

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ANTOSİYANİN İÇEREN *Hibiscus sabdariffa* L., *Ocimum basilicum* L. ve
ENDEMİK *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. TÜRLERİNDE *IN VITRO* VE *IN*
VIVO KOŞULLARDA TOPLAM ANTOSİYANİN VE ANTİOKSİDAN
DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Gülsün TAVALI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ANTOSİYANİN İÇEREN *Hibiscus sabdariffa* L., *Ocimum basilicum* L. ve
ENDEMİK *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. TÜRLERİNDE *IN VITRO* VE *IN
VIVO* KOŞULLARDA TOPLAM ANTOSİYANİN VE ANTİOKSİDAN
DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Gülsün TAVALI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTOSİYANİN İÇEREN *Hibiscus sabdariffa* L., *Ocimum basilicum* L. ve
ENDEMİK *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. TÜRLERİNDE *IN VITRO* VE *IN*
VIVO KOŞULLARDA TOPLAM ANTOSİYANİN VE ANTIOKSİDAN
DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

Gülsün TAVALI
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez BİLİMSEL ARTAŞTIRMALAR KOORDİNASYON MERKEZİ (BAP)
tarafından FYL-2025-6786 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTOSİYANİN İÇEREN *Hibiscus sabdariffa* L., *Ocimum basilicum* L. ve
ENDEMİK *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. TÜRLERİNDE *IN VITRO* VE *IN*
VIVO KOŞULLARDA TOPLAM ANTOSİYANİN VE ANTİOKSİDAN
DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

Gülsün TAVALI
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

Bu tez 17/07/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Esin ARI (Danışman)

Prof. Dr. Serpil TANGOLAR

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

ÖZET

ANTOSİYANİN İÇEREN *Hibiscus sabdariffa* L., *Ocimum basilicum* L. ve ENDEMİK *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. TÜRLERİNDE *IN VITRO* VE *IN VIVO* KOŞULLARDA TOPLAM ANTOSİYANİN VE ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

Gülsün TAVALI

Yüksek Lisans, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Esin ARI

Temmuz 2025; 87 sayfa

Bu tez çalışmasında, bitki biyoteknolojisi alanında doku kültürü teknikleri kullanılarak antosiyanin içeren üç farklı bitki türünde (*Hibiscus sabdariffa*, *Ocimum basilicum* ve endemik *Ricotia carnosula*) antosiyanin ve antioksidan bileşiklerin *in vitro* koşullarda üretim potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Sekonder metabolit üretiminin artırılması, özellikle doğal renklendirici ve antioksidan kaynaklarının sürdürülebilir şekilde elde edilmesi açısından önem arz etmektedir. Çalışma hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda yürütülmüş olup, deneysel süreç; bitkisel materyal üretimi, kallus indüksiyonu ve metabolit analizleri olmak üzere 3 ana aşamadan oluşturulmuştur.

In vitro koşullarda gerçekleştirilen kallus kültürü denemeleri; çeşitli ortam bileşenleri (bazal ortam, BGD tip ve konsantrasyonu), kültür koşulları (aydınlık/karanlık) ve farklı eksplant tiplerinin kallus oluşumu, kallus kalitesi, köklenme, antosiyanin ve antioksidan üretimi üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. *H. sabdariffa* türünde en yüksek kallus proliferasyonu 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin BGD kombinasyonunda gerçekleşmiş olup, bu ortam aynı zamanda sınırlı düzeyde de olsa antosiyanin üretimini desteklemiştir. İlginç şekilde, *in vitro* kallus örneğinden elde edilen antioksidan miktarı, *in vivo* örneğe kıyasla daha yüksek bulunmuştur. *O. basilicum* türünde karanlık koşullarda ve büyük yaprak eksplantlarında daha yüksek düzeyde antosiyanin üretildiği belirlenmiş; 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin BGD kombinasyonundan elde edilen kallus örneği en yüksek antioksidan aktivitesini sağlamıştır. *R. carnosula* da ise hem antosiyanin miktarı hem de antioksidan kapasitesi doğadan toplanan kotiledonlarda daha yüksek olmakla birlikte, *in vitro* örnekler içinde antosiyanin ve antioksidan üretimi en fazla *in vitro* fidelerin kotiledonlarında tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular, doku kültürü tekniklerinin seçilen bitki türüne bağlı olarak sekonder metabolit üretiminde güçlü bir araç olabileceğini göstermiştir. Özellikle antioksidan kapasitesinin artırılması açısından *in vitro* yöntemler umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. Bu bağlamda, çalışmanın bulguları doğal biyoaktif bileşiklerin sürdürülebilir üretimi konusunda biyoteknolojik uygulamalara katkı sağlama potansiyeline sahiptir. Ayrıca, gen ekspresyon analizleri ve farklı elisitörlerin kullanımıyla yapılacak ileri düzey çalışmalar, bu alandaki üretim verimliliğini daha da artırma potansiyeline sahiptir.

ANAHTAR KELİMELEER: Antioksidan, Antosiyanin, Bitki doku kültürü, Hibiskus, *In vitro* sekonder metabolit retimi, Reyhan, *Ricotia carnosula*

JÜRİ: Prof. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Serpil TANGOLAR

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK



ABSTRACT

COMPARATIVE ANALYSIS OF TOTAL ANTHOCYANIN AND ANTIOXIDANT LEVELS IN ANTHOCYANIN-CONTAINING SPECIES *Hibiscus sabdariffa* L., *Ocimum basilicum* L. AND ENDEMIC *R. carnosula* Boiss. & Heldr. UNDER *IN VITRO* AND *IN VIVO* CONDITIONS

Gülsün TAVALI

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Esin ARI

July 2025; 87 pages

This thesis aimed to investigate the *in vitro* production potential of anthocyanin and antioxidant compounds in three different anthocyanin-containing plant species (*Hibiscus sabdariffa*, *Ocimum basilicum*, and the endemic *Ricotia carnosula*) using tissue culture techniques in the field of plant biotechnology. Increasing secondary metabolite production is particularly important for the sustainable production of natural colorant and antioxidant sources. The study was conducted both *in vitro* and *in vivo*, and the experimental process consisted of three main stages: plant material production, callus induction, and metabolite analyses.

Callus culture experiments carried out under *in vitro* conditions revealed the effects of medium components (basal medium, PGR type and concentration), culture conditions (light/dark) and explant type on callus formation, callus quality, rooting, anthocyanin and antioxidant production. In *H. sabdariffa* species, the highest callus proliferation occurred in the PGR combination of 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin and this also supported anthocyanin production, albeit to a limited extent. Interestingly, the amount of antioxidants obtained from the *in vitro* callus sample was found to be higher compared to the *in vivo* sample. In *O. basilicum* species, it was determined that higher levels of anthocyanin were produced under dark conditions and in large leaf explants. The callus sample obtained from the PGR combination of 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin provided the highest antioxidant activity. In *R. carnosula*, both anthocyanin amount and antioxidant capacity were higher in cotyledons collected from nature, while in *in vitro* samples the highest anthocyanin and antioxidant production was detected in the cotyledons of *in vitro* seedlings.

The findings demonstrate that tissue culture techniques can be a powerful tool for secondary metabolite production, depending on the selected plant species. *In vitro* methods have shown promising results, particularly in terms of increasing antioxidant capacity. In this context, the study's findings have the potential to contribute to biotechnological applications for the sustainable production of natural bioactive compounds. Furthermore, future studies incorporating gene expression analysis and elicitor treatments have the potential to further increase production efficiency in this area.

KEYWORDS: Antioxidant, Anthocyanin, Basil, *In Vitro* Secondary Metabolite Production, Plant Tissue Culture, Roselle, *R. carnosula*.

COMMITTEE: Prof. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Serpil TANGOLAR

Assoc. Prof. Dr. Aysun ÖZÇELİK



ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, bitki biyoteknolojisinin doku kültürü teknikleri alanındaki *in vitro* sekonder metabolit üretimi üzerinedir. Çalışmanın ana materyallerini antosiyanin içeren üç bitki türü (*Hibiscus sabdariffa* L., *Ocimum basilicum* L. ve endemik *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr) oluşturmaktadır. Çalışma hem *in vitro* hem *in vivo* koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile *in vitro* sekonder metabolit üretimi yoluyla 3 bitki türünün farklı örneklerinden elde edilebilecek antosiyanin miktarlarının karşılaştırılması ve böylece gıda, boya vb. endüstrilerin kullanabileceği alternatif doğal renklendirici ve antioksidan kaynaklarının sağlanması hedeflenmektedir.

Bu tezin yürütülmesinde ve tamamlanmasında beni destekleyen, laboratuvar çalışmalarında bütün imkânları sunarak, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Esin ARI'ya şükran ve saygılarımı sunarım.

Tez savunma jürimde yer alarak değerli tavsiye ve yorumlarıyla tezime son şeklini verilmesini sağlayan, kıymetli hocalarım Prof. Dr. Serpil TANGOLAR (Çukurova Üniversitesi) ve Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK (Akdeniz Üniversitesi)'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili kardeşlerim doktora öğrencisi Ahmet İZMİRLİ (Akdeniz Üniversitesi) ve Dr. Ahmad Ratib SHARAFAT (Seyyid Cemaleddin Afgani Üniversitesi)'a teşekkürlerimi sunarım.

Bitkisel materyal temininde yardımcı olan Dr. Ahu ÇINAR'a, BATEM'e ve Kırcami Fide'ye, antioksidan ve antosiyanin analizlerimi gerçekleştiren Öğr. Gör. Dr. Emrah EROĞLU (Akdeniz Üniversitesi)'na ve tezin yazım aşamasında desteğini esirgemeyen sevgili ablam Zir. Yük. Müh. Aylin ZAMBAK ÖZGÜR ve Yüksek Lisans öğrencisi Emine NAMAL (Akdeniz Üniversitesi)'a şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans öğrenim sürecimde desteklerini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Öğretim Üyelerine ve proje desteği sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her döneminde gerek maddi gerek manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili eşim Doç. Dr. İsmail Emrah TAVALI (Akdeniz Üniversitesi)'ya ve bu zorlu süreçte hedefime ulaşmam için beni motive eden sevgili çocuklarım Selami ve Mustafa'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	5
2.1. Antosiyaninlerin ve antioksidanların <i>in vitro</i> üretimi	5
2.1.1. <i>H. sabdariffa</i> türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için <i>in vitro</i> çalışmalar.....	5
2.1.2. <i>O. basilicum</i> türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için <i>in vitro</i> çalışmalar.....	9
2.1.3. <i>R. carnosula</i> türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için <i>in vitro</i> çalışmalar.....	12
2.2. Antosiyaninlerin ve antioksidanların <i>in vivo</i> üretimi	13
2.2.1. <i>H. sabdariffa</i> türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için <i>in vivo</i> çalışmalar.....	13
2.2.2. <i>O. basilicum</i> türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için <i>in vivo</i> çalışmalar.....	16
2.2.3. <i>R. carnosula</i> türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için <i>in vivo</i> çalışmalar.....	20
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. <i>In vitro</i> kültür çalışmaları	23
3.1.1. <i>H. sabdariffa</i> 'da <i>in vitro</i> kültür çalışmaları	23
3.1.2. <i>O. basilicum</i> 'da <i>in vitro</i> kültür çalışmaları	28
3.1.3. <i>R. carnosula</i> 'da <i>in vitro</i> kültür çalışmaları	34
3.2. <i>In vivo</i> kültür çalışmaları	38
3.2.1. <i>H. sabdariffa</i> 'da <i>in vivo</i> kültür çalışmaları	39

3.2.2. <i>O. basilicum</i> 'da <i>in vivo</i> kültür çalışmaları.....	39
3.2.3. <i>R. carnosula</i> 'da <i>in vivo</i> kültür çalışmaları.....	39
3.3. Antosiyanin ve antioksidan analizleri	40
3.3.1. Örneklerin hazırlanması.....	40
3.3.2 Antosiyanin ve antioksidan analizi.....	41
3.4. İncelenen özellikler	42
3.5. İstatistik analizi.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. <i>In vitro</i> kültür çalışmaları bulguları.....	44
4.1.1. <i>H. sabdariffa</i> 'da <i>in vitro</i> kültür çalışmaları bulguları.....	44
4.1.2. <i>O. basilicum</i> 'da <i>in vitro</i> kültür çalışmaları bulguları.....	49
4.1.3. <i>R. carnosula</i> 'da <i>in vitro</i> kültür çalışmaları bulguları.....	57
4.2. <i>In vivo</i> kültür çalışmaları bulguları	61
4.3. Antosiyanin ve antioksidan bulguları.....	62
4.3.1. <i>H. sabdariffa</i> örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları	62
4.3.2. <i>O. basilicum</i> örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları	63
4.3.3. <i>R. carnosula</i> örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları	64
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇLAR	73
7. KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Antosiyanin İçeren *Hibiscus sabdariffa* L., *Ocimum basilicum* L. ve Endemik *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr Türlerinde *In Vitro* ve *In Vivo* Koşullarda Toplam Antosiyanin ve Antioksidan Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

17/07/2025

İmza

Gülsün TAVALI

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
g/L	: gram/litre
< / >	: büyüktür / küçüktür
mg/L	: Miligram/litre
°C	: Santigrad derece
***	: Önemli ölçüde
ö.d.	: Önemli değil

Kısaltmalar

BA	: Benzil adenin
BGD	: Bitki gelişim düzenleyicisi
B5	: B5 (Gamborg, 1968) besin ortamı
HCL	: Hidroklorik asit
IAA	: Indol-3-asetik asit
KIN	: Kinetin
KOH	: Potasyum hidroksit
MES	: 2-Morpholino ethane sulfonic asit
Mod MS	:Modifiye Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı
MS	: Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı
NAA	: Naftalen asetik asit
NN	: Nitsch ve Nitsch (1969) besin ortamı
TDZ	: Thidiazuron
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksi asetik asit
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. <i>H. sabdariffa</i> 'nın genel görünümü	21
Şekil 3.2. <i>O. basilicum</i> 'un genel görünümü	22
Şekil 3.3. <i>R. carnosula</i> Boiss. & Heldr. 'in genel görünümü	22
Şekil 3.4. Araştırmada kullanılan <i>H. sabdariffa</i> türünün bitkisel görüntüsü, tohumları ve kozalaklarından genel görünüm	23
Şekil 3.5. Tohum çimlendirme ortamında yetiştirilen <i>in vitro</i> hibiscus bitkileri ve kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan eksplantlar.	26
Şekil 3.6. Kallus indüksiyon ortamında kültüre alınan hibiskus sepallerinin görünümü	28
Şekil 3.7. Araştırmada kullanılan reyhan bitkileri ve tohumlarından genel görünüm	29
Şekil 3.8. Reyhan tohumlarında yüzey dezenfeksiyon işlemleri	30
Şekil 3.9. Tohum çimlendirme ortamında yetiştirilen <i>in vitro</i> reyhan bitkileri ve kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan eksplantlar	32
Şekil 3.10. <i>R. carnosula</i> türünün doğadaki bitki gelişimi ve tohumlarının görünümü...	35
Şekil 3.11. <i>In vitro</i> şartlarda ekilmiş <i>R. carnosula</i> tohumları ve bu tohumlardan oluşan fidelikler	36
Şekil 3.12. <i>R. carnosula</i> 'nın kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan kotiledon eksplantları	37
Şekil 3.13. <i>In vivo</i> kültür çalışmalarında yetiştirilen fideler. a), b) Hibiskus bitkileri; c) Reyhan fideleri d) <i>R. carnosula</i> fideleri.....	40
Şekil 4.1. Hibiskusta yapılan 2.grup kallus denemelerinde 10 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarının ortamlara verdiği tepkilere örnekler. Sol üstte sağa doğru; 1. ortam (MS Kontrol), 2. ortam (MS + 0.5 mg/L 2,4-D) 3. ortam (MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin), 4. ortam (MS + 0.5 mg/L IAA) , 5. ortam (MS + 0.5 mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin). Sol altta sağa doğru; 6. ortam (NN Kontrol), 7. ortam (NN + 0.5 mg/L 2,4-D) 8. ortam (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin), 9. ortam (NN + 0.5 mg/L IAA) , 10. ortam (NN + 0.5 mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin).	46
Şekil 4.2. Hibiskus kotiledonlarının kültüre alındığı 2.grup kallus indüksiyon ortamlarının oluşan kallusların rengi üzerindeki etkileri.	48
Şekil 4.3. Hibiskus 2.grup kallus denemelerinin 8.ortamında kültürden 6 ay sonra başlayan antosiyanin oluşum görüntüsü	48
Şekil 4.4. Reyhanda 1.kallus denemelerinde farklı kültür koşullarında elde edilen kalluslar; (a) Karanlıkta kültüre alınan küçük yaprak eksplantından oluşan kallus; (b) Aydınlighta kültüre alınan küçük yaprak eksplantından oluşan kallus.....	51
Şekil 4.5. Reyhanda 1.kallus denemelerinde karanlık kültür koşullarında farklı ortamlarda kültüre alınan farklı eksplantlardan elde edilen antosiyaninli kallus oluşumları; a) hipokotilden oluşan kallus; b) büyük yapraktan oluşan kallus; c) kotiledondan oluşan kallus; d) küçük yapraktan oluşan kallus.....	53
Şekil 4.6. Reyhanda 2.kallus denemelerinde karanlık kültür koşulunda farklı ortamlarda kültüre alınan büyük yaprak eksplantlarından oluşan kallus görüntüleri. Yukarıda soldan	

sağa doğru; 1. (MS kontrol ortamı), 2. (MS + 0.5 mg/L 2,4-D), 3. (MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin) ortamda; aşağıda soldan sağa doğru, 4. (NN kontrol ortamı), 5. (NN + 0.5 mg/L 2,4-D) ve 6. (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2mg/L Zeatin) ortamlardaki kalluslar	55
Şekil 4.7. Reyhanda yapılan 2.grup kallus denemelerinde farklı kallus indüksiyon ortamlarının kallus renk oluşumu üzerine etkileri	56
Şekil 4.8. <i>In vitro</i> yaprak üretimi için <i>in vitro</i> şartlarda yetiştirilen reyhan fideleri	57
Şekil 4.9. <i>R. carnosula</i> da 2. grup kallus denemelerinde meydana gelen kallus ve antosiyanin oluşumları; a) 5.ortamda oluşan kalluslar, b) 6.ortamda oluşan antosiyanin başlangıcı görüntüsü, c) 5.ortamda oluşan antosiyaninleşme, d) 5.ortamda oluşan kallusdaki antosiyaninlerin görüntüsü.	59
Şekil 4.10. <i>R. carnosula</i> da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 2. grup kallus indüksiyon ortamlarının kallus renk oluşumu üzerine etkileri.....	60
Şekil 4.11. <i>In vitro</i> kotiledon üretimi için <i>in vitro</i> şartlarda yetiştirilen <i>R. carnosula</i> fideleri	61
Şekil 4.12. <i>In vivo</i> kültür şartlarında yetiştirilip kurutulan antosiyaninli örneklerin kurutulma önce ve sonrası görüntüleri; a-b) Hibiskus kozalaklarına ait sepaller, c-d) Reyhanda büyük yapraklar, e-f) <i>R. carnosula</i> kotiledon yaprakları	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Hibiskus tohum çimlendirme ortamlarının içerikleri	24
Çizelge 3.2. Çalışmada tohum çimlendirme ve kallus denemelerinde kullanılan temel besin ortamlarının içerikleri ve konsantrasyonları (mg/L).....	25
Çizelge 3.3. <i>H. sabdariffa</i> türünde 1.grup kallus induksiyon ortamları içerikleri	26
Çizelge 3.4. <i>H. sabdariffa</i> türünde 2.grup kallus induksiyon ortamları içerikleri	27
Çizelge 3.5. <i>O. basilicum</i> 'da yapılan tohum yüzey dezenfeksiyonu optimizasyon denemesindeki uygulamaların ayrıntıları	30
Çizelge 3.6. <i>O. basilicum</i> 'da 1., 2. ve 3.grup tohum çimlendirme ortamlarının içerikleri	31
Çizelge 3.7. Reyhanda 1.grup kallus induksiyon ortamında kültüre alınan farklı eksplantlar ve kültür koşulları	33
Çizelge 3.8. Reyhanda 2.grup kallus induksiyon ortamlarının içerikleri	34
Çizelge 3.9. <i>R. carnosula</i> 'da kullanılan tohum çimlendirme ortamlarının içerikleri	35
Çizelge 3.10. <i>R. carnosula</i> da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 1. grup kallus induksiyon ortamlarının içerikleri ve kültür şartları	37
Çizelge 3.11. <i>R. carnosula</i> da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 2. grup kallus induksiyon ortamlarının içerikleri ve kültür şartları	38
Çizelge 4.1. Hibiskusda 1.grup kallus denemelerinde farklı ortam ve eksplant ile bu faktörlerin interaksyonunun kallus oluşumu ve kallus çapı üzerine etkileri.....	45
Çizelge 4.2. Hibiskus 2.grup kallus denemelerinde kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı on farklı induksiyon ortamının kallus oluşumu, kallus çapı, kök oluşumu, kök sayısı/eksplant ile yaş ve kuru kallus ağırlığı üzerine etkileri	46
Çizelge 4.3. Farklı yüzey dezenfeksiyonu uygulamalarına tabi tutulduktan sonra farklı çimlendirme ortamlarına ekilen <i>O. basilicum</i> tohumlarının çimlenme ve kontaminasyon oranları (%)	50
Çizelge 4.4. Reyhanda yapılan 1.grup kallus denemelerinde eksplant ve kültür koşulu faktörlerinin toplam kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu ve kallus çapı üzerine bağımsız ve interaksyonel etkileri.....	52
Çizelge 4.5. Reyhanda yapılan 2.grup kallus denemelerinde farklı kallus induksiyon ortamlarının kültüre alınan büyük yapraklarda kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu, kallus çapı, kök oluşumu, kök sayısı/eksplant, kallus kuru ve yaş ağırlığı üzerine etkileri.....	54
Çizelge 4.6. <i>R. carnosula</i> da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 1. grup kallus induksiyon ortamlarının kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu ve kallus çapı üzerindeki etkileri.....	58
Çizelge 4.7. <i>R. carnosula</i> da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 2. grup kallus induksiyon ortamlarının kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu, kallus çapı, kök oluşumu, kök sayısı/eksplant, kallus yaş ve kuru ağırlıkları üzerindeki etkileri	58
Çizelge 4.8. <i>H. sabdariffa</i> örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları	63
Çizelge 4.9. <i>O. basilicum</i> örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları	64

Çizelge 4.10. *R. carnosula* örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları ...65



1.GİRİŞ

Bitkiler, temel besin maddeleri olan karbonhidratlar, proteinler ve yağların ana kaynağını oluşturdukları için insanların beslenmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Bu bileşikler, primer metabolitler olarak adlandırılır. Bunun yanı sıra, ilaç, kimya, gıda, kozmetik ve tarım gibi çeşitli sektörlerde ekonomik öneme sahip bazı kimyasal bileşikler de bitkilerden elde edilmektedir. Bu bileşikler ise sekonder metabolitler olarak bilinmektedir.

Primer ve sekonder metabolitler hem bitkilerin hayatta kalması hem de insan sağlığı ve endüstri için önemli katkılar sunmaktadır. Primer metabolitler, bitkilerin büyüme, gelişim, fotosentez ve solunum gibi temel yaşamsal süreçlerinde rol oynarken, sekonder metabolitler daha çok çevresel faktörlere adaptasyon, savunma mekanizmaları ve bitkiler arası iletişim gibi işlevleri yerine getirir (Karataş 2013). Özellikle flavonoidler sınıfına ait sekonder metabolitler, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı bitkilerin dayanıklılığını artırarak, tozlaşmayı teşvik etmek, UV radyasyonuna karşı koruma sağlamak ve herbivorları caydırmak gibi ekolojik roller üstlenmektedir (Close ve Beadle 2003).

Sekonder metabolitler arasında yer alan antosiyaninler, flavonoidlerin bir alt grubunu oluşturur ve bitkilerde çiçek, meyve ve yaprak renklerinin oluşumunda temel rol oynar. Antosiyaninler sadece bitkilerin çevresel streslere karşı dayanıklılığını artırmakla kalmaz, aynı zamanda insan sağlığı açısından da önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Antioksidan, anti-enflamatuar, antiviral, anti-alerjik ve antikarsinojenik etkileri sayesinde kronik hastalıkların önlenmesine katkıda bulunur (Ghosh ve Konishi 2007). Ayrıca, antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stresi azaltarak hücre hasarını engelleyebilir ve bağışıklık sistemini destekleyerek kalp hastalıkları ve kanser gibi rahatsızlıkların riskini azaltabilir (Karakaya ve El 2006). Gıda endüstrisinde de antioksidanlar, gıdaların raf ömrünü uzatmak, doğal renklendirici olarak kullanmak ve besinlerin tat ile aroma stabilitesini artırmak amacıyla tercih edilmektedir.

Tüketici eğilimlerinin doğal ve sağlıklı ürünlere yönelmesiyle birlikte, gıda endüstrisinde sentetik renklendiricilerin yerini doğal bileşikler almaya başlamıştır. Bu bağlamda, bitkisel kaynaklı antosiyaninler, doğal renklendirici olarak önemli bir potansiyel sunmaktadır. Antosiyaninler, özellikle kırmızı, mavi ve mor renkteki meyve ve sebzelerde değişen oranlarda bulunur ve bitkilerde yaygın olarak rastlanan flavonoid bileşikler arasında yer alır (Gürkaynak 2022). Kimyasal olarak, flavilyum katyonu yapısına sahip olan antosiyaninler, genellikle glikozit formunda bulunur (Ghosh ve Konishi 2007). Bitkilerde en sık karşılaşılan antosiyanin türleri arasında siyanidin, delfinidin, malvidin, peonidin, pelargonidin ve petunidin yer almaktadır. Antosiyaninlerin çeşitliliği, moleküler yapıdaki hidroksil gruplarının sayısı, metilasyon derecesi ve bağlı şeker türleri gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Kong vd. 2003).

Bitki doku kültürü teknikleri, antosiyaninler gibi değerli sekonder metabolitlerin *in vitro* koşullarda üretimini sağlayarak, doğal renklendiricilerin sürdürülebilir bir şekilde elde edilmesine imkân sunmaktadır. Bu bağlamda, antosiyanin ve antioksidan bileşiklerin *in vitro* üretimi hem bilimsel hem de ticari açıdan büyük bir öneme sahiptir. Bu tez çalışmasında, antosiyanin içeren üç farklı bitki türünden elde edilen antosiyaninlerin *in*

vitro üretim potansiyelleri ve bunların antioksidan değerlerinin araştırılarak ve bu bitkilerin *in vivo* koşullarda üretilen antosiyanin ve antioksidanları ile karşılaştırılarak başta gıda endüstrisinde doğal renklendirici olarak kullanılabilecek alternatif bitkisel kaynakların geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Hibiscus sabdariffa L. ve *Ocimum basilicum* L. türleri Türkiye’de kültürü yapılan yüksek antioksidan içeriğine sahip bitkiler arasında sayılabilir. Kültürü henüz yapılmayan endemik *R. carnosula* Boiss. & Heldr türü ise alternatif bir antosiyaninli bitki potansiyeli taşımaktadır. Bu 3 türden *Hibiscus sabdariffa* L. (roselle) Malvaceae familyasına ait bir tür olup, Afrika kökenli olmasına rağmen tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak yetiştirilen bir bitkidir (Moser vd. 2021). Bu türün çiçekleri, içerdiği fenolik bileşikler ve antosiyaninler nedeniyle dikkat çekmektedir (Maciel vd. 2018). *H. sabdariffa* özütlerinde bulunan delphinidin-3-sambubioside ve siyanidin-3-sambubioside gibi antosiyanin bileşenleri; hipertansiyon, inflamasyon, karaciğer hastalıkları, diyabet ve metabolik sendrom gibi sağlık sorunlarına karşı çeşitli farmakolojik etkiler göstermektedir (Guardiola ve Mach 2014).

H. sabdariffa, tek ya da çok yıllık bir bitki olup, 2–2.5 metreye kadar büyüeyebilen bir form sergilemektedir (Wang vd. 2012). Yaprakları, 3-5 loblu ve 8-15 cm uzunluğunda olup, gövdesi kırmızı renklidir (Mohamed vd. 2007). Bitkinin çiçeklenme döneminde elde edilen çiçek kaliksleri; polifenoller, flavonoidler ve organik asitler açısından zengin olup, başta bitkisel içecekler, reçeller, şekerlemeler ve fermente içecekler olmak üzere çeşitli gıda ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Da-Costa-Rocha vd. 2014). Kurutulmuş *H. sabdariffa* çiçekleri, yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde gıda endüstrisinde doğal renklendirici olarak giderek artan bir öneme sahiptir. Bu nedenle, çalışmamızda tercih edilen 3 türden biri olan *H. sabdariffa* türünün *in vivo* ve *in vitro* koşullarda üretilen antosiyanin ve antioksidan değerlerinin karşılaştırılarak gıda, boya vb. sektörlerde doğal renklendirici kullanımına yönelik olarak *in vitro* antosiyanin üretiminin bir alternatif olup olmayacağının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda tercih edilen 3 bitki türünden ikincisi olan fesleğen (*Ocimum basilicum* L.), Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasının üyesi olup, yaklaşık 65 farklı türü içeren bir bitki cinsine aittir (Karaca 2017). *Ocimum* türleri, Türkiye’de genellikle fesleğen veya reyhan olarak adlandırılmaktadır. Fesleğen (*O. basilicum*), tropikal ve ılıman bölgelerde yayılış gösteren, Hindistan kökenli bir bitkidir. Türkiye’nin doğal florasında yer almamakla birlikte, özellikle kuru ve sıcak iklim koşullarında çok kolaylıkla yetiştirilmektedir. Tek yıllık, otsu bir bitki olan fesleğen bitkisi 20-60 cm uzunluğa erişebilir. Yaprakları yumuşak dokulu, yeşilin farklı tonlarında ve 1-5 cm uzunluğunda olup çiçekleri beyaz, pembe veya mor renklere olabilir. Bu bitkinin mor renkli yapraklara sahip varyeteleri halk arasında "reyhan" olarak bilinmektedir (Telci vd. 2015). Fesleğen, zengin fenolik bileşik içeriğiyle dikkat çeken bir bitki olup kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, kafur ve çeşitli polifenoller içermektedir. Bu bileşenler sayesinde fesleğen, güçlü bir doğal antioksidan olarak değerlendirilmektedir (Baydar 2019). Mor fesleğen ise Lamiaceae familyasında yer alan türler arasında en yüksek kikorik asit içeriğine sahip bitkilerden biridir (Telci vd. 2015).

Mor reyhanın karakteristik mor rengini, yapraklarında ve çiçeklerinde yoğun olarak biriken siyanidin, peonidin ve antosiyanin bileşenleri oluşturmaktadır. Bu antosiyanin içeriği, mor reyhanın antioksidan kapasitesini artıran temel faktörlerden biridir.

Türkiye'de özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'nde yaygın olarak yetiştirilmektedir (Telci vd. 2005; Flanigan ve Niemeyer 2014; Szymanowska vd. 2015).

Tıbbi ve aromatik bitkiler, geleneksel ve modern tıpta hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesinde önemli rol oynayan doğal bileşenler içermektedir (Marshall 2011). Mor reyhan da zengin sekonder metabolit içeriği sayesinde yalnızca farmakoloji alanında değil, aynı zamanda gıda ve kozmetik endüstrisinde de geniş bir kullanım alanına sahiptir (Telci vd. 2006). Mor reyhan genellikle çay veya şerbet olarak tüketilirken, içerdiği antosiyaninler sayesinde gıda sektöründe doğal koruyucu ve renklendirici olarak da değerlendirilmektedir. Sentetik koruyuculara kıyasla kalıntı bırakmaması ve doğal olması, bu bitkiyi gıda güvenliği açısından önemli bir alternatif haline getirmektedir. Ayrıca, tıbbi ve aromatik bitkilerde bulunan uçucu yağların antimikrobiyal etkisi sayesinde fesleğen, gıdaların raf ömrünü uzatmada da etkili olmaktadır (Telci 2005). Fesleğen yaprakları, mutfakta salatalardan soslara, makarnalardan çorbalara ve deniz ürünlerine kadar geniş bir yelpazede lezzet ve aroma verici olarak kullanılmaktadır (Esetlili vd. 2014).

Mor reyhanın çeşitli biyolojik etkileri üzerine yapılan araştırmalar, bitkinin fonksiyonel faydalarını ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalar, reyhanın uykusuzluk sorunlarına iyi geldiğini, iştah açıcı özellik gösterdiğini, balgam söktürücü ve diüretik etkiler sunduğunu göstermektedir. Ayrıca, antiseptik ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu ve kadınlarda menstrual döngünün düzenlenmesine yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Akgül 1993). Türkiye'de 2013 yılında Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığının yayılması üzerine yapılan bir araştırmada, fesleğenin hastalığı taşıyan kene türüne karşı doğal bir koruyucu olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Demirtaş vd. 2013).

Mor reyhan, içerdiği uçucu yağlar sayesinde insektisit ve antifungal özellikler göstererek ilaç endüstrisinde de önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olarak değerlendirilmektedir. Yüksek antosiyanin içeriği nedeniyle gıda sektöründe doğal gıda katkı maddesi, doğal renklendirici ve koruyucu olarak büyük bir potansiyel taşımaktadır (Simon vd. 1999; Adıgüzel vd. 2005). Reyhanın fenolik bileşenleri arasında flavonlar ve tanenler önemli bir yer tutmakta olup, bu bileşenler bitkinin güçlü antioksidan etkisini desteklemektedir. Fenolik bileşikler, oksidasyona duyarlı bileşenleri koruyarak antioksidan özellik göstermektedir (Çelebi 2010). Flanigan ve Niemeyer (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, mor reyhanın yüksek miktarda rosmarinik asit, şikorik asit ve kaftarik asit gibi fenolik bileşikler içerdiği rapor edilmiştir. Özellikle rosmarinik asidin, mor reyhanda en güçlü antioksidan etkiye sahip fenolik bileşik olduğu belirlenmiştir. Bu tür araştırmalar, fesleğen yetiştiriciliği ve ıslahı çalışmalarının bilimsel ve ticari açıdan giderek daha fazla önem kazanmasına neden olmaktadır (Telci 2005).

Fesleğen bitkisinden ekstrakte edilen flavonoidler, flavon ve flavonol alt gruplarında yer almakta ve genellikle glikozile edilmiş türevler olarak elde edilmektedir. Grayer vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, *O. basilicum*'un yapısında baskın bileşenler olarak leteolin, kuersetin, kemferol ve apigenin flavonoidlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bileşenler, bitkinin antioksidan kapasitesini artırarak sağlık açısından

önemli katkılar sunmaktadır. Tüm bu özellikler, fesleğenin sağlık, gıda ve kozmetik sektörlerinde giderek artan bir öneme sahip olmasına katkıda bulunmaktadır.

Çalışmamızda tercih edilen 3 bitki türünün sonuncusu ise Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'nde doğal olarak yetişen ve Brassicaceae familyasına ait olan *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr., endemik bir bitki türüdür. Nikelce zengin, eğimli ve kayalık bölgelerde yetişen *R. carnosula*; boyu 20-30 cm arasında değişen bir bitki olup, çiçeklenme dönemi ise Mart-Nisan aylarına denk gelir (Arı 2010).

R. carnosula Akdeniz Bölgesi'ne özgü olup, Türkiye florasında özellikle Antalya, Muğla ve Osmaniye illerinde yayılış göstermektedir (Davis 1965). Ayrıca, bu bitkinin özellikle serpantin anakayalar üzerinde ve *Pinus brutia* (kızılçam) altı kayalık alanlarda yayılım gösterdiği bildirilmiştir (Özüdoğru 2015). Sarpantin kayalar, endemizm açısından zengin habitatlar olarak bilinir ve dünya genelinde bu tür kayalar üzerinde birçok endemik bitki türünün varlığı tespit edilmiştir (Brooks 1987; Kruckeberg 2023).

R. carnosula'da yapılan sekonder metabolit analizlerinde; reductoroz, saponin, nitrojen bileşenleri, flavonoidler, taninler, lipidler ve siyanojenetik glikozitler gibi bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir (Arı 2010). Ayrıca, *R. carnosula*'nın yüksek antioksidan içeriği ve nörobiyolojik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar, bu türün önemli farmakolojik etkilere sahip olabileceğini ortaya koymuştur (Orhan vd. 2015; Orhan vd. 2016).

Bu tez çalışması, bitki biyoteknolojisinin doku kültürü teknikleri alanındaki *in vitro* sekonder metabolit üretimi üzerinedir. Çalışmanın ana materyallerini antosiyanin içeren üç bitki türü (*H. sabdariffa*, *O. basilicum* ve endemik *R. carnosula*) oluşturmaktadır. Çalışma hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda gerçekleştirilmiştir. *In vitro* çalışmalar üç aşamalı olup, ilk aşamada intakt bitki kültürü ile bu bitkilerin *in vitro* koşullarda eksplant kaynağı olarak kullanılacak stok bitki materyalleri, *in vitro* fideler tohum çimlendirme yoluyla üretilmiştir. İkinci aşamada, üretilen bu *in vitro* bitkiciklerin çeşitli eksplantları kullanılarak kallus denemeleri kurulmuştur. Bu denemelerde; besin ortamları, bitki gelişim düzenleyicileri (BGD'ler) ve kültür koşulları optimize edilerek, hedef metabolit (antosiyanin) üretim miktarı en üst düzeye çıkarılmaya çalışılmıştır. Üçüncü aşamada ise, *in vitro* denemelerden elde edilen bitki materyalleri ile bu arada *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitki örneklerinin toplam antosiyanin ve antioksidan içerik miktarları laboratuvar analizleri ile belirlenmiştir. Bu son aşamada ayrıca hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda elde edilen metabolit miktarları birbiri ile kıyaslanmıştır. Bu çalışma ile *in vitro* sekonder metabolit üretim tekniği kullanılarak farklı bitki türlerinden elde edilebilecek antosiyanin miktarının artırılması ve gıda, boya vb. endüstrilerinin kullanabileceği alternatif doğal renklendirici ve antioksidan kaynaklarının sağlanması hedeflenmiştir.

2.KAYNAK TARAMASI

Antosiyaninler doğal renklendirici ve antioksidan özellikleriyle endüstriyel ve tıbbi açıdan büyük önem taşıyan sekonder metabolitlerdir (Khoo vd. 2017). Ancak geleneksel tarım yöntemleriyle metabolit üretiminde; mevsimsel değişkenlik, çevresel bağımlılık ve verim kısıtlamaları gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Bitki biyoteknolojisinde, özellikle *in vitro* doku kültürü teknikleri, kontrollü koşullarda sekonder metabolit üretimini artırarak geleneksel yetiştiriciliğin sınırlamalarını aşma potansiyeli sunmaktadır (Espinosa-Leal vd. 2018). Bu tez çalışmasında antosiyanin içeren, üç farklı bitki türünde (*H. sabdariffa*., *O. basilicum* ve endemik *R. carnosula*) antosiyanin ve antioksidan üretimi için *in vitro* sistemlerin kapasitesi araştırılmıştır. Öte yandan bu türlerin *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitki örneklerinin antosiyanin ve antioksidan içerikleri belirlenmiş ve *in vitro* koşullara ait verilerle kıyaslanmıştır.

