



T.C.

**BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**ENDEMİK *Salvia cerino-pruinosa* Rech var.
elazigensis BİTKİSİNİN KALLUS
KÜLTÜRLERİNİN OPTİMİZASYONU VE
ETANOL EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Züleyha TOPTAMUR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Haziran-2022
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Züleyha TOPTAMUR tarafından hazırlanan “Endemik *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* Bitkisinin Kallus Kùltürlerinin Optimizasyonu ve Etanol Ekstrelerinin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 01/07/2022 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından oy birliğı / oy çokluğu ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.



Bu tez çalışması Batman Üniversitesi tarafından BTÜBAP-2022-YL-06 no’lu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Züleyha TOPTAMUR

Tarih:01/07/2022

ÖZET**YÜKSEK LİSANS TEZİ****ENDEMİK *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* BİTKİSİNİN KALLUS KÜLTÜRLERİNİN OPTİMİZASYONU VE ETANOL EKSTRELERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ****Züleyha TOPTAMUR****Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Prof. Dr. Engin TİLKAT****2022, 70 Sayfa****Jüri****Prof. Dr. Engin TİLKAT****Prof. Dr. Tarık ARAL****Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER**

Bu tez kapsamında, tıbbi ve aromatik öneme sahip değerli sekonder metabolitler içeren *Salvia* cinsine ait endemik bir tür olan *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* bitkisinin kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu için etkili bir protokol geliştirilmiştir; ayrıca kallus kültürlerinin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır.

Bu bağlamda öncelikle kallus kültürlerinin oluşumuna, her biri 1 mg/l olan oksin (IAA, IBA ve 2,4 D) ve sitokinin (BAP, Kin ve TDZ) BBD kombinasyonunun etkisi test edilmiştir. Kallus gelişiminin optimizasyonu için ise, her biri 1/1 kuvvette hazırlanan farklı besi yeri (MS, WPM, SH, Gamborg B5), farklı şeker tipi (glukoz ve sukroz) ve konsantrasyonları (15, 30 ve 45 mg/l), farklı pH (4.5, 5.8, ve 7) ve farklı ışık yoğunluğu (aydınlık ve karanlık) uygulamaları denenmiştir. 1 mg/l TDZ+ IBA içeren MS besi ortamında %100 yeşil ve dağılgan tekstürde kallus dokularının oluştuğu görülmüştür. Ayrıca aydınlık, 15g sükroz, 1 mg/l TDZ + 1 mg/l IBA içeren, 6.2 g agar destekli, ½ kuvvette hazırlanmış ve pH 7'ye ayarlanmış MS besi ortamında ise optimum kallus gelişimi elde edilmiştir. Kallus dokularına ait etanol ekstresinin ise, yüksek oranda toplam fenolik (52.65 ± 1.87 µg PEs/mg) ve toplam flavonoid içeriğe (16.19 ± 0.81 µg QEs/mg) sahip olduğu, antioksidan, bütirilkolinesteraz (BChE), antitirozinaz, antikollajenaz ve antihipertansif aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Ayrıca, kallus dokularının oleanonik (1172,745 ppm), oleanolik (878,191 ppm) ve moronik asit (519,113 ppm) triterpen çeşitlerini içerdiği ancak alfa amirin, betulinik, ursolik ve ursonik asit gibi triterpen çeşitlerini ise içermediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenolik bileşik, kallus kültürleri, *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis*, terpenler

ABSTRACT

MSC THESIS

OPTIMIZATION OF CALLUS CULTURES OF ENDEMIC PLANT *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* AND DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ETHANOL EXTRACTS

Züleyha TOPTAMUR

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Engin TILKAT

2022, 70 Pages

Jury

Prof. Dr. Engin TILKAT

Prof. Dr. Tarık ARAL

Assoc. Prof. Dr. Veysel SÜZERER

Within the scope of this thesis, a practical protocol was developed for the initiation and optimization of callus cultures of *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis*, an endemic species belonging to the genus *Salvia*, containing valuable secondary metabolites with medicinal and aromatic importance; and the biological activities of callus cultures were investigated.

In this context, the effect of the combination of auxin (IAA, IBA and 2,4 D) and cytokinin (BAP, Kin and TDZ) BBD, each of which is 1 mg/l, on the formation of callus cultures was tested. For the optimization of callus development, different media (MS, WPM, SH, Gamborg B5) prepared at 1/1 strength, different sugar types (glucose and sucrose) and concentrations (15, 30 and 45 mg/l), different pH (4.5, 5.8, and 7) and different light intensity (light and dark) applications were tried. It was observed that 100% green and friable texture callus tissues were formed in MS broth containing 1 mg/l TDZ+ IBA. In addition, optimum callus development was obtained in an MS medium containing 15 g sucrose, 1 mg/l TDZ + 1 mg/l IBA, supplemented with 6.2 g agar, prepared at ½ strength and adjusted to pH 7. It was determined that the ethanol extract of callus tissues had high total phenolic (52.65 ± 1.87 µg PEs/mg), total flavonoid content (16.19 ± 0.81 µg QEs/mg) and exhibited antioxidant, butyrylcholinesterase (BChE), antityrosinase, anti-collagenase and antihypertensive activities. In addition, it was determined that callus tissues contain oleanonic (1172,745 ppm), oleanolic (878,191 ppm), and moronic acid (519,113 ppm) triterpene varieties, but they do not contain triterpenes such as alpha amirine, betulinic, ursolic and ursonic acid.

Keywords: Phenolic compound, callus cultures, *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis*, terpenes

ÖNSÖZ

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanlarını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Engin TİLKAT ve Prof. Dr. Emine AYAZ TİLKAT'a teşekkürü bir borç bilirim. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki destek ve katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER'e, materyalin temini ve teşhisi aşamasında yardım ve katkılarından dolayı sayın Arş. Gör. Dr. Mehmet FIRAT'a, tez çalışmamın deneysel aşamalarında değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan sevgili arkadaşım Ayşe HOŞER'e içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamı hazırlarken bana her zaman destek olan bana güç veren sevgili eşim İlyas TOPTAMUR'a ve sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Züleyha TOPTAMUR
BATMAN-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. <i>Salvia cerino-pruinosa</i> Rech var. <i>elazigensis</i> Türü Hakkında Genel Bilgiler	4
211. Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası.....	4
222. <i>Salvia</i> L. cinsi	4
223. <i>S. cerino-pruinosa</i> Rech var. <i>elazigensis</i> türü	5
2.2. Doku Kültürü Uygulamaları ve Önemi.....	6
221. Kallus kültürleri	7
222. Kallus kültürlerinin sekonder metabolit sentezindeki rolü	8
2.2.4. Sekonder metabolitler ve biyoaktiviteleri.....	9
2.3. <i>Salvia</i> Türleri Üzerine Yapılan Kallus Kültürü ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal.....	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1 Doku kültürü uygulamaları çalışmaları	23
322. Biyolojik aktivite çalışmaları.....	29
323. İstatistiksel Analiz	34
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Kallus Kültürlerinin Başlatılması Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma.....	35
4.2. Kallus Kültürlerinin Optimizasyonu Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma	38
421. Farklı besi ortam tipinin kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma	38
422. Farklı MS besi ortam tipi kuvvetlerinin kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma	40
423. Farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonlarının kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma.....	41
424. Farklı ışık yoğunluklarının kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma.....	43
425. Farklı pH uygulamalarının kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma.....	45
426. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonu	46
4.3. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma	47
431. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini ile antioksidan aktivite çalışmalarına ait bulgular ve tartışma	47

432	Enzim inhibisyonu aktivite çalışmalarına ait bulgular ve tartışma	49
433	Terpenoid bileşiklerin analizine ait bulgular ve tartışma	53
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	55
5.1	Sonuçlar	55
5.2	Öneriler	56
KAYNAKLAR		57
ÖZGEÇMİŞ		69



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler ve Kısaltmalar

°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
g/l	: Gram/litre
Lux	: Lüks
m ² s ⁻¹	: metre ² /saniye
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/litre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
s	: Saat
sn	: Saniye
U	: Enzim ünitesi
UV	: Ultraviyole
µM	: Mikromolar
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksi asetik asit
2iP	: 2-izopentiladenin
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
ACE	: Anjiyotensin-dönüştürücü enzim
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AcI	: Asetiltiyokolin iyodür
AH	: Alzheimer Hastalığı
B5	: Gamborg (1968)
BAP	: Benzil amino pürin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi
IAA	: Indol asetik asit
IBA	: İndol bütirik asit
Kin	: Kinetin
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometresi
MS	: Murashige ve Skoog
NAA	: Naftalen asetik asit
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit
TDZ	: Thidiazuron

1. GİRİŞ

Antik çağlardan beri, yaygın veya nadir birçok bitki türü, alternatif tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Efferth, 2019). Tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanılmasının ilk bilimsel izleri ve yazılı delilleri olarak, M.Ö. 5.000–3.000 yılları arasında, Sümerler tarafından kil tabletler üzerine yazılan mevcut en eski kayıtlarda yerini almıştır. Bitkilerin yaklaşık 60.000 yıl öncesinde ise, tıbbi amaçlı olarak kültüre alındığını gösteren kanıtlar mevcuttur. O zamanlardan günümüze değin, tıbbi ve aromatik bitkiler hakkında birikmiş bilgiler nesilden nesile aktarılmış ve neredeyse her medeniyet ve kültüre özgü ilaçların elde edilebilmesi için yüzyıllarca bu bitkilerden faydalanılmıştır (Inoue ve ark., 2018). Özellikle 20. yy’ın başlarında sentetik ilaç hammadde sektöründeki hızlı artış ile birlikte doğal kaynaklı tıbbi bitkilere olan ilgi azalsa da, 20. yy’ın sonlarına doğru, yeniden önem kazanarak “Fitoterapi; phytos=bitki, therapy=tedavi” teriminden ilk kez 1870- 1953 yılları arasında *La Presce Medical* adlı dergide bahsedilmiştir (Vardar ve ark., 2018).

Uluslararası Doğayı Koruma Birliği'ne göre, dünya çapında tıbbi amaçlı olarak kullanılan 50.000 ila 80.000 çiçekli bitki türü bulunmaktadır (Jamshidi-Kia ve ark., 2018). Bu bitkilerdeki fonksiyonel fitokimyasallar, genellikle bitki sekonder metabolitlerinin (BSM'ler) varlığı ile açıklanmaktadır. Günümüze kadar 4000'den fazla fitokimyasal tanımlanmış ve yaklaşık yarısı kadar fitokimyasal ayrıntılı olarak incelenmiştir (Twaij ve Hasan, 2022). Potansiyel sağlık yararları olan sekonder metabolitlerin artan klinik bulguları nedeniyle, tüketimleri yıllık olarak %5-10 oranında istikrarlı bir büyüme kaydetmektedir. İnsanlığa fayda sağlayan yeni ilaçlar üretmek için muazzam bir potansiyele sahip olduklarından, bitkilerde bulunan yeni biyoaktif kimyasallara yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bitkiler, benzersiz savunma mekanizmalarına katkıda bulunmak için şaşırtıcı derecede çok çeşitli fitokimyasalları sentezleyebilir ki çoğu da bir dizi karmaşık biyokimyasal tepkimeler sonucunda türetilmiştir. Bunlara örnek olarak alkaloidler (organik nitrojen içeren bir kimyasal bileşikler sınıfı), flavonoidler (15 karbonlu polifenolik bileşikler), polifenoller (bileşikler fenol halkaları içerenler), antosiyaninler, glukosinolatlar, siyanojenik glikozitler (bir şekerin karbonhidrat olmayan bir kısma bağlandığı bir molekül), terpenler (5 karbon atomlu izopren bileşikleri içerir), kumarinler, tanenler (protein, amino asit ve alkaloidler de dâhil olmak üzere çeşitli diğer organik bileşikler bağlayan ve çökelten bir polifenolik

bileşik), saponinler (glikosillenmiş steroidler, triterpenoidler ve steroid alkaloidler olan bileşikleri içerir), steroidler, lignanlar ve uçucu yağlar verilebilir (Sharangi, 2017)

Bitki doku kültürü teknikleri, değerli sekonder metabolitlerin üretimi için bir alternatif kaynak sağlamakla birlikte sekonder metabolit biyosentezinin aydınlatılması için de bir araç olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Farjaminezhad ve ark., 2013). İlgili metabolitleri sentezlemek için sürgün, kök, kallus, hücre süspansiyonu ve saçak kök kültürleri kullanılmaktadır. Birden fazla dokuda lokalize olan metabolitler, genellikle kallus veya süspansiyon kültürleri yoluyla sentezlenebilir (Thirumurugan ve ark., 2018). Kallus dokuları, *in vitro* veya bir tüp içinde sürekli bölünen hücrelerden oluşan amorf (şekilsiz veya farklılaşmamış) hücrelerdir. Bölünme yeteneğini yitirmemiş organ veya doku parçalarının (eksplant) *in vitro* koşullarda kültüre alınması sonucu oluşan organize olmamış hücre yığınları kallus kültürlerini oluşturur. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda kallus ve hücre süspansiyon kültürleri yoluyla birçok değerli biyokimyasal bileşik elde edilmiştir (Çalışkan ve ark., 2019).

