorbitol (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Dokularda ozmotik strese neden olan farklı elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.5.3. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki sorbitol, sakkaroz ve ya PEG katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam fenolik kapsamları mg GAE/kg olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.28ABC). Nar çeşitlerinin kontrol grubu kallus ekstraktlarının toplam fenolik kapsamları Suruç Karası > Suruç > Hicaz olup değerleri sırasıyla 5948, 5534.7, 3523.6 mg GAE/kg olarak hesaplanmıştır. Nar kallusları içinde en yüksek fenolik miktarı 40 g/l sakkaroz katkılı MS ortamındaki Suruç çeşidinde 6827.6 mg GAE/kg olarak ölçülmüştür. MS ortamına 20 g/l dozunda Sakkaroz eklenmesi üç çeşidin fenolik miktarlarını düşürürken, en düşük fenolik miktarı 20 g/l sakkaroz katkılı MS ortamındaki Hicaz (2852.4 mg GAE/kg) çeşidinde ölçülmüştür (Şekil 4.28A).

MS kültür ortamında PEG'ün varlığı Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin toplam fenolik kapsamlarını olumsuz etkilerken, Hicaz çeşidi kalluslarının toplam fenolik kapsamı üzerine olumlu etki yapmıştır. PEG katkılı MS kültür ortamındaki nar kallusları içinde en yüksek fenolik miktarı kontrol grubunda Suruç Karası ve Suruç çeşitlerinde 5948 ve 5534.7 mg GAE/kg olarak ölçülürken, PEG dozu arttırıldıkça bu çeşitlerin toplam fenolik miktarları azalmıştır. 20 ve 40 g/l PEG ilave edilen ortamlarda kültüre alınan Hicaz çeşidi kalluslarının toplam fenolik kapsamı kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunurken bu iki doz arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.28B).

Nar kallus kültürlerinde sorbitol uygulamaları Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin toplam fenolik bileşik sentezini azalttığı belirlenmiştir. Kontrol, 20 ve 40 g/l sorbitol ilave edilen ortamlarda kültüre alınan Hicaz çeşidi kalluslarının toplam fenolik kapsamları arasındaki farklar önemsiz bulunurken doz 60 g/l'ye çıkarıldığında toplam fenolik miktarı azalmıştır (Şekil 4.28C).



Şekil 4. 28. *In vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Fenolik Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 ve 60 g/l) Sakkaroz (A), Polietilen Glikol (PEG) (B) ve Sorbitol (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Dokularda ozmotik strese neden olan farklı elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

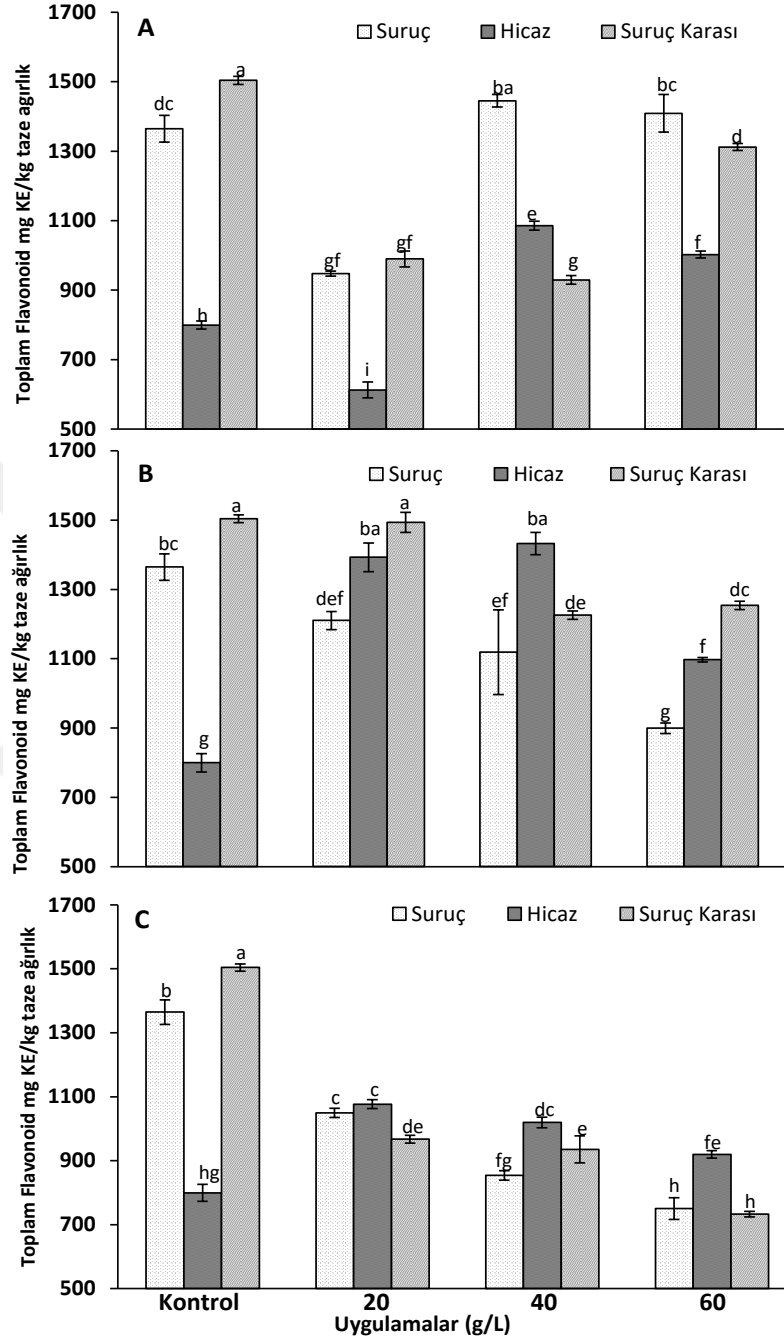
#### 4.5.4. Toplam flavonoidlerin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki sorbitol, sakkaroz ve ya PEG katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları mg KE/kg olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.29ABC). Sakkarozun farklı dozlarının nar kalluslarının toplam flavonoid kapsamları üzerindeki etkisi önemli bulunurken, uygulanan dozlar nar kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları üzerine her çeşitte farklı etki yapmıştır. Suruç ve Hicaz çeşitlerinin kalluslarında toplam flavonoid kapsamlarını en çok yükselten sakkaroz dozu 40 g/l iken Suruç Karası kalluslarına uygulanan sakkaroz dozunun yükseltilmesi toplam flavonoid kapsamları üzerine olumsuz etki yapmıştır. En yüksek toplam flavonoid kapsamı 1503.9 mg KE/kg ile kontrol grubunda Suruç Karası çeşidinin kalluslarında, en düşük toplam flavonoid kapsamı ise 612.7 mg KE/kg ile Hicaz çeşidinin kalluslarında belirlenmiştir (Şekil 4.29A).

PEG'ün varlığı Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin toplam flavonoid kapsamlarını olumsuz etkilerken, Hicaz çeşidi kalluslarının toplam flavonoid içeriği üzerine olumlu etki yapmıştır. Araştırmada Suruç Karası ve Suruç çeşitlerinin flavonoid üretim düzeyleri elisitör katkısız (kontrol) MS besi ortamında kültüre alınan kalluslarda en yüksek (1503.09 ve 1364.4 mg KE/kg) düzeyde bulunurken, PEG dozu 40 ve 60 g/l'ye yükseltildikçe çeşitlerin toplam flavonoid kapsamları azalmıştır. Hicaz çeşidinin toplam flavonoid kapsamı kontrol grubunda en düşük (799.5 mg KE/kg) düzeyde bulunurken en yüksek düzey (1503.9 mg KE/kg) Suruç Karası çeşidinde elde edilmiştir (Şekil 4.29B).

PEG'ün nar kalluslarında flavonoid sentezi üzerine etkinliğine benzer şekilde, sorbitolün varlığı Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin toplam flavonoid kapsamlarını olumsuz etkilerken, Hicaz çeşidi kalluslarının toplam flavonoid içerikleri üzerine olumlu etki yapmıştır. Suruç Karası çeşidinde en yüksek flavonoid miktarı (1503.09 mg KE/kg) kontrol grubundaki kalluslardan elde edilmiştir. Suruç çeşidinin kontrol grubunda toplam flavonoid miktarı 1364.4 mg KE/kg iken kalluslara uygulanan sorbitol dozunun yükseltilmesi toplam flavonoid kapsamları üzerine olumsuz etki

yapmıştır. Hicaz çeşidinin kalluslarında sentezlenen flavonoid miktarına en etkili sorbitol dozu 20 g/l belirlenmiştir (Şekil 4.29C).



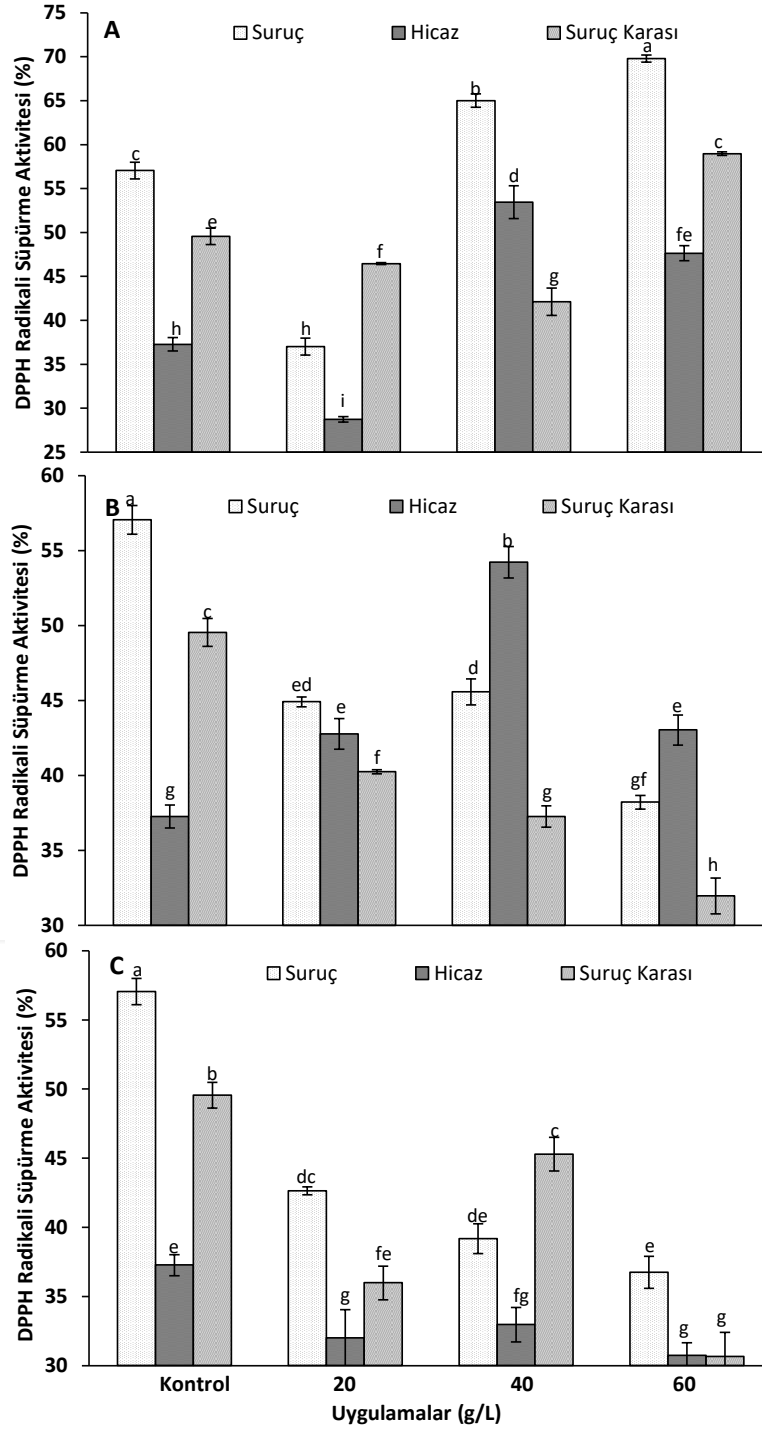
Şekil 4. 29. *İn vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Toplam Flavonoid Kapsamları. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 ve 60 g/l) Sakkaroz (A), Polietilen Glikol (PEG) (B) ve Sorbitol (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Dokularda ozmotik strese neden olan farklı elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

#### 4.5.5. DPPH serbest radikalini süpürülmesi

Farklı konsantrasyonlarda sorbitol, sakkaroz ve ya PEG katkılı MS besi ortamında büyütülen Suruç, Hicaz ve Suruç Karası kallus ekstraktlarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri % olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.30ABC). Araştırmada kontrol grubundaki farklı nar çeşidi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki farkların önemli olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubundaki nar çeşitlerinin kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri sırasıyla Suruç > Suruç Karası > Hicaz (% 57.06, % 49.55, % 37.27) olarak belirlenmiştir. En yüksek DPPH serbest radikalini süpürme kapasitesi (% 69.79) Suruç çeşidine ait kalluslarda 60 g/l sakkaroz uygulamasında, en düşük düzey (% 28.73) Hicaz çeşidine ait kalluslarda 20 g/l sakkaroz uygulamasında elde edilmiştir. (Şekil 4.30A).