Bu araştırma, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda elde edilen antosiyanin ve antioksidan profillerini karşılaştırarak, endüstriyel ölçekli pigment üretimi için alanındaki boşlukları doldurmayı amaçlamaktadır. Böylece, mümkün olması halinde laboratuvar tabanlı yenilikler ile tarımsal pratiği birleştirerek, gıda, ilaç, boya vb. sektörler için doğal renklendirici ve antioksidan kaynaklarına yönelik yeni alternatiflerin sunulması hedeflenmiştir. Literatür taramalarına göre bu türlerde ve bu konuda daha önce yapılan çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

2.1. Antosiyaninlerin ve antioksidanların *in vitro* üretimi

2.1.1. *H. sabdariffa* türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için *in vitro* çalışmalar

Mizukami vd. (1988), farklı bitki hormonlarının hibiskus (*H. sabdariffa*) kallus kültürlerinin büyümesi ve antosiyanin sentezi üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma yürütmüştür. Araştırmalarında kullanılan bitki materyali, çimlenmekte olan hibiskus tohumlarından elde edilen kallus dokularından oluşmuştur. Bu kalluslar, 1 μ M 2,4-D ve 1 μ M kinetin ilave edilmiş Linsmaier ve Skoog (1965) besin ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada, 2,4-D, naftalin asetik asit (NAA), indol-3-asetik asit (IAA) ve indol-3-bütirik asit (IBA) dahil olmak üzere farklı oksinlerin kallus gelişimi ve antosiyanin biyosentezi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hibiskus kallus dokusundan antosiyanin pigmentlerinin ekstraksiyonu ve izolasyonu, Harborne (1984) tarafından tanımlanan yöntemler izlenerek gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, pigment analizinde iki boyutlu selüloz ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemini kullanmışlardır. Pigment I ve Pigment II olarak adlandırılan iki ana antosiyanin pigmentinin yanı sıra, iz miktarda bazı minör pigmentler de tanımlanmıştır. Pigment I (1 mg) ve Pigment II (12 mg), 1 gram dondurularak kurutulmuş kallus dokusundan izole edilmiş ve TLC analizi ile saf oldukları doğrulanmıştır. Sonuçlar, 2,4-D'nin hem kallus gelişimini hem de antosiyanin sentezini anlamlı derecede artırdığını ve diğer test edilen oksinlere kıyasla antosiyanin üretiminde 15 ila 30 kat artış sağladığını ortaya koymuştur. En yüksek antosiyanin verimi, kültür ortamında 1 μ M 2,4-D'nin 0.1 veya 1 μ M kinetin ile kullanılmasıyla elde edilmiştir. Buna karşılık, giberellik asidin antosiyanin biyosentezi üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, oksinlerin, özellikle 2,4-D'nin, hibiskus kallus kültürlerinde hem hücre büyümesi hem de sekonder metabolit birikimini teşvik etmedeki hayati rolünü vurgulamaktadır.

Mizukami vd. (1991), hibiskus (*H. sabdariffa*) kallus kültürlerinde farklı kültür koşullarının antosiyanin sentezi ve hücre büyümesi üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma yapmıştır. Elde ettikleri bulgular, %3 konsantrasyonunda sükrözün hem kallus hem de süspansiyon kültürlerinde büyüme ve sekonder metabolit sentezi için optimal olduğunu göstermiştir. Ayrıca, azot miktarının önemi araştırılmıştır; NH_4^+ ile NO_3^- arasındaki 1:4 mol oranı, antosiyanin üretimi için en etkili oran olarak belirlenmiştir. En yüksek antosiyanin içeriği, 12–30 mM arasındaki azot konsantrasyonlarında gözlemlenmiş, ancak daha yüksek azot seviyeleri antosiyanin birikimini azaltmıştır. Maksimum hücre büyümesi, 80 mM potasyum nitratin tek azot kaynağı olarak kullanıldığı durumda gerçekleşmiştir. Bitki doku kültürlerinde antosiyanin üretimi, karbon ve azot kaynakları, fosfat seviyeleri ve makro besin maddelerinin takviyesi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Fosfat seviyelerinin, antosiyanin ve diğer fenolik bileşiklerin üretimini azaltan yüksek fosfat konsantrasyonları ile sekonder metabolizmanın önemli bir düzenleyicisi olduğu bulunmuştur. Ayrıca, FeSO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 ve mio-inositol gibi makro besin maddeleri kallus gelişimi ve antosiyanin birikimini etkilemiştir. Bunlar arasında, FeSO_4 özellikle önemli olup, hem büyüme hem de antosiyanin içeriği 0.05–0.10 mM FeSO_4 'te zirve yapmıştır. Bu bulgular, bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit üretimini optimize etmek için doğru besin ortamı içeriğinin önemini vurgulamaktadır.

Abeda vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, *H. sabdariffa* (Roselle) kallus kültürlerinde kontrollü *in vitro* koşullar altında antosiyanin üretiminin optimize edilmesi için yöntemler araştırılmış ve çeşitli BGD'ler ile antosiyanin biyosentezi arasındaki etkileşim vurgulanmıştır. Bitki materyali kaynağı olarak 7 günlük fide kullanılarak, kotiledon ve hipokotil eksplantları, kallus oluşumu ve antosiyanin birikimini indüklemek için farklı konsantrasyonlarda oksin (2,4-D) ve sitokinler (BAP veya kinetin) ile takviye edilmiş Murashige ve Skoog (MS 1962) ortamında kültüre alınmıştır. Kallus gelişimi, klasik oksin-sitokin oranı prensibine uygun olarak gerçekleşmiş ve 1 mg/L 2,4-D ile 1 mg/L BAP kombinasyonu, özellikle kotiledon kaynaklı eksplantlarda kallus büyümesini maksimize etmek için optimal olarak belirlenmiştir. Ancak, kallus büyümesi, üçüncü alt kültürde zirveye ulaşmış ve ardından önemli derecede düşüş göstermiştir, bu da tekrarlanan alt kültürlerde sürdürülebilir biyokütle üretiminin sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Dikkat çekici bir şekilde, antosiyanin sentezi, kallus büyümesiyle ters orantılı bir ilişki göstermiştir; gelişme hızları azalan kültürler, daha yüksek pigment verimi sergilemiştir. En yüksek antosiyanin içeriği (15.23 mg/g), 1 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L kinetin kombinasyonu kullanılarak elde edilmiştir, oysa BAP ile 2,4-D kombinasyonu antosiyanin üretimini baskılamış, sitokin türlerinin sekonder metabolit biyosentezi üzerindeki farklı etkilerini vurgulamıştır. HPLC analizi, kallusta altı antosiyanin tespit etmiştir, bunlar arasında ana bileşenler olarak siyandinin 3-O-sambubiozid, delphinidin 3-O-sambubiozid ve malvidin 3-O-glukozid yer almakta olup, ara ve küçük bileşikler olarak delphinidin 3-O-glukozid ve siyandinin 3-O-glukozid bulunmuştur. İlginç bir şekilde, kallusta tespit edilen iki antosiyanin, daha önce Roselle petallerinde rapor edilmemiştir ve bu durum *in vitro* sistemlerin, bitki dokularından farklı yeni fitokimyasal profiller oluşturma potansiyelini vurgulamaktadır. Bulgular, bitki *in vitro* sistemlerinin biyolojik aktif bileşik üretimi için yapılan araştırmalarla uyumlu olup, antosiyanin biyosentezinin uygun BGD'lerin düzenlenmesi ve biyokütle birikimi ile metabolit sentezi arasındaki dengeyi daha iyi anlamamıza olanak tanımaktadır. Kültür koşullarını optimize eden ve pigment üretimini destekleyen hormon kombinasyonlarını belirleyen Abeda vd.

(2014), *H. sabdariffa*'nın farmakolojik ve nutrasötik değerini iyileştirmek için biyoteknolojik yöntemlerin uygulanabilirliğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, kallus kaynaklı antosiyaninlerin antioksidan üstünlüğünü vurgulamış ve bitki doku kültürünün biyolojik aktif bileşiklerin hem miktarını hem de çeşitliliğini artırma potansiyelini göz önüne sermiştir. Bu durum, *H. sabdariffa*'nın doğal antioksidan üretimi için sanayi uygulamaları açısından umut verici bir aday olduğunu ortaya koymuştur.

Kouakou vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, *H. sabdariffa*'nın kaliks ve kallus dokularındaki antosiyaninlerin tanımlanması ve karşılaştırmalı antioksidan analizi incelenmiş, bitkinin doğal bir antioksidan kaynağı olarak potansiyeli vurgulanmıştır. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), metanol, trifluoroasetik asit ve siyandinin, delphinidin gibi antosiyanin standartları da dahil olmak üzere analiz derecesinde kimyasallar kullanılarak, kurutulmuş kalikslerden ve antosiyanin açısından zengin kallus hatlarından yapılan ekstraktlar üzerinde HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Agilent marka HPLC sistemi, ters faz C18 kolonuyla her iki bitki materyalinde de belirgin antosiyanin profilleri ortaya koymuştur. Kallus ekstraktlarında, başlıca bileşenler olarak siyandinin-3-O-sambubiozid ve delphinidin 3-O-glukozid başta olmak üzere altı antosiyanin bulunurken, kaliks ekstraktlarında, ağırlıklı olarak delphinidin 3-O-sambubiozid ve siyandinin-3-O-sambubiozid olmak üzere dört antosiyanin tespit edilmiştir. Dikkat çekici olarak, DPPH testleriyle değerlendirilen antioksidan aktivite, kallus kaynaklı antosiyaninlerde, kaliksten elde edilenlere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, *in vitro* kültür tekniklerinin antosiyanin çeşitliliğini ve verimini artırmadaki etkinliğini vurgulayarak, *H. sabdariffa*'nın diyet ve farmasötik değerini iyileştirmeye yardımcı olabileceğini göstermektedir. Çalışma, bitkinin güçlü bir doğal antioksidan kaynağı olduğunu ve biyoteknolojik yöntemlerin biyolojik aktif bileşik üretimini artırmadaki rolünü vurgulayarak, nutrasütik ve terapötik uygulamalar için umut verici alanlar sunduğunu belirtmektedir. Bu sonuçlar, bitki *in vitro* sistemlerini yüksek değerli fitokimyasalların sürdürülebilir üretimi için kullanma yönündeki çabalarla uyumludur ve *H. sabdariffa*'nın antioksidan araştırmalarındaki önemini pekiştirmektedir.

Medina vd. (2019) tarafından yapılan çalışma, *H. sabdariffa* kallus kültürlerinde antosiyanin üretiminin araştırılmasını daha da genişleterek, elisitasyon yöntemlerini optimize edilmesine ve pigment biyosentezinin geçici doğasının anlaşılmasına odaklanmıştır. Abeda vd. (2014) ve Kouakou vd. (2015) tarafından yapılan önceki çalışmalara dayanan bu araştırma, *in vitro* sistemlerinin antosiyanin çeşitliliğini ve verimini artırma potansiyelini ortaya koymuştur. Medina vd. (2019), biyotik elisitörlerin ve hormon kombinasyonlarının kallus indüksiyonu ve antosiyanin dinamiklerindeki rolünü incelemiştir. Tayland ekotipine ait aseptik fide kullanılarak kallus kültürleri, değişik konsantrasyonlarda 2,4-D ve kinetin ile desteklenmiş MS ortamında başlatılmıştır. Test edilen hormon kombinasyonları arasında, 1 ppm 2,4-D ve 2 ppm kinetin (T3) içeren uygulama, kallus indüksiyonunda etkili olmuş ve antosiyanin üretimi inokülasyondan iki hafta sonra geçici olarak gözlemlenmiştir. Çalışmanın yenilikçi bir yönü, antosiyanin sentezini uyarmak için biyotik bir elisitör olarak maya ekstresi kullanılmasıdır. 4 g/L (Y2) maya ekstresi, kallus büyüme oranlarını 10 kat artırmaya rağmen, elisitör konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, maya ekstresinin büyüme artırıcı rolünün doğrudan antosiyanin stabilitesiyle ilişkilendirilemeyeceğini göstermiştir. İlginç bir şekilde, antosiyanin üretimi yalnızca kalluslar, maya ekstresinin büyüme ortamına geri transfer

edildikten sonra gözlemlenmiştir. Bu da pigment sentezinin elisitör maruziyeti altında kararsız olduğunu vurgulamaktadır. İnce tabaka kromatografisi (TLC) analizi, sarı pigmentli kalluslarda klorojenik asitlerin varlığını ortaya koyarak, bu bileşiklerin antosiyanin biyosentez yolunda potansiyel öncüller olabileceğini öne sürmektedir. Ancak, antosiyanin birikiminin geçici doğası belirli alt kültür fazlarıyla sınırlı *in vitro* sistemlerde pigment üretiminin sürdürülebilirliğine dair zorlukları vurgulamaktadır. Bu kararsızlığa rağmen, çalışma, Roselle kallusunun antosiyanin sentezi için biyokimyasal yeterliliğini doğrulamış ve kallus büyümesi ile ikincil metabolit üretimi arasında ters ilişki bildiren önceki bulgularla uyumlu olmuştur. Ayrıca, biyotik elisitör uygulamasının bitki doku kültüründeki etkisinin anlaşılmasına katkı sağlamıştır. Maya ekstresi gibi biyotik elisitörlerin biyokütleyi artırabileceğini, ancak ikincil metabolit yolları üzerindeki etkilerinin doğru zamanlama ve kültür ayarlamaları gerektirebileceğini göstermiştir. Klorojenik asitlerin ara bileşikler olarak tanımlanması, *H. sabdariffa*'daki antosiyanin biyosentezinin metabolik çerçevesini daha da zenginleştirerek, hedeflenmiş metabolik mühendislik için yollar önermiştir. Bu çalışma, *in vitro* sistemlerin fitokimyasal profilleri manipüle etme potansiyelini vurgulayan önceki çalışmalarla uyumlu olup, antosiyanin verimlerini stabilize etmek için geliştirilmiş protokoller gerekliliğini vurgulamaktadır. Sonuç olarak bu bulgular, BGD oranları, elisitör uygulamaları ve alt kültürlerin dengeye konulmasının bitki doku kültürlerinde biyolojik aktif bileşik üretimini optimize etmedeki karmaşıklığını ortaya koymakta ve *H. sabdariffa*'yı doğal ürün araştırmalarında biyoteknolojik keşifler için önemli bir model olarak sunmaktadır.

Jirakiattiku vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada *H. sabdariffa* kallus kültürlerinde elisitör uygulamalarından biri olan, jasmonik asidin (JA) iki farklı roselle türünün [HS003 (turuncu-kırmızı kaliks) ve HS005 (koyu-kırmızı kaliksli)] antosiyanin, fenolik ve flavonoid üretimini artırmadaki rolünü araştırılmıştır. Hormonal ve biyotik elisitörler, örneğin maya ekstresi kullanan önceki araştırmalara (Abeda vd. 2014; Medina vd. 2019) dayanan bu çalışma, bitki stres yanıtlarında iyi bilinen bir sinyal molekülü olan JA'nın biyolojik aktif bileşik sentezini ve antioksidan aktiviteyi sistematik olarak artırmadaki etkinliğini göstermiştir. Her iki genotipin kallus kültürleri, MS ortamında 2,4-D ve 6-benziladenin ile desteklenmiş, JA 50 μM HS003 için ve 100 μM HS005 için 7–28 gün arasında farklı sürelerle uygulanmıştır. Sonuçlar, türlere özgü ve zamana bağlı tepkileri ortaya koymuştur: HS003, en yüksek antosiyanin birikimini (1.48 mg cyd-3-glu L^{-1} , 3.7 kat artış) 21. günde sergilerken, fenolikler ve flavonoidler daha erken, 14. günde zirveye ulaşmıştır (114.7 mg GAE g^{-1} ve 106.1 mg CE g^{-1} , sırasıyla 6.9 ve 18.6 kat artış). Buna karşılık HS005, optimal antosiyanin (0.86 mg cyd-3-glu L^{-1} , 6.6 kat artış), fenolik (48.01 mg GAE g^{-1}) ve flavonoid (21.41 mg CE g^{-1}) verimleri elde etmek için 100 μM JA'ya 28 gün süresince uzun süre maruz kalmayı gerektirmiştir. Bu da pigmentasyonlarıyla ilişkili türler arasındaki içsel metabolik farkları vurgulamaktadır. DPPH testiyle değerlendirilen antioksidan aktivite, tüm JA tedavilerinde sürekli olarak iyileşmiş ve bu iyileşme artan fitokimyasal seviyelerle korelasyon göstermiştir. Özellikle koyu kırmızı HS005 kallusu, biyolojik aktif bileşik birikiminde HS003'ü geride bırakmış ve Kouakou vd. (2015) tarafından yapılan gözlemlerle uyumlu olarak, Hibiskus dokularındaki daha koyu pigmentasyonun daha yüksek antosiyanin içeriği ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma, elisitör konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin türlere özgü özelliklere göre uyarlanması önemi vurgulayarak, Medina vd. (2019) tarafından maya ekstresi ile gözlemlenen geçici antosiyanin üretimi gibi önceki çalışmalarda belirtilen zorluklara çözüm getirmiştir. JA'yı stabil ve önemli fitokimyasal

iyileştirme için güçlü bir elisitör olarak belirleyen Jirakiattiku vd. (2021), ikincil metabolizma üzerindeki hormonal ve zamansal düzenlemeye dair önemli bilgiler sunmuş ve *in vitro* sistemlerin optimize edilmesi için ölçeklenebilir bir çerçeve sağlamıştır.

H. sabdariffa'da elde edilen bu bulgular, biyoteknolojik uygulamalarda elisitör yöntemlerinin potansiyelini pekiştirerek, metabolik mühendislik ile doğal antioksidanlara yönelik endüstriyel talepler arasındaki boşluğu doldurmakta ve bitki doku kültüründe ürün/bitki verimlerinin en üst düzeye çıkarılması için genotipe özgü protokollerin gerekliliğini vurgulamaktadır.

2.1.2. *O. basilicum* türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için *in vitro* çalışmalar

Mosadegh vd. (2018), farklı coğrafi kökenlere sahip fesleğen ekotipleri arasında fizyolojik ve metabolik farklılıklara odaklanarak fesleğenin (*O. basilicum*.) *in vitro* koşullardan yüksek UV-B ışınımına karşı tepkilerini incelemişlerdir. Çalışmada sterilize edilen tohumlar, %3 sukroz ve %1.2 Agar içeren, pH'ı 5.7'ye ayarlanmış MS ortamında çimlendirilmiştir. Tohumların çimlenmesini senkronize etmek amacıyla, 48 saat boyunca 4 °C'de soğuk uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Daha sonra, tohumlar 16 saatlik fotoperiyot ve 22 °C sıcaklıkta, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğundaki büyüme odasına aktarılmıştır. Beş günlük fideler, köklerin *in vitro* ortama maruz kalırken hava ile temas eden sürgünlerin UV-B ışınımına doğrudan maruz kalmasını sağlayan özel olarak geliştirilmiş bir "*in vitro-vivo* sistemine" aktarılmıştır. Bu sistemde, büyüme düzenleyicisi ve sukroz içermeyen agarlı MS ortamı ile doldurulmuş, modifiye edilmiş Falcon™ tüpleri kullanılmıştır. Her tüpün silindirik yüzeyine açılan iki delik aracılığıyla iki fide yerleştirilmiş, fidelerin sapları steril plastik hamurla kapatılmış ve tüpler yatay şekilde yerleştirilmiştir. Fidler, sabit 22 °C sıcaklıkta ve 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda 2 hafta boyunca büyütülmüştür. Bu deneyle, yüksek UV-B ışınımı altında klorofil a floresan parametrelerindeki değişimler ve yapraktaki rosmarinik asit (RA) içeriği değerlendirilerek fesleğen bitkilerinin koruyucu tepkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, dokuz farklı ekotip arasında UV-B toleransı açısından önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle OCI160, OCI142, OCI148, OCI30 ve OCI102 ekotiplerinde UV-B uygulaması sonrası RA birikiminde anlamlı artış gözlenmiştir. OCI160 ekotipi, en yüksek RA konsantrasyonuna sahip olmuş ve 48 saatlik UV-B uygulaması sonrasında 0.70 değeriyle en yüksek Fv/Fm oranını koruyarak, diğer ekotiplere kıyasla daha yüksek fotosentetik performans ve yaprak fonksiyonunun daha hızlı toparlanma yeteneği sergilemiştir. Bu bulgular, RA'nın UV emici bir bileşik olarak, yüksek UV stresine karşı bitkilerde fotoinhibitör ve fotooksidatif zararın azaltılmasında etkili bir mekanizma olduğunu ve fesleğende UV-B'ye adaptif yanıtların ekotipler arasında çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Nazir vd. (2020 a), *O. basilicum* kallus kültürlerinde melatonin ve UV-C ışınlanmasının fenilpropanoid metabolit profili ve antioksidan aktivite üzerindeki etkilerini abiyotik elisitörler olarak araştırmıştır. Çalışmada, UV-C ve melatoninin bireysel uygulamalarının genellikle kombinasyonlarına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle, 10 dakikalık UV-C uygulaması, kontrol grubuna kıyasla 2.3 kat artışla rosmarinik asit içeriğini (134.5 mg/g K.A.) önemli ölçüde artırmıştır. 50 dakikalık UV-C uygulaması ise chichoric asit ve siyanidin ile peonidin gibi antosiyaninlerin seviyelerini sırasıyla 4.1 ve 2.7 kat artırmıştır. Benzer şekilde, 1 mg/L melatonin uygulaması

rosmarinik asit üretimini en üst düzeye çıkarırken, daha yüksek konsantrasyonlar (2 mg/L) chichoric asit ve antosiyaninlerin birikimini artırmıştır. İlginç bir şekilde, 4 mg/L melatonin ile 20 dakikalık UV-C kombinasyonu, özellikle kafeik asit üretiminde etkili olmuştur. Antioksidan aktivite; DPPH, ABTS ve FRAP analizleri ile değerlendirilmiş ve en yüksek *in vitro* antioksidan aktivite UV-C (50 dk) uygulanan kültürlerde, özellikle ABTS analizinde gözlemlenmiştir. Bu durum, fesleğen kallus ekstraktlarından elde edilen antioksidanların hidrojen atomu transferi (HAT) mekanizmasıyla etkili olduğunu göstermektedir. Maya hücreleri kullanılarak yapılan hücresel antioksidan analizleri, bu antioksidan etkinin biyolojik geçerliliğini de doğrulamıştır. Bu çalışma, *in vitro* kültür koşullarının sekonder metabolit üretimini, özellikle antosiyaninler ve ilgili fenolik bileşiklerin artırılmasında sahip olduğu potansiyeli vurgulamakta olup, doku kültürü teknikleriyle antosiyanin verimini optimize etmeyi amaçlamaktadır.

Nazir vd. (2020 b) tarafından yürütülen başka bir çalışmada, *O. basilicum* (mor fesleğen) bitkisinin *in vitro* koşullarda fenilpropanoid bileşik üretimi ve antioksidan aktivitesi üzerine farklı ışık kalitelerinin etkisi araştırılmıştır. Deneysel çalışmada tohumlar %0.1 cıva klorür ve %70 etanol kullanılarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve pH'ı 5.6–5.7'ye ayarlanmış, %3 sükröz ve %0.8 agar içeren MS ortamında çimlendirilmiştir. 28 günlük *in vitro* fide yapraklarından (0.5 cm²) alınan eksplantlarla kallus kültürleri oluşturulmuş ve MS ortamına 2.5 mg/L NAA ilavesiyle kallus indüksiyonu sağlanmıştır. Bu hormon konsantrasyonu, kallus gelişimi için en uygun konsantrasyon oranı olarak belirlenmiştir. Kallus kültürleri kurulduktan sonra, beyaz ışık, karanlık, kırmızı, yeşil, mavi ve sarı ışık gibi farklı monokromatik ışık koşullarına 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. 16 saat ışık / 8 saat karanlık döngüsü (fotoperiyot) kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Işık şiddeti 40–50 µmol m⁻² s⁻¹ düzeyinde tutulmuş ve kültürler 49 gün boyunca izlenmiştir; her 7 günde bir örnekleme yapılmıştır. Mavi ışık uygulaması, kontrol grubuna kıyasla en yüksek biyokütle birikimi, toplam fenolik madde içeriği (TPC), toplam flavonoid içeriği (TFC) ve antioksidan aktiviteleri (DPPH, FRAP ve ABTS testleri ile) sağlamıştır. Ayrıca, mavi ışık süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesini artırırken, kırmızı ışık peroksidaz (POD) aktivitesini en fazla teşvik etmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri, karanlıkta yetiştirilen kallus kültürlerinde rosmarinik asit (87.62 mg/g kuru ağırlık), siyanidin (0.15 mg/g kuru ağırlık) ve peonidin (0.13 mg/g kuru ağırlık) içeriklerinin sırasıyla kontrol grubuna göre yaklaşık 1.55, 1.25 ve 1.18 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, kırmızı ışık en yüksek miktarda kikorik asit (14.65 mg/g kuru ağırlık) üretimini sağlamıştır. Çalışmada ayrıca fenolik ve flavonoid bileşik birikimi ile antioksidan aktiviteler arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ışık kalitesinin mor fesleğen bitkisinin *in vitro* kültürlerinde tıbbi açıdan değerli fenilpropanoid metabolitlerin biyosentezini ve antioksidan potansiyelini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

Nazir vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, Thai fesleğeni yapraklarından yüksek verimli biyokütle ve antioksidan açısından zengin kallus kültürlerinin salisilik asit (SA) ve çeşitli ışık rejimleri kullanılarak üretilmesi için etkili bir protokol geliştirilmesi amaçlanmıştır. Salisilik asit, bitkilerdeki birçok metabolik süreci etkileyerek sekonder metabolitlerin biosentezini etkileyen önemli bir bileşiktir. Çalışma, SA'nın farklı konsantrasyonlarının üç farklı ışık rejimi altında kallus kültürlerine uygulanarak sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. Sonuçlar, orta dereceli SA konsantrasyonu (10 µM) ile sürekli ışık uygulamasının, total fenolik içerik (18.7 ± 1.13

mg/g DW), flavonoid içerik (7.2 ± 0.21 mg/g DW), eugenol (0.56 ± 0.015 mg/g DW), rosmarinik asit (54.35 ± 1.85 mg/g DW), kikorik asit (64.46 ± 6.71 mg/g DW), siyanoidin (0.42 ± 0.021 mg/g DW) ve peonidin (0.32 ± 0.002 mg/g DW) üretimini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Fotoperiyod ve karanlık rejimleri ise metabolit üretimi açısından sürekli ışık uygulamasına göre daha düşük seviyelerde sonuç vermiştir. Ayrıca, fotoperiyod uygulaması ile $25 \mu\text{M}$ SA, en yüksek biyokütle birikimini üretmiş ve taze ağırlık (FW) 226.6 ± 3.91 g/L ile kuru ağırlık (DW) ise 16.44 ± 0.59 g/L olarak ölçülmüştür. Aynı zamanda kafeik asit üretimi (0.54 ± 0.025 mg/g DW) de gözlemlenmiştir. *In vitro* antioksidan testleri, DPPH ve ABTS ile yapılan analizler ve hücresel antioksidan kapasite, sürekli ışık tedavisi ve $10 \mu\text{M}$ SA uygulanan kallus kültürlerinde daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, kallus özütleri insan eritrositleri ile biyouyumluluk göstermiştir, bu da onların toksik olmayan doğasını ve alfa-amilaz inhibisyonuna karşı orta düzeydeki potansiyellerini göstermektedir, bu da glukoz seviyelerinin düzenlenmesine yardımcı olabilir. Ticari fesleğen yaprakları ile karşılaştırıldığında, kallus özütleri, kikorik asit ve rosmarinik asit üretiminde önemli ölçüde daha yüksek değerler ve daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Bu biyolojik sistem, sürekli biyokütle üretme kapasitesine sahip olup, terapötik amaçlarla değerli biyolojik bileşiklerin üretimi için yüksek potansiyel taşımaktadır. Bu çalışma, SA ve ışık gibi elisitörler kullanarak bitki kültürlerinde sekonder metabolit üretiminin optimize edilebileceğini vurgulayarak, sürdürülebilir bir alternatif olarak terapötik amaçlar için kullanılabilir biyolojik bileşiklerin üretimini ortaya koymaktadır.

Zaman vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada, *O. basilicum* (mor fesleğen) kallus kültürlerinde maya ekstresinin fenilpropanoid metabolitlerinin üretimi üzerindeki etkileri ve bunların potansiyel antioksidan özellikleri incelenmiştir. Çalışma, farmasötik açıdan önemli metabolitlerin, özellikle fenolik asitler ve antosiyaninlerin üretimini artırmayı amaçlamaktadır, çünkü bu bileşikler sağlık açısından değerli faydalara sahiptir. Tohumlar, %70 etanol ve %0.1 cıva klorür ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve ardından 3% sukroz ve %0.8 agar ile beslenen MS ortamına ekilmiştir. *In vitro* ortamda yetiştirilen bitkilerden alınan yaprak kesitleri, 2.5 mg/L NAA (1-naftalenasetik asit) içeren MS ortamında kallus kültürleri oluşturmak amacıyla kültürlenmiştir. Maya ekstresi hazırlamak için *Saccharomyces cerevisiae* su içinde çözülmüş, etanol ile işlenmiş ve 4°C 'de dört gün inkübe edilmiştir. Ekstrakt süzölmüş ve çeşitli konsantrasyonlarda ($1, 10, 25, 50, 100, 200$ ve 400 mg/L) MS ortamına eklenmiştir. 28 gün sonra, kalluslar hasat edilmiş ve kurutulmuş, taze ve kuru ağırlıklar kaydedilmiştir. Toplam fenolik içerik (TPC) ve toplam flavonoid içerik, belirli protokoller izlenerek değerlendirilmiş ve fitokimyasal bileşenlerin analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Sonuçlar, özellikle 100 mg/L konsantrasyonundaki maya ekstresinin biyokütle birikimini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir; taze ve kuru ağırlıklar kontrol grubuna göre yaklaşık 1,5 kat artmıştır. Artan biyokütle ile, bu maya ekstresi konsantrasyonu, toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinde de önemli bir artışa yol açmıştır. Antioksidan aktiviteleri, ABTS, FRAP ve DPPH testleriyle ölçüldüğünde de önemli ölçüde iyileşme gözlemlenmiştir. HPLC analizi, maya ekstresiyle işlenen kültürlerde rosmarinik asit, kikorik asit, peonidin ve siyanidin seviyelerinin kontrol grubuna göre neredeyse 1.9 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, eugenol ve chavicol gibi uçucu yağların konsantrasyonları da artmış; eugenol, 1.8 kat, chavicol ise 2.4 kat artmıştır. Bunun yanı sıra, antioksidan aktiviteleri ile toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinde pozitif bir korelasyon gözlemlenmiştir. Bu bulgular, maya

ekstresinin, *O. basilicum* kallus kültürlerinde farmasötik açıdan önemli metabolitlerin biyosentezini teşvik eden verimli bir elisitör olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Çalışma, maya ekstresinin, *O. basilicum*'daki değerli metabolitlerin üretiminin artırılmasında etkili bir strateji sunduğunu ve bunun terapötik ve ticari uygulamalar için önemli bir yöntem olabileceğini ortaya koymuştur.

2.1.3. *R. carnosula* türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için *in vitro* çalışmalar

Literatürdeki bilgilere göre, *Ricotia* türlerinde antosiyanin ve antioksidanların hem *in vitro* hem de *in vivo* üretimine odaklanan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Mevcut literatür kapsamlı bir şekilde taranmasına rağmen, bu konuyu kısmen ele alan yalnızca birkaç yayına ulaşılabilmektedir. Bu az sayıdaki çalışma, bazı fikirler sunmuş ve bu bölümde sunulan literatür derlemesi verilerini oluşturmuştur. Bu nedenle, özellikle *in vitro* kültür koşulları altında *Ricotia* türlerinde antosiyanin ve antioksidan bileşiklerin biyosentezi ve birikimine yönelik kapsamlı ve hedefe yönelik bir araştırmanın eksik olduğu açıkça söylenilebilir.

Literatürde rastlanan *R. carnosula*'daki tek ama son derece kapsamlı *in vitro* çalışma Demir (2020)'e aittir. Bu çalışmada, farklı rejenerasyon ortamlarının farklı eksplantlar üzerindeki etkileri araştırılmış ve hem sürgün hem de somatik embriyo oluşumları gözlemlenmiştir. Özellikle, kalluslarda ve rejenerantlarda yoğun antosiyanin birikimleri tespit edilmiştir. Doğal *R. carnosula* formlarında da zaman zaman görülebilen bu pigmentasyon özelliği, tüm *in vivo* ve *in vitro* çimlenme çalışmalarında kotiledonların alt yüzeylerinde tutarlı şekilde gözlemlenmiş ve bu durum, türde erken somatik embriyogenesis teşhisi için morfolojik bir belirteç potansiyelini ortaya koymuştur. Çalışmada yapılan varyans analizleri, eksplantlar ve ortamlar arasında rejenerasyon kapasiteleri bakımından anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir. Hipokotil eksplantları daha yüksek bir rejenerasyon oranı göstermiştir (%27.14) ve bu oran kotiledon eksplantlarına (%16.69) kıyasla belirgin şekilde fazladır olup, ayrıca kullanılan ortamın da önemli bir etkisi olmuştur. Test edilen ortam arasında, 0.5 mg/L NAA ve 0.5 mg/L TDZ içeren 47 numaralı ortam, özellikle kotiledon eksplantlarında (%81.25) en başarılı rejenerasyonu sağlamış; en yüksek genel rejenerasyon oranı ise (%93.75), 1 mg/L TDZ içeren 50 numaralı ortamda kültüre alınan hipokotil eksplantlarında elde edilmiştir. Antosiyanin üretimi de eksplant tipi ve ortam bileşimi tarafından anlamlı şekilde etkilenmiştir. Hipokotil kaynaklı rejenerantlar, kotiledon kaynaklı olanlara kıyasla üç kat daha fazla antosiyanin üretmiş ve 1 mg/L Zeatin içeren 71 numaralı ortam, rejenerantlarda en yüksek antosiyanin oluşumuna yol açmıştır. Hipokotil kaynaklı rejenerantlardaki maksimum antosiyanin içeriği, 31 numaralı ortamda (2 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA) elde edilmiştir. Kallus pigmentasyonu açısından, kotiledon eksplantları (%22.09) hipokotillere (%18.07) göre daha duyarlı olmuş ve ortam bileşimi yine anlamlı etki göstermiştir. Kalluslarda maksimum antosiyanin oluşumu (%100), hem kotiledon hem de belirli hipokotil koşullarında, 2 mg/L NAA + 2 mg/L TDZ içeren 69 numaralı ortam kullanılarak elde edilmiştir. Eksplant tipi ile kültür ortamı arasındaki etkileşim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çalışmada ayrıca BA'nın özellikle oksin varlığında antosiyanin üretimini güçlü şekilde uyardığı gözlenmiş, BA ve NAA içeren ortamların kalluslarda yüksek antosiyanin birikimine yol açtığı belirtilmiştir.

Görüldüğü gibi *R. carnosula*'dan yapılan *in vitro* çalışma çok kısıtlıdır. Bu

alandaki veri eksikliği, literatürde önemli bir boşluğu ortaya koymakta ve yürütülen çalışmanın özgünlüğünü ve önemini vurgulamaktadır. Bu nedenle, bu çalışma yalnızca *R.canasula* türünde sekonder metabolit üretimi çalışmalarına katkı sağlamayı amaçlamakla kalmayıp, aynı zamanda *Ricotia* cinsinde yapılabilecek antosiyanin ve antioksidan biyosentezi araştırmalarına temel oluşturmayı da hedeflemektedir.

2.2. Antosiyaninlerin ve antioksidanların *in vivo* üretimi

Bitkilerde antosiyaninler ve diğer antioksidanların *in vivo* üretimi, genetik, gelişimsel ve çevresel sinyallerin karmaşık bir ağı tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Petroni ve Tonelli 2011). Bitkilerde antosiyanin biyosentezi esas olarak sitoplazmada gerçekleşir ve ardından depolanmak üzere vakuole taşınır (Zhao vd. 2015). Bu biyosentetik yolak, özellikle chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ve anthocyanidin synthase (ANS) gibi enzimleri kodlayan yapısal ve düzenleyici genler tarafından kontrol edilir (Koes vd. 2005). Bu genlerin ifadesi, MYB-bHLH-WD40 (MBW) kompleksi olarak bilinen korunaklı bir transkripsiyon faktörleri grubu tarafından düzenlenir. Genotip farklılıkları veya çevresel etkiler nedeniyle bu transkripsiyon faktörlerinin etkinliğinde meydana gelen değişiklikler, bitkideki antosiyanin düzeylerini önemli ölçüde etkileyebilir (Allan vd. 2008). Işık şiddeti, sıcaklık, besin mevcudiyeti ve stres koşulları gibi çevresel faktörler, antosiyaninler ve antioksidanların *in vivo* birikimini güçlü bir şekilde etkiler. Örneğin, yüksek ışık maruziyeti ve düşük sıcaklıklar, üzüm, elma ve mor mısır gibi birçok bitki türünde antosiyanin üretimini artıran iyi belgelenmiş etmenlerdir (Chalker-Scott, 1999; Jaakola 2013). Benzer şekilde, yaralanma, patojen enfeksiyonu veya kuraklık gibi biyotik ve abiyotik stres faktörleri de antioksidanla ilişkili yolları olumlu yönde düzenleyerek antosiyaninler ve diğer fenolik bileşiklerin sentezinin artmasına neden olabilir (Nakabayashi vd. 2014). Antosiyaninlerin yanı sıra, bitkiler askorbik asit (C vitamini), glutatyon, karotenoidler ve flavonoller gibi çok çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar üretirler. Bu bileşikler birlikte bitkinin redoks homeostazı ve savunma mekanizmalarına katkı sağlar (Mittler 2002). Özellikle antosiyaninler ve diğer flavonoidler, metal iyonlarını şelatlayabilir ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyerek hücrel hasarı önleyebilir (Agati vd. 2012). Antosiyaninlerin besinsel ve farmakolojik faydaları, onların *in vivo* üretiminin artırılmasına yönelik ıslah, genetik mühendislik ve tarımsal uygulamalarla ilgili araştırma ilgisinin artmasına neden olmuştur. Geleneksel ıslah yöntemleri, doğal olarak daha yüksek pigment içeriğine sahip çeşitlerin seçilmesinde kullanılırken, modern biyoteknolojik stratejiler, temel biyosentetik genlerin aşırı ifade edilmesini veya olumsuz düzenleyicilerin baskılanmasını hedefler. Örneğin, mısır ve diğer bazı bitkilerde Lc geninin (bir MYC transkripsiyon faktörü) aşırı ifade edilmesi, vejetatif ve generatif dokularda antosiyanin birikiminin artmasına yol açmıştır (Borevitz vd. 2000).