Ilıman iklim kuşağında yer alan Türkiye, coğrafi konumu, iklim çeşitliliği, tarımsal potansiyeli ve geniş yüzölçümü nedeniyle birbirinden farklı flora bölgelerine sahip olup, bu bölgelere ait çok sayıda özel bitki yayılış göstermektedir. Bunlardan bazıları endemik, bazılarının da yayılış alanı ülke sınırları dışına taşan bitkilerdir (Avcı, 2005). Adaçayı (*Salvia*), Lamiaceae familyasına mensup kozmopolit değerli bir tıbbi ve aromatik bitkidir. Türkiye'de Lamiaceae familyasına ait 45 cins ve 586 tür bulunmaktadır. Bu türlerden 239 takson endemiktir. Lamiaceae familyası Türkiye'nin 3. büyük endemik takson bulunduran familyasıdır (Sefalı ve Gıdık 2018). Ballıbabagiller olarak da bilinen Lamiaceae familyası, genellikle tıpta ve parfümeride yaygın kullanım alanı bulan uçucu yağlar bakımından zengin olan *Salvia*, *Rosmarinus*, *Mentha*, *Origanum*, *Thymus*, *Lavandula* ve *Melissa* vb. cinslerine ait türleri kapsamı bakımından önemli bir familyadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler içerdikleri biyoaktif maddeler nedeniyle kültürü yapılan bitkilerdir. Sadece tedavi amaçlı değil aynı zamanda baharat, gıda, içecek olarak, parfümeri, kozmetik, insektisit amaçlı kullanılmaktadır. Ülkemizde kesin olarak bilinmemekle birlikte bu amaçla 1000-2000 arasında bitki türü kullanıldığı tahmin edilmektedir (İpek ve Gürbüz, 2010). Uçucu yağlar, terpenoid bileşikler ve fenolik türevler gibi çeşitli kimyasal gruplara ait alışılmadık derecede fazla sayıda faydalı sekonder metabolit, dünya çapında birçok ülkede belirgin bir şekilde bu cinsten izole edilmiştir. Halk arasında "adaçayı" olarak da bilinen *Salvia* türleri antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiseptik, analjezik (ağrı kesici), antispazmodik, karminatif,

antidiyabetik gibi tıbbi özelliklerinden dolayı eski devirlerden beri halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Uçucu yağları nedeniyle antiseptik ve spazmolitik etkileri olan değerli bir tıbbi ve aromatik bitki olarak birçok ülkede yetiştirilmektedir. *S. officinalis*'in toprak üstü kısımları diyabet, kanser, ateş basması, obezite, ishal gibi birçok hastalığın tedavisinde, kolesterol seviyesinin düzenlenmesinde ve hafızanın geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Hamidpour ve ark., 2013; Abdelkader ve ark., 2014). Antiseptik ve spazmolitik etkileri, esas olarak uçucu yağlardan kaynaklanmaktadır (Mossi ve ark., 2011; Traykova ve ark., 2019). Flavonoidlere *Salvia* türlerinde sık bir şekilde rastlanmaktadır. *Salvia* türlerinin en önemli etken maddelerini uçucu yağlar, terpenoitler ve polifenoller oluşturmaktadır. Uçucu yağ bileşenlerini oluşturan en önemli bileşenlerin α ve β -tuyon, 1,8-sineol ve kafur olduğu ifade edilmiştir (Karakuş ve ark., 2014). Hoş kokulu uçucu yağları nedeniyle kozmetik sanayiinde de geniş kullanım alanı bulmakta ve ayrıca uçucu yağlarının antioksidan etkisi sayesinde gıdaların raf ömrünü uzatmaktadır (Uyanık, 2020).

Uluslararası Doğayı Koruma Birliği'ne göre, Dünya çapında tıbbi öneme sahip yaklaşık 15.000 tür, yüksek hasat ve habitat tahribatı nedeniyle yok olma riskiyle karşı karşıyadır ve artan insan popülasyonu ve aşırı bitki tüketimi nedeniyle doğal yaşam kaynaklarının %20'si azalmaktadır (Jamshidi-Kia ve ark., 2018). *Salvia* türleri doğal yaşam alanlarından artan sayıda hızla yok edildiğinden bu tez çalışmasında bölgemizin bir değeri olan endemik *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün ilk kez kallus kültürlerine yönelik bir optimizasyon protokolünün çıkarılması ve biyolojik yönden aktivitelerinin detaylı bir şekilde ortaya konmasının yanı sıra (antioksidan, antikolinesteraz, antihipertansif, antitirozinaz, antiüreaz, antikollajenaz ve antielastaz aktivite) bazı terpenoid bileşiklerinin de incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* Türü Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası

Hermafrodit bazen ginodioik, aromatik eterik yağ üreten kısa saplı glandular tüysü otsu bitkiler, çalılar ya da nadiren ağaçlardan oluşur. Gövdeler en azından gençken genellikle 4 köşelidir (enine kesitte kare). Yapraklar basit (nadiren pinnat), stipulsuz, karşılıklı, bazen dairesel (nadiren sarmal) dizilişlidir. Çiçeklenme durumu bir vertisilasterde lateral simoz, tirs (dallanmış çok çiçekli panikula) ya da tek çiçekli, aksillar çiçeklidir. Çiçekler iki eşeyli (nadiren tek eşeyli), çoğunlukla zigomorf, brakte ve brakteollü, hipogindir. Periant iki sıralı ve diklamid; korolla genellikle bilabiat, bazen aktinomorf ve hipantiumu yoktur. Kaliks sinsepal, 5 zigomorf, bazen bilabiat, lobludur. Korolla simpetal, 4 ya da 5 loblu (iki lob birleşirse 4), Stamenler 2. 4 ya da 2 verimli +2 staminodlu, dairesel, epipetaldır (korolla tüpüne bağlı). Anterler, *Salvia* ve ilişkili türlerde anterlerin tekalarını ayıran konnektif çatlağı boyunca açılır (bazı taksonlarda teka kaybolmuş). Ginekeum sinkarp iki karpelli ve 4 gözlü, üst durumlu ovaryumludur. Stilus tek, uçta iki parçalı, terminal ya da ginobazik; ovaryum her bir karpeli ayıran yalancı septumlu 4-loblu; stigmalar genellikle 2 adettir. Plasentalanma bazal; ovüller anatropdan hemitropa kadar değişen şekillerde, unitegmik (tek integümentli), her karpelde 2 her lokusta 1 adettir. Nektaryumlar ovaryum tabanında bir disk ya da yastık şeklindedir. Meyve genellikle, 4 (1-3) kısmi fındıksı meyvelerden oluşan şizokarp, drupa ya da üzüksüdür (İpek, 2018).

2.2.2. *Salvia L. cinsi*

Otsu, yarı çalimsı ya da çalimsı çok yıllık, iki yıllık ya da tek yıllık, çoğunlukla güçlü aromatik bitkilerdir. Gövde dik veya toprak üzerine yatık, salgı tüylü, salgı tüysüz ya da çıplaktır. Yapraklar tam, lirat ya da pennatisektir.

Çiçek durumu çeşitli şekillerde düzenlenmiş simozdur. Vertisillastrumlar (1-)-2-10(-40) çiçekli, sık ya da aralıklıdır. Kaliks çan şeklinde, tüpsü ya da huni şeklinde, 2 dudaklı; üst dudak 3 dişli, tam olarak gelişmemiş ya da hafif girintili; alt dudak 2 dişli, meyvede yer alan kaliks meyve içerisinde az ya da çok genişlemiş, sonra zarımsı hale gelmiştir. Korolla beyaz, sarı, pembe, mavi ya da menekşe renkli, bilabiat; üst dudak düzden falkata kadar; alt dudak orta lobu geniş konkav ve iki küçük yan lobu olmak üzere 3 loblu, tüp düz ya da kıvrık, içe doğru katlanmış ya da şişkin, halkalı ya da değil, pulcuklu ya da değildir. Stamenler 2 adet, kısa bir filamentli ve üst ucunda az çok kısa

veya daha uzamış konnektif taşıyan, verimli tekalı ve alt ucunda ya daha küçük verimli ya da hemen hemen verimli tekalı (A tipi stamen) veya steril (verimsiz) dokuda çeşitli şekillerde (B tipi stamen); stamenler normalde filamentle konnektifin birleştiği yerde eklem ile bağlı, nadiren değil (C tipi stamen); staminodlar (stamenlerin arkadaki çifti) her zaman var ve küçüktürler. Stilus 2 lobludur. Fındıksı meyveler tüysüz, yumurtamsı, üç köşeliden dairemsiye kadar, sıklıkla ıslanınca müsilağ üretir (İçen, 2019).

2.2.3. *S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* türü

Âlem : Plantae

Alt âlem : Tracheobionta

Bölüm : Magnoliophyta

Sınıf : Magnoliopsida

Altsınıf : Asteridae

Takım : Lamiales

Aile : Lamiaceae

Cins : Salvia

Tür : *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis*

Çok yıllık yarı çalimsı bitkiler. Gövde genellikle dik, 25-45 cm, glabrous. Yapraklar basit, elliptik (oblong-elliptik), 2.3-6 x 1.1-2.4 cm, daima bir çift lateral taban loplarına sahip, glabros to glaukos ve sesil glandlara sahip, rugos, yaprak kenarları krenulat to serrat, petiole 2-5 (-6) mm. Çiçek durumu genellikle dallanmaz, glabrous, vertisillat 2-8 (-10) çiçekli, mesafeli. Üstteki brakteler genişçe ovat, daima kaliksdan kısa, 6-15 x 5-16 mm, genellikle yeşil, glabrous, alttaki brakteler yaprak benzeri, brakteol yok. Pedisel (2.5-) 3-7 (-10) mm, glabros. Çanak yapraklar mor'dan yeşil renge doğru, glabrous, meyvedeki kaliks zarımsı, genişçe campanulate, çiçekte 15-20 x 12-20 mm, meyvede genişler ve 19-25 x 18-30 mm. Taç yapraklar menekşe mavisi, 25-35 mm; korolla tüpü 20-25 mm annulat. Stamenler 2, staminal konnektifler filamentten kısa; filament 4.3-8 mm, anterler genellikle uzun villous tüylü, nadiren glabrous, 3.0-3.8 mm, anterler 1.1-1.7 mm; üst teka 3.1-4.6 mm, alt teka 2.7-4.3 mm. Stilus (25-) 27-35 (-40) mm. Tohumlar kahverengi'den siyah renge doğru, roundad trigonous, suboblat, 4.5-5.1 x 3.7-4.4 mm. ve hilum çapı 1.1-1. mm'dir (Doğan ve ark., 2008).

Dağılışı: B7 Elazığ: Elazığ-Pertek

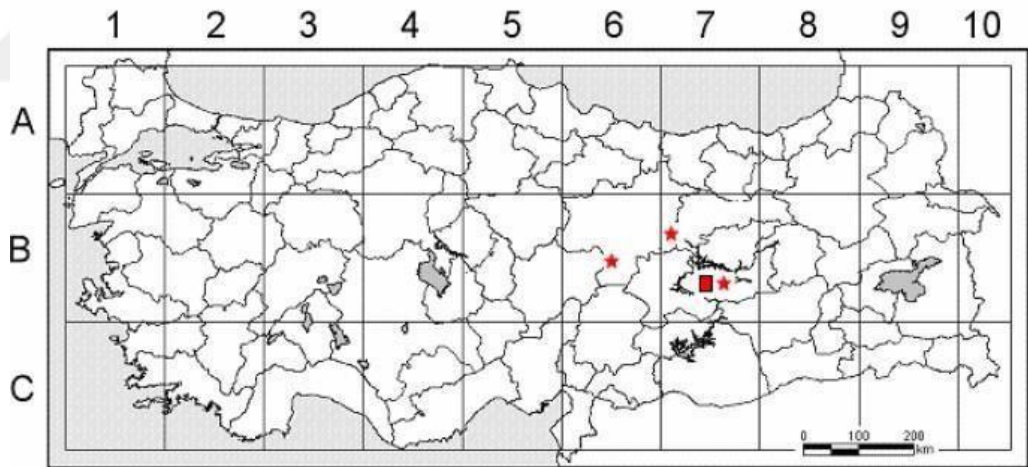
Çiçeklenme ve Habitat: May. Kireç taşlı yamaçlar. 900-1000 m.

Endemik. İran-Turan. Tehlike kategorisi EN

Değerlendirme: *S.cerino-pruinosa* var. *elazigensis*, var. *cerino-pruinosa*'dan yapraklar, brakteler ve çanak yaprakların pilose tüylü olmasından dolayı farklılık gösterir.



Şekil 2.1. *S. cerino-pruinosa* Rech. var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan (Doğan ve ark., 2008)



Şekil 2.2. *S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa* (★), var. *elazigensis* (■) dağılım haritası (Doğan ve ark., 2008)

2.2. Doku Kültürü Uygulamaları ve Önemi

Biyoteknoloji, canlı organizmaları farklı tekniklerle manipüle etmemize izin veren bir multidisiplindir (Limer ve ark., 2017). Bitki doku kültürü, temel bilim ve ticari uygulamada önemli bir tekniği temsil eder. Son yıllarda, biyoteknoloji, moleküler ve hücre biyolojide anlamlı gelişmelere ulaşmış, hücre ve mikroorganizmaların fizyolojik ve genetik yönleri üzerine *in vitro* kültürde yapılan çalışmalarda derinleşmeye izin veren teknikler geliştirmiştir (Currin ve ark., 2021; Garibaldi ve ark., 2021; Sunter ve ark.,

2021). Bu teknikler, seçkin çeşitlerin apikal veya nodal tomurcuklar tarafından klonal çoğaltılması; doğrudan organogenez ve somatik embriyogenez; meristem kültürü ile hastalıksız bitki üretimi; nesli tükenmekte olan bitkilerin uzun süreli korunması; dolaylı organogenez yoluyla somaklonal varyasyonun uyarılması; anter veya mikrospor kültürleri ile haploid ve diploidlerin elde edilmesi; kallus veya hücre süspansiyon kültürleri yoluyla sekonder metabolitlerin biyosentezi; ve protoplast füzyonu ile somatik melezlerin elde edilmesi gibi geniş bir pratik uygulama yelpazesi sunar (Anis ve Ahmad, 2016). Günümüzde doku kültürlerinin gıda olarak kullanılan veya tıbbi öneme sahip türlerde kullanıldığına dair çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (Gulzar ve ark., 2020).