MS besi ortamında PEG varlığı Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini olumsuz etkilerken, Hicaz çeşidi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri üzerine olumlu etki yapmıştır. Suruç çeşidinin kontrol grubunda DPPH serbest radikalini süpürme kapasitesi en yüksek (% 57.06) seviyede iken kalluslara uygulanan PEG dozunun yükseltilmesi radikali süpürme kapasitesi üzerine olumsuz etki yapmıştır. Hicaz çeşidi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri üzerine en etkili PEG dozu 40 g/l olarak belirlenmiştir (Şekil 4.30B).

Araştırmada kontrol olarak kullanılan nar genotiplerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki fark önemli olup en yüksek değere Suruç (% 57.06) sahip olurken bunu sırasıyla Suruç Karası (% 49.55) ve Hicaz (% 37.27) izlemiştir. Araştırmada kullanılan Suruç, Hicaz ve Suruç Karası çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri kontrol grubunda en yüksek seviyelerde iken MS besi ortamına sorbitol ilave edilmesi tüm çeşitlerin DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini olumsuz etkilemiştir (Şekil 4.30C).



Şekil 4. 30. *İn vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı DPPH Radikalı Süpürme Aktiviteleri. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 ve 60 g/l) Sakkaroz (A), Polietilen Glikol (PEG) (B) ve Sorbitol (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Dokularda ozmotik strese neden olan farklı elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir.

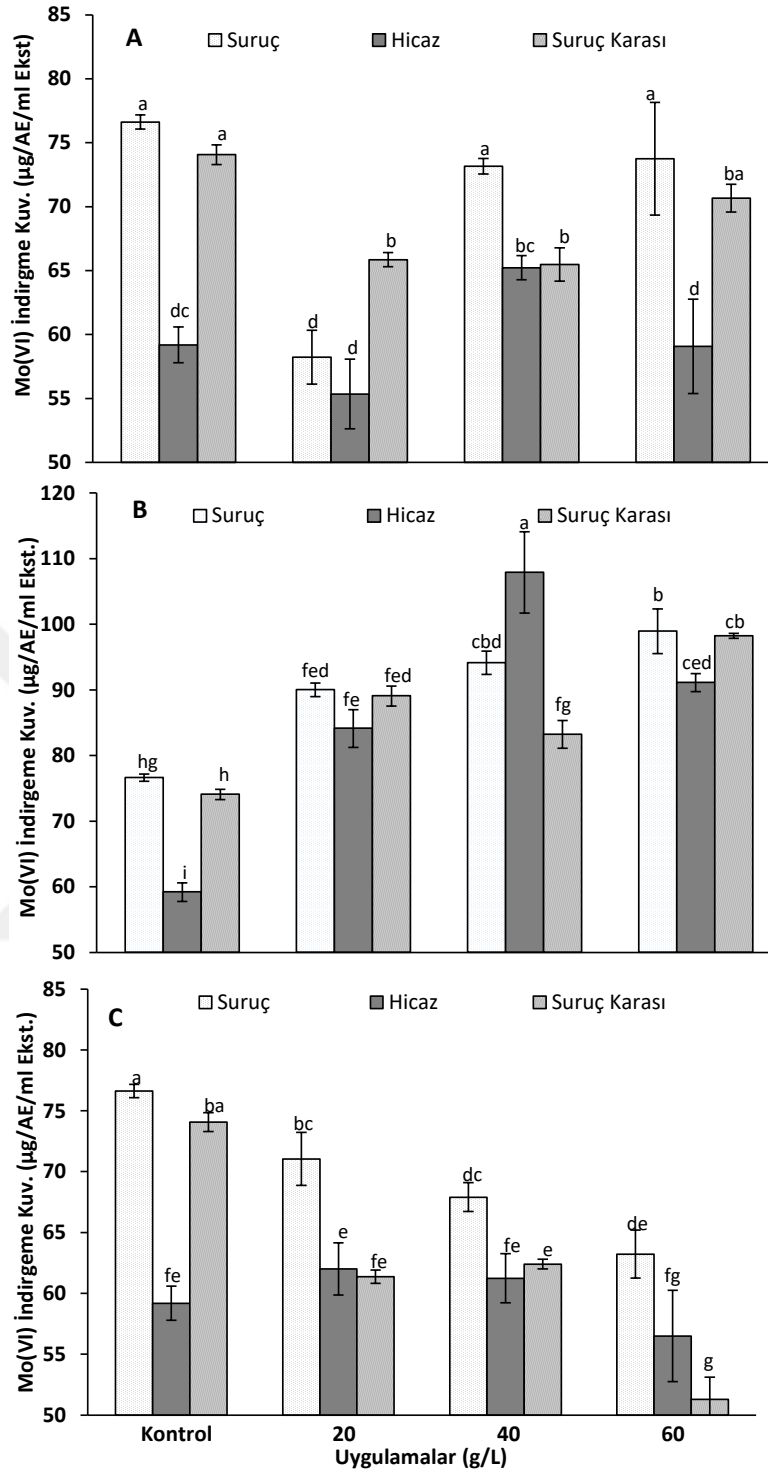
#### 4.5.6. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

##### 4.5.6.1. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Değişik konsantrasyonlarda sorbitol, sakkaroz ve ya PEG katkılı MS besi ortamında büyütülen farklı nar genotipleri kallus ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri fosfomolibden metoduna göre  $\mu\text{g AE/ml}$  ekstrakt olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.31ABC). Araştırmada kontrol olarak kullanılan Suruç ve Suruç Karası nar çeşitlerinin Mo(VI) indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Suruç nar çeşidinin 40 ve 60 g/l sakkaroz dozlarına karşı göstermiş olduğu tepkiler ile kontrol grubu arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Sakkarozun Hicaz kallus ekstraktları Mo(VI) indirgeme kuvvetleri üzerine en etkili dozu 40 g/l olarak belirlenmiştir (Şekil 4.31A).

Farklı PEG dozları içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının Mo (VI) indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek Mo (VI) indirgeme kuvveti 40 g/l PEG içeren MS kültür ortamından elde edilen Hicaz kallus ekstraktlarında ( $107.9 \mu\text{g AE/ml}$  ekstrakt) ölçülürken bunu 60 g/l PEG uygulanan Suruç çeşidinin kallus ekstraktları ( $98.9 \mu\text{g AE/ml}$  ekstrakt) takip etmiştir. MS besi ortamına PEG ilave edilmesi nar kallus ekstraktlarının Mo (VI) indirgeme kuvvetlerini olumlu etkilemiştir (Şekil 4.31B).

Araştırmada kontrol grubundaki farklı nar çeşidi kalluslarının Mo (VI) indirgeme kuvveti arasındaki farkların önemli olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubundaki nar çeşitlerinin kalluslarının Mo (VI) indirgeme kuvvetleri sırasıyla Suruç > Suruç Karası > Hicaz ( $76.63, 74.07, 59.19 \mu\text{g AE/ml}$  ekstrakt) olarak belirlenmiştir. MS besi ortamına ilave edilen sorbitol dozu arttırıldıkça Suruç ve Suruç Karası kalluslarının Mo (VI) indirgeme kuvveti azalmıştır. Hicaz çeşidi kalluslarının Mo (VI) indirgeme kuvveti üzerine en etkili sorbitol dozu 20 g/l belirlenirken daha yüksek dozlarda sorbitol uygulanan kallusların Mo (VI) indirgeme kuvveti ile kontrol grubu arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.31C).



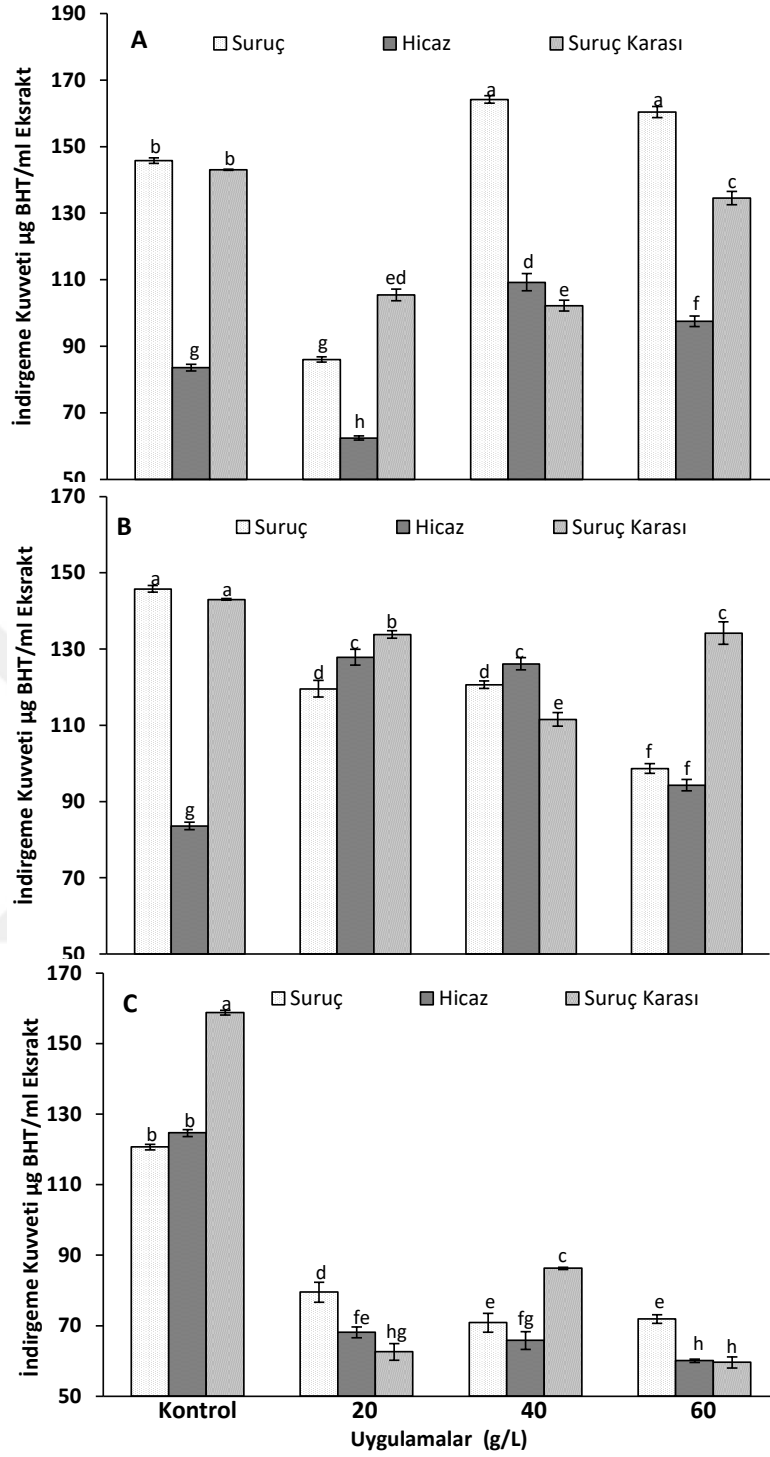
Şekil 4. 31. *İn vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı Mo(VI) indirgeme kuvveti. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 ve 60 g/l) Sakkaroz (A), Polietilen Glikol (PEG) (B) ve Sorbitol (C) katkı MS besi ortamında büyütülmüştür. Dokularda ozmotik strese neden olan farklı elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