2.2.1. *H. sabdariffa* türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için *in vivo* çalışmalar

Tsai vd. (2002), *H. Sabdariffa* türüne ait F141 çeşidinin taç yapraklarında antioksidan aktivite ile antosiyanin içeriği arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Taç yapraklar Tayvan'ın Taitung bölgesinden toplanmış, 50 °C'de 36 saat boyunca kurutulmuş ve ardından 25 °C'de ekstraksiyona kadar saklanmıştır. Sulu ekstrakt, 3 gram kurutulmuş taç yaprağının 300 mililitre suda 3 dakika kaynatılmasıyla

hazırlanmıştır. Ekstrakt daha sonra Büchner hunisi ile hızlıca süzölmüş, buz üzerinde soğutulmuş ve analiz öncesinde 4 °C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmada, roselle ekstraktının antioksidan kapasitesini değerlendirmek amacıyla ferrik indirgeme gücü (FRAP), oksijen radikali absorpsiyon kapasitesi (ORAC) ve toplam antioksidan durumu (TAS) gibi çeşitli antioksidan analizleri kullanılmıştır. Antosiyanin içeriğı (520 nm’de absorbans ile ölçölmüş) ile antioksidan kapasite arasında pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir. Özellikle FRAP analizi ile antosiyanin konsantrasyonu arasında güçlü bir doğrusal ilişki tespit edilmiş ve bu durum antosiyaninlerin ekstraktın antioksidan özelliklerine önemli ölçüde katkı sağladığını göstermiştir. FRAP ile ORAC ve TAS analizleri arasında yapılan karşılaştırmalar da doğrusal ilişkiler göstermiştir, bu da antosiyaninlerin merkezi rolünü pekiştirilmiştir. Ekstraktın Amberlite XAD-2 reçinesi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile daha ileri saflaştırılması sonucunda, bireysel bileşiklerin antioksidan kapasiteye katkıları belirlenmiştir. Antosiyaninlerin toplam antioksidan kapasitenin yaklaşık %51’ini, kahverengi bir pigmentin ise yaklaşık %24’ünü oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, farklı işleme sıcaklıkları ve depolama sürelerinin ekstrakt bileşimi üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Bu koşullar altında antosiyanin seviyeleri azalmasına rağmen, diğer fenolik bileşiklerin arttığı ve genel olarak toplam fenolik içeriğinde ve antioksidan aktivitede sadece küçük bir azalma meydana geldiğı bulunmuştur. Bu bulgular, *H. sabdariffa* ekstraktında antosiyaninlerin önemli antioksidanlar olduğunu ortaya koyarken, aynı zamanda diğer fenolik bileşiklerin de genel antioksidan potansiyele katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Barrios vd. (2018), Meksika’nın Michoacán eyaletine bağılı Cajones bölgesinde kuru koşullar altında gerçekleştirdikleri çalışmada, *H. sabdariffa* bitkisinin, özellikle Reina Roja genotipinin besin içeriğı ve tarımsal özellikleri üzerine bakır (Cu) uygulamasının etkilerini değerlendirmiştir. Bu araştırmanın amacı, farklı doz ve uygulama sayılarında yapılan bakır püskürtmelerinin, bitkideki antosiyanin içeriğı, kimyasal özellikler ve çanak yaprak verimi üzerindeki etkilerini belirlemektir. İnsan sağığı üzerinde olumlu etkileri olan ve güçlü antioksidan özelliklere sahip antosiyaninlerin artırılmasının, hafif abiyotik stres uygulanarak mümkün olup olmayacağını araştıran çalışma, bu bileşiklerin bitki kalitesini artırmak amacıyla üretim sürecinde teşvik edilip edilemeyeceğini sorgulamaktadır. Denemelerde, vejetatif büyüme döneminde 150, 300 ve 450 mg L⁻¹ konsantrasyonlarında Cu, iki, dört ve altı kez püskürtölerek uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, tüm dozlarda dört ve altı kez yapılan püskürtmeler kuru çanak yaprak verimini düşürmüştür. Ancak, iki kez yapılan püskürtmeler, uygulanan dozdan bağımsız olarak, verim üzerinde anlamlı bir değışiklik yaratmamıştır. Bununla birlikte, Cu uygulaması çanak yapraklardaki antosiyanin içeriğini ve titre edilebilir asitliğı anlamlı düzeyde artırırken, askorbik asit içeriğini azaltmıştır. Antosiyanin artışı en fazla, altı kez yapılan püskürtmelerde 300 ve 450 mg L⁻¹ dozlarında sırasıyla %57 ve %44 oranlarında gözlemlenmiştir. Ancak bu uygulamalar verimde azalmaya neden olmuştur. Bu nedenle araştırmacılar, bitkinin besin içeriğini artırmak ve verimi korumak adına, 150 mg L⁻¹ Cu ile yapılan iki püskürtmenin en uygun strateji olabileceğı sonucuna varmışlardır. Bu çalışma, kontrollü abiyotik streslerin örneğın ağır metal uygulamalarının bitkisel ürünlerin fitokimyasal bileşimini artırmada stratejik olarak kullanılabileceğini ve fonksiyonel gıda üretiminde potansiyel faydalar sağlayabileceğini ortaya koymaktadır.

Hashemi ve Shahani (2019), *H. sabdariffa* (Roselle) bitkisinde tuzluluk stresinin

morfolojik ve fizyolojik özellikler üzerindeki etkilerini, özellikle fenolik ve antosiyanin içerikleri açısından incelemiştir. Çalışmada tohumlar sterilize edildikten sonra, İran'da yer alan ve ortalama sıcaklığı yaklaşık 25 °C olan bir serada doğal çevre koşullarında, toprak/humus karışımı (4:1, hacim/hacim) içeren saksılarda yetiştirilmiştir. Spektrofotometrik analizler için örnek hazırlama aşamasında, kurutulmuş *H. sabdariffa* çiçekleri toz haline getirilmiş ve %80 etanol ile oda sıcaklığında maserasyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar döner evaporatör ile yoğunlaştırılmış ve liyofilizatör (freeze dryer) ile kurutulmuştur. Toplam fenolik madde içeriği, 765 nm dalga boyunda Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenmiş ve 6.25 ile 100 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanmış gallik asit standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Toplam antosiyanin içeriği ise pH diferansiyel yöntemiyle belirlenmiştir. Fenolik içeriği ekstrakt gramı başına miligram gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g) olarak, antosiyanin içeriği ise 100 gram ekstrakt başına miligram siyanidin 3-glikozit eşdeğeri (mg C3G/100g) olarak ifade edilmiştir. Deneme, üç tekerrürlü basit tesadüf deneme deseninde planlanmış ve bitkilere 0, 40, 80, 120 ve 160 mM NaCl konsantrasyonlarında tuzluluk uygulamaları yapılmıştır. Sonuçlar, artan tuzluluk seviyelerinin bitki boyunda, yaprak sayısında ve sürgün yaş ağırlığında önemli azalmalar oluşturduğunu göstermiştir. Çiçeklerin yaş ve kuru ağırlıkları bakımından uygulamalar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir, ancak çiçek sayısı 120 ve 160 mM NaCl uygulamalarında belirgin şekilde azalmıştır. Toplam fenolik madde içeriği, 40 mM NaCl dışındaki tüm tuz uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır. Öte yandan, toplam antosiyanin içeriği 40 mM NaCl uygulamasında anlamlı bir artış göstermiştir. Bu sonuçlar, düşük düzeydeki tuzluluk konsantrasyonunun antosiyanin içeriğinde artış sağlayabileceğini, ancak çiçek veriminde bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, çalışmada düşük düzeydeki tuzluluğun sekonder metabolit üretimini, özellikle antosiyanin sentezini artırıcı bir etkiye sahip olabileceği vurgulanmıştır.

Salmerón-Ruiz vd. (2019), sağlık açısından faydalı antosiyaninlere sahip ama yeterince değerlendirilmeyen *H. sabdariffa* çanak yapraklarından hazırlanan infüzyonların optimizasyonunu araştırmışlardır. Çalışmada, Meksika'nın kuzeybatısında yer alan Hermosillo şehrindeki bir yerel süpermarketten temin edilen kuru *H. sabdariffa* 'Criollo' çanak yaprakları kullanılmıştır. Araştırma, antosiyaninlerin ısıya duyarlı yapısı ve uzun süre yüksek sıcaklıklarda ekstraksiyonun biyolojik aktiviteyi azaltabileceği gerçeğinden yola çıkarak, toplam antosiyanin içeriği (TAC) ve antioksidan aktivite üzerindeki ekstraksiyon koşullarının etkisini incelemiştir. Antosiyanin miktarı, TAC'yi belirlemek için yaygın olarak kullanılan ve güvenilir bir yöntem olan Lee vd. (2005) tarafından tanımlanan pH-diferansiyel yöntemiyle ölçülmüştür. Antioksidan aktivite ise iki farklı yöntemle değerlendirilmiştir: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) testleri. Her iki yöntemde de standart olarak Trolox kullanılmış ve sonuçlar 100 mL infüzyon başına mikromol Trolox eşdeğeri (TE) cinsinden ifade edilmiştir. Çalışmada, üç bağımsız değişkenin etkilerini değerlendirmek amacıyla yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanılmıştır: çanak yaprağı/su oranı (1–20 g/100 mL), ekstraksiyon sıcaklığı (70–100 °C) ve ekstraksiyon süresi (1–30 dakika). Bu istatistiksel yaklaşım, en yüksek antosiyanin miktarını ve antioksidan kapasiteyi elde etmek için ideal koşulların belirlenmesini sağlamıştır. En uygun koşullar; 100 mL suya 10 g kuru çanak yaprağı, 88,7 °C sıcaklık ve 15.5 dakikalık ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında toplam antosiyanin içeriği

132.7±7.8 mg siyanidin-3-glukozit eşdeğeri (C3G)/100 mL olarak bulunmuştur. Antioksidan aktivite ise DPPH testiyle 800.6±69.9 µmol TE/100 mL ve ABTS testiyle 1792.0±153.5 µmol TE/100 mL olarak ölçülmüştür. Tahmin edilen değerlerin, deneysel sonuçlarla büyük ölçüde uyumlu olması modelin güvenilirliğini ortaya koymuştur. Bulgular, infüzyon koşullarının dikkatlice kontrol edilmesinin, antosiyaninlerin yapısını korumak ve antioksidan kapasiteyi artırmak açısından büyük önem taşıdığını göstermektedir. Bu optimal ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi, yüksek antosiyanin içeriği ve güçlü antioksidan aktiviteye sahip *H. sabdariffa* bazlı fonksiyonel içeceklerin geliştirilmesini destekleyeceği ve bu tür ürünlerin tüketicilere sağlık açısından önemli faydalar sağlayabileceği belirtilmiştir.

Ahmed vd. (2024) tarafından yürütülen yakın tarihli bir çalışmada, *H. sabdariffa* çanak yapraklarından biyoaktif bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) işleminin optimizasyonu amacıyla yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ve Box-Behnken metodu (BBD) kullanılmıştır. Çalışmada, taze *H. sabdariffa* çanak yaprakları Bangladeş'in Bogura kentindeki Kırsal Kalkınma Akademisi'ne bağlı Bahçecilik ve Fidanlık Birimi'nden toplanmıştır. Toplandıktan sonra örnekler distile suyla iyice yıkanmış ve çanak yaprakları elle ayrılmıştır. Bitki materyali -90 °C'de dondurulmuş ve ardından -50 °C ile -54 °C arasında beş gün boyunca dondurarak kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Kurutulan örnekler ticari bir blender kullanılarak 30 mesh boyutunda ince toz haline getirilmiş ve biyokimyasal bütünlüğünü korumak amacıyla -80 °C'de hava geçirmez kavanozlarda saklanmıştır. Çalışmada, üç bağımsız değişkenin ultrason sıcaklığı (30–80 °C), ultrason süresi (20–50 dakika) ve katı/sıvı oranı (1:10–1:60) toplam antosiyanin içeriği (TAC), toplam fenolik içeriği (TPC) ve antioksidan aktiviteler (DPPH radikal süpürme aktivitesi ve FRAP yöntemiyle ölçülen ferrik iyon indirgeme gücü) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. ANOVA sonuçları, TAC için 0.98, TPC için 0.97, DPPH için 0.98 ve FRAP için 0.98 olan R² değerleriyle modellerin yüksek güvenilirliğini göstermiş, ikinci dereceden polinom modellerin bağımsız değişkenlerle yanıtlar arasındaki ilişkileri etkili bir şekilde analiz edebildiğini ortaya koymuştur. En uygun ekstraksiyon koşulları, 80 °C ultrason sıcaklığı, 48 dakika ultrason süresi ve 1:60 katı/sıvı oranı olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen değerler TAC için 311 ± 5 mg CGE/100 g, TPC için 572 ± 7 mg GAE/100 g, DPPH için 974 ± 3 µmolTE/100 mL ve FRAP için 2332 ± 3 µmolTE/100 mL olarak rapor edilmiştir. Deneysel ve tahmin edilen değerler arasındaki uyumun yüksek olması ve artık standart hatanın %5'in altında olması, geliştirilen modellerin doğruluğunu ve hassasiyetini doğrulamıştır. Geleneksel bir yöntem olan Soxhlet ekstraksiyonuyla karşılaştırıldığında (TAC: 176 ± 4 mg CGE/100 g; TPC: 210 ± 3 mg GAE/100 g; DPPH: 534 ± 2 µmolTE/100 mL; FRAP: 1732 ± 3 µmolTE/100 mL), UAE yöntemi tüm parametrelerde anlamlı derecede daha yüksek sonuçlar vermiştir. Bu bulgular, optimize edilmiş koşullarda UAE tekniğinin, *H. sabdariffa* bitkisinden değerli fitokimyasalların ekstraksiyonunda oldukça verimli ve sürdürülebilir bir yöntem sunduğunu göstermekte olup, fonksiyonel gıdalar, nutrasötikler ve doğal antioksidanlar üzerine çalışan sanayiler için umut verici bir alternatif oluşturmaktadır.

2.2.2. *O. basilicum* türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için *in vivo* çalışmalar

Nguyen vd. (2010), potasyum gübrelemesinin üç fesleğen (*O. basilicum*) çeşidinde Dark Opal, Sweet Thai ve Genovese fenolik bileşik içeriği ve antioksidan

aktivite üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bitkiler, Southwestern Üniversitesi'nin serasında doğal ışık ve sıcaklık koşulları altında, 22°C ile 42°C arasında değişen sıcaklıklarda yetiştirilmiştir. Çalışmada HPLC saflığında çözücüler ve galik asit, rosmarinik asit, şikorik asit, kuromanin klorür gibi analitik saflıkta kimyasalların yanı sıra DPPH ve TPTZ gibi antioksidan analiz reaktifleri kullanılmıştır. Deneysel tasarım, özellikle 1.0 mM ve 5.0 mM K düzeylerinde, farklı potasyum konsantrasyonlarının fesleğen yapraklarındaki biyoaktif bileşiklerin birikimini nasıl etkilediğini anlamayı amaçlamıştır. Sonuçlar, artan potasyum konsantrasyonunun fesleğen yapraklarında toplam fenolik içeriği anlamlı düzeyde artırdığını ve en yüksek fenolik düzeylerin 5.0 mM K uygulanan bitkilerde gözlemlendiğini ortaya koymuştur ($p = 0.008$). Ayrıca, bu uygulama, düşük potasyum seviyelerine göre daha yüksek rosmarinik asit ($p = 0.005$) ve kikorik asit ($p < 0.001$) düzeylerine yol açmıştır. DPPH ve FRAP analizleri ile değerlendirilen antioksidan kapasite de daha yüksek potasyum uygulamalarında anlamlı şekilde artmış ve potasyum beslemesi ile antioksidan potansiyel arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Çalışma ayrıca fenolik bileşik kompozisyonunun ve antioksidan aktivitenin çeşitler arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Sweet Thai çeşidi, Dark Opal ve Genovese'ye kıyasla daha düşük toplam fenolik içeriğe ve FRAP antioksidan aktivitesine sahip bulunmuştur. Bununla birlikte, antosiyanin içeriği potasyum uygulamasından etkilenmemiş olsa da çeşitler arasında anlamlı farklılık göstermiştir. Mor renkli Dark Opal çeşidi, Sweet Thai ($p = 0.003$) ve Genovese ($p = 0.002$) çeşitlerine kıyasla belirgin şekilde daha yüksek antosiyanin düzeylerine sahip olmuştur. Bu bulgular, potasyum beslemesinin yalnızca fenolik bileşik birikimini ve antioksidan kapasiteyi artırmakla kalmayıp, farklı çeşitlerin ikincil metabolit profillerinde de doğal farklılıklar olduğunu ortaya koymakta ve hem besin yönetiminin hem de çeşit seçiminin fesleğenin sağlık açısından faydalı özelliklerini maksimize etmek açısından önemli unsurlar olduğunu vurgulamaktadır.

Flanigan vd. (2014), sekiz mor fesleğen çeşidinde antosiyanin ve fenolik asit içeriğinin genotip etkisiyle nasıl değiştiğini araştırmış ve tür içindeki genetik ve morfolojik çeşitliliğe dikkat çekmiştir. Çalışma, Southwestern Üniversitesi serasında doğal ışık ve sıcaklık koşulları altında (ortalama sıcaklık aralığı: 25.2°C–37.6°C) fide döneminden itibaren yürütülmüştür. Fesleğen tohumları, ticari bir torf karışımı içeren siyah plastik fideliğe ekilmiş, günde iki kez sulanmış ve haftada iki kez tüm makro ve mikro besin elementlerini içeren bir NPK gübre çözeltisi ile beslenmiştir. Ekimden 15 gün sonra fideler, her çeşit için altı tekrar olacak şekilde rastgele blok düzeninde yerleştirilen 1 galonluk saksılara şaşırtılmıştır. Yapraklar çimlenmeden 39 gün sonra hasat edilerek sıvı azotla hızlıca dondurulmuş ve -80°C'de analiz yapılana kadar saklanmıştır. Analizlerde kuromanin klorür, çeşitli fenolik asitler ve formik asit, asetonitril ile metanol gibi HPLC dereceli reaktifler kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, çeşitlerin toplam ve bireysel antosiyanin konsantrasyonları üzerinde anlamlı etkisi olduğu bulunmuştur. Dört ana antosiyanin bileşiği (A–D olarak etiketlenmiştir) arasında, B, C ve D antosiyaninlerinde çeşide bağlı olarak anlamlı farklılıklar tespit edilirken ($p < 0.01$), A antosiyanininde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.94$). Toplam fenolik içerik çeşitler arasında anlamlı farklılık göstermemekle birlikte, bazı bireysel fenolik asitlerin (örneğin kaftarik asit, $p = 0.03$; şikorik asit, $p = 0.04$) konsantrasyonları çeşitlere göre değişmiştir. Ayrıca, toplam antosiyanin ve fenolik seviyeler ile antioksidan kapasite (FRAP yöntemiyle ölçülmüştür) arasında korelasyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bazı çeşitlerde bireysel fenolik asit ve antosiyanin bileşiminin de antioksidan özellikleri

etkileyen önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, mor fesleğende fitokimyasal bileşim ve sağlıkla ilişkili özelliklerin belirlenmesinde genotipin önemli rol oynadığını ortaya koymuştur.

Szymanowska vd. (2015) tarafından yürütülen bir çalışmada, abiyotik elicitorlerden olan araşidonik asit (AA), jasmonik asit (JA) ve β -aminobütirik asidin (BABA) mor fesleğen (*O. basilicum*.) yapraklarından elde edilen antosiyaninlerin anti-inflamatuar ve antioksidatif özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Deneyde, fesleğen bitkileri kontrollü çevresel koşullar altında toprak karışımı kullanılarak yetiştirilmiş ve standart gübreleme rejimleri uygulanmıştır. Yedi günlük fideler saksılara şaşırtılmış ve 25/18°C (gündüz/gece), 16/8 saatlik fotoperiyot, 500–700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik foton akı yoğunluğu ve %75 bağıl nemde bir iklim odasında büyütülmüştür. Elicitorler, literatürdeki bilgiler ve ön tarama deneylerine dayanarak belirlenen konsantrasyonlarda, fitotoksik etkilere yol açmamak amacıyla 21 günlük bitkilere yapraktan püskürtülerek uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise yalnızca elisitör çözeltilerinde kullanılan eser miktardaki etanol içeren deiyonize su verilmiştir. Elisitör uygulamasından on beş gün sonra bitkilerin toprak üstü kısımları hasat edilip dondurulmuş ve antosiyanin içeriği ile biyolojik aktiviteleri analiz edilmiştir. Toplam antosiyanin düzeyi pH farkı yöntemi kullanılarak ölçülmüş, saflaştırılmış özütler ise HPLC ile analiz edilerek belirli antosiyanin bileşiklerinin kantitatif ölçümü yapılmıştır. Antioksidan aktivite DPPH ve ABTS radikal süpürme testleriyle değerlendirilmiş, demir (Fe^{2+}) şelatlama kapasitesi ise Guo vd. (2001) tarafından tanımlanan yöntemle belirlenmiştir. Ayrıca, anti-inflamatuar enzim inhibisyonu için lipoksijenaz (LOX) ve siklooksijenaz (COX) enzimlerinin inhibisyon düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür (Axelroad vd. 1981). Elde edilen bulgulara göre, tüm elisitör uygulamaları mor fesleğen yapraklarındaki toplam antosiyanin içeriğini anlamlı şekilde artırmıştır. Ancak bu artışa rağmen özütlerin genel antioksidan aktivitelerinde bir artış gözlenmemiş, hatta Fe^{2+} şelatlama kapasitesinde yaklaşık %50 oranında bir azalma tespit edilmiştir. Öte yandan, elicitor uygulamaları sonrası elde edilen antosiyanin özütlerinin anti-inflamatuar potansiyelinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Lipoksijenaz inhibisyonu için gerekli IC_{50} değeri kontrol grubuna kıyasla neredeyse yarıya düşmüştür. Siklooksijenaz inhibisyonu da genel olarak elicitor uygulamalarıyla artış göstermiş, yalnızca JA uygulamasında bu artış gözlenmemiştir. HPLC analizleri, AA, JA ve BABA uygulamalarının çoğu bireysel antosiyanin bileşiğinin düzeyinde artışa yol açtığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, elicitor uygulamalarının mor fesleğende antosiyanin biyosentezini ve anti-inflamatuar aktiviteyi artırdığını, ancak bazı antioksidan özellikleri geliştirmediğini ve hatta azalttığını ortaya koymuştur.

Ghasemzadeh vd. (2016), hasat sonrası dönemde farklı yoğunluk ve sürelerde uygulanan ultraviyole-B (UV-B) ışınımı ile tatlı fesleğen (*O. basilicum*) bitkisinin fitokimyasal bileşimini ve farmasötik değerini artırmaya yönelik kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Araştırmada, fesleğen bitkilerinin tohumları %1 sodyum hipoklorit çözeltisiyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve ardından toprak–kum–torf (1:1:1), karışımı içeren fideleme kaplarına ekilmiştir. Dört haftalık, üç-dört yapraklı fideler, hindistan cevizi torfu–yakılmış pirinç kabuğu (1:1, hacim/hacim) karışımı içeren 3 litrelik saksılara şaşırtılmış ve dekara 40:40:40 kg oranında azot (N), fosfor (P_2O_5) ve potasyum (K_2O) içeren orta düzeyde bir gübre uygulanmıştır. Bitkiler; günlük ortalama sıcaklık 30 ± 2 °C, bağıl nem %75–80 ve ışık şiddeti minimum 52 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ile maksimum 1480 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ arasında değişen kontrollü çevre koşullarında büyütülmüş, sulama ise damla

sulama sistemiyle sağlanmıştır. Dört aylık gelişim süresinin ardından bitkiler hasat edilmiş, yapraklar ayrılıp musluk suyu ile yıkanmıştır. Hasat edilen yapraklar dondurarak kurutulmuş, ardından öğütülerek toz haline getirilmiştir. Bu kuru örnekler 100 mL saf su ile 65 °C’de 2 saat refluks yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt süzülüp döner buharlaştırıcıyla (rotary evaporator) konsantre hale getirilmiş ve fazla çözücü uzaklaştırılmıştır. Elde edilen kalıntı tekrar dondurularak kurutulmuş ve analizler için -20 °C’de saklanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı (TPC), Folin-Ciocalteu yöntemi ile; toplam flavonoid miktarı (TFC) ise alüminyum klorür spektrofotometrik yöntemi ile belirlenmiştir. Bireysel fenolik asitler ve flavonoidler ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) ile tanımlanmıştır. Flavonoid biyosentezinde kilit rol oynayan chalcone synthase (CHS) enzim aktivitesi de değerlendirilmiştir. CHS enzimi taze yapraklardan izole edilmiş, Dowex reçinesi ile saflaştırılmış ve 370 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Yapraklar, 2.30, 3.60 ve 4.80 W/m² şiddetlerinde UV-B ışınımına ve 4, 6, 8 ve 10 saatlik farklı sürelerde maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda, 3.60 W/m² UV-B yoğunluğunda uygulama, kontrol grubuna kıyasla toplam flavonoid miktarında yaklaşık %85 oranında artış sağlamıştır. Ayrıca, quercetin, kateşin, kaempferol, rutin ve luteolin gibi bireysel flavonoidlerin içerikleri de artış göstermiştir. En yüksek artış luteolinde (%100) gözlemlenmiştir. Aynı UV-B yoğunluğu, galik asit, sinamik asit ve ferulik asit gibi fenolik asitlerin ve toplam fenolik içeriğin de en yüksek düzeyde oluşmasına neden olmuştur. Özellikle sinamik asit ve luteolin kontrol bitkilerinde tespit edilmezken, UV-B ışınımı ile indüklenmiştir. Işınım süresi de metabolit üretimini önemli ölçüde etkilemiştir. Sekiz saatlik UV-B uygulaması, çoğu flavonoid ve fenolik asit açısından en yüksek düzeylerin elde edilmesini sağlamıştır. Ancak sinamik asit açısından en yüksek içerik 6 saatlik uygulamada gözlemlenmiştir. On saatlik uzun süreli ışınım ise ikincil metabolit üretiminde önemli düşüşlere yol açmıştır. UV-B uygulaması CHS enzim aktivitesini de artırmış ve en yüksek aktivite 3.60 W/m² şiddetinde gözlemlenmiştir. Ek olarak, bitki özlerinin antioksidan kapasitesi DPPH serbest radikal süpürme testiyle, antikanser potansiyeli ise MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde MTT testiyle değerlendirilmiştir. UV-B uygulanan yapraklardan elde edilen ekstraktlar, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek antioksidan ve antiproliferatif aktivite göstermiştir. Bu gruptaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 56.0 µg/mL (DPPH) ve 40.8 µg/mL (MTT) olarak ölçülmüş, bu da kontrol bitkilerine göre daha etkili olduklarını göstermiştir (kontrol: 78.0 ve 58.2 µg/mL). Tüm bu bulgular, hasat sonrası UV-B ışınımının tatlı fesleğen yapraklarında flavonoidler, fenolik asitler ve bunlara bağlı biyolojik aktivitelerin üretimini artırabileceğini göstermiştir.

Skrypnik vd. (2019) tarafından yürütülen bir çalışmada, selenyum (Se) biyofortifikasyonunun tatlı yeşil yapraklı fesleğenin (*O. basilicum*. cv Tonus) fitokimyasal bileşimi, uçucu yağ içeriği, antioksidan aktivitesi ve selenyum birikimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Deneme Rusya’da Immanuel Kant Baltık Federal Üniversitesi’nin sera koşullarında gerçekleştirilmiştir. Sodyum selenat formunda uygulanan selenyum, 3 farklı derişimde (2.0, 5.0 ve 10.0 µM) olmak üzere hem besin çözültisine eklenmiş hem de yapraktan püskürtme yöntemiyle verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, selenyum uygulamasının fesleğen yapraklarında Se konsantrasyonunu anlamlı düzeyde artırdığını göstermiştir; bu değer, besin çözültisiyle uygulamada 20.23 µg g⁻¹, yapraktan uygulamada ise 10.74 µg g⁻¹ seviyesine ulaşmıştır. Uygulanan selenyum dozlarının bitkiler üzerinde herhangi bir toksik etki yaratmadığı ve büyüme ya da gelişim üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Besin çözültisine 2 µM Se

eklenmesi ve yapraktan 5 µM Se püskürtülmesi, fesleğen yapraklarında uçucu yağ, hidroksisinamik asitler, toplam fenolik bileşikler ve toplam antioksidan aktivite üretimini anlamlı düzeyde artırmıştır. Antioksidan kapasite artışı DPPH, ABTS ve FRAP testleriyle doğrulanmıştır. Antosiyanin içeriğindeki artış ise yalnızca besin çözeltisiyle uygulanan selenyumda pozitif yönde etkilenmiştir. Kurumuş ve öğütülmüş yapraklarda toplam selenyum konsantrasyonu, otoklav ile basınç altında gerçekleştirilen mineralizasyon işleminin ardından hidrit üretimi atomik absorpsiyon spektrometresi (HG-AAS) kullanılarak belirlenmiştir. Bitki özütlerinde toplam antosiyanin, hidroksisinamik asit, flavonoid ve fenolik bileşik içerikleri spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmiştir. Antioksidan aktivite ise DPPH ve ABTS radikal süpürme kapasiteleri ile ferrik indirgeme antioksidan gücü (FRAP) testleriyle değerlendirilmiştir. Bu çalışma, selenyum biyofortifikasyonunun fesleğen bitkisinde hem selenyum birikimini artırmada hem de sağlık açısından faydalı fitokimyasalların biyosentezini teşvik etmede etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, herhangi bir toksik etki yaratmadan gerçekleştirilebilmesi bu uygulamayı daha değerli kılmıştır. Besin çözeltisine 10 µM ve yapraktan 5 µM Se uygulanması, en uygun besinsel zenginleştirme ve fitobesin artışı sağlayan konsantrasyonlar olarak öne çıkmıştır. Elde edilen bulgular, selenyumla zenginleştirilmiş fesleğen üretiminin insan beslenmesinin niteliğini artırmak açısından umut verici bir yaklaşım gibi gözükmektedir.

2.2.3. *R. carnosula* türünde antosiyanin ve antioksidan üretimi için *in vivo* çalışmalar

Endemik *R. carnosula*'nın kültürel üretimi mevcut olmayıp çok sınırlı şekilde *in vivo* ve *in vitro* kültüre alma çalışmaları yapılmıştır (Arı 2010, Demir 2020). *In vivo* kültüre alma çalışmaları kapsamında, yapılan sekonder metabolit analizlerinde reductoroz, saponin, nitrojen bileşenleri, flavonoidler, taninler, lipidler ve siyanojenetik glikozitler gibi bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir (Arı 2010). Ayrıca, *R. carnosula*'nın yüksek antioksidan içeriği ve nörobiyolojik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar, bu bitkinin diğer tıbbi bitkilerle birlikte değerlendirildiğinde önemli farmakolojik potansiyele sahip olabileceğini ortaya koymuştur (Orhan vd. 2015; Orhan vd. 2016).

Sonuç olarak, buraya kadar bildirilen kaynak taraması verilerinde; *H. sabdariffa*, *O. basilicum* ve *R. carnosula* bitki türlerinde antosiyaninler ve antioksidanların *in vitro* ve *in vivo* üretimi üzerine yapılan çalışmalar incelenmeye çalışılmıştır. Ancak görüldüğü gibi *H. sabdariffa* ve *O. basilicum*'da bileşiklerin biyosentezi ve birikimini etkileyen faktörler konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, *Ricotia* türleri ile ilgili literatürde önemli bir boşluk bulunmaktadır. Özellikle *R. carnosula*'da antosiyaninler ve antioksidanların üretimi üzerine sınırlı sayıda çalışma olduğundan, bu çalışma, bu türde biyosentetik yollar ve üretimlerini etkileyen çevresel faktörlere yönelik daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu derleme bulgularının, bu türlerde gelecekte yapılacak araştırmalara ve *in vitro* sekonder metabolit üretimi çalışmalarına katkı sağlaması umulmaktadır.

3.MATERYAL VE METOT

Bu çalışma 2023-2025 yılları arasında yürütülmüş, *in vitro* kültür çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünde Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında, *in vivo* kültür çalışmaları ise Kırcaami Fide Ltd. Şti'nde gerçekleştirilmiştir. Araştırmada öncelikle *H. sabdariffa*, *O. basilicum* ve *R. carnosula* türlerinin *in vitro* koşullarda yetiştirilen fidelerinden ve ayrıca bu tip fidelerin farklı eksplantlarından geliştirilen kalluslardan antosiyanin elde edilmeye çalışılan *in vitro* kültür çalışmaları yapılırken, ayrıca aynı türlerde *in vivo* kültür çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yetiştirilen kültürlerin antosiyanin ve antioksidan içerikleri karşılaştırılmıştır.

3.1.1.1. Bitkisel materyal

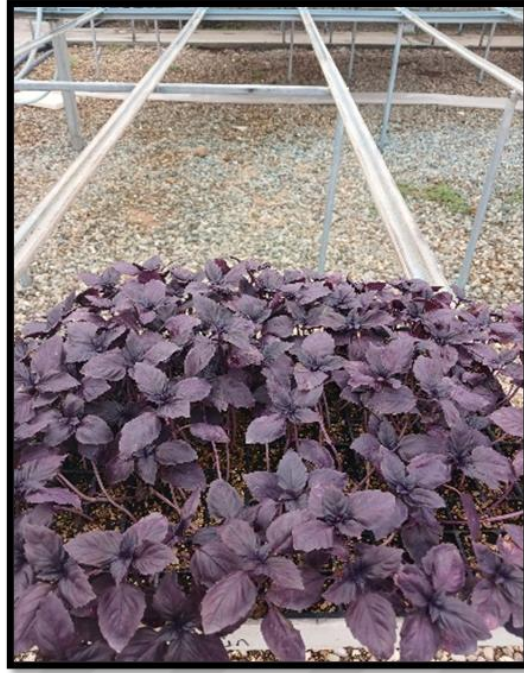
Tezde antosiyanin içeren üç bitki türünde (*H. sabdariffa*, *O. basilicum* ve endemik *R. carnosula*) çalışılmış olup, bunların bitkisel özellikleri kısaca aşağıda belirtilmiştir:

***H. sabdariffa*:** Malvaceae familyasına ait bir türdür. Tek ya da çok yıllık bir bitki olup, 2–2.5 metreye kadar büyüyebilir. Yaprakları, 3-5 loblu ve 8-15 cm uzunluğunda olup, gövdesi kırmızı renklidir (Şekil 3.1.). Çiçeklenme döneminde elde edilen çiçek kaliksleri; polifenoller, flavonoidler ve organik asitler açısından zengindir. Kurutulmuş *H. sabdariffa* çiçekleri, yüksek antioksidan kapasitesine sahiptir.



Şekil 3.1. *H. sabdariffa*'nın genel görünümü

***O. basilicum*:** Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait bir türdür. Türkiye'de genellikle fesleğen veya reyhan olarak adlandırılmaktadır. Tek yıllık, otsu bir bitki olup, 20-60 cm uzunluğa erişebilir. Yaprakları yeşil ve/veya morun farklı tonlarında (Şekil.3.2.) ve 1-5 cm uzunluğunda olup çiçekleri beyaz, pembe veya mor renklerde olabilir. Mor reyhanın karakteristik mor rengini, yapraklarında ve çiçeklerinde yoğun olarak biriken siyanidin, peonidin ve antosiyanin bileşenleri oluşturmaktadır.



Şekil 3.2. *O. basilicum*'un genel görünümü

***R. carnosula*:** *R. carnosula* Boiss. & Heldr. Brassicaceae familyasının endemik bir türüdür. *R. carnosula* nikelce zengin, eğimli ve kayalık bölgelerde yetişen, boyu 20-30 cm arasında değişen, genellikle beyaz çiçeklere sahip bir bitkidir (Şekil 3.3.). Çiçeklenme dönemi ise Mart-Nisan aylarındadır.



Şekil 3.3. *R. carnosula* Boiss. & Heldr.'in genel görünümü

3.1. *In vitro* kültür çalışmaları

3.1.1. *H. sabdariffa*'da *in vitro* kültür çalışmaları

Çalışmada kullanılan *H. sabdariffa* türünün tohumları Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (BATEM) temin edilmiştir. Hibiskus türünde bitkisel materyal olarak tohumların yanı sıra, hibiskus kozalaklarının antosiyanin içeren kırmızı renkli sepalleri de kullanılmış olup, kozalaklar *in vivo* şartlarda yetiştirilen bitkilerden elde edilmiştir (Şekil 3.4.). *In vitro* şartlarda antosiyanin üretimi için tohumlar *in vitro* şartlarda çimlendirildikten sonra elde edilen fidelerin çeşitli eksplantlarından (hipokotil ve kotiledonlarından) ve ayrıca *in vivo* şartlarda yetiştirilen bitkilerin kozalaklarına ait sepallerinden yüzey dezenfeksiyonu sonrası çeşitli kallus indüksiyon ortamlarında antosiyaninli kalluslar geliştirilmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.4. Araştırmada kullanılan *H. sabdariffa* türünün bitkisel görüntüsü, tohumları ve kozalaklarından genel görünüm

3.1.1.2. Tohumların ve sepallerin yüzey dezenfeksiyonu

Hibiskus türünde yaptığımız *in vitro* ön çalışmalarda hibiskus bitkisinin içsel mikroorganizmalarından kaynaklandığını düşündüğümüz nedenle yoğun kontaminasyon problemi ile karşılaşmıştır. Bu nedenle eksplantların yüzey dezenfeksiyonları normalden daha kapsamlı şekilde yapılmıştır.

Sert bir yapıya sahip hibiskus tohumlarının daha iyi çimlenebilmeleri için yüzey dezenfeksiyonuna başlamadan önce ilk olarak tohumların yüzeyleri zımparalanmıştır. Daha sonra hem tohumların hem de sepallerin yüzey dezenfeksiyonları şu şekilde yapılmıştır: Her iki bitkisel materyal öncelikle %0.2 lik civa klorür çözeltisinde 5 dakika bekletilip, ardından steril saf suda 5 dakika durulanmıştır. Daha sonra %70 lik etanol çözeltisinde 1 dakika bekletilmiş ve 3 dakika saf suda durulanmış, ardından 1-2 damla Tween 20 içeren %15 lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dakika boyunca bekletilmiş

ve son olarak her birisi 3'er dakikalık 3 durulama işlemi yapılmıştır.