2.2.1. Kallus kültürleri

Karasal bitkilerin tüm büyük ailelerinde, yaralı doku, farklılaşmamış kallus hücreleri tarafından kurtarılır. Bu kallus hücreleri, biyoteknolojik uygulamalar için *in vitro* olarak kültürlenebilir. Bitkinin hemen hemen her parçası kallus kültürü oluşturmak için kullanılabilir. Bitki dokularından alınan eksplantlar, *in vitro* olarak amorf ve renksizden soluk kahverengiye kadar değişen renklerde bir hücre kütesine dönüşürler (Efferth, 2019). Büyümeyi teşvik eden iki hormon olan oksin ve sitokinin kombinasyonunun *in vitro* olarak bitki eksplantlarından kallus oluşturduğunun tarihi keşfinden bu yana, bu sistem hem temel araştırmalarda hem de bahçecilik uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kallus kültürleri yoluyla, çok az miktarda kallus materyalinin yüksek miktarlarda üretilebilmesi mümkündür. Aynı zamanda kallus kültürleri mevsimlik kısıtlamalar nedeniyle üretilemeyen, istenilen ürünlerin yıl boyunca üretimine de imkân sağlar.

Kallus kültürleri, bir *in vitro* kültür başlatmak için en önemli adımdır ve yeterli büyümeleri için optimum besin kaynağı gerektirir. Bununla birlikte, yavaş büyüme hızı ve yüksek biyokimyasal değişkenlik, bitki doku kültüründe kullanımını engellemektedir. Bu nedenle ortam optimizasyonu, farklı ortam bileşenlerinin dokunun büyüme hızı üzerindeki etkisini değerlendirmek için önemli bir parametredir. Büyüme indeksi, taze ağırlık ve kuru ağırlık gibi parametreler, kallus kültürlerinin büyümesini belirlemek için sıklıkla kullanılır (Bhatia, 2015). Dağılgan ve yeşil renkli kallus oluşumu, bitki biyoaktif bileşik çalışmaları için homojen bir hücre süspansiyon kültürlerini başlatmak ve oluşturmak için esastır. İstenen morfojenik tepki ile optimum kallus indüksiyonunu elde etmek için çeşitli kallus indüksiyon faktörleri uygulanabilir. Bazal kültür ortamı türleri, bitki büyüme düzenleyicileri, sakkaroz bileşimleri, kültür ortamının pH'ı ve sıcaklık gibi

çevresel faktörlerdeki farklılıklar, indüklenen kallusun indüksiyon potansiyelini ve morfolojisini etkileyebilecek faktörler arasındadır (Osman ve ark., 2016).

2.2.2. Kallus kültürlerinin sekonder metabolit sentezindeki rolü

İlaç, kozmetik, gıda ve ilgili endüstrilerde ikincil metabolitlerin sürdürülebilir ve büyük ölçekli üretimi için kallus kültürleri kullanılabilir. Tıbbi bitkilerden elde edilen kallus kültürleri, çok çeşitli hastalıkları (örn. kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, bulaşıcı hastalıklar, vb.) tedavi etmek için kullanılabilen biyoaktif fitokimyasallar üretir; ayrıca üretilen kimyasal maddelerin belirli kimyasal sınıflarla sınırlı olmadığı, geniş bir kimyasal çeşide sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kallus kültürleri yoluyla bitkilerden üretilen fitokimyasallar (Efferth, 2019)

Tür	Üretilen Fitokimyasal	Kaynak
<i>Abrus pectorius</i>	Glisirizin	Karwasara ve ark., 2010
<i>Ammi majus</i>	Furokumarin	Staniszewska ve ark., 2003
<i>Arachis hypogaea</i>	Resveratrol	Nandagopal ve ark., 2018
<i>Aralia elata</i>	Aralin	Tomatsu ve ark., 2004
<i>Arnebia euchroma</i>	Şikonin	Hao ve ark., 2014
<i>Brugmansia candida</i>	Hiyosiyamin	Spollansky ve ark., 2000
<i>Brugmansia suaveolens</i>	Tropan Alkaloidler	Alves ve ark., 2007
<i>Calendula officinalis</i>	Oleanolik Asit	Wiktorowska ve ark., 2010
<i>Camptotheca acuminata</i>	Kamptotesin	Pi ve ark., 2010
<i>Carthamus tinctorius</i>	A-Tokoferol	Chavan ve ark., 2011
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	Kuersetin	Purwianingsih ve ark., 2016
<i>Datura stramonium</i>	Tropan Alkaloidler	Kurosaki ve ark., 2001
<i>Drosera burmanii</i>	Plumbagin	Putalun ve ark., 2010
<i>Ephedra (E.) sp.</i>	1-Efedrin	O'Dowd ve ark., 1993
<i>Eschscholtzia California</i>	Sanguinarin	Thoma ve ark., 2003
<i>Ginkgo biloba L.</i>	Ginkgolid B ve Ginsenosid	Hu ve ark., 2003
<i>Glycine max</i>	Apigenin, Daidzein, Genistein	Modolo ve ark., 2002
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Soyasaponin	Hayashi ve ark., 2003
<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperisin ve Hiperforin	Walker ve ark., 2002
<i>Hypericum perforatum L.</i>	Hiperisin	Murthy ve ark., 2014
<i>Linum flavum</i>	Podofillotoksin	Nandagopal ve ark., 2018
<i>Linum narbonense</i>	Justisidin B	Ionkova ve ark., 2013
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Şikonin ve Rosmarinik Asit	Yazaki ve ark., 2002
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Skopoletin	Thoma ve ark., 2003
<i>Ocimum basilicum</i>	Rosmarinik Asit	Bais ve ark., 2002
<i>Panax ginseng</i>	Saponinler	Wu ve ark., 2002
<i>Pharbitis nil</i>	Umbelliferon Ve Skopoletin	Yaoya ve ark., 2004
<i>Podophyllum hexandrum</i>	Podofillotoksin	Nandagopal ve ark., 2018
<i>Rhodolia sachalinensi</i>	Salidroside	Zhou ve ark., 2007
<i>Rubia tinctorum</i>	Tropan Alkaloidler	Boldizsár ve ark., 2008
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Rosmarinik Asit, Salvianolik Asit	Wu ve ark., 2016
<i>Saussurea medusa</i>	Flavonoidler	Liu ve ark., 2009
<i>Scopalia parviflora</i>	Skopolamin	Jung ve ark., 2003
<i>Silybium marianum</i>	Silimarin	Sánchez-Sampedro ve ark., 2005
<i>Solidago chilensis</i>	Klorojenik Asit ve Rutin	Schmeda-Hirschmann ve ark., 2005
<i>Taxus baccata</i>	Paklitaksel	Tabata ve ark., 2004
<i>Taxus chinensis</i>	Paklitaksel	Wang ve ark., 2001
<i>Vitis vinifera</i>	Stilben, Resveratrol, Antosiyanin	Nandagopal ve ark., 2018

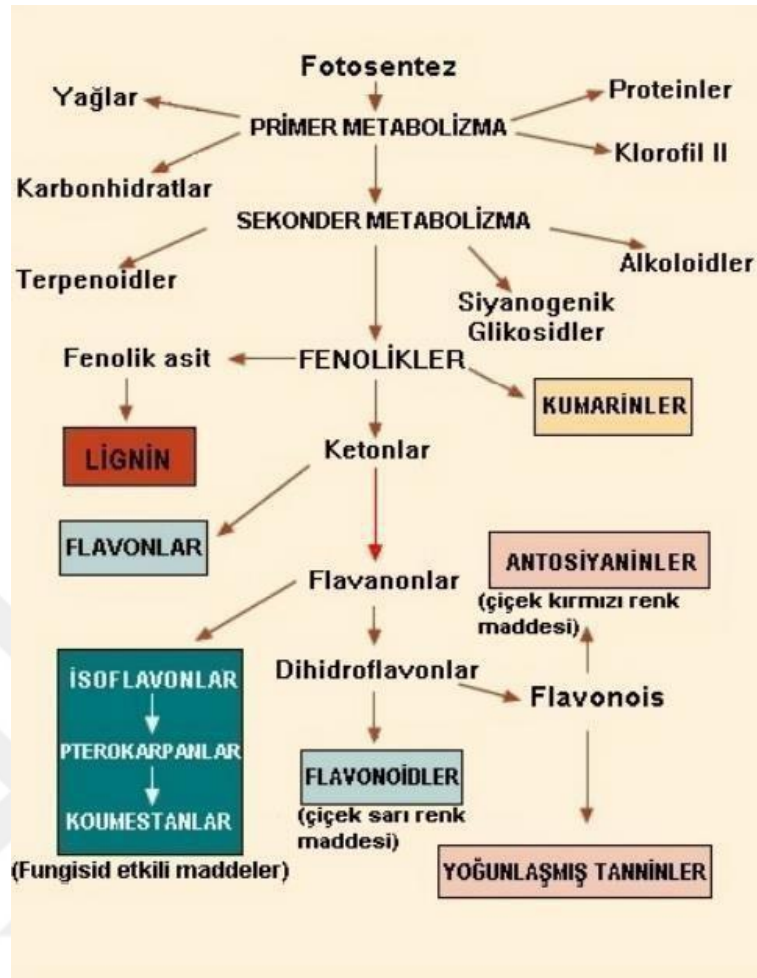
Fitokimyasallar tüm bitkiye gerek kalmadan doğrudan kallustan ekstrakte edilebildiğinden, kallus teknolojisi nadir ve tehlike altındaki türlerin korunmasına da

yardımcı olabilir. Bazı sekonder metabolitler (örneğin antosiyanin) organize olmuş dokulardan daha zor elde edilirken, kallus kültürlerinden kolay elde edilir (Demir, 2018). Kallus kültürlerinin en çok tercih edildiği çalışma alanları arasında ikincil bitki ürünü üretimi gelmektedir. Sekonder metabolit üretiminde kallus kültürü diğer *in vitro* yöntemlere göre daha fazla kullanılmaktadır. Kallus kültürlerinin kullanılması ile elde edilecek hedef bileşiğin miktarı, ortamda kullanılan büyümeyi düzenleyici, uyarıcı veya öncü maddeler katkısı ile düzenlenerek artırılabilir (Yağcı ve ark. 2008; Demir, 2018).

2.2.4. Sekonder metabolitler ve biyoaktiviteleri

Çağlar boyunca insan temel ihtiyaçları, yiyecek, barınak, giyecek, ulaşım, gübre, aroma, koku ve ilaç üretimi için doğaya güvenmiştir. Bitkiler hem geleneksel olarak hem de ilaçların yapımında önemli bir rol oynamaktadır. Geleneksel tıpta kullanılan birçok psikoaktif madde bitki kökenlidir. Geleneksel olarak kullanılan şifalı bitkiler, bilinen çeşitli terapötik özellikler üretir Tıbbi bitki, terapötik amaçla kullanılabilecek bileşikler veya kemofarmasötik sentezin öncülerini içeren herhangi bir bitki olarak tanımlanır. (Sathuluri ve Gokare, 2002). Bitkilerin büyük çoğunluğu büyüme ve gelişmeye doğrudan katılmayan çok çeşitli organik bileşikler üretir. Geleneksel olarak ikincil metabolitler olarak adlandırılan bu maddeler, genellikle bitkiler âleminde sınırlı taksonomik gruplar arasında farklı şekilde dağıtılır. Sekonder metabolitlerin gelişen ticari önemi, son yıllarda özellikle biyoaktif bitki metabolitlerinin üretimini doku kültürü teknolojisi kullanarak değiştirme olasılığına büyük ilgiyle sonuçlanmıştır. Bitki hücre ve doku kültürü teknolojisi, ikincil metabolitlerin hem çoğaltılması hem de ekstraksiyonu için yaprak, gövde, kök ve meristemler gibi eksplantlardan steril koşullar altında rutin olarak kurulabilir (Jain ve ark., 2019). Tıbbi bitkiler, ilaç ve farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan alkaloidler, glikozitler, aminler, böcek öldürücüler, steroidler, flavonoidler ve ilgili metabolitleri içeren çeşitli kimyasallar grubu olan ikincil metabolitler bakımından zengindir (Santosh ve ark., 2011). Günümüze toplamda 33.000 terpenoid, 16.000 alkaloid ve 8.182 flavonoid bildirilmiştir. Temel metabolizmanın ayrılmaz bir parçası olan bu bileşikler ekolojik bir role de sahiptir ve genellikle biyotik veya abiyotik streslere karşı bitki korumasında yer alır (Weisshaar ve Jenkins 1998; Jain ve ark., 2019).

Bitkilerin sekonder metabolitleri genellikle biyosentetik yollarına göre sınıflandırılır ve 3 büyük molekül ailesine ayrılırlar; fenolik bileşikler, terpenler ve azot içeren sekonder metabolitler (alkaloidler, siyanogenik glikozitler vb.).



Şekil 2.1. Sekonder metabolitler (Oskay ve Oskay, 2009)

1. Fenolik Bileşikler: Fenolik bileşikler, bitkiler âleminde en yaygın şekilde dağılmış sekonder metabolitlerdir. Fenolik bileşikler bitkilerde pentoz fosfat, şikimat ve fenilpropanoid yollarının türevleri olan ikincil metabolitlerdir. Çeşitli önemli işlevlerde (büyüme, yapı, savunma, pigmentasyon, lignifikasyonlar vb.) yer almaları nedeniyle bitkilerin fizyolojisi için gereklidirler. Polifenollerin çoğu, önemli yapısal çeşitliliğe sahip çok sayıda kimyasal bileşiğin biyosentezinden sorumlu olan fenil propanoid yolu ile sentezlenir (Kumar ve ark., 2014). Flavonoidler ise, bir grup polifenolik bileşiktir. Fotosentez yapan hücrelerde ve genellikle meyveler, sebzeler, kabuklu yemişler, tohumlar, saplar, çiçekler, çay, şarap, propolis ve balda bulunurlar. Tıbbi özelliklere sahip oldukları ve eski çağlardan beri başarılı tıbbi tedavilerde önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir ve kullanımları bugüne kadar devam etmiştir. Oksidatif hücre hasarını önleyen ve güçlü antikanser aktivitesine sahip, suda çözünen güçlü antioksidanlar ve serbest radikal süpürücülerdir. Antienflamatuar, antispazmodik ve antialerjik,

antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılırlar. Flavonoidler, bitkileri farklı biyotik ve abiyotik streslerden korur ve benzersiz UV filtresi görevi görür, sinyal molekülleri, alelopatik bileşikler, fitoaleksinler, detoksifiye edici maddeler, antimikrobiyal savunma bileşikleri olarak işlev görür.