**4.5.6.2. FRAP metodu ile toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi**

Değişik konsantrasyonlarda sorbitol, sakkaroz ve ya PEG katkılı MS besi ortamında büyütülen farklı nar genotipleri kallus ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri FRAP metoduna göre  $\mu\text{g BHT/ml}$  ekstrakt olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.32ABC). Araştırmada kontrol olarak kullanılan Suruç ve Suruç Karası nar çeşitlerinin  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli bulunmazken Hicaz nar çeşidinin  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvveti daha düşük hesaplanmıştır. Sakkarozun nar kallus ekstraktları  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetleri üzerine en yüksek etkisi Suruç çeşidi için 40 ve 60 g/l konsantrasyonlarda bulunurken, Hicaz için 40 g/l, Suruç Karası için kontrol grubunda bulunmuştur (Şekil 4.32A).

Farklı PEG dozları içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvveti kontrol grubunda Suruç ve Suruç Karası kallus ekstraktlarında (145.79 ve 143.03  $\mu\text{g BHT/ml}$  ekstrakt) ölçülürken bunları 20 g/l PEG uygulanan Suruç Karası kallus ekstraktları (133.83  $\mu\text{g BHT/ml}$ ) takip etmiştir (Şekil 4.32B).

Nar kalluslarının sorbitole karşı göstermiş olduğu tepkilerin kontrole göre farklarının önemli seviyede olduğu bulunurken, dozların çeşitler üzerindeki etkisi de önemli bulunmuştur. En yüksek  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvveti kontrol grubunda Suruç Karası kallus ekstraktlarında (158.78  $\mu\text{g BHT/ml}$  ekstrakt) ölçülürken bunu yine kontrol grubunda Hicaz ve Suruç çeşitlerinin kallus ekstraktları (124.64 ve 120.62  $\mu\text{g BHT/ml}$ ) takip etmiştir. MS besi ortamına sorbitol ilave edilmesi nar kallus ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetlerini çok olumsuz etkilemiştir (Şekil 4.32C).



Şekil 4. 32. *İn vitro* koşullarda abiyotik strese maruz bırakılan nar kallus etanolik ekstraktı  $Fe^{+3}$  İndirgeme Kuvveti. Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar (*Punica granatum* L.) kallusları, 1mg/l BA, 0.4 mg/l NAA ve farklı konsantrasyonlarda (0, 20, 40 ve 60 g/l) Sakkaroz (A), Polietilen Glikol (PEG) (B) ve Sorbitol (C) katkılı MS besi ortamında büyütülmüştür. Dokularda ozmotik strese neden olan farklı elisitör uygulamalarından elde edilen nar kalluslarının büyüme indeksleri arasındaki farklılıklar LSD testine göre belirlenerek harflerle ifade edilmiştir. Kolonlar üzerindeki farklı harfler  $P \leq 0.05$  seviyesinde farklılığı ifade etmektedir

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Araştırmanın amacı; *in vitro* koşullarda bazı abiyotik elisitörler kullanılarak nar yaprak kallus kültüründe sekonder metabolitlerin üretimlerinin artırılmasıdır. Nar yaprak kallus kültürlerinde üretilen sekonder metabolitlerin miktarları ile normal meyvelerin ilgili bileşikler bakımından kapsamaları karşılaştırılmak istendiğinden sekonder metabolitlerin nar meyvesinin kabuk, dane ve çekirdeklerindeki varlıkları ölçülmüştür. Araştırmaya, iklim ve toprak koşullarının nar üretimine uygun olan Şanlıurfa iline bağlı Suruç ilçesindeki ticari nar bahçelerinden alınan nar örneklerinin pomolojik ve fitokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile başlanmıştır.

Günümüze kadar yayınlanmış birçok araştırma sonucunda meyve rengi ile meyve ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri arasında güçlü bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçların aksine, mevcut araştırma sonuçları gerek dane ve kabukların hue değerleri gerekse antosiyanin kapsamlarıyla meyve çeşitlerinin antioksidan kapasiteleri arasında paralel bir ilişkinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Açık renkli kabuğa sahip çeşitlerin kabuk, meyve ve çekirdek ekstraktlarının FRAP değerlerinin koyu renk kabuğa sahip olanlardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Hajimahmoodi ve ark., 2008; Sadeghi ve ark., 2009). Çam ve ark., (2009) nar meyvelerinin antosiyanin kapsamı ile antioksidan özellikleri arasındaki ilişkinin önemli olduğunu belirtirken, Tzulker (2007), Karaaslan ve ark., (2014)'nin nar, Özden ve Vardin (2009)'nin üzüm çeşitleri üzerinde yürütmüş oldukları araştırma sonuçlarına göre meyvelerin antosiyanin kapsamlarıyla antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişkiden ziyade meyvelerin toplam fenolik ve flavonoid kapsamlarının en önemli belirleyiciler olduğu ortaya konmuştur. Araştırmada kullanılan nar çeşitlerinin meyve kabuklarının fenolik ve flavonoid kapsamları dane ve çekirdeğe göre daha yüksek ölçülmüş olup, bu sonuca paralel olarak nar çeşitleri ve meyve kısımlarının antioksidan aktiviteleri paralellik göstermiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında araştırmada kullanılan çeşitlerin meyve, kabuk ve çekirdeklerin toplam

fenolik ve flavonoid kapsamaları seviyesinde örnekler DPPH serbest radikalini süpürmüş,  $Fe^{+3}$  ve Mo (VI) iyonlarını indirgemıştır (Ek 1).

Çalışmada kullanılan nar çeşitlerinin kallusları 1 mg/l BA, 0.4 mg/l NAA, 0, 5, 25, ve 50  $\mu$ M  $AgNO_3$ ,  $CoCl_2$  ve ya  $CdCl_2$ ; salisilik asit veya MeJA (0, 10, 50, ve 100  $\mu$ M); sakkaroz, PEG veya sorbitol (0, 20, 40 ve 60 g/l) katkılı MS tuzları ve vitaminlerinden oluşan *in vitro* büyüme ortamlarında kültüre alınmıştır.

1. Kültür başlangıcından 6 hafta sonra kallusların büyüme indeksleri belirlenmiştir. Araştırma sonucuna göre kültür ortamlarında  $AgNO_3$ 'ın varlığı Suruç ve Hicaz nar kalluslarının ağırlık artışlarını kontrole göre düşürürken, Suruç Karası nar kalluslarında önemli seviyede artışa neden olmuştur.  $AgNO_3$ 'ın etkisinin aksine nar genotipleri *in vitro* kültür ortamlarına  $CoCl_2$  ve  $CdCl_2$  eklenmesi bütün nar çeşitleri kalluslarının nisbi büyüme indekslerini kontrole göre düşürmüştür. Suruç Karası kalluslarına uygulanan  $AgNO_3$  dozların kallus nisbi büyüme indekslerine etkileri arasındaki fark önemli bulunarak, en etkili dozun 25  $\mu$ M  $AgNO_3$  olduğu belirlenmiştir.

2. MS besi ortamında kullanılan bütün ağır metal dozlarının kontrole göre kallusların toplam antosiyanin kapsamlarını artırdığı belirlenmiştir. Her üç çeşide ait kallusların en yüksek antosiyanin kapsamı 50  $\mu$ M  $AgNO_3$  uygulamasında elde edilmiştir. Hicaz çeşidinde  $AgNO_3$  dozlarının etkileri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

3. Araştırmada kontrol grubunda her üç çeşidin kalluslarının toplam fenolik kapsamaları arasındaki farklar önemsiz olup, uygulamalarda kullanılan bütün ağır metal dozları kontrole göre kallusların toplam fenolik madde kapsamlarını artırmıştır. Kalluslara uygulanan ağır metallerin en düşük dozları kallusların fenolik madde kapsamaları üzerinde en büyük etkiye sahip olmuştur. Ağır metallerin fenolik madde sentezi üzerine etkinlikleri çeşitlere göre farklılık göstermiş olup; Suruç kalluslarında en yüksek fenolik madde sentezine 5  $\mu$ M  $AgNO_3$  dozu neden olurken,

Hicaz çeşidinde 5  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  ve Suruç Karasında 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  en yüksek fenolik madde sentezine neden olduğu belirlenmiştir.

4. MS kültür ortamında  $\text{AgNO}_3$ 'ün varlığı Suruç, Hicaz ve Suruç Karası nar kallusları flavonoid içerikleri üzerinde olumlu etki yapmıştır.  $\text{AgNO}_3$ 'ün farklı dozlarının nar kalluslarının toplam flavonoid kapsamları üzerindeki etkisi önemli bulunurken, nar kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamları üzerine en etkili  $\text{AgNO}_3$  dozu 5  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir.  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$ 'ün varlığı Suruç çeşidinin toplam flavonoid kapsamını olumsuz etkilerken, Hicaz ve Suruç Karası nar kalluslarının toplam flavonoid içerikleri üzerine olumlu etki yapmıştır. Hicaz çeşidinin toplam flavonoid kapsamı 50  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  katkılı MS ortamında en yüksek seviyeye ulaşırken, Suruç Karası için en yüksek toplam flavonoid kapsamı 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  uygulamasından elde edilmiştir.

5. Araştırmada kullanılan bütün ağır metal dozlarının kontrole göre kallusların DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini artırdığı ve en düşük dozların en etkili olduğu belirlenmiştir.

6. Araştırmada kontrol olarak kullanılan nar genotiplerinin Mo (VI) indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli olup, en yüksek Mo (VI) indirgeme kuvvetine Suruç çeşidinin sahip olduğu, bunu sırasıyla Hicaz ve Suruç Karasının izlediği belirlenmiştir.  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{CdCl}_2$  içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının Mo (VI) indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek Mo (VI) indirgeme kuvveti en düşük dozlarda ağır metal içeren kültür ortamından elde edilen kallus ekstraktlarında ölçülmüştür.

7. Nar çeşitlerinin  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli olup kontrol grubunda en yüksek  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetine Suruç Karası sahip olurken bunu Suruç ve Hicaz çeşitleri izlemiştir. Farklı ağır metal uygulamaları içerisinde nar kallus ekstraktlarının  $\text{Fe}^{+3}$  indirgeme kuvvetine olan etkileri bakımından en etkin doz Suruç için 5  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , Hicaz için 25  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  ve Suruç Karasında 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  olarak belirlenmiştir (Ek 1).