3.1.1.3. Tohumların çimlendirilmesi

Hibiskus tohumlarının *in vitro* şartlarda çimlendirilmesi için her ne kadar tohumların yüzey dezenfeksiyonları oldukça kapsamlı yapılmış olsa da, bu amaçla kullanılan kimyasallar kontaminasyon sorununu çözmede genellikle etkili olamamış, bu nedenle çimlendirme ortamlarına eklenen farklı antifungallerin hem kontaminasyon hem de tohum çimlenmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 3 farklı çimlendirme ortamı (Çizelge 3.1.) hazırlanmıştır. Çizelge 3.1'deki 1 nolu ortam kontrol ortamı olarak hazırlanırken, 2 nolu ortama propamocarb ve 3 nolu ortama ise fluazinam etken maddeli antifungallar eklenmiştir. Temel besin ortamı olarak modifiye Murashige ve Skoog (1962) (MS) (Mod 3B) (NH_4NO_3 ve KNO_3 oranları $\frac{1}{2}$ oranında azaltılmış) ortamı (Mod-MS) (Çizelge 3.2.) kullanılmış, bu ortama ek vitamin olarak Nitsch ve Nitsch (NN) ortamı vitaminleri (Çizelge 3.2.), karbonhidrat kaynağı olarak %3 sukroz ve ortam katılaştırıcısı olarak %0.7 g agar eklenmiştir. Ortamların pH değeri 1 N KOH ve 0.1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlanmış ve ardından 121°C 'de 20 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu yapılmıştır. Hazırlanan ortamlar 180 mL'lik steril cam kavanozlara 20'er mL olarak dökülmüş, sterilizasyonu yapılan hibiskus tohumları her çimlendirme ortamına 3'er tekerrürlü olarak, 4'er kavanoza ve her kavanoza 5'er tohum olacak şekilde ekilmiştir. Kültüre alınan tohumlar 3 gün 24°C 'de karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Çimlenmeye başlayan tohumlar 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyoda sahip 24°C lik odaya transfer edilmiştir. Birer hafta arayla çimlenme ve kontaminasyon gözlemleri yapılmıştır. Dört hafta sonunda en iyi çimlendirme ortamı belirlenmiş ve bu ortam bundan sonraki gerçek çimlendirme ortamı olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Hibiskus tohum çimlendirme ortamlarının içerikleri

Ortam No	Temel Besin Ortamı	Ek Vitamin	Sukroz (g/L)	Agar (g/L)	Antifungal Etken Maddesi (mL/L)	pH
1 (Kontrol)	Mod-MS*	NN**	30	7	-	5.8
2	Mod-MS	NN	30	7	Propamocarb (1ml/l)	5.8
3	Mod-MS	NN	30	7	Fluazinam (1ml/l)	5.8

*Mod-MS: Modifiye Murashige ve Skoog (1962) (MS) ortamı, **NN: Nitsch ve Nitsch (1969) ortamı vitaminleri.

Çizelge 3.2. Çalışmada tohum çimlendirme ve kallus denemelerinde kullanılan temel besin ortamlarının içerikleri ve konsantrasyonları (mg/L)

	MS*	Mod-MS **	B5***	NN****
Mikro elementler				
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
FeNaEDTA	36.7	36.7	36.7	36.7
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	3	10
KI	0.83	0.83	0.75	-
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	16.90	10	18.94
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.60	2	10
Makro Elementler				
CaCl ₂	332.02	332	113.23	166
KH ₂ PO ₄	170	170	-	68
KNO ₃	1900	950	2500	950
MgSO ₄	180.54	180	121.56	90.27
NH ₄ NO ₃	1650	825	-	720
NH ₄ 2SO ₄	-	-	134	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	130.44	-
KCl	-	-	-	-
Vitaminler				
Nicotinic acid	0.5	0.5	1	5
Biotin	-	-	-	0.05
Pyridoxine HCl	0.5	0.5	1	0.5
Thiamine HCl	0.1	0.1	10	0.5
Myo-inositol	100	100	100	100
Glisin	2	2	-	2
Folic acid	-	-	-	0.5

*MS: Murashige ve Skoog (1962) ortamı, **Mod-MS: Modifiye Murashige ve Skoog (1962) (MS) ortamı, ***B5: Gamborg ve ark. (1968) ortamı, ****NN: Mitsch ve Nitsch (1969) ortamı.

3.1.1.4. Kallus denemeleri

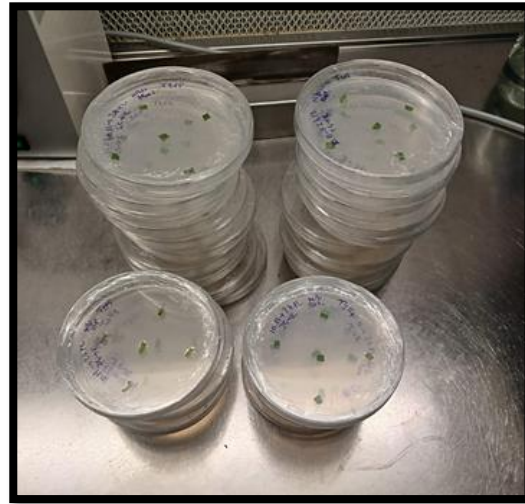
1. Grup kallus denemeleri: Bir aylık *in vitro* *H. sabdariffa* fidelerinden elde edilen eksplantlar ile öncelikle farklı bitki gelişim düzenleyicisi (BGD) içeriğine sahip 3 indüksiyon ortamından oluşan 1.grup kallus denemeleri kurulmuştur (Çizelge 3.3.). 1.grup denemede uygun eksplantın belirlenmesi ve ayrıca uygun kallus geliştirme ortamının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için 1.grup denemelerinde eksplant olarak kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılırken, kallus indüksiyon ortamları olarak ise herhangi bir BGD nin eklenmediği 1 nolu ortam kontrol ortamı olup, 2 nolu ortam 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP ve 3 nolu ortam ise 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/l Kinetin içerikli BGD kombinasyonlarından oluşturulmuştur. Bu kombinasyonlar belirlenirken, literatürde hibiskus kallus kültürleri için önerilen çalışmalardan yararlanılmıştır.

Çizelge 3.3. *H. sabdariffa* türünde 1.grup kallus indüksiyon ortamları içerikleri

Ortam No	Kullanılan Eksplant Tipi	Kültür Koşulu	Temel Besin Ortamı Tuzları	Vitamin	BGD İçeriği (mg/L)	Sukroz (g/L)	Agar (g/L)	pH
1	Hipokotil Kotiledon	Karanlık	MS* (MES'li)	NN**	-	30	7	5.8
2	Hipokotil Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP	30	7	5.8
3	Hipokotil Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L Kinetin	30	7	5.8

*MS: Murashige ve Skoog (1962) ortamı, **NN: Mitsch ve Nitsch (1969) ortamı.

Çizelge 3.3'teki kallus indüksiyon ortamlarında temel besin ortamı olarak MS ortamı tuzları (makro ve mikro elementleri) (Çizelge 3.2.) kullanılmış, bu ortama vitamin olarak NN ortamı vitaminleri (Çizelge 3.2.), karbonhidrat kaynağı olarak %3 sukroz ve ortam katılaştırıcısı olarak %0.7 g agar ilave edilmiştir. Üç ortamın tümüne pH stabilizasyonu için 1 g/L MES monohydrate (2-Morpholinoethanesulphonic acid) eklenmiştir. Ortamların pH değeri 5.8'e ayarlanmış ve sterilizasyonları otoklavlanarak yapılmıştır. Otoklavlanan ortamlar 90 mm'lik steril petri kaplarına 20'şer mL olarak dökülmüş ve kültür yapılınca kadar streç film ile sarılıp 24°C karanlık koşullarda muhafaza edilmiştir. Eksplant olarak 1 aylık *in vitro* fidelerin kotiledon (5x5 mm) ve hipokotil (5 mm uzunlukta) eksplantları kullanılmış, eksplantların kenarları steril bisturi uçları yardımıyla belirtilen ebatlarda kesilmiştir (Şekil 3.5.). Eksplantlar her ortam için 3 tekerrür halinde, her tekerrürde 5 petri ve her petride 5 eksplant olacak şekilde kültüre alınmıştır. Eksplantlar petriler içerisinde kültüre alındıktan sonra petrilerin ağızları streç film ile sıkıca sarılıp 24°C'de karanlık koşullarda inkübe edilmiştir.

**Şekil 3.5.** Tohum çimlendirme ortamında yetiştirilen *in vitro* hibiskus bitkileri ve kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan eksplantlar.

2.Grup kallus denemeleri: Birinci grup kallus denemelerinin sonucunda kotiledon eksplantının kallus oluşturmaya daha eğilimli olduğu gözlenmiştir. İndüksiyon ortamlarında kullanılan BGD kombinasyonları ise kallusdan çok yoğun kök oluşumunu teşvik etmiştir. Bu nedenle kallus oluşumunu teşvik eden bir ortam belirlemek üzere

kotiledon eksplantı kullanılarak, farklı BGD içeriğine sahip 10 indüksiyon ortamından oluşan 2.grup kallus denemeleri kurulmuştur (Çizelge 3.4.).

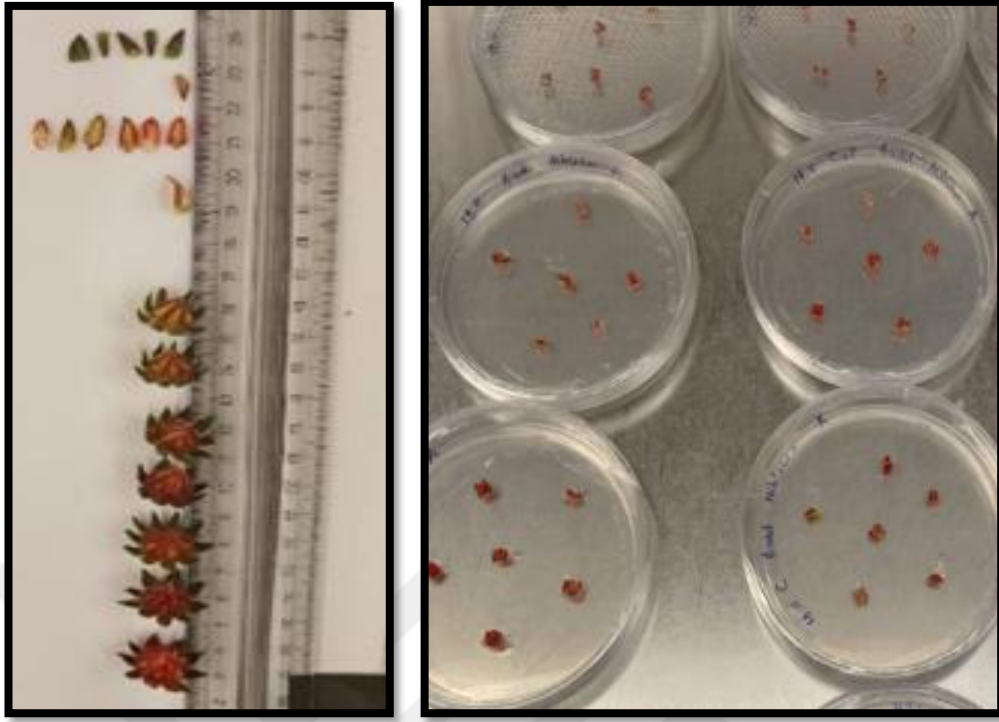
Çizelge 3.4. *H. sabdariffa* türünde 2.grup kallus indüksiyon ortamları içerikleri

Ortam No	Eksplant Tipi	Kültür Koşulu	Temel Besin Ortamı Tuzları	Vitamin	BGD İçeriği (mg/L)	Sukroz (g/L)	Agar (g/L)	pH
1	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	-	30	7	5.8
2	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	0.5 mg/L 2,4-D	30	7	5.8
3	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin	30	7	5.8
4	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	0.5 mg/L IAA	30	7	5.8
5	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	0.5 mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin	30	7	5.8
6	Kotiledon	Karanlık	NN (MES'li)	NN	-	30	7	5.8
7	Kotiledon	Karanlık	NN (MES'li)	NN	0.5 mg/L 2,4-D	30	7	5.8
8	Kotiledon	Karanlık	NN (MES'li)	NN	0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin	30	7	5.8
9	Kotiledon	Karanlık	NN (MES'li)	NN	0.5 mg/L IAA	30	7	5.8
10	Kotiledon	Karanlık	NN (MES'li)	NN	0.5 mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin	30	7	5.8

Çizelge 3.4'te görüldüğü gibi 2.grup kallus denemeleri 10 indüksiyon ortamından oluşturulmuştur. Bu ortamlarda 2 farklı temel besin ortamı (MS ve NN) kullanıldığı için 2. grup denemelerde 1. ve 6. ortamlar sırasıyla MS ve NN ortamlarının kontrol ortamı (BGD içermeyen ortam) olarak hazırlanmış olup, 10 ortamın tümüne pH stabilizasyonu için 1 g/L MES monohydrate ilave edilmiştir. Temel besin ortamı MS olan ilk 5 ortamda tuzlar yani makro ve mikro elementler MS ortamının tuzları olup, bunlara vitamin olarak NN vitaminleri eklenmiştir. Son 5 ortamın tuz ve vitaminleri ise tamamen NN ortamının orijinalindeki içeriklerden oluşturulmuştur (Çizelge 3.2.). Çeşitli BGD tip ve konsantrasyonlarından oluşturulan ortamların içerikleri şunlardır:

- 1.ortam MS ortamı kontrolü (BGD içermeyen MS ortamı)
- 2.ortam MS + 0.5 mg/L 2,4-D
- 3.ortam MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin
- 4.ortam MS + 0.5 mg/L IAA
- 5.ortam MS + 0.5 mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin
- 6.ortam NN ortamı kontrolü (BGD içermeyen NN ortamı)
- 7.ortam NN + 0.5 mg/L 2,4-D
- 8.ortam NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin
- 9.ortam NN + 0.5 mg/L IAA
- 10.ortam NN + 0.5 mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin (Çizelge 3.4.).

İkinci grup kallus denemelerinde eksplant olarak 1 aylık *in vitro* fidelerin sadece kotiledon (5x5 mm) eksplantları kullanılmıştır. Kotiledon eksplantları her ortam için 3 tekerrür halinde, her tekerrürde 5 petri ve her petride 5 eksplant olacak şekilde kültüre alınarak, 24°C'de karanlık koşullarda inkübe edilmiştir.



Şekil 3.6. Kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan hibiskus sepallerinin görünümü

H. sabdariffa türünde tohumun yanı sıra kozalakların sepal eksplantından da kallus elde etme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla hibiskus kozalakları, *in vivo* şartlarda serada yetiştirilmiş hibiskus bitkilerinden alınmış ve bunlar buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Kozalıklardan çıkartılan sepaller kültüre alınmadan önce yukarıda tohumlar için belirtilen yüzey dezenfeksiyonu işlemlerine tabi tutulmuştur. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan sepal eksplantları 5x5 mm olacak şekilde kesilerek 1 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamı olmak üzere tek tip ortamda, ancak hem karanlık hem de aydınlık (16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyod koşulları) olmak üzere 2 farklı ışık koşulunda kültüre alınmıştır (Şekil 3.6.).

3.1.2. *O. basilicum*'da *in vitro* kültür çalışmaları

3.1.2.1 Bitkisel materyal

Çalışmada *O. basilicum* türünün yani reyhan bitkisinin “Morfes” çeşidi kullanılmış olup, bu çeşidin tohumları Enza Zaden Tarım Ar-Ge Tic. A. Ş. firmasından temin edilmiştir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Araştırmada kullanılan reyhan bitkileri ve tohumlarından genel görünüm

In vitro şartlarda antosiyanin üretimi için öncelikle tohumların *in vitro* şartlarda çimlendirilmesiyle elde edilen fidelerin çeşitli eksplantlarından (hipokotil, kotiledon, küçük yaprak, büyük yaprak) antosiyaninli kalluslar geliştirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, antosiyanin oluşumunun en yoğun görüldüğü yaprak eksplantlarının içeriğindeki antosiyanin ve antioksidan miktarı da araştırılmak istendiği için, *in vitro* şartlarda yine tohumdan *in vitro* fideler yetiştirilerek bunların sadece büyük yaprak eksplantları da analize hazırlanmıştır. Bunların yanısıra, *in vivo* şartlarda yetiştirilen fidelerin de yine büyük yaprakları hasat edilerek analiz için hazırlanmıştır.

3.1.2.2. Tohumların yüzey dezenfeksiyonu

Reyhan bitkisinde yaptığımız *in vitro* ön çalışmalarda; reyhan tohumlarının dışındaki müsilaj benzeri kaygan tabaka, özellikle sıvı ile muamele edildikten sonra şişkinleşerek dezenfeksiyon için kullanılan kimyasalların tohum kabuğundan içeri yeterince girememesine ve dolayısıyla tohumların yüzeyinin yeterince dezenfekte edilememesine neden olduğu için yoğun kontaminasyon problemi oluşturmuştur. Bu nedenle reyhan tohumlarının yüzey dezenfeksiyonu için ayrıntıları aşağıda belirtilen 3 farklı uygulamadan oluşan bir optimizasyon denemesi yapılmıştır (Çizelge 3.5., Şekil 3.8.).

Çizelge 3.5. *O. basilicum*'da yapılan tohum yüzey dezenfeksiyonu optimizasyon denemesindeki uygulamaların ayrıntıları

Uyg. No	Civa Klorür Oranı ve Süresi	Steril Saf Su ile Durulama Sayı ve Süresi	Etil alkol Oranı ve Süresi	Steril Saf Su ile Durulama Sayı ve Süresi	Sodyum Hipoklorit Oranı ve Süresi	Steril Saf Su ile Durulama Sayı ve Süresi
1	-	-	%70 (1 dk)	1 kez 3 dk	%25 (15 dk)	3 kez 3 dk
2	%0.2 (5 dk)	1 kez 5 dk	%70 (1 dk)	1 kez 3 dk	%30 (15 dk)	3 kez 3 dk
3	%0.05 (5 dk)	1 kez 5 dk	%70 (1 dk)	1 kez 3 dk	%30 (15 dk)	3 kez 3 dk



Şekil 3.8. Reyhan tohumlarında yüzey dezenfeksiyon işlemleri

3.1.2.3. Tohumların çimlendirilmesi

Reyhan tohumlarının çimlendirilmesi için her birisinde 3'er ortamın test edildiği 2 grup çimlendirme denemesi kurulmuştur.

Çizelge 3.5.'deki 1. yüzey dezenfeksiyonu uygulamasına tabi tutulan reyhan tohumları için en iyi çimlendirme ortamını belirlemeye yönelik olarak öncelikle Mod-MS, NN ve B5 olmak üzere 3 farklı temel besin ortamından oluşturulan 1.grup çimlendirme ortamları hazırlanmıştır (Çizelge 3.6.). 1. Grup çimlendirme çalışmalarında, dezenfeksiyonu yapılan reyhan tohumları bu ortamlardan her birisinde 10 kavanoz ve her kavanozda 5'er tohum olacak şekilde ekilmiştir.

Çizelge 3.6. *O. basilicum*'da 1., 2. ve 3.grup tohum çimlendirme ortamlarının içerikleri

Çimlendirme Grupları	Çiml. Ort. No	Temel Besin Ortamı	Ek Vitamin	Sukroz (g/L)	Agar (g/L)	Antifungal Etken Maddesi (ml/L)	pH
1.Grup Çimlendirme Ortamları (1. Yüzey Dezenfeksiyonu Uygulaması Yapılan Tohumlar için)	1	Mod-MS*	NN	30	7	-	5.8
	2	NN **	-	30	7	-	5.8
	3	B5***	-	30	7	-	5.8
2.Grup Çimlendirme Ortamları (2. Yüzey Dezenfeksiyonu Uygulaması Yapılan Tohumlar için)	1	Mod-MS	NN	30	7	-	5.8
	2	Mod-MS	NN	30	7	Propamocarb (1ml/L)	5.8
	3	Mod-MS	NN	30	7	Fluazinam (1ml/L)	5.8
3.Grup Çimlendirme Ortamı (3. Yüzey Dezenfeksiyonu Uygulaması Yapılan Tohumlar için)	1	Mod-MS	NN	30	7	Propamocarb (1ml/L)	5.8

*MS (Murashige Skoog, 1962), **NN (Nitsch ve Nitsch 1969) , *** B5 (Gamborg, 1968).

Birinci grup çimlendirme ortamlarında çimlendirilmeye çalışılan tohumların çimlenme oranları yüksek olsa da, kültürlerin kontaminasyon oranları yüksek bulunduğu için farklı antifungaller ilave edilerek bunların hem kontaminasyon hem de tohum çimlenmesi üzerine etkinliğinin araştırıldığı 2.grup çimlendirme denemesi yapılmıştır. Bu amaçla temel besin ortamı Mod-MS olan 3 farklı çimlendirme ortamı (Çizelge 3.6.) hazırlanmıştır. Çizelge 3.6'ın 2.Grup çimlendirme ortamları arasındaki 1 nolu ortam antifungal içermeyen kontrol ortamı iken, 2 nolu ortama propamocarb ve 3 nolu ortama ise fluazinam etken maddeli antifungallar eklenmiştir. Reyhan tohumları bu ortamlardan her birisine 3 tekerrürlü şekilde, her tekerrürde 5 kavanoz ve her kavanozda 5 tohum olacak şekilde ekilmiştir. Tohumlar çimlenmeleri için 24°C'de karanlık koşullarda bırakılmıştır. Çimlenmeye başlayan tohumlar 16/8 saat ışık/karanlık foto periyoda sahip iklim odasına (24°C) alınmış, 1'er hafta arayla çimlenme sayımları yapılmıştır.

Çizelge 3.5.'deki 3. yüzey dezenfeksiyonu uygulamasına tabi tutulan reyhan tohumları ise Çizelge 3.6'deki temel besin ortamı Mod-MS olan tek çimlendirme ortamına propamocarb etken maddeli antifungalın ilave edildiği ortamda kültüre alınmıştır. Bu gruptaki reyhan tohumları bu ortama 5 tekerrür halinde, her tekerrürde 8 kavanoz, her kavanozda 6 tohum olacak şekilde ekilmiştir.

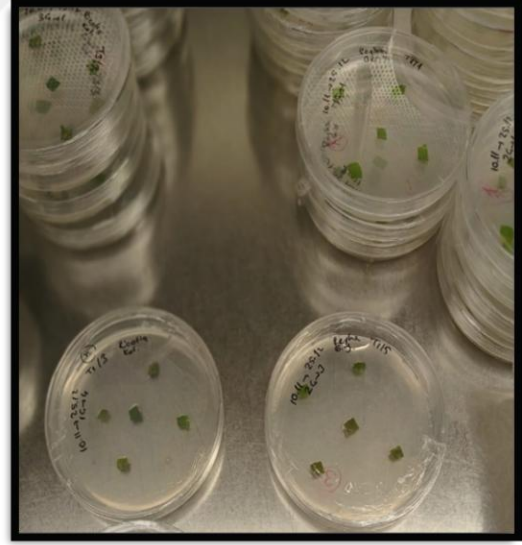
Çimlendirme ortamlarının tümüne karbonhidrat kaynağı olarak %3 sukroz,

katılaştırıcı ajan olarak ise %0.7 agar eklenmiştir (Çizelge 3.6.). Ortamların pH değeri 5.8 olup, hazırlanan ortamlar 180 ml'lik steril cam kavanozlara 20'şer mL halinde dökülerek, 121 °C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

Çimlendirilmek üzere kültüre alınan kavanozlardaki tüm tohumlar önce 2 gün 24 °C'de karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Çimlenmeye başlayan tohumlar 16/8 saat ışık/karanlık foto periyoda sahip (24°C) iklim odasına alınmış, 1'er hafta arayla çimlenme sayımları yapılmıştır. Bir ayın sonunda ise ortamlardaki çimlenme ve kontaminasyon oranları belirlenmiştir.

3.1.2.4. Kallus denemeleri

1.Grup kallus denemeleri: Reyhanda 1.grup çimlendirme çalışmalarından elde edilen fidelerin çeşitli eksplantlarından 1 ay sonra 1.grup kallus denemeleri kurulmuştur (Şekil 3.9.). Bu grupta en uygun eksplant ve kültür (ışık yönünden) koşulunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Eksplant olarak hipokotil, kotiledon, küçük yaprak ve büyük yaprak eksplantları BGD olarak 1mg/L 2,4-D nin ilave edildiği, %3 sukroz ve %0.7 agar içeren MES'li MS ortamında kültüre alınmıştır (Çizelge 3.7.). Ortamın pH değeri 5.8'e ayarlanmış ve ardından 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak sterilizasyonu yapılmıştır. Otoklavlanan ortam 9 cm'lik steril petri kaplarına 20'şer ml hacimde dökülmüş ve kültür yapılınca kadar streçlenerek 24°C karanlık koşullarda muhafazası sağlanmıştır.



Şekil 3.9. Tohum çimlendirme ortamında yetiştirilen *in vitro* reyhan bitkileri ve kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan eksplantlar

Çizelge 3.7. Reyhanda 1.grup kallus indüksiyon ortamında kültüre alınan farklı eksplantlar ve kültür koşulları

Eksplant Tipi	Kültür Koşulları	Temel* Besin Ortamı Tuzları	Ek Vitamin	BGD (mg/L)	Sukroz (g/L)	Agar (g/L)	pH
Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	1mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
	Aydınlık	MS (MES'li)	NN	1mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
Hipokotil	Karanlık	MS (MES'li)	NN	1mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
	Aydınlık	MS (MES'li)	NN	1mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
Küçük Yaprak	Karanlık	MS (MES'li)	NN	1mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
	Aydınlık	MS (MES'li)	NN	1mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
Büyük Yaprak	Karanlık	MS (MES'li)	NN	1mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
	Aydınlık	MS (MES'li)	NN	1mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8

*MS (Murashige Skoog, 1962)

Çizelge 3.7.de belirtilen her bir eksplant tipi için 3 petri kullanılmış, her petride 10 eksplant olacak şekilde eksplantlar kültüre alınmıştır. Hipokotil (5 mm uzunlukta), kotiledon, küçük yaprak ve büyük yaprak (5x5 mm) eksplantlarının kenarları steril bisturi yardımıyla kesilerek kallus oluşumu teşvik edilmeye çalışılmıştır (Şekil 3.9.). Eksplantlar petriler içerisinde kültüre alındıktan sonra petrilerin ağızları sıkıca streçle kapatılıp, 24°C'lik iklim odasında yarısı karanlık, yarısı da aydınlık (16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyod) koşullarda inkübe edilmiştir.

2.Grup kallus denemeleri: 1. grup kallus denemelerinde en iyi eksplant ve kültür koşulu belirlendikten sonra en iyi kallus geliştirme ortamını belirlemek üzere 2. grup kallus denemeleri kurulmuştur. İkinci grup denemelerde 6 farklı indüksiyon ortamı test edilmiştir. Ortamların yarısının temel besin ortamı MES'li MS iken, diğer yarısının NN ortamıdır. Her 2 grup; BGD içermeyen kontrol ortamları (1. ve 4. ortamlar), 0.5 mg/L 2,4-D içeren ortamlar (2. ve 5. ortamlar) ile 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin içeren ortamlardan (3. ve 6. ortamlar) oluşturulmuştur (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.8. Reyhanda 2.grup kallus indüksiyon ortamlarının içerikleri

Eksplant Tipi	Kültür Koşulları	Temel* Besin Ortamı Tuzları	Vitamin	Ortam No	BGD (mg/L)	Sukroz (g/L)	Agar (g/L)	pH
Büyük Yaprak	Karanlık	MS* (MES'li)	NN	1	-	30 g /L	7 g/L	5.8
				2	0.5 mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
				3	0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin	30 g /L	7 g/L	5.8
		NN**	NN	4	-	30 g /L	7 g/L	5.8
				5	0.5 mg/L 2,4-D	30 g /L	7 g/L	5.8
				6	0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin	30 g /L	7 g/L	5.8

*MS (Murashige ve Skoog, 1962), **NN (Nitsch ve Nitsch 1969)

2.grup kallus indüksiyon ortamlarında elde edilen kalluslar 1 ay sonra kallus proliferasyonu için alt kültüre alınmıştır. Kontrol grupları aynı ortama alınırken, diğer ortamlardaki kalluslar 0.5 mg/L 2,4-D içeren ortamlarda alt kültüre alınmıştır.

3.1.2.5. Yaprak üretimi için *in vitro* *O. basilicum* fidelerinin yetiştirilmesi

Antosiyanin ve antioksidan analizinde büyük yaprak eksplantları kullanılmak üzere *in vitro* reyhan fidelerinin üretimi için Çizelge 3.5.'deki 2. yüzey dezenfeksiyonu uygulamasına tabi tutulan reyhan tohumlarının çimlendirme ortamında temel besin ortamı olarak Mod-MS, vitamin olarak NN vitamini, karbonhidrat kaynağı olarak ise %3 sukroz kullanılmıştır. Ortam katılaştırıcısı olarak ise %0.7 agar kullanılmış, pH'sı 5.8'e ayarlanan ortamın sterilizasyonu 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak yapılmıştır. Tohumlar çimlendirme ortamına 4 tekerrür halinde, her tekerrürde 10 kavanoza ve her kavanozda 7 tohum olmak üzere ekilmiştir. Ağzları streçle sarılan kavanozlar 22 °C lik iklim odasında karanlıkta bekletilmiştir. 45 gün sonra bu fidelerden büyük yapraklar hasat edilerek antosiyanin ve antioksidan analizine hazır hale getirilmiştir.

3.1.3. *R. carnosula*'da *in vitro* kültür çalışmaları

3.1.3.1. Bitkisel materyal

Çalışmada *R. carnosula* türünde bitki materyali olarak daha önce yürütülen bir TUBİTAK 1007 projesinin 106G020 nolu alt projesi kapsamında toplanan doğal *R. carnosula* tohumlarının (Şekil 3.10.) serada üretilmiş tohumları kullanılmıştır.



Şekil 3.10. *R. carnosula* türünün doğadaki bitki gelişimi ve tohumlarının görünümü

3.1.3.2. Tohumların yüzey dezenfeksiyonu

R. carnosula tohumlarının yüzey dezenfeksiyonu için tohumlar önce %0.2 lik civa klorür ile 5 dk muamele edilip, sonra saf suda 1 kez 5 dk durulama yapılmıştır. Tohumlar daha sonra %70 lik ethanolde 1 dk bekletilmiş ve ardından saf su ile 1 kez 3 dk süreyle durulanmıştır. Durulanan tohumlar 1-2 damla Tween 20 içeren %15 lik ticari çamaşır suyunda 15 dk boyunca bekletilmiş ve ardından her biri 3 dk lık 3 durulama işleminden geçirilmiştir.

3.1.3.3. Tohumların çimlendirilmesi

R. carnosula tohumlarının *in vitro* şartlarda çimlendirilmesi için her ne kadar tohumların yüzey dezenfeksiyonları oldukça kapsamlı yapılmış olsa da çalışılan türün doğal bir bitki olması nedeniyle, ön denemelerde kullanılan kimyasallar kontaminasyon sorununu çözmede etkili olmamış, bu nedenle çimlendirme ortamlarına eklenen farklı antifungallerin hem kontaminasyon hem de tohum çimlenmesi üzerine etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla 3 farklı çimlendirme ortamı (Çizelge 3.9.) hazırlanmıştır.

Çizelge 3.9. *R. carnosula*'da kullanılan tohum çimlendirme ortamlarının içerikleri

Ort. No	Temel Besin Ortamı	Ek Vitamin	Sukroz (g/L)	Agar (g/L)	Antifungal Etken Maddesi (ml/L)	pH
1	Mod-MS	NN	30	7	-	5.8
2	Mod-MS	NN	30	7	Propamocarb (1ml/L)	5.8
3	Mod-MS	NN	30	7	Fluazinam (1ml/L)	5.8

*MS (Murashige Skoog, 1962), **NN (Nitsch ve Nitsch 1969)

Çizelge 3.9. dan görüleceği gibi, temel besin ortamı Mod-MS (NN vitaminli) olan 3 farklı çimlendirme ortamından 1.ortam antifungal içermeyen kontrol ortamı iken, 2.ortama propamocarb ve 3.ortama ise fluazinam etken maddeli antifungallar eklenmiştir. Ortamlara karbonhidrat kaynağı olarak %3 sükroz, katılaştırıcı ajan olarak ise %0.7 agar eklenmiştir. Ortamların pH değeri 5.8'e ayarlanmış ve ardından 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak sterilizasyonu yapılmıştır. Hazırlanan ortamlar 180 ml'lik steril cam kavanozlara 20'şer ml dökülerek, *R. carnosula* tohumları bu ortamlardan her birisine 3 tekerrürlü şekilde, her tekerrürde 4 kavanoz ve her kavanozda 5 tohum olacak şekilde ekilmiştir. Tohumlar çimlenmeleri için 24°C'de karanlık koşullarda bırakılmıştır. Çimlenmeye başlayan tohumlar 16/8 saat ışık/karanlık foto periyoda sahip iklim odasına (24°C) alınmış, 1 ay boyunca 1'er hafta arayla çimlenme sayımları yapılmıştır (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. *In vitro* şartlarda ekilmiş *R. carnosula* tohumları ve bu tohumlardan oluşan fidecikler

3.1.3.4. Kallus denemeleri

R. carnosula da kotiledon yaprakların abaksial yani alt yüzeyi her şartta istisnasız mor renkli antosiyaninler taşımaktadır. *In vitro* antosiyanin üretimi için de antosiyanin kaynağı olarak sadece kotiledon eksplantları kullanılmış ve bu kotiledonlarla 2 grup kallus denemeleri kurulmuştur.

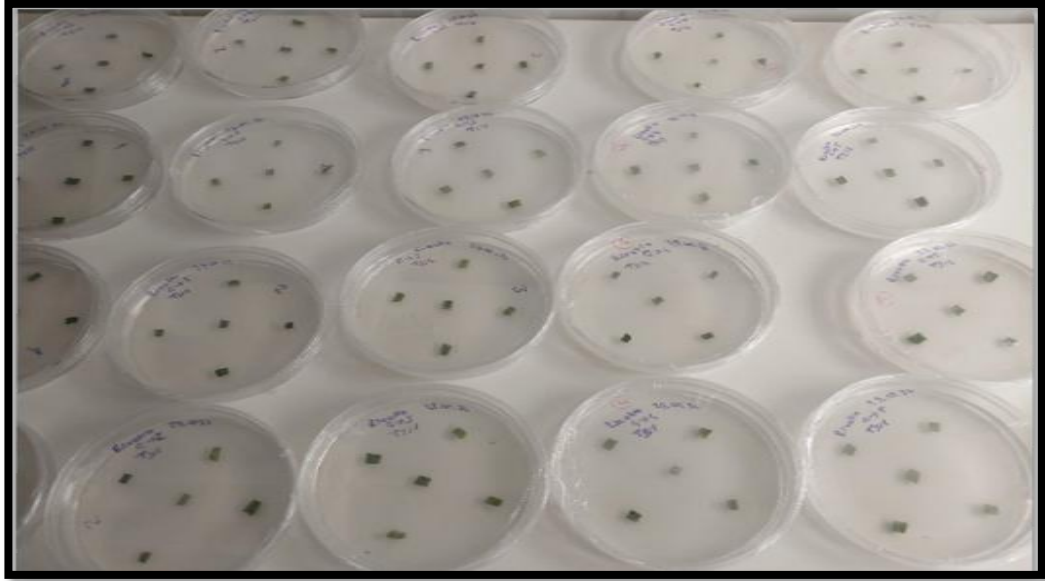
I.Grup kallus denemeleri: *R. carnosula* tohum çimlendirme çalışmalarından elde edilen kotiledonlarla öncelikle ön deneme niteliğinde 3 kallus indüksiyon ortamından oluşan 1.grup kallus denemeleri yapılmıştır. Birinci ortam kontrol ortamı olup, herhangi bir BGD içermezken, 2. ortama 2 mg/l NAA + 1 mg/l BAP, 3.ortama ise 2 mg/l NAA + 1 mg/l TDZ hormon kombinasyonları ilave edilmiştir. Ortamların temel besin ortamı MS (MES'li) ortamı olup, karbonhidrat kaynağı olarak %3 sukroz, ortam katılaştırıcısı olarak ise %0.7 eklenmiştir (Çizelge 3.10.). pH 5.8'e ayarlanmış ve ardından otoklavlanarak

sterilizasyonu yapılmıştır. Ortamlar 9 cm'lik steril petri kaplarına 20'şer ml hacimde dökülmüş ve kültür yapıncaya kadar streçlenerek 24°C karanlık koşullarda muhafaza edilmiştir. Kotiledonlar 5x5 mm boyutta kesilerek adaksial yüzeyleri yukarıya, abaksial yüzeyleri aşağıya bakacak şekilde kallus indüksiyon ortamlarına yerleştirilmiştir. Eksplantlar 3 tekerrür halinde, her tekerrürde 5 petri ve her petride 5 eksplant olacak şekilde kültüre alınmış ve petriler 24°C'de tamamen karanlık koşullarda inkübe edilmiştir (Şekil 3.12.).

Çizelge 3.10. *R. carnosula* da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 1. grup kallus indüksiyon ortamlarının içerikleri ve kültür şartları

Ortam No	Kullanılan Eksplant Tipi	Kültür Koşulları	Temel Besin Ortamı Tuzları	Vitamin	BGD (mg/L)	Sukroz (g/L)	Plant Agar (g/L)	pH
1	Kotiledon	Karanlık	MS* (MES'li)	NN**	-	30	7	5.8
2	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	2mg/l NAA + 1mg/l BAP	30	7	5.8
3	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	2mg/l NAA + 1mg/l TDZ	30	7	5.8

*MS (Murashige Skoog, 1962), **NN (Nitsch ve Nitsch 1969)



Şekil 3.12. *R. carnosula*'nın kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan kotiledon eksplantları

2.Grup kallus denemeleri: İkinci grup kallogenesis çalışmalarında ise 3'ü MS (MES'li) ve diğer 3'ü de NN (MES'li) temel besin ortamlarına sahip olmak üzere toplam 6 farklı kallus indüksiyon ortamı hazırlanmıştır. 1.ortam MS'li kontrol ortamı olup herhangi bir BGD içermezken, 2. ortama 2 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ ve 3.ortama 2 mg/L NAA + 1

mg/L Zeatin den oluşan BGD kombinasyonları ilave edilmiştir. 4.ortam NN'li kontrol ortamı olup herhangi bir BGD içermezken, 5. ortama 2 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ ve 6.ortama 2 mg/L NAA + 1 mg/L Zeatin den oluşan BGD kombinasyonları eklenmiştir. Kotiledonlar 5x5 mm ebatta kesilerek, ortamlara 4 tekerrür halinde, her tekerrürde 5 petri ve her petride 5 eksplant olacak şekilde kültüre alınmış, ağızları streçlenerek 24°C lik ortamda ilk 2 hafta karanlıkta, daha sonra da 16/8 saat fotoperiyot koşullarında karanlıkta inkübe edilmiştir (Çizelge 3.11.).