2. Terpenler: Çoklu izopren birimlerine sahip basit hidrokarbonlardır. Bu arada terpenoidler, farklı fonksiyonel gruplar içeren terpen türevleridir. Terpenoidler tedavi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyal, antikanser, antihiperlipidemik, antihiperglisemik, antienflamatuar, antioksidan, antiparaziter, immünomodülatör ve antikolinesterasik aktiviteler gibi geniş biyolojik aktiviteleri nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılır (Ninkuu, ve ark., 2021). Örneğin, Taxol® (paklitaksel) en çok kullanılan ve klinik olarak iyi bilinen terpen bazlı kemoterapi ilaçlarından biridir (Brahmkshatriya ve Brahmkshatriya 2013). Keza triterpen yapıdaki steroller, bitkilerin biyosentezinin başlangıç maddesidir. Bitki sterolleri, steroid bileşikler, böcek öldürücüler, antioksidan ve antikanser ilaçları için endüstriyel olarak önemli kimyasal kaynaklardır. Yüksek bitkilerde β -sitosterol, β -stigmasterol, lanosterol ve kampesterol'un yumurtalık kanserine ve östrojene bağımlı meme kanserine karşı kanser önleyici aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir (Ju ve ark., 2004; İrtegün Kandemir ve ark., 2022).

3. Azot içeren sekonder metabolitler: Heterosiklik nitrojen bileşikleridir. Türetildiği birincil metabolitler, triptofan, tirozin ve lizin gibi amino asitleri içerir. Biyosentez yolları uzun olabilir ve birçok alkaloid buna uygun olarak karmaşık kimyasal yapılara sahiptir. Alkaloidlerin yılan sokması, ateş ve delilik durumlarında müshil, öksürük kesici ve yatıştırıcı olarak insan tıbbi kullanımında 3000 yıllık bir geçmişi vardır. Bir benzilzokinolin alkaloidi olan papaverinin, *Cryptolepis sanguinolenta*'dan gelen çeşitli virüsler ve indokinolin alkaloidleri üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Literatürler, bitki alkaloidlerinin önemli biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Okunade ve ark., 2007). Sekonder metabolitler olarak alkaloidlerin bitkide otçullara ve patojenlere karşı koruyucu bir rol oynadığı düşünülmektedir. Güçlü biyolojik aktiviteleri nedeniyle, yaklaşık 12000 bilinen alkaloid, farmasötikler, uyarıcılar, narkotikler ve zehirler olarak kullanılmıştır.

Antioksidan Aktivite

Antioksidanların, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir. Tüm organizmalar, serbest radikalleri temizleyen ve stabilize eden savunma

mekanizmaları tarafından serbest radikal saldırısından korunur, ancak serbest radikallerin üretim hızı oksidatif stresi aştığında, lipidler, proteinler ve DNA dahil hücre yapılarına zarar verebilecek zararlı bir süreç oluşur. Mekanizmaları oksidatif stres sürecini içeren hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için birçok antioksidan bazlı ilaç formülasyonu kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabilmelerinden dolayı kısıtlanmasından dolayı, gıdalarda, kozmetiklerde veya ilaç malzemelerinde sentetik olanların yerini alacak doğal olarak oluşan antioksidanların bulunmasına olan ilgi önemli ölçüde artmıştır.

Antiüreaz Aktivite

Üreaz (nikel içeren), daha fazla ayrışma üzerine amonyak ve karbon dioksit üretmek için üreyi hidrolize eden bir enzimdir. Üreaz birçok bitkide, seçilmiş mantarlarda ve çok çeşitli prokaryotlarda bulunur (Amtul ve ark., 2007). Mikrobiyal üreazların işleyişi, hücresel yerleşimlerine, düzenlemelerine, genetik yapılarına ve mikrobiyal üreaz ile iyi karakterize edilmiş ikna edici inhibitör aralığı arasındaki ilişkilere bağlıdır. Üreaz inhibitörleri, özellikle köpeklerde ve kedilerde mide yolu sendromları, idrar yolu enfeksiyonları, struvit ürolitiazis dâhil olmak üzere *Helicobacter pylori* tarafından üreaz salgılanmasının neden olduğu çok sayıda ciddi enfeksiyona karşı etkilidir (Amtul ve ark., 2004; Zahid ve ark., 2015).

Antitirozinaz Aktivite

Melanin, cilt pigmentasyonuna önemli bir katkıda bulunur ve cildi zararlı ultraviyole radyasyona karşı korur. Melanogenez, melanin sentezini, melanozomun taşınmasını ve salınmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Melanin bozunmasının kozmetik açıdan büyük önemi vardır ve melanin sentezine müdahale eden doğal ve kimyasal ajanlar alanında araştırma ve geliştirmeleri teşvik etmiştir (Subramanian ve Sahithya 2016). Tirozinaz, pigmentasyonda rol oynayan bakır içeren bir enzimdir. Bu enzim, l-tirozinin 3,4-Dihidroksi-l-Fenilalanin'e (l-DOPA) hidroksilasyonunu ve l-DOPA'nın DOPA kinon'a oksidasyonunu katalize eder. İkincisi, kırmızı-sarı veya siyah-kahverengi pigmentler olan feomelaninlerin veya eumelaninlerin sentezi için bir substrattır. Bu nedenle, tirozinazın düzenlenmesi, pigmentasyon bozukluklarının tedavisinde ve kozmetik beyazlatma ajanlarının geliştirilmesinde faydalı olmuştur. Tirozinaz inhibitörü, melanogenezin azaltılması için bir hedeftir.

Antikolinesteraz Aktivite

Alzheimer hastalığı genellikle yıllar içinde kötüleşen demans ile karakterizedir ve genellikle geriatrik insanları etkiler. Patolojik özellikleri, kolinerjik nöronların önemli

eksikliğini, β -amiloid ($A\beta$) proteini içeren senil plakların ortaya çıkmasını ve mikrotübül ile ilişkili protein tau'nun nörofibriler yumaklarını içerir (Guo ve ark., 2020). Beyindeki oksidatif stres ve yetersiz kolinerjik işlevsellik hastalığın gelişiminde iki hayati olay olarak kabul edilir (Collin ve Bigley, 2018). Son yıllarda etiyojisi ve patogenezinin algılanmasındaki makul ilerlemeye rağmen, etkili ilaçlar sınırlı kalmaktadır. Asetilkolinin (ACh) tükenmesi ile birlikte azalan kolinerjik aktarımlar demansın oluşumundan ve ilerlemesinden sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle, asetilkolini hidrolize etmekten sorumlu olan kolinesteraz enzimlerini inhibe etmeyi hedeflemek, hastalığın tedavisinde ana strateji olarak gelişmiştir. Donepezil, galantamin ve rivastigmin, şimdiye kadar ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından AD tedavisi için onaylanan tek antikolinesteraz ajanlarıdır. Bu ilaçların hiçbirisi hastalığın gelişimini kısıtlamada veya tersine çevirmede başarılı olmamıştır (Atri, 2019). Ancak son yıllarda, asetil-kolinesteraz inhibitörleri hakkında çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Valerianaceae, Myristicaceae, Amaranthaceae, Rutaceae, Amaryllidaceae, Lycopodiaceae ve Polygonaceae gibi bitki familyaları bu tür inhibitörlerin potansiyel kaynakları olduğundan özellikle bitki bazlı AChE inhibisyonu ve yeni ajanların keşfi tedavi için ilgi odağında tutulmaktadır (Taqui ve ark., 2022).

Antielastaz ve Kollajenaz Aktivite

Cilt yaşlanması karmaşık bir biyolojik süreçtir. Ciltte kuruluk, kırışıklıklar, ince çizgiler, cilt elastikiyetinde azalma, cilt sıkılığı ve yumuşak doku kaybı gibi çeşitli istenmeyen gözle görülür belirtilere neden olur (Yagi ve ark., 2017). Hem içsel hem de dışsal faktörlerin bir sonucu olarak gelişir. İçsel faktörler, genetik, hormonal ve hücresel metabolik faktörleri içerir. Dış faktörler, toksinler, kimyasallar, nikotin, kirleticiler gibi cilde zararlı etkileri olan ajanlara kronik maruziyetin ve özellikle foto yaşlanmaya ve cilt kanserine neden olan UV-B başta olmak üzere güneş ışınlarına maruz kalmanın sonucudur (Ganceviciene ve ark., 2012). Bu faktörler, insan derisinde matris metalloproteinazların (MMP'ler) ekspresyonunda bir artışa yol açabilir. MMP'ler yaşlanan hücrelerin birikmesinden, bağ dokusu bozulmasından ve elastik liflerin bozulmasından sorumludur (Cavinato ve ark., 2017). Kollajenaz ve elastaz, sırasıyla kolajen ağını bozan ve elastin liflerini parçalayan MMP ailesinin üyeleridir. Bunun sonucunda kırışıklık görünümü, cilt elastikiyeti kaybı ve buna bağlı olarak cilt yaşlanması meydana gelir (Banglao ve ark., 2020).

Antihipertansif Aktivite

Sistemik arteriyel hipertansiyon, sistolik kan basıncı için 130 ve 139 mmHg ve/veya diyastolik kan basıncı için 80 mmHg'nin üzerinde kan basıncının sürekli korunması ile karakterize edilir. Hastalığın nedenleri genetik, metabolik, davranışsal faktörlere kadar uzanır ve hatta diğer organlardaki patofizyolojik değişikliklerden kaynaklanabilir (Précoma ve ark., 2019). BP kontrolünde yer alan yollar arasında nitrik oksit (NO), anjiyotensin II ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi önemli bir yer tutar (Förstermann ve ark. 2017). Hastalığın tedavisinde genellikle anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, beta-blokörleri ve kalsiyum kanalı bloke edicileri gibi çeşitli antihipertansif ilaçlar kullanılmakla birlikte yan etkilerinin fazlalığı da rapor edilmiştir (Batıbay, 2020). Ayrıca, mevcut ilaçlar veya bunların kombinasyonları tedavi için etkili olmayabilir ve birçok hasta diğer kardiyovasküler hastalıklara neden olabilecek sessiz bir semptom sunabilir ve ölümle sonuçlanabilir (Pijacka ve ark. 2016, Pike ve ark. 2017). Bitkisel ilaçların kullanımı, biyoaktif moleküllerin tanımlanması ve karakterizasyonu üzerine yapılan araştırmalar son yıllarda artmıştır. Artemetin bakımından zengin bir bitki olan *Achillea millefolium*, resveratrol, hidroksibenzoik asit, kumarik asit ve fenolik bileşikler içeren *Rosmarinus officinalis* ve flavonlar içeren *Cecropia pachystachya* gibi bitkilerin ACE inhibisyonu nedeniyle antihipertansif etki gösterdiğini bildirmiş olup çalışmalar devam etmektedir (Trindade ve ark., 2021).

2.3. *Salvia* Türleri Üzerine Yapılan Kallus Kültürü ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Marconi ve ark. (2013), *S. hispanica* L. (Chia) gövde kısımlarından başlattıkları kallus kültürlerinde, IAA ve NAA'nın, sitokininli/sitokininsiz test edilen tüm konsantrasyonlarda, hem karanlık ortamda hem de ışık varlığında adventif köklerin gelişimine yol açtığını, 2,4-D (2,25 μ M)'nin aydınlık ortamda embriyojenik dokuların gelişimini indüklediği ancak ışığın hızlı büyüyen kallusların başlatılmasını ve muhafazasını teşvik ettiğini bildirmişlerdir. NAA + Kin (0,54 μ M/ 0,46 μ M) veya Pikloram (1,72 μ M, 3,43 μ M) ile destekli MS besi ortamlarında alt kültürlenen kallusların iki yıl boyunca kırılabilirliklerini koruduğunu rapor etmişlerdir.

Mpumelelo (2014) *S. africanalutea*'nın 5 farklı popülasyonuna ait (Brackenfell, Koeberg, Silwerstroomstrand, Yzerfontein ve Stellenbosch) kimyasal içerikleri ve antimikrobiyal aktivitelerine yönelik çalışmada Stellenbosch popülasyonunun diğer dört popülasyonda bulunmayan bazı bileşikler içerdiğini (propanoik asit, ritronik asit, 2-keto-1-glukonik asit ve 1,3-dibromobisiklon), ayrıca diğer dört popülasyonda saptanan ksilitol'ün de bu popülasyonda bulunmadığı belirtilmiştir. Tüm test numunelerinin,

minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri bakımından iyi aktivite sergilediğini ve Stellenbosch popülasyonu nispeten farklı bir kimyasal profilin yanı sıra en iyi aktiviteyi de gösterdiğinden, bu bitkilerden elde edilen yaprakları *in vitro* olarak farklı BBD'lerini içeren MS besi ortamında kültüre aldığını ve sonuç olarak elde ettiği kallus ekstrelerinin antifungal aktivitesinin, *in vivo* koşullardan aldığı yaprak ekstreleri ile aynı aralıkta olduğu rapor edilmiştir.