8. Kültür ortamlarında salisilik asit ve ya metil jasmonatın varlığı tüm çeşitlerin kalluslarının nisbi ağırlık artışlarında kontrole göre önemli seviyede düşüşe neden olmuştur. Kontrol grubunda çeşitlerin nisbi ağırlık artışları karşılaştırıldığında büyükten küçüğe doğru Suruç Karası, Hicaz ve Suruç olarak sıralanmıştır. Hicaz ve Suruç Karası kalluslarının nisbi ağırlık artışlarına etkisi açısından besi ortamına ilave edilen salisilik asit ve metil jasmonat dozları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

9. Araştırmada kullanılan salisilik asidin tüm dozlarının kontrole göre Hicaz ve Suruç Karası çeşitlerinin kalluslarının toplam antosiyanin kapsamlarını artırdığı ancak Suruç çeşidinin kalluslarına uygulanan 50 ve 100  $\mu\text{M}$  salisilik asidin kallusların toplam antosiyanin kapsamlarını düşürdüğü belirlenmiştir. Kalluslara uygulanan salisilik asit ve ya metal jasmonat dozlarından en etkilisinin 10  $\mu\text{M}$  olduğu belirlenmiştir. En yüksek antosiyanin kapsamı 10  $\mu\text{M}$  salisilik asit uygulamasında Suruç Karasının kalluslarında elde edilirken bunu aynı uygulama ile Hicaz ve 10  $\mu\text{M}$  metil jasmonat uygulanan Suruç çeşidi takip etmiştir.

10. Araştırmada kullanılan nar çeşitlerinin kontrol grubu kallus ekstraktlarının toplam fenolik kapsamları Suruç Karası> Hicaz> Suruç olarak belirlenmiştir. MS kültür ortamında salisilik asit varlığı Hicaz ve Suruç Karası, metil jasmonatın varlığı tüm çeşitlerin kalluslarının toplam fenolik madde kapsamlarını olumsuz etkilemiştir. Nar kallusları içinde en yüksek fenolik madde miktarı 10  $\mu\text{M}$  salisilik asit katkılı MS ortamındaki Suruç çeşidinde ölçülürken en düşük toplam fenolik madde miktarı yine aynı çeşidin kalluslarına 50 ve ya 100  $\mu\text{M}$  salisilik asit uygulandığında ölçülmüştür. Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin kalluslarına uygulanan metil jasmonat konsantrasyonu artırıldıkça toplam fenolik madde kapsamlarında azalma olurken, Hicaz çeşidinde 10, 50 ve ya 100  $\mu\text{M}$  dozlarında metil jasmonat uygulanan kallusların toplam fenolik madde kapsamları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

11. MS kültür ortamında salisilik asit varlığı Hicaz ve Suruç karası, metil jasmonatın varlığı tüm çeşitlerin kalluslarının toplam flavonoid sentezini azalttığı

belirlenmiştir. En yüksek toplam flavonoid kapsamı kontrol grubunda Suruç Karası çeşidinin kalluslarında elde edilirken bunu sırası ile kontrol grubunda Hicaz ve Suruç çeşitleri izlemiştir. Suruç çeşidinin kalluslarında en yüksek toplam flavonoid kapsamı 10 µM dozunda salisilik asit uygulanan kalluslarda ölçülmüştür.

12. Araştırmada kontrol olarak kullanılan nar çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki fark önemli olup en yüksek değere Suruç Karası sahip olurken bunu sırasıyla Hicaz ve Suruç izlemiştir. Araştırmada kullanılan Hicaz ve Suruç Karası çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri kontrol grubunda en yüksek seviyelerde iken MS besisi ortamına salisilik asit ilave edilmesi bu iki çeşidin DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini olumsuz etkilemiştir. Suruç çeşidi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri üzerine en etkili salisilik asit ve metil jasmonat dozu 10 µM olarak belirlenmiştir.

13. Araştırmada kontrol olarak kullanılan Suruç ve Suruç Karası nar çeşitlerinin Mo (VI) indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli bulunmamıştır. En yüksek toplam antioksidan kapasitesi 10 µM dozunda salisilik asit uygulanan Suruç çeşidi kalluslarında ölçülürken, kalluslara uygulanan salisilik asit dozu artırıldıkça toplam antioksidan kapasitelerinin azaldığı belirlenmiştir.

14. Araştırmada metil jasmonat uygulamalarının, çalışmada kullanılan üç nar çeşidinin kalluslarında toplam antioksidan kapasitelerini azalttığı belirlenmiştir. En yüksek toplam antioksidan kapasiteleri tüm çeşitlerde kontrol grubu kalluslarında elde edilirken, kontrol grubunda toplam antioksidan kapasiteleri yönünden çeşitler arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Salisilik asidin nar kallus ekstraktları  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetleri üzerine en etkili dozu Suruç ve Hicaz çeşitleri için 10 µM olarak belirlenirken, Suruç Karası için kontrol grubu belirlenmiştir. Farklı metil jasmonat dozları içeren MS besisi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvveti kontrol grubunda Suruç ve Suruç Karası kallus ekstraktlarında ölçülürken bunları 10 µM metil jasmonat uygulanan Suruç çeşidinin kallus ekstraktları takip

etmiştir (Ek 1). MS besisi ortamına metil jasmonat ilave edilmesi Suruç ve Suruç Karası nar kallus ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetlerini çok olumsuz etkilemiştir.

15. Araştırmada kullanılan sakkaroz, polietilen glikol (PEG) ve sorbitolün nar çeşitlerinin yaprak kalluslarının nisbi ağırlık artışları üzerine olan etkinlikleri Suruç Karası> Hicaz> Suruç sıralaması olarak belirlenmiştir. Kültür ortamına eklenen 20 g/l sakkaroz Suruç ve Hicaz çeşitlerinin kalluslarının ağırlıklarında kontrole göre artışa sebep olurken, Suruç Karası nar kalluslarındaki nisbi ağırlık artışı kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki fark önemsiz bulunmuştur. Tüm çeşitlerin kalluslarındaki en yüksek nisbi kallus ağırlık artışı 20 g/l sakkaroz uygulamasında elde edilirken sakkaroz dozu arttırıldıkça kallus ağırlıkları azalmıştır. Nar çeşitlerinin *in vitro* kültür ortamlarına 20 g/l dozunda PEG eklenmesi Hicaz çeşidi kalluslarının nisbi büyüme indeksinde kontrole göre fark yaratmazken, Suruç Karası çeşidinde kallus büyüme indeksini azaltmıştır. Fakat aynı uygulama Suruç çeşidinde kallus büyüme indeksini kontrole göre artırmıştır. İn vitro kültür ortamlarına sorbitol eklenmesi üç nar çeşidinin kalluslarının nisbi büyüme indekslerini kontrole göre düşürmüştür.

16. MS besisi ortamına farklı konsantrasyonlarda sakkaroz, PEG ve ya sorbitol ilave edilmesi tüm çeşitlerin kallus ekstraktlarının toplam antosiyanin kapsamlarını kontrole göre artırmıştır. En yüksek antosiyanin kapsamı 20 g/l PEG uygulamasında Hicaz çeşidinin kalluslarında elde edilmiştir. Suruç çeşidi kallus ekstraktlarında en yüksek antosiyanin kapsamı 60 g/l sakkaroz uygulandığında, Suruç Karası çeşidinde ise 20 g/l sorbitol uygulandığında elde edilmiştir. Sorbitol konsantrasyonu artıkça üç çeşidin de antosiyanin kapsamlarının azaldığı ancak yine de kontrolden yüksek olduğu ortaya konmuştur.

17. MS besisi ortamına farklı konsantrasyonlarda sorbitol ilave edilmesi tüm çeşitlerin kallus ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamlarını kontrole göre azaltırken, besisi ortamına sakkaroz ilave edilmesi Suruç çeşidinin, PEG ilavesi Hicaz

çeşidinin kallus ekstraktlarının toplam fenolik madde kapsamlarını kontrole göre artırmıştır. Nar kallusları içinde en yüksek fenolik madde miktarı 40 g/l sakkaroz katkılı MS ortamındaki Suruç çeşidinde ölçülmüştür. PEG katkılı MS kültür ortamındaki nar kallusları içinde en yüksek fenolik miktarı kontrol grubunda Suruç Karası ve Suruç çeşitlerinde ölçülmüştür. PEG dozu arttırıldıkça bu çeşitlerin toplam fenolik miktarları azalmıştır.

18. Sakkaroz, PEG ve sorbitolün farklı dozlarının nar kalluslarının toplam flavonoid kapsamı üzerindeki etkisi önemli bulunurken, uygulanan dozlar nar kallus ekstraktlarının toplam flavonoid kapsamı üzerine her çeşitte farklı etki yapmıştır. Sakkaroz Suruç çeşidi kalluslarının toplam flavonoid içeriği üzerine olumlu etki yaparken MS besi ortamına PEG ve sorbitol ilavesi Suruç çeşidinin kalluslarının toplam flavonoid içeriği üzerine olumsuz etki yapmıştır. Suruç ve Hicaz çeşitlerinin kalluslarında toplam flavonoid kapsamını en çok artıran sakkaroz dozu 40 g/l iken Suruç Karası kalluslarına uygulanan sakkaroz dozunun yükseltilmesi toplam flavonoid kapsamı üzerine olumsuz etki yapmıştır. PEG ve sorbitolün varlığı Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin toplam flavonoid kapsamını olumsuz etkilerken, Hicaz çeşidi kalluslarının toplam flavonoid içerikleri üzerine olumlu etki yapmıştır.

19. Araştırmada kontrol grubundaki farklı nar çeşidi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri arasındaki farkların önemli olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubundaki nar çeşitlerinin kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri sırasıyla Suruç> Suruç Karası> Hicaz olarak belirlenmiştir. En yüksek DPPH serbest radikalini süpürme kapasitesi Suruç çeşidine ait kalluslarda 60 g/l sakkaroz uygulamasında elde edilmiştir. MS besi ortamında sakkaroz varlığı tüm çeşitlerin DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini kontrole kıyasla olumlu etkilemiştir. MS besi ortamında PEG varlığı Suruç ve Suruç Karası çeşitlerinin DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini olumsuz etkilerken, Hicaz çeşidi kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri üzerine olumlu etki yapmıştır. Besi ortamına 40 g/l PEG ilave edilmesi ile Hicaz çeşidinin kalluslarının DPPH serbest radikalini süpürme kapasiteleri en yüksek

seviyeye ulaşmıştır. MS besi ortamında sorbitol varlığı tüm çeşitlerin DPPH serbest radikalini süpürme kapasitelerini kontrole kıyasla olumsuz etkilemiştir.

20. Araştırmada kontrol olarak kullanılan Suruç ve Suruç Karası nar çeşitlerinin Mo (VI) indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Sakkarozun Hicaz kallus ekstraktları Mo (VI) indirgeme kuvvetleri üzerine en yüksek etkisi 40 g/l konsantrasyonunda ölçülmüştür. Farklı PEG dozları içeren MS besi ortamından alınan nar kallus ekstraktlarının Mo (VI) indirgeme kuvvetine olan etkileri değerlendirildiğinde en yüksek Mo (VI) indirgeme kuvveti 40 g/l PEG içeren MS kültür ortamından elde edilen Hicaz kallus ekstraktlarında ölçülmüştür. MS besi ortamına ilave edilen sorbitol dozu arttırıldıkça Suruç ve Suruç Karası kalluslarının Mo (VI) indirgeme kuvveti azalmıştır.

21. Çalışmada kontrol olarak kullanılan Suruç ve Suruç Karası nar çeşitlerinin yaprak eksplantlarından elde edilen kallus ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetleri arasındaki fark önemli bulunmazken Hicaz nar çeşidinin  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvveti daha düşük hesaplanmıştır. Sakkarozun nar kallus ekstraktları  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetleri üzerine en yüksek etkisi Suruç çeşidi için 40 ve 60 g/l konsantrasyonlarda bulunurken, Hicaz için 40 g/l, Suruç Karası için kontrol grubunda bulunmuştur. MS besi ortamında PEG varlığı Suruç ve Suruç karası kallus ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetlerini olumsuz etkilerken, Hicaz çeşidinin kallus ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetlerini arttırmıştır. Sorbitol katkılı ortamlar içinde en yüksek  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvveti kontrol grubunda Suruç Karası kallus ekstraktlarında ölçülürken bunu yine kontrol grubunda Hicaz ve Suruç çeşitlerinin kallus ekstraktları takip etmiştir (Ek 1). MS besi ortamına sorbitol ilave edilmesi nar kallus ekstraktlarının  $Fe^{+3}$  indirgeme kuvvetlerini çok olumsuz etkilemiştir.