Çizelge 3.11. *R. carnosula* da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 2. grup kallus indüksiyon ortamlarının içerikleri ve kültür şartları

Ortam No	Kullanılan Eksplant Tipi	Kültür Koşulları	Temel Besin Ortamı Tuzları	Vitamin	BGD (mg/L)	Sukroz (g/L)	Plant Agar (g/L)	pH
1	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	-	30	7	5.8
2	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	2mg/l NAA + 1mg/l TDZ	30	7	5.8
3	Kotiledon	Karanlık	MS (MES'li)	NN	2mg/l NAA + 1mg/l Zeatin	30	7	5.8
4	Kotiledon	Karanlık	NN (MES'li)	-	-	30	7	5.8
5	Kotiledon	Karanlık	NN (MES'li)	-	2mg/l NAA + 1mg/l TDZ	30	7	5.8
6	Kotiledon	Karanlık	NN (MES'li)	-	2mg/l NAA + 1mg/l Zeatin	30	7	5.8

*MS (Murashige Skoog, 1962), **NN (Nitsch ve Nitsch 1969)

Kültüre alınan kalluslar, bir ay sonra kallus proliferasyonu için aynı içerikli taze ortamlarda alt kültüre alınmıştır. Eksplantlar aynı hormon konsantrasyonları içeren ortamlarda alt kültüre alınmıştır. Alt kültüre alınan kallusların 1 ay sonra antosiyanin ve antioksidan analizleri öncesi yaş ve kuru ağırlıkları tartılmıştır.

3.1.3.5. Kotiledon üretimi için *in vitro* *R. carnosula* fidelerinin yetiştirilmesi

Antosiyanin ve antioksidan analizinde kotiledon yaprakları kullanılmak üzere *in vitro* *R. carnosula* fidelerinin üretimi için Bölüm 3.1.3.2.'de belirtilen yüzey dezenfeksiyonu uygulamasına tabi tutulan *R. carnosula* tohumları Çizelge 3.9. daki 2 nolu çimlenme ortamına ekilmiştir. Tohumlar çimlendirme ortamına 4 tekerrür halinde, her tekerrürde 10 kavanoza ve her kavanozda 7 tohum olmak üzere ekilmiştir. Tohumlar çimlendirme ortamına 4 tekerrür halinde, her tekerrürde 10 petri ve her petride 18 tohum olacak şekilde ekilmiştir. Ağızları streçle sarılan petriler 24°C lik kültür odasında karanlıkta bekletilmiştir. Tohum ekiminden 40 gün sonra *R. carnosula* bitkilerinin kotiledonları kesilip analiz için yaş ve kuru ağırlıkları tartılmıştır.

3.2. *In vivo* kültür çalışmaları

Tüm bitki türlerindeki *in vivo* kültür çalışmaları Kırcaami Fide Ltd. Şti'de yürütülmüştür.

3.2.1. *H. sabdariffa*'da *in vivo* kültür çalışmaları

H. sabdariffa'da *in vivo* fide yetiştiriciliğine öncelikle fide yetiştirme kabı olan viyole, torf, vermikulit ve perlitten oluşan karışımı (2:1:1 oranında) doldurmakla başlanmıştır. Hazırlanmış olan viyolün her gözüne bir tohum olacak şekilde, toplamda 100 adet tohum ekilmiştir. Tohumlar sulanıp 24°C'de karanlık koşullarda çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenme sayımları günlük yapılmıştır. Kotiledonları yüzeye çıkıp gerçek yaprak çıkıncaya kadar sadece su verilmiştir. Kotiledonları yüzeye çıkan bitkilere ise ilk olarak azot, fosfor ve potasyumdan oluşan dengeli gübre verilmiştir. Sulamalar her sabah kontrollü bir şekilde yapılmıştır. Hibiskus fideleri 40 gün sonra saksılara aktarılmış ve analizler için kullanılacak kapsüller olgunlaşınca kadar bitkilerin bakımlarına düzenli olarak devam edilmiştir (Şekil 3.13a ve 3.13b). Kırmızımsı antosiyaninli kapsüller belirli bir olgunluğa erişince kapsüller hasat edilerek analize hazırlanmıştır.

3.2.2. *O. basilicum*'da *in vivo* kültür çalışmaları

O. basilicum'da *in vivo* fide yetiştiriciliği için de yukarıda belirtilen içerikte substrat karışımı içeren viyollere aynı şekilde toplamda 100 adet tohum ekilmiştir. Tohum ekilen viyol sulanıp, 24°C'de karanlık koşullarda çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenme görülür görülmez fidelik sehpasına yerleştirilmiş ve çimlenme sayımları yapılmıştır. Fidelerin günlük sulama gübreleme ve havalandırma kontrolleri yapılmıştır. 25 gün sonra gelişmesini tamamlayan reyhan fidelerinin (Şekil 3.13c) büyük yaprakları hasat edilerek buz kalıplarıyla birlikte laboratuvara getirilmiş, önce yaş ağırlıkları, etüvde kurutulduktan sonra da kuru ağırlıkları tartılarak analize hazırlanmıştır.

3.2.3. *R. carnosula*'da *in vivo* kültür çalışmaları

R. carnosula'daki *in vivo* fide yetiştiriciliği için de tohumlar yukarıda belirtildiği şekilde toplam 100 adet olarak ekilmiştir. Her bir viyol sulanıp 24°C'de karanlık koşullarda çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenme görülür görülmez fidelik sehpasına yerleştirilmiş ve haftalık çimlenme sayımları yapılmıştır (Şekil 3.13d). Kotiledonlar büyüüp gerçek yaprakların ilk görüldüğü zaman (15gün) kotiledonlar hasat edilerek buz kalıplarıyla birlikte laboratuvara getirilmiş ve yukarıda açıklandığı şekilde analiz öncesi yaş ve kuru ağırlıkları tartılmıştır.



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.13. *In vivo* kültür çalışmalarında yetiştirilen fideler. a), b) Hibiskus bitkileri; c) Reyhan fideleri d) *R.carnosula* fideleri

3.3. Antosiyanin ve antioksidan analizleri

3.3.1. Örneklerin hazırlanması

In vitro kallus çalışmalarından elde edilen reyhan ve *R. carnosula* kallusları alt kültüre alındıktan 4 hafta sonra ve hibiskus kallusları ise 5 hafta sonra petrilere çıkartılarak yaş ağırlıkları tartılmıştır. Bu kalluslar 2 gün boyunca 35°C’de etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları tartılmış ve analiz yapılmaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

In vitro koşullarda yetiştirilen reyhan fideleri 45 günlük, *R. carnosula* fideleri ise 40 günlük iken, reyhan fidelerinin büyük yaprakları, *R. carnosula* fidelerinin ise kotiledon yaprakları hasat edilerek toplam yaş ağırlıkları tartılmıştır. Tartılan yapraklar 35°C’de etüvde kurutularak kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. Kurutulan yapraklar analiz yapılıncaıa kadar -20°C’de muhafazaya alınmıştır.

In vivo koşullarda yetiştirilen reyhan ve *R. carnosula* fideleri içinse; tohum ekiminden 15 gün sonra *R. carnosula* kotiledonları, 25 gün sonra ise reyhan fidelerinin büyük yaprakları hasat edilip yaş ağırlıkları tartılmıştır. Yaş ağırlıkları tartılan yapraklar 2 gün boyunca 35°C’de etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları tartılmıştır. Kurutulan yapraklar analiz edilinceıe kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.3.2 Antosiyanin ve antioksidan analizi

Toplam monomerik antosiyanin analizi, antosiyaninlerin ortamın pH değerine göre renk değiştirmesinden yararlanılarak pH diferansiyel metoduıa spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir (Cemeroğlu, 2010). Buna göre örnekler, öncelikle potasyum klorür (KCl) (pH 1.0) tamponu ile farklı oranlarda seyreltilmiş ve sonuçta 0.4-0.6 absorbans değeri arasında olmasını sağlayacak seyreltme faktörü tespit edilmiştir. Daha sonra rnekler KCl ve sodyum asetat (CH₃COONa) (pH 4.5) tampon çözeltileri kullanarak belirlenen oranda seyreltilmiş, seyreltmeden sonra örnekler karanlık ortamda 15 dk bekletilerek en yüksek absorbans (A_{max}) belirlenen dalga boyu ve 700 nm’deki absorbans değerleri spektrofotometre (Shimadzu UV 1800, Kyoto, Japan) yardımııa tespit edilmiştir. Örneklere ait toplam monomerik antosiyanin içerikleri aşağıda verilen eşitlikler (2.5 ve 2.6) yardımı ile hesaplanmıştır. Sonuçlar mg siyanidin-3-glukozit 100 g kuru örnek⁻¹ eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.

$$A = (A_{\max} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{\max} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$$

$$\text{TMA (mg/L)} = A \times \text{MW} \times \text{Sf} \times 1000 \epsilon \times l$$

A: Düzeltilerek hesaplanmış absorbans farkı

MW: Baz alınacak antosiyanin molekül ağırlığı (g/mol)

Sf: Seyreltme faktörü

ϵ : Absorpsiyon katsayısı

L: Spektrofotometre küveti katman kalınlığı (1 cm)

Toplam antioksidan aktivite analizi Fernandez-Leon vd. (2013) tarafından belirlenen yönteme göre yapılmıştır. Reaksiyonu başlatmak için 50 μ L seyreltilmiş çözelti rneği ile 0.95 mL 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) eklenerek karışım hazırlanmıştır. Karışım 30 dk karanlıkta bekletilmiş ve absorbans değerleri 515 nm dalga boyunda spektrometrede okunmuştur. lm için standart olarak Troloks kullanılmıştır ve antioksidan aktivitesi mg Troloks/100 g kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır.

3.4. İncelenen özellikler

Eksplantlarda kallus oluşumu (%), antosiyaninli kallus oluşumu (%), kallus çapı (mm), kök oluşumu (%), kök sayısı/eksplant (n), yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg), kallus rengi (renk skalası) gözlemleri yapılmıştır.

Kallus oluşturan eksplantların oranı (%): Her petride kültüre alınan eksplantlardan kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına oranlanıp yüzle çarpılmasıyla belirlenmiştir.

Antosiyaninli kallus oluşturma oranı (%): Her petride kültüre alınan eksplantlardan, antosiyaninli kallus oluşturanların, petrideki eksplant sayısına oranlanıp yüzle çarpılmasıyla bulunmuştur.

Kallus çapı (mm): Petrideki her bir kallusun en ve boyu mm cinsinden ölçülüp, ortalaması alınmıştır.

Kök oluşumu (%): Her petride kültüre alınan eksplantlardan kök oluşturanların sayısı, petrideki eksplant sayısına oranlanıp yüzle çarpılmasıyla belirlenmiştir.

Ortalama kök sayısı/eksplant (n): Her petrideki eksplantlarda oluşan kökler sayılmış ve ortalaması alınmıştır.

Kallus rengi: Oluşan kallusların renklerini değerlendirmek amacıyla hibiskus için 6, reyhan için 5 ve *R. carnosula* için 6 renk skalası oluşturulmuştur.

Hibiskus kalluslarının renk skalası:

- Beyaz kallus 1
- Krem kallus 2
- Sarı kallus 3
- Yeşil kallus 4
- Kahverengi kallus 5
- Kırmızı kallus 6

Reyhan kalluslarının renk skalası:

- Beyaz kallus 1
- Krem kallus 2
- Pembe kallus 3
- Kırmızı kallus 4
- Mor kallus 5

R. carnosula kalluslarının renk skalası:

- Beyaz kallus 1
- Krem kallus 2
- Sarı kallus 3
- Yeşil kallus 4

- Kahverengi kallus 5
- Kırmızı kallus 6

Yaş ağırlık (mg): Bir uygulamada her eksplanttan elde edilen kallus veya yapraklar hassas terazide tartıldıktan sonra ağırlıklarının ortalaması alınmıştır.

Kuru ağırlık (mg): Yaş ağırlığı tartılan kallus veya yapraklar 35 °C lik etüvde 2 gün kurutulduktan ve hassas terazide tartıldıktan sonra ağırlıklarının ortalaması alınmıştır.

3.5. İstatistik analizi

Tüm istatistiksel analizler, istatistiksel hesaplamalar için geliştirilmiş bir programlama dili ve ortam olan R dili için entegre bir geliştirme ortamı olan RStudio (sürüm 2025.05.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Varyans analizleri (ANOVA) için "agricolae" paketi kullanılmıştır. Farklı uygulamaların incelenen parametreler üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla tek yönlü ve iki yönlü ANOVA analizleri yapılmıştır. Anlamlı farklılıkların tespit edilmesi durumunda, gruplar arası farkları belirlemek için %5 anlamlılık düzeyinde Fisher'in En Küçük Önemli Fark (LSD) testi uygulanmıştır.

Ayrıca, kültür ortamı ile kallus rengi dağılımı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Fisher'in Kesinlik Testi kullanılmıştır. Bu test, iki kategorik değişken arasında rastlantısal olmayan bir ilişki olup olmadığını belirlemek için kullanılan parametrik olmayan bir istatistiksel yöntemdir. Özellikle biyolojik deneylerde sıkça karşılaşılan küçük örneklem büyüklükleri veya dengesiz dağılımlar gibi durumlar için uygun bir analiz yöntemidir. Veri setinin büyüklüğü ve tablonun karmaşıklığı nedeniyle test, 10.000 yinelemeli Monte Carlo simülasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve anlamlılık düzeyleri bu şekilde tahmin edilmiştir.

Tüm sonuçlar %95 güven düzeyi esas alınarak değerlendirilmiş ve istatistiksel bulguları desteklemek amacıyla uygun grafik ve tablo gösterimleri oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. *In vitro* kültür çalışmaları bulguları

4.1.1. *H. sabdariffa*'da *in vitro* kültür çalışmaları bulguları

4.1.1.1. *H. sabdariffa*'da tohum çimlenme bulguları

Kallus denemelerinde kullanılacak eksplantları elde etmek için *in vitro* stok bitkiler yetiştirilmiştir. Bu amaçla hibiskus tohumları sterilizasyona tabi tutulmuş ve ardından 1. Grup çimlendirme ortamı yapılmıştır. Bu grupta üç farklı çimlendirme ortamı (Çizelge 3.1.) test edilmiştir. 1 nolu kontrol ortamında %25 çimlenme, %66 kontaminasyon gerçekleşmiştir. Propamocarb etken maddeli antifungal ilave edilmiş 2 nolu ortamda %25 çimlenme ve %33 kontaminasyon kaydedilmiştir. Fluazinam etken maddeli antifungalın eklendiği 3 nolu ortamda ise %25 çimlenme ve %41 oranında kontaminasyon meydana gelmiştir. Öte yandan, ortamlara eklenen propamocarb ve fluazinam etken maddeli antifungallerin kontaminasyonu önemli ölçüde azaltırken, çimlenme üzerine önemli etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Bu bulgulara göre kontaminasyona karşı en etkili çimlendirme ortamı 2 nolu ortam olarak belirlenmiş, hibiskusda bundan sonra bu çimlendirme ortamının kullanıldığı *in vitro* fide elde etme çalışmalarında %23 oranında çimlenme gerçekleşirken, kontaminasyon oranı kaydedilmemiştir.

4.1.1.2. *H. sabdariffa*'da kallus deneme bulguları

1.Grup kallus deneme bulguları: Hibiskusda yapılan 1.grup kallus denemelerinde 3 indüksiyon ortamı ve 2 eksplant tipi (hipokotil ve kotiledon) kullanılmıştır. Bu ortamlarda kültüre alınan eksplantlardan meydana gelen kallus oluşumu ve kallus çapı parametrelerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1. de verilmiştir.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi, ortamın bağımsız etkisi değerlendirildiğinde, herhangi bir BGD nin ilave edilmediği kontrol ortamında kallus oluşumu gerçekleşmemiştir. Buna karşılık, 2.ortam (MS + 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP) ve 3. ortamda (MS + 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L Kinetin) %100 oranında kallus oluşumu meydana gelmiştir. Kallus çapı yönünden ise en yüksek değer 21 mm olarak 2.ortamda ölçülürken, 3.ortamın çap ortalaması 18.66 mm olarak kaydedilmiştir. Bu 2 ortam, kallus çapı açısından kontrol ortamından ve birbirinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir. Eksplant tipinin bağımsız etkisi değerlendirildiğinde ise hipokotil ve kotiledonlar arasında kallus oluşum yüzdesi bakımından fark bulunmamış, her iki eksplant tipi de ortalama %66.6 oranında kallus üretmiştir. Ancak kallus çapı bakımından kotiledon eksplantları, ortalama 17.22 mm'lik değeriyle, hipokotil eksplantlarına kıyasla (9.22 mm) yaklaşık 2 kat daha fazla kallus üretmiş ve bu fark oldukça önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu durum, kotiledon dokusunun daha büyük kallus geliştirme açısından daha avantajlı olduğunu ortaya koymuştur.

Ortam ve eksplant tipinin interaksyonu (etkileşimi) değerlendirildiğinde, kallus oluşumu açısından etkileşim ölçülememiştir. Ancak kallus çapı bakımından etkileşim son derece anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Özellikle 2.ortamda kültüre alınan kotiledon eksplantlarında kallus çapı 27.3 mm ile en yüksek değere ulaşmıştır. Benzer şekilde,

3.ortamda kültüre alınan kotiledon eksplantlarında ise kallus çapı 24.3 mm olarak belirlenmiştir. Her iki ortamda kültüre alınan hipokotil eksplantlarında ise kallus çapı değerleri daha düşük (2.ortamda: 14.7 mm, 3.ortamda: 13 mm) bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Hibiskusda 1.grup kallus denemelerinde farklı ortam ve eksplant ile bu faktörlerin interaksiyonunun kallus oluşumu ve kallus çapı üzerine etkileri

Faktör	Kallus Oluşumu (%)		Kallus Çapı (mm)	
Ortam				
Ortam 1.	0.00		0.00 c ¹	
Ortam 2.	100		21.00 a	
Ortam 3.	100		18.66 b	
LSD (%5)	ö.d. ²		1.90*** ²	
Eksplant				
Hipokotil	66.67		9.22 b	
Kotiledon	66.67		17.22 a	
LSD (%5)	ö.d.		1.55***	
	Kallus Oluşumu (%)		Kallus Çapı (mm)	
Ortam x Eksplant	Hipokotil	Kotiledon	Hipokotil	Kotiledon
Ortam 1.	0.00	0.00	0.00d	0.00d
Ortam 2.	100	100	14.67c	27.33 a
Ortam 3.	100	100	13.00c	24.33b
LSD (%5)	ö.d.		2.69***	

¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² ***: $p < 0.001$. ² ö.d: Önemli değil.

Bu sonuçlar, kullanılan ortam bileşimlerinin kallus indüksiyonu ve gelişiminde etkili olduğunu ve özellikle kotiledon eksplantlarının kallus kalitesi üzerinde yüksek performans sergilediğini göstermiştir. Herhangi bir BGD kullanılmayan kontrol ortamı hibiskusda kallus oluşumunu teşvik etmemiştir. Çeşitli BGD içeriğine sahip 2.ortam ve 3.ortamdan ise özellikle 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP kombinasyonuna sahip 2.ortam, her iki eksplant tipi için de kallus gelişimi açısından daha başarılı ortam olarak öne çıkmıştır.

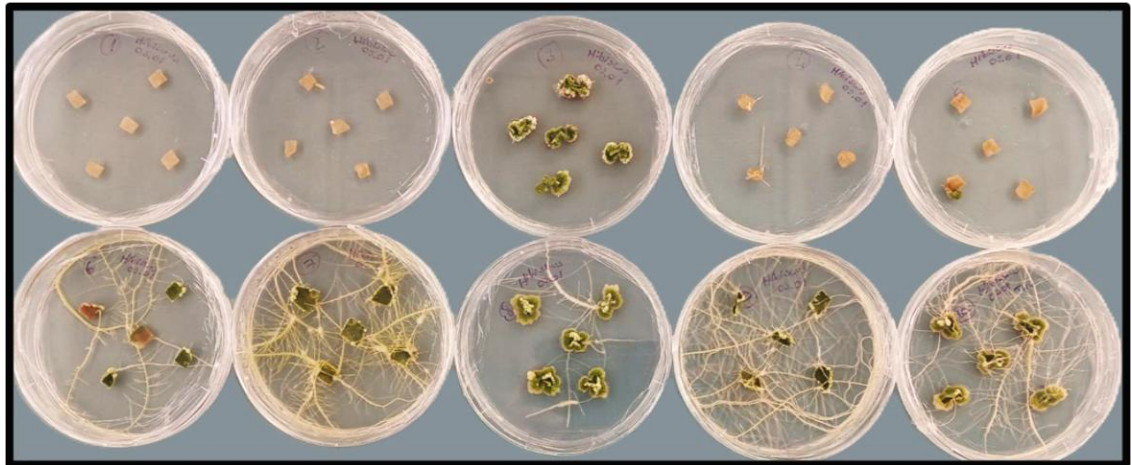
2.Grup kallus deneme bulguları: Hibiskusta yapılan daha kapsamlı 2.grup kallus denemelerinde 10 indüksiyon ortamı ve tek eksplant tipi olarak kotiledon kullanılmıştır. Bu ortamlarda kültüre alınan kotiledonlarda; farklı besin ortamlarının kallus oluşumu, kallus çapı, kök oluşumu, kök sayısı/eksplant, yaş ve kuru ağırlık gibi parametreler üzerindeki etkileri Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Hibiskus 2.grup kallus denemelerinde kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 10 farklı indüksiyon ortamının kallus oluşumu, kallus çapı, kök oluşumu, kök sayısı/eksplant ile yaş ve kuru kallus ağırlığı üzerine etkileri

Kallus İndüksiyon Ortam No	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Çapı (mm)	Kök Oluşumu (%)	Kök Sayısı /Eksplant (adet)	Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)
1	0.00 c ¹	0.00 b	65.00 c	0.65 ef	0.00 c	0.00 c
2	0.00 c	0.00 b	66.67 bc	1.33 de	0.00 c	0.00 c
3	86.67 b	8.40 c	36.67 d	0.50 f	197.3 b	40 b
4	0.00 c	0.00 b	66.67 bc	0.67 ef	0.00 c	0.00 c
5	0.00 c	0.00 b	65.00 c	0.75 def	0.00 c	0.00 c
6	0.00 c	0.00 b	70.00 bc	1.53 d	0.00 c	0.00 c
7	0.00 c	0.00 b	100.00 a	12.08 b	0.00 c	0.00 c
8	100 a	11.72 a	81.67 b	2.40 c	300.17 a	55.92 a
9	0.00 c	0.00 b	65.00 c	14.50 a	0.00 c	0.00 c
10	100 a	9.92 b	46.67 d	1.18 def	204.67 b	44 b
LSD (%5)	3.89*** ²	1.41***	16.04***	0.82***	14.79***	5.14***

¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² ***: $p < 0.001$.

Çizelge 4.2'deki varyans analizi sonuçları incelenen tüm parametrelerde ortamlar arasında istatistiksel olarak son derece anlamlı farklılıkların bulunduğunu ortaya koymuştur ($p < 0.001$). İndüksiyon ortamlarının kallus oluşumu üzerine etkisi değerlendirildiğinde, sadece 3.ortamda %86.67, 8.ortam (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin) ve 10.ortamda ise (NN + 0.5 mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin) %100 oranında kallus üretimleri sağlanırken (Şekil 4.1), ilginç şekilde diğer 7 ortamda hiç kallus oluşumu gerçekleşmemiştir.

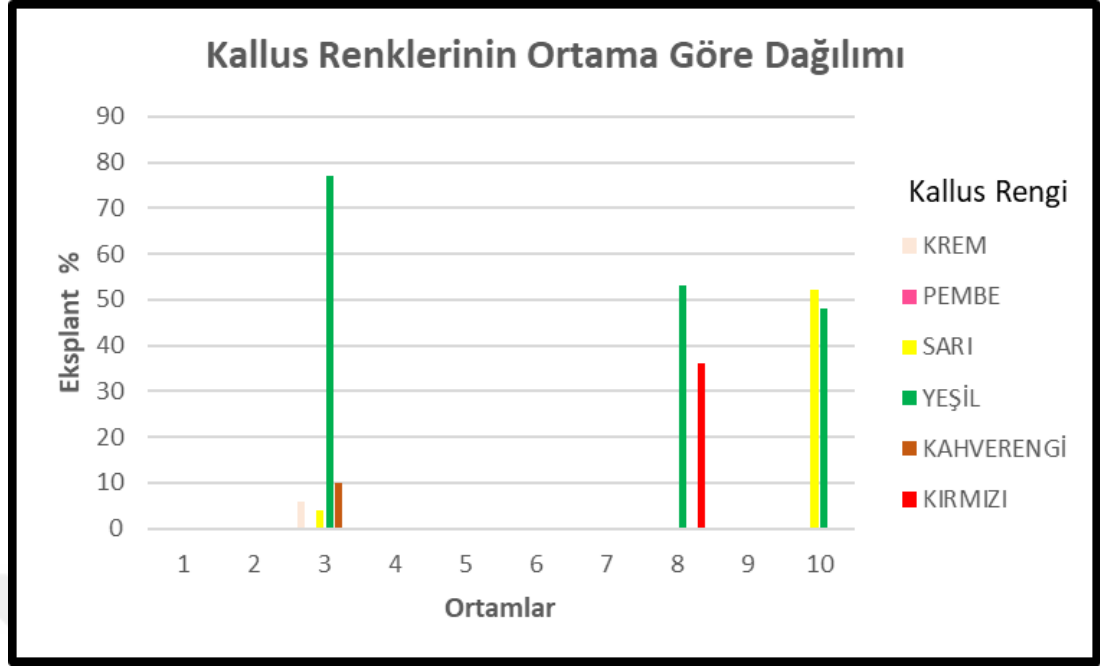


Şekil 4.1. Hibiskusta yapılan 2.grup kallus denemelerinde 10 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarının ortamlara verdiği tepkilere örnekler. Sol üstte sağa doğru; 1. ortam (MS Kontrol), 2. ortam (MS + 0.5 mg/L 2,4-D) 3. ortam (MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin), 4. ortam (MS + 0.5 mg/L IAA) , 5. ortam (MS + 0.5

mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin). Sol altta sağa doğru; 6. ortam (NN Kontrol), 7. ortam (NN + 0.5 mg/L 2,4-D) 8. ortam (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin), 9. ortam (NN + 0.5 mg/L IAA) , 10. ortam (NN + 0.5 mg/L IAA + 0.25 mg/L Zeatin).

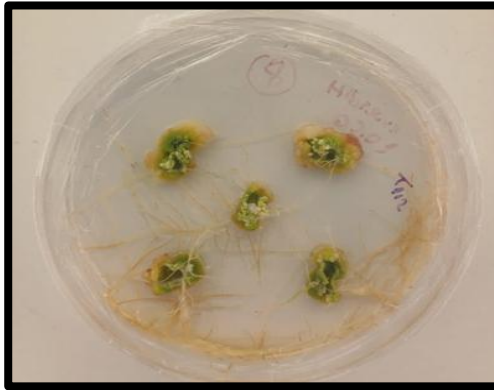
Kallusların yaş ve kuru ağırlıkları en yüksek 8 numaralı ortamda belirlenmiş; bu ortamda elde edilen yaş ağırlık 300.17 mg, kuru ağırlık ise 55.92 mg olarak tartılmıştır. Bunu ikinci olarak 10. ortam ve üçüncü olarak ise 3. ortam izlemiştir. Bu durum, 8 numaralı ortamın kallus dokularında biyokütle birikimini desteklediğini ve bu özelliği ile diğer ortamlardan ayrıştığını göstermektedir (Çizelge 4.2). Deneme sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, her bir ortamın hibiskus kotiledon eksplantlarının morfojenik yanıtları üzerinde farklı düzeylerde etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır. Özellikle 7.ortam (NN + 0.5 mg/L 2,4-D) kök oluşumu açısından öne çıkarken (%100), 8.ortam kallus oluşumunun yanısıra, kallus çapı ve biyokütle üretimi açısından da en etkili ortam olarak bulunmuştur. Bunlara ek olarak, 9.ortam (NN + 0.5 mg/L IAA) ise kök sayısı/eksplant artırma yönünden en etkili sonucu ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar, ortam kompozisyonlarının bitki doku kültürü uygulamalarındaki kritik rolünü bir kez daha ortaya koymakta ve hibiskus türünde bundan sonra yapılabilecek doku kültürü çalışmaları açısından önemli verileri ortaya koymaktadır.

Hibiskusda yapılan 2.grup kallus denemelerinde ayrıca, kullanılan indüksiyon ortamının oluşan kallusların rengi üzerine etkileri de değerlendirilmiştir. 2.grup kallus denemelerinde 6 aya kadar oluşan kallus renkleri krem, sarı, yeşil, pembe, kırmızı ve kahverengi ile sınırlı kalmış ve değerlendirme bu renkler üzerinden yapılmıştır (Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.). Bu veri setinde, bazı ortamlarda kallus oluşumu gözlenmemesi nedeniyle klasik Ki-kare testi yerine, daha uygun bir yöntem olan simülasyon tabanlı Fisher'in kesinlik testi uygulanmıştır. Elde edilen p değeri 0,00009999 olup, bu sonuç kallus renklerinin ortamlara göre dağılımının istatistiksel olarak son derece anlamlı bir şekilde farklılaştığını göstermektedir. Bu bulgu, kallus renginin yalnızca genetik faktörlerden değil, aynı zamanda kültür ortamlarının birleşiminden de önemli ölçüde etkilendiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.2. Hibiskus kotiledonlarının kültüre alındığı 2.grup kallus indüksiyon ortamlarının oluşan kallusların rengi üzerindeki etkileri.

Çalışmanın 6.ayından sonra özellikle 8.ortamda olmak üzere, bazı kalluslarda hibiskus kapsüllerindeki kırmızımsı renk benzeri renklenme oluşumuna rastlanmıştır (Şekil 4.3). Bu durum, hibiskus türünde hem kotiledondan kallus oluşumu, hem de kallusdan antosiyanin oluşumunun çalışmada kullanılan diğer 2 türe göre daha geç gerçekleştiğini ortaya koymuştur.



Şekil 4.3. Hibiskus 2.grup kallus denemelerinin 8.ortamında kültürden 6 ay sonra başlayan antosiyanin oluşum görüntüsü.

H. sabdariffa'da kozalakların sepallerinden yapılan kallus denemelerinde ise sepallerden herhangi bir kallus gelişimi meydana gelmemiştir.

4.1.2. *O. basilicum*'da *in vitro* kültür çalışmaları bulguları

4.1.2.1. *O. basilicum*'da tohum yüzey dezenfeksiyonu ve çimlendirme bulguları

O. basilicum'da kallus denemelerinde kullanılacak eksplantları elde etmek için *in vitro* stok bitkiler yetiştirilmeye çalışılmıştır. Bunun için en uygun tohum çimlendirme ortamını belirlemek amacıyla reyhan tohumları öncelikle 1.yüzey dezenfeksiyonu uygulamasına tabi tutulmuş, ardından herhangi bir BGD veya katkı maddesi içermeyen 3 farklı temel besin ortamından (MS, NN ve B5 ortamları) oluşan 1.grup çimlendirme ortamlarına ekilmiştir. Bu grubun 3 çimlendirme ortamında da tohumlar hızla çimlenmeye başlamış, ancak başlangıçta temiz görünen kültürlerde zamanla kontaminasyon oranları hızla artmıştır. 1.grup çimlendirme ortamlarındaki MS'li 1.çimlendirme ortamında %84 çimlenme ve %40 kontaminasyon, NN'li 2.çimlendirme ortamında %80 çimlenme ve %50 kontaminasyon ve B5'li 3.çimlendirme ortamında ise %78 çimlenme ve %50 kontaminasyon meydana gelmiştir (Çizelge 4.3.). En az %78 çimlenmenin gerçekleştiği 1.grup çimlendirme ortamlarında en fazla çimlenme %84 ile MS'li ortamda oluşmuştur. Bununla birlikte, kontaminasyon oranları tüm ortamlarda genel olarak yüksek bulunmuştur. Yüksek çimlenme oranlarına karşılık kontaminasyon oranlarının yüksek olmasının nedeni reyhan tohumlarının dışındaki müsilaj benzeri kaygan tabakaya bağlanabilir. Bu tabakanın özellikle sıvı ile muamele edildikten sonra şişkinleşerek dezenfeksiyon için kullanılan kimyasalların tohum kabuğundan içeri yeterince girememesine ve dolayısıyla tohumların yüzeyinin yeterince dezenfekte edilememesine neden olduğu için yoğun kontaminasyon problemi oluşturduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. Farklı yüzey dezenfeksiyonu uygulamalarına tabi tutulduktan sonra farklı çimlendirme ortamlarına ekilen *O. basilicum* tohumlarının çimlenme ve kontaminasyon oranları (%)

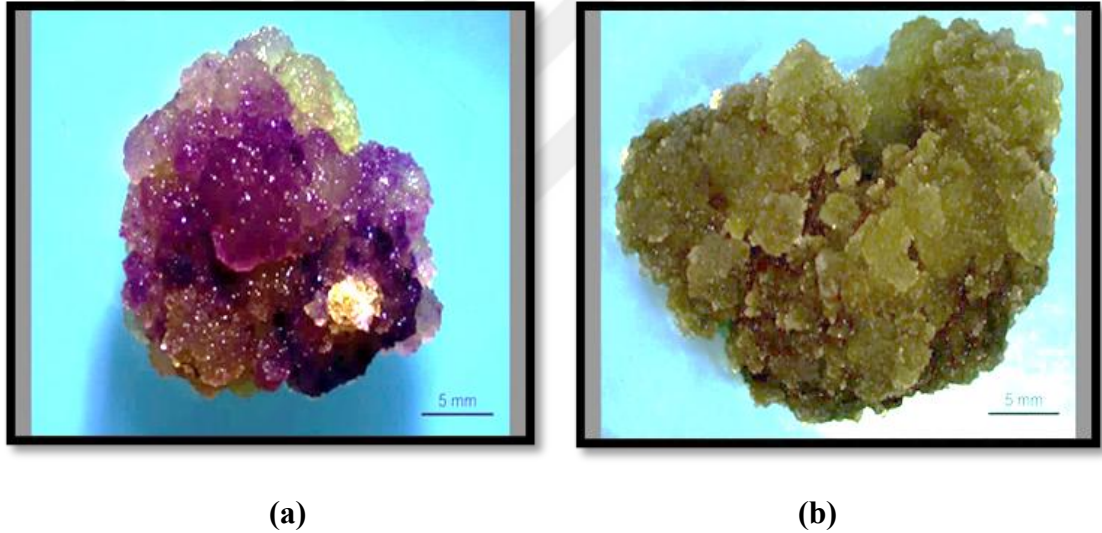
Yüzey Dezenfeksiyonu Uygulamaları	Çimlenme (%)	Kontaminasyon (%)	Çimlenme (%)	Kontaminasyon (%)	Çimlenme (%)	Kontaminasyon (%)
1. Yüzey Dezenfeksiyonu Uygulaması Yapılan Tohumların Çimlendirme Ortamları ve Sonuçları	1.Çimlendirme Ortamı (Mod-MS li)		2.Çimlendirme Ortamı (NN li)		3.Çimlendirme Ortamı (B5 li)	
	84	40	80	50	78	50
2. Yüzey Dezenfeksiyonu Uygulaması Yapılan Tohumların Çimlendirme Ortamları ve Sonuçları	MS li Kontrol Ortamı		Propamocarb Etken Maddeli Çimlendirme Ortamı (Mod-MS li)		Fluazinam Etken Maddeli Çimlendirme Ortamı (Mod-MS li)	
	73.3	43	90	25	78.3	33
3. Yüzey Dezenfeksiyonu Uygulaması Yapılan Tohumların Çimlendirme Ortamları ve Sonuçları	-		Propamocarb Etken Maddeli Çimlendirme Ortamı (Mod-MS li)		-	
	-	-	81	0	-	-

Tohumlardaki kontaminasyonun fazla olması sebebiyle farklı antifungallerin hem kontaminasyon hem de çimlendirme üzerine etkilerinin ortaya konulması için reyhan tohumlarına 2.grup sterilizasyon uygulaması (%0.2 civa klorürlü) yapılmış ve bu uygulamaya tabi tutulan tohumlar temel besin ortamı Mod-MS olan 3 farklı ortamdan oluşturulan 2.grup çimlendirme ortamlarına ekilmiştir. Bu ortamlardan 1.ortam antifungal eklenmeyen kontrol ortamı iken, 2.ortama propamocarb (1ml/L) ve 3.ortama fluazinam (1ml/L) etken maddeli antifungaller ilave edilmiştir. 2.grup çimlendirme ortamlarından 1.ortamda %73.3 çimlenme ve %43 kontaminasyon, 2.ortamda %90 çimlenme ve %25 kontaminasyon, 3.ortamda ise %78.3 çimlenme ve %33 kontaminasyon gerçekleşmiştir (Çizelge 4.3.). Bu bulgulara göre; en az çimlenme (%73.3) ve en yüksek kontaminasyon (%43) kontrol ortamında gerçekleşirken, en yüksek çimlenme (%90) ve en az kontaminasyon (%25) ise propamocarb etken maddeli antifungal içeren 2.çimlendirme ortamında meydana gelmiştir. Ayrıca, 2.grup denemelerde antifungal eklenen 2. ve 3. çimlenme ortamlarının kontaminasyonu önemli ölçüde azaltırken, çimlenmeyi de arttırması önemli bulunmuştur. Bununla birlikte, kullanımı uygulayıcıya ve çevreye zararlı olan civa klorür konsantrasyonunun ¼ oranında azaltılarak yüzey dezenfeksiyonu yapılan tohumların, 2.grupta en başarılı bulunan çimlendirme ortamına ekildiğindeki çimlenme ve kontaminasyon etkisi tespit edilmek istenmiş ve bu amaçla 3.çimlendirme uygulamasına geçilmiştir. Bunun için %0.2 den

%0.05 oranına düşürülen civa klorürlü 3.yüzey dezenfeksiyonu uygulamasına tabi tutulan tohumlar, temel besin ortamı yine Mod-MS olan ve propamocarb (1ml/L) etken maddeli antifungalın ilave edildiği çimlendirme ortamına ekilmiştir. Tek bir sterilizasyon ve çimlendirme ortamı kullanılan 3.çimlendirme uygulamasında %81 oranında çimlenme gerçekleşirken, kontaminasyon oranı kaydedilmemiştir (Çizelge 4.3.).

4.1.2.2. *O. basilicum*'da kallus deneme bulguları

1.Grup kallus deneme bulguları: Reyhan bitkisi üzerinde yürütülen 1.kallus denemelerinde, eksplant tipi (hipokotil, kotiledon, küçük yaprak ve büyük yaprak) ile kültür koşullarının (aydınlık ve karanlık) kallus oluşumu (%), antosiyaninli kallus oluşumu (%), antosiyaninli kallus miktarı ve kallus çapı (mm) üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Kültür koşulunun kallus üzerindeki etkisi önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.4.). Eksplant tipinin kallus oluşumu üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ve eksplant ile kültür koşulu arasındaki etkileşim de anlamlı değildir. Bu durum, eksplantların kallus oluştururken esas olarak kültür ortamındaki aydınlık, karanlık koşulları gibi çevresel faktörlerden direkt olarak etkilenmediğini göstermektedir (Çizelge 4.4.).



