



**SİYAH HAVUÇ (*Daucus carota*) KALLUS VE
HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE
ANTOSİYANİN ÜRETİMİNE UV-C STRESİNİN VE
RİBOFLAVİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

İlhami KARATAŞ

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. Mahfuz ELMATAŞ
2013
Her hakkı saklıdır**

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

SİYAH HAVUÇ (*Daucus carota*) KALLUS VE HÜCRE
SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE ANTOSİYANİN ÜRETİMİNE UV-C
STRESİNİN VE RİBOFLAVİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

İlhami KARATAŞ

TOKAT
2013

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ danışmanlığında, İlhami KARATAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 24/04/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Üye : Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Üye : Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Üye : Prof. Dr. Şaban TEKİN

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Naim ÇAĞMAN

Enstitü Müdürü

13.05/2013

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

İlhami KARATAŞ

ÖZET

Doktora Tezi

SİYAH HAVUÇ (*Daucus carota*) KALLUS VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE ANTOSİYANİN ÜRETİMİNE UV-C STRESİNİN VE RİBOFLAVİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

İlhami KARATAŞ

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mahfuz ELMATAŞ

Bu çalışmada, siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atropurpurea* Alef.) bitkisinden elde edilen kallus ve hücre süspansiyon kültüründe antosiyanin üretimine bazı uygulamaların etkisi incelenmiştir. Kallus indüksiyonu steril şartlarda yetiştirilen fidelerin hipokotil eksplantlarının oksin (2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), Naftalen asetik asit ve İndol-3-asetik asit) ve sitokinin (Benzilaminopürin (BAP) ve Kinetin) değişik miktar ve kombinasyonlarını içeren MS (Murashige and Skoog) besi ortamında kültüre alınmasıyla başlatılmıştır. Yapılan çok sayıda farklı uygulamalar neticesinde antosiyanin üretimi ve hücre süspansiyon kültürü için en uygun kallusların 2 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L BAP, 30 g/L sukroz ve 2 g/L phytigel içeren MS besi ortamında olduğu belirlenmiştir. Bu ortam şartlarında elde edilen kallusların antosiyanin üretimini artırmak için farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde riboflavin ve UV-C elisitör olarak kullanılmıştır. UV-C (254 nm) ışığı kalluslara 10 cm mesafeden günlük 10 dakika ve 15 dakika olarak 10 gün uygulanmıştır. UV-C uygulamasından sonra kalluslar 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta ve 25 ± 2 °C inkübe edilmişlerdir. Riboflavin uygulaması 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/L olmak üzere beş farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler neticesinde kalluslara uygulanan riboflavin veya UV-C'nin antosiyanin sentezini güçlü bir şekilde artırsa da hücre büyümesini önemli ölçüde yavaşlattığı belirlenmiştir. Antosiyanin içeriğindeki artış en fazla 4 mg/L riboflavin ve 15 dakika UV-C uygulanan kalluslarda belirlenmiş olup artış oranı sırasıyla % 188,95 ve % 101,17'dir. Hücre süspansiyon kültürü bir aylık, yumuşak ve kolay dağılabilen kallusların 2 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L BAP and 30 g/L sukroz içeren MS besi ortamında kültüre alınmasıyla başlatılmıştır. Bu özellikteki kalluslar 40 ml sıvı besi ortamı içeren 100 ml'lik erlenmayerlerde, 120 devir/dakika hızla karıştıran çalkayıcı üzerinde, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyotta inkübe edilmiştir. Söz konusu kültürde antosiyanin üretimini artırmak için 4 mg/L riboflavin 15 dakika UV-C uygulanmış ve yapılan analizler neticesinde her iki uygulamanın da antosiyanin içeriğini anlamlı ($P \leq 0,05$) şekilde artırdığı belirlenmiştir.

2013, 81 sayfa

Anahtar kelimeler: Antosiyanin, Hücre süspansiyon kültürü, Kallus kültürü, Riboflavin, UV-C
Siyah havuç

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

EFFECTS OF UV-C STRESS AND RIBOFLAVIN ON ANTHOCYANIN PRODUCTION IN THE CALLUS AND CELL SUSPENSION CULTURE OF BLACK CARROT (*Daucus carota*)

İlhami KARATAŞ

Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mahfuz ELMATAŞ

In this study, the effect of some applications on the production of anthocyanin in the callus culture and cell suspension culture of black carrot (*Daucus carota ssp. sativus var. atropurpurea* Alef.) were studied. A number of combination of different media were assessed for callus induction. Hypocotyle explants excised from sterile seeding were cultured on MS media supplemented with different amounts and combination of auxin (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Indole-3-acetic acid and Naphthaleneacetic acid) and cytokinin (Benzylaminopurine (BAP) and Kinetin). The most suitable callus were obtained in MS (Murashige and Skoog) media containing 2 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L BAP, 30 g/L sucrose and 2 g/L phytagel for anthocyanin production and cell suspension culture. Riboflavin and UV-C as an elicitor were applied to callus culture at different concentrations and durations in order to increase the production of anthocyanin. Callus tissues were exposed to UV-C (254 nm) light at 10 cm distance from the source for 10 and 15 minute in a day. After UV-C application, callus tissues were incubated under 16 h. light and 8 h. dark photoperiod at 25 °C ± 2 and harvested after 10 days. The effect of riboflavin at the concentrations of 2, 4, 6, 8 ve 10 mg /L on enhancement of anthocyanin production were studied. In a callus culture of black carrot, anthocyanin biosynthesis was strongly enhanced, whereas cell growth was inhibited, eliciting either the addition of riboflavin or UV-C light irradiation. The highest increase of anthocyanin content were determined callus cultures applied 4 mg/L riboflavin and 15 minute UV-C, and increasing ratios were %188,95 and % 101,17, respectively. Cell suspension cultures were initiated by transferring one month old friable callus to 40 ml MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L BAP and 30 g/L sucrose in a 100 ml erlenmeyer flask and placed on a shaker with agitation at 120 rpm at 25 °C ± 2 at 16 h. light and 8 h. dark photoperiod. To increase the production of anthocyanin, cell suspension cultures were carried out 4 mg/L riboflavin and 15 min. UV-C. Both applications enhanced significantly anthocyanin content in suspension culture (P≤0,05).

2013, 81 pages

Keywords: Anthocyanin, Black carrot, Callus culture, Cell suspension culture, UV-C, Riboflavin

ÖNSÖZ

Doktora çalışmamın her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a, çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. İsa GÖKÇE, Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK ve Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ'a, Moleküler Biyoteknoloji Laboratuvar'ında çalışma imkanı sunduğu için Prof. Dr. Nejdet KANDEMİR'e, desteklerinden dolayı Uzm. Biyolog Salih KUŞÇUOĞLU'na, çalışmamın her aşamasında yardımını esirgemeyen eşim Doktora öğrencisi Zir. Yük. Müh. Rahime KARATAŞ'a, analiz aşamasındaki katkılarından dolayı arkadaşlarım lisansüstü öğrencileri Zülfükar KARAÇAY, Nusret GENÇ, Hüseyin AKŞİT ve Duygu MISIRLI'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim. Maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime ayrıca çalışmalarım sırasında yeterince ilgi gösteremediğim oğlum Muhammed Emre'ye teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığının 2010/78 nolu projesi ile desteklenmiştir.

İlhami KARATAŞ

Mart 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Bitki Doku Kültürünün Tanımı ve Uygulama Alanları.....	5
2.2. Sekonder Metabolitlerin Tanımı, Grupları ve Kullanım Alanları.....	5
2.3. Bitki Doku Kültürü Yöntemleriyle Sekonder Metabolit Üretimi.....	11
2.4. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak için Geliştirilen Stratejiler.....	13
2.5. Bitkilerde çeşitli streslere karşı oluşan sinyal mekanizması.....	17
2.6. Ultraviyole Radyasyonunun (UV) ve Riboflavinin Sekonder Metabolit Üretimi Üzerine Etkisi.....	20
2.7. Antosiyaninler.....	22
2.7.1. Tanımı ve Çeşitleri.....	22
2.7.2. Antosiyaninlerin Biyosentezi.....	24
2.7.3. Antosiyaninlerin Biyolojik Önemi ve Kullanım Alanları.....	27
2.7.4. Siyah Havuç Antosiyaninleri.....	27
2.7.5. Antosiyaninlerin Bitki Doku ve Hücre Kültürü Yöntemleriyle Üretimi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Bitkisel Materyal.....	35
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	35
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar.....	36
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi ve Steril Fidelerin Elde Edilmesi.....	36
3.2.2. Kallus Kültürünün Oluşturulması.....	39
3.2.3. Kallus Kültürüne Riboflavin Uygulanması.....	42
3.2.4. Kallus Kültürüne UV-C Uygulanması.....	42
3.2.5. Hücre Süspansiyon Kültürünün Oluşturulması.....	43
3.2.6. Süspansiyon Kültüründeki Hücrelerin Çoğalma Eğrisinin Oluşturulması.....	44
3.2.7. Hücre Süspansiyon Kültürüne Riboflavin Uygulanması.....	45
3.2.8. Hücre Süspansiyon Kültürüne UV-C Uygulanması.....	45
3.2.9. Antosiyaninlerin Analizi.....	45
3.2.10. İstatistiksel Analizler.....	46
4. BULGULAR	48

4.1. Kallus Oluşumunun En İyi Olduğu Ortam Şartlarının Belirlenmesi.....	48
4.2. Farklı Besi Ortam Şartlarından Elde Edilen Kallusların Antosiyanin İçeriği..	52
4.3. Riboflavin Uygulanan Kalluslarda Antosiyanin İçeriği.....	53
4.4. UV-C Uygulanan Kalluslarda Antosiyanin İçeriği.....	54
4.5. Riboflavin ve UV-C Uygulanan Kallusların Taze Ağırlıklarındaki Değişim..	54
4.6. Hücre Süspansiyon Kültürünün Oluşturulması ve Çoğalma Eğrisinin Çıkarılması	56
4.7. Riboflavin ve UV-C Uygulanan Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Antosiyanin İçeriği.....	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
ϵ	Molar absorpsivite katsayısı
g	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
N	Azot
NaOH	Sodyumhidroksit
nm	Nanometre
O_2^-	Süperoksit radikali
$^\circ\text{C}$	Santigrat derece
OCH_3	Metoksil
OMe	Metoksil
OH	Hidroksil
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S	Kükürt
W	Watt

Kısaltmalar	Açıklama
2,4-D	2,4-diklorofenoksi asetik asit

4CL	4-kumaril-CoA ligaz
ABA	Absisik asit
ANS	Antosiyanidin sentaz
APX	Askorbat peroksidaz
B5	Gamborg (1968)
BA	Benziladenin
BAP	Benzil amino pürin
C4H	Sinnamat-4-hidroksilaz
CAT	Katalaz
CHI	Kalkon izomeraz
CHS	Kalkon sentaz
DFR	Dihidroflavanol-4-redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAD	Flavin adenin dinükleotit
FMN	Flavin mononükleotit
GST	Glutatyon-S-transferaz
GT	3-O-glikozil transferaz
HSP	Isı şok proteinleri
IAA	İndol-3-asetik asit
KA	Kuru ağırlık
KIN	Kinetin
LPO	Lignin peroksidaz
LS	Linsmaier-Skoog ortamı
MA	Molekül ağırlığı
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MeJA	Metil jasmonat
MS	Murashige and Skoog (1962)
MT	O- metiltransferaz
NAA	Naftalen asetik asit
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
PHH	Paketlenmiş hücre hacmi
PIC	4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit

PR	Patogenez ile ilgili proteinler
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TA	Taze ağırlık
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Sekonder metabolitlerin sentezlendiği yaygın biyosentetik yollar.....	8
Şekil 2.2. Terpenlerin temel birimini oluşturan izoprenin yapısı	9
Şekil 2.3. Flavonoidlerin yapısı	10
Şekil 2.4. Nitrojen içeren bazı sekonder metabolitler	10
Şekil 2.5. Çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartlarında üretimi artan fenilpropanoid bileşikleri.....	15
Şekil 2.6. Biyotik veya abiyotik stres süresinde ROS'ların üretimi ve yok edilme mekanizması.....	19
Şekil 2.7. Bitkilerin savunma yanıtının sinyal iletim mekanizması.....	19
Şekil 2.8. Riboflavinden FMN ve FAD'ın sentezi.....	21
Şekil 2.9. Antosiyaninlerin temel kısmını oluşturan antosiyanidin olarak adlandırılan flavilium katyonu.....	23
Şekil 2.10. Antosiyaninlerin biyosentez basamakları.....	26
Şekil 3.1. Siyah havuç bitkisi.....	35
Şekil 3.2. Siyah havuç tohumlarının çimlendirilmesi ve fide yetiştirilmesi.....	38
Şekil 3.3. Steril şartlarda yetiştirilen fideler (A) ve bir aylık bitkiler (B).....	38
Şekil 3.4. Eksplant kaynağı olarak kullanılan hipokotil kısımlarının besi ortamına aktarımı ve elde edilen kalluslar.....	41
Şekil 3.5. Riboflavin içeren besi ortamına alt kültüre alınmış kalluslar (A) ve kontrol grubu kalluslar (B).....	42
Şekil 3.6. Kalluslara UV-C ışığı uygulamasında kullanılan sistem.....	43
Şekil 3.7. Hücre süspansiyon kültürünün oluşturulması.....	44
Şekil 3.8. Paketlenmiş hücre hacminin belirlenmesinde kültür ortamından alınan hücrelerin petri kabındaki görüntüsü.....	44
Şekil 3.9. Antosiyanin analizi için ekstrakte edilen numuneler.....	46
Şekil 3.10. Deney akış şeması.....	47
Şekil 4.1. Farklı besi ortamlarında kültürü alınan eksplantlardan oluşan kalluslar.....	51
Şekil 4.2. Hücre süspansiyon kültürünün çeşitli aşamalarından resimler.....	57
Şekil 4.3. Süspansiyon kültüründeki hücrelerin paketlenmiş hücre hacmi (% PHH) olarak çoğalma eğrisi.....	58

Şekil 4.4.	Hücre süspansiyon kültürüne yapılan uygulamalar neticesinde elde edilen hücrelerin ve agregatların görüntüleri: Riboflavin (A), Kontrol (B), UV-C (C).....	60
-------------------	--	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı değerli sekonder metabolitlerin kullanım alanları, kullanıldığı sektörler ve elde edildiği bitkiler.....	7
Çizelge 2.2. Yüksek bitkilerin doku ve süspansiyon kültürlerinden izole edilen sekonder metabolit grupları	11
Çizelge 2.3. Bitki doku kültürü yöntemleriyle üretilen bazı sekonder metabolitler ve elde edildikleri kültür tipleri.....	12
Çizelge 2.4. Sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılan elisitörler	16
Çizelge 2.5. Doğal olarak meydana gelen antosiyanidinler.....	23
Çizelge 3.1. MS temel besi ortamı.....	37
Çizelge 3.2. Kallus kültürünün oluşturulmasında kullanılan besin ortamına ilave edilen hormon çeşidi ve miktarları.....	40
Çizelge 4.1. Eksplantların kültüre alındığı MS besi ortamına ilave edilen hormonların kallus oluşumuna etkisi.....	49
Çizelge 4.2. Farklı besi ortamlarında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallusların antosiyanin içeriği.....	52
Çizelge 4.3. Riboflavin uygulanan kallusların antosiyanin içeriğinde meydana gelen artış.....	53
Çizelge 4.4. UV-C uygulanan kallusların antosiyanin içeriğinde meydana gelen artış.....	54
Çizelge 4.5. Riboflavin uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıkları.....	55
Çizelge 4.6. UV-C uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıkları.....	55
Çizelge 4.7. Riboflavin ve UV-C uygulanan hücre süspansiyon kültürlerinin antosiyanin içerikleri.....	59

1. GİRİŞ

Bitkiler primer ve sekonder metabolit olarak adlandırılan çok çeşitli organik bileşikler sentezlemektedirler. Primer metabolitler; fitosteroller, açıl lipidler, nükleotidler, proteinler, karbonhidratlar ve amino asitler olup büyüme, gelişme, fotosentez ve solunum gibi bir çok süreçte önemli rol oynamaktadırlar (Crozier ve ark., 2006; Ramawat, 2007). Sekonder metabolitler ise temel büyüme ve gelişme için gerekli olmayan fakat biyotik ve abiyotik streslere karşı çevresel uyumda görev alan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Nascimento ve Fett-Neto, 2010). Başka bir ifadeyle sekonder metabolitler bazı bitki türlerinde şaşırtıcı derecede yüksek miktarlarda biriken bitki kimyasalları olarak adlandırılmaktadır. Sekonder metabolitler biyosentetik olarak primer metabolitlerden türetilen ve bir çoğu bitkiler aleminde belli bir taksonomik gruba (tür, cins veya aile) özgü olan bileşiklerdir (Ramawat, 2007). Bu bileşiklerin bitkilerdeki fonksiyonları uzun süre göz ardı edilse de herbivor ve mikroorganizmalara karşı korumada, tozlaşma ve tohumun yayılmasında hayvanları cezp etmede ve UV karşı korumada önemli bir role sahip olduğunun ortaya çıkmasıyla ilgi çekmeye başlamıştır. Ayrıca sekonder metabolitlerin boya, lif, yapıştırıcı, yağ, mum, tatlandırıcı, ilaç, parfüm, insektisit ve herbisit olarak kullanılabilmelerinden dolayı büyük önem arz etmektedir (Crozier ve ark., 2006).

Bitki doku ve hücre kültürü, aseptik koşullar altında ve uygun besi ortamında bitki, hücre, doku, veya organlarının büyütülmesi tekniği olarak tanımlanmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001). Bu yöntemin birçok uygulama alanının bulunmasının yanında değerli sekonder metabolitlerin araştırılması ve üretilmesi için de elverişli biyoteknolojik bir yöntem olduğu ifade edilmektedir (Zhong, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Vanisree ve ark., 2004). Sekonder metabolitlerin bitki doku kültürü yöntemleriyle üretimi birçok açıdan avantajlıdır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Bu avantajlar arasında hızlı, sabit kalitede ve çevre şartlarından etkilenmeden sürekli ürün elde edilmesi sayılabilmektedir. Söz konusu yöntemin bir diğer önemli üstünlüğü ise çeşitli stratejilerle üretimin artırılabilmesidir. Metabolit üretiminin artırılmasında yararlanılan başlıca stratejiler arasında biyotik veya abiyotik elisitör uygulanması, öncül bileşiklerin

kültür ortamına ilave edilmesi, yüksek üretken hücre hatlarının seçilmesi, kültür besi ortamının manipasyonu ve mutajenlerin kullanımı yeralmaktadır (Sasson, 1991; Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Antosiyaninler sekonder metabolitlerin yaygın bir grubu olan flavonoidlerin önemli bölümünü oluşturmaktadır. Bitkiler aleminde 2000 yılı itibariyle 500 farklı antosiyanin çeşidinin bulunduğu belirlenmiştir. Kimyasal açıdan antosiyaninler 2-fenilbenzopirilium'un (flavilium katyonu) polihidroksi ve polimetoksi türevlerinin glikozitleridir (Galvano ve ark., 2004; Ghosh ve Konishi, 2007). Bu bileşiklerin temel kısmını antosiyanidin (aglikon) olarak adlandırılan flavilium katyonu oluşturmaktadır (Kong ve ark., 2003). Bitkilerde siyanidin, delfidin, malvidin, peonidin, pelargonoidin ve petunidin olarak adlandırılan altı antosiyanidin yaygın şekilde bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan antosiyaninler arasındaki farklılıklar antosiyanidin molekülündeki hidroksil grubunun sayısı ve pozisyonu, hidroksil gruplarının metilasyon derecesi, ilave edilen şekerin çeşidi, sayısı ve bağlanma bölgesi ve şeker molekülüne bağlanmış alifatik veya aromatik asitlerden ileri gelmektedir (Galvano ve ark., 2004; Ghosh ve Konishi, 2007).

Çiçek, meyve, sebze ve diğer bitki dokularındaki kırmızı, mavi ve mor renklerinin çoğunluğu antosiyaninlerden kaynaklanmaktadır (Mazza, 2007). Bu bileşikler bitkilere bir görsellik kazandırmasının yanında antioksidan, kuraklık ve don stresinde osmotik ayarlayıcı ve UV radyasyonuna karşı koruyucu olarak fonksiyon göstermektedir (Close ve Beadle, 2003). Bitkilerdeki bu fonksiyonlarına ilave olarak insan sağlığı içinde faydalı etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasında antioksidant, anti alerjik, anti enflamatuar, anti viral, anti mutajenik, anti mikrobial, anti karsinojenik ve diyabeti önleme sayılabilmektedir (Ghosh ve Konishi, 2007).

Renk gıdaların kabul edilebilirliğinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Tüketiciler bir gıda ürününün kalitesini ilk olarak onun rengiyle sorgulamaktadır. Gıda sanayisi renklendiricileri gıdalara orijinal görünüm kazandırmak, standart hale getirmek veya kalitenin bir göstergesi olması bakımından kullanmaktadır (Giusti ve Wrolstad, 2003). Gıda sanayinde bu amaçla sentetik renklendiriciler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak yapay renklendiricilerin kullanımı gerek yasal gerekse tüketici kaygısı oluşturmaları nedeniyle alternatif doğal bir kaynak olan antosiyaninlere talebi artırmıştır

(Giusti ve Wrolstad, 2003; Deroles, 2009). Antosiyaninlerin çekici renklerinin yanında suda çözünmeleri bunların renklendirici olarak kullanılmalarını sağlayan temel faktörlerdir (Bakowska-Barczak, 2005). Sanayide ticari amaçlı kullanılan antosiyaninlerin büyük çoğunluğu üzüm kabuklarından elde edilmektedir. Sadece üzüm kabuklarından 2002 yılında izole edilen antosiyaninlerin değeri 200 milyon \$ olduğu ve her yıl talebin % 5-15 arttığı tahmin edilmektedir. Antosiyaninlerin diğer önemli bitkisel kaynaklarını ise havuç, kırmızı lahana ve tatlı patates oluşturmaktadır (Deroles, 2009).

Siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atropurpurea* Alef.) Türkiye, Orta ve Uzak Doğu orijinli olup en az 3000 yıldır kültürü yapılmaktadır. Siyah havuç yüksek antosiyanin içeriğinin yanında çekici mavimsi mor renge sahiptir. Bu bitkide iki tanesi açılırsız, üç tanesi açılı siyanidin türevi beş antosiyanin pigmenti bulunmaktadır. Siyah havuçta bulunan antosiyaninlerin yüksek ışık, ısı ve pH stabilitelerinden dolayı doğal gıda renklendiricileri olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla siyah havuç ekstraktları meyve suları, şekerler, dondurma, alkolsüz içecekler ve diğer fermente içeceklere ilave edilmektedir (Montilla ve ark., 2011).

Antosiyaninlerin bitki hücre kültürüyle üretimi gerek akademik gerekse endüstriyel açıdan önemli ölçüde ilgi çeken bir teknolojidir. Bitki hücre kültürü yöntemleriyle antosiyanin üretiminin incelenmesinin temel nedeni, ticari kullanıma uygun ekonomik olarak fayda sağlayacak geçerli bir sürecin oluşturulmasıdır. Bu amaçla yaklaşık 33 farklı bitki türünde çalışma yapıldığı ve en yaygın olarak çilek (*Fragaria ananassa*), üzüm (*Vitis vinifera*) ve havuç (*Daucus carota*) bitkilerinin kullanıldığı bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2002; Deroles, 2009).

Birçok kültür sisteminde antosiyanin biyosentezini artırarak ticari amaca elverişli bir teknoloji oluşturmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan stratejiler arasında yüksek üretken hücre hatlarının seçimi, öncül bileşiklerin ilave edilmesi, besin ortamının ve kültür şartlarının optimizasyonu, elitasyon ve iki aşamalı kültür sistemlerinin kurulması sayılabilmektedir (Zhang ve Furusaki, 1999). Bu amaçla yapılan farklı çalışmalarda kültüre uygulanan UV-B (Takeda ve Abe, 1992), riboflavin (Mori ve Sakurai, 1996), fungal elisitör (Gläbgen ve ark., 1998), jamonik asit (Zhang ve

ark., 2002), mekanik stres (Strazzer ve ark., 2011) ve UV-C (Çetin ve ark., 2011)'nin antosiyanin üretimini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada renklendirici olarak kullanılan bitki sekonder metabolitlerinden antosiyaninlerin bitki doku ve hücre kültürü yöntemleriyle üretimi ve çeşitli uyarıcıların bu bileşiğin üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla siyah havuç (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) bitkisinden oluşturulan kallus ve hücre süspansiyon kültürüne UV-C ve riboflavin uygulamanın antosiyanin içeriğinde meydana getirdiği değişim incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Bitki Doku Kültürünün Tanımı ve Uygulama Alanları

Bitki doku kültürü; aseptik şartlar altında ve yapay bir besin ortamında bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesi olarak tanımlanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001). Başlıca doku kültürü yöntemleri arasında kök, sürgün, embriyo, kallus ve hücre süspansiyon kültürleri sayılabilmektedir. Kalluslar ana bitkiden kesip çıkarılan ve bölünme özelliğini kaybetmemiş organ veya doku parçalarının karbon kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicilerini içeren yarı katı besi ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip yapılardır. Hücre süspansiyon kültürleri ise tek hücrelerin veya küçük çapta hücre gruplarının sıvı büyüme ortamında dağılım gösterdiği bitki hücre kültürü tekniğidir. Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında başlangıç materyali olarak ana bitkiden alınan uygun doku parçaları kullanıldığı gibi kallus numuneleri de kullanılabilmektedir. Süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında kallusların kullanılması daha avantajlıdır. Bunun nedeni *in vitro* ortama uyum sağlamış kallus numunelerinin sıvı ortama daha hızlı adapte olabilmesi ve bu ortamda kolayca parçalara ayrılıp homojen bir dağılım gösterebilmesidir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Bitki doku kültürü yöntemlerin uygulama alanları arasında; hastalıksız bitkilerin elde edilmesi, ıslah, somaklonal varyasyonların oluşturulması, *in vitro* seleksiyon, gen kaynaklarının korunması, gen aktarılması, sentetik tohum üretimi, bitkilerin çoğaltılması ve sekonder metabolitlerin üretilmesi sayılabilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2001).

2.2. Sekonder Metabolitlerin Tanımı, Grupları ve Kullanım Alanları

Sekonder metabolitler, bitkilerin savunma, korunma, ortama uyum sağlama, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirme gibi çeşitli olaylarda görev alan kimyasal maddelerdir. Söz konusu bileşikler bitkileri kuraklık, tuzluluk, UV ışınları vb. gibi

Çevresel etkenlerin oluşturduğu stresten korumanın yanında herbivorlara ve mikroorganizmalara karşı savunmada da fonksiyon göstermektedirler. (Bourgaud ve ark., 2001; Sökmen ve Gürel, 2001).