Qadri ve ark. (2014), *S. santolinifolia* türünde kallus kültürünü başlatmak amacıyla öncelikle NAA (0.5 mg/l) içeren MS besi ortamında kültüre almış akabinde ise, BA (0.5 + 1.5 mg/l) ve NAA destekli MS besi ortamında ise alt kültürlenme yapmışlardır. Elde edilen kallus kültürlerinden yeni bir bileşik olan *Salvialaktomin* ile iki farklı fitokimyasal olan Pentatriakontanoik asit 1, 3-dihidroksipropil ester ve 5-Metilflavon'ı izole etmişlerdir. Hela (Rahim ağzı kanseri hücresi) ve PC-3 (Prostat kanseri hücreleri) üzerinde test ettikleri bileşiklerin standart olarak kullanılan Doksorobisin'den yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Boix ve ark. (2012), *R. officinalis*'in, *in vitro* kültür sonrası elde ettikleri kallusların anatomisini ile kimyasal ve morfolojik özelliklerini değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında 2,4D ve TDZ içeren besi ortamında yaprak eksplantlarından kallus elde etmişlerdir. Kallusların hem kapitat hem de peltat glandüler trikomal taşıdığını, kapitat trikomal ve parankima veya meristematik hücrelerin lipofilik ve terpenoid bileşiklere pozitif reaksiyonlar gösterdiğini, TDZ'ye kıyasla 2,4D ortamından elde edilen kırılgen kallusların monoterpen bileşikleri üretme kapasitesi üzerine olumlu bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Grysczynska ve ark. (2015), *S. miltiorrhiza* ve *S. przewalskii* türlerinin aktif bileşiklerini arttırmanın yanı sıra, kallus kültürlerinde taşınon ve fenolik bileşikleri belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada saçak kök ve kallus kültürlerine ait elisite dokuların taşınon ürettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca ekstrelerin antialkolik aktivitelerini de test ettikleri çalışmalarında her iki *Salvia* türünün de bazı aktif bileşiklerin içeriğinde farklılık gösterdiği, hidroalkolik ekstrelerde, kalluslara kıyasla bazı bileşiklerin içeriğinin arttığını ve sadece *S. przewalskii* kalluslarından elde edilen ekstrelerin alkole bağımlı hayvanlarda alkol alımını önemli ölçüde azalttığı bu durumda *S. przewalskii* kallus ekstrelerindeki taşınonların (özellikle kriptotaşınon) içeriği ile bağıntılı bulunduğu ortaya konmuştur.

Özcan ve Özkan (2015), doğal yaşam alanlarından toplanan 2 adaçayı (*S. fruticosa* ve *S. officinalis*) ekstrelerinin toplam fenolik madde, flavonol miktarları,

antioksidan kapasitesi ve antiradikal aktivite değerlerinin sırasıyla 51.19-118.13 mg Gallik Asit Eşdeğeri (GAE)/gm, 820.71-1000.65 mu g RE/gm, 67.26-138.44 mg AAE ve 725.19-815.56 IC50 = mu g/ml olarak belirlendiği, *S. fruticosa* ekstrelerinin antiradikal aktivite değerlerinin 599.10 mu g/m ile 890.14 mu g/ml arasında değiştiği ve elde edilen sonuçların adaçayının önemli bir doğal antioksidan kaynağı olarak görülebileceğini gösterdiği tespit edilmiştir.

Duletic ve ark. (2016), yaz ve kış mevsiminde toplanan Sırbistan ve Montenegro orjinli *S. officinalis* L. ekstrelerini antioksidan aktivite, fenolik ve flavonoid içerikleri açısından analiz ettikleri çalışmalarında, ekstrelerin fenolik ve flavonoid içeriği ile antioksidan aktivitelerinin çoğunlukla ekstraksiyon çözücüsüne ve hasat mevsimine bağlı olduğu, Sırbistan kökenli bitki ekstrelerinin daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği, genel olarak, yaz mevsiminde toplanan bitkilerin daha yüksek aktivite gösterdiği, test edilen ekstreler arasında etanol ekstrelerinin analiz edilen diğer ekstrele kıyasla daha iyi antioksidan aktiviteler gösterdiği rapor edilmiştir.

Uyanık (2017), Türkiye’de değişik tehlike kategorilerinde bulunan ve klasik yollarla çoğaltımında problemler yaşanan bazı endemik *Salvia* türlerinin (*S. albimaculata*, *S. chrysophylla*, *S. ephratica* var. *euphratica* ve *S. nydeggeri*) doku kültürü yöntemiyle çoğaltım olanaklarını araştırdığı çalışmasında materyal olarak koltukaltı ve sürgün uçlarını eksplant kaynağı olarak kullanmıştır. *S. chrysophylla* türünün rejenerasyon yeteneğinin diğer türlere göre daha iyi olduğunu, *S. chrysophylla* dışındaki türlerde hızlı çoğaltım metodunun başarısız olduğunu dolayısıyla, *S. chrysophylla* dışındaki türlerde köklenme çalışmalarının yapılamadığını, köklenmeye alınan sürgünlerin % 51.2’si köklenmiş olup, köklenen bitkicikler 1:1 oranında torf: perlit karışımında saksıya aktarılmış ve dış koşullara kolaylıkla adapte olabilmişlerdir.

Jan ve ark. (2018), *S. santolinifolia* kalluslarından yeni bir bileşik olan *Salvialaktomin* ile birlikte ender olarak görülen Pentatriakontanoik asit 1, 3-dihidroksipropil ester ve 5-Metilflavon izole edilmiştir. Kallus kültürleri 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında başlatılmış akabinde 0. 5 mg/l BA ve 1.5 mg/l NAA içeren MS ortamında alt kültüre alınmıştır. İzole edilen bileşiklerin yapıları kütle spektrometri, 1D ve 2D–NMR teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. *Salvialaktomin* ve 5-Metilflavon iki farklı kanser hücre hattında (Hela-Rahim ağzı kanseri) ve PC-3-Prostat kanseri hücreleri) test edilmiştir. IC50 değeri standart olarak kullanılan Doksorobisin ($0.912 \pm 0.12 \mu\text{mol L}^{-1}$)den yüksek bulunmuştur.

Khoshsokhan ve ark. (2018), *S. nemorosa*'da *in vitro* kallus oluşumu ve RA üretimini inceledikleri çalışmalarında genç yaprak eksplantlarını 2,4-D (0, 0.5, 1, 2 ve 5 mg/l)'nin farklı konsantrasyonları ya da BAP ve Kin (0.5, 1 ve 2 mg/l) kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alarak kallus oluşumu, taze ağırlık ve kallus tekstürlerini değerlendirmişlerdir. En yüksek kallus oluşumunu 5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP, 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP ve 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l Kin destekli 3 farklı besi ortamından elde ettiklerini, kallusların 2 kat daha fazla RA içerdiğini ve 1 mg/l BAP ve 1 mg/l 2,4-D BBD kombinasyonlarının RA üretimi için en uygun yöntem olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Balur Adsız (2018), *In vivo S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan aktif etanol ekstraktlarından farklı 30 madde elde edildiği, bu bileşiklerden triterpen yapısında olanların ursolik ve oleanolik asitler ile beta-amyrin olduğu, steroid yapıda olanların β -sitosterol, stigmasterol, 7- α -hidroksi- β -sitosterol, γ -sitostenon, diterpen yapısında olanların ferruginol, sugiol, 7-asetil royleanon, kriptanol, 6,7-dehidroroyleanon, flavonoid yapıda olanların ise salvigenin, apigenin, luteolin 7-glikosid, fenolik yapıda olanların rozmarinik asit, fumarik asit, kafeik asit, *Salvianolik* asit A ve B, benzoik asit, protokateşik asit, 4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzaldehit, scoparon ve bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat), bis(2-etil heksil) teraftalat olduğu belirlenmiştir.

Fidan (2019), 6 endemik *Salvia* türünden (*S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa*; *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*; *S. pseudoeuphratica*; *S. siirtica*; *S. rosifolia* ve *S. kurdica*) elde edilen 12 ekstre ile saflaştırılan sekonder metabolitlerin sitotoksik etkileri ve gen düzeyinde antikanser aktivitelerini incelemiştir. 12 ekstrenin de ancak yüksek konsantrasyonlarda HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı sitotoksik etki gösterdiğini, ancak bu konsantrasyonlarda sağlıklı fibroblast hücre serisine karşı da toksik etki gösterdiğini, ekstraktların aksine izole edilen bazı maddelerin oldukça sitotoksik potansiyele sahip olduğunu belirlemiştir. Yine elde ettiği diterpen yapısındaki 6,7-dehidroroyleanon, asetil royleanon, ferruginol, inuroyleanol, 12-demetilmultikaulin, 12-hidroksi abieta-1,3,5(10),8,11,13-hekzan ve triterpen yapısındaki 4 yeni bileşiğin (21 α -hidroksi-2 α ,3 β -diasetoksi urs-9(11),12-dien, 3 β -hidroksi-2 α -asetoksi urs-9(11),12-dien, 2 α ,3 β ,21 α -trihidroksi urs-9(11),12-dien, 1 α ,21 α -dihidroksi-2,3-(1',1'-dimetildioksimetilen) urs-9(11),12-dien) oldukça yüksek bir sitotoksik potansiyele sahip olduğunu öne sürmüştür.

Hemmati ve ark. (2020), 8 haftalık *S. tebesana* bitkisinden aldıkları farklı eksplant kaynaklarından (sürgün apikal meristemi, yaprak ve yaprak sapı) kallus oluşumu üzerine farklı BBD (2,4-D, NAA ve BAP)'lerin etkisi ile fenolik bileşik içeriği ve antioksidan potansiyelini araştırmışlardır. Elde edilen kallusların renk, taze-kuru ağırlık ve yüzdeye bağlı olarak biyokütle artışının 56 gün sonra kaydedildiği, maksimum kallus oluşumunun (%100) 0.5-1.5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP ve 1- 1.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP ile desteklenmiş MS ortamında sürgün apikal meristeminden elde edildiği ayrıca en yüksek taze (15.06 ± 0.88 g) ve kuru (0.33 ± 0.02 g) ağırlığın da 1.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l içeren MS besi ortamından elde edildiğini belirtmişlerdir. Kombine BBD ile zenginleştirilmiş MS besi ortamlarında polifenollerin, fenolik asitlerin ve flavonoid bileşiklerin birikiminin daha yüksek olduğunu, 2,4-D + BAP > NAA + BAP > 2,4-D + NAA sırasını takip ettiklerini rapor etmişlerdir.

Ozhan-Kocakaya ve ark. (2020), çalışmalarında *Salvia* cinsine ait rosmarinik asit, salvigenin, *Salvianolik* asit A ve B, tanshinone I ve IIA, cyrtotanshinon, dihidrotanshinone I, karnosik asit, karnosol ve danshensu sodyum tuzunun asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz ve tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyonu üzerine potansiyellerini araştırmışlardır. Dihidrotanshinon I, karnasol ve karnosik asitin asetil- ve butirilkolinesteraz üzerine yüksek inhibitör etkilerini, ayrıca, diğer tüm sekonder metabolitlerin, butirilkolinesteraza karşı aktif olduğunu, Tanshinon I'in antiüreaz ve antitirozinaz aktivitelerinin bulunduğunu dolayısıyla *Salvia* türlerinin bir antialzheimer aktif bileşik kaynağı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Sotiropoulou ve ark. (2020), üç farklı sıcaklıkta (25, 80, 100 °C) hazırlanan papatya ve adaçayı sulu ekstratlarının toplam fenolik içeriğini, antioksidan aktivitesini ve potansiyel toksisitesini belirlemek ve fenolik profillerini optimum sıcaklıkta tespit etmek amacıyla yaptıkları araştırmada, 80 °C'deki ekstraksiyon sıcaklığının, her iki bitki için de maksimum antioksidan aktivite ve en yüksek toplam fenolik içerik gösterdiğini, tüm sulu ekstratların *Vibrio fischeri*'ye karşı toksisiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Papatyada bulunan majör fenolik bileşiklerin rutin hidrat, ferulik asit, klorojenik asit ve apigenin-7-O- glucoside ve adaçayının ise; rosmarinik asit, *Salvianolik* asit K ve luteolin-7-O- glucuronide olduğu ve son olarak 80 °C'de bitkisel sulu ekstratların önemli biyoaktif ve antioksidan bileşikler sağlayabileceği, ancak tüketimlerinin ölçülü olması gerektiği bildirilmiştir.

Yener (2020), *S. pocolata*'nın uçucu yağ, aroma, yağ asidi, terpenoid ve fenolik içeriklerini, uçucu yağ ve etanol ekstratlarının antioksidan, toksik-sitotoksik

aktivitelerinin yanı sıra antikolinesteraz, antiüreaz, antitirozinaz ve antielastaz enzimlerinin inhibisyon aktivitelerini araştırdığı çalışmasında, GC–MS sonucuna göre uçucu yağ, aroma ve yağ asidi kompozisyonları için sırasıyla germacrene D (%20.07), karyofillen (%17.57) ve trikozanoik asiti (%17.01) ana bileşenler olarak belirlediğini, GC–MS ve LC–MS/MS sonuçlarına göre ise, bu türün önemli miktarda ferruginol (9292.9µg analit/g özüt) ve rosmarinik asit (15612.08µg analit/g özüt) içerdiğini, türün yüksek toplam fenolik ve rosmarinik içeriğine paralel olarak, etanol özütü yüksek bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu ancak asetilkolinesteraz enzimine karşı aktif olmadığını ve kök etanol ekstresinin butirilkolinesteraz enzimine karşı iyi aktivite (İnhibisyon %:63.01±1.12) gösterdiğini belirlemiştir. Türün tüm ekstrelerinin oldukça yüksek antiüreaz aktivitesine sahip bulunduğunu (İnhibisyon %: 89.67±0.72), ancak antitirozinaz ve antielastaz aktivite analizlerinde orta ve benzer aktiviteler gösterdiğini sonuç olarak toplam fenolik ve rosmarinik asit içeriği, antioksidan kapasitesi, antiüreaz ve antibütirikolinesteraz enzim aktivitesi nedeniyle gıda koruyucu ve ilaç endüstrisinde potansiyele sahip olduğunu rapor etmiştir.