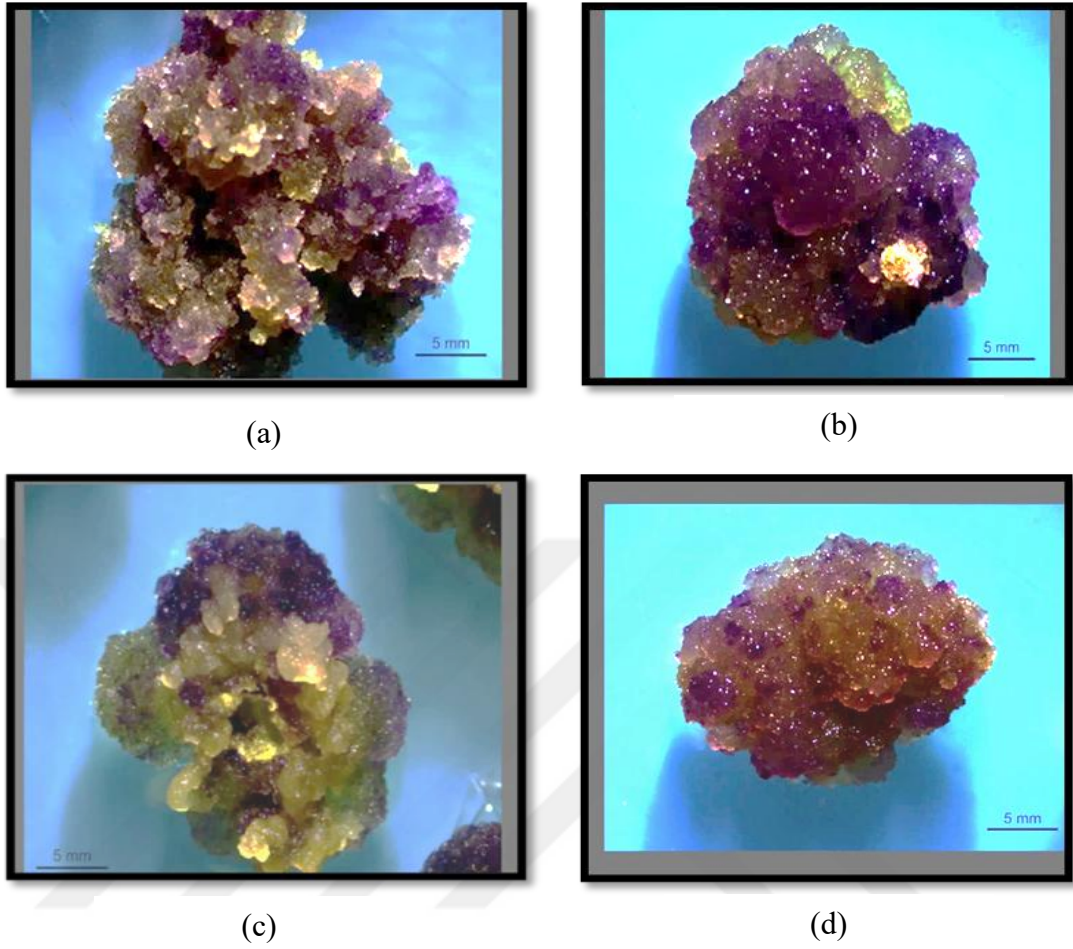
Şekil 4.4. Reyhanda 1.kallus denemelerinde farklı kültür koşullarında elde edilen kalluslar; (a) Karanlıkta kültüre alınan küçük yaprak eksplantından oluşan kallus; (b) Aydınlıkta kültüre alınan küçük yaprak eksplantından oluşan kallus

Çizelge 4.4. Reyhanda yapılan 1.grup kallus denemelerinde eksplant ve kültür koşulu faktörlerinin toplam kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu ve kallus çapı üzerine bağımsız ve interaksiyonel etkileri

Faktör	Kallus Oluşum (%)		Antosiyaninli Kallus Oluşum (%)		Kallus Çapı (mm)	
Kültür Koşulu						
Aydınlık	100		45.00b ¹		19.75a	
Karanlık	100		85.00a		17.75b	
LSD (%5)	-		15.76***		1.59*	
Eksplant						
Hipokotil	100		50.00b		19.75ab	
Kotiledon	100		45.00b		15.50c	
Küçük yaprak	100		75.00a		18.00b	
Büyük yaprak	100		90.00a		21.75a	
LSD (%5)	-		22.29*** ²		2.25***	
Kültür Koşulu x Eksplant	Kallus Oluşum (%)		Antosiyaninli Kallus Oluşum (%)		Kallus Çapı (mm)	
	Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık
Hipokotil	100	100	0.0d	100a	22.5ab	17.0c
Kotiledon	100	100	50bc	40c	11.0d	20.0bc
Küçük Yaprak	100	100	50bc	100a	19.0c	17.0c
Büyük Yaprak	100	100	80ab	100a	25a	18.5c
LSD (%5)	ö.d.		31.52***		3.18***	

¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² ***: $p < 0.001$. ö.d: Önemli değil.

Antosiyaninli kallus oluşumu ve miktarı ise hem kültür koşullarına hem de eksplant tipine bağlı olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0.001$). En yüksek antosiyaninli kallus oluşumu, karanlık koşulunda (%85) ve büyük yaprak eksplantından elde edilen kalluslarda (%90) gözlenmiştir (Şekil 4.4.ve Şekil 4.5.). Eksplant ve kültür koşulu arasındaki etkileşim de anlamlı bulunmuş ($p < 0.001$), bu da antosiyaninli kallus oluşum miktarının yalnızca tek bir faktörden değil, bu faktörlerin birleşiminden etkilendiğini göstermektedir (Çizelge 4.4.).



Şekil 4.5. Reyhanda 1.kallus denemelerinde karanlık kültür koşullarında farklı ortamlarda kültüre alınan farklı eksplantlardan elde edilen antosiyaninli kallus oluşumları; a) Hipokotilden oluşan kallus; b) Büyük yapraktan oluşan kallus; c) Kotiledondan oluşan kallus; d) Küçük yapraktan oluşan kallus.

Kallus çapı açısından da hem kültür koşulları hem de eksplant tipi bağımsız olarak anlamlı fark oluşturmuştur ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$). Aydınlik ve karanlık koşulları arasında kallus çapı bakımından anlamlı bir fark oluşmuştur. Aydınlik koşullarda (19.75 mm) en büyük kalluslar oluşmuştur. Eksplantlar arasında en büyük kallus çapı (21.75mm) büyük yapraktan elde edilmiştir (Şekil 4.5.). Bu durum eksplant ve ortam etkileşiminin kallus gelişiminde belirleyici olduğunu göstermektedir ($p < 0.001$). Antosiyanin içeren kallus miktarı da tüm faktörlerden anlamlı şekilde etkilenmiştir; kültür koşulu ($p < 0.001$), eksplant tipi ($p < 0.001$) ve bunların etkileşimi ($p < 0.001$) anlamlı bulunmuştur. Tüm eksplant tiplerinde karanlık koşullarda daha fazla sayıda antosiyanin içeren kallus elde edilmiş, bu da karanlık ortamın reyhan bitkisine ait kalluslarda antosiyanin üretimini teşvik ettiğini göstermektedir (Çizelge 4.4.).

2.Grup kallus deneme bulguları: Reyhan bitkisinde yürütülen 2.kallus denemelerinde, eksplant olarak yalnızca büyük yapraklar kullanılmış ve bu eksplantlar farklı gelişim parametrelerini değerlendirmek amacıyla 6 farklı kallus indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Değerlendirilen parametreler; kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu,

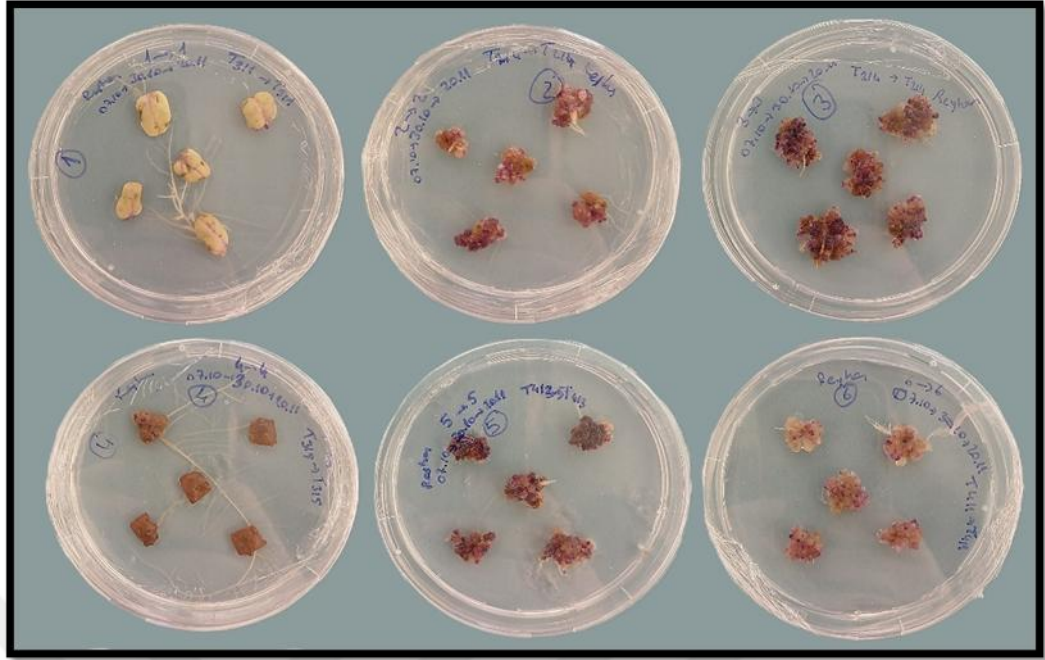
kallus çapı, kök oluşumu, kök sayısı/eksplant, kallus yaş ağırlığı ve kallus kuru ağırlığıdır. Varyans analizi (ANOVA), tüm bu özellikler açısından ortamlar arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı farklar ($p < 0.001$) olduğunu ortaya koymuştur (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Reyhanda yapılan 2.grup kallus denemelerinde farklı kallus indüksiyon ortamlarının kültüre alınan büyük yapraklarda kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu, kallus çapı, kök oluşumu, kök sayısı/eksplant, kallus kuru ve yaş ağırlığı üzerine etkileri

Ortam No	Kallus Oluşumu (%)	Antosiyaninli Kallus Oluşumu (%)	Kallus Çapı (mm)	Kök Oluşumu (%)	Kök Sayısı/ Eksplant (adet)	Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)
1	48.75b ¹	48.75b	10.77b	67.50bc	2.65b	37.93f	9.10d
2	100a	100a	10.24b	61.25c	1.23c	138.1d	17.85c
3	100a	100a	14.72a	80.00ab	1.94bc	361.93a	32.63a
4	5c	5c	7.75b	90.00a	4.86a	62.5e	10.34d
5	100a	100a	10.31b	70.00bc	1.83bc	177.13c	21.73bc
6	100a	100a	14.46a	63.75c	1.93bc	246.88b	27.19ab
LSD (%5)	6.96*** ²	6.96***	1.31***	13.68***	0.88***	19.13***	7.15***

¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² ***: $p < 0.001$.

Çizelge 4.5'e göre kallus oluşumu açısından, 2. (MS + 0.5 mg/L 2,4-D), 3. (0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin), 5. (NN + 0.5 mg/L 2,4-D) ve 6. (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin) ortamlardan her biri %100 kallus üretim oranı ile en başarılı sonuçları oluşturmuştur. Bu durum, bu ortamlara eklenen 0.5 mg/L 2,4-D nin kallus oluşumunu teşvik ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, 4 numaralı ortamda en düşük oranda (%5) kallus oluşurken, %90 oranında kök oluşmuştur. Bu durum ise bu ortamın kallus için değil, kök oluşumu için en etkili ortam olduğunu ortaya koymuştur. Yine 4 nolu ortamda ortalama 4.86 kök/eksplant ile en yüksek kök sayısı/eksplant elde edilmiştir. Bu sonuç da BGD eklenmemiş NN ortamının köklenmeyi teşvik etmede özel bir role sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.6.). Kallus çapı açısından ise en büyük kalluslar 3 ve 6 numaralı ortamlardan elde edilmiştir. Bu ortamların kalluslarında ölçülen ortalama çaplar sırasıyla 14.72 mm ve 14.46 mm olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, bu ortamlardaki 0.5 mg/L 2,4-D ile birlikte 0.2 mg/L Zeatin kullanımının yalnızca kallus oluşumunu değil, aynı zamanda kallus gelişimini daha etkin şekilde desteklediğini göstermektedir.



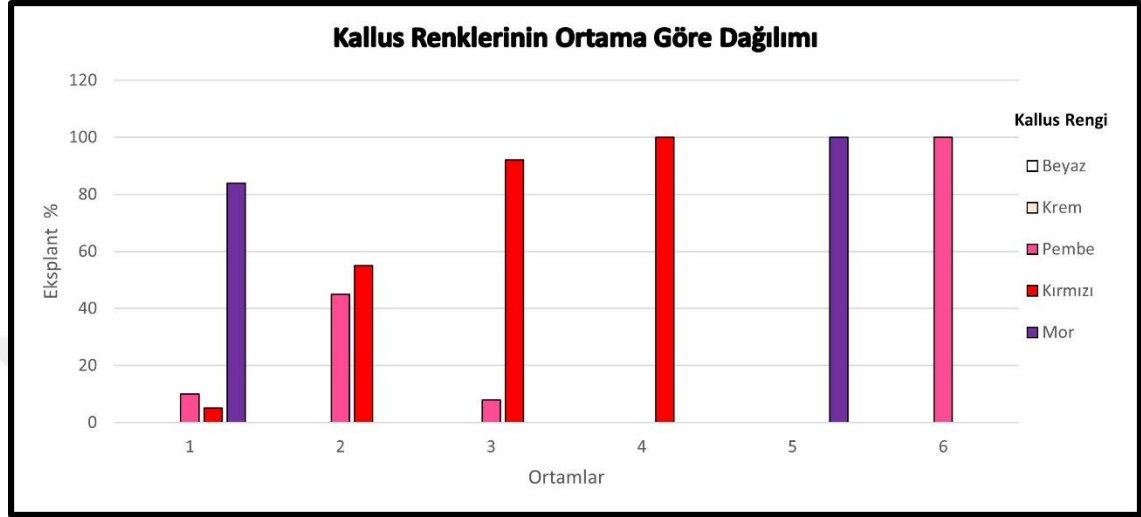
Şekil 4.6. Reyhanda 2.kallus denemelerinde karanlık kültür koşulunda farklı ortamlarda kültüre alınan büyük yaprak eksplantlarından oluşan kallus görüntüleri. Yukarıda soldan sağa doğru; 1. (MS kontrol ortamı), 2. (MS + 0.5 mg/L 2,4-D), 3. (MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin) ortamda; aşağıda soldan sağa doğru, 4. (NN kontrol ortamı), 5. (NN + 0.5 mg/L 2,4-D) ve 6. (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2mg/L Zeatin) ortamlardaki kalluslar

Kallusların yaş ve kuru ağırlık ölçümleri de ortamların etkisini açıkça ortaya koymuştur. 3 numaralı ortam, 361.93 mg'lık ortalama ile en yüksek kallus yaş ağırlığını oluşturmuştur. 6 numaralı ortamın kallus yaş ağırlığı (246.8 mg) 3 numaralı ortamı takip etmiştir. Bu durum, 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin kombinasyonunun öncelikle MS ortamında olmak üzere, NN ortamında da en güçlü kallus gelişimini teşvik ettiğini göstermektedir. 32.63 mg'lık kallus kuru ağırlığı ile en yüksek kuru madde birikimi ise 3 numaralı ortamda kaydedilmiş, onu 27.19 mg ile 6.ortam takip etmiştir (Çizelge 4.5.).

Genel olarak değerlendirildiğinde, bu bulgular her bir ortamın farklı güçlü yönlerini ortaya koymaktadır. 4 numaralı ortam kök oluşumu ve kök sayısı/eksplant üzerinde en etkili bulunurken, 3 ve 6 numaralı ortamlar daha büyük kallus gelişimi ve kallus yaş ağırlığını sağlamıştır. Bu sonuçlar, reyhan bitkisinin doku kültürü çalışmalarında istenilen gelişimsel hedefe göre besin ortamının dikkatle seçilmesinin önemini vurgulamaktadır (Çizelge 4.5.).

Reyhanda ayrıca, farklı besin ortamlarının kallus renkleri üzerindeki etkisi de incelenmiştir (Şekil 4.7.). Denemede farklı kallus indükiyon ortamlarında oluşan kalluslar renklerine göre beyaz, krem, pembe, kırmızı ve mor olarak sınıflandırılmıştır. Ortamlar arasında kallus renklerinin dağılımı belirgin şekilde farklılık göstermiştir. 1 numaralı ortamda sadece birkaç mor renkli kallus oluşurken, 2 numaralı ortamda pembe ve kırmızı renkli kalluslar ağırlıklı olarak gözlemlenmiş, az sayıda krem ve mor renkli kallus da görülmüştür. 3 numaralı ortamda ise kırmızı kalluslar yoğun olarak oluşmuş, bunun yanında birkaç pembe renkli kallus da gözlenmiştir. 4 numaralı ortamda yalnızca çok az sayıda kırmızı renkli kallus meydana gelirken, 5 numaralı ortamda kallusların tamamı

reyhanda antosiyaninlerin en yoğun bulunduğu düşünölen mor renkte oluşmuştur. 6 numaralı ortamda ise tamamen pembe kallus üretimi gerçekleşmiştir. Ortamlar arasında bu denli belirgin renk farklılıklarının olması, besin ortamlarının bileşimlerinin kallusların renkleri üzerindeki etkisini ortaya koymuştur.



Şekil 4.7. Reyhanda yapılan 2.grup kallus denemelerinde farklı kallus indüksiyon ortamlarının kallus renk oluşumu üzerine etkileri

Ancak bu veri setinde bazı ortamlarda kallusların oluşmaması nedeniyle klasik ki-kare testi yerine, daha uygun bir yöntem olan simölasyon tabanlı Fisher's Exact Testi (10.000 tekrar) uygulanmıştır. Elde edilen p-değeri 0.00009999 ($p < 0.001$) olup, bu sonuç kallus renklerinin dağılımının ortamlara göre istatistiksel olarak son derece anlamlı şekilde farklılaştığını ortaya koymuştur. Bu durum, kallus renginin yalnızca genetik faktörlerle değil, aynı zamanda ortam bileşenleriyle de doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle reyhanda antosiyaninlerin daha yoğun bulunduğu düşünölen mor renkli kalluslar yalnızca 1 ve 5. ortamlarda, pembe renkli kalluslar ise özellikle 6. ortamda oluşmuştur (Şekil 4.7.).

4.1.2.3. *In vitro* reyhan fide yetiştiriciliği bulguları

Reyhan tohumları temel besin ortamı olarak Mod-MS olan çimlendirme ortamına 4 tekerrür, her tekerrürde 10 kavanoz ve her kavanozda 7 tohum olacak şekilde ekilmiştir. Ekilen tohumların haftalık çimlenme gözlemlerini takiben çimlenme oranları belirlenmiştir. 1.tekerrürde %65, 2.tekerrürde %75, 3.tekerrürde %72 ve 4.tekerrürde %74 çimlenme olmak üzere ortalama %71.5 oranında çimlenme gerçekleşmiş ve bunların her birisi *in vitro* fideciklere dönüşmüştür (Şekil 4.8). Tohum ekiminden 45 gün sonra

antosiyenin ve antioksidan analizine hazır hale getirmek üzere *in vitro* fideciklerin büyük yaprakları hasat edilerek yaş ve kuru ağırlıkları ölçülmüştür.



Şekil 4.8. *In vitro* yaprak üretimi için *in vitro* şartlarda yetiştirilen reyhan fideleri

4.1.3. *R. carnosula*'da *in vitro* kültür çalışmaları bulguları

4.1.3.1. *R. carnosula*'da tohum çimlenme bulguları

Kallus denemelerinde kullanılacak kotiledon eksplantlarını elde etmek için *in vitro* stok bitkiler yetiştirilmiştir. Bu amaçla yüzey dezenfeksiyonları yapılan *R. carnosula* tohumları herhangi bir BGD içermeyen üç farklı çimlendirme ortamına ekilmiştir. Kontrol ortamı olan 1.ortamda %90 çimlenme meydana gelmiştir. Propamocarb etken maddeli antifungal içeren 2.ortamda çimlenme %91.6 olurken, fluazinam etken maddeli antifungal içeren 3.ortamdaki çimlenme ise %75.5 olarak gerçekleşmiştir. Üç ortamda da kontaminasyon olmamıştır. Çimlenme oranının %91.6 oranında gerçekleştiği 2. ortam en başarılı çimlendirme ortamı olarak belirlenmiştir.

4.1.3.2. *R. carnosula*'da kallus deneme bulguları

1.Grup deneme bulguları: *R. carnosula* 1.grup kallus denemelerinde, kotiledonların karanlık koşulda kültüre alındığı 3 kallus indüksiyon ortamının kotiledonlar üzerindeki etkisi; kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu ve kallus çapı yönünden değerlendirilmiştir. Denemenin BGD içermeyen kontrol ortamında herhangi bir kallus oluşumu gözlenmezken, 2.ortam (MS + 2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP) ve 3.ortamda (MS + 2 mg/L NAA + 2 mg/L TDZ) %100 oranında kallus oluşumu gerçekleştiği için iki ortam arasında istatistiksel bir farklılık ölçülemedi. Ayrıca kallusların hiçbirinde antosiyanin oluşumuna rastlanmamıştır. Kallus çapı açısından ise 2. ve 3.ortam arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu nedenle, her iki ortamın da belirtilen koşullar altında kallus oluşumunu teşvik etmede eşit derecede etkiye sahip olduğu ifade edilebilir (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. *R. carnosula* da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 1. grup kallus indüksiyon ortamlarının kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu ve kallus çapı üzerindeki etkileri

Ortam no	Kallus Oluşumu (%)	Antosiyaninli Kallus Oluşumu (%)	Kallus Çapı (mm)
1	0	0.00	0.00b ¹
2	100	0.00	11.67a
3	100	0.00	10.67a
LSD (%5)	ö.d.	ö.d.	2.85*** ²

¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² ***: $p < 0.001$. ö.d: Önemli değil

2.Grup deneme bulguları: *R. carnosula* 2.grup kallus denemelerinde, kotiledonlar karanlık koşulda 6 farklı kallus indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. *R. carnosula* da kallus verilerinden; kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu, kallus çapı, kallus yaş ağırlığı, kallus kuru ağırlığının yanısıra, ayrıca kök oluşumu ve kök sayısı/eksplant verileri de değerlendirilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.9.).

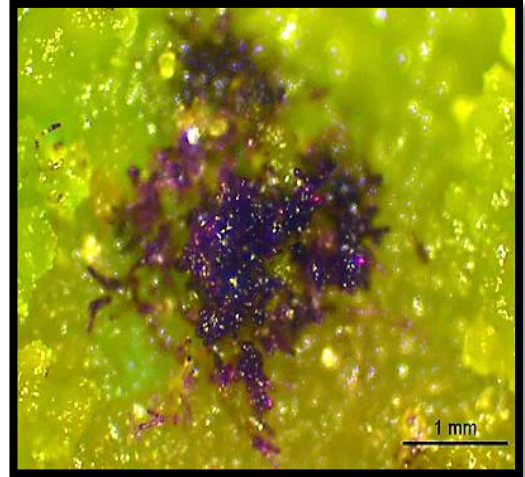
Çizelge 4.7. *R. carnosula* da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 2. grup kallus indüksiyon ortamlarının kallus oluşumu, antosiyaninli kallus oluşumu, kallus çapı, kök oluşumu, kök sayısı/eksplant, kallus yaş ve kuru ağırlıkları üzerindeki etkileri

Ortam No	Kallus Oluşumu (%)	Antosiyaninli Kallus Oluşumu (%)	Kallus Çapı (mm)	Kök Oluşumu (%)	Kök Sayısı / Eksplant (adet)	Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Kallus Kuru Ağırlığı (mg)
1	0.00	0b ¹	0c	48b	1.60b	95.50c	10.33b
2	100	0b	12.72ab	0c	0c	442.10a	22.78a
3	100	1b	13.44a	0c	0c	501.80a	30.33a
4	0.00	0b	0c	79a	3.74a	72.60c	8.56b
5	100	11a	13.50a	0c	0c	475.00a	25.75a
6	100	7a	11.80b	0c	0c	273.01b	13.51b
LSD (%5)	ö.d.	4.74*** ²	1.33* ³	9.0***	0.72***	64.90***	8.77***

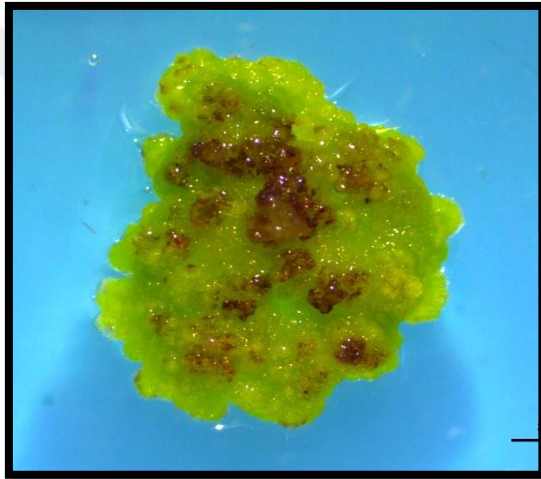
¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² ***: $p < 0.001$. ³ *: $p < 0.05$. ö.d: Önemli değil.



(a)



(b)



(c)



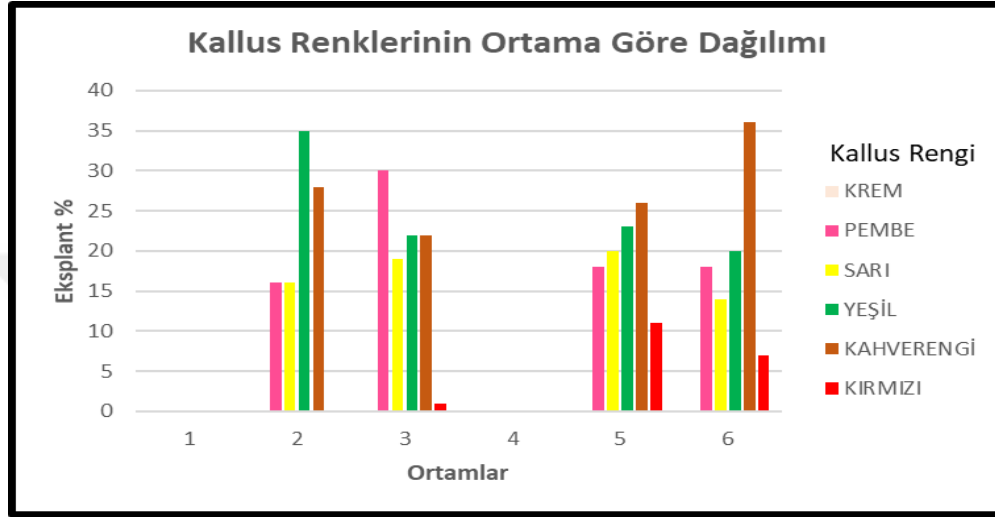
(d)

Şekil 4.9. *R. carnosula* da 2. grup kallus denemelerinde meydana gelen kallus ve antosiyanin oluşumları; a) 5.ortamda oluşan kalluslar, b) 6.ortamda oluşan antosiyanin başlangıcı görüntüsü, c) 5.ortamda oluşan antosiyaninleşme, d) 5.ortamda oluşan kallusdaki antosiyaninlerin görüntüsü.

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi kallus oluşumu yönünden MS ve NN ortamlarının BGD içermeyen 1 ve 4 nolu kontrol ortamları haricindeki 2.ortam (MS+2mg/l NAA+1mg/l TDZ), 3.ortam (MS+2mg/l NAA+1mg/l Zeatin), 5.ortam (NN+2mg/l NAA+1mg/l TDZ) ve 6.ortamda (NN+2mg/l NAA+1mg/l Zeatin) %100 kallus oluşumu gerçekleşmiş, ancak ortamlar arasında istatistiksel bir önem ölçülemedi. Kallus çapı yönünden ise ortamlar anlamlı farklılıklar göstermiş ($p < 0.05$) ve en büyük kalluslar 5.ortam (ortalama 13.5 mm) ve 3.ortamda (ortalama 13.44 mm) elde edilmiştir.

Çizelge 4.7’e göre biyokütle açısından da anlamlı farklılıklar saptanmış; en yüksek yaş ağırlık 3., 5. ve 2.ortamlarda ölçülmüş, kuru ağırlık açısından ise yine 3.,5. ve 2.ortamlarda en yüksek değerler elde edilmiştir. En yüksek kök oluşumu (%79) ve kök sayısı/eksplant (3.74) 4. ortamda meydana gelmiştir.

R. carnosula 2.grup kallus denemelerinde etkinliği test edilen indüksiyon ortamlarının oluşan kallusların rengi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Kültür ortamı ile kallus rengi dağılımı arasındaki ilişki Fisher'ın Kesinlik Testi (Fisher's Exact Test) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu test sonucunda elde edilen p-değeri 0.006799 olup, bu değer kültür ortamı ile kallus rengi dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). Bu sonuç, denemede kullanılan ortamların farklı kallus renklerinin dağılımı üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. *R. carnosula* da kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 2. grup kallus indüksiyon ortamlarının kallus renk oluşumu üzerine etkileri

4.1.3.3. *In vitro R. carnosula* fide yetiştiriciliği bulguları

R. carnosula'da *in vitro* şartlarda kotiledon eksplantları elde etmek ve bunların antosiyanin-antioksidan analizlerini yaptırmak için gerçekleştirilen fide yetiştiriciliğinde tohumlar temel besin ortamı olarak Mod-MS olan ve propamocarb (1ml/L) etken maddeli antifungal içeren 2.çimlendirme ortamına 4 tekerrürlü olarak her tekerrürde 10 petri ve her petride 18 tohum olacak şekilde ekilmiştir. Ekilen tohumların haftalık çimlenme gözlemlerini takiben belirlenen çimlenme oranlarına göre 1.tekerrürde %93, 2.tekerrürde %96, 3.tekerrürde %98.4 ve 4.tekerrürde %96 çimlenme olmak üzere ortalama %95.85 oranında çimlenme gerçekleşmiş ve bunlar *in vitro* fideciklere dönüşmüştür (Şekil 4.11.) Tohum ekiminden 40 gün sonra antosiyanin ve antioksidan analizine hazır hale getirmek üzere *in vitro* fideciklerin kotiledon yaprakları hasat edilerek yaş ve kuru ağırlıkları ölçülmüştür.



Şekil 4.11. *In vitro* kotiledon üretimi için *in vitro* şartlarda yetiştirilen *R. carnosula* fideleri

4.2. *In vivo* kültür çalışmaları bulguları

In vivo şartlarda yetiştirilmek üzere tohumları ekilen hibiskus, reyhan, *R. carnosula* türlerinde yapılan çimlenme sayımlarında hibiskusta %32, reyhanda %100, *R. carnosula* da %78 oranında çimlenme kaydedilmiştir. Yetiştirilen fidelerin antosiyanin içeren kısımlarının antosiyanin ve antioksidan analizine hazır hale getirilmesi amacıyla hibiskus fidelerinden hasat edilen kozalakların sepal yaprakları, reyhan fidelerinden hasat edilen büyük yapraklar ve *R. carnosula* fidelerinden hasat edilen kotiledon yapraklarının hasat sonrası önce yağ ağırlıkları tartılmıştır. Tartılan kısımlar etüvde kurutulduktan sonra da kuru ağırlıkları tartılmış ve analizlere kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 4.12.).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 4.12. *In vivo* kültür şartlarında yetiştirilip kurutulan antosiyaninli örneklerin kurutulma önce ve sonrası görüntüleri; a-b) Hibiskus kozalaklarına ait sepaller, c-d) Reyhanda büyük yapraklar, e-f) *R. carnosula* kotiledon yaprakları

4.3. Antosiyanin ve antioksidan bulguları

Üç farklı bitki türünün çeşitli eksplantlarında ve bunların yetiştirildikleri ortamlara göre değişen toplam monomerik antosiyanin (TMA) miktarları ve antioksidan aktiviteleri aşağıdaki alt başlıklarda ve çizelgelerde verilmiştir.

4.3.1. *H. sabdariffa* örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları

Hibiskus türünde *in vitro* şartlarda yapılan kallus kültür çalışmalarında, 2.grup kallus denemelerindeki 10 ortam arasından sadece 8.ortamda antosiyaninli kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Bu nedenle hibiskusda *in vitro* şartlarda elde edilen örneklerin antosiyanin ve antioksidan analizi yalnızca 8. ortamdan gelişen kallus örneğine uygulanmıştır. Bunun yanısıra, *in vivo* şartlarda yapılan bitki yetiştiriciliğinden elde edilen kozalakların sepallerine de bu analizler uygulanmıştır (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. *H. sabdariffa* örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları

Örnek adı	Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı (mg Siyanidin-3-glukozid eşdeğeri / 100 g kuru örnek)	Antioksidan Aktivite (g Trolox eşdeğeri / 100 g kuru örnek)
8. Ortamda Kallus (<i>in vitro</i> dan)	3.27b	20.20a
Kozalak Sepali (<i>in vivo</i> dan)	224.63a ¹	10.24b
LSD (%5)	10.17*** ²	0.27***

¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² ***: $p < 0.001$

Çizelge 4.8'e göre, bu örneklerden *in vitro* şartlarda 8.ortamdan elde edilen kallus örneğinin TMA miktarı 3.27 mg siyanidin-3-glukozid eşdeğeri/100 g kuru örnek olarak ölçülürken, *in vivo* şartlarda yetiştirilen kozalakların sepal örneğindeki TMA miktarı ise 224.63 mg siyanidin-3-glukozid eşdeğeri/100 g kuru örnek olarak belirlenmiştir.

Antioksidan aktivite ise kozalakta 10.24 g trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek, 8. ortamda gelişen kallus örneğinde ise 20.20 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek olarak tespit edilmiştir.

4.3.2. *O. basilicum* örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları

Reyhan türünde 7'si *in vitro*, 1'i *in vivo* koşullarda elde edilen örneklerle ait olmak üzere toplam 8 örneğe antosiyanin ve antioksidan analizi uygulanmıştır. Tüm örnekler içerisinde TMA miktarı en yüksek örnek 777.45 mg siyanidin-3-glukozid/100 g kuru örnek ile *in vivo* koşullarda yetiştirilen fidelerin yaprak örneğinde bulunurken, bunu 394.03 mg siyanidin-3-glukozid/100g kuru örnek ile *in vitro* koşullarında yetiştirilen fidelerin yaprak örneği takip etmiştir (Çizelge 4.9.). Kallus geliştirme ortamları içerisinde ise en yüksek TMA miktarı, 5.ortamda oluşan kalluslarda 222.44 mg siyanidin-3-glukozid/100g kuru örnek olarak belirlenmiştir. En düşük TMA miktarı ise 1. ve 3. ortamlarda oluşan kalluslarda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. *O. basilicum* örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları

Örnek Adı	Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı (mg Siyanidin-3-glukozid eşdeğeri / 100 g kuru örnek)	Antioksidan Aktivite (g Trolox eşdeğeri / 100 g kuru örnek)
1. Ortamdan Kallus	54.19g ¹	20.40b
2. Ortamdan Kallus	153.09d	10.22d
3. Ortamdan Kallus	67.73fg	20.43b
4. Ortamdan Kallus	79.07f	20.30b
5. Ortamdan Kallus	222.44c	10.21d
6. Ortamdan Kallus	117.24e	25.72a
<i>In Vitro</i> Fideden Büyük Yapraklar	394.03b	10.08d
<i>In Vivo</i> Fideden Büyük Yapraklar	777.45a	10.65c
LSD (%5)	16.85**** ²	0.29***

¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² ***: $p < 0.001$

Reyhandaki tüm örneklerin antioksidan aktiviteleri incelendiğinde ise en yüksek antioksidan aktivite 25.72 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek olarak 6.ortamda oluşan kalluslarda belirlenmiştir (Çizelge 4.9.). En düşük antioksidan aktivite ise 2.ortam ve 5.ortamda oluşan kallus örnekleri ile *in vitro* fidelerin yaprak örneğinde tespit edilmiştir.

4.3.3. *R. carnosula* örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları

R. carnosula türünde *in vitro* koşullarda yetiştirilen 6'sı kallus ve 1'i kotiledon yaprağı örneği olmak üzere 7 *in vitro* örnek ile bunun yanısıra, 1'i *in vivo* koşullarda yetiştirilen kotiledon yaprağı ile 1'i doğadan toplanan kotiledon yaprakları olmak üzere 2 *in vivo* örnek olmak üzere toplam 9 örneğe antosiyanin ve antioksidan analizi uygulanmıştır (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. *R. carnosula* örneklerinde antosiyanin ve antioksidan analiz bulguları

Örnek Adı	Toplam Monomerik Antosiyanin Miktarı (mg Siyanidin-3-glukozid eşdeğeri / 100 g kuru örnek)	Antioksidan Aktivite (g Trolox eşdeğeri / 100 g kuru örnek)
1. Ortamdan Kallus	4.16ef ¹	2.55d
2. Ortamdan Kallus	8.09e	2.40d
3. Ortamdan Kallus	4.68ef	2.52d
4. Ortamdan Kallus	37.32d	2.61d
5. Ortamdan Kallus	3.23ef	2.67d
6. Ortamdan Kallus	T.E. ²	2.37d
<i>In Vitro</i> Fideden Kotiledon Yaprığı	195.24b	10.20c
<i>In Vivo</i> Fideden Kotiledon Yaprığı	114.18c	13.37b
Doğadan Toplanan Kotiledon Yaprığı	301.78a	14.31a
LSD (%5)	4.64*** ³	0.56***

¹ Aynı harfle gösterilmeyen değerler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir. ² T.E.: Tespit edilemedi. ³ ***: $p < 0.001$

Çizelge 4.10'a göre, tüm örnekler içerisinde TMA miktarı en yüksek örnek doğadan toplanan kotiledon yapraklarında (301.78 mg siyanidin-3-glukozid eşdeğeri/100 g kuru örnek) tespit edilmiştir. Bunu *in vitro* fideden kotiledon yaprağı örneği (195.24 mg siyanidin-3-glukozid eşdeğeri/100 g kuru örnek), onu da *in vivo* fideden kotiledon yaprağı örneği (114.18 mg siyanidin-3-glukozid eşdeğeri/100 g kuru örnek) takip etmiştir. En düşük TMA miktarı ise 1. ve 5. ortamlarda oluşan kallus örneklerinde (sırasıyla 4.16 ve 3.23 mg siyanidin-3-glukozid eşdeğeri/100 g kuru örnek) belirlenmiştir.

In vitro fidelerin kotiledon yaprağı örneğine ait TMA miktarı doğadan toplanan kotiledon yaprağı örneğine göre daha düşük olmakla birlikte, diğer tüm örneklerinkinden daha yüksek miktarda tespit edilmiştir. *In vivo* fidelerin kotiledon yaprağı örneği doğadan toplanan kotiledon yaprağı örneği ve *in vitro* fidelerin kotiledon yaprağı örneğinden daha düşük TMA miktarına sahipken, kallus geliştirme ortamlarından oluşan kallus örneklerinden daha yüksek TMA miktarı oluşturmuştur. Kallus geliştirme ortamları kendi içerisinde değerlendirildiğinde 4. ortamda TMA miktarı en yüksek iken, en düşük TMA miktarı 1., 3. ve 5. ortamda gözlenmiştir. 6. ortamda ise TMA miktarı tespit edilememiştir.