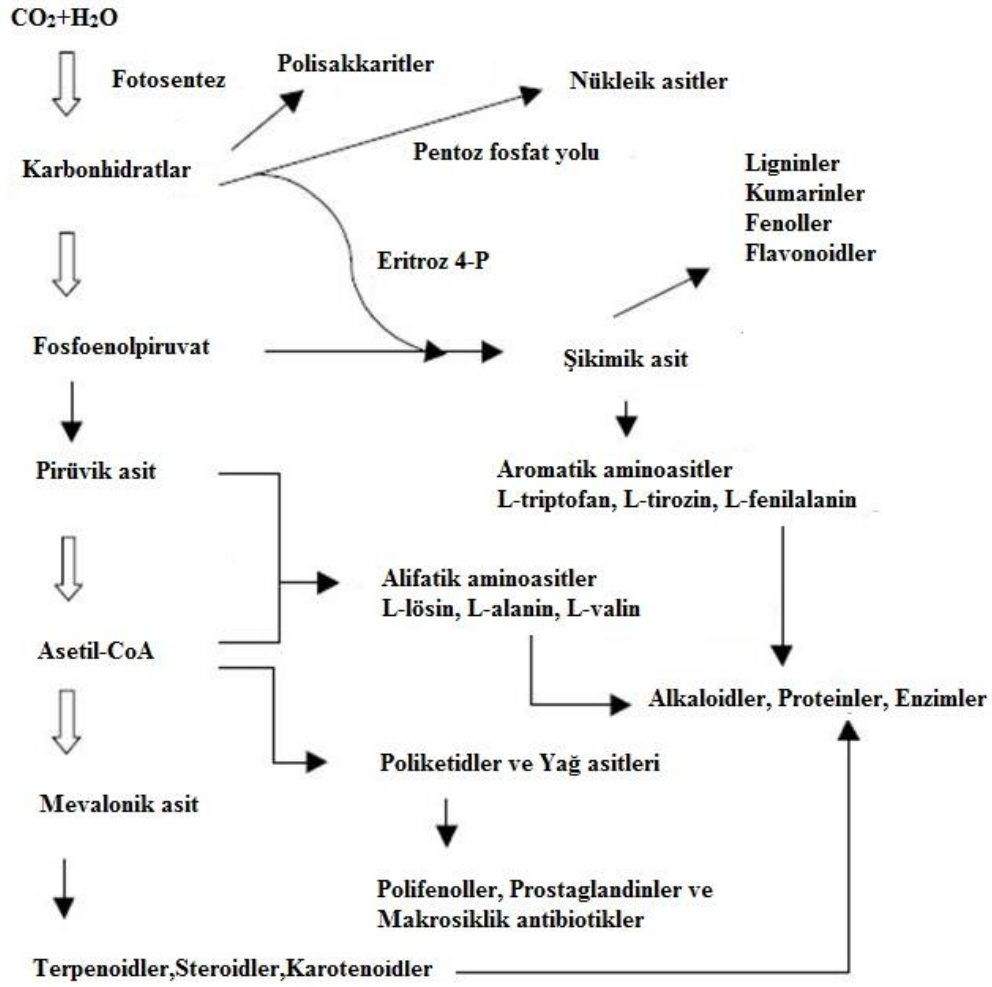
Sekonder metabolitlerin bitkilerdeki bu ana fonksiyonlarının yanında endüstride pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Bu doğal bileşikler yaygın şekilde ilaç hammaddesi, besin katkı maddesi, zirai mücadele ve kozmetikte kullanılmaktadır (Bourgaud ve ark., 2001; Sökmen ve Gürel, 2001). Gelişmiş ülkelerde reçete edilen ilaçların dörtte biri ve Dünya Sağlık rgt tarafından ilan edilen 252 temel ilacın %11'i bitkisel kökenli olduğu bildirilmiştir (Namdeo, 2007). Örneğin *Taxus brevifolia*'dan elde edilen anti kanser etkisi olan taxol (paclitaxel) ve *Papaver somniferum*'dan elde edilen analjezik ve narkotik etkisi olan morfin en çok bilinen ilaçlardan bazılarıdır (Vijaya ve ark., 2010). Bazı değerli sekonder metabolitlerin kullanım alanları, kullanıldığı sektörler ve elde edildiği bitkiler izelge 2.1'de özetlenmiştir (Sökmen ve Gürel, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Çizelge 2.1. Bazı değerli sekonder metabolitlerin kullanım alanları, kullanıldığı sektörler ve elde edildiği bitkiler (Sökmen ve Gürel, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002)

Sektör	Sekonder Metabolit	Kullanım Alanı	Elde Edildiği Bitki
İLAC	Ajmasilin Atropin Efedrin Kamptotesin Kapsaisin Kodein Kolşisin Digoksin Elliptisin Emetin Morfin Taksol Vinkristin Kinin	Antihipertansif Antikolinerjik Bronş açıcı Antitümoral Tahriş önleyici Analjezik Antitümoral Kardiyonik Antitümoral Ampli dizanteri Yatıştırıcı Antikanser Antilösemik Sıtma tedavisi	<i>Catharanthus roseus</i> <i>Atropa belladonna</i> <i>Ephedra sinica</i> <i>Camptotheca acuminata</i> <i>Capsicum frutescens</i> <i>Papaver somniferum</i> <i>Colchicum autumnale</i> <i>Digitalis lanata</i> <i>Ochrosia elliptica</i> <i>Cephaelis spp.</i> <i>Papaver somniferum</i> <i>Taxus brevifolia</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>Cinchona ledgerana</i>
GIDA	Antosiyanin Betalain Likopen Kinin Vanilin Taumatin Krosetin Glisirrizin Humulon	Renklendirici Renklendirici Renklendirici Acılaştırıcı Koku verici Tatlandırıcı Renklendirici Tatlandırıcı Acı ve koku verici	<i>Vitis vinifera</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Lycopersicum esculentum</i> <i>Cinchona ledgeriana</i> <i>Vanilla planifolia</i> <i>Thaumatococcus danielli</i> <i>Crocus sativa</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Humulus lupulus</i>
PARFÜM KOZMETİK	Yasemin yağı Gül yağı Lavanta yağı	Parfüm Parfüm Parfüm ve kozmetik	<i>Jasminum spp.</i> <i>Rosa damascena</i> <i>Lavandula officinalis</i>
ZİRAAT	Piretrin Yasmolin Nikotin Anakardik asit	İnsektisit İnsektisit İnsektisit Molluskusit	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Anacardicum occidentale</i>

Bitki sekonder metabolitleri genellikle sentezlendikleri biyosentetik yollara göre sınıflandırılmaktadır (Bourgaud ve ark., 2001). Çoğu sekonder metabolitin biyosentezi nispeten belli küçük bileşik gruplarından başlar ve çeşitli sentez yollarıyla sınırsız sayıda bileşiğe dönüştürülmektedir. Bu metabolik yolların en önemlileri Asetil-CoA,

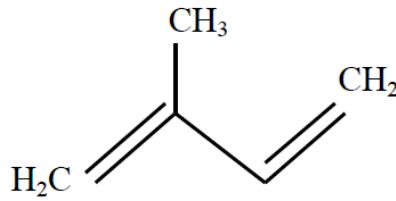
şikimik asit, mevalonik asit aracılığıyla gerçekleşen ve sırayla asetat, şikimat ve mevalunat olarak adlandırılan yollardır. Sekonder metabolitlerin sentezlendiği yaygın biyosentez yolları Şekil 2.1’de özetlenmiştir (Tolonen, 2003).



Şekil 2.1. Sekonder metabolitlerin sentezlendiği yaygın biyosentetik yollar (Tolonen, 2003)

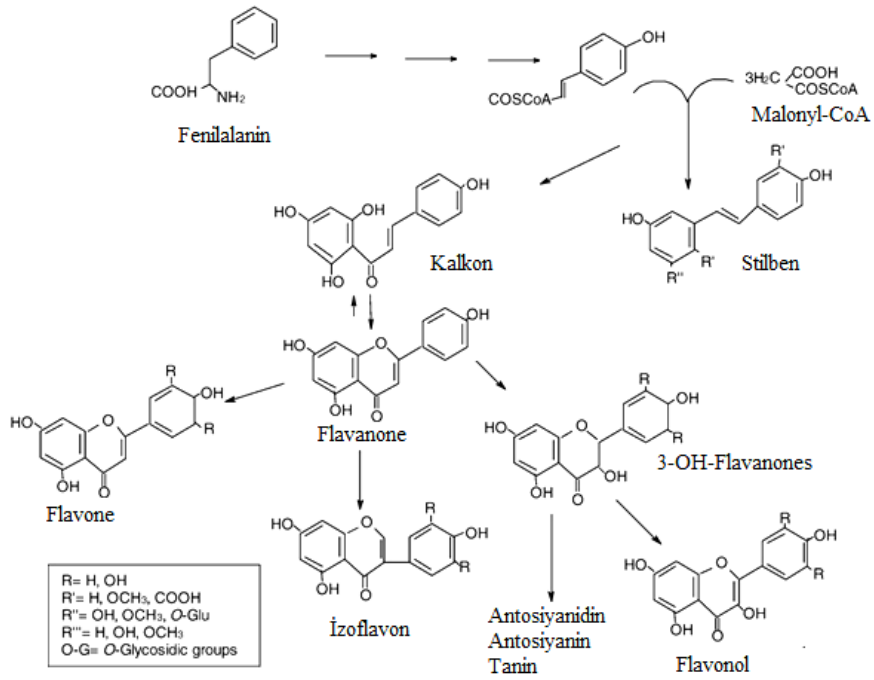
Bitki sekonder metabolitleri fenolikler, streoid ile terpenler ve alkaloidler olmak üzere üç büyük molekül grubuna ayrılmaktadır (Bourgaud ve ark., 2001). Yapılan başka bir sınıflandırmada yine üç gruba ayrılmış olup; terpenler, fenolikler ve N ve S içeren bileşikler olarak ifade edilmiştir (Mazid ve ark., 2011).

Terpenler sekonder metabolitlerin en büyük grubunu oluşturup yaygın olarak asetil CoA veya glikolitikler aracılığı ile sentezlenmektedir. Terpenler; monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, triterpenler ve polyterpenler olmak üzere beş alt gruba ayrılmıştır. Bu bileşiklerden en çok bilineni tohum ve tomurcuk dormansisinde ve bir çok fizyolojik olayda birinci derecede rol alan absisik asit (ABA) bir seskiterpendir. (Mazid ve ark., 2011). Kimyasal açıdan terpenler beş karbonlu bir hidrokarbon olan izopren (2-metil-1,3-butadien) yapıtaşından oluşan bileşiklerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Terpenlerin temel birimini oluşturan izopren'in yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir.



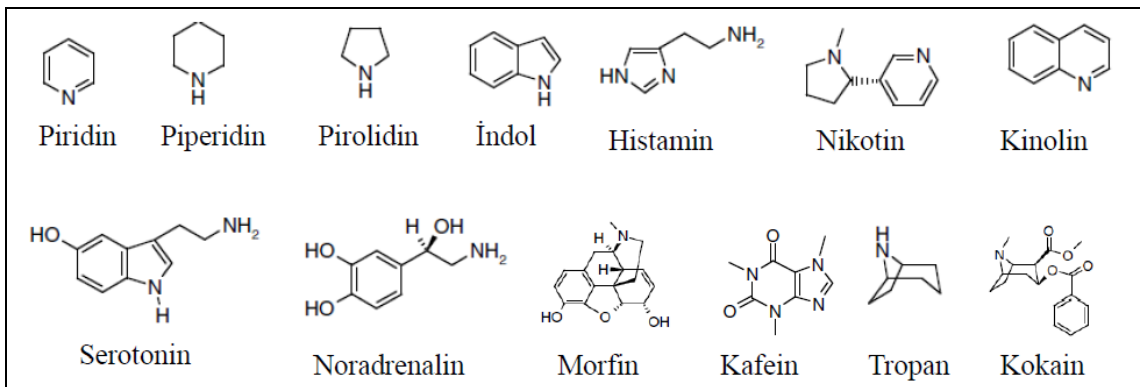
Şekil 2.2. Terpenlerin temel birimini oluşturan izoprenin yapısı (Anonim, 2013c)

Fenolik bileşikler bir aromatik halkaya direk olarak bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubunun bağlandığı bileşiklerdir (Vermerris ve Nicholson, 2006). Bitki fenolik bileşikleri fenilpropanoid, şikimat ve pentoz fosfat yollarından türetilen sekonder metabolitlerdir (Balasundram ve ark., 2006). Fenil propanoid yolu bitkilerde karbon akışı bakımından en önemli metabolik yollardan biridir. Bir bitki hücresinde toplam metabolizmanın % 20'sinden daha fazlası bu yol vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Verpoorte, 2000). Fenolik bileşikler; basit fenolikler, fenolik asit, sinamik asitler, kumarinler, flavonoidler, biflavoniller, betasiyaninler, ligninler ve taninler olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Flavonoid grubu bileşikler; kalkonlar, aurenler, flavoneller, antosiyanidinler ve antosiyaninlerden oluşmaktadır (Vermerris ve Nicholson, 2006). Flavonoidler bitkilerin meyve tohum, çiçek, yaprak ve gövde gibi çeşitli kısımlarında bulunan renkli maddeler olup antioksidan, diüretik, antidiyabetik, antikansoren gibi birçok etkiye sahiptir (Yağcı ve ark., 2008). Flavonoidlerin yapısı Şekil 2.3'de verilmiştir (Zhang ve Björn, 2009).



Şekil 2.3. Flavonoidlerin yapısı (Zhang ve Björn, 2009)

Nitrojen içeren sekonder metabolitler alkaloidler, siyonogenik glikozitler ve protein yapısına katılmayan amino asitlerden oluşmaktadır. Alkaloidler genellikle lizin, aspartik asit, tirozin ve triptofan gibi çok yaygın olmayan amino asitlerin birinden sentezlenmektedir. Bu bileşikler vasküler bitki türlerinin yaklaşık % 20'sinde bulunur. Çoğu alkaloidlerin toksik etkisinden dolayı predatörlere karşı bir savunma unsuru olabileceği düşünülmektedir (Mazid ve ark., 2011). Nitrojen içeren bazı önemli sekonder metabolitlerin yapıları Şekil 2.4'de verilmiştir (Briemann ve ark., 2006).



Şekil 2.4. Nitrojen içeren bazı sekonder metabolitler (Briemann ve ark., 2006)

2.3. Bitki Doku Kültürü Yöntemleriyle Sekonder Metabolit Üretimi

Bitki hücre kültürü; kozmetik, farmositik veya tarımsal açıdan değerli sekonder metabolitlerin üretimi için geleneksel ekim yöntemleri ve kimyasal yöntemlere alternatif cezbedici bir yöntemdir (Kieran ve ark., 1997; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Yağcı ve ark., 2008; Vijaya ve ark., 2010). Bitki hücre kültürü teknikleri 1960'ların sonlarından itibaren sekonder metabolitlerin hem üretilmesinde hem de bilimsel araştırmalarda bir araç olarak kullanılmaktadır. Söz konusu sistemlerde sekonder metabolit üretiminin geliştirilmesi amacıyla farklı stratejiler kullanarak yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Çalışmaların büyük çoğunluğu farklılaşmamış hücre kültürleri üzerine olsa da saçak kök kültürleri ve diğer organ kültürleri üzerine de yoğun bir ilgi gösterilmektedir. Son 30 yılda yapılan tüm uğraşlara rağmen değerli sekonder metabolitlerin bitki biyoteknolojisiyle üretiminde ticari anlamda başarı sınırlıdır. Başarının düşük olmasının nedenleri arasında sekonder metabolitlerin biyosentez yollarının tam olarak anlaşılamamış olması veya üretim basamaklarını biyoreaktör sistemine tam olarak adapte edilememesinden kaynaklanmaktadır (Bourgaud ve ark., 2001). Yüksek bitkilerin doku ve süspansiyon kültürlerinden elde edilen sekonder metabolit grupları Çizelge 2.2'de (Ramachandra ve Ravishankar, 2002) kültür tipi ve kaynak bitki Çizelge 2.3'de özetlenmiştir (Karuppusamy, 2009).

Çizelge 2.2. Yüksek bitkilerin doku ve süspansiyon kültürlerinden izole edilen sekonder metabolit grupları (Ramachandra ve Ravishankar, 2002)

Fenilproponoidler	Alkoloidler	Terpenoidler	Kinonlar	Streoidler
Antosiyaninler Kumarinler Flavonoidler Hidroksisinnamoil türevleri İsoflavonoidler Lignanlar Fenolenanlar Proantosiyanidinler Stilbenler Tanenler	Akridinler Betalainler Kinolizidinler Furonokinonlar Harritoninler İzokinolinler İndoller Pürinler Piridinler Tropan alkoloidler	Karotenler Monoterpenler Seskitерpenler Diterpenler Triterpenler	Antrokinonlar Benzokinonlar Naftokinonlar	Kardiyoaktif glikozitler Pregnenolon türevleri

Çizelge 2.3. Bitki doku kültürü yöntemleriyle üretilen bazı sekonder metabolitler ve elde edildikleri kültür tipleri (Karuppusamy, 2009)

Kültürü Yapılan Bitki	Metabolit	Kültür tipi
<i>Agave amaniensis</i>	Saponin	Kallus
<i>Anchusa officinalis</i>	Rosmarinik asit	Süspansiyon
<i>Artemisia annua</i>	Artemisin	Kallus
<i>Brucea javanica</i>	Alkoloidler	Süspansiyon
<i>Brugmansia candida</i>	Tropane	Saçak kök
<i>Capsicum annum</i>	Kapisasin	Kallus
<i>Catharanthus roseus</i>	Vincristine	Süspansiyon
<i>Catharanthus roseus</i>	İndol alkoloidleri	Süspansiyon
<i>Citrus sp.</i>	Limonin	Kallus
<i>Coffea arabica</i>	Kafein	Kallus
<i>Cinchona succirubra</i>	Antrokinon	Süspansiyon
<i>Coscinium fenestratum</i>	Berberine	Kallus
<i>Ephedra sp.</i>	L-Ephedrin	Süspansiyon
<i>Ginko biloba</i>	Ginkosid-A	Süspansiyon
<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Flavonoidler	Kallus
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Saponin	Saçak kök
<i>Hypericum perforatum</i>	Hypersin	Süspansiyon
<i>Hyssopus officinalis</i>	Sterol	Süspansiyon
<i>Linum flavum</i>	Lignan	Saçak kök
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shikonin	Saçak kök
<i>Mucuna pruriens</i>	L-Dopa	Süspansiyon
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nikotin	Süspansiyon
<i>Panax ginseng</i>	Saponin	Kallus
<i>Papaver somniferum</i>	Alkoloidler	Kallus
<i>Papaver somniferum</i>	Kodein	Saçak kök
<i>Piper solmsianum</i>	Piperine	Süspansiyon
<i>Pluchea lanceolata</i>	Quersitin	Kallus
<i>Portulaca grandiflora</i>	Betasiyanin	Kallus
<i>Rauvolfia serpentina</i>	Serpentin	Kallus
<i>Rheum ribes</i>	Kateşin	Kallus
<i>Rhodiola rosea</i>	Rosarin	Kallus
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Rosmarinik asit	Kallus
<i>Salvia officinalis</i>	Terpenoidler	Kallus
<i>Scutellaria columnae</i>	Fenolikler	Kallus
<i>Silybum marianum</i>	Silymarin	Saçak kök
<i>Solanum laciniatum</i>	Solasodine	Süspansiyon
<i>Taxus spp.</i>	Taxol	Süspansiyon
<i>Thalictrum minus</i>	Berberin	Süspansiyon
<i>Vinca major</i>	Vincamine	Saçak kök
<i>Vitis vinifera</i>	Antosiyanin	Süspansiyon
<i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol	Kallus
<i>Withania somnifera</i>	Withaferin	Saçak kök

Sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemlerle üretmenin pek çok açıdan avantajlı olduğunu bildiren çok sayıda yayın bulunmaktadır (Chattopadhyay ve ark., 2002; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Vanisree ve ark., 2004; Vijaya ve ark., 2010). Bu avantajlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- 1) Değerli bileşikler kontrollü şartlar altında iklim değişiklikleri ve toprak şartlarından bağımsız bir şekilde üretilebilmektedir.
- 2) Kültür ortamındaki hücreler mikrobiyolojik kontaminasyondan ve böcek saldırılarından uzak bir şekilde yetiştirilebilmektedir.
- 3) Tropikal veya yükseklerde yetişen herhangi bir bitkinin hücreleri kolaylıkla çoğaltılarak bu bitkiye has bileşikler üretilebilmektedir.
- 4) Hücre büyümesinin otomatik kontrolü ve metabolit süreçlerinin rasyonel düzenlenmesiyle üretkenlik artırılabilen ve iş gücü maliyeti azaltılabilmektedir.
- 5) Organik bileşikler kallus kültüründen kolayca ekstrakte edilebilmektedir.
- 6) Bu sistem zararlı herbisit ve pestisidlerin kullanıma gereksinim duymamaktadır.
- 7) Üretildiği ana bitkide normal olarak bulunmayan yeni bileşiklerin üretilmesine imkan sağlamaktadır.
- 8) Daha sabit kalitede ve verimde sürekli üretim imkanı sağlanabilmektedir.

2.4. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak için Geliştirilen Stratejiler

Bitki hücre kültür sisteminde ürün verimi ve kalitesini artırıp maliyeti azaltmak için stratejiler geliştirilmiştir (Yağcı ve ark., 2008). Bu sistemlerden yüksek miktarlarda ticari amaçlı ürün elde edilmesi kültür şartlarını optimize edilmesine, kültür ortamının hedef bileşiğe göre düzenlenmesine ve ilgili metabolik yolların iyi bilinmesine bağlıdır (Shilpa ve ark., 2010).

Bir çok kaynak tarafından ifade edilen bu stratejiler maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

- 1- Üretim gücü yüksek hücre hatların taranması ve seçilmesi arzu edilen bileşiği en yüksek seviyede elde etme imkanı sağlayabilmektedir. Hücre hattının geliştirilmesi

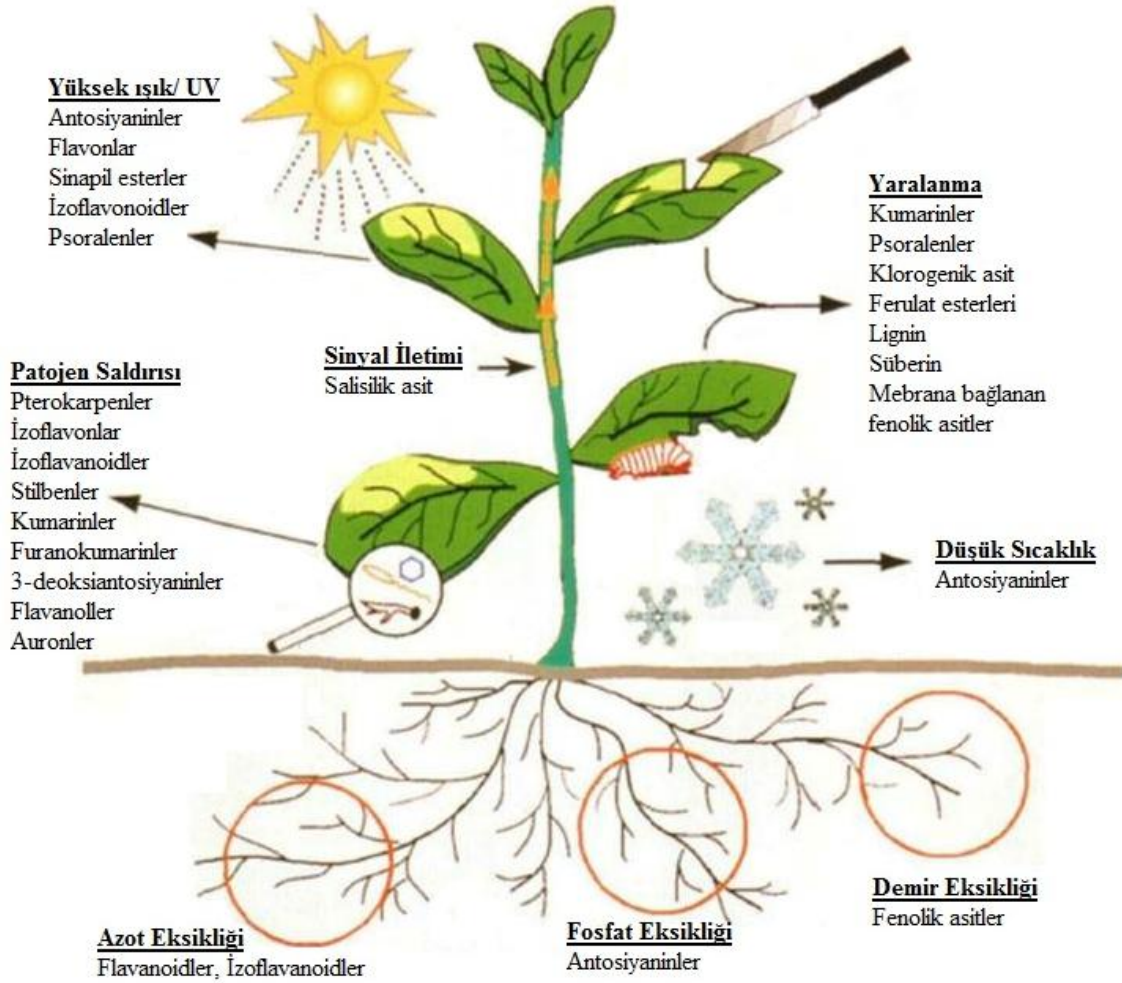
hedeflenen bileşimin yüksek miktarda üretildiği ana bitkinin seçimiyle başlar ve bundan elde edilecek kallus kültüründen yüksek verimli hücre hatlarının seçimiyle devam ettirilir. İstenilen bileşimin renkli bir pigment olması durumunda seçim kolaylıkla yapılabilmektedir. Örneğin *Lithospermum erythrorhizon* kültüründe şikonin üretiminde kırmızı renkli hücrelerin seçilmesiyle 13-20 kat daha fazla verim alınmıştır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Yağcı ve ark., 2008).

2- Kültürün oluşturulduğu besin ortamının standardizasyonu hem yüksek miktarda biyomas elde etme açısından hem de sekonder metabolit üretimi açısından önemli bir parametredir. Hücrelerdeki metabolit birikimi besin ortamının içeriği, dışarıdan uygulanan bitki hormonları ve kültür ortamının şartları tarafından düzenlenmektedir (Shilpa ve ark., 2010). Bitki doku ve hücre kültürlerinin gerçekleştirildiği besi ortamında bulunan her kimyasal büyüme ve sekonder metabolit üretimi için teşvik edici olabildiği gibi sınırlayıcı da olabilmektedir. Örneğin besi ortamında yer alan her hangi bir madde hücrelerin büyümesini teşvik ederken sekonder metabolit birikimini azaltabilmektedir. Kültür ortamında metabolit üretimini etkileyen başlıca kimyasal koşullar arasında karbon, azot ve fosfor kaynağı, bitki hormonlarının çeşidi ve derişimi, kültür ortamında bulunan makro ve mikro elementler, pH ve osmotik basınç sayılabilmektedir. Kültür ortamında metabolit üretimini etkileyen fiziksel koşullar ise ışık ve sıcaklıktır. Çalkalama ve havalandırma gibi fiziksel etmenler de hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme ve metabolit birikimini etkileyen diğer önemli faktörlerdir (Sökmen ve Gürel, 2001).