## 5.2.Öneriler

Günümüzde sağlıklı beslenme bilincinin artmasının sonucu olarak fonksiyonel gıdalara olan ilgi artmıştır. Dhumal ve ark. (2014) tarafından ‘süper meyve’ olarak nitelendirilen nar, danelerin yanı sıra meyve kabuğu, çekirdek, ağaç kabuğu, yaprak

ve çiçek gibi çeşitli organlarının içerdiği fenolik maddeler, flavonoidler, antosiyaninler, tanenler ve daha başka birçok sekonder metabolit sayesinde fonksiyonel gıdaların başında gelmektedir. Son yıllarda nar üzerindeki ilgi dünya genelinde büyük artış göstermiştir (Sumaiya ve ark., 2018).

Bu doktora tez çalışmasında, yerel olarak Şanlıurfa'nın Suruç İlçesinde yetiştirilen Suruç ve Suruç Karası nar çeşitleri ile uluslararası tanınan Hicaz nar çeşidinin hasat olumunda sahip olduğu sekonder metabolit miktarları ve antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Her üç çeşitte kabuk ekstraktlarının sekonder metabolit miktarları ve antioksidan kapasitelerinin dane ve çekirdek ekstraktlarına kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir. Narın gıda, kimya, kozmetik ve ilaç sanayileri için önemli hammaddeler içeren, biokimyasal olarak en kıymetli kısmının gerek sofralarımızdaki tüketimde gerek gıda sanayinde işlenmesi sırasında atık madde olarak düşünülmesi ülke ekonomisi açısından üzücüdür.

Araştırma sonucunda, ülkemizde henüz tanınmayan Suruç Karası çeşidinin özellikle kabuk ekstraktlarının toplam antosiyanin, fenolik ve flavonoid miktarı ile antioksidan özelliğinin yüksek bulunması bu çeşidin gıda, kimya, kozmetik ve ilaç sanayileri için önemli hammaddeler içerebileceği düşüncesini desteklemiştir. Diğer yandan tadının çok ekşi olması, meyvelerinin ufak olması, çekirdeklerinin iri ve sert olması dolayısıyla Suruç Karası nar çeşidi sofralık olarak tüketilememektedir. Çok koyu kırmızı kabuk rengine sahip olan çeşit evlerin bahçesinde süs bitkisi olarak değerlendirilmekte ve ticari değerleri olmadığı için yöre halkı tarafından ilgi görmemekte hatta ağaçlar bahçelerden sökülmemektedir. Araştırmanın yürütüldüğü bölgede çiftçiler Suruç Karası nar çeşidinin önemli bir yerel gen kaynağı olduğu konusunda bilinçlendirilmelidir. Bu çeşide ait ağaçların sökülmesinin gelecekte Suruç Karası çeşidinin kaybolmasına sebep olacağı açıklanmalıdır. Bölgedeki araştırma kuruluşları ve Harran Üniversitesi bünyesinde yapılacak çalışmalar ile çeşidinin biokimyasal içeriği açık şekilde ortaya konulmalı ve sanayide değerlendirilme olanakları araştırılmalıdır.

Yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslarda sekonder metabolit üretimini artırıcı uygulamaların etkilerinin belirlenmesi amacıyla kalluslara abiyotik elisitörler uygulanmış ve bu uygulamaların kallusların sekonder metabolit üretimi ve antioksidan kapasitelerini olumlu etkilediği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre nardan sekonder metabolitlerin üretiminde doku kültürü yöntemlerinin etkin şekilde kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

*Punicaceae* familyası içinde yer alan nar (*Punica granatum L.*)’ın fitokimyasal bileşimini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaların sonucu göstermiştir ki nar bitkisinin yapraklarında punikalin, punikafolin (Tanaka ve ark., 1985; Jurenka, 2008; Dipak ve ark., 2012), çekirdeğinde punikik asit, danelerde punikalajin (Akhavan ve ark., 2015), meyve kabuğunda punikalajin, ağaç kabuğu ve köklerinde punikalin ve punikalajin (Jurenka, 2008) gibi sadece *Punica* cinsine özgü fenolik maddeler bulunduğu belirlenmiştir. Yapılacak olan yeni çalışmalarla, bu araştırmada kullanılan çeşitlerin içerdiği sekonder metabolitler tek tek belirlenerek, artırılmak istenen sekonder metabolite yönelik farklı konsantrasyonlar denenerek en uygun elisitör ve konsantrasyonları belirlenmelidir.

## KAYNAKLAR

- AK, B. E., ÖZGÜVEN, A., İKİNCİ, A., YILMAZ, C., ve PARLAKÇI, H., 2009. Some Pomological Traits of Different Pomegranate Varieties Grown in Sanliurfa-Turkey. I. International Symposium on Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits, 16-19 Oktober, Vol. I, Adana, s.115-119.
- AK, B. E., SAKAR, E., ve KORKMAZ, Ş., 2013a. Güneydoğu'da nar yetiştiriciliği. Mardin Gıda Tarım ve Hayvancılık Dergisi, 3(3): 27-34.
- AK, B. E., SAKAR, E., ve KORKMAZ, Ş., 2013b. Nar bahçelerinde yıllık bakım işleri ve hasat. Mardin Gıda Tarım ve Hayvancılık Dergisi, 3(6): 11-19.
- AK, B. E., SÖYLEMEZ, S., ve KORKMAZ, Ş., 2016. Nar yetiştiriciliği ve narın sağlık bakımından önemi. Tarım Gündem, 6(35): 82-87.
- AKHAVAN, H., BARZEGAR, M., WEIDLICH, H., and ZIMMERMANN, B. F., 2015. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Juices from Ten Iranian Pomegranate Cultivars Depend on Extraction. Journal of Chemistry, Vol. 2015: 1-7.
- ALIGHOURCHI H., BARZEGAR M., and ABBASI S., 2008. Anthocyanins Characterization of 15 Iranian Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Variation after Cold Storage and Pasteurization. European Food Research Technology, 227(3): 881-887.
- AL-JIBOURI, A. M. J., ABD, A. S., MAJEED, D. M., and ISMAIL, E. N., 2012. Influence of Abiotic Elicitors on Accumulation of Thymol in Callus Cultures of *Origanum vulgare* L. Journal of Life Sciences, 6(2012): 1094-1099.
- AMBIGAIPALAN, P., CAMARGO, A. C., and SHAHIDI, F., 2017. Identification of Phenolic Antioxidant and Bioactives of Pomegranate Seeds Following Juice Extraction Using HPLC-DAD-ESI-MS. Food Chemistry, 221(2017): 1883-1894.
- AYDIN, S. A. ve USTUN, F., 2007. Tanenler kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 33(1): 21-31.
- BİLALOĞLU, G. V. ve HARMANDAR, M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 369s.
- BLOIS, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, 181(1958): 1199-1200.
- BONYANPOUR, A. and KHOSH-KHUI, M., 2013. Callus Induction and Plant Regeneration in *Punica granatum* L. 'Nana' from Leaf Explants. Journal of Central European Agriculture, 14(3): 928-936.
- CEMEROĞLU, B., 2007. Gıda analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 34, Ankara. 535s.
- CHAKRABORTY, N., BANERJEE, D., GHOSH, M., PRADHAN, P., GUPTA, N. S., ACHARYA, K. and BANERJEE, M., 2013. Influence of Plant Growth Regulators on Callus Mediated Regeneration and Secondary Metabolites Synthesis in *Withania somnifera* (L.) Dunal. Physiology and Molecular Biology of Plants, 19(1): 117-125.
- COŞKUN, F., 2006. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2006(2): 27-33.
- ÇETİN, E. S., 2010. Asmada Hücre Süspansiyon Kültürleri ile Sekonder Metabolit Üretimi Üzerine Araştırmalar. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta, 128s.
- ÇETİN, E. S., BABALIK, Z., HALLAÇ TÜRK, F. ve BAYDAR, N. G., 2013. Öküzgözü Üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorür

- uygulamalarının bazı fenolik bileşikler üzerine etkileri. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 6(1): 163-167.
- ÇETİN, E. S. ve BAYDAR, N. G., 2016. Elicitor Applications to Cell Suspension Culture for Production of Phenolic Compounds in Grapevine. Tarım Bilimleri Dergisi, 22(1): 42-53.
- DIPAK, G., AXAY, P., MANODEEP, C. and JAGDISH, K. V., 2012. Phytochemical and Pharmacological Profile of *Punica granatum*: An Overview. International Research Journal of Pharmacy, 3(2): 65-68.
- DORNENBURG, H. and KNORR, D., 1997. Challenges and Opportunities for Metabolite Production from Plant Cell and Tissue Cultures. Food Technology, 51(11): 47-54.
- DHUMAL, S. S., KARALE, A. R., JADHAV, S. B. and KAD, V. P., 2014. Recent Advances and Developments in the Pomegranate Processing and Utilization: A Review. Journal of Agriculture and Crop Science, 1(2014): 1-17.
- ELFALLEH, W., HANNACHI, H., TLILI, N., YAHIA, Y., NASRI, N. and FERCHICHI, A., 2012. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Pomegranate Peel, Seed, Leaf and Flower. Journal of Medicinal Plants Research, 6(32): 4724-4730.
- ERKOYUNCU, M. T. ve YORGANCILAR, M., 2015. Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi. Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi, 2(1): 66-76.
- EROĞUL, D., OĞUZ, H. İ. ve ŞEN, F., 2016. Ekşi, Mayhoş ve Tatlı Nar Genotiplerine Ait Meyvelerin Depolama Süresince Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. VII. Bahçe Ürünlerinde Muhafaza ve Pazarlama Sempozyumu, 4-7 Ekim 2016, Cilt I, Eğirdir, s.34-39.
- FARMER, E. E. and RYAN, C. A., 1992. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-inducible Proteinase Inhibitors. The Plant Cell, 4(1992): 129-134.
- FAWOLE, O. A., OPARA, U. L. and THERON, K. I., 2012. Chemical and phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Three Pomegranate Cultivars Grown in South Africa. Food and Bioprocess Technology, 5(7): 2934-2940.
- FISCHER, U. A., CARLE, R. and KAMMERER, D. R. 2011. Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel, Mesocarp, Aril and Differently Produced Juices by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>. Food Chemistry, 127(2): 807-821.
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A. and OKAJIMA, K., 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Experimental Cell Research, 50(1): 151-156.
- GIL, M. I., THOMAS-BARBERAN, F. A., HESS-PIERCE, B., HOLCROFT, D. M. and KADER A. A., 2000. Antioksidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48(10): 4581 -4589.
- GIUSTI, M. M. and WROLSTAD, R. E., 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. [http://www.academia.edu/6873755/Characterization\\_and\\_Measurement\\_of\\_Anthocyanins\\_by\\_UV-Visible\\_Spectroscopy](http://www.academia.edu/6873755/Characterization_and_Measurement_of_Anthocyanins_by_UV-Visible_Spectroscopy)
- GOMEZ-CARAVACA, A. M., VERARDO, V., TOSELLI, M., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. and CABONI, M.F., 2013. Determination of the Major Phenolic Compounds in Pomegranate Juices by HPLC-DAD-ESI-MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(22): 5328-5337.