R. carnosula türündeki örneklerin antioksidan aktivitesine gelince; en yüksek aktivite doğadan toplanan kotiledon yaprağı örneğinde (14.31 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek) tespit edilmiştir (Çizelge 4.10.). En düşük antioksidan aktivite ise tüm kallus geliştirme ortamlarında ölçülmüştür. *In vivo* fidelerin kotiledon yaprağı örneğine ait antioksidan aktivitesi (13.37 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek) karşılaştırma yapıldığında doğadan toplanan kotiledon yaprağı örneğine göre biraz daha düşük tespit edilirken, *in vitro* fidelerin kotiledon yaprağı örneği ve tüm kallus örneklerine göre daha yüksek bulunmuştur. *In vitro* fidelerin kotiledon yaprağı örneğinin antioksidan aktivitesi (10.20 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek) tüm kallus örneklerinden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş, doğadan toplanan kotiledon yaprağı örneği ve *in vivo* fidelerin kotiledon yaprağı örneğine göre ise daha düşük aktivite tespit edilmiştir.

5.TARTIŞMA

Çalışmada öncelikle *H. sabdariffa*, *O. basilicum* ve *R. carnosula* türlerinin *in vitro* koşullarda tohumdan yetiştirilen fidelerinden ve ayrıca fidelerin farklı eksplantlarından antosiyaninli kallusların geliştirilmeye çalışıldığı *in vitro* kültür çalışmaları yapılmıştır. Aynı türlerde ayrıca *in vivo* kültür çalışmaları da yapılmıştır. Daha sonra *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yetiştirilen kültürlerin antosiyanin ve antioksidan içerikleri karşılaştırılmıştır.

Çalışılan türlerden *H. sabdariffa* da öncelikle kallus denemeleri için gerekli eksplantların elde edilmesi amacıyla *in vitro* stok bitkiler yetiştirilmiştir. Ancak hibiskus tohumlarında yapılan farklı sterilizasyon çalışmalarında bile yoğun kontaminasyon sorunu ile karşılaşmış, bu nedenle tohumlar farklı etken maddeli antifungal ilave edilmiş ortamlarda çimlendirme denemelerine tabi tutulmuştur. Bu ortamlarda en fazla %25 çimlenme ve en az %33 kontaminasyon oranı 2 nolu ortamda kaydedilmiştir. Hibiskusun *in vivo* şartlarda ekilen tohumlarındaki çimlenme oranı ise %32 olarak belirlenmiştir. Bu nedenle hibiskusun bizim çalışmamızdaki diğer türlere göre çimlenme oranının daha düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte, Plessis vd.(2021)'in *H. coddii* türünde *in vitro* koşullarda yaptığı çalışmada çimlenme oranı %85-98 arasında bildirilirken, Chachalis vd. (2008)'nin *H. trionum* türünde petri koşullarında yaptığı çimlendirme çalışmasında ise en yüksek çimlenme (%60), 12 saatlik fotoperiyotta 30/20 C° gündüz/gece sıcaklığında kaydedilmiştir. Bizim çalışmamızın çimlenme oranları, bu çalışmalardan daha düşük olup, bu sonuç söz konusu çalışmalarda hibiskusun farklı türlerinde çalışılmış olmasından ve tohumların farklı koşullarda çimlendirilmiş olmasından kaynaklanabilir.

In vitro şartlarda yetiştirilen hibiskus fidelerinin hipokotil ve kotiledon eksplantlarının farklı kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alındığı kallus denemelerinin bulguları ise bitki doku kültürü uygulamalarında ortam bileşiminin ve eksplant tipinin kallus oluşumu ve gelişimi üzerinde belirleyici olduğunu ortaya koymuştur. İki grup halinde gerçekleştirilen denemelerden özellikle uygun eksplant tipinin belirlenmeye çalışıldığı 3 ortamdan oluşan 1.grup çalışmalarında; BGD içermeyen kontrol ortamında kallus oluşumu gerçekleşmezken, 2.ortamda (2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP) ve 3.ortamda (1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L Kinetin) %100 oranında kallus oluşmuştur. Bu sonuç 2 ve 3 nolu ortamların hibiskus için optimum kombinasyonda BGD içerdiğini ve kallus indüksiyonunu maksimum düzeyde tetiklediğini göstermektedir. Literatürde benzer şekilde, Konar vd. (2018)'nin *H. sabdariffa* 'da yaptığı çalışmada; MS + 1.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP içeren ortam, kallus indüksiyonunda en yüksek verimi (%90) sağlamıştır. Bu nedenle, bizim çalışmamızda olduğu gibi oksin ve sitokininin birlikte kullanılmasının, kallus oluşumunu yüksek oranda teşvik ettiği kabul edilebilir. Abeda vd. (2015) nin hibiskusta yaptıkları çalışmada ise 7 günlük kotiledon ve hipokotil eksplantları kallus oluşumu ve antosiyanin birikimini indüklemek amacıyla, farklı konsantrasyonlarda oksin (2,4-D) ve sitokininler (BAP veya kinetin) ile takviye edilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada, kallus gelişimi için en uygun kombinasyonun 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BAP olduğu belirlenmiş; özellikle kotiledon kaynaklı eksplantlarda bu kombinasyonun kallus büyümesini maksimize ettiği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 1. grup denemelerde en fazla kallus büyüklüğü kotiledon eksplantında gerçekleşirken, en büyük kallus çapı 21 mm ile 2.ortamda (2 mg/L NAA + 1 mg/L BAP) elde edilmiştir. Kotiledon eksplantlarının hipokotile kıyasla daha yüksek kallus çapı

üretmesi, eksplant seçiminin önemini vurgulamıştır. Nitekim, çalışmamızla uyumlu Sylvere Sie vd. (2010) nin hibiskusta indirekt somatik embriyogenesis için yaptıkları çalışmada da kotiledon eksplantının, hipokotil eksplantından daha fazla kallus indüksiyonu sağladığı ve dengeli oksin-sitokinin kombinasyonlarının en etkili protokolü oluşturduğu bildirilmiştir.

Hibiskus türünde en yüksek antosiyanin oluşturabilecek kallus indüksiyon ortamının belirlenmesi amacıyla yürütülen 2. grup çalışmalarda; 10 farklı besin ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarından alınan sonuçlar, ortam bileşiminin kallus oluşumu ve organogenesis süreçleri üzerinde belirleyici olduğunu ortaya koymuştur. Kallus oluşumu açısından yalnızca 3. ortamda (MS + 0,5 mg/L 2,4 D + 0,25 mg/L Zeatin) %86.67 oranında, 8.ortamda (NN + 0,5 mg/L 2,4 D + 0,25 mg/L Zeatin) ve 10.ortamda (0.5 mg/L IAA + 0,25 mg/L Zeatin) ise %100 oranında kallus oluşumu sağlanmıştır. Abeda vd. (2014) nin hibiskustaki çalışmasında kallus gelişiminin klasik oksin-sitokinin oranı prensibine uygun olarak gerçekleştiği ve 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BAP kombinasyonunun özellikle kotiledon eksplantlarında kallus büyümesini maksimize etmek için optimal olduğu belirtilmiştir. Kallus gelişiminin çoğunlukla oksinin sitokininle birlikte kullanıldığı ortamlarda sağlandığı bizim çalışmamız da bu çalışmayla uyumlu bulunmuştur. Özellikle 2,4-D'nin kallus gelişimi ve antosiyanin sentezini artırıcı etkisi, bitki biyoteknolojisi alanında *H. sabdariffa* türü için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Abeda vd. (2014)'nin hibiskusta yaptığı çalışmada en yüksek antosiyanin içeriği (15.23 mg/g), 1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L kinetin kombinasyonu kullanılarak elde edilirken, BAP + 2,4-D kombinasyonu antosiyanin üretimini baskılamış, bu nedenle sitokinin türlerinin sekonder metabolit biyosentezi üzerindeki farklı etkilerine vurgu yapılmıştır.

Antosiyaninli kallus elde etmeye çalışırken bazı eksplantlarda yoğun kök oluşumuna rastlanması, daha sonra hibiskusta köklerden yapılabilecek *in vitro* sekonder metabolit çalışmalarına katkı sağlama potansiyeli nedeniyle köklenme verileri göz ardı edilmemiştir. Kök oluşumu açısından 7.ortam (NN + 0,5 mg/L 2,4 D) en yüksek (%100) köklenme oranını sağlarken, 9.ortam (NN + 0,5 mg/L IAA) ise eksplant başına en fazla kök sayısı/eksplant (14.5 adet) oluşturmuştur. Köklenme yönünden öne çıkan bu ortamlar BGD yönünden sitokinin içermeyip, sadece oksin içeriğine sahip NN bazlı ortamlardır. Ancak aynı BGD içeriklerine sahip MS bazlı 2. ve 4.ortamlardaki köklenme verilerinin daha düşük gerçekleşmesi, temel besin ortamı içeriğinin de köklenmede etkili olduğunu ve bu yönden NN temel besin ortamının köklenmeyi MS ortamına göre daha fazla teşvik ettiği söylenebilir. Kumar vd. (2015) nin *Hibiscus cannabinus* da yaptıkları çalışmada 15 günlük kotiledonlar farklı konsantrasyonlarda NAA, IAA ve IBA içeren MS ortamlarında kültüre alınmış ve en yüksek kök oluşumu 2 mg/L NAA da gerçekleşirken, bunu 2 mg/L IAA takip etmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da hibiskusta sadece oksin gruplarının daha fazla köklenmeyi sağlaması nedeniyle çalışmamız Kumar (2015)'in çalışmasıyla uyumlu bulunmuştur.

Hibiskusta yaptığımız antosiyanin ve antioksidan analizlerine gelince; *in vivo* koşullarda yetiştirilen hibiskus bitkilerinin kozalak örnekleri ile 8.ortamda (NN + 0.5 mg/L 2,4 D + 0.25 mg/L Zeatin) ortamda geliştirilen kallus örnekleri arasında toplam monomerik antosiyanin (TMA) ve antioksidan aktivite düzeyleri bakımından belirgin farklar saptanmıştır. Kozalak örneğinde TMA miktarı 224.63 mg cyanidin-3-glukozid (C3G) eşdeğeri/100 g kuru örnek iken, 8.ortamda (NN + 0,5 mg/L 2,4 D + 0,25 mg/L

Zeatin) gelişen kallus örneğinde yalnızca 3.27 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek olarak tespit edilmiştir. Bu fark, *in vivo* koşullarda yetiştirilen bitkilerin özelleşmiş dokularındaki antosiyanin birikiminin kalluslara kıyasla daha yüksek olduğunu gösteren önceki çalışmalardan farklılık göstermiştir. Örneğin Kouakou vd. (2015), *H. sabdariffa* da yaptıkları çalışmada; bitkinin çanak yaprakları ve kallus dokularında antosiyanin üretimini karşılaştırmış ve *in vitro* kallus kültürlerinin anlamlı düzeyde antosiyanin üretebildiğini bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada, çanak yapraklarda toplam antosiyanin içeriği 42.99 mg/g taze ağırlık olarak raporlanırken, kallus kültürlerinde bu değer 131.13 mg/g taze ağırlık olarak belirlenmiştir. Bu sonuç özellikle farklı doku örnekleri arasındaki biyosentetik kapasite farklarını ortaya koymuştur. Çalışmada kallus dokusunda antosiyanin birikiminin, kaliks dokulara kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda söz konusu çalışmadan farklı şekilde *in vivo* örneğin antosiyanin içeriği *in vitro* örnekten daha yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni kültür ortamında kullanılan ortam ve BGD içeriği veya bitkinin yetiştirildiği çevre şartları olabilir.

Çalışmamızda buna karşılık, antioksidan aktivite açısından ise *in vitro* kallus örneğinin (20.20 g TE/100 g kuru örnek) *in vivo* kozalak örneğine (10.24 g TE/100 g kuru örnek) kıyasla daha yüksek düzeyde aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Kouakou vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada da, *H. sabdariffa*'nın kallus örneğinin antioksidan kapasitesi kaliks örneğinden nispeten daha yüksek olarak rapor edilmiş olup, dolayısıyla elde ettiğimiz sonuç söz konusu bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, hibiskus türünde kallogenesis ve rhizogenesinin besin ortamı içeriği ve farklı BGD tip ve konsantrasyonlarına oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, hibiskus bitkisinin farklı doku ve ortam koşullarına bağlı olarak biyokimyasal profilinin önemli ölçüde değiştiği de ifade edilebilir. Bu farklılıklar, biyoteknolojik uygulamalarda hedef bileşiklerin optimizasyonu açısından önem arz etmektedir. Ayrıca, kallus dokusunun yüksek antioksidan kapasitesi, gelecekte fonksiyonel bileşik üretimi amacıyla kallus kültürlerinin önemli potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır.

Çalışılan ikinci tür olarak *O. basilicum* daki çalışmalara da *in vitro* şartlarda tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen stok bitkilerin yetiştiriciliği ile başlanmış ve daha sonra yapılan kallus geliştirme çalışmalarında bu stok bitkilerin farklı eksplantları kültüre alınmıştır. Farklı çimlendirme ortamlarına ekilen tohumların *in vitro* çimlenme oranı ortalamaları %71.5 ila %90 arasında değişirken, *in vivo* çimlenme oranı %100 olarak gerçekleşmiştir. Benzer şekilde *in vitro* koşullarda 3 farklı fesleğen türünün çimlendirilmesi üzerine çalışan Jakovljević vd. (2020) *O. basilicum* için %98, *in vivo* şartlarda farklı fesleğen türlerinde yaptığı çimlenme testlerinde França vd. (2017) ise *O. basilicum* için %55 lik bir çimlenme oranı bildirmiştir. Dolayısıyla, reyhan tohumlarının hem *in vitro* hem de *in vivo* şartlarda son derece yüksek oranda çimlendiği ifade edilebilir.

Reyhan bitkisinde gerçekleştirilen 1.grup kallus denemelerinde elde edilen sonuçlar, *O. basilicum* (mor reyhan) türünde, bütün eksplant tiplerinde kallus oluşumu %100 olmuştur. Bu sonuçlar Cherednichenko vd. (2023)'nin yaptığı çalışma ile uyumlu olup; mor yapraklı Fioletovy Barkhat çeşidinin kullanıldığı çalışmada, çeşitli besin ortamlarında kültüre alınan tüm eksplant tiplerinden %100 oranında kallus elde

edilmiştir. Öte yandan, Sudhakaran ve Sivasankari (2003), *O. basillium* un yaprak ve internodal eksplantlarından kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerini karşılaştırmışlar ve her iki eksplant tipinden de kallus oluşumu gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da Sudhakaran ve Sivasankari (2003)'nin sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur. Çalışmamızda karanlık kültür koşullarının gerçek yaprak eksplantlarının antosiyanin birikimini artırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuç Nazir vd. (2020b) tarafından reyhanda yapılan çalışma ile uyumlu olup, söz konusu çalışmada karanlık koşulların daha yüksek rosmarinik asit ve antosiyanin (siyanidin ve peonidin) içeriği oluşturduğu bildirilmiştir. Her iki çalışma da, kallus oluşumu ve antosiyanin üretiminin çevresel faktörlerden, özellikle ışık koşullarına yüksek derecede bağımlı olduğu gerçeğinin altını bir kez daha çizmiştir.

Kallus ve antosiyanin oluşumu üzerine etkili bir diğer önemli faktör ise eksplant kaynağıdır. Çalışmamızda, antosiyaninli kallus en fazla büyük yapraklarda görülmüştür. Cherednichenko vd. (2023)'nin reyhanda yaptığı çalışmada; çalışılan çeşitler için, gövde ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallus dokusunda fenolik içerik için bazı modeller belirlenmiştir ve en yüksek fenolik içerik miktarı, yaprak eksplantlarından elde edilen kallus dokusunda kaydedilmiştir. Hakkim vd. (2007) ise, kutsal fesleğen (*O. sanctum* L.) bitkisinin farklı organlarının (yaprak, sap ve çiçek salkımı) kimyasal bileşimini ve antioksidan özelliklerini incelemişler, en yüksek kallus üretimini yaprak kalluslarından elde etmişlerdir. Kishan (2022) tarafından *O. sanctum* L bitkisinde yapılan çalışmada da türler arasında eksplant tipine bağlı olarak kallus oluşumunda farklılıklar olabileceği belirtilmiştir.

Reyhanda yaptığımız 2.grup kallus denemelerinde; kullanılan farklı besin ortamlarının ve farklı BGD konsantrasyonlarının morfojenik yanıtlar üzerindeki etkileri kapsamlı biçimde analiz edilmiştir. Tüm ortamlarda kontrol grupları hariç, 2,4-D kullanımının, kallus ve antosiyanin oluşumu üzerinde olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Wongsen vd. (2015)'nin reyhanda yaptığı çalışmada, yaprak eksplantları kontrol ortamı hariç bütün ortamlarda 2,4-D (0.5, 1, 2 mg/L) nin kullanıldığı ortamlarda 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık ışık rejiminde 4 hafta kültüre alınmıştır. Kontrol hariç diğer ortamların tümünde kompakt kallus oluşumunun gerçekleştiği bildirilen çalışmada en yüksek yaş ağırlık 0.5 mg/L 2,4-D ortamında elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da kontrol hariç, 2,4-D li tüm ortamlarda %100 oranında antosiyaninli kallus oluşmuş, en yüksek kallus çapı ve kallus yaş-kuru ağırlığı ise yine 2,4-D li, ancak Zeatin kombinasyonlu bir ortamdan (3.ortam = MS + 0.5mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l Zeatin) karanlık koşullarda elde edilmiştir. Hatta aynı BGD kombinasyonlu NN ortamında (6.ortam = NN + 0.5mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l Zeatin) da çalışmamızda en yüksek ikinci kallus çapı ve yaş-kuru ağırlık oluşumu ölçülmüştür. Ayrıca Zeatin içeren 0.5 mg/l 2,4-D li 3. ve 6.ortamlarda, Zeatin içermeyen 0.5mg/l 2,4-D li 2. ve 5.ortamlara göre kallus çapı ve kallus yaş-kuru ağırlıkları hemen hemen 2 katı olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla, 0.5 mg/L lik 2,4-D konsantrasyonunun reyhanda genel olarak kallus oluşturmada etkili olduğu, ancak gerek kallus çapı gerekse kallus biyokütlesi açısından ise doğru oksin+sitokinin kombinasyon ve konsantrasyonlarının gerekli olduğu ifade edilebilir.

O. basilicum da yapılan antosiyanin ve antioksidan analizleri yönünden, antosiyanin birikiminin bitkinin gelişim durumu ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak büyük ölçüde değişkenlik gösterdiği ortaya konulmuştur. En yüksek toplam monomerik antosiyanin (TMA) içeriği 777.45 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek ile *in vivo*

koşullarda yetiştirilen fidelerin yapraklarından elde edilmiştir. Bu değeri sırasıyla *in vitro* koşullarda yetiştirilen fidelerin yaprak örneği (394.03 mg C3G/100 g kuru örnek) ile 5. ortamda (NN + 0,5 mg/L 2,4 D) geliştirilen kallus örneği (222.44 mg C3G/100 g kuru örnek) takip etmiştir. Bu sonuçlar, antosiyanin sentezinin genellikle bitkinin gelişimsel olarak daha organize olduğu fide/bitki koşullarda arttığını gösteren literatürle uyumludur. Örneğin benzer şekilde Aye vd. (2019) *O. basilicum* da yaptığı çalışmada; *in vivo* yaprağın *in vitro* yaprak ve kallusa göre çok daha fazla bileşen içerdiğini bildirmesi nedeniyle bizim çalışmamızla uyumlu bulunmuştur.

Reyhanda antioksidan aktivite bakımından en yüksek değer ise 25.72 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek ile 6. (NN + 0.5 mg/L 2,4 D + 0.2 mg/L Zeatin) ortamda geliştirilen kalluslardan elde edilmiştir. Bu bulgu, bazı *in vitro* koşulların bitki hücrelerinde oksidatif stres yanıtlarını tetikleyerek antioksidan savunmayı artırabileceğini düşündürmektedir. Hakkim vd. (2007) nin *O. sanctum* L. de yaptığı çalışmada, farklı konsantrasyonlarda kinetin (0.1–0.5 mg/L) ve 2,4-D (1 mg/L) kombinasyonları içeren MS besin ortamlarında kalluslar elde edilmiş ve daha sonra kalluslardaki fenolik bileşiklerin dağılımı analiz edilmiştir. Tüm kallus özütlerindeki antioksidan aktivite, tarlada yetiştirilen bitki parçalarından elde edilen ekstraktan daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Bizim çalışmamızda da 6. ortamda (NN + 0.5 mg/L 2,4 D + 0.2 mg/L Zeatin) geliştirilen kalluslardan *in vivo* örneğe göre 2.5 kat daha fazla oranda antioksidan tespit edilmiş olması nedeniyle çalışmamız, Hakkim vd. (2007) nin çalışması ile uyumludur. Nazir vd. (2019) nin yaptığı çalışmada da *in vitro* kallus özütlerinde yüksek düzeyde fenolik bileşik ve güçlü antioksidan aktivite saptanmıştır. Danova vd. (2010) *Hypericum rumeliacum* Boiss türünde yaptığı çalışmada, *in vitro* ortamların özellikle fenolik bileşiklerin ve türevlerinin üretiminde etkili olabileceğini, çünkü ortamda oluşan stres koşullarının bu metabolitlerin sentezini artırdığını raporlamıştır. Sonuç olarak yapılan çalışmalar; *O. basilicum* bitkisinin doku kültüründe ortam seçiminin hem morfolojik gelişim, hem de metabolik kalite açısından optimize edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Ayrıca, *O. basilicum* un biyokimyasal bileşenleri gelişimsel evre, yetiştirme ortamı ve özellikle *in vitro* kültür koşullarına oldukça duyarlı olup, hedef bileşiklerin üretimi açısından uygun koşulların optimize edilmesini gerektirmektedir.

Çalışılan üçüncü bitki türü olan endemik *R. carnosula* daki çalışmalara da yine *in vitro* şartlarda tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen stok bitki yetiştiriciliği ile başlanmış ve daha sonra yapılan kallus geliştirme çalışmalarında bu stok bitkilerin farklı eksplantları kültüre alınmıştır. Farklı çimlendirme ortamlarına ekilen tohumların *in vitro* çimlenme oranı ortalamaları %75.5 ila %95.85 arasında değişirken, *in vivo* çimlenme oranı %78 olarak gerçekleşmiştir. Demir (2020)'in çalışmasında, *R. carnosula* da yapılan *in vitro* çimlendirme denemelerinde en başarılı çimlendirme oranının %64 olduğu bildirilmiştir. Arı (2010) nin *in vivo* koşullarda yaptığı çimlenme denemelerinde ise en yüksek çimlenme oranı %98 olarak bulunmuştur. Bu nedenle *R. carnosula* tohumlarının hem *in vitro* hem de *in vivo* şartlarda çimlenme oranı genel olarak yüksek bir tür olduğu ifade edilebilir.

R. carnosula 1. grup kallus denemelerinde; kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı BGD içermeyen kontrol ortamı ile birlikte toplam 3 ortam kallus oluşturma yönünden test edilmiştir. Bunlardan kontrol ortamında hiç kallus oluşmazken, 2. ortam (2

mg/L NAA + 1 mg/L BAP) ve 3. ortamda (2 mg/L NAA + 2 mg/L TDZ) %100 oranında kallus oluşmuştur. Bu sonuç, *R. carnosula* da BGD kullanımının kallus oluşumu üzerinde belirleyici olduğunu ve 2. ve 3. ortam BGD içeriklerinin kallus oluşumunu etkin şekilde desteklediğini göstermektedir. Benzer sonuçlar *R. carnosula* daki tek kapsamlı literatür olan Demir (2020)'in yaptığı çalışmada da vurgulanmıştır. Söz konusu çalışmada kallus oluşumu açısından başarılı bulunan besin ortamları tek başına IAA, NAA ve 2,4-D oksinlerini içerebildiği gibi, aynı zamanda BA+ NAA, BA + IAA, TDZ + IAA, 2,4-D + TDZ ve TDZ + NAA gibi çeşitli BGD kombinasyonlarını da içermektedir.

R. carnosula 2. grup kallus denemelerinde ise yine kotiledon eksplantlarının kültüre alındığı 6 farklı kallus indüksiyon ortamı test edilmiş olup, bunlar arasından en fazla antosiyaninli kallus oluşumu 5. ortam (2 mg/l NAA+1 mg/l TDZ) ve 6. ortamda (2 mg/l NAA+ 1 mg/l Zeatin) meydana gelmiştir. Çalışmamızda kullandığımız BGD kombinasyonları ile uyumlu olan Demir (2020)'in *R. carnosula* kotiledonlarını kültüre aldığı çalışmada ise 59. ortam (2mg/l NAA+1mg/l TDZ) ve 69. ortamda (2mg/l NAA+ 2 mg/l TDZ) en fazla antosiyaninli kallus oluşumu bildirilmiştir. Ancak iki çalışma arasındaki fark bizim çalışmamızdaki temel besin ortamı NN ortamı iken, Demir (2020)'in çalışmasında MS ortamı kullanılmıştır. Ayrıca, çalışmamızdaki kök oluşumunun sadece BGD içermeyen NN kontrol ortamında (%79) ve MS kontrol ortamında (%48) gerçekleşmesi de yine Demir (2020) in yaptığı çalışmada *R. carnosula* nın kotiledonlarının kültüre alındığı ve herhangi bir BGD içermeyen MS kontrol ortamında dikkat çekici bir şekilde %75 oranında kök oluşumu gerçekleşmiş olmasıyla uyumludur. Bu bulguların, *R. carnosula* türünün kotiledon eksplantlarındaki içsel hormonların yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda tespit edilen kültür ortamları ile kallus rengi arasındaki anlamlı ilişki, ortam bileşiminin fenotipik varyasyonları modüle ettiğini ortaya koymaktadır. Kallus rengindeki farklılıkların antosiyanin ve diğer flavonoid bileşenlerin sentezine bağlı olarak çevresel ve kültürel faktörlerle şekillendiği bilinmektedir (Chalker-Scott, 1999). Bu nedenle, ortam bileşiminin metabolik yolları etkileyerek bitki doku kültüründe biyokimyasal ve fizyolojik çeşitliliği tetiklediği söylenebilir.

R. carnosula da yapılan antosiyanin ve antioksidan analizlerine gelince; TMA içeriği bakımından en yüksek değerin doğadaki bitkilerden toplanan kotiledon yapraklarında (301.78 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek) tespit edilmesi, doğal çevredeki ışık, sıcaklık ve stres faktörlerinin antosiyanin biyosentezini artırıcı etkisini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, antosiyanin sentezinin çevresel faktörlerden güçlü şekilde etkilendiğini belirten Chalker-Scott (1999) gibi araştırmacıların çalışmalarıyla uyumludur.

Çalışmamızda doğal bitki kotiledonlarından sonra en fazla TMA sırayla *in vitro* fidelerin kotiledon yaprakları (195.24 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek) ile *in vivo* fidelerin kotiledon yapraklarından (114.18 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek) belirlenmiştir. Buna karşılık, 6 farklı kallus ortamında tespit edilen en yüksek TMA ise 37.32 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek olup, 4. ortamdaki (BGD içermeyen NN ortamından) elde edilmiştir. Bu sonuçlar ise *R. carnosula* da daha önce belirtilen kotiledon yapraklarına özgü bir karakteristik özelliğin önemini bir kez daha ortaya koymuştur. *R. carnosula* da kotiledon yaprakların alt yüzeyi yani abaksial yüzeyi her şartta istisnasız mor renkli antosiyaninler taşımaktadır. Antosiyanin üretimi için

çalışmamızda doğada ve *in vivo* şartlarda üretilen kotiledonların yanısıra, *in vitro* şartlarda üretilen kotiledonlar ile bunlardan üretilen kallusların antosiyanin miktarları karşılaştırıldığında, *R. carnosula* da gerek *in vivo* gerekse *in vitro* şartlarda antosiyanin üretimi için antosiyanin kaynağı olarak mutlaka kotiledon eksplantlarının kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Öte yandan, *R. carnosula* daki tek kapsamlı literatür olan Demir (2020)'in çalışmasında, 73 farklı besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda en fazla 59.ortamda (1mg /L TDZ + 2 mg/L NAA) ve 69.ortamda (2 mg /L TDZ + 2 mg/L NAA) %100 oranında antosiyaninli kalluslar oluşmuş ancak kallusların antosiyanin miktar analizleri yapılmadığı için kendi çalışmamızın sonuçlarını söz konusu çalışma ile karşılaştırma fırsatı olmamıştır.

R. carnosula da antioksidan aktivite açısından ise, en yüksek değer yine doğadan elde edilen kotiledon örneklerinden (14.31 g TE/100 g kuru örnek) elde edilmiş, bunu *in vivo* fide (13.37 g TE/100 g kuru örnek) ve *in vitro* fide (10.20 g TE/100 g kuru örnek) takip etmiştir. Kallus geliştirme ortamlarında ise antioksidan aktivite tüm koşullarda oldukça düşük düzeyde saptanmıştır. Bu durum *R. carnosula* da yine antosiyanin kaynağı kotiledon eksplantlarının önemini vurgulamakla birlikte, doğal örnek için doğal çevredeki ışık, sıcaklık ve stres faktörlerinin antioksidan biyosentezini artırıcı etkisini ortaya koymaktadır. Orhan vd. (2017)'nin çalışmasında; *R. carnosula*'nın doğadan toplanan bitki örneklerinde, serada yetiştirilen bitkilere göre yaklaşık 4 kat kadar daha fazla antioksidan tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmamız, Orhan vd. (2017)'nin çalışmasıyla uyumludur. Benzer şekilde, Kolarević vd. (2024)'nin çalışmasında; yaban mersini/böğürtlenin tarlada yetiştirilen yaprakları, *in vitro*'da yetiştirilen yapraklar ve bu yapraklardan elde edilen kalluslardaki fenolik bileşikler analiz edilmiş ve tarlada yetiştirilen yaprakların *in vitro* indüklenmiş kallus kültürüne kıyasla çok daha iyi bir fenolik bileşik kaynağı olduğu bildirilmiştir.

R. carnosula'da antioksidan aktivite yönünden *in vitro* fide ve kallus örnekleri arasındaki yaklaşık 4 katlık belirgin farkın olmasının; kültür ortamlarının özellikle BGD kompozisyonu, ışık düzeyi, kültür şartları gibi çeşitli stres faktörlerinin antioksidan metabolizma üzerinde önemli etkisi olmakla birlikte, *R. carnosula* türü için bu farkın direkt antosiyanin kaynağı eksplant olarak kotiledonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, bundan sonra *R. carnosula* da yapılabilecek çalışmalarda kotiledon eksplantları kullanılarak biyotik veya abiyotik stres koşullarının kontrollü şekilde manipüle edilmesi, hedef biyokimyasal bileşiklerin üretimi açısından önemli bir strateji olabilir.

Sonuç olarak, *R. carnosula* türünde antosiyanin ve antioksidan düzeylerinin bitkinin eksplant kaynağına ve yetiştirme ortamına göre büyük ölçüde değişkenlik göstermesi, bu bileşiklerin biyosentezinin hem genetik hem çevresel faktörlere duyarlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, hem biyoteknolojik uygulamalarda uygun doku ve ortam seçiminin önemine işaret etmekte, hem de doğal örneklerin biyolojik potansiyel açısından kıymetini vurgulamaktadır.

6.SONUÇLAR

Bu tez çalışması, bitki biyoteknolojisinin doku kültürü teknikleri arasındaki *in vitro* sekonder metabolit üretimi üzerine odaklanmıştır. Çalışmanın ana materyallerini antosiyanin içeren üç bitki türü (*H. sabdariffa*, *O. basilicum* ve endemik *R. carnosula*) oluşturmuştur. Çalışma hem *in vitro* hem *in vivo* koşullarda gerçekleştirilmiştir. *In vitro* çalışmalar üç aşamalı olup, ilk aşamada intakt bitki kültürü ile bu bitkilerin *in vitro* koşullarda kullanılacak eksplant kaynakları olan stok bitki materyalleri tohum çimlendirme ile üretilmiştir. İkinci aşamada, üretilen bu *in vitro* bitkiciklerin çeşitli eksplantları kullanılarak bitki türüne göre ikiye aşamalı kallus denemeleri kurulmuştur. Bu denemelerde; besin ortamları BGD ve kültür koşulları yönünden optimize edilerek ve en uygun eksplant kaynağı belirlenerek, hedef metabolit (antosiyanin) üretim miktarı en üst düzeye çıkarılmaya çalışılmıştır. Son olarak üçüncü aşamada ise, hem *in vivo* hem de *in vitro* denemelerden elde edilen bitki materyallerine toplam antosiyanin ve antioksidan içerik analizleri yapılmıştır. Daha sonra hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda elde edilen metabolit miktarları birbiriyle kıyaslanmıştır. Bu çalışma ile *in vitro* sekonder metabolit üretimi tekniğini kullanarak antosiyanin içeren farklı bitki türlerinden elde edilebilecek antosiyanin miktarının artırılması ve özellikle gıda, boya vb. endüstrilerin kullanabileceği alternatif doğal renklendirici ve antioksidan kaynaklarının sağlanması hedeflenmiştir. Çalışmalara ait bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- *H. sabdariffa* da yapılan tohum çimlendirme çalışmaları kapsamında; *in vitro* şartlarda ekilen tohumlarda en yüksek %25, *in vivo* şartlarda ekilen tohumlarında ise en yüksek %32 oranında çimlenme gerçekleşmiş olup, hibiskusun çalışmadaki diğer türlere göre çimlenme oranının daha düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır.
- *H. sabdariffa* da *in vitro* şartlarda yapılan çimlendirme çalışmalarında yoğun kontaminasyonla karşılaşılması nedeniyle tohumlar propamocarb ve fluazinam etken maddeli antifungal ilave edilmiş ortamlarda da çimlendirme denemelerine tabi tutulmuştur. Özellikle propamocarb etken maddeli antifungal içeren ortam daha yüksek çimlenme ve daha düşük kontaminasyon oranı ile daha başarılı bulunmuştur. Ancak kullanılan bu antifungallerin kontaminasyonu önemli ölçüde azaltırken, çimlenme üzerine önemli etkisinin olmadığı belirlenmiştir.
- *H. sabdariffa* da yapılan iki grup kallus denemesinden 1.grup denemede karanlıkta 3 farklı besin ortamında kültüre alınan 2 eksplant tipinden (hipokotil ve kotiledon), kotiledon eksplantlarının kallus kalitesinin daha yüksek olduğu ve besin ortamı içeriğinin kallus gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur. Kontrol ortamında kallus oluşumu gerçekleşmezken, 2.ortam (2mg/L NAA 1mg/L BAP) ve 3.ortamda (1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l Kinetin) %100 oranında kallus oluşumu gerçekleşmiş, ancak kalluslarda antosiyanin varlığı görülmemiştir.
- *H. sabdariffa* da yapılan 2.grup denemede 2'si kontrol (1.ve 6.) ortamı olmak üzere 10 farklı kallus indüksiyon ortamı test edilmiştir. Bu ortamlardan ilk 5'inde besin ortamı olarak MS, diğer 5'inde ise NN kullanılmıştır. Ortamlardan 3.ortamda %86.67 (0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin), 8.ortamda (0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin) ve 10.ortamda (0.5 mg/L IAA + 0.25mg/l Zeatin) %100 oranında kallus gelişimi sağlanmış ve bu ortamlarda oksin ve sitokininin

birlikte kullanılmasının bu etkiyi oluşturduğu belirlenmiştir. Kallus çapı açısından ortamlar arasında anlamlı farklılıklar belirlenmiş olup, en büyük kalluslar 8 numaralı ortamda (0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin) oluşmuştur. Bu sonuç, 8 numaralı ortamın kallus proliferasyonu açısından en uygun ortam olduğunu göstermektedir. Kök oluşumu yönünden ise en fazla kök öncelikle 7.ortamda (0.5 mg/L 2,4-D), ve ayrıca 9.ortamda (0.5 mg/L IAA) gerçekleşmiştir. Dolayısıyla hibiskusta kök oluşumunun sadece oksin grubu BGD içeren NN ortamlarında daha fazla gerçekleştiği ifade edilebilir. Sonuç olarak, NN ortamının MS ortamına göre daha fazla köklenmeyi sağladığı bulunmuştur. Ayrıca 2.,4.,7. ve 9.ortamın yani tek başına oksin gruplarının kallus oluşumunu desteklemediği gözlenmiştir.

- Hibiskusa rengini veren kırmızımsı antosiyanin varlığı sadece 8. ortamda kültürden 6 ay sonra sınırlı şekilde görülmüştür. Bu nedenle, 8. ortamın (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin) antosiyanin oluşumunu sağladığı, ancak antosiyanin oluşumu için zaman gerektirdiği ifade edilebilir. Sonuç olarak, hibiskusta ortam bileşimi ve eksplant tipi özellikle antosiyaninli kallus oluşumu ve gelişimi üzerinde belirleyici etkiye bulunmuştur.
- Hibiskusta antosiyaninli kallus elde etmeye çalışırken bazı eksplantlarda yoğun kök oluşumuna rastlanması, daha sonra hibiskusta köklerden yapılabilecek *in vitro* sekonder metabolit çalışmalarına katkı sağlama potansiyeli nedeniyle göz ardı edilmemiştir. Kök oluşumu açısından 7.ortam (NN + 0.5 mg/L 2,4 D) en yüksek (%100) köklenme oranını sağlarken, 9.ortam (NN + 0.5 mg/L IAA) ise eksplant başına en fazla kök sayısı/eksplant (14.5 adet) oluşturmuştur. Köklenme yönünden öne çıkan bu ortamlar BGD yönünden sitokinin içermeyip, sadece oksin içeriğine sahip NN bazlı ortamlardır. Ancak aynı BGD içeriklerine sahip MS bazlı 2. ve 4.ortamlardaki köklenme verilerinin daha düşük gerçekleşmesi, temel besin ortamı içeriğinin de köklenmede etkili olduğunu ve bu yönden NN temel besin ortamının köklenmeyi MS ortamına göre daha fazla teşvik ettiği söylenebilir. Özetle, hibiskusta sitokinin kullanılmayan, sadece oksin içeren ortamların daha fazla köklenmeyi sağladığı ortaya çıkmıştır.
- Hibiskusta antosiyanin ve antioksidan analizleri yönünden; *in vivo* ortamda yetiştirilen hibiskus bitkilerinden alınan kozalak örneği ile *in vitro* kallus çalışmalarında 8.ortamdan (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin) elde edilen kallus örneğine analizler yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, *in vivo* şartlarda yetiştirilen kozalaklardan elde edilen antosiyanin miktarının, kallustan oluşan antosiyanin miktarına göre çok daha fazla olduğu saptanmıştır. Antioksidan üretimi açısından ise durum tam tersi olup kallusdan elde edilen antioksidanın daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, hibiskusda antioksidan üretimi açısından doku kültürü tekniklerinden faydalanılabileceği öngörülmektedir. Çalışmada kallus dokusundan elde edilen yüksek antioksidan kapasitesi, gelecekte fonksiyonel bileşik üretimi amacıyla kallus kültürlerinin önemli potansiyel taşıdığını ortaya koymuştur.
- *H. sabdariffa*'da yapılan çalışmaların özeti olarak; hibiskusta kallus oluşumunda MS ve NN ortamlarının etkili olduğu, özellikle 8 numaralı ortamda (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.25 mg/L Zeatin) kallus proliferasyonu ve antosiyanin üretiminin

optimize edilebildiği ortaya konulmuştur. *In vitro* kalluslardan elde edilen antosiyanin miktarının *in vivo* örneklerle karşılaştırıldığında daha düşük olduğu, ancak antioksidan kapasitenin *in vitro* ortamda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu potansiyel, hibiskus bitkisi özelinde doku kültürü tekniklerinin antioksidan üretimi açısından etkin bir yöntem olabileceğini ve geliştirilebileceğine işaret etmektedir.