3- Öncül bileşiklerin besi ortamına ilave edilerek sekondor metabolit üretiminin artırılması yaygın şekilde başvurulmuş bir yaklaşımdır. Üretilmesi istenen metabolitin biyosentez mekanizmasının bilinmesi durumunda bu süreçte yer alan başlangıç veya ara ürünlerin kültür ortamına katılması metabolit üretimini artırabilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002)

4- Elisitör olarak tanımlanan mikrobiyal, fiziksel veya kimyasal stres faktörlerinin sekonder metabolizmada artışa yol açması bu metabolitlerin üretiminde bir strateji olarak kullanılabilir (Mulabagal ve Tsay, 2004; Shilpa ve ark., 2010). Daha öncede ifade edildiği gibi bitki sekonder metabolitleri çoğunlukla bitkileri çevresel stres faktörlerinden korumak için sentezlenmektedir. Bu nedenle bitki hücre kültürlerine ozmotik şok, ağır metal iyonlarının ilave edilmesi, inorganik tuzlar, mikrobiyal

homogenat veya UV radyasyonu gibi stres faktörlerinin uygulanması bazı sekonder metabolitlerin birikimini artırmaktadır (Verpoorte ve ark., 2002). Bitkilerde çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartlarında üretimi artan fenilpropanoid bileşikleri Şekil 2.5’de gösterilmiştir (Dixon ve Paiva, 1995)



Şekil 2.5. Çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartlarında üretimi artan fenilpropanoid bileşikleri (Dixon ve Paiva, 1995)

Elisitörler yapısına göre biyotik ve abiyotik olarak sınıflandırılırken kaynağına göre ise egzogen ve endojen olarak sınıflandırılmaktadır. Sekonder metabolitlerin üretimi için kullanılacak elisitörler Çizelge 2.4’de özetlenmiştir (Namdeo, 2007).

Çizelge 2.4. Sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılan elisitörler (Namdeo, 2007)

YAPISINA GÖRE ELİSİTÖRLER	
Biyotik Elisitörler	Abiyotik Elisitörler
-Doğrudan mikroorganizmalar tarafından salınan ve bitki hücrelerince tanınanlar (enzimler, hücre duvarı parçacıkları) -Mikroorganizmaların bitki hücre duvarındaki işlevi sonucu oluşanlar (pektin fragmentleri) -Mikroorganizma üzerinde bitki enzimlerinin işlev görmesiyle oluşanlar (kitosan, glukun) Çeşitli uyarıcı etkenlere yanıt olarak bitki hücreleri tarafından oluşturulan ve ortama salınan endojen ve her zaman doğada mevcut olan bileşikler	-Fiziksek ve kimyasal kaynaklıdır -UV ışığı -Denatüre proteinler (ribonükleaz) -Donma ve çözülme döngüleri -Gerekli olmayan ortam bileşenleri (agaroz) -Ağır metaller -Kimyasallar DNA'ya yüksek afiniteliler Membran yıkıcılar (deterjanlar) Fungusitler (butylamine) Herbisitler (acifluorofen)
KAYNAĞINA GÖRE ELİSİTÖRLER	
Egzojen Elisitörler	Endojen Elisitörler
Hücre dışı orjinlidirler -Polisakkaritler (glukomannoz, glukun, kitosan) -Peptitler (monilikolin, poli-L-lisin, poliamin, glikoproteinler) -Enzimler (selülaz) Yağ asitleri (araşdonik asit)	Hücrede biyotik veya abiyotik orijinli bir sinyalle teşvik edilen ikinci reaksiyonlar aracılığıyla oluşur. -Aljinat oligomerleri -Hepta-β-glukosidaz

5- Üretilmesi istenen hedef bileşiğin biyosentez yolundaki kilit gen veya genlerin aşırı ekspresyonu ile metabolit üretimi teşvik edilebilmektedir. Sekonder metabolitlerin biyosentez yolundaki genlerin klonlanmasında, transformasyonunda ve düzenlenmesinde oldukça ilerleme kaydedilmiştir. Bu tekniklerdeki ilerleme hedef bileşiğin biyosentezinin manipasyonu için olanak ve bilgi imkanı sağlamaktadır (Gaosheng ve Jingming, 2012). Örneğin tıbbi bir bitki olan *Saussurea involucre*'ın

içerdiği apigenin bileşiği tümörogenezi anlamlı şekilde inhibe ettiği bilinmektedir. Ancak bitkinin doğal yapısında düşük miktarda bulunan bu bileşiğin miktarını artırmak için flavonoid biyosentez yolunda transgenik yaklaşımla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bitkinin saçak kök kültürüne aktarılan *kalkon izomeras* geninin aşırı ekspresyonuyla kontrolden 12 kat daha fazla apigenin bileşiği elde edilmiştir (Li ve ark., 2006).

2.5. Bitkilerde Çeşitli Streslere Karşı Oluşan Sinyal Mekanizması

Bitkilerin strese (elisitör veya sinyal molekülleri) maruz kalması çok çeşitli sekonder metabolitlerin birikimine yol açmaktadır. Bu streslerle ilgili sinyal iletim yolunun incelenmesi hedef bileşiklerin ticari amaç için üretilmesinde strateji geliştirmeye (bazı metabolik yolların aktive edilmesiyle veya baskılanmasıyla) katkı sağlaması nedeniyle önemlidir. Bilindiği gibi biyotik bir elisitöre maruz kalan bitkiler genellikle bir dizi savunma veya stres yanıtı oluşturmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmaların çoğunluğu oluşan uyarıların ve sonrasında başlatılan savunma yanıtlarının tanımlanması üzerine odaklanmıştır. Bitkilerin çeşitli streslere karşı savunma sürecinde sinyal iletimi birincil olarak elisitöre maruz kalan hücre ile ilgilidir. Bu hücreler protein fosforilasyonu veya defosforilasyonu, iyon akışında değişimler ve oksidatif patlama gibi ilk sinyal olaylarını başlatmaktadır. Bu ilk sinyaller savunma ile ilgili genlerin (GST, PAL, CHS vb. gibi enzimlerin aktivasyonu ile ilgili) transkripsiyonel aktivasyonunu, içsel ikinci sinyallerin (salisilik asit, etilen, jasmonatlar) biyosentezini, NADPH oksidaz (O_2^- ve H_2O_2 gibi ROS türlerinin üretimine sebep olur)'ın aktivasyonunu ve savunma sinyalinden etkilenen hücrelerin redoks statüsünün değişmesini teşvik etmektedir. Bitkilerde herhangi bir elitasyon sürecinden sonra üretilen bu reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortadan kaldırılmasında faaliyet gösteren antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır (Şekil 2.6.). Antioksidan aktivitesinin inhibisyonu veya aktivasyonu oksidatif patlamanın oluşumuna ve sekonder metabolit birikiminin değişmesine neden olmaktadır (Shilpa ve ark., 2010).

Elisitörün hücresel reseptörle etkileşimi savunma genlerinin indüksiyonuna sebep olmaktadır. Bu birincil savunma yanıtlarının ortaya çıkarılmasına ek olarak elisitör

sinyalleri salisilik asit gibi ikincil bitki sinyal moleküllerinin üretilmesi yoluyla etkinliğini artırabilmektedir. Elisitörler ve içsel ikincil sinyaller genellikle bitkilerin savunması ve korunmasıyla ilgili çok çeşitli genleri aktive etmektedir. Bu genlerin ürünleri arasında glutatyon -S- transferaz (GST), peroksidaz, hücre duvar proteinleri, proteinaz inhibitörleri, hidrolitik enzimler, patogeneze ile ilgili proteinler (PR), fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve kalkon sentaz (CHS) yer almaktadır. Bunlara ilaveten G proteinleri, NADPH oksidaz, H_2O_2 , ikincil sinyaller ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) gibi sinyal bileşenleri bir çok bitki savunma yanıtına katıldığı belirlenmiştir (Şekil 2.7.) (Shilpa ve ark., 2010).

2.6. Ultraviyole Radyasyonunun (UV) ve Riboflavinin Sekonder Metabolit Üretimi Üzerine Etkisi

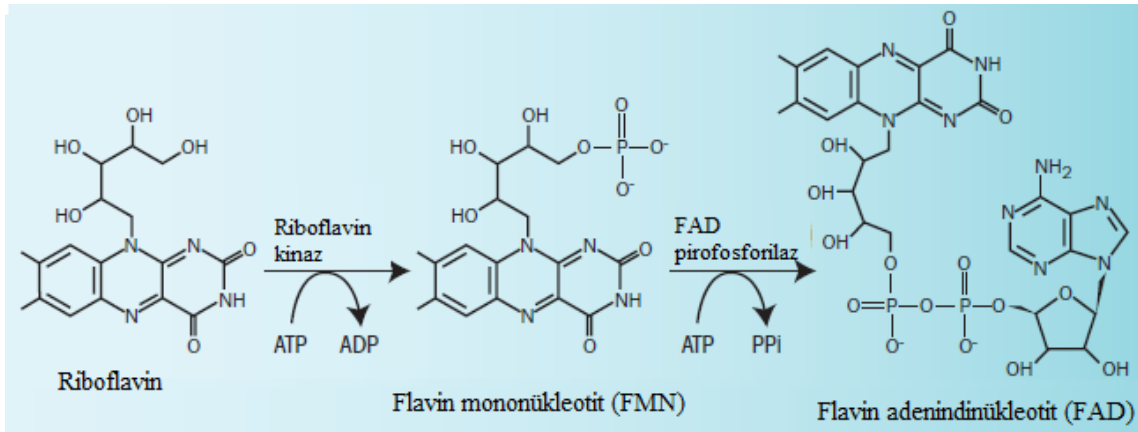
Ultraviyole radyasyon (UV) elektromanyetik spektrumun iyonize olmayan bölgesinin bir parçası olup toplam güneş radyasyonunun yaklaşık % 8-9 nu oluşturmaktadır. UV radyasyonu genel olarak dalga boyuna göre UV-A , UV-B ve UV-C olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. UV-A (320 - 400 nm) güneşten gelen radyasyonun yaklaşık % 6,3'lük kısmını oluşturmakta ve radyasyonunun en az tehlikeli bölümüdür. UV-B (280-320 nm) toplam spektrumun yaklaşık % 1,5'lik bölümünü oluşturmakta ve bitkilerde çok çeşitli zararlara sebep olmaktadır. UV-C (200-280 nm) organizmalarda en fazla zarara neden olan bölümü teşkil etmektedir (Khatami ve Ghanati, 2011).

UV radyasyonu nükleik asitler, amino asitler, proteinler, lipitler, bitki büyüme düzenleyicileri, pigmentler, membranlar ve fotosentez gibi bir çok faktör üzerinde olumsuz etkiye sahiptir (Hollósy, 2002). UV'ye maruz kalma ile ilgili olarak oluşan zararın büyük bir kısmı, serbest radikallerin ve diğer reaktif kimyasal türlerinin üretilmesinin indirek bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Grace, 2005). UV radyasyonuna maruz kalmayla meydana gelen aktif oksijen türevlerinin bu bileşiklerle reaksiyona girmesi sonucunda oluşan bozulmalar oksidatif strese yol açmaktadır. Bitkiler normal sağlıklı büyüme şartları altında bu aktif oksijen türlerini ve onların ikinci reaksiyon ürünlerini enzimatik veya enzimatik olmayan mekanizmalarla etkili şekilde ortadan kaldıra bilmektedirler (Mahdavian ve ark., 2008). Bitkiler enzimatik olmayan mekanizmada fenolikler, flavonoidler ve antosiyaninler gibi çok çeşitli UV absorplayan sekonder bileşikleri sentezleyerek UV ışığının zararlı etkilerinden korunmaktadır (Tsormpatsidis ve ark., 2008). Enzimatik mekanizmada ise antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak reaktif oksijen türlerini etkisizleştirmektedir (Ravindran ve ark., 2010).

Örneğin UV-B ve UV-C uygulanan biber yapraklarında prolin, quercetin, rutin ve antosiyanin miktarlarının artması bu ışınların olumsuz etkilerinden korunmayla doğrudan ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca fenolikler ve flavonoidler UV-B bandında absorbsiyon yapması bitkileri zararlı ışınların etkisinden korumada seçici bir UV-B filtresi olarak görev görmektedir (Mahdavian ve ark., 2008). Bunlara ilaveten UV-A ve UV-B antosiyanin biyosentez ile ilgili genlerinin indüksiyonuyla antosiyanin

birikimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Guo ve ark., 2008). Antosiyaninlerin görünür ışığın yanında UV radyasyonunu absorbe eden etkili antioksidanlar olup reaktif oksijen türlerini etkisizleştirdiği ifade edilmiştir (Quina ve ark., 2009). Yine yapılan benzer bir çalışmada UV-C uygulanan üzüm kalluslarında fenolik bileşikler ve karotenoit birikimi önemli ölçüde artmıştır (Çetin ve ark., 2011).

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen riboflavin (B₂ vitamini) pek çok fizyolojik reaksiyonda koenzim olarak fonksiyon göstermektedir (Saikia ve ark., 2006; Abdel-Monaim, 2011). Bitkiler ve diğer organizmalar riboflavinin biyosentezini gerçekleştirdikten sonra flavin mononükleotit (FMN) ve flavin adenin dinükleotit (FAD) olarak adlandırılan nükleotit türevlerine dönüştürmektedirler (Şekil 2.8). FMN ve FAD genellikle çeşitli proteinlere kofaktör olarak birleşmektedir. Bu flavinler elektronların taşınmasına aracılık etmekte ve redoks gerektiren mitokondrial elektron taşınımı, fotosentez, yağ asidi oksidasyonu, DNA tamiri ve çeşitli sekonder metabolitlerin biyosentezinde görev almaktadır (Higa ve ark., 2012). Riboflavinler ayrıca ışığın algılanması, biyoluminesans, jasmonat sinyal iletimi, sirkadiyen ve mevsimsel saat gibi hayati süreçlere katılmaktadır (Ouyang ve ark., 2010).



Şekil 2.8. Riboflavinden FMN ve FAD'ın sentezi (Anonim, 2008)

Riboflavinler aynı zamanda peroksidasyon ve antioksidan savunma süreçlerinde rol oynamaktadır. Çeşitli süreçler sonucunda oluşan reaktif oksijen ara bileşikleri oksidatif patlamaya sebep olması nedeniyle aşırı hassas bir yanıt oluşmaktadır. Bu süreçte riboflavin sistemik bir dirence öncülük ederek yeni bir sinyal yolu olarak davranmaktadır (Saikia ve ark., 2006). Riboflavin pek çok biyolojik sürece bitkilerde

savunma yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan ve hücresel bir sinyal olan H_2O_2 'nin üretilmesiyle aracılık etmektedir (Deng ve ark., 2011).

Tütün (*Nicotiana tabacum*) hücre süspansiyon kültüründe riboflavinin sekonder metabolizma ve savunma yanıtı üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada riboflavin bir seri savunma yanıtını teşvik etmesinin yanında sekonder metabolit birikimini de artırmıştır. Tütün hücrelerinde ribofilavin uygulandığında savunma yanıtı olarak oksidatif patlama, ekstrasellüler ortamın alkalizasyonu, savunmayla ilgili genlerin ifade edilmesi ve fenolik bileşiklerin birikimi gerçekleştiği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2010a). Nohut bitkisinde yapılan bir diğer çalışmada ise riboflavinin, fenoller ve patogeneze ile ilgili proteinlerin birikiminin teşvik ettiği ayrıca fenilalanin amonyum liyaz ve peroksidaz aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Saikia ve ark., 2006).

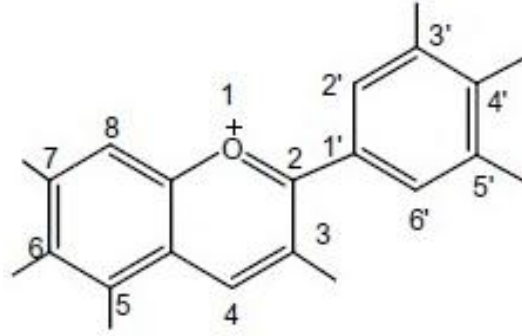
2.7. Antosiyaninler

2.7.1. Tanımı ve Çeşitleri

Antosiyaninler (Yunancada *anthos*: çiçek ve *kyanos*: mavi) klorofilden sonra gözle görülebilen en önemli pigment grubudur. Bunlar bitkilerin çiçek, meyve, yaprak ve depo organlarına kırmızıdan maviye kadar birçok rengi veren doğal bileşiklerdir. Başka bir ifadeyle antosiyaninler flavonoid grubuna ait C6-C3-C6 iskeletine sahip fenolik bileşiklerdir (Delgado-Vargas ve ark., 2000). Kimyasal açıdan ise, 2-fenilbenzopirilium'un (flavilium katyonu) polihidroksi ve polimetoksi türevlerinin glikozitleridir. Antosiyaninlerin temel kısmını antosiyanidin (aglikon) olarak adlandırılan flavilium katyonu oluşturmaktadır (Şekil 2.9) (Kong ve ark., 2003).

Antosiyaninler arasındaki farklar, antosiyanidin moleküldeki hidroksil (OH) ve metoksil (OCH_3) gruplarının sayısı ve pozisyonu, moleküle bağlanmış şekerlerin türü, sayısı ve bağlanma şekli ve bu şekerlere bağlanmış alifatik ve aromatik asitlerin yapı ve sayısı gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. Doğal olarak meydana gelen 17 antosiyanidin yapısı Çizelge 2.5'de verilmiştir. Bunlardan pelargonidin, siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin ve malvidin bitkilerde en yaygın olarak bulunan altı antosiyanidindir. Bu altı antosiyanidinin bitkilerin yenilebilir kısımlarındaki dağılımları incelendiğinde % 50 siyanidin, % 12 pelargonidin, % 12 peonidin, % 12 delfinidin, %

7 petunidin ve % 7 malvidinden oluştuğu belirlenmiştir (Kong ve ark., 2003; Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003).



Şekil 2.9. Antosiyaninlerin temel kısmını oluşturan antosiyanidin olarak adlandırılan flavylium katyonu (Kong ve ark., 2003)

Çizelge 2.5. Doğal olarak meydana gelen antosiyanidinler (Kong ve ark., 2003)

Adı	Kısaltma	3	5	6	7	3'	4'	5'	Renk
Apigeninidin	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu
Aurantininidin	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Turuncu
Capensininidin	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Mavimsi-Kırmızı
Cyanidin	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Delphinidin	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Mavimsi-Kırmızı
Eurupininidin	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Mavimsi-Kırmızı
Hirsutidin	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Mavimsi-Kırmızı
6-Hydroxycyanidin	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Kırmızı
Luteolinidin	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Turuncu
Malvinidin	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Mavimsi-Kırmızı
5-Methylcyanidin	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Pelargonidin	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Turuncu
Peonidin	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Petunidin	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Mavimsi-Kırmızı
Pulchellidin	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Mavimsi-Kırmızı
Rosininidin	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Kırmızı
Triceninidin	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Kırmızı

Not: OMe=OCH₃

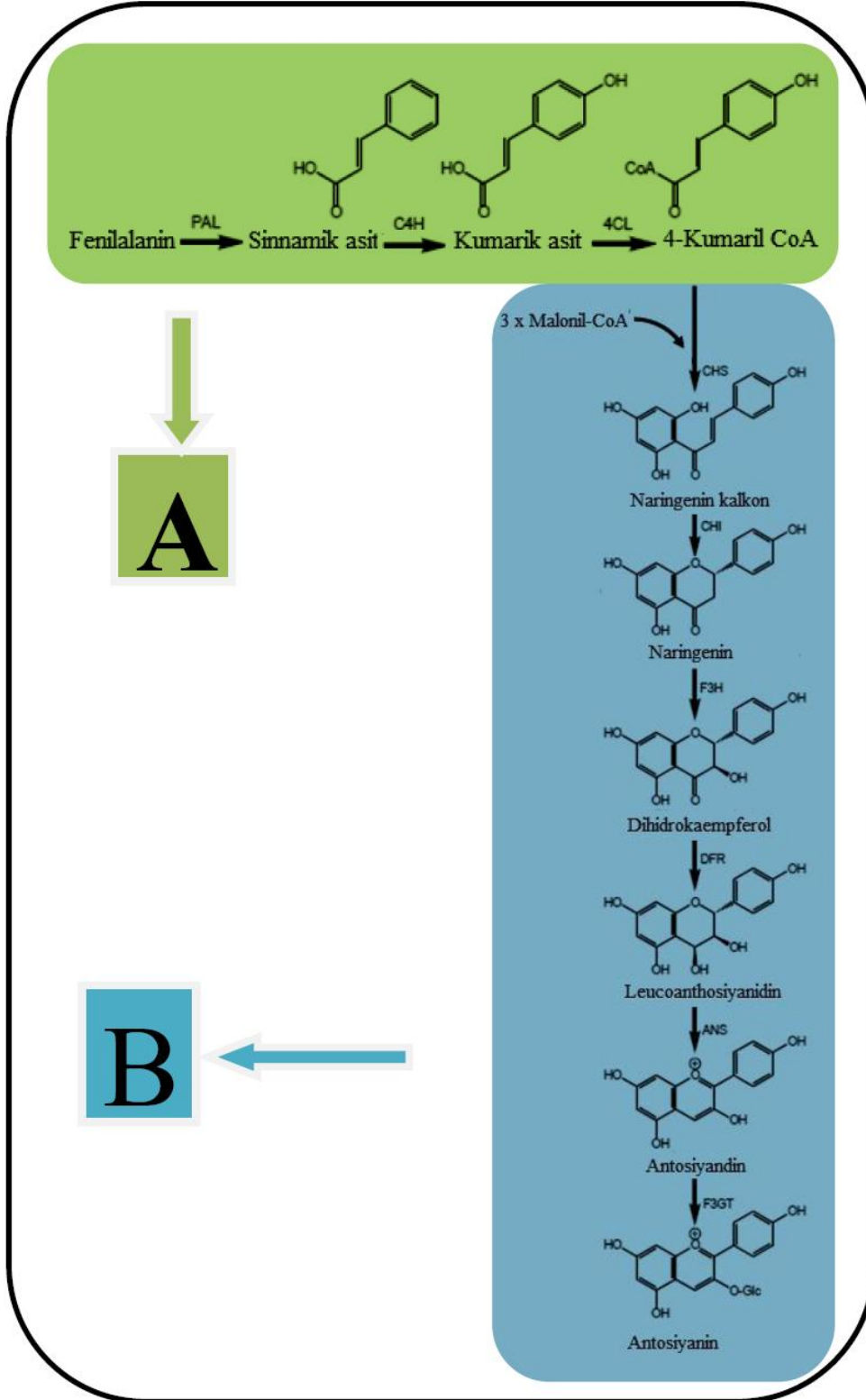
Antosiyaninlerin meydana gelmesi için antosiyanidinlere en az bir şeker molekülünün bağlanması gerekmektedir. Bu nedenle antosiyaninler şeker molekülünün sayısına (monozid, biozid, triozid vb. gibi) göre de sınıflandırılmaktadır (Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003). Antosiyanidinlere yaygın olarak bağlanan şekerler; glukoz,

galaktoz, ramnoz, ksiloz, fruktoz ve arabinozdur. Bu monosakkaritlerden oluşan di ve trisakkaritler de bazı antosiyanidinlerle glikozit yapmaktadırlar. Antosiyanidin glikozitlerinin en yaygınları, 3–monozidler, 3–biozidler, 3,5–diglikozidler ve 3,7–diglikozidlerdir. Bunlardan 3–glikozitler, doğada 3,5–diglikozidlerden yaklaşık 2.5 kat daha fazla bulunmaktadır. Bu nedenle siyanidin 3–glikozit en yaygın olarak bulunan antosiyanindir (Kong ve ark., 2003; Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003). Ayrıca şeker molekülüne kumarik, kafeik, ferulik, sinapik, p-hidroksibenzoik, malonik, okzalik, malik, süksinik ve asetik asit gibi asitler bağlanarak açıl antosiyaninleri meydana getirmektedir (Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003).

2.7.2. Antosiyaninlerin Biyosentezi

Antosiyaninlerin öncül bileşikleri glikolitik yolla (fosfoenol pirüvat) ve pentoz fosfat yoluyla (eritroz-4-fosfat/ kalvin döngüsü) üretilir. Bu yollarla üretilen şikimik asit ile asetat antosiyaninleri de içeren pek çok fenolik bileşiğin temel aromatik yapıtaşını oluşturur. Şikimat yolu ile kumarik, kafeik, ferrulik ve fenilalanin gibi birkaç organik asit sentezlenmektedir. Antosiyaninlerin biyosentez yolu temel olarak iki ana bölüme ayrılabilir. Bu yolun birinci aşamasında (Şekil 2.10 A) fenilpropanoid metabolizmasının öncülleri sentezlenirken, ikinci aşamasında (Şekil 2.10 B) spesifik flavonoidlerin sentezi gerçekleşmektedir. Antosiyanin sentezinin ilk aşamasında fenilalanin *p*-kumaril-CoA'ya üç enzim tarafından dönüştürülür. Bu enzimler fenilalanin amonyum liyaz (PAL), sinamat-4-hidroksilaz (C4H) ve 4-kumaril-CoA ligaz (4CL) dir. *p*-Kumaril-CoA flavonoid, lignin ve diğer fenilpropanoidlerin başlıca öncül bileşiğidir. Sentezin ikinci aşamasında flavonoid biyosentezinin anahtar enzimi olarak düşünülen kalkon sentaz (CHS) üç molekül malonil CoA ile 4-kumaril-CoA yı ara kalkon oluşturmak için katalizler. Bir sonraki aşamada kalkon; kalkon izomeraz (CHI) enzimi tarafından naringenine dönüştürülür. Naringenin flavonoid ve izoflavonoidlerin yaygın öncüsüdür. Naringenin bir dioksigenaz veya monooksigenaz tarafından dihidrokaempferol'e dönüştürülür. Bir sonraki basamakta dihidrokaempferol dihidroflavanol-4-redüktaz (DFR) enzimiyle leucoanthocyanidine dönüştürülür. Antosiyanidin sentaz (ANS) enzimi leucoanthocyanidinden renkli antosiyanidinleri meydana getirir. Antosiyaninlerin biyosentezi bir glikozillenme reaksiyonu

antosiyandinlerin antosiyaninlere dönüşümü gerçekleştirilir. Bu basamak için en iyi tanımlanan enzim 3-O-glikozil transferaz (GT) enzimidir. Flavanoit sentezinin çeşitli aşamalarında hidroksilasyon ve metilasyon meydana gelir. Antosiyaninlerin metilasyonu sentezinin son aşaması olup O- metiltransferaz (MT) enzimi bu aşamada önemli rol oynamaktadır (Delgado-Vargas ve ark., 2000; Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003).