- GUNDLACH, H., MULLER, M. J., KUCHAN, T. M. and ZENK, M. H., 1992. Jasmonic Acid is a Signal Transducer in Elicitor-induced Plant Cell Cultures. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 89(6): 2389-2393.
- GÜNDOĞDU, M. ve YILMAZ, H., 2013. Bazı Standart Nar (*Punica granatum* L.) Çeşitleri ve Genotiplerine Ait Meyvelerin C Vitamini, Şeker ve Besin Elementleri İçeriklerinin Belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(3): 242-248.
- GÜNDOĞDU, M., YILMAZ, H. ve CANAN, İ., 2015. Nar (*Punica granatum* L.) Çeşit ve Genotiplerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD)*, 1(2): 57-65.
- HAQUE, N., SOFI, G., ALI, W., RASHID, M. and ITRAT, M., 2015. A Comprehensive Review of Phytochemical and Pharmacological Profile of Anar (*Punica granatum* Linn): A Heaven's Fruit. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 1(1): 22-26.
- HIRAGA, S., ITO, H., YAMAKAWA, H., OHTSUBO, N., SEO, S., MITSUHARA, I., MATSUI, H., HONMA, M. and OHASHI, Y., 2000. An HR-induced Tobacco Peroxidase Gene is Responsive to Spermine, But Not to Salicylate, Methyl Jasmonate and Ethephon. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 13(2): 210-216.
- HMID, I., ELOTHMANI, D., HANINE, H., OUKABLI, A. and MEHINAGIC, E., 2017. Comparative Study of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Attributes of Eighteen Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars in Grown in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2): 2675-2684.
- HOLLAND, D., HATIB, K. and BAR-YA'AKOV, I., 2009. Pomegranate, Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*, 35: 127-191.
- İKİNCİ, A. ve KILIÇ, M. E., 2016. Siverek (Şanlıurfa) Yöresinde Yetiştirilen Yerel Nar (*Punica granatum* L.) Genotiplerinin Bazı Pomolojik ve Kimyasal Özellikleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(4): 556-562.
- JURENKA, J., 2008. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Alternative Medicine Review*, 13(2): 128-144.
- KARAASLAN, M., VARDİN, H., VARLIKLIÖZ, S. ve YILMAZ, F. M., 2014. Antiproliferative and Antioxidant Activities of Turkish Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Accessions. International Journal of Food Science Technology*, 49: 82-89.
- KAUR, C., PAL, R.K., KAR, A., GADI, C., SEN, S., KUMAR, P., CHANDRA, R., JAISWAL, S. and KHAN, I., 2014. Characterization of Antioxidants and Hypoglycemic Potential of Pomegranate Grown in India: A Preliminary Investigation. *Journal of Food Biochemistry*, 38(2014): 397-406.
- KELEBEK, H. ve CANBAŞ, A., 2010. Hicaz Narı Şırasının Organik Asit Şeker ve Fenol Bileşikleri İçeriği ve Antioksidan Kapasitesi. *Gıda*, 35(6): 439-444.
- KIKOWSKA, M., KEDZIORA, I., KRAWCZYK, A. and THIEM, B., (2015). Methyl Jasmonate, Yeast Extract and Sucrose Stimulate Phenolic Acids Accumulation in *Eryngium planum* L. Shoot Cultures. *Acta ABP Biochimica Polonica*, 62(2): 197-200.
- LEGUA, P., FORNER-GINER, M. A., NUNCIO-JAUREGUI, N. and HERNANDEZ, F., 2016. Polyphenolic compounds, Anthocyanins and Antioxidant Activity of Nineteen Pomegranate Fruits: A Rich Source of Bioactive Compounds. *Journal of Functional Foods*, 23(2016): 628-636.

- LI, Y., GUO, C., YANG, J., WIE, J., XU, J. and CHENG, S., 2006. Evaluation of Antioxidant Properties of Pomegranate Peel Extract in Comparison with Pomegranate Pulp Extract. *Food Chemistry*, 96(2): 254-260.
- LI, X., WASILA, H., LIU, L., YUAN, T., GAO, Z., ZHAO, B. and AHMAD, I., 2015. Physicochemical Characteristics, Polyphenol Compositions and Antioxidant Potential of Pomegranate Juices from 10 Chinese Cultivars and the Environmental Factors Analysis. *Food Chemistry*, 175(15): 575-584.
- MAHALAKSHMI, R., EGANATHAN, P. and PARIDA, A. K., 2013. Salicylic Acid Elicitation on Production of Secondary Metabolite by Cell Cultures of *Jatropha curcas* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4): 655-659.
- MALAMY, J. and KLESSING, D. F., 1992. Salicylic Acid and Plant Disease Resistance. *The Plant Journal*, 2: 643-654.
- MANASATHIEN, J., INDRAPICHATE, K. and INTARAPICHET, K. O., 2012. Antioxidant Activity and Bioefficacy of Pomegranate *Punica granatum* Linn. Peel and Seed Extracts. *Global Journal of Pharmacology*, 6(2): 131-141.
- MATKOWSKI, A., 2008. Plant *in vitro* Culture for the Production of Antioxidants-A Review. *Biotechnology Advances*, 26(6): 548-560.
- MCGUIRE, R. G., 1992. Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*, 27(12): 1254-1255.
- MENDHULKAR, V. D. and VAKIL, M. A., 2013. Elicitation of Flavonoids by Salicylic Acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. *Cell Culture. Research in Biotechnology*, 4(2): 01-09.
- MERTENS-TALCOTT, S. U., JILMA-STOHLAWETZ, P., RIOS, J., HINGORANI, L. and DERENDORF, H., 2006. Absorption, Metabolism, and Antioxidant Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Polyphenols after Ingestion of a Standardized Extract in Healthy Human Volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23): 8956 -8961.
- MOREL, G., 1970. Le Probleme de la Transformation tumorale chez les vegetaux. *Physiologia Vegetale*, 8: 189-204.
- MANSOUR, E., KHALED, A. B., LACHIHEB, B., ABID, M., BACHAR, K. and FERCHICHI, A., 2013. Phenolic Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Peel Extract from Tunisian Pomegranate. *Journal of Agricultural Science Technology*, 15(7): 1393-1403.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- NARAYAN, M. S., THIMMARAJU, R. and BHAGYALAKSHMI, N., 2005. Interplay of Growth Regulators During Solid-state and Liquid-state Batch Cultivation of Anthocyanin Producing Cell Line of *Daucus carota*. *Process Biochemistry*, 40(1): 351-358.
- OHTSUBO, N., MITSUHARA, I., KOGA, M., SEO, S. and OHASHI, Y., 1999. Ethylene Promotes the Necrotic Lesion Formation and Basic PR Gene Expression in TMV-infected Tobacco. *Plant Cell Physiology*, 40(8): 808-817.
- OSKAY, D. and OSKAY, M., 2009. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoteknolojik Önemi. *e-Journal of New World Sciences Academy*. 4(2): 31-41.
- OYAIZU, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.

- ÖZTÜRK, B., KESKİN, S., YILDIZ, K., KAYA, Ö., KILIÇ, K. ve UÇAR, M., 2013. Erzincan Koşullarında Yetiştirilen ‘Ak Sakı’ Elma Çeşidinin Depolama Performansı Üzerine Hasat Öncesi Naftalen Asetik Asit ve Aminoetoksivinilglinin Uygulamalarının Etkileri. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30(1): 52-60.
- PASQUA, G., MONACELLI, B., MULINACCI, N., RINALDI, S., GIACCHERINI, C., INNOCENTI, M. and VINCERI, F. F., 2005. The Effect of Growth Regulators and Sucrose on Anthocyanin Production in *Camptotheca acuminata* Cell Cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3): 293-298.
- PATEL, H. and KRISHNAMURTY, R., 2013. Elisitors in Plant Tissue Culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2): 60-65.
- PEREZ-VICENTE, A., GIL-IZQUIERDO, A. and GARCIA-VIGUERA, C., 2002. *In Vitro* Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate Juice Phenolic Compounds, Anthocyanins and Vitamin C. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50(8): 2308-2312.
- PIATCZAK, E., KUZMA, L. and WYSOKINSKA, S., 2016. The Influence of Methyl Jasmonate and Salisilic Acid on Secondary Metabolite Production in *Rehmannia glutinosa* Libosch. Hairy Root Culture. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 58(1): 57-65.
- POYRAZOGLU, E., GOKMEN, V. and ARTIK, N., 2002. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L) Grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(5): 567-575.
- PRIETO, P., PINEDA, M. and AGUILAR, M., 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity Through the Formation of a Phosphomolybdenum complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal. Biochemistry*, 269(2): 337-341.
- QU, J. G., ZHANG, W., HU, Q.L. and JIN, M. F., 2006. Impact of Subculture Cycles and Inoculum Sizes on Suspension Cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(6): 984-989.
- RAMACHANDRA R. S. and RAVISHANKAR, G. A., 2002. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Seondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2): 101-153.
- SADEGHI, N., JANNAT, B., OVEISI, M. R., HAJIMAHMOODI, M. and PHOTOVAT, M., 2009. Antioxidant Activity of Iranian Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11: 633-638.
- SAJE, L., GRUBISIC, D. and VUNTAJ-NOVAKOVIC, G., 2000. Bioreactors for Plant Engineering: an Outlook for Further Research. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2): 89-99.
- SAS, 1995. SAS/STAT Users guide. Version 6.12. SAS Instutue, Cary North Carolina.
- SLINKARD, K. and SINGLETON, V.L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49-55.
- SÖKMEN, A. ve GÜREL, E., 2001. Sekonder Metabolit Üretimi ve Bitki Biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya, 270s.
- SUDHA, G. and RAVISHANKAR, G. A., 2003. Influence of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid in the Enhancement of *Capsicum frutescens* Mill. *Current Science Association*, 85(8): 1212-1217.

- SUMAIYA, K., JAHURUL, M. H. A. and ZZAMAN, W., 2018. Evaluation of Biochemical and Bioactive Properties of Native and Imported Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars Found in Bangladesh. *International Food Research Journal*, 25(2): 737-746.
- ŞİMŞEK, M. ve GÜLSOY, E., 2017. Güneydoğu Anadolu Bölgesinin Nar (*Punica granatum* L.) Potansiyeli Konusunda Bir Araştırma. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(2):31-41.
- TANAKA, T., NONAKA, G. and NISHIOKA, I., 1985. Punicalin and Ellagitannin from the Leaves of *Punica granatum*. *Phytochemistry*, 24(9): 2075-78.
- TANVEER, H., ALI, S. and KHAN, Z. D., 2012. Appraisal of Secondary Metabolites in *in vitro* Cultures of *Citrullus colocynthis* (L.) Schard. *Science International (Lahore)*, 24(1): 75-80.
- TEZCAN, F., GULTEKIN-OZGUVEN, M., DIKEN, T., OZCELIK, B. and ERIM, F. B., 2009. Antioxidant Activity and Total Phenolic, Organic Acid and Sugar Content in Commercial Pomegranate Juices. *Food Chemistry*, 115(3): 873-877.
- THEIS, N. and LERDAU, M., 2003. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal Plant Science*, 164(3): 93-102.
- TUİK, 2015. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu.
- TURGUT, D. Y. ve SEYDİM, A. C., 2013. Akdeniz Bölgesi'nde Yetiştirilen Bazı (*Punica granatum* L.) Çeşit ve Genotiplerinin Fenolik Bileşenleri ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 11(2): 51-59.
- TURKYILMAZ, M., 2013. Anthocyanin and Organic Acid Profiles of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juices from Registered Varieties in Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, 48: 2086-2095.
- TZULKER, R., GLAZER, I., BAR-ILAN, I., HOLLAND, D., AVIRAM, M. and AMIR, R., 2007. Antioxidant Activity, Polyphenol Content, and Related Compounds in Different Fruit Juices and Homogenates Prepared from 29 Different Pomegranate Accessions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55(23): 9559-9570.
- WROLSTAD, R. E., 1976. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. IN: *Agricultural Station Bulletin 624*, Oregon State University, 17p.
- YASOUBI, P., BARZEGAR, M., SAHARI, M. A. and AZIZI, M. H., 2007. Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 9: 35-42.
- ZAOUAY, F., MENA, P., GARCIA-VIGUERA, C. and MARS, M., 2012. Antioxidant Activity and Physico-Chemical Properties of Tunisian grown Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. *Industrial Crop and Products*, 40: 81-89.
- ZHANG, W. and FURUSAKI, S., 1999. Production of Anthocyanin by Plant Cell Cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4(4): 231-252.
- ZHISHEN, J., MENGCHENG, T. and JIANMING, W., 1999. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry*, 64(4): 555-559.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Aslı Neslihan ÖZDEN  
**Uyruğu** : TC  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Ankara 13.04.1974  
**Telefon** : 0535 7828135  
**e-mail** : aslineslihan.ozden@tarimorman.gov.tr