- Çalışılan ikinci bitki türü olan *O. basilicum*'da yapılan tohum çimlendirme çalışmaları kapsamında; farklı çimlendirme ortamlarına ekilen tohumların *in vitro* çimlenme oranı ortalamaları %71.5 ila %90 arasında değişirken, *in vivo* çimlenme oranı %100 olarak gerçekleşmiştir. Bu nedenle reyhan tohumlarının hem *in vitro* hem de *in vivo* şartlarda son derece yüksek oranda çimlendiği sonucuna varılmıştır.
- *O. basilicum* da yapılan iki grup kallus denemesinden 1.grup denemede hem en iyi kültür koşulu (aydınlık/karanlık) hem de en iyi eksplant tipi (kotiledon, hipokotil, küçük yaprak, büyük yaprak) belirlenmeye çalışılmıştır. Aydınlık ve karanlık koşulların ikisinde de %100 oranında kallus oluşumu sağlanırken, tüm eksplant tiplerinde karanlık koşullarda daha fazla miktarda antosiyanin içeren kallus elde edilmiştir. Bu sonuç, reyhanda karanlık ortamın kalluslarda antosiyanin üretimini teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Eksplant tipi yönünden ise en yüksek miktarda antosiyanin içeren kallus, büyük yaprak tipinden elde edilmiştir.
- *O. basilicum* da yapılan 2.grup denemede 6 farklı kallus indüksiyon ortamı karanlıkta kültüre alınan büyük yaprak eksplantlarında test edilmiştir. Bunlardan ilk 3 ortamda besin ortamı olarak MS, diğer 3 ortamda ise NN ortamı kullanılmıştır. 1. ve 4. ortamlar kontrol ortamlarıdır. Bulgular her ortamın farklı baskın etkilerini ortaya çıkartmıştır. Kontrol grupları hariç tüm ortamlarda 2,4-D kullanımının, kallus ve antosiyanin oluşumu üzerinde olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir. 2,4-D li tüm ortamlarda %100 oranında antosiyaninli kallus oluşmuş, en yüksek kallus çapı ve kallus yaş-kuru ağırlığı ise yine 2,4-D li, ancak Zeatin kombinasyonlu bir ortamdan (3.ortam = MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin) elde edilmiştir. Hatta aynı BGD kombinasyonlu NN ortamında (6.ortam = NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin) en yüksek ikinci kallus çapı ve yaş-kuru ağırlık oluşumu ölçülmüştür. Ayrıca Zeatin içeren 0.5 mg/l 2,4-D li 3. ve 6.ortamlarda, Zeatin içermeyen 0.5 mg/L 2,4-D li 2. ve 5.ortamlara göre kallus çapı ve kallus yaş-kuru ağırlıkları hemen hemen 2 katı olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla, oksinin reyhanda kallus oluşturmada genel olarak etkili olduğu, ancak gerek kallus çapı gerekse kallus biyokütlesi açısından ise doğru oksin+sitokinin kombinasyon ve konsantrasyonlarının gerekli olduğu ifade edilebilir.
- Antosiyaninli kallus elde edilmeye çalışılan *O. basilicum* daki 2.grup denemelerde bazı eksplantlarda meydana gelen yoğun kök oluşumu, daha sonra yapılabilecek *in vitro* sekonder metabolit çalışmaları açısından önemli bulunmuş ve rhizogenesis verileri de dikkate alınmıştır. Denemedeki 4.ortam (NN kontrol

ortamı), 1.ortama (MS kontrol ortamı) göre daha fazla köklenme oluşturmıştır. Ayrıca 4.ortamda antosiyanin fazla miktarda oluşurken, 1.ortamda bu miktar daha düşük gerçekleşmiştir. Renk yönünden ise kalluslarda farklı renkler gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, *O. basilicum* türünün doku kültürü çalışmalarında istenilen gelişimsel hedefe göre besin ortamının optimize edilmesinin önemi ortaya çıkmıştır.

- *O. basilicum* da yapılan antosiyanin ve antioksidan analizlerinde; *in vitro* fide ve *in vivo* fidelerin yaprak örneklerinden elde edilen antosiyanin ve antioksidan miktarları karşılaştırıldığında; kallustan elde edilen antosiyanin miktarının *in vivo* ve *in vitro* fide örneklerine göre düşük olduğu, fakat antioksidan miktarının 6.ortamda elde edilen kallus örneğinde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu sonuca göre, NN besin ortamına eklenen 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin kombinasyonu *O. basilicum*'daki antioksidan miktarını arttırmıştır. Bu sonucun reyhanda antioksidan üretiminin artırılması için veri oluşturabileceği görülmektedir.
- *O. basilicum*'da (reyhanda) yapılan çalışmaların özeti olarak; karanlık koşullarda kültüre alınan gerçek yaprak eksplantlarının antosiyanin üretimini daha fazla teşvik ettiği ortaya konulmuştur. Bu eksplantlar özellikle 3. ortamda (MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin) kültüre alındığında antioksidanlı kallus oluşumu, kallus çapı ve kallus yaş-kuru ağırlıkları maksimum düzeye çıkarken, 5.ortamda (NN + 0.5 mg/L 2,4-D) kültüre alındıklarında ise kallusların tamamının reyhanda antosiyaninlerin en yoğun bulunduğu düşünülen mor renkte olduğu ortaya konulmuştur. Öte yandan, *O. basilicum* da kallusların TMA üretiminin *in vivo* örneklerle kıyasla daha düşük kapasiteye sahip olmasına rağmen, kalluslar antioksidan içeriği bakımından daha yüksek bir profil sergilemiştir. Özellikle 6.ortamda (NN + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Zeatin) oluşan kallusların antioksidan aktivitesinin tüm reyhan örnekleri içinde (*in vivo* örnek dahil) maksimum düzeye çıkması tezin en önemli sonuçlarından birisi olmuştur.
- Çalışılan üçüncü bitki türü olan endemik *R. carnosula* da yapılan tohum çimlendirme çalışmaları kapsamında; farklı çimlendirme ortamlarına ekilen tohumların *in vitro* çimlenme oranı ortalamaları %75.5 ila %95.85 arasında değişirken, *in vivo* çimlenme oranı %78 olarak gerçekleşmiştir. *R. carnosula* tohumlarının hem *in vitro* vitro hem de *in vivo* şartlarda çimlenme oranı oldukça yüksek bir tür olduğu ifade edilebilir.
- *R. carnosula* da yapılan iki grup kallus denemesinden 1.grup denemede 3, 2.grup denemede 6 kallus indükiyon ortamında kotiledon eksplantları karanlıkta kültüre alınmıştır. BGD içermeyen kontrol ortamlarında herhangi bir kallus oluşumu gerçekleşmezken, BGD li diğer tüm ortamlarda %100 oranında kallus oluşması, *R. carnosula* da BGD kullanımının kallus oluşumu üzerinde belirleyici olduğunu ortaya koymuştur.
- BGD li ortamlarda *R. carnosula*'da %100 kallus oluşumuna rağmen; 1.grup denemede bunların hiçbiri antosiyaninli kallusa dönüşmezken, daha kapsamlı

2.kallus denemesinde 6 ortam arasından en fazla antosiyaninli kallus oluşumu 5.ortamda (2 mg/L NAA + 1 mg/L TDZ) ve 6.ortamda (2 mg/L NAA + 1 mg/L Zeatin) meydana gelmiştir. Bu BGD kombinasyonları, *R. carnosula* daki tek kapsamlı doku kültürü literatürü olan Demir (2020)'in çalışmasını doğrulamıştır.

- Antosiyaninli kallus elde edilmeye çalışılan *R. carnosula* kallus denemelerinde de çalışılan diğer türlerde olduğu gibi belirli ortamlarda beklenenden fazla miktarda kök oluşumu gerçekleşmiştir. Çalışmada kök oluşumu sadece BGD içermeyen NN kontrol ortamında (%79) ve MS kontrol ortamında (%48) gerçekleşmiştir. Kontrol ortamlarındaki bu köklenme bulguları, MS kontrol ortamında %75 oranında köklenmenin elde edildiği Demir (2020) in çalışmasını yine dikkat çekici şekilde doğrulamıştır. BGD içermeyen kontrol ortamlarındaki bu tekrarlayan köklenme bulguları, endemik *R. carnosula* türünün kotiledon eksplantlarındaki içsel hormonlardan muhtemelen oksin miktarının yüksek olduğuna işaret ediyor olabilir.
- *R. carnosula*'nın antosiyanin ve antioksidan kapasitesi açısından yapılan analizlerinde; *in vitro* kallus örnekleri ile *in vitro* fide kotiledon örneği, *in vivo* fide kotiledon örneği ve doğadan toplanan kotiledon örnekleri karşılaştırıldığında, en yüksek TMA doğadan toplanan kotiledon örneğinden (301.78 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek) elde edilmiştir. Onu, önce *in vitro* fide kotiledon örneği (195.24 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek) ve daha sonra *in vivo* fide kotiledon örneği (114.18 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek) takip etmiştir. Bu sonuç; doğal çevredeki ışık, sıcaklık ve stres faktörlerinin antosiyanin biyosentezini artırıcı etkisini ortaya koymakla birlikte, endemik bir tür olan *R. carnosula*'da *in vitro* antosiyanin üretimi için *in vitro* şartlarda BGD içermeyen besin ortamında yetiştirilecek fidelerin kotiledon yapraklarının oldukça yüksek potansiyel taşıdığını ispatlamıştır. Buna karşılık, 6 farklı kallus ortamında tespit edilen en yüksek TMA ise 37.32 mg C3G eşdeğeri/100 g kuru örnek) olup, bu BGD içermeyen NN ortamından elde edilmiştir. Bu bulgular *R. carnosula*'nın kotiledon yapraklarına özgü bir karakteristik özelliğin (abaksial yani alt yüzeyin her şartta istisnasız mor renkli antosiyaninler taşıması) önemini bir kez daha ortaya koymuştur. Bu nedenle *R. carnosula* da gerek *in vivo* gerekse *in vitro* şartlarda antosiyanin üretimi için antosiyanin kaynağı olarak mutlaka kotiledon eksplantlarının kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.
- *R. carnosula*'nın en yüksek antioksidan miktarı ise doğadan toplanan kotiledon yaprakları örneğinden (14.31 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek örnek) elde edilirken, bunu *in vivo* fide kotiledon örneği (13.37 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek örnek) ve *in vitro* fide kotiledon örneği (10.20 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek) takip etmiştir. Kallusların antioksidan miktarları ise ortalama 2.37-2.67 g Trolox eşdeğeri/100 g kuru örnek aralığında bulunmuştur. *R. carnosula*'da antioksidan aktivite yönünden *in vitro* fide ve kallus örnekleri arasındaki yaklaşık 4 katlık belirgin farkın olmasının sebebi; özellikle *R. carnosula* türü için direkt antosiyanin kaynağı eksplant olarak kotiledonlardan kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle, bundan sonra *R. carnosula* da yapılabilecek çalışmalarda kotiledon eksplantlarının doğrudan kullanılarak biyotik veya abiyotik stres koşullarının

kontrollü şekilde manipüle edilmesi, hedef biyokimyasal bileşiklerin üretimi açısından önemli bir strateji olabilir.

- *R. carnosula* da yapılan çalışmaların özeti olarak; antosiyanin üretimi yönünden doğadan toplanan kotiledonlardan sonraki maksimum antosiyaninin *in vitro* fidelerin kotiledon örneklerinden elde edilmiş olması, endemik ve çok kısıtlı bir alanda popülasyonu olan *R. carnosula* nın sürdürülebilir antosiyanin üretimi için *in vitro* kültür çalışmalarını çevreci ve daha etkin bir biyoteknolojik araç olarak öne çıkartmıştır. Üstelik mevcut çalışma, *R. carnosula* da *in vitro* antosiyanin üretimi (hatta *in vitro* sekonder metabolit üretimi) yönünden ilk olup, bundan sonra yapılacak çalışmalarla hem antosiyanin hem de antioksidan kapasitesinin artırılması potansiyeline sahiptir.

Sonuç olarak; *H. sabdariffa* ve *O. basilicum* türlerinde *in vitro* koşullar altında elde edilen antioksidan aktivitenin *in vivo* koşullardaki muadillerine göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuş olup hem bu türlerde hem de *R. carnosula* türünde mevcut antosiyanin miktarları ve antioksidan aktivitenin doku kültürü yöntemleri sayesinde (farklı besin ortamları ve BGD kombinasyonlarının optimizasyonu, farklı elisitörlerin kullanımı vb. gibi) optimize edilerek artırılabilirliği anlaşılmaktadır. Optimizasyonlarla birlikte çalışılan türlerin ilgili metabolitlerinin, ilgili sektörler için alternatif bitki kaynakları olma potansiyeli mevcut görülmektedir.

Gelecek çalışmalarda ayrıca, antosiyanin sentezine katkıda bulunan genlerin *in vitro* koşullarda ekspresyon düzeylerinin analiz edilmesi, metabolit üretim süreçlerinin moleküler düzeyde anlaşılmasına ve genetik mühendislik yaklaşımlarıyla optimize edilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca, elde edilen sekonder metabolitlerin yapısal karakterizasyonu, saflık düzeylerinin belirlenmesi ve stabilite analizlerinin yapılması, özellikle gıda, kozmetik, ilaç, boya vb. endüstrilerinde kullanıma yönelik potansiyelin değerlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, zaten gıda sektöründe kullanımı bilinen *H. sabdariffa* ve *O. basilicum* türlerinin yanısıra, üzerinde henüz fazla çalışma yapılmayan endemik *R. carnosula* türünün de özellikle gıda ve boya sektörleri için alternatif antosiyanin kaynağı olarak kullanım kriterlerine uygunluğunun araştırılması gerekmektedir.

Son olarak, *R. carnosula* gibi özellikle endemik türler üzerinde yapılacak çalışmalar; bu türlerin biyoteknolojik yöntemler sayesinde sürdürülebilir üretimine ve kullanımına olanak tanırken, doğal popülasyonlarının da korunmasına katkı sağlayacaktır. Tüm bu yönleriyle, doku kültürü temelli sekonder metabolit üretimi, gelecekte yüksek katma değerli biyolojik ürünlerin elde edilmesinde stratejik bir araç olarak değerlendirilme potansiyeline sahiptir.

7.KAYNAKLAR

- Abeda, Hermane Zagadou, Modeste Kan Kouassi, Kicho Denis Yapou, Edmond Koffi², Raoul Sylvère Sie, Mongomanké Kone, and Hilaire Tanoh Kouakou. 2014. *Production and Enhancement of Anthocyanin in Callus Line of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.)*.
- Abeda, Z. H., Sie, R. S., Ayolie, K., Yapou, S. E. S., Coulibaly, S., Kouassi, K. M., & Kouakou, T. H. (2015). Free radical scavenging properties and antioxidant activities of some anthocyanins purified from roselle (Hibiscus sabdariffa L.) callus using In-Vitro tests. *Research Journal Of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 320-329.
- Adigüzel, A., Güllüce, M., Şengül, M., Ögütçü, H., Şahin, F., & Karaman, I. (2005). Antimicrobial effects of Ocimum basilicum (Labiatae) extract. *Turkish Journal of Biology*, 29(3), 155-160.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 196, 67-76.
- Ahmed, T., Rana, M. R., Hossain, M. A., Ullah, S., & Suzaudulla, M. (2024). Optimization of ultrasound-assisted extraction using response surface methodology for total anthocyanin content, total phenolic content, and antioxidant activities of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) calyces and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(22), 28985-28999.
- Akgül, A. (1993). Fesleğen Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, (15), 79-81.
- Allan, A. C., Hellens, R. P., & Laing, W. A. (2008). MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in plant science*, 13(3), 99-102.
- Arı, E. (2010). Cultivation and Phytochemical Studies on *Ricotia carnosula* Boiss. & Heldr. 6th Conference On Medicinal And Aromatic Plants Of Southern European Countries (6th CMAPSEEC), 6(22) (Suppl.). Abstract Book: 104.
- Axelrod, D. (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *Journal of Cell Biology*, 89(1), 141-145.
- Aye, A., Jeon, Y. D., Lee, J. H., Bang, K. S., & Jin, J. S. (2019). Anti-inflammatory activity of ethanol extract of leaf and leaf callus of basil (Ocimum basilicum L.) on RAW 264.7 macrophage cells. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19, 217-226.
- Barrios, Patricio Apáez, María Del, Carmen Rocha Granados, Martha E. Pedraza Santos, Yurixhi Atenea, and Raya Montaña. 2018. "Effect of Foliar Copper Application on Yield and Anthocyanin Concentration in Hibiscus Sabdariffa Calyces." *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo* 50.

- Baydar, H. (2019). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi (7. Baskı). Nobel Akademik Yayıncılık, Yayın No: 2328, Ankara.
- Bhuvaneshwari, K., Gokulanathan, A., Jayanthi, M., Govindasamy, V., Milella, L., Lee, S., ... & Girija, S. (2016). Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. in vitro culture be a potential source of secondary metabolites?. *Food chemistry*, 194, 55-60.
- Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A., & Lamb, C. (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*, 12(12), 2383-2393.
- Brooks, R.R. 1987. *Serpentine and its Vegetation: A Multidisciplinary Approach*. Dioscorides Press, Portland, OR.
- Cemeroğlu, B. (2010). Gıda analizlerinde genel dağılım. Gıda Analizleri, Editör: Cemeroğlu B. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 34 .
- Chachalis, D., Korres, N., & Khah, E. M. (2008). Factors affecting seed germination and emergence of Venice mallow (*Hibiscus trionum*). *Weed Science*, 56(4), 509-515.
- Chalker-Scott, L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70(1), 1-9.
- Cherednichenko, MY, Polivanova, OB, Khlebnikova, DA, Slovareva, OY, Kirakosyan, RN ve Kalashnikova, EA (2023). Aseptik Bitkilerin ve *Ocimum basilicum* L. Kallus Kültürlerinin Biyosentetik Potansiyelinin In Vitro Yönetimi. *Rusya Bitki Fizyolojisi Dergisi* , 70 (7), 170.
- Cho, Won Kyong, Soo Yun Kim, Sung Joo Jang, Sak Lee, Hye In Kim, Euihyun Kim, Jeong Hun Lee, Sung Soo Choi, and Sang Hyun Moh. 2023. "Comparative Analysis of Water Extracts from Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Plants and Callus Cells: Constituents, Effects on Human Skin Cells, and Transcriptome Profiles." *International Journal of Molecular Sciences* 24(13). doi:10.3390/ijms241310853.
- Close, D.C., Beadle, C.L.(2003). The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69(2) 149-161.
- Çelebi, Ç. (2010). *Fesleğenin (Ocimum basilicum) fenolik madde dağılımı ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi* (Master's thesis, Ankara Üniversitesi (Turkey)).
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *H. sabdariffa*.—A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424-443.
- Danova, K., Čellárová, E., Macková, A., Daxnerová, Z., & Kapchina-Toteva, V. (2010). In vitro culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46, 422-429.

- Davis, P.H. (ed), 1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegan Islands. Edinburgh University Press. Vol 1-9.
- De Klerk, G. J. (2002). Effects of plant hormones on in vitro shoot growth. *Plant Growth Regulation*, 37(2), 105-113.
- Demir, M. (2020). Endemik *Ricotia Carnosula* Boiss. & Heldr.(Brassicaceae)'da in vitro rejenerasyon ve sentetik tohum üretimi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Antalya.
- Demirtaş, İ., İnah, N. K., Koldaş, S., Karakoç, Ö. C., Tüfekçi, A. R., Gül, F., ... & Altun, M. (2013). Değerlendiremediğimiz Tarım Ürünleri Potansiyelimiz. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, (1), 168-173.
- Esetlili, B. C., Pekcan, T., Çobanoğlu, Ö., Aydoğdu, E., Turan, S., & Anac, D. (2014). Essential plant nutrients and heavy metals concentrations of some medicinal and aromatic plants. *Journal of Agricultural Sciences*, 20(3), 239-247.
- Espinosa-Leal, Claudia A., César A. Puente-Garza, and Silverio García-Lara. 2018. "In Vitro Plant Tissue Culture: Means for Production of Biological Active Compounds." *Planta* 2018 248:1 248(1):1–18. doi:10.1007/S00425-018-2910-1.
- Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C., & González-Gómez, D. (2013). Altered commercial controlled atmosphere storage conditions for 'Parhenon'broccoli plants (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). Influence on the outer quality parameters and on the health-promoting compounds. *LWT-food science and technology*, 50(2), 665-672.
- Flanigan, P. M., & Niemeyer, E. D. (2014). Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food chemistry*, 164, 518-526.
- Flanigan, Patrick M., and Emily D. Niemeyer. 2014. "Effect of Cultivar on Phenolic Levels, Anthocyanin Composition, and Antioxidant Properties in Purple Basil (*Ocimum Basilicum* L.)." *Food Chemistry* 164:518–26.
- França, M. F. D. M. S., Vilela, M. S., Costa, A. P., Nogueira, I., Pires, M. D. C., & Souza, N. O. S. (2017). Germination test and ornamental potential of different basil cultivars (*Ocimum* spp.). *Ornamental Horticulture*, 23(4), 385-391.
- Ghasemzadeh, A., Ashkani, S., Baghdadi, A., Pazoki, A., Jaafar, H. Z., & Rahmat, A. (2016). Improvement in flavonoids and phenolic acids production and pharmaceutical quality of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by ultraviolet-B irradiation. *Molecules*, 21(9), 1203.
- Ghosh, D., & Konishi, T. (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 16(2).
- Gómez-Galera, Sonia, Eduard Rojas, Duraialagaraja Sudhakar, Changfu Zhu, Ana M. Pelacho, Teresa Capell, and Paul Christou. 2010. "Critical Evaluation of

- Strategies for Mineral Fortification of Staple Food Crops.” *Transgenic Research* 19(2):165–80. doi:10.1007/S11248-009-9311-Y/TABLES/6.
- Grayer, R. J., Kite, G. C., Veitch, N. C., Eckert, M. R., Marin, P. D., Senanayake, P., & Paton, A. J. (2002). Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. *Biochemical systematics and ecology*, 30(4), 327-342.
- Guardiola, S., & Mach, N. (2014). Therapeutic potential of *H. sabdariffa*: A review of the scientific evidence. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 61(5), 274-295.
- Guo, J. T., Lee, H. L., Chiang, S. H., Lin, F. I., & Chang, C. Y. (2001). Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan. *Journal of food and drug analysis*, 9(2), 1.
- Gürkaynak 2022 <https://www.gidabilgi.com/Makale/Detay/zengin-antioksidan-kaynagi-flavonoidler-142232>
- Hakkim, F. L., Shankar, C. G., & Girija, S. (2007). Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(22), 9109-9117.
- Hashemi, A., & Shahani, A. (2019). Effects of salt stress on the morphological characteristics, total phenol and total anthocyanin contents of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant Physiology Reports*, 24, 210-214.
- Irshad, Muhammad, Biswojit Debnath, Sangeeta Mitra, Yasir Arafat, Min Li, Yueting Sun, and Dongliang Qiu. 2018. “Accumulation of Anthocyanin in Callus Cultures of Red-Pod Okra [*Abelmoschus Esculentus* (L.) Hongjiao] in Response to Light and Nitrogen Levels.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 134(1):29–39.
- Jakovljević, D., Bojović, B., Stanković, M., & Topuzovic, M. (2020). Characteristics of in vitro seed germination of three basil genotypes under different nutrition. *Kragujevac J. Sci.* 42: 135-142.
- Jaakola, L., Määtä-Riihinen, K., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2002). Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.)
- Jirakiattikul, Yaowapha, Panumart Rithichai, Papichaya Kwanthong, and Arunporn Itharat. 2021. “Effect of Jasmonic Acid Elicitation Period on Enhancement of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Callus Cultures of *Hibiscus Sabdariffa* Linn.” *Horticulture Environment and Biotechnology* 62(4):629–36.
- Karaca, M., Kara, Ş. M., & Özcan, M. M. (2017). Bazı fesleğen (*O. basilicum* .) popülasyonlarının herba verimi ve uçucu yağ oranının belirlenmesi. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(2), 160-169.
- Karakaya, S., El, SN. (2006). Bazı Bitkisel Çayların Toplam Fenolik Madde İçerikleri, Antioksidan Aktiviteleri ve Siyah Çay Polifenollerinin in vitro Biyoyararlılığı. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23 (1), 1-8.

- Karataş, İ. (2013). Siyah havuç (*daucus carota*) kallus ve hücre süspansiyon kültüründe antosiyanin üretimine UV-C stresinin ve riboflavinin etkilerinin belirlenmesi.
- Khoo, Hock Eng, Azrina Azlan, Sou Teng Tang, and See Meng Lim. 2017. "Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits." *Food and Nutrition Research* 61.
- Kishan, A. S., Paul, M., & Reddy, J. (2022). In vitro micropropagation of *Ocimum sanctum* L. *International Journal of Botany*, 7(1), 225-229.
- Koes, R., Verweij, W., & Quattrocchio, F. (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in plant science*, 10(5), 236-242.
- Kolarević, T., Milinčić, D. D., Vujović, T., Gašić, U. M., Prokić, L., Kostić, A. Ž., ... & Pešić, M. B. (2021). Phenolic compounds and antioxidant properties of field-grown and in vitro leaves, and calluses in blackberry and blueberry. *Horticulturae*, 7(11), 420.
- Konar, S., Karmakar, J., Ray, A., Adhikari, S., & Bandyopadhyay, T. K. (2018). Regeneration of plantlets through somatic embryogenesis from root derived calli of *Hibiscus sabdariffa* L.(Roselle) and assessment of genetic stability by flow cytometry and ISSR analysis. *PloS one*, 13(8), e0202324.
- 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.
- Kouakou, TH, Konkon NG, Ayoliã© K, Obouayeba AP, Abeda ZH, and Konã© M. 2015. "Anthocyanin Production in Calyx and Callus of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) and Its Impact on Antioxidant Activity." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4(3):09–15.
- Kruckeberg, A. R. (2023). *Introduction to California soils and plants: serpentine, vernal pools, and other geobotanical wonders* (Vol. 86). Univ of California Press.
- Kumar, S. S., Manoj, P., & Giridhar, P. (2015). Optimization of an in vitro protocol for the production of ascorbic acid in *Hibiscus cannabinus* leaf-derived normal root cultures. *EurAsian Journal of BioSciences*, 9, 38-45.
- Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., & Collaborators: Eisele T Giusti MM Hach J Hofsommer H Koswig S Krueger DA Kupina; S Martin SK Martinsen BK Miller TC Paquette F Ryabkova A Skrede G Trenn U Wightman JD. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 88(5), 1269-1278.
- Linsmaier, E. M., & Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 18(1).
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 718-733. Mohamed, R.,

- Fernandez, J., Pineda, M., & Aguilar, M. (2007). Roselle (*H. sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ -tocopherol. *Journal of food science*, 72(3), S207-S211.
- Medina, Therese Julienne T., and Lourdes B. Cardenas. 2019. "Induction of Anthocyanin Production in Established Callus Cultures of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Using Yeast Extract."
- Meyer, H. J., & Van Staden, J. (1995). The in vitro production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 40, 55-58.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mizukami, Hajime, Kaomi Tomita, Hiromu Ohashi, and Noboru Hiraoka. 1988. *Anthocyanin Production in Callus Cultures of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.)*. Vol. 7.
- Mizukami, Hajime, Miki Nakamura, Kaomi Tomita, Kaori Higuchi, and Hiromu Ohashi. 1991. *Effects of Macronutrients on Anthocyanin Production in Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) Callus Cultures*. Vol. 8.
- Mohamed, R., Fernández, J., Pineda, M., & Aguilar, M. 2007. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ -tocopherol. *Journal of Food Science*, 72(3), S207–S211.
- Mosadegh, H., Trivellini, A., Ferrante, A., Lucchesini, M., Vernieri, P., & Mensuali, A. (2018). Applications of UV-B lighting to enhance phenolic accumulation of sweet basil. *Scientia Horticulturae*, 229, 107-116.
- Moser, C., Jaqueline, P., Barboza, G., Amanda, J. ve Mizuta, G. (2021). Comparative studies on chemical stability, antioxidant and antimicrobial activity from hot and cold hibiscus (*H. sabdariffa*.) calyces tea infusions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(4), 3531–3538.
- Murashige, T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Nakabayashi, R., Mori, T., & Saito, K. (2014). Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior*, 9(8), e29518.
- Nangui Abrogoua, Université, Université Jean Lorougnon Guédé, and Ufr Agroforesterie. 2015. "Anthocyanin Production in Calyx and Callus of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) and Its Impact on Antioxidant Activity." *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4(3).
- Nazir, M., Tungmunthum, D., Bose, S., Drouet, S., Garros, L., Giglioli-Guivarc'h, N., ... & Hano, C. (2019). Differential production of phenylpropanoid metabolites in callus cultures of *Ocimum basilicum* L. with distinct in vitro antioxidant activities and in vivo protective effects against UV stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(7), 1847-1859.

- Nazir, Munazza, Muhammad Asad Ullah, Muhammad Younas, Aisha Siddiquah, Muzamil Shah, Nathalie Giglioli-Guivarc'h, Christophe Hano, and Bilal Haider Abbasi. 2020a. "Light-Mediated Biosynthesis of Phenylpropanoid Metabolites and Antioxidant Potential in Callus Cultures of Purple Basil (*Ocimum Basilicum* L. Var *Purpurascens*).” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 142(1):107–20.
- Nazir, Munazza, Muhammad Asad Ullah, Sadia Mumtaz, Aisha Siddiquah, Muzamil Shah, Samantha Drouet, Christophe Hano, and Bilal Haider Abbasi. 2020b. "Interactive Effect of Melatonin and UV-C on Phenylpropanoid Metabolite Production and Antioxidant Potential in Callus Cultures of Purple Basil (*Ocimum Basilicum* L. Var *Purpurascens*).” *Molecules* 25(5).
- Nazir, S., Jan, H., Zaman, G., Ahmed, N., Drouet, S., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2021). Synergistic effects of salicylic acid and light stress on bioactive metabolites in basil callus cultures. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 37, 102176.
- Nguyen, Phuong M., Eileen M. Kwee, and Emily D. Niemeyer. 2010. "Potassium Rate Alters the Antioxidant Capacity and Phenolic Concentration of Basil (*Ocimum Basilicum* L.) Leaves.” *Food Chemistry* 123(4):1235–41.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85–87.
- Orhan, IE, Şenol, FS, Haznedaroğlu, MZ, Koyu, H., Erdem, SA, Yılmaz, G., ... & Toker, G. (2017). Otuz bir tıbbi bitki özütünün mikrotiter enzim analizleri kullanılarak nörobiyolojik değerlendirilmesi. *Klinik Bitki Bilimi* , 2 , 1-12.
- Orhan, I.E., Şenol, F.S., Haznedaroglu M.Z., Koyu, H., Aslan Erdem, S., Yılmaz, G., Çiçek, M., Yaprak, A.E., Arı, E., Küçükboyacı, N. and Toker, G. 2015. In vitro neurobiological evaluation of randomly selected fourteen medicinal and edible plants using high throughput screening assays. The Second Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, pp:508, 22-25 April, Antalya, Turkey.
- Özüdoğru, B. 2015. *Ricotia* L. (Brassicaceae) cinsinin filogeni ve filocoğrafyası. D Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 224 s.
- Pacôme Obouayeba, Abba; Diarrassouba, Moussa; Francis Soumahin, Eric; Kouakou, Hilaire. 2015. "Phytochemical Analysis, Purification and Identification of Hibiscus Anthocyanins.” *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* 3(2):156–168.
- Petroni, K., & Tonelli, C. (2011). Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant science*, 181(3), 219-229.
- Phippen, W. B., and James E. Simon. 2000. "Anthocyanin Inheritance and Instability in Purple Basil (*Ocimum Basilicum* L.).” *Journal of Heredity* 91(4):289–96. doi:10.1093/JHERED/91.4.289.
- Plessis, H. J. D., Nikolova, R. V., Egan, B. A., & Kleynhans, R. (2021). Preliminary study on in vitro shoot culture of *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii*, an indigenous South African flowering plant. *Ornamental Horticulture*, 27(03), 408-416.

- Ram, Mohan, K. V. Prasad, Charanjit Kaur, S. K. Singh, Ajay Arora, and Surendra Kumar. 2011. "Induction of Anthocyanin Pigments in Callus Cultures of Rosa Hybrida L. in Response to Sucrose and Ammonical Nitrogen Levels." *Plant Cell*,
- Razavizadeh, Roya, Fatemeh Adabavazeh, Marzieh Rezaee Chermahini, and Setsuko Komatsu. 2023. "Callus Induction and Plant Regeneration from Carum Copticum and Assessment of Antioxidant Responses and Phytochemical Profiling by In Vitro Salinity Stress." *Horticulturae* 9(1). doi:10.3390/horticulturae9010022.
- Salmerón-Ruiz, de Sonora México, Universidad, J. Abraham, J. Fernando, and Sonia Guadalupe. 2019. "Optimization of Total Anthocyanin Content and Antioxidant Activity of a Hibiscus Sabdariffa Infusion Using Response Surface Methodology." 21(2):114–22.
- Simon, JE, Morales, MR, Phippen, WB, Vieira, RF, & Hao, Z. (1999). Fesleğen: Aroma bileşiklerinin bir kaynağı ve popüler bir mutfak ve süs otu. *Yeni ürünler ve yeni kullanımlar üzerine bakış açıları* , 16 , 499-505.
- Skrypnik, L., Novikova, A., & Tokupova, E. (2019). Improvement of phenolic compounds, essential oil content and antioxidant properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) depending on type and concentration of selenium application. *Plants*, 8(11), 458.
- Sudhakaran, S., & Sivasankari, V. (2003). A protocol for in vitro plant regeneration in *Ocimum basilicum* L.: a medicinal herb.
- Sylvere Sie, R., Charles, G., Sakhanokho, H. F., Toueix, Y., Djè, Y., Sangaré, A., & Branchard, M. (2010). Protocols for Callus and Somatic Embryo Initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): Influence of Explant Type, Sugar, and Plant Growth Regulators. *Australian Journal of Crop Science*, 4(2), 98-106.
- Szymanowska, U., Złotek, U., Karaś, M., & Baraniak, B. (2015). Anti-inflammatory and antioxidative activity of anthocyanins from purple basil leaves induced by selected abiotic elicitors. *Food Chemistry*, 172, 71-77.
- Szymanowska, Urszula, Urszula Złotek, Monika Karaś, and Barbara Baraniak. 2015. "Anti-Inflammatory and Antioxidative Activity of Anthocyanins from Purple Basil Leaves Induced by Selected Abiotic Elicitors." *Food Chemistry* 172:71–77.
- Telci, I., Bayram, E., Yılmaz, G., & Avcı, B. (2006). Variability in essential oil composition of Turkish basils (*O. basilicum*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(6), 489-497.
- Telci, İ. (2005). (*O. basilicum*) genotiplerinde uygun biçim yüksekliklerinin belirlenmesi. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University (JAFAG)*, 2005(2), 77-83.
- Telci, İ., Elmastaş, M., Demirtaş, İ., Kaçar, O., Aytaç, Z., Yılmaz, E. (2015). Türkiye’de Kültürü Yapılan Reyhanlarda (*O. basilicum*) Flavonoid ve Fenolik Asit Kompozisyonlarının Araştırılarak Farklı Kemotiplerin Belirlenmesi, Önemli

- Bileşiklerin Ekolojilere Göre Değişimi ve Antioksidan Potansiyallerinin Karşılaştırılması, 1110677 No'lu [TÜBİTAK] Projesi.
- Termignoni, R. R., Wang, P. J., & Hu, C. Y. (1996). Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunni*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45, 129-132.
- Tsai, Pi Jen, John McIntosh, Philip Pearce, Blake Camden, and Brian R. Jordan. 2002. "Anthocyanin and Antioxidant Capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Extract." *Food Research International* 35(4):351–56. doi:10.1016/S0963-9969(01)00129-6.
- Turker, A. U., & Camper, N. D. (2002). Biological activity of common mullein, a medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2–3), 117–125. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00164-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00164-1)
- Wang, M. L., Morris, B., Tonniss, B., Davis, J., & Pederson, G. A. (2012). Assessment of oil content and fatty acid composition variability in two economically important *Hibiscus* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(26), 6620-6626.
- Aras, Ö. (2006). Üzüm Ve Üzüm Ürünlerinin Toplam Karbonhidrat, Protein, Mineral Madde ve Fenolik Bileşik İçeriklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2006.
- Wongsen, W., Bodhipadma, K., Noichinda, S., & Leung, D. W. M. (2015). Influence of different 2, 4-D concentrations on antioxidant contents and activities in sweet basil leaf-derived callus during proliferation. *International Food Research Journal*, 22(2).
- Xu, Xing Yue, Han Sol Choi, Sang Yong Park, Jin Kyu Kim, Kwang Hoon Seo, Hoon Kim, and Yeon Ju Kim. 2022. "Hibiscus Syriacus L. Cultivated in Callus Culture Exerts Cytotoxicity in Colorectal Cancer via Notch Signaling-Mediated Cholesterol Biosynthesis Suppression." *Phytomedicine* 95. doi:10.1016/j.phymed.2021.153870.
- Zaman, G., Farooq, U., Bajwa, M. N., Jan, H., Shah, M., Ahmad, R., ... & Abbasi, B. H. (2022). Effects of yeast extract on the production of phenylpropanoid metabolites in callus culture of purple basil (*Ocimum Basilicum* L. var *purpurascens*) and their in-vitro evaluation for antioxidant potential. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(3), 543-553.
- Zhao, M., Wang, P., Zhu, Y., Liu, X., Hu, X., & Chen, F. (2015). The chemoprotection of a blueberry anthocyanin extract against the acrylamide-induced oxidative stress in mitochondria: unequivocal evidence in mice liver. *Food & function*, 6(9), 3006-3012.

ÖZGEÇMİŞ

GÜLSÜN TAVALI

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2022-2025	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2003-2007	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

MESLEKİ GÖREVLER

Üretim Müdürü	Kırcami Fide
2011-2024	Aksu, Antalya
Üretim Mühendisi	Balabanlar Tarım
2008-2010	Serik, Antalya