Şekil 2.10. Antosiyanın biyosentez basamakları (Davies, 2009); PAL: fenilalanin amonyum liyaz, C4H: sinamat-4-hidroksilaz, 4CL: 4-kumaril-CoA ligaz, CHS: kalkon sentaz, CHI: kalkon izomeraz, DFR: dihidroflavanol-4-redüktaz, ANS: antosiyanidin sentaz, GT: 3-O-glikozil transferaz

2.7.3. Antosiyaninlerin Biyolojik Önemi ve Kullanım Alanları

Antosiyaninler ekolojik fonksiyonlarının yanında antioksidan olarak, yüksek seviyedeki ışığın olumsuz etkilerinden korumada ve savunma mekanizmalarında önemli role sahiptir (Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003). Antosiyaninlerin ekolojik önemi bitkilerin tozlaşması ve tohumlarının yayılması sürecinde hayvanları cezbe etmesinden ileri gelmektedir (Kong ve ark., 2003). Ayrıca yapraklardaki antosiyaninler fotosentez için kullanılabilir ışık miktarını artırırken ışık inhibisyonunu azaltmaktadır (Delgado-Vargas ve Paredes-López, 2003). Bunlara ilaveten antosiyaninler bitki dokularını görülebilir aşırı radyasyondan korumasının yanında ultraviyole (UV) radyasyonundan da koruyabilmektedir. Bir diğer önemli fonksiyonu ise çevresel stres faktörleri tarafından üretilen serbest radikallerin uzaklaştırılmasında rol almasıdır (Hatier ve Gould, 2009).

Antosiyaninlerin çekici kırmızı, turuncu ve mor renklerinin yanında suda çözünmeleri bu bileşiklerin doğal renklendirici olarak kullanım imkanı sağlamıştır (Bakowska-Barczak, 2005). Antosiyanin ekstraktlarının gıdalara yalnızca çekici renk özellikleri kazandırmadığı, aynı zamanda yüksek antiradikal kapasiteleri nedeniyle, eklendikleri gıdaların oksidatif stabilitelerini de arttırdığı ifade edilmiştir (Kırca, 2004).

Antosiyaninlerin doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılmasının yanında, yüksek antioksidan aktivitesi göstermesi nedeniyle de diyetle önemli bir yere sahiptir. Ayrıca kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği, koroner kalp rahatsızlıklarının oluşumunu engellediği, diyabet, nörolojik hastalıklar ve inflamasyonda etkili olduğu klinik olarak belirlenmiştir (Zhang ve Furusaki, 1999; Maharik ve ark., 2009).

2.7.4. Siyah Havuç Antosiyaninleri

Havuç maydanozgiller (Apiaceae) familyasından, koni biçimindeki etli kökü için sebze olarak yetiştirilen iki yıllık otsu bir kültür bitkisidir. Türkiye'de yörelere göre gelinparmağı, pürçüklü, balkamış, deper otu, yerebatan, yer otu, yerekağan, kızıl ot gibi değişik isimlerle adlandırılmaktadır (Anonim, 2013 a). Havuç kültürleri botaniksel olarak iki gruba ayrılmış olup, bunlar doğu veya antosiyanin (*Daucus carota ssp.*

sativus var. *atrorubens* Alef.) grubu ve batı veya karotenoid (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *sativus*) grubudur. Siyah havuç (antosiyenin grubu) çeşitleri batılı ülkelere çok bilinmese de, ana çeşit olarak kabul edilen turuncu havuç varyetelerinden çok daha eski olduğu ve Türkiye, Afganistan, Mısır, Pakistan ve Mısır gibi ülkelerde geleneksel olarak kültürü yapılmakta ve tüketilmektedir (Kammerer ve ark., 2004).

Siyah havuçta (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) siyanidin türevi beş temel antosiyenin pigmenti bulunmaktadır. Bunlardan iki tanesi açısız, üç tanesi açilli antosiyeninlerdir. Açısız antosiyeninler siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit ve siyanidin-3-ksilozil-galaktozit; diğer üçü ise sinapik, ferulik ve kumarik asitlerle açillenmiş siyanidin-3-ksilozil-glukozil-galaktozit'lerdir (Netzel ve ark., 2007; Montilla ve ark., 2011). Farklı siyah havuç varyetelerinde toplam antosiyenin içeriğinin % 55'ten % 99'a kadar olan kısmını açıl antosiyeninler oluşturmaktadır (Montilla ve ark., 2011).

Antosiyeninlerin renk ve stabiliteelerini etkileyen en önemli faktörler arasında antosiyenin yapısı, konsantrasyonu, kopigmentin varlığı ve kendi kendine birleşmesi sayılmaktadır. Bunlara ilaveten sıcaklık, ışık, pH, metalik iyonlar, enzimler, oksijen, askorbik asit, şeker ile şekerin yıkılma ürünleri, proteinler ve sülfürdioksit stabiliteyi etkileyen diğer önemli faktörlerdir (Ersus ve Yurdagel, 2007). Siyah havuç antosiyeninleri, gıda pH'sında yüksek renk stabilitesine sahiptir. Özellikle asidik pH'da mükemmel bir parlak çilek kırmızısı renk tonuna sahiptir. Bu yüzden siyah havuç suyu alkolsüz içecekler, meyve suyu ve nektarları, konserve, jöle ve şekerlemelerin renklendirmesinde iyi bir seçim olabilmektedir. Siyah havuç antosiyeninleri hem yapısı hemde açillenmeleri nedeniyle pH ve ısı değişmelerine karşı yüksek stabilite göstermektedir (Kırca ve ark., 2007).

Bunlara ilaveten siyah havuçtan elde edilen antosiyenin zengin ekstraktın insan kanser hücrelerin poliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği belirtilmiştir (Netzel ve ark., 2007).

2.7.5. Antosiyaninlerin Bitki Doku ve Hücre Kültürü Yöntemleriyle Üretimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Daucus carota (Havuç) bitkisinden elde edilen kallus kültüründe besin stresinin ve osmotik etmenlerin antosiyanin üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu bitkiden oluşturulan kalluslarda indol-3 asetik asit ve kinetinin etkisiyle kırmızı renkli pigment geliştiği ve maksimum antosiyanin veriminin kuru ağırlık bazında % 5,4 olduğu bildirilmiştir. Söz konusu kalluslar fosfat ve nitrat stresine maruz bırakıldığında antosiyanin içeriğinin sırasıyla % 7,2 ve % 8,5'e yükseldiği ifade edilmiştir. Ayrıca osmotik etmen olarak uygulanan mannitolun antosiyanin üretimi üzerine pozitif etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir (Rajendran ve ark., 1992). Söz konusu bitkiden oluşturulan hücre süspansiyon kültüründe yapılan farklı bir çalışmada antosiyanin sentezinin düzenlenmesi incelenmiştir. Bu araştırmanın sonucunda embriyogenezin oluşumuyla yani morfolojik farklılaşmayla antosiyanin sentezi yani metabolik farklılaşma arasında yakın bir ilişkinin olduğu ileri sürülmüştür. Antosiyanin indüksiyonu ve hücrelerin bölünmesi veya farklılaşmadan meydana gelen büyümenin 2,4-D ile değiştiği belirtilmiştir. Antosiyanin sentezinin 2,4-D aracılığıyla düzenlenmesinde fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve kalkon sentaz (CHS) aktivitelerinin anahtar bir rol oynadığı belirlenmiştir. PAL ve CHS genleri ve bunların transkripsiyonlarının detaylı olarak incelenmesi neticesinde havuçta iki tane PAL geni olduğu tespit edilmiştir. Bu genlerden bir tanesi stresle hızlıca aktive olup aktivitesi süreklilik arz etmezken, diğeri spesifik olarak 2,4-D ile düzenlenmekte ve antosiyanin sentezinde teşvik edilmektedir (Ozeki, 1996).

Daucus carota L. bitkisinden oluşturulan hücre kültüründe antosiyanin birikimine ve antosiyanin biyosenteziyle ilgili enzimlerin düzenlenmesine ultraviyole ışığın ve fungal elisitörün etkisi incelenmiştir. Söz konusu uygulamalar sürekli UV ışığıyla aydınlatma, karanlıkta bekletme, *Pythium aphanidermatum*'dan elde edilen elisitörün uygulanması ve UV ışığıyla aydınlatılan hücrelere elisitör uygulanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. UV uygulanması neticesinde antosiyanin birikimi ile fenilpropanoid ve flavonoid metabolik yolundaki enzimlerin aktivitesi güçlü şekilde artmıştır. Karanlıkta büyüyen havuç hücrelerine fungal elisitör uygulanması PAL'ın hızlı ve geçici indüksiyonuna neden olurken antosiyanin miktarında bir artış meydana getirmemiştir. UV ışığının

elisitörle birlikte uygulandığında fenilpropanaid yolunda hızlı bir artış meydana getirirse de, UV ışığının antosiyanin üzerine indükleyici etkisini ve antosiyanin biyosentezindeki enzimleri baskıladığı ifade edilmiştir (Gläbgen ve ark., (1998). Bu çalışmaların paralelinde söz konusu bitkiden oluşturulan hücre kültüründe ve kültürün başlatılmasında kullanılan eksplantın antosiyanin içeriği incelenmiştir. Hücre kültüründe siyanidin-3-latrosit (% 90) ve siyandin-3- β -D-glukopiranosit (%10) olmak üzere iki antosiyanin pigmenti izole edilirken, kallus kültürün başlatılmasında kullanılan eksplantta sadece siyanidin-3- latirosit bulunduğu belirtilmiştir (Narayan ve Venkataraman, 2000). Yapılan benzer bir araştırmada *Daucus carota* var. Nantes scarlet kallus kültürüne 0,05 mM putresin uygulanması antosiyanin miktarını kontrol grubuna göre 1,68 kat artırdığı belirtilmiştir (Sudha ve Ravishankar, 2003a). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada kallus kültürüne fungal elisitör uygulanması yüksek miktarda antosiyanin birikimine sebep olduğu ifade edilmiştir (Sudha ve Ravishankar (2003b).

Vitis vinifera (üzüm) hücre süspansiyon kültüründe antosiyanin biyosentezine jasmonik asit ve ışık uygulamanın etkisi incelenmiştir. En yüksek antosiyanin içeriği 20 μ M jasmonik asit uygulanan kültürden elde edilmiş ve elde edilen miktarın kontrol grubunun 8,5 katı olduğu bildirilmiştir. Işık uygulamanın etkisinin belirlenmesi amacıyla 8000-8300 lüks ışık altında kültüre alınan hücrelerde antosiyanin içeriği kontrole göre 4,8 bir artış meydana gelmiştir. Jasmonik asitin ve ışığın birlikte uygulanması durumunda antosiyanin içeriğinde kontrol grubuna göre 13,9 kat bir artış meydana gelmiştir (Zhang ve ark., 2002). Yapılan farklı bir çalışmada viskozite artırıcı bir madde olan karboksi metil selülozun antosiyanin birikimine etkisini *Vitis vinifera* cv. Bailey Alicant A. hücre kültüründe araştırılmıştır. Metabolit birikimini teşvik etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda karboksi metil selüloz kültüre ilave etmişlerdir. Araştırmanın sonucunda % 0,8'lik karboksi metil selüloz uygulanan kültürlerin antosiyanin içeriği kontrol grubuna göre 3 kat fazla olduğu ifade edilmiştir (Nagamori ve ark., 2001). Benzer bir çalışmada, Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine ait yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kalluslar hücre süspansiyon kültürünün oluşturulmasında kullanılmıştır. Oluşturulan hücre süspansiyon kültüründe sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla, aydınlık (10.000 lüks), kadmiyum sülfat (1,0 mM ve 1,5 mM), metil jasmonat (10 μ M) ve sakkaroz (0,20 M ve 0,25 M)

uygulanmıştır. Sekonder metabolit olarak antosiyanin, toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, *trans*-resveratrol ve tokoferol miktarları belirlenmiştir. Araştırmanın sonucunda farklı elisitör uygulamalarının genel olarak sekonder metabolit birikimini teşvik ettiği ifade edilmiştir (Çetin, 2010). Söz konusu bitkiden (*Vitis* sp.) oluşturulan hücre süspansiyon kültüründe fosfat eksikliğinin antosiyanin biyosentezi ve ilgili genlerin anlatımı üzerine etkisi incelenmiştir. Hem fosfat eksik (-Pi) hem de fosfat ilave edilen (+Pi) MS besi ortamındaki hücrelerde siyanidin-3-O-glikozit, peonidin-3-O-glikozit, siyanidin-3-O-(6-O-p-kumaril)-glikozit ve peonidin 3-O-(6-O"-p-kumaril)-glikozit belirlenmiştir. Antosiyanin birkimi fosfat eksik kültürün hücrelerinde çok daha önemli olduğu bildirilmiştir. Fenilalanin antosiyanine katılımı en yüksek posfat eksik (-Pi) ortamlardaki hücrelerde 3.-14. günler arasında elde edilmiştir. Hücreler – Pi ve +Pi besi ortamlarına aktarıldıktan sonra antosiyanin biyosentezinde görev alan enzimlerin genleri ile düzenleyici genlerin ifadesi zamana bağlı olarak incelenmiştir. *UFGT* ve *VvmybA1* genlerinin ifade seviyesi -Pi ortamındaki hücrelerde +Pi ortamındakilere göre daha yüksek olduğu ve bunun -Pi hücrelerindeki antosiyanin birikiminin başlangıcına denk geldiği ifade edilmiştir (Yin ve ark., 2012). Farklı bir çalışmada ise *Vitis vinifera* hücre süspansiyon kültüründe metil jasmonat (MeJA) ve kırmızı ışığın antosiyanin, kateşin ve stilben üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Kallus dokusu yaprak sapı eksplantlarından elde edilmiştir. Hücre süspansiyon kültürü 1 mg/ L BAP, 0,1 mg/L 2,4-D ve 10 g/L sukroz içeren MS besi ortamında gerçekleştirilmiştir. Kırmızı ışık ($1,34 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve 10 μM metil jasmonat süspansiyon kültürüne ayrı ayrı olarak veya birlikte uygulanmıştır. Toplam antosiyanin sentezi sadece kırmızı ışık uygulanan kültürlerde hafifçe azalmıştır. MeJA ve MeJA ile birlikte kırmızı ışık uygulandığında bu metabolitlerin seviyesi kontrole göre artmıştır (Tassoni ve ark., 2012).

Vitis vinifera hücre süspansiyon kültüründe yapılan bir diğer çalışmada antosiyanin ve resveratrol üretimine iki sentetik ve bir tane biyotik elisitörün etkisi incelenmiştir. Sentetik elisitör olarak indanol-izolösin (In-Ile) ve N-linolenol-L-glutamim (Lin-Gln) kullanılırken biyotik elisitör olarak böcek (*Manduca sexta* larvası) tükrüğü kullanılmıştır. Sentetik elisitör In-Ile ve böcek kaynaklı tükrüğün elisitör olarak kullanılmasıyla biyomas kaybı olmadan antosiyanin ve fenolik asitlerin üretimi teşvik edilmiştir. In-Ile uygulanan süspansiyon kültüründe antosiyanin üretimi 2,6 kat arttığı ifade edilmiştir (Cai ve ark., 2012a).

Çilek hücre süspansiyon kültüründe riboflavin ve sukroz konsantrasyonunun hücre büyümesi ve antosiyanin birikimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu araştırmanın neticesinde riboflavinin hücre büyümesini belirgin bir şekilde azaltırken antosiyanin içeriğini önemli ölçüde artırmıştır. En yüksek antosiyanin üretimi 4 mg/L riboflavin ve % 10 sukroz içeren besin ortamından elde edildiği bildirilmiştir (Mori ve Sakurai, 1995). Benzer bir çalışmada vişne (*Prunus cerasus*) kallus kültüründe ışığın ve jasmonik asidin antosiyanin üretimine etkisi incelenmiştir. Antosiyanin üreten kallus kültürü vişne yaprak dokusundan elde edilmiş ve baskın antosiyanin içeriğinin siyanidin-3-glikozit olduğu ifade edilmiştir. Karanlıkta büyütülen kalluslar ışığa maruz bırakıldığında siyanidin-3-glukozit içeriği 0,1 den 4,5 mg /100 g TA'a yükselmiştir. Ayrıca kültür ortamına 50 µM jasmonik asit ilave edilmesi siyanidin-3-glukozit sentezini uyardığı ifade edilmiştir (Blando ve ark., 2005). Yapılan bir diğer çalışmada *Catharanthus roseus*, *Celosia argentea* ve *Cordyline termnalis*'in internodyum eksplantları kullanılarak edilen kalluslarda antosiyanin üretimi incelenmiştir. Kallus oluşumuna MS besin ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki 2,4-D ile BAP veya NAA ile Kinetin'in etkisi araştırılmıştır. En yüksek kallus üretimi 1 mg/L 2,4-D ve 3 mg/L BAP içeren MS besi ortamında gerçekleşmiştir. Toplam antosiyanin üretimine L-fenilalanin (1, 3, 5 ve 10 µM) ve Ca^{++} (0,25, 0,5, 0,75 ve 1 µM)'nin etkisi incelenmiştir. L- fenilalanin ve Ca^{++} için optimum konsantrasyonun sırasıyla 3 µM ve 0.5 µM olduğu belirtilmiştir. En yüksek antosiyanin üretimi *Celosia argentea* kallus kültüründe 197,98 µg/KA olarak elde edildiği belirtilmiştir (Taha ve ark., 2008).

Crataegus sinaica B. gövde ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallus kültüründe antosiyanin üretimi incelenmiştir. Kallus kültürünün oluşturulmasında MS besi ortamına 2,4-D ile KIN (kinetin) veya NAA ile BA'nın farklı kombinasyonları ilave edilmiştir. Kullanılan her iki eksplant kaynağı içinde en iyi kallus gelişimi 1 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L KIN içeren MS besi ortamından elde edilmiştir. Gövde eksplantlarından elde edilen kallusların antosiyanin içeriği yapraktan elde edilenlere göre daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca antosiyanin üretimi uygulanan sitokinin çeşidine göre önemli ölçüde etkilenmiştir (Maharik ve ark., 2009). Yapılan farklı bir çalışmada *Cleome rosea* bitkisinde kallus kültürünün optimizasyonu ve antosiyanin üretimine çeşitli faktörlerin etkisi incelenmiştir. Kallus kültürü gövde ve yaprak eksplantlarının NAA (0,54; 1,07 µM), IAA (0,57; 1,14 µM), PIC (0,41; 0,82 µM) veya 2,4-D (0,45; 0,9 µM) içeren

MS besi ortamlarına aktarılmasıyla başlatılmıştır. En yüksek biyomas 0,9 μM 2,4-D içeren besi ortamında kültüre alınan gövde eksplantlarından elde edilmiştir. Kültür başlatıldıktan 6-7 ay sonra kallusların yüzeyinde antosiyanin olarak tanımlanan kırmızımsı-pembe bölgeler görülmüştür. Bu kalluslarda sıcaklık (24 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ ve 32 ± 2 $^{\circ}\text{C}$) ve ışık (67 ve 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) yoğunluğunun antosiyanin içeriği üzerine etkisi incelenmiştir. Antosiyanin üretimi sıcaklığın düşmesiyle ve ışık şiddetinin artmasıyla yükselmiştir. Bitki düzenleyicisi içermeyen veya 0,9 μM 2,4-D içeren besi ortamlarındaki kalluslara sukroz (30; 50; 70; 90 g L⁻¹), toplam nitrojen (50; 60; 70; 80 mM), NH₄⁺'ün NO₃⁻'e oranı (1:1, 1:2, 1:4, 1:6) ve mineral tuzların (MS 1/2; MS1/4) etkisi incelenmiştir. Pigmentli kalluslarda 70 g/L sukroz, 0,9 μM 2,4-D, 1:4 NH₄⁺/ NO₃⁻ ve 1/2 MS ortam şartlarında yüksek biyomas elde edilmesinin yanında antosiyanin üretimi başlangıç kültür koşullarına göre % 150 oranında arttığı ifade edilmiştir (Simões ve ark., 2009). Yapılan benzer bir çalışmada *Melastoma malabathricum* hücre süspansiyon kültüründe biyomas ve antosiyanin üretimine ışık şiddeti, sürekli ışıktaki veya karanlıkta bekletme, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerin etkisi incelenmiştir. Orta dereceli ışık şiddeti (301-600 lüks) hücrelerde antosiyaninin birikimini daha fazla teşvik etmiştir. Pigment içeriği 10 gün sürekli karanlıkta bekletilen kültürlerde en düşükken, 10 gün sürekli ışıktaki bekletilen kültürlerde en yüksek olduğu belirtilmiştir. Daha düşük sıcaklıkta (20 ± 2 $^{\circ}\text{C}$) inkübe edilen hücre kültürlerinin daha yüksek sıcaklıkta (26 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ ve 29 ± 2 $^{\circ}\text{C}$) inkübe edilenlere göre daha iyi geliştiği ve daha yüksek pigment içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Besi ortamının farklı pH dereceleri hücre biyomas verimini etkilemezken antosiyanin birikimi en yüksek pH 5,25 - 6,25 aralığında elde edilmiştir (Chan ve ark., 2010).

Mekanik stres uygulanan reyhan (*Ocimum basilicum*) hücre süspansiyon kültüründe rosmarik asit ve antosiyanin birikimi incelenmiştir. Kallus kültürünün oluşturulmasında kırmızı renkli kök-gövde geçiş bölgesi eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kallusların büyütülmesi Gamborg'un B5 ortamına % 2 sukroz, 0,5 mg/L 2,4-D ve % 0,7 agar ilave edilerek hazırlanan katı besin ortamında gerçekleştirilmiştir. Antosiyanin üretimini artırmak ve kolay dağılabilir kallus hücre hattı elde etmek için kırmızı hücreler her alt kültürde seçilmiştir. Uzun süreli stabil antosiyanin üreten hücre hatlarını elde etmek için kalluslar karanlık ortama aktarılarak burada alt kültüre alınmıştır. Süspansiyon kültürü bu ortam şartları altında üretilen kallusların aynı B5 sıvı besi

ortamında ve 90 rpm'deki çalkalayıcıda kültüre alınmasıyla başlatılmıştır. Mekanik stresin karanlık ve ışıklı ortam şartlarında antosiyanin ve rosmarik asidin birikimine etkisini belirlemek için çalkalama hızı 90 rpm'den 150 rpm'e yükseltilmiştir. Bu araştırmanın sonucunda mekanik stresin antosiyanin ve rosmarik asit içeriğini artırırken biyomas birikimini azalttığı belirtilmiştir (Strazzer ve ark., 2011). *Malva neglecta*'nın yaprak eksplantlarından elde edilen kallus kültüründe UV-B ve UV-C'nin UV absorbe eden bileşikler (antosiyanin, flavonoid ve taninler) üzerine etkisi incelenmiştir. Kalluslar 144, 288, 432, 576, 720, 864, 1296 ve 1728 j/m² dozlarda UV-B'ye maruz bırakılırken 204, 408, 612, 816, 1020, 1284, 1836 ve 2448 j/m² dozlarda UV-C'ye maruz bırakılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda antosiyanin ve flavonoidlerin kontrole göre anlamlı şekilde arttığı belirtilmiştir (Khatami ve Ghanati, 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada kullanılan siyah havuç bitkisinin tohumları ticari amaçlı tohum üreten bir firmadan temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Siyah havuç bitkisi (Anonim, 2013b)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalkalayıcı	IKA KS
Fotoğraf makinası	Samsung
Hassas terazi	Scaltec
Laminer kabin	Nüve
Lüksmetre	T-ECHINI-C
Magnetik karıştırıcı	Heidolph-MR

Otoklav	ALP
Otomatik pipet	Ephendorf
pH metre	Hanna
Santrifüj	Hettich
Spektrofotometre	Jasco V-530 UV/VIS

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)	Sigma
Benzil amino pürin	Sigma
Etanol	Merck
HCl	Merck
İndol asetik asit	Sigma
Kinetin	Sigma
Metanol	Merck
MS	Sigma
Naftalen asetik asit	Merck
NaOH	Merck
Phytigel	Sigma
Riboflavin	Sigma
Sukroz Grade I	Sigma
Twenn 20	Sigma-Aldrich

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi ve Steril Fidelerin Elde Edilmesi

Deneyde kullanılan bitkiler steril şartlarda çimlendirilen tohumlardan yetiştirilmiştir. Tohumların çimlendirilmesinde ve steril fidelerin yetiştirilmesinde kullanılan besiyeri 4,4 g/L MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel besi ortamına 30 g/L sukroz ve 2 g/L phytigel (katılaştırıcı) ilave edilerek hazırlanmıştır. Besiyerinin pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 121°C, 1,2 atmosfer basınçta 20 dakika

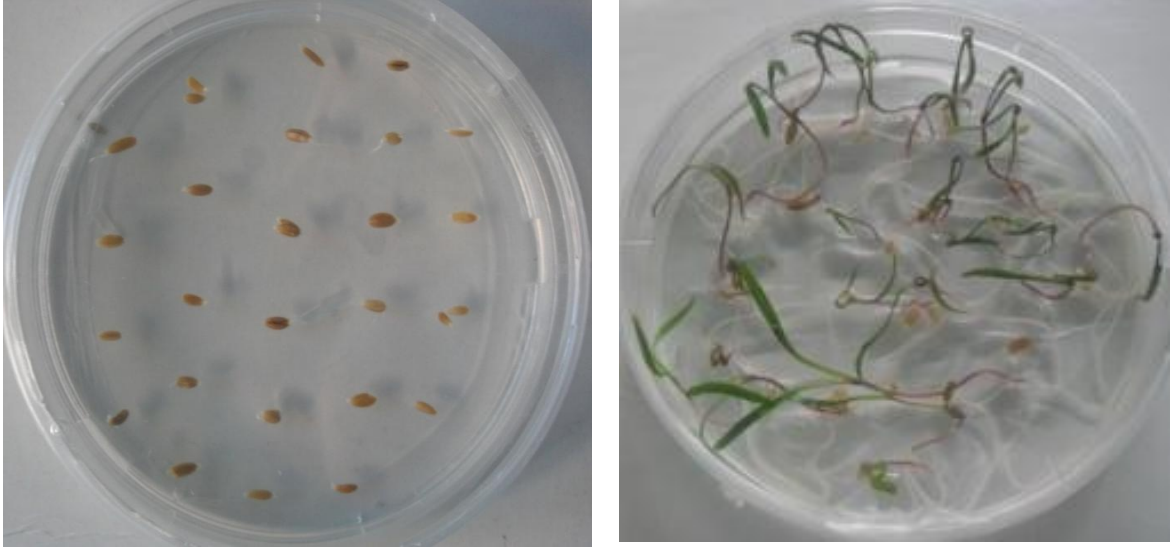
otoklav edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri 50-60 °C' ye kadar soğutulup 9 cm çaplı petrilere 25 ml ve 8 cm çaplı cam kavanozlara (14 cm boyunda) 50 ml olacak şekilde dökülmüştür. Besiyerlerinin katılaşması gerçekleştikten sonra ağzları parafilmle kapatılmıştır. Gerek bitkilerin yetiştirilmesinde gerekse kallus ve hücre süspansiyon kültürü çalışmalarında kullanılan MS besi ortamının içeriği Çizelge 3.1 verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS temel besi ortamı (Murashige ve Skoog, 1962)