### EĞİTİM

| Derece        | Adı, İlçe, İl                                        | Bitirme Yılı |
|---------------|------------------------------------------------------|--------------|
| Lise          | : Ankara Atatürk Lisesi (ANKARA)                     | 1990         |
| Üniversite    | : Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bit. Böl. (ANKARA)  | 1996         |
| Yüksek Lisans | : Harran Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bit. Böl. (Ş. URFA) | 2007         |

### İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl       | Kurum                         | Görevi            |
|-----------|-------------------------------|-------------------|
| 2009-2018 | Harran Üniversitesi Suruç MYO | Öğretim Görevlisi |
| 2018-.... | Niğde İl Tarım ve Orman Müd.  | Ziraat Yük. Müh.  |

### UZMANLIK ALANI

Bitki doku kültürü  
Meyve yetiştiriciliği  
Seralarda sebze yetiştiriciliği

### YABANCI DİLLER

İngilizce

### YAYINLAR

AK, B.E. , A.N. ÖZDEN, 2007. Meyve yetiştiriciliğinde Doku kültürü Yoluyla Çoğaltma Yöntemleri ve Önemi. GAP V. Tarım Kongresi, 17-19 Ekim 2007, Şanlıurfa, s. 507-519

ÖZDEN, A.N.; AK, B.E. and ÖZDEN, M., 2011. *In Vitro* Regeneration and Micropropagation of GF-677 Hybrid (*Prunus amygdalus*× *P. persica*) Rootstock. *Acta horticulturae* 912(912):653-656. (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır)

Özden, M., ve ÖZDEN, A. N., 2014. Farklı Renkteki Meyvelerin Toplam Antosiyanin, Toplam Fenolik Kapsamlarıyla Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* Cilt: 9, No: 2, (1-12)

ÖZDEN, A.N.; AK, B.E. ve ÖZDEN, M., 2017. Farklı Nar (*Punica granatum* L.) Çeşitlerinin Pomolojik, Fitokimyasal Özellikleri ve Antioksidan Kapasiteleri. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 21(2):164-176. (Dok. tezinden yapılmıştır)

## EKLER

### EK 1

Nar meyveleri ve kalluslarının büyüme indeksi, toplam antosiyanin, fenolik, flavonoid kapsamlar, DPPH süpürme kapasitesi, Mo (VI) ve Fe İndirgeme Kapasitesi

|                      |                         | <b>Kallus<br/>Büyüme<br/>İndeksi</b> | <b>Antosiyanin<br/>(mg<br/>siyanidin-3-<br/>glukosid/kg<br/>taze ağırlık)</b> | <b>Toplam<br/>Fenolik<br/>Kapsamı<br/>(mg GAE/kg<br/>taze ağırlık)</b> | <b>Toplam<br/>Flavonoid<br/>Kapsamı<br/>(mg AE/kg taze<br/>ağırlık)</b> | <b>DPPH<br/>Süpürme<br/>Kapasitesi<br/>(%)</b> | <b>Mo (VI)<br/>İndirgeme<br/>Kapasitesi<br/>(µg AE/ml<br/>ekstrakt)</b> | <b>Fe İndirgeme<br/>Kapasitesi<br/>(µg BHT/ml<br/>ekstrakt)</b> |
|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Nar Çeşitleri</b> | <b>Uygulamalar</b>      | -                                    |                                                                               |                                                                        |                                                                         |                                                |                                                                         |                                                                 |
| Suruç                | Dane                    | -                                    | 46.58 gf                                                                      | 728.88 f                                                               | 458.33 h                                                                | 22.48 e                                        | 78.81 d                                                                 | 54.87 e                                                         |
|                      | Kabuk                   | -                                    | 39.74 g                                                                       | 11440 b                                                                | 3502.19 b                                                               | 84.18 b                                        | 224.96 b                                                                | 890.85 b                                                        |
|                      | Çekirdek                | -                                    | 68.29 ed                                                                      | 6511.11 d                                                              | 3076.75 c                                                               | 17.84 f                                        | 34.45 h                                                                 | 15.67 f                                                         |
| Hicaz                | Dane                    | -                                    | 347 b                                                                         | 906.66 f                                                               | 559,21 g                                                                | 28.07 d                                        | 66.63 f                                                                 | 76.03 d                                                         |
|                      | Kabuk                   | -                                    | 95.51 c                                                                       | 9484.44 c                                                              | 2984.65 d                                                               | 82.48 b                                        | 215.41 c                                                                | 769.70 c                                                        |
|                      | Çekirdek                | -                                    | 54.93 f                                                                       | 5577.77 e                                                              | 2554.82 e                                                               | 18.87 f                                        | 41.76 g                                                                 | 10.04 gf                                                        |
| Suruç Karası         | Dane                    | -                                    | 69.13 d                                                                       | 873.33 f                                                               | 554.82 g                                                                | 31.34 c                                        | 71.57 e                                                                 | 58.89 e                                                         |
|                      | Kabuk                   | -                                    | 403.27 a                                                                      | 16628.89 a                                                             | 5620.61 a                                                               | 94.04 a                                        | 320.09 a                                                                | 924.06 a                                                        |
|                      | Çekirdek                | -                                    | 55.94 ef                                                                      | 4733.33 e                                                              | 1677.63 f                                                               | 17.8 f                                         | 28.17 i                                                                 | 6.60 g                                                          |
|                      | <b>AgNO<sub>3</sub></b> |                                      |                                                                               |                                                                        |                                                                         |                                                |                                                                         |                                                                 |
| Suruç                | 0                       | 6.12 cd                              | 160.30 fe                                                                     | 2714 g                                                                 | 2310.08 gf                                                              | 68.54 d                                        | 70.48 ef                                                                | 147.17 f                                                        |
|                      | 5                       | 4.68 fed                             | 248.25 c                                                                      | 11708 a                                                                | 4184.64 a                                                               | 79.72 a                                        | 90.67 a                                                                 | 199.81 a                                                        |
|                      | 25                      | 5.25 cde                             | 217.02 dc                                                                     | 9439 b                                                                 | 3824.12 b                                                               | 72.11 c                                        | 80.16 b                                                                 | 177.40 b                                                        |
|                      | 50                      | 5.87 cde                             | 292.78 b                                                                      | 8659 cb                                                                | 3722.36 b                                                               | 68.54 d                                        | 78.10 cb                                                                | 178.20 cb                                                       |

|                 |                         |          |            |          |            |          |          |           |
|-----------------|-------------------------|----------|------------|----------|------------|----------|----------|-----------|
| Hicaz           | 0                       | 6.79 cb  | 238.79 c   | 3526 g   | 1985.52 h  | 53.43 g  | 62.72 g  | 102.91 h  |
|                 | 5                       | 3.35 fg  | 264.03 a   | 7823 cd  | 3763.59 b  | 77.11 b  | 76.82 c  | 124.98 g  |
|                 | 25                      | 4.16 fge | 354.01 a   | 7516 ed  | 3056.57 d  | 71.11 e  | 72.98 d  | 151.54 ef |
|                 | 50                      | 4.74 fde | 370.71 a   | 6259 f   | 3286.40 c  | 66.11 e  | 70.92 ed | 140.50 f  |
| Suruç<br>Karası | 0                       | 2.68 g   | 132.47 fg  | 3170 g   | 1687.28 i  | 47.42 h  | 53.00 h  | 172.00 cd |
|                 | 5                       | 8.25 b   | 148.06 fg  | 7452 ed  | 2804.82 e  | 55.88 f  | 69.19 ef | 163.72 ed |
|                 | 25                      | 10.14 a  | 115.22 g   | 6903 ef  | 2506.57 f  | 40.39 i  | 68.94 ef | 144.64 f  |
|                 | 50                      | 8.01 b   | 195.37 de  | 7279 ed  | 2236.40 g  | 47.42 h  | 68.42 f  | 172.00 cd |
|                 | <b>CoCl<sub>2</sub></b> |          |            |          |            |          |          |           |
| Suruç           | 0                       | 5.01 b   | 160.30 ef  | 2997 g   | 2310.08 ba | 62.10 e  | 71.00 g  | 147.17 f  |
|                 | 5                       | 2.42 dfe | 201.49 dc  | 11185 a  | 2131.14 bc | 81.23 ba | 89.40 a  | 263.14 a  |
|                 | 25                      | 3.66 c   | 159.75 ef  | 10490 ba | 1995.17 e  | 76.08 c  | 82.72 d  | 240.39 b  |
|                 | 50                      | 3.16 dc  | 143.05 ef  | 7192 f   | 1862.71 fg | 69.97 d  | 77.98 f  | 180.96 d  |
| Hicaz           | 0                       | 6.79 a   | 238.79 c   | 2566 g   | 1985.52 fe | 53.47 f  | 63.00 h  | 102.91 h  |
|                 | 5                       | 5.03 b   | 383.51 a   | 9939 bac | 2044.29 de | 82.26 a  | 87.21 ba | 207.74 c  |
|                 | 25                      | 3.20 dc  | 343.44 a   | 9483 bdc | 2170.61 dc | 83.40 a  | 85.60 bc | 201.08 c  |
|                 | 50                      | 2.87 dce | 349.56 ba  | 3748 f   | 2386.40 a  | 79.06 b  | 81.69 d  | 155.49 d  |
| Suruç<br>Karası | 0                       | 2.68 cd  | 132.47 f   | 3466 g   | 1687.28 h  | 47.42 g  | 55.00 i  | 172.00 e  |
|                 | 5                       | 1.85 gf  | 205.95 dc  | 8692 edc | 1936.40 fe | 74.57 c  | 83.62 dc | 183.95 d  |
|                 | 25                      | 2.01 gfe | 172.55 de  | 8523 ed  | 1758.33 hg | 73.58 d  | 82.21d   | 187.05 d  |
|                 | 50                      | 1.40 g   | 168.10 def | 7945 ef  | 1663.59 h  | 61.73 e  | 74.45 f  | 122.68 g  |
|                 | <b>CdCl<sub>2</sub></b> |          |            |          |            |          |          |           |
| Suruç           | 0                       | 5.47 ba  | 160.30 fg  | 2714 g   | 2310.08 a  | 62.10 g  | 70.48 f  | 147.17 g  |
|                 | 5                       | 4.00 dc  | 205.95 de  | 11916 c  | 2121.49 ba | 79.47 a  | 87.33 a  | 254.18 b  |
|                 | 25                      | 4.38 bc  | 190.92 fe  | 12943 b  | 1975.87 dc | 77.81 ba | 85.92 ba | 264.64 b  |