Szymczyk ve ark. (2021), çalışmalarında öncelikle tohumlarını *in vivo* olarak çimlendirmiş ve akabinde yapraklarını kallus elde etmek amacıyla kullanmışlardır. 0.5% NaOCl ve Tween 20 ile 10 dk boyunca steril edilen eksplantlar 1 mg/l 2,4-D ve 30g/l süktroz içeren MS besi ortamında 1 ay karanlıkta bekletmek suretiyle kallus kültürlerini başlatmışlardır. Akabinde sentetik bir oksin olan NAA ve SA (salisilik asit)'in, MS besi ortamında kültüre alınan *S. miltiorrhiza* kallus kültürlerinde toplam tanshinone ile dihydrotanshinone (DHT), cryptotanshinone (BT) tanshinine (TI) ve tanshinone IIA (TiIA) miktarını incelemişler ve sonuç olarak, NAA'in hiçbir tanshinone üzerinde etkili bulunmadığını, SA'in ise konsantrasyon ve zamana bağlı olarak artışa yol açtığını, bununla birlikte *S. miltiorrhiza* Poland çeşidinde muhtemelen metabolik özgülüğü nedeniyle verimin nispeten düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Fidan ve ark. (2021), tarafından petrol eter, kloroform ve etanol ile hazırlanan *S. siirtica* farklı kısımlarına ait *in vivo* ve *in vitro* kökenli ekstrelerinin fitokimyasal içerikleri incelenmiş ve farklı teknikler (GC-MS ve LC-MS/MS) kullanarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda analizi yapılan örneklerin antioksidan potansiyelleri yüksek, enzim aktivite potansiyelleri ise düşük bulunmuştur. Ayrıca *in vitro* *S. siirtica*-TIS örneği MCF-7 (meme kanseri) hücre hattına karşı yüksek sitotoksik aktivite (% 2,12 ± 0,06 canlılık) göstermiştir. GC-MS ve LC-MS/MS analizlerinin sonuçları, ferruginol ve sugiolün *S. siirtica* köklerinin etanol ekstrelerinden, salvigenin ve sitosterolün de toprak üstü

kısımlarının kloroform ekstrelerinden ve fenolik bileşiklerin ise yine toprak üstü kısımlarının etanol ekstrelerinden izole edilebileceğini göstermiştir. Ayrıca *in vitro* örneklerin rosmarinik asit, kafeik asit ve 12-demetilmultikaoline miktarları *in vivo* örneklerle göre daha yüksek bulunmuştur. Hem *in vivo* hem de *in vitro* tüm numuneler yüksek seviyelerde rosmarinik asit ve sitosterol içermiştir. Solarak bitki materyalinin doğası, uygun solvent seçimi ve kullanılan materyalin kısımlarının kimyasal içerikte oldukça etkili olduğu ifade edilmiştir.

Yılmaz ve ark. (2021), 2015, 2016 ve 2017 yıllarında toplanan *Salvia* türlerinin kökleri, çiçekleri, yaprakları, dalları ve tüm bitkinin kullanıldığı çalışmalarında *Salvia* türlerinin kök ve dallarının *Salvianolik* asit A, kafeik asit ve 6,7-dehidroroylenon bileşenleri açısından benzer olduğunu, buna göre apigenin, rosmarinik asit, luteolin 7-O-glukozit, kafeik asit, *Salvianolik* asit B ve 6,7-dehidroroylenonun incelenen *Salvia* türlerinde bulunan dikkate değer fitokimyasallar olduğunu belirtmişlerdir.

Ovidi ve ark. (2021), *Laurus nobilis*, *S. officinalis* ve *S. sclarea* türlerinin esansiyel yağları ve hidrolatlar kimyasal bileşimlerini ve biyolojik özelliklerini tanımlamak için yaptıkları araştırmada, esansiyel yağının ana bileşenleri bakımından *L. nobilis*'te 1,8-Sineol (%42.2,%33.5) ve α -pinen (%16.7, %39.0) bulunurken, *S. officinalis* için 1,8-sineol (%30.3, %48.4) ve kafur (%17.1,%8.7) *S. sclarea*'da ise; linalil asetat (%62.6,%30.1) ve linalool (%11.1,%28.9) hidrolatların kimyasal profili bakımından ise, *L. nobilis* ve *S. officinalis*'nin ana bileşeni olarak 1,8-sineol (% 65,1,% 61,4) ile karakterize edilirken, *S. sclarea*'da ise linalool (%89,5) ana bileşen olarak tespit edildiği belirtilmiştir. *L. nobilis* ve *S. officinalis* esansiyel yağları önemli antibakteriyel aktivite gösterirken, *S. sclarea*'nın daha az etkili olduğu ancak *Acinetobacter bohemius* DSM 102855 ve *Bacillus cereus* ATCC 10876'a karşı da en büyük inhibisyon çapına sahip olduğu yine düşük IC₅₀ değerleri gösteren *L. nobilis* ve *S. sclarea* için oldukça yüksek bir antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Kolak ve ark. (2021), endemik bir tür olan *S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa*'nın toprak üstü ve kök kısımlarından hazırlanan etanol ekstrelerine ait antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında 20 çeşit bilinen sekonder metabolit (rosmarinic asit, klorojenik asit, kafeik asit, 4-hidroksibenzoik asit, benzoik asit, luteolin 7-O-glucoside, bis-(2-ethylhexyl)benzene-1,2-dicarboxylate, *Salvianolik* asit A, *Salvianolik* asit B, 7-acetylroyleanone, 6,7-dehydroroyleanone, ferruginol, inuroyleanol, 12-hydroxy-6,7-secoabieta-8,11,13-triene-6,7-dial, ursolik asit, oleanolik asit, taraxasterol, lupenone, β -sitosterol ve stigmasterol

izole etmişlerdir. Rosmarinic asitin serbest radikal süpürme testleri bakımından izole edilen sekonder metabolitler arasında en iyi antioksidan bileşik olduğu, sırasıyla klorojenik ve kafeik asitler, luteolin 7-O-glukozit, *Salvianolik* asitler A ve B ve inuroyleanolün de söz konusu deneyde yüksek antioksidan aktivite sergilediğini bildirmişlerdir.

Ertaş ve ark. (2021), endemik bir tür olan ve doğal ortamında yetişen *S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa*'dan hazırladıkları etanol ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmek amacıyla yaptıkları çalışmada aktif antioksidan fraksiyonlarından bilinen 20 sekonder metabolit izole edilmiştir ki bunlar; rosmarinik asit, klorojenik asit, kafeik asit, 4-hidroksibenzoik asit, benzoik asit, luteolin 7-O-glukozit, bis-(2-etilheksil)benzen -1,2-dikarboksilat, *Salvianolik* asit A, *Salvianolik* asit B, 7-asetil royleanon, 6,7-dehidroroyleanon, ferruginol, inuroyleanol, 12-hidroksi-6,7-secoabieta-8,11,13-trien-6,7-kadran, ursolik asit, oleanolik asit, taraksasterol, lupenon, β -sitosterol ve stigmasterol'dür. DPPH serbest radikal ve ABTS katyon radikal süpürme ve CUPRAC analizlerinde toprak üstü kısımlarından elde edilen rosmarinik asit, izole sekonder metabolitler arasında en iyi antioksidan bileşik olarak bulunmuştur. Klorojenik ve kafeik asitler, luteolin 7-O-glukozit, *Salvianolik* asitler A ve B ve inuroyleanol de bahsedilen deneylerde yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir.

Akdeniz ve ark. (2021), *S. multicaulis* uçucu yağını antioksidan, sitotoksik, antialzheimer, antiüreaz, antitirozinaz, antielastaz ve antikollajenaz aktiviteleri açısından değerlendirmiştir. Enzim aktiviteleri ve türlere ait tüm etanol ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri oldukça yüksek bulunmuştur. Özellikle uçucu yağ ve yaprak kısımlarının etanol ekstrelerinin kanser hücre dizilerinde ((PDF (Sağlıklı primer dermal fibroblast hücre dizisi), HT-29 (kolon kanseri hücre dizisi), MCF-7'de (meme kanser hücre hattı), Caco-2 (kolon kanseri hücre hattı) ve Skov-3 (yumurtalık kanseri hücre hattı))'un yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. GC-MS sonuçlarına göre, doğal örnekte 1,8-sineole (%33,05) ve D- limonen (%21.18), kültürü yapılan örnekte ise, 1,8-cineole (%42.35) ve α -pinen (%15.74) uçucu yağ ve aromanın ana bileşenleri olarak tespit edilmiştir. Kültüre alınan örnekler Sitosterol açısından zengin bulunmuştur.

Ayrıca doğal örneklerin kök ekstrelerinin abieatan diterpen (ferruginol, kriptanol, sugiol ve inuroyleanone) bileşikleri açısından diğer ekstrelerden daha zengin olduğu tespit edilmiştir. LC-MS/MS sonuçlarında hem doğal hem de kültüre alınan örneklerin rosmarinik asit açısından oldukça zengin olduğu görülmüştür. Doğal örneğin çiçek kısmının diğer kısımlara göre daha fazla rosmarinik asit içerdiği bulunmuştur. Türlerin

yaprak kısımlarının etanol ekstralarının yüksek toplam fenolik ve rosmarinik asit içeriği, sitotoksik, yaşlanma karşıtı ve antioksidan potansiyeli nedeniyle gıda takviyesi, gıda koruyucu ve farmasötik olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir.

Uysal ve ark. (2021), limon kokulu bir bitki olan *S. ceratophylla*'nın metanolik, hidro-metanolik, diklorometan, heksan ve sulu ekstraları toplam fenolik (TPC) ve flavonoid içeriği (TFC) için test edilmiş ve antioksidan aktiviteleri (DPPH, ABTS, FRAP) ile toplam antioksidan kapasitelerini (TAC) ve hedef enzimler olarak asetil-(AChE), butiril-kolinesteraz (BChE), tirozinaz, α -amilaz ve α -glukosidaz kullanılarak enzim inhibitör etkilerini ve ayrıca HepG2, B164A5 ve S17 hücre hatlarında sitotoksik aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, metanol ekstralarının en yüksek fenolik ve flavonoid içeriğine sahip olduğu, hidro-metanol ekstralarının, önemli DPPH ve CUPRAC'a karşı en yüksek indirgeme potansiyeli gösterdiğini ve en iyi tirozinaz aktivitesinin diklorometan kök ekstresinden elde edildiğini bildirmişlerdir. Test ettikleri ekstralar arasında, en yüksek antimikrobiyal potansiyeli, 0.048 mg m/l MIC değeri ile heksan kökü ekstresinin gösterdiğini, metanol kök ekstresinin ise HepG2 hücrelerine karşı en düşük sitotoksikiteyi (%28) gösterdiğini belirtmişlerdir.

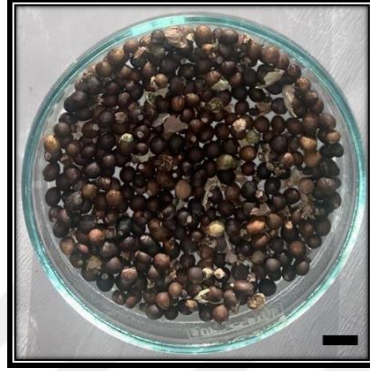
Ertaş ve ark. (2022), *S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa*, *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*, *S. pseudeuphratica*, *S. rosifolia* ve *S. kurdica* uçucu yağ, aroma ve yağ asidi bileşimlerini GC-FID, GC-MS/Head Space ve GC-MS ile analiz ederek yaptıkları kemometrik değerlendirme sonucunda, uçucu yağ ana bileşenlerinin germacrene-D (bu türler için en yüksek %41,79), kafur (%55,80), linalool (%33,38), caryophyllene oksit (%32,99), 1,8-sineole (%26,30) ve geraniol asetat (%31.63) olarak belirlenirken, aroma için ise 1,8-sineole (bu türler için en yüksek %45.95), kafur (%58.54), D-limonen (%40.83), linalool (%27.67) ve cis-linalool oksit (%25.87) olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, oleik (bu türler için en yüksek %72.65), erusik (%44.61), 2-palmitoleik (%42.17) ve nervonik (%32.61) asitler, yağ asitlerinin ana bileşenleri olarak bildirilmiştir. PCA ve HCA'ya göre sözkonusu taksonların uçucu yağ bileşenlerinin yıllardan etkilenmediği ve *Salvia* taksonlarının kendi aralarında gruplandığı rapor edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, 2019-2022 yılları arasında Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Materyal

Çalışmamızda materyal olarak *S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan'a ait tohumlar (Şekil 3.1.) kullanılmıştır. 2017 yılı Haziran-Ağustos aylarında toplanan tohumların teşhisi Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi'nde Arş. Gör. Mehmet Fırat tarafından yapıldı. Tohumlar, laboratuvara transfer edildikten sonra kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C da muhafaza edildi.



Şekil 3.1. *S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan'a ait olgun tohumların genel görünümü (Bar: 1 cm)

3.2. Yöntem

3.2.1 Doku kültürü uygulamaları çalışmaları

3.2.1.1 Besi yeri ve stok solüsyonların hazırlanması

Bu tez kapsamında tohumlardan itibaren kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonunda kullanılan MS besiy ortamının hazırlanmasında kullanılan stok solüsyonlar ve miktarları ile diğer tüm besiy ortam içerikleri, besiy ortamlarına ilave edilen BBDlerin çeşitleri ve hazırlanışı ile stok solüsyonların hazırlanmasına yönelik bilgiler aşağıda çizelgeler halinde sunuldu (Çizelge 3.1, 3.2 ve 3.3).

Çizelge 3.1. MS besiy ortamının hazırlanmasında kullanılan stok solüsyonlar ve miktarları

MS (Makro Elementler) Ana Solüsyonu	
NH ₄ NO ₃	16.5g
KNO ₃	19.0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7 g
KH ₂ PO ₄	1.7 g
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.
MS (Mikro Elementler-1) Ana Solüsyonu	
H ₃ BO ₃	620 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	1695 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg
KI	83 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	35 mg

Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.
MS (Mikro Elementler-2) Ana Solüsyonu	
CuSO ₄ .5H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ .6 H ₂ O	25 mg
Distile Su	200 ml'ye tamamlanır.
Komplex Kelatör Ana Solüsyonu	
FeSO ₄ .7H ₂ O	3,725 g
Na ₂ EDTA	2,785 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır.
Vitamin Karışımı Ana Solüsyonu	
Nikotinik asit	50 mg
Glisin	200 mg
Pridoksin HCl	50 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.
B₁ Vitamini Ana Solüsyonu (10⁻³)	
Tiamin HCl	10 mg
Distile Su	100 ml'ye tamamlanır.
Myo-inositol (10⁻³)	
myo-inositol	100 mg
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.