İçerik	mg/L
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,025
myo-inositol	100
Thiamin- HCl	0,1
Nikotinik asit	0,5
Pridoksin HCl	0,5
Na ₂ EDTA	37,30
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80
Glisin	2

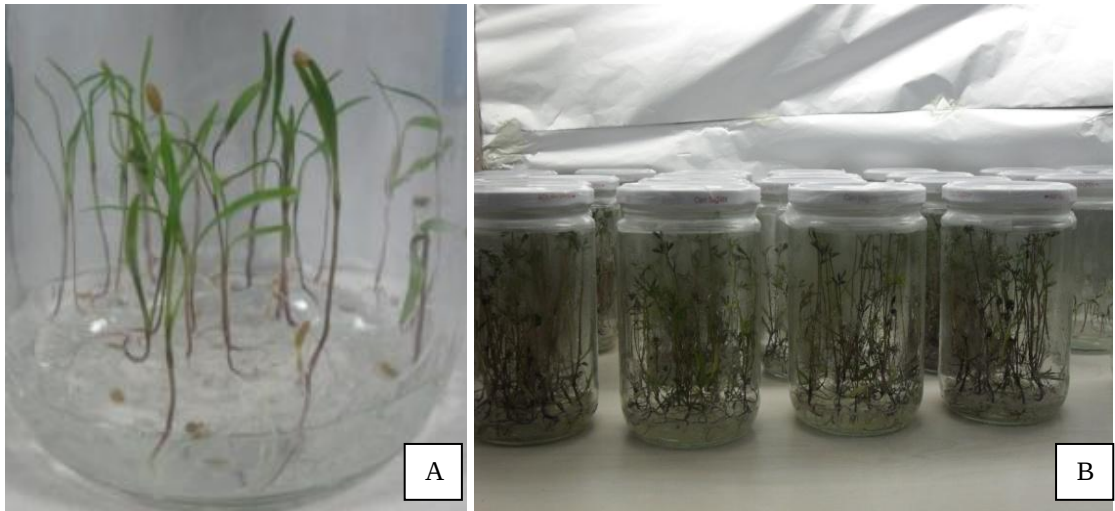
Steril bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılan tohumlar çimlendirilmeden önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Tohumlarının yüzey sterilizasyonu % 70'lik etil alkol içerisine iki dakika karıştırılarak başlatılmıştır. Bu sürenin sonunda etil alkol süzülerek tohumlardan uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki aşamada tohumlar 2-3 damla twenn 20 içeren % 2'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla 25 dakika boyunca hafifçe karıştırılmıştır. Son olarak da kullanılan sodyum hipokloritin uzaklaştırılması için tohumlar üç kez beşer dakika steril su ile durulanmıştır. Tüm bu çalışmalar steril şartlarda laminar kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Yukarıda açıklandığı şekilde steril edilen tohumlar besi ortamı içeren petri kaplarına 20-25 adet olacak şekilde ekilerek karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. Petri kaplarının kenarları kontaminasyonu ve su kaybını önlemek için parafilm ile sarılmıştır. Karanlık ortamda 7-10 gün bekletilerek çimlenmesi sağlanan tohumlar aydınlık ortama çıkarılarak (2-3 gün) fide gelişimi sağlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Siyah havuç tohumlarının çimlendirilmesi ve fide yetiştirilmesi

Petri kaplarında gelişimi iyi olan fideler seçilerek pens yardımıyla kavanozlara aktarılmıştır. Söz konusu fideler 25 ± 2 °C' sıcaklık, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta yetiştirilmiştir. Cam kavanoza aktarılan fideler ve bir aylık bitkiler Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Steril şartlarda yetiştirilen fideler (A) ve bir aylık bitkiler (B)

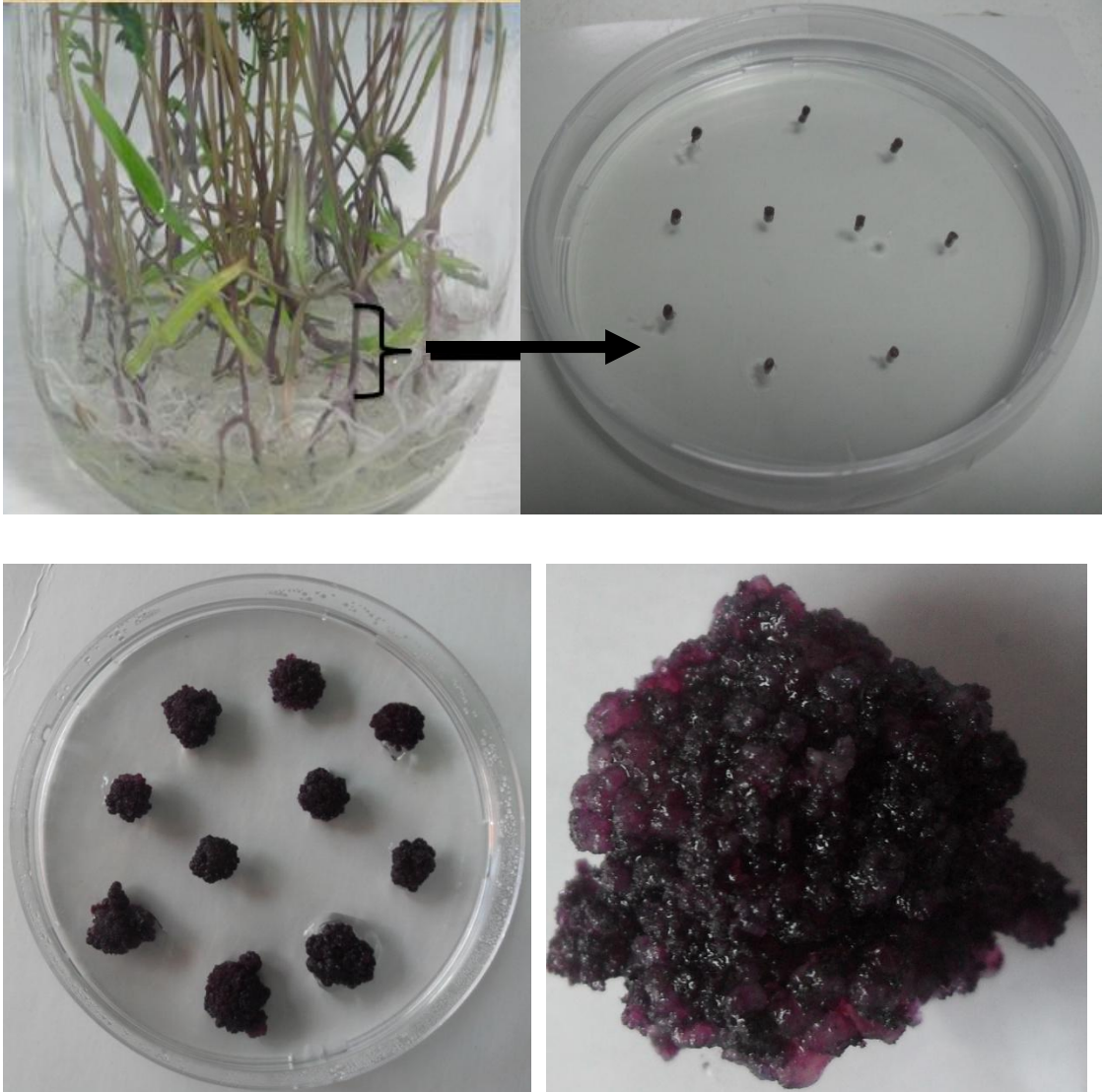
3.2.2. Kallus Kültürünün Oluşturulması

Kallus kültürünün oluşturulmasında steril şartlarda yetiştirilen bir aylık bitkilerin hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Hipokotiller kallus oluşumunun en iyi olduğu besi ortam şartlarının belirlenmesi amacıyla 18 farklı ortamda kültüre alınmıştır. Kültürünün oluşturulmasında kullanılan besin ortamı, tohumların çimlenmesinde ve steril bitkilerin elde edilmesinde kullanılan besin ortamından farklı olarak bitki büyüme düzenleyicilerini içermektedir. Kallus kültürünün oluşturulmasında 4,4 g/L temel MS besin ortamına 2 g/L phytagel, 30 g/L sukroz, farklı miktar ve kombinasyonlarda sitokinin (Kinetin ve BAP) grubu iki hormon ile oksin (IAA, NAA ve 2,4-D) grubu üç hormon ilave edilmiştir. Oksin grubu hormonlar 1, 2 ve 3 mg/L olmak üzere üç farklı miktarda uygulanırken, sitokinin grubu hormonlar 0,2 mg/ olmak üzere tek miktarda uygulanmıştır. Besiyerinin pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 121°C, 1.2 atmosfer basınçta 20 dakika otoklav edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri 50-60 °C' ye kadar soğutulup 9 cm çaplı petrilere 25 ml olacak şekilde dökülmüştür. MS besi ortamına eklenen hormon çeşidi ve miktarları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Kallus kültürünün oluşturulmasında kullanılan besin ortamına ilave edilen hormon çeşidi ve miktarları

Uygulama No	Oksin Grubu Hormon		Sitokinin Grubu Hormon	
	Çeşidi	Miktarı (mg/L)	Çeşidi	Miktarı (mg/L)
1	2,4D	1	Kinetin	0,2
2	2,4D	1	BAP	0,2
3	2,4D	2	Kinetin	0,2
4	2,4D	2	BAP	0,2
5	2,4D	3	Kinetin	0,2
6	2,4D	3	BAP	0,2
7	NAA	1	Kinetin	0,2
8	NAA	1	BAP	0,2
9	NAA	2	Kinetin	0,2
10	NAA	2	BAP	0,2
11	NAA	3	Kinetin	0,2
12	NAA	3	BAP	0,2
13	IAA	1	Kinetin	0,2
14	IAA	1	BAP	0,2
15	IAA	2	Kinetin	0,2
16	IAA	2	BAP	0,2
17	IAA	3	Kinetin	0,2
18	IAA	3	BAP	0,2
Kontrol	Hormon ilave edilmemiştir.			

Hipokotiller yaklaşık 0,3 cm boyunda kesilerek Çizelge 3.2’de içerikleri verilen 18 farklı besi ortamına dikey şekilde ekilmiştir (Şekil 3.4). Her bir uygulama için üç petri ve her petride 10 adet eksplant kültüre alınmıştır. Petriler 25 ± 2 °C’ sıcaklık, 2500 lüks ışık şiddeti, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta kallus oluşumu için inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan kalluslar aynı içerikli taze besi ortamlarına 2 hafta arayla alt kültüre alınmıştır. Söz konusu ortamlarda 45 gün inkübasyona bırakılan eksplantlardan kallus oluşumunu, oluşan kallusların ağırlıklarını ve antosiyanin içeriklerini belirlemek amacıyla hasat edilmiştir.

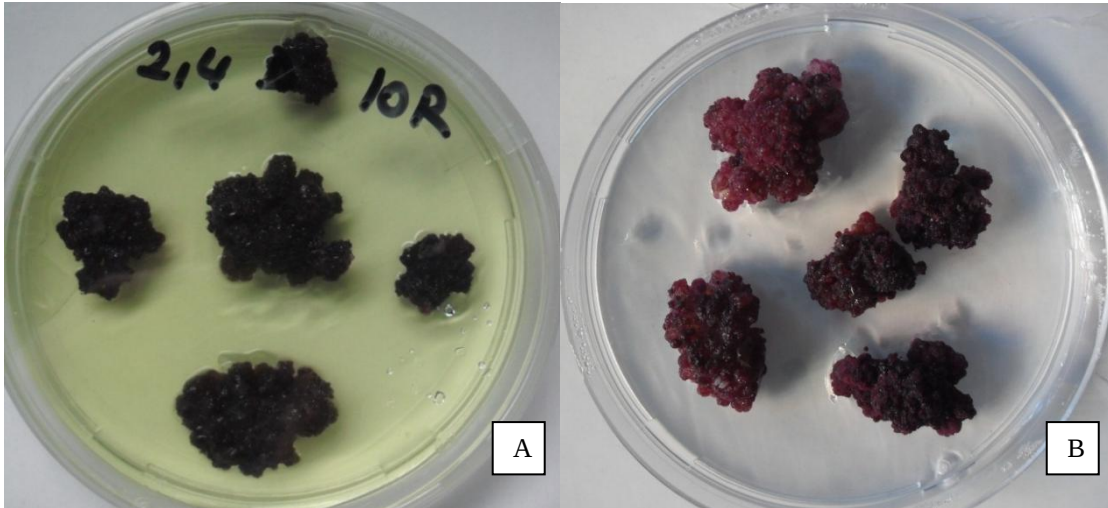


Şekil 3.4. Eksplant kaynağı olarak kullanılan hipokotil kısımlarının besi ortamına aktarımı ve elde edilen kalluslar

Kallus oluşumunun en iyi olduğu ortam şartlarının belirlenmesi amacıyla eksplantlar 18 farklı ortamda (Çizelge 3.2) kültüre alınmıştır. Söz konusu ortamlardan elde edilen veriler (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2) incelendiğinde denemeler için en uygun kallusların 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren besi ortamında oluştuğu belirlenmiştir. Bu ortamda kültüre alınan eksplantların kallus oluşturma oranları ile oluşan kallusların ağırlık ve antosiyanin içerikleri oldukça yüksektir. Ayrıca bu ortamdan elde edilen kallusların kolay parçalanabilir özellikte olması süspansiyon kültürünün oluşturulmasına da imkan sağlamaktadır. Bu nedenlerle kallus kültürüne riboflavin ve UV-C uygulanmasında kullanılan kalluslar bu ortam şartlarında oluşturulmuştur.

3.2.3. Kallus Kültürüne Riboflavin Uygulanması

Kallus kültürüne riboflavin uygulanmasında 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besi ortamında oluşan 45 günlük kalluslardan gelişimleri iyi olanlar seçilerek kullanılmıştır. Bu amaçla kalluslar 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/L riboflavin içeren besi ortamlarında (elde edildikleri besi ortamına ek olarak) alt kültüre alınmıştır (Şekil 3.5). Bu uygulamalarda her bir konsantrasyon için üç petri ve her petride beş adet kallus bulunmaktadır. Kalluslara riboflavin 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta 10 gün boyunca uygulanmıştır.

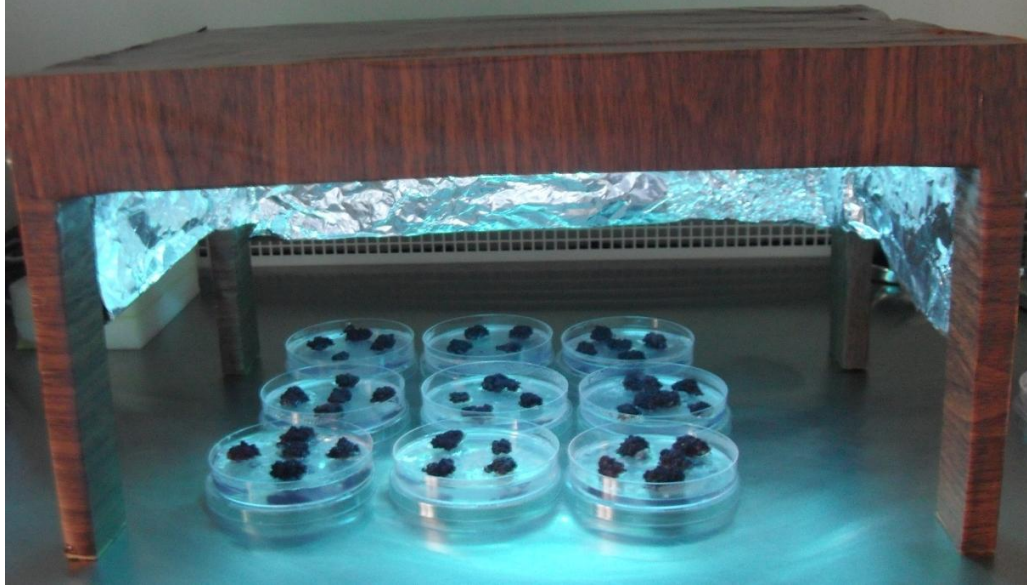


Şekil 3.5. Riboflavin içeren besi ortamına alt kültüre alınmış kalluslar (A) ve kontrol grubu kalluslar (B)

3.2.4. Kallus Kültürüne UV-C Uygulanması

Kallus kültürüne UV-C uygulaması 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besin ortamında oluşturulan 45 günlük kalluslara Keskin ve Kunter (2007)'in belirttiğinde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kalluslara UV-C ışığı 10 cm mesafeden günlük 10 dakika ve 15 dakika olmak üzere iki farklı sürede laminar kabin içerisinde uygulanmıştır (Şekil 3.6). UV-C ışığı uygulamalarında petri kapaklarının ağzı açılarak kallusların ışıkla direk teması sağlanmıştır. Işık kaynağı olarak 254 nm dalga boyuna sahip Philips TUV 6W'lık (G6 T5) bir lamba kullanılmıştır. Bu uygulamada

her bir süre için üç petri ve her petride beş adet kallus bulunmaktadır. Kalluslara UV-C ışığı 10 gün süreyle uygulanmıştır. Günlük UV-C uygulamalarının sonunda kalluslar 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta inkübe edilmiştir.



Şekil 3.6. Kalluslara UV-C ışığı uygulamasında kullanılan sistem

3.2.5. Hücre Süspansiyon Kültürünün Oluşturulması

Hücre süspansiyon kültürünün oluşturulmasında 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren besi ortamından elde edilen yumuşak ve kolay dağılabilen özellikteki 30 günlük kalluslar başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Süspansiyon kültürlerinde kullanılan besi ortamı 4,4 g/L MS, 2 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L BAP ve 30 g/L sukrozdan oluşmaktadır. Besiyerin pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 100 ml'lik erlenmayerlere 40 ml olacak şekilde bölünmüş ve 121°C, 1,2 atmosfer basınçta 20 dakika otoklav edilmiştir.

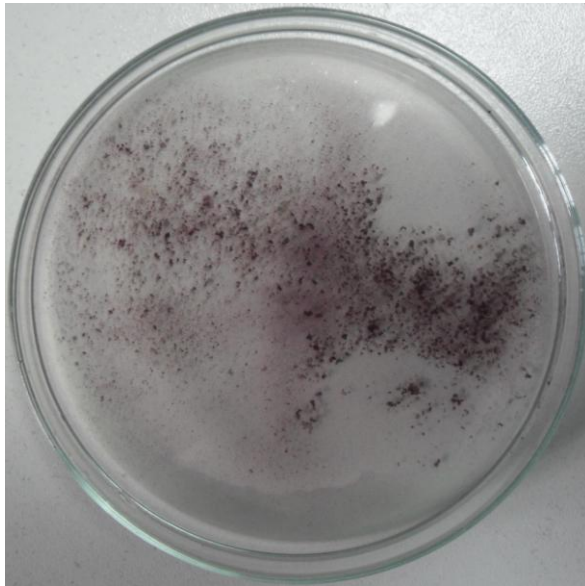
Hücre süspansiyon kültürü 1,2 g kallus numunelerinin steril bir petri kabı içerisinde spatula yardımıyla küçük parçalara ayırarak 40 ml besi ortamı içeren 100 ml'lik erlenmayerlerde kültüre alınmasıyla oluşturulmuştur. Erlenmayerler 120 devir/dakika hıza sahip çalkalayıcı üzerinde 25 ± 2 °C sıcaklıkta, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık foto periyotta ve 2500 lüks ışık şiddetinde inkübe edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Hücre süspansiyon kültürünün oluşturulması

3.2.6. Süspansiyon Kültüründeki Hücrelerin Çoğalma Eğrisinin Oluşturulması

Süspansiyon kültüründeki hücrelerin çoğalma eğrileri Gürel ve ark., (2002) belirttiği şekilde paketlenmiş hücre hacmi (PHH) ölçülerek oluşturulmuştur. Steril şartlar altında hücre süspansiyonunun bulunduğu sıvı ortamından üçer gün arayla 10 ml alınarak 200 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında çöken peletin hacmi yüzde olarak hesaplanmıştır. Paketlenmiş hücre hacminin belirlenmesi amacıyla kültür ortamından alınan hücrelerin petri kabındaki görüntüsü Şekil 3.8 de verilmiştir.



Şekil 3.8. Paketlenmiş hücre hacminin belirlenmesinde kültür ortamından alınan hücrelerin petri kabındaki görüntüsü

3.2.7. Hücre Süspansiyon Kültürüne Riboflavin Uygulanması

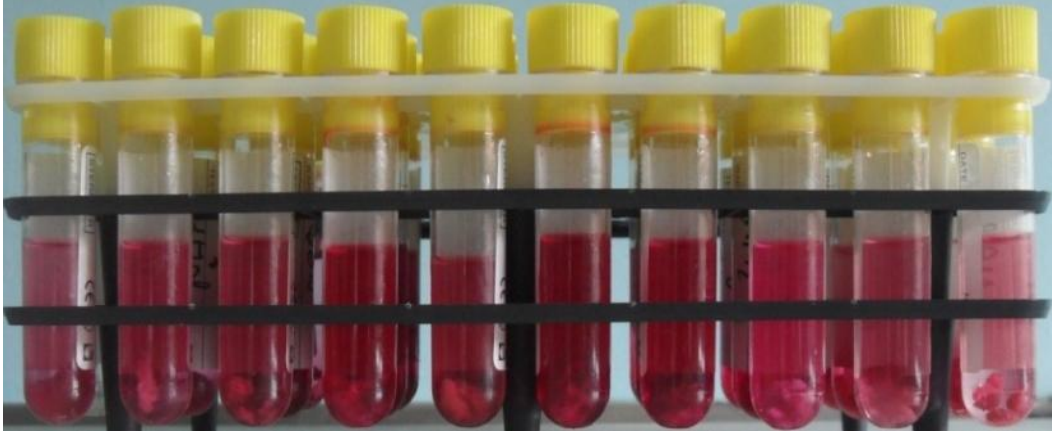
Hücre süspansiyon kültürüne riboflavin uygulaması paketlenmiş hücre hacmindeki artışın yavaşlamaya başladığı 15. günde ve kallus kültüründeki uygulamalar neticesinde antosiyanin içeriğindeki artışın en fazla olduğu konsantrasyonda dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamına steril şartlar altında 4 mg/L riboflavin ilave edilerek 10 gün süreyle aynı ortam şartlarında inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hasat edilerek antosiyanin analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Hücre Süspansiyon Kültürüne UV-C Uygulanması

Hücre süspansiyon kültürüne UV-C uygulaması paketlenmiş hücre hacmindeki artışın yavaşlamaya başladığı 15. günde ve kallus kültüründeki uygulamalar neticesinde antosiyanin içeriğindeki artışın en fazla olduğu sürede dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. UV-C ışığı 10 cm mesafeden günlük 15 dakika olmak üzere 10 gün boyunca uygulanmıştır. UV-C ışık kaynağı olarak Philips TUV 6W'lık (G6 T5) bir lamba kullanılmıştır. UV-C uygulamasından sonra süspansiyon kültürleri 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyoda alınmıştır. Bu sürenin sonunda hasat edilerek antosiyanin analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. Antosiyaninlerin Analizi

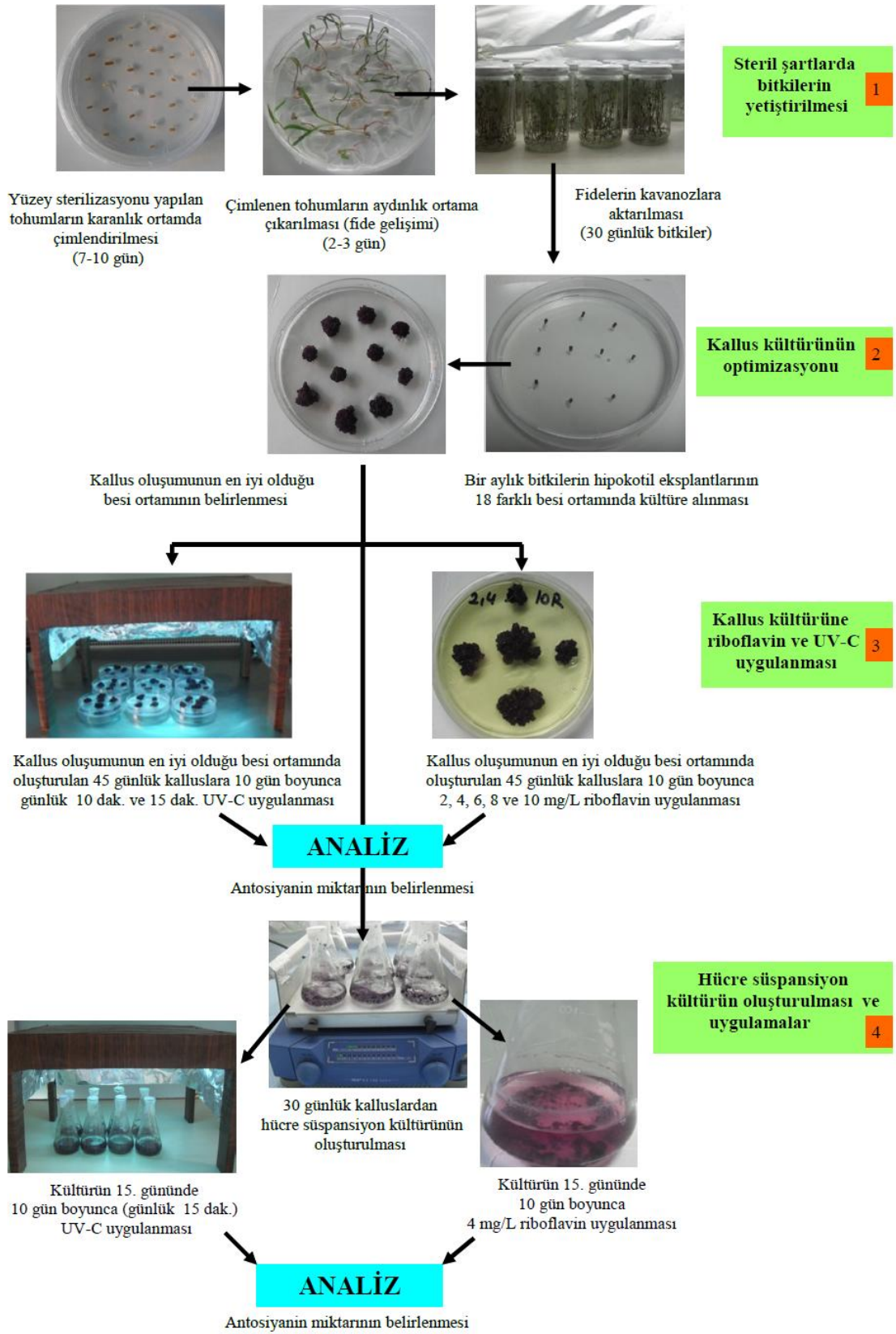
Antosiyaninlerin analizi, Giusti ve Wrolstad (2001)'ın belirttiği yöntemde küçük değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Kallus ve hücre süspansiyon kültüründeki tüm uygulamalar sonucunda elde edilen numuneler %1 HCl ve Metanol karışımı kullanarak ekstrakte edilmiştir (Şekil 3.8). Ekstrakt 0,22 µm çaplı filtreden geçirildikten sonra çözücüye karşı absorpsiyon 530 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Örneklerdeki antosiyaninlerin miktarı siyanidin 3-O- glukozitin molar absorpsiyon katsayısı (ϵ :30200, MA :449,2) kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.9. Antosiyanin analizi için ekstrakte edilen numuneler

3.2.10. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS (16.) istatistiki analiz paket programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma yöntemiyle belirlenmiştir. Farklılıklar % 5 önemlilik düzeyinde ($P \leq 0,05$) değerlendirilmiştir



Şekil 3.10. Deney akış şeması

4. BULGULAR

Siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) tohumlarından steril şartlar altında yetiştirilen bir aylık bitkilerin hipokotil kısımları kallus kùltürünün oluşturulmasında eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Hipokotiller kallus oluşumunun en iyi olduğu ortam şartlarının belirlenmesi amacıyla oksin (2,4-D, IAA ve NAA) ile sitokinin (BAP ve Kinetin) değişik miktar ve kombinasyonlarını içeren MS besi ortamlarında kùltüre alınmıştır. Yapılan 18 farklı uygulama neticesinde oluşan kallusların ortalama ağırlıkları, oluşum oranları, gùrùnùmleri ve antosiyanin içerikleri analiz edilmiştir. Bu parametrelerin değerlendirilmesi neticesinde süspansiyon kùltürlerinin oluşturulmasında ve diğer uygulamalarda kullanılacak kallusların elde edileceği ortam şartları (2 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L BAP, 30 g/L sukroz içeren MS besi ortamı) belirlenmiştir. Bu en uygun ortam şartlarından elde edilen kalluslara riboflavin (2, 4, 6, 8 ve 10 mg/L) ve UV-C (10 dak. ve 15 dak.) uygulayarak antosiyanin içeriğinde meydana gelen değişim incelenmiştir.