|                 |                       |          |           |           |            |           |          |          |
|-----------------|-----------------------|----------|-----------|-----------|------------|-----------|----------|----------|
|                 | 50                    | 4.00 de  | 140.27 g  | 11859 c   | 1592.54 fe | 72.25 fe  | 83.34 c  | 239.24 c |
| Hicaz           | 0                     | 6.50 a   | 238.79 c  | 3600 f    | 1985.52 dc | 53.42 h   | 61.31 g  | 102.91 h |
|                 | 5                     | 3.24 dce | 326.74 a  | 9336 e    | 2181.14 b  | 78.95 a   | 86.37 ba | 169.93 f |
|                 | 25                    | 4.16 c   | 292.23 b  | 9470 e    | 1876.75 dc | 76.01 bc  | 84.17 bc | 221.77 d |
|                 | 50                    | 4.59 bc  | 248.28 c  | 10894 d   | 1604.82 fe | 75.16 dc  | 77.21 e  | 191.65 e |
| Suruç<br>Karası | 0                     | 2.68 dfe | 132.47 g  | 3170 gf   | 1687.28 e  | 46.32 i   | 53.00 h  | 172.00 f |
|                 | 5                     | 1.64 gf  | 284.99 b  | 13752 a   | 2073.24 bc | 73.14 de  | 82.71 c  | 296.13 a |
|                 | 25                    | 2.61 fe  | 237.12 dc | 10359 d   | 1480.26 f  | 70.89 f   | 80.28 d  | 196.94 e |
|                 | 50                    | 1.20 g   | 190.36 fe | 10132 ed  | 1266.22 g  | 55.11 hg  | 76.12 e  | 153.72 g |
|                 | <b>Salisilik Asit</b> |          |           |           |            |           |          |          |
| Suruç           | 0                     | 6.48 b   | 238.79 d  | 4830.20 d | 1079.38 c  | 43.08 d   | 74.83 c  | 145.79 b |
|                 | 10                    | 2.20 c   | 343.44 c  | 7225.77 a | 1423.24 b  | 59.01 b   | 83.17 a  | 160.50 a |
|                 | 50                    | 1.07 dc  | 164.20 fe | 363.55 hi | 360.96 h   | 0.66 h    | 45.41 f  | 1.19 f   |
|                 | 100                   | 1.44 dc  | 58.44 g   | 270.22 i  | 275.00 i   | 0.66 h    | 39.19 g  | 0.27 f   |
| Hicaz           | 0                     | 10.29 a  | 160.30 fe | 5425.77 c | 1437.28 b  | 56.58 c   | 79.00 b  | 83.60d   |
|                 | 10                    | 1.61 dc  | 584.46 b  | 4150.22 e | 852.19 d   | 40.17 e   | 69.07 d  | 92.00 c  |
|                 | 50                    | 1.03 dc  | 396.87 c  | 3363.55 f | 782.01 fe  | 25.82 g   | 69.45 d  | 72.34 e  |
|                 | 100                   | 0.44 dc  | 169.77 e  | 559.11 hg | 537.28 g   | 0.66 h    | 46.31 f  | 3.72 f   |
| Suruç<br>Karası | 0                     | 10.96 a  | 132.47 fe | 6676.88 b | 1811.84 a  | 64.12 a   | 77.14 c  | 143.0h3  |
|                 | 10                    | 0.25 dc  | 784.29 a  | 3923.55 e | 790.78 e   | 36.23 f   | 66.25 d  | 83.60 d  |
|                 | 50                    | 0.75 dc  | 301.14 e  | 3432.44 f | 740.78 f   | 25.35 g   | 59.51e   | 72.00 e  |
|                 | 100                   | 0.24 d   | 235.45 fg | 792.44 g  | 396.05 h   | 0.66 h    | 43.42 f  | 5.21 f   |
|                 | <b>Metil Jasmonat</b> |          |           |           |            |           |          |          |
| Suruç           | 0                     | 6.48 b   | 238.79 de | 4830.22 c | 1079.38 c  | 43.08 cbd | 74.84 a  | 145.79 a |
|                 | 10                    | 2.68 c   | 495.40 a  | 4383.55 d | 949.56 d   | 58.05 a   | 69.51 ba | 110.27 c |

|                 |                 |          |           |            |            |          |           |           |
|-----------------|-----------------|----------|-----------|------------|------------|----------|-----------|-----------|
|                 | 50              | 1.33 dc  | 453.10 a  | 3101.33 gf | 659.21 hg  | 44.03 cb | 60.22 c   | 60.85 h   |
|                 | 100             | 0.24 d   | 276.09 dc | 988.00 i   | 556.57 i   | 2.02 g   | 47.46 f   | 10.62 d   |
| Hicaz           | 0               | 10.29 a  | 160.31 fe | 5425.77b   | 1437.28 b  | 56.58 a  | 79.00 a   | 83.60 d   |
|                 | 10              | 2.16 dc  | 500.41 a  | 3021.33 gf | 622.36 h   | 41.31 cd | 56.31 dce | 65.56 g   |
|                 | 50              | 1.12 dc  | 461.45 a  | 3245.77 f  | 757.45 f   | 47.35 b  | 59.26 dc  | 70.96 f   |
|                 | 100             | 0.38 d   | 355.69 bc | 3054.66 gf | 674.12 g   | 38.52 d  | 54.77 de  | 61.08 d   |
| Suruç<br>Karası | 0               | 10.96 a  | 132.48 f  | 6676.88 a  | 1811.84 a  | 60.81 a  | 77.14 a   | 143.03 b  |
|                 | 10              | 0.33 d   | 431.94 ba | 3534.66 e  | 899.56 e   | 45.36 cb | 59.77 c   | 78.20 e   |
|                 | 50              | 0.31 d   | 232.11 de | 2852.44 gf | 774.12 f   | 27.85 e  | 56.12 dce | 64.29 g   |
|                 | 100             | 0.46 d   | 303.92 dc | 1996.88 h  | 575.87 i   | 13.46 f  | 52.78 e   | 35.44 g   |
|                 | <b>Sakkaroz</b> |          |           |            |            |          |           |           |
| Suruç           | 0               | 6.48 dc  | 160.30 fe | 5534.7 c   | 1364.47 dc | 57.06 c  | 76.63 a   | 145.79 b  |
|                 | 20              | 11.33 ba | 248.25 c  | 3937.3 f   | 947.48 gf  | 37.01 h  | 58.23d    | 86.02 g   |
|                 | 40              | 5.77 dce | 217.02 dc | 6827.6 a   | 1445.17 ba | 65.01 b  | 73.17a    | 164.18 a  |
|                 | 60              | 3.37 e   | 292.78 b  | 6205.3 b   | 1409.21 bc | 69.79 a  | 73.75 a   | 160.39 a  |
| Hicaz           | 0               | 10.29 b  | 238.79 c  | 3523.6 g   | 799.56 b   | 37.27h   | 59.19 dc  | 83.6 g    |
|                 | 20              | 12.79 a  | 264.03 a  | 2852.4 h   | 612.71 i   | 28.73 i  | 55.35 d   | 62.45 h   |
|                 | 40              | 7.01 c   | 354.01 a  | 4448.0 d   | 1085.52e   | 53.45 d  | 65.22 bc  | 109.24 d  |
|                 | 60              | 4.22 de  | 370.71 a  | 4230.2 edf | 1002.19 f  | 47.64 fe | 59.07 d   | 97.51 f   |
| Suruç<br>Karası | 0               | 10.96 ba | 132.47 fg | 5948.0 b   | 1503.94 a  | 49.55 e  | 74.07 a   | 143.03 b  |
|                 | 20              | 12.68 ba | 148.06 fg | 4361.3 ed  | 989.91 gf  | 46.46 f  | 65.86 b   | 105.44 ed |
|                 | 40              | 4.96 dce | 115.22 g  | 4112.4 ef  | 929.38 g   | 42.12 g  | 65.48 b   | 102.22 e  |
|                 | 60              | 1.12 de  | 195.37 de | 5434.7 c   | 1311.84 d  | 58.97 c  | 70.67 ba  | 134.52 c  |
|                 | <b>PEG</b>      |          |           |            |            |          |           |           |
| Suruç           | 0               | 6.48 bdc | 160.30 ef | 5534.7 b   | 1364.47 bc | 57.06 a  | 76.63 hg  | 145.79 a  |

|                 |                 |           |            |             |            |          |           |          |
|-----------------|-----------------|-----------|------------|-------------|------------|----------|-----------|----------|
|                 | 20              | 8.75 bac  | 201.49 dc  | 4634.7 ed   | 1210.08def | 44.92 ed | 90.03 fed | 119.58 d |
|                 | 40              | 4.79 dc   | 159.75 ef  | 4681.3 d    | 1118.86 fe | 45.58 d  | 94.13 cbd | 120.62 d |
|                 | 60              | 6.16 bdc  | 143.05 ef  | 4216.9 f    | 899.56 g   | 38.22 gf | 98.94 b   | 68.66 f  |
| Hicaz           | 0               | 10.29 a   | 238.79 c   | 3523.55 g   | 799.56 g   | 37.27 g  | 59.19 i   | 83.6 g   |
|                 | 20              | 11.72 a   | 383.51 a   | 5214.7 cb   | 1392.54 ba | 42.78 e  | 84.13 fe  | 127.86 c |
|                 | 40              | 5.68 dc   | 343.44 b   | 5512.44 cb  | 1432.01 ba | 54.23 b  | 107.91 a  | 126.13 c |
|                 | 60              | 6.14 bce  | 349.56 ba  | 4328.0 ef   | 1096.93 f  | 43.03 e  | 91.12 ced | 94.29 f  |
| Suruç<br>Karası | 0               | 10.96 a   | 132.47 f   | 5948.0 a    | 1503.94 a  | 49.55 c  | 74.07 h   | 143.03 a |
|                 | 20              | 9.64 ba   | 205.95 dc  | 5203.55 c   | 1493.42 a  | 40.25 f  | 89.07 fed | 133.83 b |
|                 | 40              | 10.77 a   | 172.55 de  | 4412.44 edf | 1225.87 de | 37.27 g  | 82.23 fg  | 111.54 e |
|                 | 60              | 8.03 bdac | 168.10 def | 4332.44 ef  | 1253.94 dc | 31.97 h  | 98.23 cb  | 134.18 c |
|                 | <b>Sorbitol</b> |           |            |             |            |          |           |          |
| Suruç           | 0               | 16.59 a   | 160.30 fg  | 5534.66 b   | 1364.47 b  | 57.06 a  | 76.63 a   | 120.62 b |
|                 | 20              | 7.42 efcd | 205.95 de  | 3930.22 d   | 1049.56 c  | 42.64 dc | 71.05 bc  | 79.47 d  |
|                 | 40              | 6.18 ef   | 190.92 fe  | 3501.33 f   | 853.94 fg  | 39.18 de | 67.91 dc  | 70.85 e  |
|                 | 60              | 4.83 f    | 140.27 g   | 2716.88 h   | 750.43 h   | 36.75 e  | 63.23 de  | 71.88 e  |
| Hicaz           | 0               | 13.33 ba  | 238.79 c   | 3523.55 f   | 799.56 hg  | 37.27 e  | 59.19 fe  | 124.64 b |
|                 | 20              | 6.83 ef   | 326.74 a   | 3590.22 ed  | 1076.75 c  | 32 g     | 62.01 e   | 68.09 fe |
|                 | 40              | 5.33 ef   | 292.23 b   | 3463.55 f   | 1019.73 dc | 32.96 fg | 61.25 fe  | 65.79 fg |
|                 | 60              | 4.88 f    | 248.25 c   | 3199.11 g   | 919.73 fe  | 30.72 g  | 56.5 fg   | 60.04 h  |
| Suruç<br>Karası | 0               | 10.24 bdc | 132.47 g   | 5948.0 a    | 1503.94 a  | 49.55 b  | 74.07 ba  | 158.78 a |
|                 | 20              | 8.57 ecd  | 284.99 b   | 3828.0 ed   | 967.1 de   | 36.98 fe | 61.37 fe  | 62.57 hg |
|                 | 40              | 10.68 bc  | 237.12 dc  | 4216.88 c   | 935.2 e    | 45.29 c  | 62.4 e    | 86.25 c  |
|                 | 60              | 7.37 efd  | 190.36 fe  | 2799.11 h   | 732.89 h   | 30.64 g  | 51.31 g   | 59.58 h  |