Çizelge 3.2. Besi ortamlarına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin tip ve çeşitleri.

BAP (6-Benzylaminopürin) Ana Solüsyonu (10⁻³)	
BAP	100 mg
1N NaOH	2-3 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
Kin (Kinetin) Ana Solüsyonu (10⁻³)	
Kin	100 mg
1N NaOH	2-3 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) Ana Solüsyonu	
2,4-D	100 mg
1N NaOH	2-3 ml
Steril saf su	100 ml'ye tamamlanır.
IBA (Indol Bütirik Asit) Ana Solüsyonu	
IBA	100 mg
%95'lik Etil Alkol	3-5 ml
Steril saf su	100 ml
IAA (Indol Asetik Asit) Ana Solüsyonu	

IAA	100 mg
%95'lik Etil Alkol	3-5 ml
Steril saf su	100 ml



Çizelge 3.3. Standart besi ortamlarının içeriği* (g/l)

Kimyasallar	MS	WPM	SH	Gamborg B5
Na ₂ SO ₄	0	0	0	0
KCl	0	0	0	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0	0	134 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0	0	0	150 mg
NH ₄ H ₂ PO ₄	0	0	300	0
NH ₄ NO ₃	1650 mg	400 mg	0	0
KNO ₃	1900 mg	0	2500 mg	2500 mg
KH ₂ PO ₄ (Monobasic)	170 mg	168 mg	0	0
Ca(NO ₃) ₂	0	460 mg	0	0
MgSO ₄	0	0	0	122 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg	368 mg	400 mg	250 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 mg	72 mg	200 mg	150 mg
K ₂ SO ₄	0	988 mg	0	0
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9 mg	16,9 mg	10 mg	10 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg	8,6 mg	1 mg	2 mg
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg	0,25 mg	0,1 mg	0,25 mg
KI	0,83 mg	0,83 mg	1 mg	0,75 mg
H ₃ BO ₃	6,20 mg	6,20 mg	5 mg	3 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg	0,025 mg	0,1 mg	0,025 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg	0,025 mg	0,2 mg	0,025 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	28 mg	28 mg	20 mg	28 mg
Na ₂ EDTA	37 mg	37 mg	15 mg	37 mg
Glisin	2 mg	2 mg	0	0
Nikotinik Asit	0,5 mg	0,5 mg	5 mg	1 mg
Thiamin HCl	0,1 mg	0,1 mg	5 mg	10 mg
Pyridoxine HCl	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg	1 mg
Sükroz	30 gr	30 gr	30 gr	20 gr
Myo-İns.	100 mg	100 mg	1000 mg	100 mg
Agar	7 gr	7 gr	7 gr	7 gr
pH	5,8	5,8	5,8	5,5

* Tez çalışmasında kullanılan bütün kimyasallar Sigma Ltd.'den alınmıştır.

3.2.1.2. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu ve kültür şartları

Sterilizasyon, bir madde ya da bir cismin birlikte bulunduğu mikroorganizmaların tüm şekillerinin (sporlar dâhil) öldürülmesi, tahrip edilmesi veya ortamdan uzaklaştırılması işlemidir. Doku kültürü uygulamalarında kullanılan malzemelerden kaynaklı olarak gelişen kontaminasyonlar en çok kayba neden olan faktörlerden biridir. Dolayısıyla bu tez kapsamında tüm aşamalar dikkatli bir şekilde uygulanarak bu risk ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

Pipet, erlenmayer, beher vb. tüm cam malzemelerin ağız kısımları folyo ile kaplanarak 180 °C'ye ayarlanmış bir etüvde 3 saat boyunca sterilize edildi. Kallus kültürlerinin başlatılması aşamalarında tek kullanımlık ve steril olan petri kapları kullanılmış olup tohum çimlendirme aşamasında ise, Magenta GA7 kültür kapları kullanılmış olup sterilizasyon işlemi 105 kPa basınç altında, 121°C'de 20 dk boyunca bir

otoklav içerisinde yapıldı. İşlem öncesinde Magenta GA7 kaplarının ağızları kapatılıp otoklav bandı kullanılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Pens, bistüri, bistüri ucu gibi kullanılacak laboratuvar aletleri %70'lik ticari alkol içerisinde daldırılarak silinmiş ve kurutulduktan sonra, 250 °C'ye kadar ısıtılmış bir cam boncuklu sterilizatör (Steri 350 Swiss-Made) içerisinde 10-20 sn bekletilerek sterilize edildi.

Kültüre alma işlemlerinin yapıldığı transfer (röpikaj) odası ve laminar hava akışlı kabin (laminar flow) kullanımdan yarım saat önce %10'luk Benzalkonyum klorür içeren ticari zefiran antiseptik çözeltisi ile akabinde ise %70'lik teknik alkol ile silindi. Kullanılan bençler ticari alkol, yerler ise ticari çamaşır suyu ile silindi. UV lambası kültür işleminden en az 30 dk önce açık bırakılarak, oda hazır hale getirildi.

Kültürler genellikle bir büyüme odasında 25 ± 2 °C de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ yoğunluklu 16/8 s fotoperiyot altında büyümeye bırakıldı. Işık kaynağı olarak 3500 lüks ışık şiddetine sahip floresan lambalar (400W MBFR/U, Thorn) kullanıldı.

3.2.13. Kallus kültürlerinin başlatılması

Öncelikle tohumlardan aksenik kallus kültürlerinin başlatılması çalışmaları kapsamında olgun *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* tohumların yüzey sterilizasyonu için Hui ve ark. (2012) tarafından rapor edilen metot modifiye edilerek uygulandı. Bu metoda göre yüzey sterilizasyonu için olgun tohumlar öncelikle musluk suyunda 20 dakika boyunca yıkanarak ve sonrasında tohumların dış kısımlarında oluşan mukus tabakasından arındırıldı. Akabinde 3-5 saniye %75'lik etil alkol içerisinde bekletildikten sonra % 5 sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 10 dk boyunca sterilize edildi. Daha sonra tohumlar 5'er dk olmak üzere 5'şer kez steril saf su ile yıkanarak NaOCl'nin dokulardan uzaklaşması sağlandı.

Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmalarında farklı BBD uygulamalarının etkisi test edildi. Bu bağlamda genellikle literatür bilgileri ışığında birçok bitki türünde kallus oluşumuna neden olan farklı sitokin (Kin, BAP ve TDZ) ve oksin (IAA, IBA ve 2,4 D) kombinasyonlarının etkileri araştırıldı. Bu bağlamda steril edilen tohumlar % 3 süktroz ve 6.2 g agar destekli ve her biri 1 mg/l oksin-sitokinin BBD kombinasyonunu içeren standart 1/1 MS besi ortamlarında (Murashige ve Skoog, 1962) kültüre alındı. Kültürler, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 25 ± 2 °C de sabit bir sıcaklıkta 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunda 4 hafta süresince gelişmeye bırakıldı.

3.2.14. Kallus kültürlerinin optimizasyonu

Kallus kültürlerinin optimizasyonu aşamasında aşağıda alt başlıklar halinde sunulan uygulamalar denendi. 4 haftalık bir kültür periyodu sonrasında denenen her bir parametreye ait kültür gelişimi izlendi. Ortalama 28 günlük kültür periyodu sonrasında gelişen kallusların, taze ve kuru ağırlık değerleri yine her bir parametre için ayrı ayrı kaydedilerek ve elde edilen veriler istatistiksel olarak hesaplanarak tablolar halinde sunuldu.

Besi ortam tiplerinin etkisi

Kallusların büyüme ve gelişimine farklı besi ortamı çeşitlerinin etkisini belirlemek amacıyla, kalluslar sırasıyla tam kuvvetteki (1/1) MS, SH, Gamborg B5 ve WPM besi ortamlarında kültüre alındı.

En iyi besi ortam tipinin farklı kuvvetlerinin etkisi

Kallus kültürlerinin optimizasyon çalışmalarında, kallus kültürlerinin büyümesi ve gelişimi üzerine en iyi besi ortamının farklı kuvvetlerinin etkisini belirlemek amacıyla, kalluslar en iyi gelişim elde edilen besi ortamının 1/2, 1/1 ve 2/1 kuvvetlerinde hazırlanan besi ortamlarında kültüre alındı.

Karbon kaynakları ve kuvvetlerinin etkisi

Kallusların gelişimlerine glikoz ve sükroz karbon kaynakları ile bunların farklı 15, 30 ve 45 g/l'lik konsantrasyonlarının etkileri test edildi.

Işık yoğunluklarının etkisi

Bu çalışmada, kallus kültürleri karanlık ve aydınlık ortam şeklinde farklı ışık yoğunluğu oluşturulmuş büyüme ortamlarında kültüre alındı.

pH uygulamalarının etkisi

Kallus kültürlerinin gelişimleri üzerine asidik ya da alkali ortam seviyelerinin etkilerinin belirlenmesi amacıyla, sırasıyla pH 4.5, 5.8 ve 7.0 derecelenmelerinde kültüre alındı.

3.2.15. Kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonu

Optimize edilmiş besin ortamı ve şartlarda kültüre alınan kalluslar, 4 hafta boyunca 25 ± 2 °C 16/8 saat fotoperiyot uygulanan bitki büyütme odasında kültüre alındı. 1. gün ve 28. günlerde kallusların yaş ağırlıkları ve 28. günün sonunda kuru ağırlıkları alınarak kaydedildi. İstatistiksel olarak hesaplanan veriler sonucunda kallusların büyümelerinin ifadesi rapor edildi. Hesaplama için aşağıda verilen veriler kullanıldı.

Kallus (%): Kültürlerin 4. hafta sonunda, kallus oluşturan tohumların kültürdeki tüm tohum sayısına oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edildi.

Ortalama Kallus Taze Ağırlığı: Kültürden 4 hafta sonra tohumdan gelişen kallusların ağırlıklarının toplamının, kallus oluşturan tohum sayısına oranı olarak ifade edildi.

Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı: Taze ağırlığı ölçülen kalluslar, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra kallusların ağırlıklarının toplamının, kallus oluşturan tohum sayısına oranı olarak ifade edildi.

3.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları

Optimize edilen kallus kültürlerinden elde edilen ekstreler biyolojik aktivite çalışmalarında kullanıldı.

Ekstraksiyon

Elde edilen örnekler gölgede kurutularak etanol ile ekstre edildi. Çözücü evaporator sisteminde uçurulduktan sonra elde edilen ekstrelerin 4000 ppm stok çözeltileri hazırlandı.

3.2.2.1. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton 1977). 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlanacak ve bu çözeltilerden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 mL alınarak hacimleri distile su ile 184 μ L'ye tamamlandı. Çalışılan bitkinin etanol ekstrelerinin 1000 ppm konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Bir miligram ekstre içeren örnek çözeltilerden 4 μ L alındı, distile su ile 184 μ L'ye tamamlandı. Pirokatekol çözeltisi ve örneklerle 4 μ L Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ve 3 dk sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 12 μ L ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında bekletildi ve örneğin absorbansı 760 nm'de okundu. Ekstrenin toplam fenolik içeriği standart pirokatekol grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi. Hazırlanan ekstrenin toplam flavonoid içeriği kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi (Moreno ve ark., 2000). 1000 ppm'lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 mL alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 192 μ L'ye tamamlandı. 4 μ L 1 M potasyum asetat eklendi ve bir dakika sonra 4 μ L %10'luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm'de mikropilaka reader ile absorbansı okundu. Çalışılacak etanol ekstresinin tek konsantrasyonda (1000 ppm) hazırlanan çözeltilerinin de absorbans değerleri okundu. Ekstrenin toplam flavonoid içeriği, standart kersetin grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi.

Total fenolik ve flavonoid içerikler aşağıdaki denklemlerden hesaplanmıştır;

Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik. ($y = 0.0548(\mu\text{g}) + 0.0333$ ($r^2: 0.9949$)

Kersetine eşdeğer flavonoid içerik. ($y = 0.0398 (\mu\text{g}) + 0.0039 (r^2: 0.9936)$)

3.222. Antioksidan aktivite

DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi

Ekstrenin, fraksiyonların ve elde edilecek olan miktarca yeterli olan saf maddelerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). Örneğin etanol çözücüsünde 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 μL alınarak etanol ile hacimleri 40 μL 'ye tamamlandı ve üzerlerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 160 μL ilave edildi. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı;

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{A}_{\text{kontrol}} - \text{A}_{\text{örnek}}) / \text{A}_{\text{kontrol}} \times 100 \text{ A: Absorbans}$$

ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi

Ekstrenin, fraksiyonların ve elde edilecek olan miktarca yeterli olan saf maddelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (Re ve ark., 1999). Örneğin etanol çözücüsünde 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 μL alınarak etanol ile hacimleri 40 μL 'ye tamamlandı ve üzerlerine 7 mM ABTS katyon radikali çözeltisinden 160 μL ilave edildi. Reaksiyon karanlıkta 6 dakika bekletildikten sonra 734 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneğin absorbans değeri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı;

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{A}_{\text{kontrol}} - \text{A}_{\text{örnek}}) / \text{A}_{\text{kontrol}} \times 100$$

CUPRAC yöntemi (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi)

CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşikler varlığında Cu (II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenir ve bu kelatın 450 nm'de absorbansı ölçülür. Son konsantrasyonları 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ olacak (67-x μL) şekilde 1000 ppm lik hazırlanan örneğin stok çözeltisinin ve standartların üzerine, 61 μL CuCl_2 , 61 μL neokuproin ve 61 μL NH_4OAc tamponu ilave edildi ve 1 saat sonra 450 nm'de absorbans ölçüldü (Apak ve ark., 2004). Örneğin absorbans değeri standartlara karşı değerlendirildi.