Hücre süspansiyon kùltürü yumuşak kolay dağılabilen özellikteki kallusların 2 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L BAP, 30 g/L sukroz içeren sıvı MS besi ortamında kùltüre alınmasıyla oluşturulmuştur. Hücre süspansiyon kùltürüne riboflavin (4 mg/L) ve UV-C (15 dak.) uygulamanın antosiyanin içeriğinde meydana getirdiği değişim kallus kùltüründeki uygulamalar neticesinde en yüksek değerlerin elde edildiği şartlarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS 16 paket programı kullanılmıştır. Gerçekleştirilen alışmalar neticesinde elde edilen bulgular ana başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

4.1. Kallus Oluşumunun En İyi Olduğu Ortam Şartlarının Belirlenmesi

Kallus oluşumunun en iyi olduğu ortam şartlarının belirlenmesinde eksplantların kùltüre alındığı MS besi ortamına ilave edilen hormonlar ile elde edilen bulgular izelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Eksplantların kültüre alındığı MS besisi ortamına ilave edilen hormonların kallus oluşumuna etkisi

MS besin ortamına ilave edilen hormonlar (mg/L)	Kallus oluşum oranı (%)	Taze Kallus ağırlığı (g)	Kök benzeri oluşumlar	Kallus yapısı
1 mg 2,4-D + 0,2 mg Kinetin	80 ±10,00 abc	0,47 ±0,107 cd	Yok	Yumuşak
1 mg 2,4-D + 0,2 mg BAP	83,3±16,66 abc	0,37 ±0,028 ed	Yok	Yumuşak
2 mg 2,4-D + 0,2 mg Kinetin	40±11,54 ef	0,28 ±0,037 ef	Yok	Hafif sert
2 mg 2,4-D + 0,2 mg BAP	83,3±3,33 abc	0,51 ±0,054 bcd	Yok	Yumuşak
3 mg 2,4-D + 0,2 mg Kinetin	46,7±12,01 de	0,07 ±0,012 g	Yok	Hafif sert
3 mg 2,4-D + 0,2 mg BAP	66,6±14,52 bcde	0,18 ±0,020 fg	Yok	Yumuşak
1 mg NAA+ 0,2 mg Kinetin	73,3±17,63 abcd	0,20 ±0,043 fg	Var	Sert
1 mg NAA + 0,2 mg BAP	86,6±8,81 ab	0,55 ±0,044 bc	Yok	Sert
2 mg NAA + 0,2 mg Kinetin	93,3±6,66 ab	0,74 ±0,036 a	Var	Sert
2 mg NAA + 0,2 mg BAP	100±00 a	0,76 ±0,058 a	Yok	Sert
3 mg NAA + 0,2 mg Kinetin	66,6±3,33 bcde	0,65 ±0,092 ab	Var	Sert
3 mg NAA+ 0,2 mg BAP	93,3±3,33 ab	0,45 ±0,045 cd	Yok	Sert
1 mg IAA + 0,2 mg Kinetin	13,3±3,33 f	0,11 ± 0,010 g	Var	Sert
1 mg IAA + 0,2 mg BAP	10±5,77 f	0,11 ±0,017 g	Var	Sert
2 mg IAA + 0,2 mg Kinetin	16,6±3,33 f	0,12 ±0,024 fg	Var	Sert
2 mg IAA + 0,2 mg BAP	53,3±8,81 cde	0,23 ±0,055 efg	Var	Sert
3 mg IAA + 0,2 mg Kinetin	13,3±3,33 f	0,1 ± 0,032 g	Var	Sert
3 mg IAA + 0,2 mg BAP	66,6±14,52 bcde	0,20 ±0,068 fg	Var	Sert
Kontrol (Hormon yok)	Kallus oluşumu gözlenmemiştir.			

Çizelgede her bir sütunda gösterilen farklı harfin ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. n:3

Çizelge 4.1'e göre kallus indüksiyonunda besisi ortamına ilave edilen hormonların çeşit, miktar ve kombinasyonu istatistiksel olarak önemli farklılıklar meydana getirmiştir ($P \leq 0.05$). Kallus oluşum oranları 10'ar adet eksplant içeren üç petri kabının 45 günlük inkübasyonu sonucunda belirlenmiştir. NAA içeren besisi ortamlarında kallus oluşumu genel olarak yüksekken IAA içeren besisi ortamlarında düşüktür. En yüksek kallus oluşum oranı 2 mg/L NAA ve 0,2 mg/L BAP içeren besisi ortamından % 100 ±00 oranında elde edilirken en düşük 1 mg/L IAA ve 0,2 mg/L BAP içeren ortamdan % 10 ± 5,77 oranında elde edilmiştir. 2,4-D içeren besisi ortamlarında eksplantlardan kallus

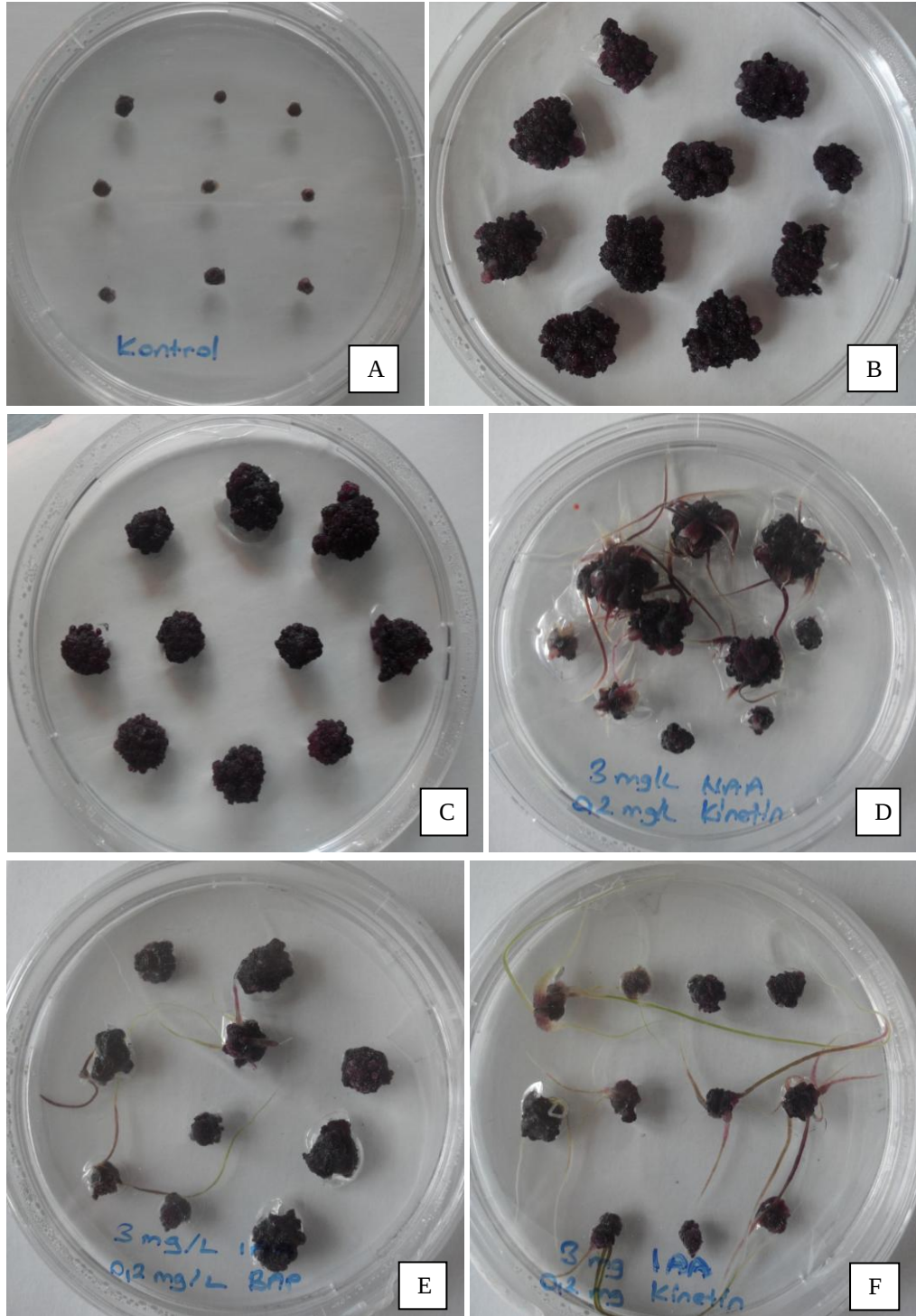
oluşumu genel olarak yüksektir. En yüksek kallus oluşumu 1 ve 2 mg/L 2,4-D içeren besi ortamlarında % 83,3 oranında elde edilmiştir.

Çizelge 4.1'e göre eksplantlardan elde edilen kallusların taze ağırlıkları ilave edilen bitki büyüme düzenleyicisinin çeşit, miktar ve kombinasyonuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılıklar oluşmuştur. Ortalama kallus ağırlığı en yüksek 2 mg/L NAA ve 0,2 mg/L BAP içeren ortamdan $0,76 \pm 0,058$ g olarak elde edilmiştir. En düşük kallus ağırlığı $0,1 \pm 0,032$ g olarak 3 mg/L IAA ve 0,2 mg/L Kinetin içeren besi ortamından elde edilmiştir. 2,4-D uygulamalarında en yüksek kallus ağırlığı $0,51 \pm 0,054$ olarak 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren ortamda belirlenmiştir.

Değişik besi ortamlarından elde edilen kalluslar renk ve doku yapısı bakımından farklılık göstermektedir. Bu çalışmada NAA içeren besi ortamından elde edilen kalluslar kırmızı renkli iken 2,4-D içeren ortamlardan elde edilen kalluslar koyu kırmızı ve siyah renk aralığında gözlemlenmiştir. IAA içeren ortamlarda ise açık kırmızı ile kırmızı renk aralığında kalluslar oluşmuştur. Bu uygulamalardan elde edilen kallus resimleri Şekil 4.1'de verilmiştir.

Kallus numunelerinin doku yapısı bakımından da uygulamalar arasında farklılıklar tespit edilmiştir. NAA ve IAA'nın gerek BAP ile gerekse kinetinle olan tüm kombinasyonlarından sert ve kolay parçalanmayan kalluslar oluşmuştur. Ancak 2,4-D'nin BAP ile olan tüm kombinasyonlarından yumuşak kolay parçalanabilen kalluslar elde edilirken kinetinle olan kombinasyonlarında miktara göre farklılıklar görülmüştür. Kinetin içeren besi ortamına 1mg/L 2,4-D ilave edildiğinde yumuşak kolay parçalanabilen kalluslar meydana gelirken 2 mg/L ve 3 mg/L ilave edildiğinde hafif sert kalluslar oluşmuştur.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi kallus üzerinde kök benzeri yapıların oluşmasında besi ortamına ilave edilen hormon çeşidine göre farklılıklar gözlenmiştir. Ancak bu yapıların oluşmasında hormon miktarından ziyade kombinasyonun daha önemli olduğu görülmüştür. IAA hormonunun BAP ve kinetinle olan tüm kombinasyonlarında kök benzeri oluşumlar meydana gelirken, 2,4-D'nin tüm kombinasyonlarında meydana gelmemiştir. NAA hormonunun BAP ile olan kombinasyonlarında kök benzeri oluşumlar gözlenmezken kinetinle olan kombinasyonlarında gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil: 4.1. Farklı besi ortamlarında kültürlü alınan eksplantlardan oluşan kalluslar: Hormon içermeyen MS besi ortamındaki eksplantlar (A), 2,4-D ve BAP içeren besi ortamında oluşan kalluslar (B), NAA ve BAP içeren besi ortamında oluşan kalluslar (C), NAA ve Kinetin içeren besi ortamında oluşan kalluslar (D), IAA ve BAP içeren besi ortamında oluşan kalluslar (E), IAA ve Kinetin içeren besi ortamında oluşan kalluslar (F)

4.2. Farklı Besi Ortam Şartlarından Elde Edilen Kallusların Antosiyanin İçeriği

Kallus oluşumunun en iyi olduğu ortam şartlarının belirlenmesi amacıyla 18 farklı besiy ortamında kültüre alınan eksplantlardan oluşan kallusların antosiyanin içeriği Çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı besiy ortamlarında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallusların antosiyanin içeriği

MS besin ortamına ilave edilen hormonlar (mg/L)	Antosiyanin içeriği (mg/g taze ağırlık)
1 mg 2,4-D + 0,2 mg Kinetin	0,49 ± 0,034 e
1 mg 2,4-D + 0,2 mg BAP	0,52 ± 0,029 de
2 mg 2,4-D + 0,2 mg Kinetin	0,72 ± 0,068 ab
2 mg 2,4-D + 0,2 mg BAP	0,80 ± 0,023 a
3 mg 2,4-D + 0,2 mg Kinetin	0,61 ± 0,027 cd
3 mg 2,4-D + 0,2 mg BAP	0,68 ± 0,061 bc
1 mg NAA + 0,2 mg Kinetin	0,34 ± 0,033 gh
1 mg NAA + 0,2 mg BAP	0,38 ± 0,029 fg
2 mg NAA + 0,2 mg Kinetin	0,47 ± 0,028 ef
2 mg NAA + 0,2 mg BAP	0,51 ± 0,037 de
3 mg NAA + 0,2 mg Kinetin	0,36 ± 0,022 g
3 mg NAA + 0,2 mg BAP	0,35 ± 0,027 gh
1 mg IAA + 0,2 mg Kinetin	0,21 ± 0,020 ii
1 mg IAA + 0,2 mg BAP	0,25 ± 0,028 hi
2 mg IAA + 0,2 mg Kinetin	0,20 ± 0,035 ii
2 mg IAA + 0,2 mg BAP	0,27 ± 0,018 ghi
3 mg IAA + 0,2 mg Kinetin	0,12 ± 0,012 i
3 mg IAA + 0,2 mg BAP	0,14 ± 0,015 i

Çizelgede her bir sütunda gösterilen farklı harfin ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. n:3

Çizelge 4.2.'deki sonuçlar incelendiğinde, antosiyanin içeriği MS besisi ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerine göre istatistiksel olarak önemli ölçüde değiştiği belirlenmiştir ($P \leq 0.05$). Temel MS besisi ortamına ilave edilen 2,4-D'nin tüm kombinasyonlarından elde edilen kallusların antosiyanin içeriği yüksek iken bunu sırasıyla NAA ve IAA takip etmiştir. En yüksek antosiyanin içeriği 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren besisi ortamından $0,80 \pm 0,023$ mg/g TA olarak elde edilirken en az 3 mg/L IAA ve 0,2 mg/L Kinetin içeren ortamdan $0,12 \pm 0,012$ mg/g TA olarak elde edilmiştir.

4.3. Riboflavin Uygulanan Kalluslarda Antosiyanin İçeriği

Kallus kültürüne riboflavin uygulamasında 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren temel MS besisi ortamından elde edilen 45 günlük kalluslar kullanılmıştır. Kalluslara riboflavin uygulaması 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/L olmak üzere beş farklı miktarda 10 gün boyunca 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperyotta uygulanmıştır. Değişik miktarlarda riboflavin uygulanan kallusların antosiyanin içeriğinde meydana gelen artış Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Riboflavin uygulanan kallusların antosiyanin içeriğinde meydana gelen artış

Uygulanan Riboflavin Miktarı (mg/L)	Antosiyanin Miktarındaki Artış (%)
2	$72,65 \pm 4,60$ cd
4	$188,95 \pm 9,74$ a
6	$124,86 \pm 4,44$ b
8	$90,33 \pm 4,17$ c
10	$62,98 \pm 8,24$ d

Çizelgede her bir sütunda gösterilen farklı harfin ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. n:3

Çizelge 4.3'deki veriler incelendiğinde uygulanan tüm riboflavin miktarları antosiyanin içeriğini istatistiksel olarak önemli ölçüde artırmıştır ($P \leq 0.05$). Antosiyanin içeriğindeki

artış en fazla 4 mg/L riboflavin uygulanan kalluslarda % 188,95 oranında gözlenmiştir. Antosiyanin içeriği uygulanan tüm riboflavin miktarlarında önemli ölçüde artsada 4 mg/L'den sonraki miktarlarda (6, 8 ve 10 mg/L) artış oranında bir düşüş gözlenmiştir. Antosinanın içeriğindeki artış en az 10 mg/L riboflavin uygulanan kalluslarda gözlemlendiği ve artış oranının % 62,98 olduğu belirlenmiştir.

4.4. UV-C Uygulanan Kalluslarda Antosiyanin İçeriği

UV-C ışını 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren temel MS besi ortamından elde edilen 45 günlük kalluslara 10 dakika ve 15 dakika olmak üzere iki farklı sürede uygulanmıştır. UV-C uygulanan kallusların antosiyanin içeriğinde meydana gelen artış Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.4. UV-C uygulanan kallusların antosiyanin içeriğinde meydana gelen artış

UV-C Uygulama Süresi	Antosiyanin Miktarındaki Artış (%)
10 Dakika	79,45 ± 5,97
15 Dakika	101,17 ± 2,39

Çizelge 4.4'deki verilere bakıldığında UV-C uygulaması kallusların antosiyanin içeriğini önemli ölçüde artırmıştır. Antosiyanin içeriğindeki artış en fazla 15 dakika UV-C uygulanan kalluslarda % 101,17 oranında gerçekleşmiştir. Uygulanan UV-C süresinin artırılmasıyla kalluslardaki antosiyaninin oranınıda önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir.

4.5. Riboflavin ve UV-C Uygulanan Kallusların Taze Ağırlıklarındaki Değişim

Farklı miktarlarda 10 gün boyunca riboflavin uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıkları Çizelge 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Riboflavin uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıkları

Uygulanan Riboflavin Miktarı (mg/L)	Taze Kallus Ağırlığı (g)
2	1,21 ± 0,068 ab
4	1,15 ± 0,044 b
6	0,98 ± 0,024 c
8	0,96 ± 0,014 c
10	0,93 ± 0,014 c
Kontrol	1,28 ± 0,039 a

Çizelgede her bir sütunda gösterilen farklı harfin ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. n:3

Çizelge 4.5.'de verilen sonuçlar incelendiğinde uygulanan tüm riboflavin konsantrasyonlarında ortalama taze kallus ağırlığının kontrole göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür ($P \leq 0.05$). Kallus ağırlığındaki düşüş 2 mg/L riboflavin uygulananlarda en az olduğu belirlenmiştir. Uygulanan riboflavin miktarının artırılması taze kallus ağırlığındaki düşüşü artırmıştır. Ancak 6, 8 ve 10 mg/L riboflavin uygulanan kallusların ortalama ağırlıklarındaki düşüş kontrole göre istatistiksel olarak önemli olsa da kendi aralarında önemli olmadığı görülmüştür ($P \leq 0.05$). Ortalama kallus ağırlığındaki düşüş en fazla 10 mg/L riboflavin uygulanan kalluslarda gözlenmiştir. Bu kallusların ortalama taze ağırlıkları kontrol grubundan 1,37 kat daha az olduğu belirlenmiştir.

UV-C uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıkları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. UV-C uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıkları

UV-C Uygulama Süresi	Taze Kallus Ağırlığı (g)
10 dakika	1,03 ± 0,027 b
15 dakika	0,92 ± 0,020 c
Kontrol	1,19 ± 0,029 a

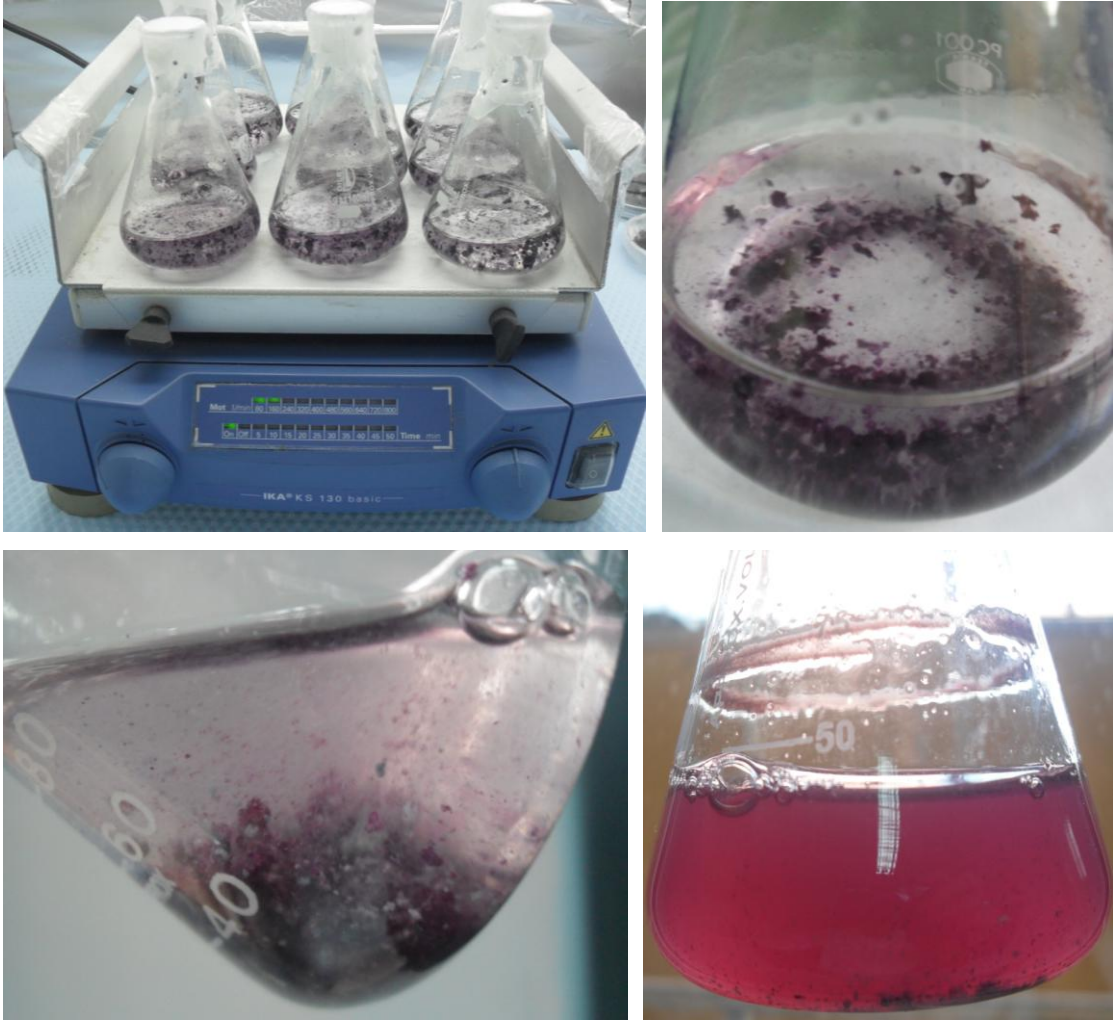
Çizelgede her bir sütunda gösterilen farklı harfin ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. n:3

Çizelge 4.6.'da sunulan veriler incelendiğinde UV-C uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıkları kontrole göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır ($P \leq 0.05$). Uygulanan iki farklı sürede de kallus büyümesi yavaşlamıştır. Uygulanan UV-C süresinin uzatılması ortalama kallus ağırlığındaki düşüşü artırmıştır. En fazla düşüş 15 dakika UV-C uygulanan kalluslarda belirlenmiştir.

4.6. Hücre Süspansiyon Kültürünün Oluşturulması ve Çoğalma Eğrisinin Çıkarılması

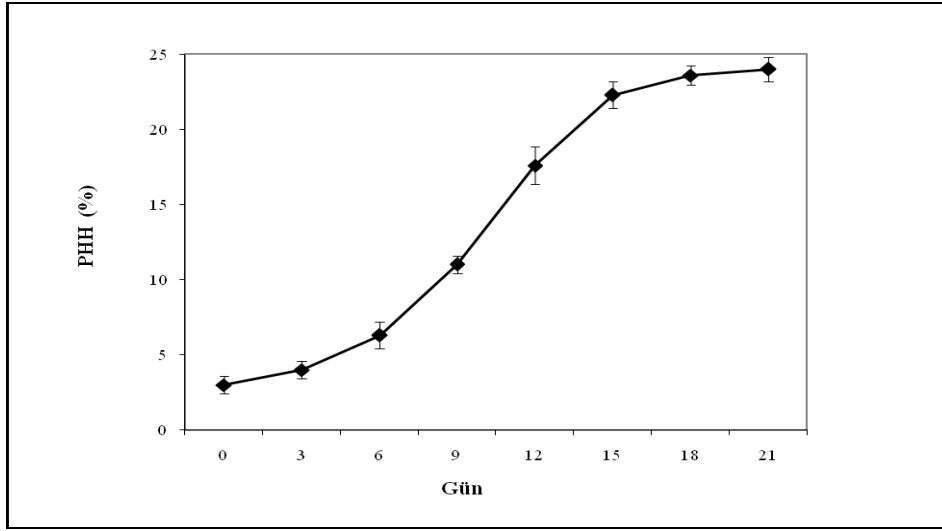
Hücre süspansiyon kültürünün oluşturulmasında yumuşak kolay dağılabilen kalluslar başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Kültürün başlatılmasında kullanılacak kallusların seçimi Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'deki verilerin değerlendirilmesi sonucunda belirlenmiştir. Bu çizelgeler incelendiğinde hücre süspansiyon kültürü için en uygun kallusların 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren temel MS besi ortamından elde edildiği görülmüştür. Bu ortamdan elde edilen kallusların yumuşak kolay parçalanabilen nitelikte olmasının yanında antosiyanin içeriği, kallus oluşum oranı ve taze kallus ağırlığı oldukça yüksektir.

Hücre süspansiyon kültürü 30 günlük kallusların 2 mg/L 2,4-D, 0,2 mg/L BAP ve 30 g/L sukroz içeren temel MS besi ortamında kültüre alınmasıyla oluşturulmuştur. 1,2 g kallus numunesi steril bir petri içerisinde hafifçe küçük parçalara ayırarak 40 ml besi ortamı içeren 100 ml'lik erlenmayerlerde kültüre alınmıştır. Hücre süspansiyon kültürünün çeşitli aşamalarından resimler Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Hücre süspansiyon kültürünün çeşitli aşamalarından resimler

Süspansiyon kültüründeki hücrelerin miktarında meydana gelen artış paketlenmiş hücre hacmi (PHH) olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla hücre süspansiyonun oluşturulduğu sıvı ortamdan üçer gün arayla 10 ml alınarak 200 g' de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Santrifuj sonrasında çöken peletin hacmi ölçülerek % PHH olarak Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Süspansiyon kültüründeki hücrelerin paketlenmiş hücre hacmi (% PHH) olarak çoğalma eğrisi

Kültür ortamındaki hücrelerin hacminde 6. günden itibaren önemli artış meydana gelmiştir. Paketlenmiş hücre hacmindeki artış en yüksek 6-15. günler arasında gerçekleşmiştir. Ancak PHH'deki bu artış 15. günden sonra yavaşlamaya başlamıştır. Kültürün 15. gününde paketlenmiş hücre hacminde başlangıca göre 7,4 kat bir artış gözlenirken 21. günde bu artış 8,1 kat olarak gerçekleşmiştir.

4.7. Riboflavin ve UV-C Uygulanan Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Antosiyanin İçeriği

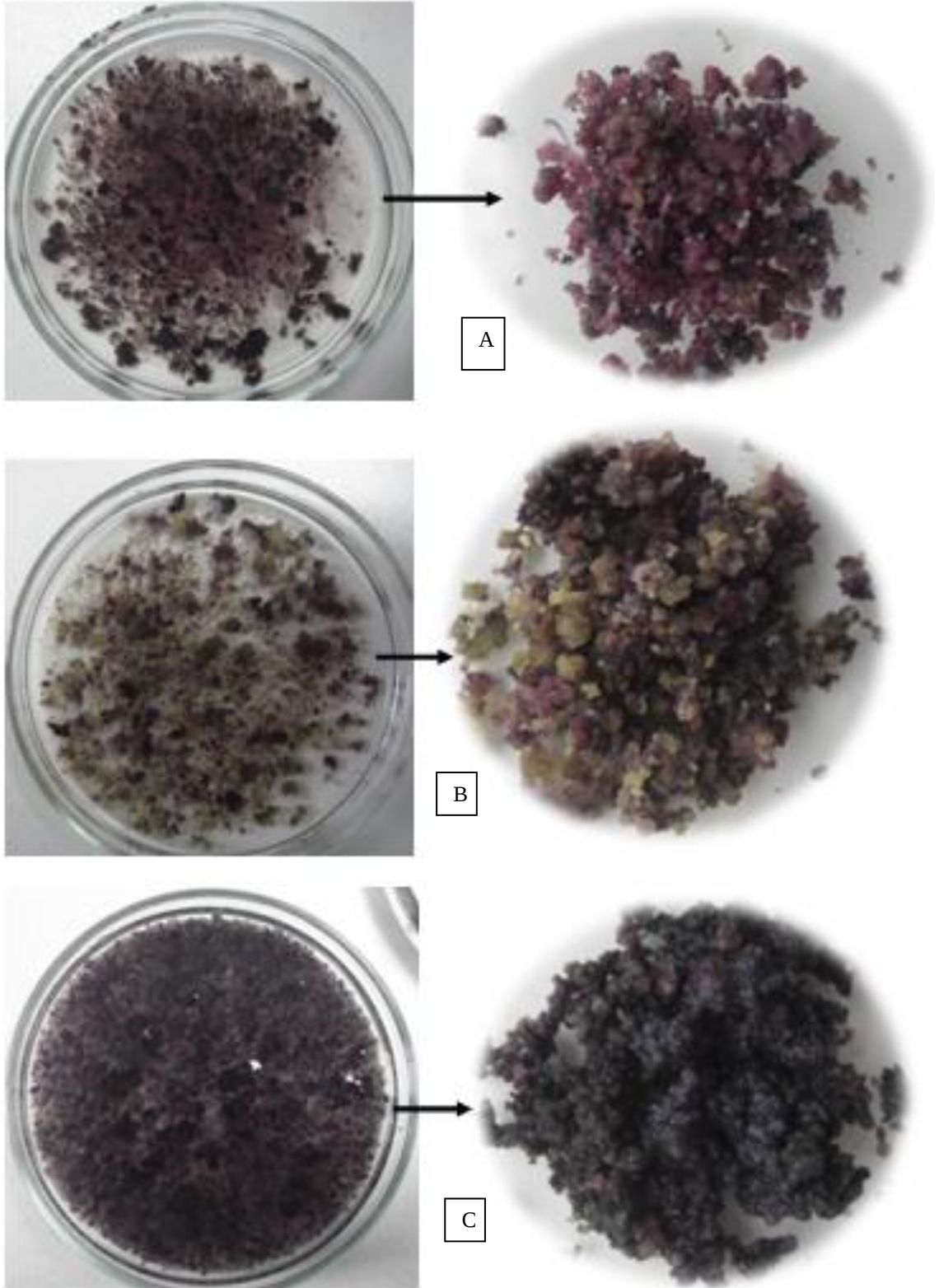
Hücre süspansiyon kültürüne riboflavin ve UV-C uygulaması kallus kültüründeki uygulamalar neticesinde antosiyanin içeriğindeki artışın en yüksek olduğu miktar ve sürede uygulanmıştır. Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4 incelendiğinde antosiyanin içeriğindeki artış en fazla 4 mg/L riboflavin ve 15 dakika UV-C uygulanan kalluslarda olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle hücre süspansiyon kültürüne riboflavin 4 mg/L olarak UV-C ise günlük 15 dakika olarak uygulanmıştır. Riboflavin ve UV-C uygulaması paketlenmiş hücre hacmindeki artışın yavaşlamaya başladığı 15. günde uygulanmıştır. Söz konusu uygulamalar sonucunda antosiyanin içeriğinde meydana gelen değişim Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Riboflavin ve UV-C uygulanan hücre süspansiyon kültürlerinin antosiyanin içerikleri

Uygulama	Antosiyanin içeriği (mg/ g taze ağırlık)
Riboflavin (4 mg/L)	0,92 ± 0,034 b
UV-C (15 dakika)	1,10 ± 0,019 a
Kontrol	0,74 ± 0,055 c

Çizelgede her bir sütunda gösterilen farklı harfin ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. n:4

Çizelge 4.7'deki sonuçlara bakıldığında hücre süspansiyon kültürüne UV-C ve riboflavin uygulanması antosiyanin içeriğinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirmiştir ($P \leq 0.05$). En yüksek antosiyanin içeriği 15 dakika UV-C uygulanan kültürlerde $1,10 \pm 0,019$ mg/g TA olarak belirlenmiş olup bu miktarın kontrol grubunun 1,49 katı olduğu görülmüştür. Riboflavin uygulanan kültürlerde kontrol grubuna göre 1,24 katlık bir artış meydana gelmiştir. Süspansiyon kültürüne yapılan her iki uygulama neticesinde elde edilen hücre ve agregatların görüntüleri Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Hücre süspansiyon kültürüne yapılan uygulamalar neticesinde elde edilen hücrelerin ve agregatların görüntüleri: Riboflavin (A), Kontrol (B), UV-C (C)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki doku kültürü teknolojisi antosiyaninlerin üretimi için alternatif bir yöntem olduğu ifade edilmektedir. Antosiyaninlerin *in vitro* yöntemlerle üretimi akademik ve endüstriyel açıdan önemli ölçüde ilgi çeken bir teknolojidir. Antosiyaninlerin söz konusu yöntemlerle üretimi havuç, üzüm, çilek, pervane çiçeği gibi pek çok bitkide incelenmiştir (Maharik ve ark., 2009). Ayrıca bu değerli bileşiklerin üretimini artırarak ticari amaca elverişli bir yöntem oluşturmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Zhang ve Furusaki, 1999).

Bu çalışmada, antosiyaninlerin bitki doku ve hücre kültürü yöntemleriyle üretilmesinde iki uyarıcının etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) bitkisinden oluşturulan kallus ve hücre süspansiyon kültürüne UV-C ve riboflavin uygulamanın antosiyanin içeriğinde meydana getirdiği değişim incelenmiştir.

Çalışmada, kallus kültürlerinin başlatılmasında bir aylık bitkilerin hipokotil kısımları kullanılmıştır. Hazırlanan 18 farklı besi ortamında hipokotil eksplantlarının kallus oluşturma oranları %10 ile %100 arasında değişiklik göstermiştir. Jiménez ve Bangerth (2001), havuç (Starca F₁ hibrid) bitkisinde kallus kültürünü 10-14 günlük bitkilerin hipokotil kısımlarını kullanarak başlattıklarını bildirmişlerdir. Havuç bitkisinin değişik çeşitlerinde yapılan benzer çalışmalarda hipokotillerin eksplant kaynağı olarak kullanıldığı ifade edilmiştir (Li ve Kurata, 2005; Latif ve ark., 2007; Yau ve ark., 2008).

Kallus oluşumu hipokotil eksplantlarının sitokinin grubu iki hormon ile oksin grubu üç hormonun değişik miktar ve kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alınmasıyla sağlanmıştır. NAA, IAA ve 2,4-D'nin Kinetin ve BAP ile oluşturulan kombinasyonlarda kallus oluşum oranı, ağırlığı ve yapısı bakımından önemli farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Kallus oluşum oranı ve elde edilen taze kallus ağırlığı en yüksek 2 mg/L NAA ve 0,2 mg/L BAP içeren besi ortamından elde edilmiştir. Ancak bu ortamdan elde edilen kallusların sert ve kolay dağılabilen bir

özellikte olmaması nedeniyle hücre süspansiyon kültürü için uygun olmadığı görülmüştür. Ayrıca bu kallusların antosiyanin içeriği 2,4-D içeren ortamlardan elde edilen kalluslara göre istatistiksel olarak önemli ölçüde düşüktür. IAA'nın tüm kombinasyonlarında hem kallus oluşum oranı hemde de ortalama kallus ağırlığı düşük olmasından dolayı uygulamalar için elverişli değildir. Tüm bu parametrelerin değerlendirilmesiyle hücre süspansiyon kültürün kurulması ve çeşitli uygulamalar için en uygun kallusların 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren besi ortamında olduğu belirlenmiştir. Çünkü bu ortamda kültüre alınan eksplantların kallus oluşturma oranları ve oluşan kallusların ağırlıkları ile antosiyanin içerikleri önemli ölçüde yüksektir. Ayrıca bu ortamdan elde edilen kallusların kolay parçalanabilen özellikte olması hücre süspansiyon kültürünün oluşturulmasına imkan sağlamıştır. Godoy-Hernández ve Vázquez-Flota (2006), hücre süspansiyon kültürünün oluşturulmasındaki başarının büyük ölçüde kullanılan kallusların sıvı ortamda tek hücreye veya küçük hücre kümelerine hızlıca ayrılabilmesine bağlı olduğu belirtmişlerdir.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin literatürlerdeki verilere paralellik arz ettiği görülmüştür. Havuç (*Daucus carota* L. T-29 çeşidi) bitkisinde kallus indüksiyonu için 2,4-D, IAA ve NAA hormonlarının tek tek veya Zeatin, Kinetin ve BAP ile oluşturulan kombinasyonları kullanılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda embriyogenik kallusların 2,4-D ve BAP içeren MS besi ortamından elde edildiği ifade etmişlerdir (Latif ve ark., 2007). Havuç (*Daucus carota* L. Nantes scarlet çeşidi) bitkisinde yapılan benzer bir çalışmada da kallus kültürü 2 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L Kinetin içeren MS besi ortamında gerçekleştirilmiştir (Sudha ve Ravishankar, 2003a,b). Farklı bir havuç çeşidi olan Nantes scarlet-104 ile yapılan çalışmada kallusların 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L Kinetin içeren MS besi ortamından elde edildiği bildirilmiştir (Narayan ve Venkataraman, 2000).

Kallus kültürünün optimizasyonu için yapılan 18 farklı uygulama neticesinde elde edilen tüm kallusların kırmızı renkli ve antosiyanin içerdikleri belirlenmiştir. Ancak antosiyanin içeriklerinin istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür. En yüksek antosiyanin içeriği 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besi ortamında oluşan kalluslarda (0,8 mg/ g TA) belirlenmiştir. En düşük antosiyanin içeriği ise IAA

içeren besi ortamlarından elde edilen kalluslarda belirlenmiştir. Ancak yapılan literatür taramalarında havuç bitkisinin değişik varyetelerinde farklı sonuçların elde edildiği görülmüştür. Nantes scarlet-104 havuç çeşidinde yapılan çalışmada 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L kinetin içeren MS besi ortamından yeşil renkli antosiyanin içermeyen kalluslar elde edilmiştir. Bu kallusların 2,15 mg/L IAA ve 0,15 mg/L Kinetin içeren besi ortamına alt kültüre alındığında renkli antosiyaninlerin oluştuğu belirtilmiştir (Narayan ve Venkataraman, 2000). Havuç bitkisinde yapılan farklı bir çalışmada 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L kinetin içeren MS besi ortamında antosiyaninlerin de gözlemlendiği yeşil renkli kalluslar elde edilmiştir. Kallusların antosiyanin içeren bölgeleri seçilerek 2 mg/L IAA ve 0,2 mg/L Kinetin içeren besi ortamında alt kültüre alındığı ifade edilmiştir (Sudha ve Ravishankar, 2003b).

Bitki doku ve hücre kültürüne yapılan çeşitli uygulamaların antosiyanin içeriğini önemli ölçüde artırdığını belirten çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bu amaçla en çok yararlanılan uygulamalar arasında yüksek üretken hücre hatlarının seçimi, besi ortamının optimizasyonu, ışık, pH, sıcaklık, hormon, öncül bileşiklerin ilave edilmesi ve elitasyon sayılabilmektedir (Zhang ve Furusaki, 1999). Örneğin *Daucus carota* L. hücre veya doku kültürlerine mannitol (Rajendran ve ark., 1992), bakteri ve mantar ekstraktları, metal iyon tuzları (Suvarnalatha ve ark., 1994), ışık (Takeda, 1990) ve UV ışığı (Gläbgen ve ark., 1998) uygulamanın antosiyanin içeriğini artırdığı bildirmiştir. Benzer çalışmalar *Vitis vinifera* kültürlerinde de yoğun şekilde yapılmıştır. Bu bitkiden oluşturulan kültürlerle ışık, jasmonik asit (Zhang ve ark., 2002), metil jasmonat, sakaroz, kadmiyum sülfat, aydınlık (Çetin, 2010), UV-C (Çetin ve ark., 2011), fosfat eksikliği (Yin ve ark., 2012), metil jasmonat ve fenilalanin (Qu ve ark., 2011), polisakkarit (Cai ve ark., 2012b), darbeleri elektrik alanı ve etefon (Saw ve ark., 2012) uygulamanın antosiyanin içeriğini artırdığı ifade edilmiştir.

Çalışmamızda antosiyanin üretimini artırmak için kallus kültürüne 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/L riboflavin uygulanmıştır. Yapılan bu uygulamalar neticesinde antosiyanin içeriğindeki artış en fazla 4 mg/L riboflavin uygulanan kalluslarda belirlenmiştir. Bu kallusların antosiyanin içeriğinde % 188,95 oranında artış gözlenmiştir. Çilek (*Fragaria anansa* Shikinari) hücre süspansiyon kültürüne yapılan farklı uygulamalar neticesinde en yüksek antosiyanin içeriğinin 4 mg/L riboflavin uygulanan kültürlerden elde edildiği ve

bunun miktarının kontrol gurubunun 2,8 katı olduğu bildirilmiştir (Mori ve Sakurai, 1995). ilek süspansiyon kültüründe yapılan farklı bir çalışmada ise 4, 8 ve 10 mg/L riboflavin uygulanmıştır. Bu çalışmanın neticesinde en yüksek antosiyanin içeriği iki hafta 4 mg/L riboflavin uygulan kültürden elde edildiği ifade edilmiştir (Mori ve Sakurai, 1996).

Bu çalışmada ayrıca riboflavin uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıklarında meydana gelen değişim de incelenmiştir. Yapılan değerlendirmelerin sonucunda uygulanan tüm riboflavin konsantrasyonlarında büyümenin yavaşladığı görölmüştür. Riboflavin miktarının artırılması büyümedeki yavaşlamayı da artırmıştır. Ortalama kallus ağırlığında meydana gelen düşüş en fazla 10 mg/L riboflavin uygulanan kalluslarda gözlenmiştir. Yapılan benzer birçok çalışmada da riboflavin uygulamanın büyümeyi önemli ölçüde baskıladığı ifade edilmiştir (Mori ve Sakurai, 1995; Mori ve Sakurai, 1996; Miyanaga ve ark., 2000).

Antosiyanin üretimini artırmak için yapılan bir diğer çalışmada kalluslara UV-C uygulanmıştır. UV-C ışığı 10 dakika ve 15 dakika olmak üzere iki farklı sürede uygulanmıştır. UV-C kalluslardaki antosiyanin içeriğini önemli ölçüde artırmıştır. Antosiyanin içeriği uygulama süresinin uzamasına paralel olarak artmıştır. Antosiyanin içeriğindeki artış en fazla 15 dakika UV-C uygulanan kalluslarda belirlenmiştir. Bu kallusların antosiyanin içeriğinde % 101,17 oranında artış gözlenmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada, *Malva neglecta* kalluslarına UV-C uygulaması antosiyanin içeriğini anlamlı ölçüde artırmıştır (Khatami ve Ghanati, 2011).

etin ve ark. (2011), Gamay üzüm (*Vitis vinifera* L.) eşidinden oluşturulan kallus kültürüne UV-C uygulanmasının sekonder metabolit birikimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Kalluslara 10 ve 15 cm uzaklıktan 10, 15 ve 20 dakika süre ile 254 nm dalga boyuna sahip UV-C radyasyonu uygulanmıştır. Bu uygulamalardan sonra alınan örneklerin antosiyanin, toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol ve karotenoid miktarları belirlenmiştir. İncelenen tüm bu parametrelerin, UV-C radyasyonunun uygulama mesafesi, uygulama süresi ile örnek alım zamanlarından oluşan kombinasyonlara göre önemli ölçüde değiştiği ifade edilmiştir. Bu araştırmanın neticesinde UV-C uygulamanın başta fenolik bileşikler olmak üzere sekonder metabolit

üretimini artırdığı belirtilmiştir. En yüksek değerlerin 10 cm mesafeden 15 dakika uygulanan kalluslardan elde edildiği ifade edilmiştir.

Capsicum annuum L. bitkisinde ultraviyole radyasyonun antosiyaninleri de içeren bir çok bileşik üzerine etkisi incelenmiştir. UV-B ve UV-C uygulanan bitkilerin antosiyanin konsantrasyonunda kontrole göre sırasıyla % 4 ve % 7 oranında artış meydana gelirken UV-A uygulanan bitkilerde sadece % 1 oranında bir artış meydana geldiği belirtilmiştir (Mahdavian ve ark., 2008). Bu araştırmanın paralelinde bir sonuçta üzüm meyvelerine üç farklı UV ışını uygulanmasıyla elde edilmiştir. UV-B ve UV-C ışını antosiyanin içeriğini artırırken UV-A'nın artırmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada şikimat yolundaki bazı yapısal genlerin UV ışınının dalga boyuna göre farklı şekilde düzenlendiği ifade edilmiştir (Zhang ve ark., 2012).

Çalışmamızda UV-C uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıklarında meydana gelen değişimde incelenmiştir. UV-C uygulanan kallusların ortalama taze ağırlığı kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır. Uygulanan UV-C süresinin uzatılması ortalama taze kallus ağırlığındaki düşüşü artırmıştır. Ortalama kallus ağırlığında meydana gelen düşüş en fazla 15 dakika UV-C uygulanan kalluslarda belirlenmiştir. Bu kallusların ortalama ağırlığı kontrol grubundan 1,29 kat daha az olduğu belirlenmiştir.

Bezelye bitkisinde UV-A ve UV-C uygulamanın büyümeyi de içeren bazı parametrelere olan etkisi incelenmiştir. Bu araştırmanın neticesinde UV-A uygulanan bezelye fidelerinin toplam biyomasın da bir azalma olmazken UV-C uygulananlarda anlamlı şekilde azalmıştır (Liu ve Yang, 2012). Liu ve ark. (2010b)'nın üzüm kallus kültüründe yaptıkları çalışma incelediğinde benzer çalışmalardan farklı bir sonucun elde edildiği dikkat çekmektedir. Bu çalışmada kallus kültürüne 10 ve 20 dakika UV-C uygulanması büyümeyi kontrole göre önemli ölçüde artırdığı ifade edilmiştir. Fakat 30 dakika UV-C ışığı uygulamanın büyüme üzerine negatif bir etkisinin olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca UV-C ışığının bitkilerin hücre büyümesi ve sekonder metabolizması ile ilgili spesifik genlerin ekspresyonunu kontrol eden ve değiştiren önemli bir faktör olduğu ifade edilmiştir.

Çalışmamızın önemli bir bölümünü de hücre süspansiyon kültürüne UV-C ve riboflavin uygulamanın antosiyanin içeriğinde meydana getirdiği değişimin belirlenmesi

oluşturulmaktadır. Süspansiyon kültürüne uygulamaların kaçınıcı gününde gerçekleştirileceğini belirlemek amacıyla hücre büyüme eğrisi oluşturulmuştur.

Hücre süspansiyon kültürünün büyüme eğrisi kültür ortamındaki hücrelerin hacminde meydana gelen artışın ölçülmesiyle oluşturulmuştur. Bitki hücre kültürlerinin büyüme kinetiklerinin değerlendirilmesinde birkaç metod bulunmaktadır. Bu metotlar arasında taze hücre ağırlığı, kuru hücre ağırlığı, çökmüş hücre hacmi, paketlenmiş hücre hacmi, hücre sayımı, kültürün optik dansitesinin belirlenmesi ve pH'ın ölçülmesi sayılabilmektedir. Farklı bitki türlerinden oluşturulan kültürlerde çökmüş hücre hacmi, paketlenmiş hücre hacmi ve taze hücre ağırlığının kuru hücre ağırlığı ile çok iyi bir linear korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Bu nedenle hücre büyümesinin ölçülmesinde söz konusu metotlardan herhangi birinin kullanılabileceği ifade edilmektedir (Godoy-Hernández ve Vázquez-Flota, 2006).

Bitki hücrelerindeki büyümenin sayı (hücre sayısı) veya hacim olarak zamana karşı grafiği çizildiğinde mikroorganizmalarda olduğu gibi sigmoidal bir eğri ortaya çıkmaktadır. Hücre sayısı esas alındığında bakterilerde olduğu gibi bitki hücre kültürlerinde de dört ana safha gözlenmektedir. Bunlar lag (gecikme ve uyum), exponential veya log (üssel), linear (doğrusal) ve durağan (stationer) safhadır. Hücre süspansiyon kültürünün büyümesini etkileyen faktörlerden biri de ekimi yapılan hücre miktarıdır. Kültür az bir ekimle başlatıldığında lag safhası çok uzadığı ve eğrideki logaritmik safhaya ait açının azaldığı belirtilmiştir. Yüksek hücre yoğunluğuyla başlatıldığında ise durağan safhaya geçmeden önce sınırlı sayıda hücre bölünmesi olduğu ifade edilmiştir. İdeal ekim hacmi kültürler arasında farklılık göstermekte ve kültürü yapılan türe ve kültür koşullarına göre değiştiği belirtilmiştir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Hücre süspansiyon kültürünün büyüme eğrisi paketlenmiş hücre hacmi (PHH) ölçülerek oluşturulmuştur. Yapılan analizler neticesinde kültürün oluşturulduğu ilk günlerde hacimdeki artışın oldukça yavaş olduğu belirlenmiştir. Kültürün hacmindeki artış en yüksek 6-15. günler arasında gerçekleşmiştir. Paketlenmiş hücre hacmindeki (% PHH) artış 15. günden itibaren oldukça yavaşlamış ve kültür doğrusal (linear) safhaya girmiştir. Ceoldo ve ark. (2005), havuç (*D. carota* L. cv. Flakkese) bitkisinin antosiyanin üreten hücre hatlarını seçerek hücre süspansiyon kültürü oluşturmuşlardır.

Söz konusu araştırmada kültürün başlıca üç ana safhaya ayrıldığını ifade etmişlerdir. Bunlar başlangıç safhası (0-2 gün), orta safha (2-9 gün) ve son safhadan (9-16 gün) oluşmaktadır.

Havuç (*D. carota* L. cv. Saint Valery) süspansiyon kültüründe yapılan farklı bir çalışmada, büyüme safhalarının kısa bir lag periyodu, katlanarak arttığı safha, doğrusal safha ve durağan safhadan oluştuğu belirtilmiştir. Kültürün durağan safhaya 11. günde ulaştığı ifade edilmiştir (Abenavoli ve ark., 2003). Tez çalışmasında oluşturulan grafik (Şekil 4.3) incelendiğinde 3 günlük lag safhasından sonra 15. güne kadar devam eden log (exponential) safhanın oluştuğu görülmektedir. Linear safhanın ise 15. günden sonra başladığı belirlenmiştir.

Hücre süspansiyon kültürüne riboflavin ve UV-C linear (doğrusal) safhanın başlangıcı olan 15. günde uygulanmıştır. *Daucus carota* hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme kinetiği ve metabolit (antosiyanın) birikimi incelendiğinde birikiminin doğrusal artış safhasının sonlarına doğru arttığı ve durağan safhada en yüksek seviyeye ulaştığı ifade edilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001). *Daucus carota* L. cv. Flakkese süspansiyon kültüründe yapılan bir çalışmada antosiyanın içeriği en yüksek 4. günden 14. güne kadar olan sürede elde edildiği ifade edilmiştir (Ceoldo ve ark., 2005).

Hücre süspansiyon kültürüne riboflavin 4 mg/L olarak uygulanırken UV-C 15 dakika olarak uygulanmıştır. Yapılan analizler neticesinde her iki uygulamanın da antosiyanın içeriğini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. UV-C ve riboflavin uygulanan süspansiyon kültürlerinin antosiyanın içeriği kontrole göre sırasıyla 1,49 ve 1,24 kat bir artış meydana gelmiştir. Ayrıca kontrol grubu kültürlerde Şekil 4.4’de görüldüğü gibi yeşil renkli pigmentler oluşmuştur. Bu oluşumlar UV-C ve riboflavin uygulanan süspansiyon kültüründe gözlenmemiştir.

Riboflavin pek çok biyolojik sürece bitkilerde savunma yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan ve hücresel bir sinyal olan H_2O_2 ’nin üretilmesiyle aracılık etmektedir. Bitkilerin sentezlezediği riboflavinin seviyesi gelişmenin farklı aşamalarında ve farklı organlarda büyük ölçüde değişmektedir. Riboflavin seviyesindeki bu değişikliklerin fizyolojik etkileri olacağı belirtilmektedir. *Arabidopsis thaliana*’da riboflavin içeriğinin değişmesiyle H_2O_2 birikiminin etkilediği ifade edilmiştir (Deng ve ark., 2011).

Çilek (*F. Ananassa* cv. Shikinari) bitkisinin yapraklarından 1 mg/L 2,4-D ve 0,1 mg/L BAP içeren LS (Linsmaier-Skoog ortamı) sıvı besi ortamında hücre kültürü oluşturulmuş ve 4 mg/L riboflavin uygulayarak antosiyanin üretimi incelenmiştir. Bu uygulama neticesinde antosiyanin miktarı kontrole göre üç kat arttığı ifade edilmiştir. (Miyanaga ve ark., 2000).

Tütün (*Nicotiana tabacum* cv. NC89) hücre süspansiyon kültüründe riboflavinin sekonder metabolizma ve savunma yanıtı üzerine etkisi incelenmiştir. Tütün hücrelerinde riboflavin aracılığıyla oluşturulan savunma yanıtı oksitatif patlama, ekstrasellüler ortamın alkalizasyonu, savunmayla ilgili 4 genin ifadesi ve iki fenolik bileşiğin (scopoletin ve lignin) birikimini içermektedir. Tütün hücre süspansiyon kültürüne 1 mM riboflavin ilave edilmesi H_2O_2 'nin hızlı ve geçici salıverilmesine, savunmayla ilgili 4 genin (PR-1a, PR-1b, PAL, LPO) ifadesinin güçlü şekilde teşvik edilmesine, toplam fenolik içeriğinin artmasına ve 80 dakikada ortamın pH'sının 4,92 den 5,49'a yükselmesine sebep olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada analiz edilen genler fenilpropanoid yolunun kilit enzimi olan fenilalanin amonyum liyaz (PAL), lignin peroksidaz (LPO) ve patogenezele ilgili iki proteindir (PR-1a ve PR-1b,) (Liu ve ark., 2010a).

Brassica napus bitkisine UV-C uygulamanın oksitadif stresi teşvik etmesinin yanında flavonoid ve antosiyanin içeriğini anlamlı şekilde artırdığı belirtilmiştir. Bu bileşiklerin aktif oksijen türlerine karşı içsel bir filtre olmasının yanında antioksidant olarak da fonksiyon gösterdiği ifade edilmiştir (Nasibi ve M-Kalantari, 2005). Yapılan farklı bir çalışmada fasulye fidelerine UV-C uygulama antosiyanin içeriğini, enzimatik olmayan antioksidanları (toplam askorbat) ve enzimatik (süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz) antioksidanların aktivitesini anlamlı şekilde artırmıştır (Younis ve ark., 2010).

Havuç hücre kültüründe UV ışığının antosiyanin üretimine ve antosiyanin biyosenteziyle ilgili genlerin düzenlenmesine etkisi incelenmiştir. UV uygulaması antosiyanin birikimini güçlü şekilde artırdığı ve fenilpropanoid ile flavonoid yolunun son aşama enzimlerinin aktivitelerinde geçici bir artışa neden olduğu ifade edilmiştir (Gläbgen ve ark., 1998).

Siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) bitkisinde doku kültürü yöntemleriyle sekonder metabolit üretimi üzerine gerçekleştirilen bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıya maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Siyah havuç bitkisinde kallus kültürünün optimizasyonu için 18 farklı uygulama yapılmış ve antosiyanin üretimi ve hücre süspansiyon kültürü için en uygun kallusların 2 mg/L 2,4-D ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besisi ortamından elde edildiği belirlenmiştir.
2. Havuç bitkisinin birçok çeşidinde antosiyanin üretim amacıyla yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda yeşil renkli kalluslar elde edildiği veya kallusların bazı bölümlerinin antosiyanin içerdiği belirtilmiştir. Bu kalluslara çeşitli muameleler veya antosiyanin içeren bölgelerinin alt kültüre alınmasıyla antosiyanin üreten hücre hatlarının elde edildiği birçok yayında ifade edilmiştir. Ancak bu çalışmada elde edilen tüm kallusların farklı miktarlarda antosiyanin içerdiği ve uniform yapıda olduğu belirlenmiştir.
3. Oluşturulan kallus kültüründe antosiyanin üretimini artırmak için çeşitli miktarlarda riboflavin ve farklı sürelerde UV-C ışığı uygulamıştır. Bu uygulamalar neticesinde antosiyanin içeriğindeki artış en fazla 4 mg/L riboflavin ile 15 dakika UV-C uygulanan kalluslarda belirlenmiştir.
4. Antosiyanin üretimine bu uyarıcıların etkisi hücre süspansiyon kültüründe de incelenmiştir. Riboflavin (4 mg/L) ve UV-C (15 dakika) uygulanan süspansiyon kültürlerinde antosiyanin üretimi kontrole göre önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir.
5. Kalluslara UV-C ve yüksek miktarda riboflavin uygulanması büyümeyi yavaşlattığı belirlenmiştir. Bunun nedeninin her iki uygulamanın da üretimini teşvik ettiği reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturduğu stresten kaynaklandığı düşünülmektedir.
6. Havuç bitkisinin birçok çeşidinde doku kültürü yöntemleriyle antosiyanin üretimi üzerine çok sayıda çalışma bulunsada ülkemizde de yaygın şekilde yetiştirilen siyah havuç çeşitlerinde yok denecek kadar az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu açıdanda sonraki çalışmalar için öncül bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

7. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ışığında siyah havuç bitkisinin doku kültürü yöntemiyle antosiyanin üretimi için uygun olduğu ve çeşitli uyarıcılarla metabolit veriminin artırılabilirdiği belirlenmiştir. Bu nedenle söz konusu bitkiden oluşturulan kültürlerin ticari amaç için antosiyanin üretiminin geliştirilmesine oldukça elverişli olduğu görülmüştür. Çalışmamız küçük ölçekli süspansiyon kültürlerinde (100 ml’lik erlenmayer) gerçekleştirilmiştir. Ekonomik olarak gelir getirecek ve büyük ölçülerde üretimin sağlanabildiği prosedürlerin oluşturulması için biyoreaktör sistemlerinde çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

.

KAYNAKLAR

- Abdel-Monaim, M. F., 2011. Role of riboflavin and thiamine in induced resistance against charcoal rot disease of soybean. *African Journal of Biotechnology*, 10 (53) 10842-10855.
- Abenavoli, M. R., Sorgona, A., Sidari, M., Badiani, M., Fuggi, A., 2003. Cumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L cv. Saint Valery) cells in suspension culture. *J. Plant Physiol*, (160)227-237.
- Anonim, 2008. Riboflavin. *Alternative Medicine Review*, Vol. :13(4) Sayfa: 334-340.
- Anonim, 2013a. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Havu%C3%A7> (30.01.2013).
- Anonim, 2013b. [ww.arzumantohum.com /index.php](http://ww.arzumantohum.com/index.php) (30.01.2013).
- Anonim, 2013c. <http://www.food-info.net/tr/qa/qa-fi69.htm> (28.03.2013)
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.1-35.
- Bakowska-Barczak, A., 2005. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 14/55 (2) 107-116.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plant and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, (99) 191-203.
- Blando, F., Scardino, A.P., Bellis, L. D., Nicoletti, I., Giovino, G., 2005. Characterization of in vitro anthocyanin –producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Research International*, (38) 937-942.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, (161) 839-851.
- Briemann H. L., Setzer, W. N., Kaufman, P. B., Kirakosyan, A., Cseke L. J., 2006. Natural products from plants, *Phytochemicals: The Chemical Components of Plants*, Second Edition, Edited, Cseke L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S. L., Duke, J. A., Briemann, H.L., P 1-51.
- Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I., 2012a. Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-L-glutamine and insect saliva. *Enzyme and Microbial Technology*, (50) 29-34.

- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D., Smetanska, I., 2012b. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, (108) 401-409.
- Ceoldo, S., Levi, M., Marconi, A.M., Baldan, G., Giarola, M., Guzzo, F., 2005. Image analysis and in vivo imaging as tools for investigation of productivity dynamic in anthocyanin –producing cell cultures of *Daucus carota*. *New Phytologist*, 166 (339-352).
- Chan, L.K., Koay, S.S., Boey, P.L., Bhatt, A., 2010. Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*. *Biol Res.* (43)127-135.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. K., Bisaria, V.S., 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, (7) 138-149.
- Close, D. C., Beadle, C. L., 2003. The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69(2) 149-161.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N., 2006. Plant Secondary Metabolites : Occurrence, structure and role in the human diet. Phenol, polyphenols and tannins : an overview. Edited Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H., (1) 1-24.
- Çetin, E. S., 2010. Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimi üzerine araştırmalar. (Doktora tezi), Süleyman Demiral Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Çetin, E. S., Uzunlar, F., Baydar, N.G., 2011. UV-C uygulamasının Gamay üzüm çeşidine ait kalluslarda sekonder metabolit üretimi üzerine etkileri. *Gıda*, 36(6) 319-326.
- Davies, K.M., 2009. Anthocyanins, Biosynthesis, functions, and applications. Modifying anthocyanin production in flowers. Editors: Gould, K., Davies, K., Winefield, C. (3) 49-83.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O., 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. *Anthocyanins and betalains*. 8.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., Paredes-López, O., 2000. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains- characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3)173-289.
- Deng, B., Deng, S., Sun, F., Zhang, S., Dong, H., 2011. Down-regulation of free riboflavin content induces hydrogen peroxide and a pathogen defense in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, (77) 185-201.

- Derolles, S., 2009. Anthocyanins, Biosynthesis, functions, and applications. Anthocyanin biosynthesis in plant cell cultures: A potential source of natural colourants . Editors: Gould, K., Davies, K., Winefield, C. (5) 107-155.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stres-induced phenylpropanoid metabolism. American Society of Plant Physiologists, (7) 1085-1097.
- Ersus, S., Yurdagel, U., 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. Journal of Food Engineering, (80) 805-812.
- Galvano, F., Fauci, L.L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N. C., Tavazzi, B., Galvano, G., 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. Journal Nutritional Biochemistry, (15) 2-11.
- Gaosheng, H., Jingming, J., 2012. Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants, Recent Advances In Plant *In Vitro* Culture, Edited Leva, A., and Rinaldi, L. M. R. Chapter, 11.
- Ghosh, D., Konishi, T., 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. Asia Pac J Clin Nutr, 16(2) 200-208.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., 2001. Characterization and measrument of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, F1.2.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochemical Engineering Journal, (14) 217-225.
- Gläßgen, W. E., Rose, A., Madlung, J., Koch, W., Gleitz, J., Seitz, H. U., 1998. Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. Planta, (204) 490-498.
- Godoy-Hernández, G., Vázquez-Flota, F. A., 2006. Growth measurements. Estimation of cell division and cell expansion. Methods in Molecular Biology, vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition, Edited: Loyola-Vargas, V. M., Vázquez-Flota, F., 51-58.
- Grace, S. C., 2005. Antioxidants and Reactice Oxygen Species in Plats, Phenolics as antioxidants. Edited: Smirnoff, N., (4) 141-153.
- Guo, J., Han, W., Wang, M.H., 2008. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis. African Journal of Biotechnology, 7(25) 4966-4972.
- Gürel, S., Gürel, E., Kaya, Z., 2002. Establishment of cell suspension culture and plant regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Türk. J. Bot., (26) 197-205.

- Hatier, J.-H. B., Gould, K. S., 2009. Anthocyanins, Biosynthesis, functions, and applications. Anthocyanin function in vegetative organs. Editors: Gould, K., Davies, K., Winefield, C. (1) 1-19.
- Higa, A., Khandakar, J., Mori, Y., Kitamura, Y., 2012. Increased *de novo* riboflavin synthesis and hydrolysis of FMN are involved in riboflavin secretion from *Hyoscyamus albus* hairy root under iron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, (58) 166-173.
- Hollosy, F., 2002. Effect of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, (33) 179-197.
- Jiménez, V.M., Bangerth, F., 2001. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiologia Plantarum*, (111) 389-395.
- Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A., 2004. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties . *Eur Food Res Technol*, (219) 479–486.
- Karuppusamy, S., 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13) 1222-1239.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2000. Lipidler ve membran yapısı, *Biyokimya, Aktif yayınevi*, Sayfa 190.
- Keskin, N., Kunter, B., 2007. Erciş üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde UV ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, (4) 379-384.
- Khatami, F., Ghanati, F., 2011. Effect of UV irradiation on cell viability, anthocyanin, and flavonoid contents of callus-cultured *Malva neglecta* cells. *International Conference on life Science and Technology, IPCBEE 3*, Singapore.
- Kırca, A., 2004. Siyah havuç antosiyaninlerinin bazı meyve ürünlerinde ısıl stabilitesi (Doktora tezi) Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kırca, A., Özkan, M., Cemeroğlu, B., 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, (101) 212-218.
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P.F., Malone, D.M., 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, (59) 39-52.
- Kong, J-M., Chia, L-S., Goh, N-K., Chia, T-F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, (64) 923-933.
- Latif, Z., Nasir, I. A., Riazuddin, S., 2007. Indigenous production of synthetic seeds in *Daucus carota*. *Pak. J. Bot.*, 39(3) 849-855.

- Li, H., Kurata, K., 2005. Static suspension culture of carrot somatic embryos. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(3) 300-302.
- Liu, W., Yang, Q., 2012. Effects of supplemental UV-A and UV-C irradiation on growth, photosynthetic pigments and nutritional quality of pea seedlings. *Acta Hort.*, (956) 657-663.
- Li, F-X., Jin, Z-P., Zhao, D-X., Cheng, L-Q., Fu, C-X., Ma, F., 2006. Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucreata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin. *Phytochemistry* (67) 553-560.
- Liu, F., Wei, F., Wang, L., Liu, H., Zhu, X., Liang, Y., 2010a. Riboflavin activates defense responses in tobacco and induces resistance against *Phytophthora parasitica* and *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, (74)330-336.
- Liu, W., Liu, C., Yang, C., Wang, L., Li, S., 2010b. Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation, *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.55.
- Maharik, N., Elgengaihi, S., Taha, H., 2009. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* boiss. *International Journal of Academic Research*, 1-1.
- Mahdavian, K., Ghorbanli, M., Kalantari Kh M., 2008. The effect of ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annulum* L. *Turk. J. Bot.* (32) 25-33.
- Mazid, M., Khan, T. A., Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2) 232-249.
- Mazza, G., 2007. Anthocyanins and heart health. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 43(4) 369-374.
- Miyanaga, K., Seki, M., Furusaki, S., 2000. Quantitative determination of cultured strawberry-cell heterogeneity by image analysis: effects of medium modification on anthocyanin accumulation. *Biochemical Engineering Journal*, (5)201-207.
- Montilla, E. C., Arzaba, M. R., Hillebrand, S., Winterhalter, P., 2011. Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *Atrorubens* Alef.) cultivars antonina, beta sweet, deep purple, and purple haze. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (59) 3385-3390.
- Mori, T., Sakurai, M., 1995. Effects of riboflavin and increased sucrose on anthocyanin production in suspended strawberry cell cultures. *Plant Science*, (110)-147-153.
- Mori, T., Sakurai, M., 1996. Riboflavin affects anthocyanin synthesis in nitrogen culture using strawberry suspended cells. *Journal of Food Science* (61) 698-702.
- Mulabagal, V., Tsay, H.S., 2004. Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International journal of Applied Science and Engineering*, 2 (1) 29-48.

- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*(15) 473-497.
- Nagamori, E., Hiraoka, K., Honda, H., Kobayashi, T., 2001. Enhancement of anthocyanin production from grape (*Vitis vinifera*) callus in a viscous additive – supplemented medium. *Biochemical Engineering Journal* (9) 59-65.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacognosy Reviews*, (1) 1.
- Narayan, M.S., Venkataraman, L.V., 2000. Characterisation of anthocyanins derived from carrot (*Daucus carota*) cell culture. *Food Chemistry*, (70) 361-363.
- Nascimento, N. C., Fett-Neto, A. G., 2010. Plant Secondary Metabolism Engineering, Methods and Applications, Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation :An Overview. Edited: Fett-Neto, A. G., *Methods in Molecular Biology* 643, (1)1-13.
- Nasibi, F., M-Kalantari, K.H., 2005. The effects of UV-A, UV-B and UV-C on protein and ascorbate content, lipid peroxidation and biosynthesis of screening compounds in *Brassica napus*. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction*, (29)-1.
- Netzel, M., Netzel, G., Kammerer, R. D., Schiber, A., Carle, R., Simons, L., Bitsch, I., Bitsch, R., Konczak, I., 2007. Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, (89) 365-372.
- Ouyang , M., Ma, J., Zou, M., Guo, J., Wang, L., Lu, C., Zhang, L., 2010. The photosensitive *phs1* mutant is impaired in the riboflavin biogenesis pathway. *Journal of Plant Physiology*, (167)1466-147 6.
- Ozeki, Y., 1996. Regulation of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultured cells. *J. Plant. Res*, (109) 343-351.
- Qu, J., Zhang, W., Yu, X., 2011. A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, (107)261-269.
- Quina, F. H., Moreira, F. P., Giongo, C. V., Rettori, D., Rodrigues,R.F., Freitas, A.A., Silva, P.f., Maçanita, A.L., 2009. Photochemistry of anthocyanin and their biological role in plant tissues. *Pure. Appl. Chem.* 81(9)1687-1694.
- Rajendran, L., Ravishankar, G.A., Venkataraman, L. V., Prathiba, K.R., 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stres and osmoticum. *Biotechnology Letters*, (14) 707-712.
- Ramachandra, R. S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, (20) 101-153.

- Ramawat, K. G., 2007. Biotechnology :Secondary Metabolites, Secondary plant products in nature. Edited: Ramawat, K. G., Merillon, L.M., (2) 21.
- Ravindran, K.C., Indrajith,A., Pratheesh, P.V., Sanjiviraja, K., Balakrishnan, V., 2010. Effect of ultraviolet –B radiation on biochemical and antioxidant defence system in *Indigofera tinctoria* L.seedlings. International Journal of Engineering, Science and Technology, 2(5)226-232.
- Saikia, R., Yadav, M., Varghese,S., Singh, B. P., Gogoi, D.K., Kumar, R., Arora, D.K., 2006. Role of riboflavin in induced resistance against *Fusarium* wilt and charcoal rot diseases of chickpea. Plant Pathol. J., 22(4) 339-347.
- Sasson, A., 1991. Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures : biotechnological and economic aspects. Options Méditerranéennes, (14) 59-74.
- Saw, N.M.M.T., Riedel, H., Cai, Z., Kütük, O., Smetanska, I., 2012. Stimulation of anthocyanin synthesis in grape (*Vitis vinifera*) cell cultures by pulsed electric field and ethephon. Plant Cell Tiss Organ Cult., (108)47-54.
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B.S., 2010. An alternate method of natural drug production: Elciting secondary metabolite production using plant cell culture. Journal of Plant Sciences, 5(3) 222-247.
- Simões, C., Bizarri, C. H. B., Cordeiro, L. S., Castro, T.C., Coutada, L. C. M., Silva, A.J.R., Albarello, N., Mansur, E., 2009. Anthocyanin production in callus culture *Cleome rosea* : Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. Plant Physiology and Biochemistry, (47) 895-903.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Sekonder metabolit üretimi, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.211-261.
- Strazzer, P., Guzzo, F., Levi, M., 2011. Correlated accumulation of anthocyanins and rosmarinic acid in mechanically stressed red cell suspensions of basil (*Ocimum basiliucum*). Journal of Plant Physiology, (168) 288-293.
- Sudha, G., Ravishankar, G. A., 2003a. Influence of putrescine on anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* mediated through calcium ATPase. Acta physiologiae plantarum, (25) 69-75.
- Sudha, G., Ravishankar, G.A., 2003b. Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and involvement of calcium channel modulators.Current Science (84) 6.
- Suvarnalatha, G., Rajendran, L., Ravishankar, G.A., Venkataraman, L. V., 1994. Elicitation of anthocyanin production in cell cultures of carrot (*Daucus carota* L) by using elicitors and abiotic stress. Biotechnology Letters, 16(12) 1275-1280.

- Taha, H.S., Abd El-Rahman, R.A., Fathalla, M.K., Aly, U.E., 2008. Successful application for Enhancement and production of anthocyanin pigment from calli cultures of some ornamental plants. *Australian Journal of Basic Applied Sciences*, 2(4)1148-1156.
- Takeda, J., 1990. Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension: II effects of light and 2,4-D on induction and reduction of enzyme activities related to anthocyanin synthesis. *J. Exp. Bot.*, 41(6): 749-755.
- Takeda, J., Abe, S., 1992. Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension-IV. The action spectrum. *Photochemistry and Photobiology*, 56 (1) 69-74.
- Tassoni, A., Durante, L., Ferri, M., 2012. Combined elicitation of methyl-jasmonate and red light on stilbene and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, (169) 775-781.
- Tolonen, A., 2003. Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of *Hypericum perforatum* L. and *Rhodiola rosea* L. Faculty of Science, University of Oulu.
- Tsormpatsidis, E., Henbest, R.G.C., Davis, F.J., Battey, N.H., Hadley, P., Wagstaffe, A., 2008. UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce "Revolution" grown under polyethylene films. *Environmental and Experimental Botany*, (63) 232-239.
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S. M., Lin, C.Y., Tsay, H.S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (45) 1-22.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. s. 1-32.
- Verpoorte, R., 2000. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Edited: Verpoorte, R., Alfermann A.W., Chapter 1.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* (1) 13-25.
- Vijaya S. N., Udayasri P., Aswani kumar V.V. Y., Ravi Babu B., Phanin kumar Y., Vijay V. M., 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. (3) 112-123.
- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. *Türk Bilimsel Derlemler Dergisi*, 1 (1) 47-58.
- Yau, Y.-Y., Davis, S.J., İpek, A., Simon, P.W., 2008. Early identification of stable transformation events by combined use of antibiotic selection and vital detection of green fluorescent protein (GFP) in carrot (*Daucus carota* L.) callus. *Agricultural Sciences in China*, 7 (6) 664-671.

- Yin, Y., Borges, G., Sakuta, M., Crozier, A., Ashihara, H., 2012. Effect of phosphate deficiency on the content and biosynthesis of anthocyanins and the expression of related genes in suspension-cultured grape (*Vitis* sp.) cells. *Plant Physiology Biochemistry*, (55)77-84.
- Younis, M.B., Hasaneen, M. N. A.-G., Abdel-Aziz, H. M. M., 2010. An enhancing effect of visible light and UV radiation on phenolic compounds and various antioxidants in broad bean seedlings. *Plant Signaling & Behavior*, 5 (10) 1197-1203.
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., Franco, C., 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, (162) 459-468.
- Zhang, W., Furusaki, S., 1999. Production of Anthocyanins by plant cell cultures. *Biotechnol Bioprocess Eng.*, (4) 231-252.
- Zhang, W.J., Björn, L.O., 2009. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants, *Fitoterapia* (80)207–218.
- Zhang, Z-Z., Li, X-X., Chu, Y-N., Zhang, M-X., Wen, Y-Q., Duan, C-Q., Pan, Q-H., 2012. Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of anthocyanins in grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry*, (57) 74-83.
- Zhong, J-J., 2001. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. Edited: Scheper, T., (72) 1-26.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : İlhami KARATAŞ
Doğum Tarihi ve Yer : 28.03.1983 Artova
Medeni Hali : Evli ve bir çocuk babası
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0538 302 8348
e-mail : ilhamik60@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı	2007
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2003
Lise	Gaziosmanpaşa Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2004-2006	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi
2006-2008	Sağlık Bakanlığı	Memur
2008-	Tokat Halk Sağlığı Müdürlüğü Halk Sağlığı Laboratuvarı	Uzm. Biyolog

Yayınlar

Karataş, İ., Öztürk, L., Demir, Y., Ünlükara, A., Kurunç, A., Düzdemi, O., 2012. Alterations in antioxidant enzyme activities and proline content in pea leaves under long-term drought stress. Toxicology and Industrial Health, 1-8.

Öztürk, L., Demir, Y., Ünlükara, A., **Karataş, İ.**, Kurunç, A., Düzdemi, O., 2012. Effects of long-term salt stress on antioxidant system, chlorophyll and proline contents in pea leaves. Romanian Biotechnological Letters, (17) 3.

Karataş, İ., Öztürk, L., Erşahin, Y., Okatan, Y., 2010. Effects of auxin on photosynthetic pigments and some enzyme activities during dark-induced senescence of *Tropaeolum leaves*. Pak. J. Bot., 42(3): 1881-1888.

Ulus, Y., Öztürk, L., **Karataş, İ.**, Maydanoz (*Petroselinium hottense*) bitkisinde kadmiyum stresinin antioksidant enzim aktiviteleri üzerine etkileri. 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007 Malatya.

Karataş, İ., Öztürk, L., Ulus, Y., *Tropaeolum majus* L. yapraklarında senesens sürecinde sentetik ve doğal oksin hormonlarının klorofil, nişasta, protein miktarları ve enzim aktiviteleri üzerine etkisinin incelenmesi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, 16-30 Haziran 2006 Kuşadası/Aydın.