NOT: Bütün antioksidan yöntemlerde 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda çalışıldı, çok aktif durumlarda 1, 2.5, 5 ve 10 µg/mL, aktif olmayan durumlarda 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda çalışılarak her yöntemde IC₅₀ hesaplandı.

3.2.2.3. Enzim inhibisyon aktiviteleri

Kolinesteraz aktivite tayin yöntemi

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu olarak (Ellman ve ark., 1961) bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçüldü. Enzim olarak elektrik balığından elde edilen asetilkolinesteraz ve at serumundan elde edilen bütirilkolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetilkolin iyodür ve bütirilkol iniyodür, aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanıldı. 96 kuyucuklu mikrolakaların her bir kuyucuğuna 0,1 M pH=8 fosfat tamponundan 130 µL, 10 µL numune, AChE veya BChE çözeltisinden ise 20 µL ilave edildi. 25 °C de 10 dakika inküasyona bırakıldı, daha sonra üzerine 20 µL DTNB çözeltisi ve 20 µL asetilkolinyodü veya bütirilkolin iyodü ilave edildi. Sırasıyla asetilkolin iyodu veya bütirilkolin iyodu enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlendi. Kontrol olarak etanol, standart olarak ise galantamin kullanıldı.

-AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodü kullanılmaktadır. Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmektedir. Mikrolakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan 10 µL çözelti ve asetil kolinesteraz (AChE) enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüyon 10 dakika süre ile 25° de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve asetilkolin iyodü (AcI) (20 µL) her bir kuyucuğa ilave edildi. Standart olarak Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan galantamin kullanıldı. Mikrolaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programı yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi. Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0.125 mM'a kadar seyreltilmiş solüyonları hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

-BChE aktivite testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodu kullanılmaktadır. Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), numunelerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden 10 µL ve BChE enzimi çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüyon 10 dakika süre ile 25° de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat olarak butirilkolinyodu (BuI) (20 µL) her bir kuyucuğa ilave edildi. Standart olarak Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanıldı. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programı yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşimler tespit edildi. Aktivite gösteren bileşimlerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0.125 mM'a kadar seyreltilmiş solüyonları hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

Tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesi

Tirozinaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak tirozinaz kullanıldı. Mikroplakadaki kuyucuklara 150 µL fosfat tamponu (pH =6,8), ekstrenin etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanacak çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu ve 3 dk karıştırarak 475 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Daha sonra bu çözelti 10 dakika süre ile 37° de inkübe edilerek ve 10 dakika sonra 20 µL L-DOPA ilave edilerek ve yine 37° de inkübe edilerek ve 10 dakika sonra Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 475 nm dalga boyunda son absorbans okundu. Tirozinaz aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak kojik asit kullanıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{Akontrol} - \text{Aörnek}) / \text{Akontrol} \times 100$$

Her bir önekten üç paralel çalışma yapıldı.

Üreaz enzim inhibisyon aktivitesi

Üreaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak Üreaz kullanıldı (Hina ve ark., 2015). Mikroplakadaki kuyucuklara etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltiden 10 µL, enzim çözeltisinden 25 µL ve Substrat olarak 50 µL üe konuldu ve 630 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Daha sonra bu çözelti 15 dakika süre ile 30° de inkübe edildi ve 15 dakika sonra 45 µL fenol reaktifi ve 70 µL alkali reaktif ilave edilerek

ve yine 30° de inkübe edilerek ve 20 dakika sonra Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 630 nm dalga boyunda son absorbans okundu. Üeaz aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak tiyoüre kullanıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{Akontrol} - \text{Aörnek}) / \text{Akontrol} \times 100$$

Her bir önekten üç paralel çalışma yapıldı.

Elastaz enzim inhibisyon aktivitesi

Elastaz inhibitör etkisi spektrofotometrik olarak tayin edildi (Kraunsoe ve ark., 1996). Örneğin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak, bu farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 0,05'er mL alınarak üzerine elastaz enziminden 0,05 mL ilave edildi. Daha sonra 0,9 mL Tris-HCl tamponundan (pH: 7,8; 0,2 M) eklenerek, sonrasında kontrol çözeltisi olarak 0,1 mL enzim çözeltisi ve üzerine 0,9 mL Tris-HCl karışım ilave edildi. Hazırlanan bu karışım 15 dakika 37° de inkübe edilerek örnek türü ve kontrol çözeltilerinin üzerine inkübasyondan sonra 0,05 mL, 5 mM N-süsinil-(Ala)3-nitroanilide çözeltisi ilave edilerek 30 dakika 37° inkübe edildi. 410 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu.

Kollajenaz enzim inhibisyon aktivitesi

0.8 U/mL kollajenaz içeren çözeltilerden 50 µL alarak, üzerine hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki ekstraterden 50 µL eklendi (Thring ve ark., 2009). Daha sonra pH: 7.5 olan Tris tampon çözeltisinden 0.9 mL ilave edildi. Kontrol çözeltisine bitki ekstresi ve uçucu yağ konulmayarak, kör için ise enzim yerine enzim miktarı kadar dimetilsüfoksit çözeltisi kullanıldı. Kör kontrol ve örnek çözeltileri 30 dakika 25°C'de ilk inkübasyona bırakıldı. Bu ilk inkübasyonun ardından tüm çözeltilere 1 mM 0.05 mL N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (kollajenaz enzimi substratı çözeltisinden ilave edilerek 25°C'de 15 dakikalık ikinci bir inkübasyona bırakıldı. Örnek çözeltileri ve kontrol çözeltisinin UV spektrofotometresinde 340 nm'de, köre karşı absorbans değerleri okundu.

Antihipertansif aktivite (Angiotensin I-converting Enzyme, ACE, Inhibition)

Kwon ve arkadaşları (2006) tarafından geliştirilen yöntemde küçük modifikasyonlar yapıldı. 50 mikrolitre numune solüyonu 10 dakika inkübe edildi. 2 mU ACE içeren 200 uL NaCl-borat tampon çözeltisi (0.3 M NaCl, pH 8.3) ile 25°C'de inkübe edildi. Inkübasyondan sonra, reaksiyon çözeltisine 100 uL 5.0 mM substrat (hippuril-histidil-löin) ilave edildi ve çözelti, 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Kör numune (enzim ve substrat yerine tampon solüyonu içeren), kontrol (numune ekstraktı yerine saf su içeren) ve boş (numune ekstraktı ve enzim yerine tampon içeren) de analiz edildi. Reaksiyon,

150 uL 0.5 N HCl eklenerek sonlandırıldı ve ortaya çıkan hippurik asidin belirlenmesi, 228 nm dalga boyunda ultraviyole detektörlü (HPLC-UV) yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle gerçekleştirildi. Standart olarak lisinopril kullanıldı. ACE inhibisyonu, aşağıdaki denklemle tepe alanları kullanılarak hesaplandı;

$$\% \text{ İhibisyon} = [A_{\text{kontrol}} - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{körörnek}})] / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}}) \times 100$$

3.2.24. Terpenoid bileşiklerin GC-MS/MS ile analizi

Örneklerin triterpen içerikleri % 1 trimethylchlorosilane içeren *N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoro acetamide (BSTFA) ile türevlendirilen (70°C'de 120 dk) (Agilent Technologies, USA) marka 7890A Model GC/FID ile birlikte 5977B model kütle spektrometresi (MS) cihazı kullanılarak tayin edildi. Kromatografik ayırım apolar HP-5MS kolonu (30m x 0,25mm x 0.25 µm film kalınlığı) ile yapıldı. GC fırın sıcaklığı 200°C'den başlanarak, 300°C'ye 10°C/dakika hızla çıkarıldı ve bu sıcaklıkta (300°C) 15 dakika sabit tutuldu. Daha sonra 5°C/dakika hızla sıcaklık 310 °C'ye çıkarıldı ve bu sıcaklıkta da 2 dakika sabit tutuldu. Taşıyıcı gaz olarak sabit akışta helyum gazı (0.8 mL/dak) kullanıldı. Enjeksiyon bloğu ve transfer line sıcaklıkları 300 °C'ye ayarlandı. Enjeksiyonlar splitless modunda yapıldı. Enjeksiyon hacmi 2,0µL alındı. Kütle spektrometresi (EI/MS) 70 eV iyonizasyon enerjisine ayarlandı. İyon kaynağının sıcaklığı 230°C'ye ayarlandı. Kütle spektrometresi (MS) verileri full tarama (scan) modunda ve tarama aralığı m/z 50-650 atomik kütle birimi (amu) aralığına ayarlanarak elde edildi (Yigitkan ve ark., 2022).

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmalarda en az 20 eksplant kullanıldı ve elde edilen veriler SPSS (IBM SPSS versiyon 20.0.0) programı kullanılarak istatistik analizleri yapıldı. Gerçekleştirilen çalışmalarda test edilen parametler arasında farklılıkları tespit etmek için elde edilen veriler SPSS 22.0 (IBM) programına işlenerek, ANOVA $P \leq 0.05$ 'e göre PostHoc çoklu karşılaştırma testine (Duncan) tabi tutuldu. Çalışmalardaki oransal verilere ise, Ki kare (χ^2) testi uygulanarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında ilk kez endemik bir bitki olan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* tohumlarından itibaren başarılı bir kallus kültürü başlatma ve optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve bu türün kallus kültürlerinin biyolojik aktivite

potansiyelleri ortaya çıkarılmıştır. Test edilen parametrelere ait bulgular ve tartışma kısmına aşağıda detaylı bir şekilde değinilmiştir.

4.1. Kallus Kültürlerinin Başlatılması Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma

Tohumların yüzey sterilizasyonu, Hui ve ark. (2012) tarafından rapor edilen metot uygulanarak yapılmıştır. Buna göre tohumlar musluk suyunda 20 dk ön yıkama işleminden sonra birkaç saniye %75'lik etil alkol içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra % 5'lik NaOCl solüsyonunda 10 dk boyunca sterilize edilmiş ve steril saf su ile yıkanarak NaOCl'ten arındırılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, 30g sükröz ve 6.2 g agar destekli ve her biri 1 mg/l oksin (IAA, IBA ve 2,4 D) ve 1 mg/l sitokinin (BAP, Kin ve TDZ) BBD kombinasyonunu içeren standart tam kuvvetteki MS besi ortamlarında (Murashige ve Skoog, 1962) kültüre alınmıştır. Kontrollü şartlarda gelişmeye bırakılan tohumlardan ortalama 4. haftanın sonunda elde edilen ve her bir denemeye ait istatistiksel veriler Çizelge 4.1'de ve morfolojik veriler ise, Şekil 4.1 A-B-C-D'de sunulmuştur.

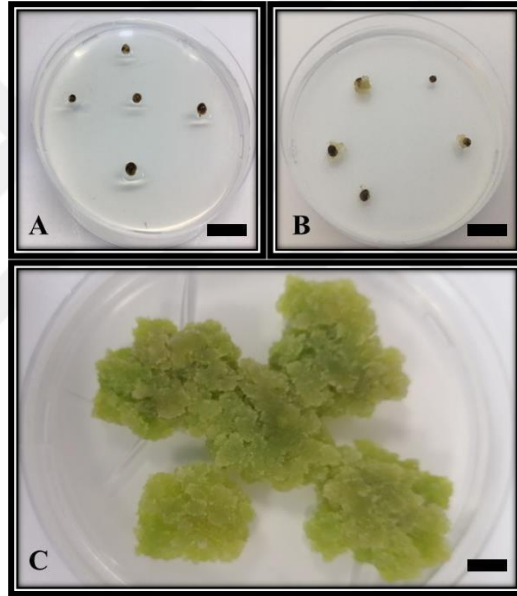
Çizelge 4.1. Farklı oksin ve sitokinin kombinasyonlarının *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus oluşumuna etkisi

BBD Kombinasyonu (1 mg/l)	Ortalama Kallus Yaş Ağırlığı (mg)	Ortalama Kallus Kuru Ağırlığı (mg)	Kallus Yüzdesi (%)	Kallus Morfolojisi
KIN + 2,4-D	0,66±0,03 f	0,024±0,001 e	%100	Yeşil, yumuşak
KIN + IAA	2,17±0,08 d	0,107±0,020 a	%100	Yeşilimsi kahve, yumuşak
KIN + IBA	2,30±0,09 cd	0,086±0,003 bc	%100	Yeşilimsi koyu kahve, kompakt
BAP+ 2,4-D	0,69±0,05 g	0,023±0,001 ef	%100	Yeşil, dağınık ve kompakt
BAP+ IAA	2,46±0,11 bc	0,076±0,002 d	%100	Yeşil, yumuşak
BAP+ IBA	1,87±0,08 e	0,075±0,003 d	%100	Yeşilimsi kahve, yumuşak
TDZ+ 2,4-D	2,68±0,11 ab	0,093±0,020 ab	%100	Yeşilimsi kahve, yumuşak
TDZ+ IAA	2,26±0,08 cd	0,073±0,003 d	%100	Koyu yeşil, yumuşak ve dağınık
TDZ+ IBA	2,69±0,11 ab	0,082±0,003 bc	%100	Koyu yeşil, dağınık

Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir. *Her bir sütunda yer alan farklı küçük harfler, Post Hoc-Duncan ($P \leq 0.05$) çoklu karşılaştırılmalı testine göre farklı uygulamalar arasında anlamsal farklılıkları oluşturmaktadır. **Ortalama $\pm$ Standart hata.

Çizelge 4.1 doğrultusunda, farklı konsantrasyonlarda denenen tüm oksin ve sitokinin kombinasyonlarının (1 mg/l Kin ile 1 mg/l 2,4-D, IAA, IBA; 1 mg/l BAP ile 1 mg/l 2,4-D, IAA, IBA; 1 mg/l TDZ ile 1 mg/l 2,4-D, IAA, IBA) kallus oluşumuna yol açtıkları tespit edilmiştir. Denenen sitokinin tipleri bakımından, Kin ve TDZ kombinasyonlarının BAP kombinasyonlarına oranla daha yüksek yaş ve kuru ağırlığa sahip kalluslar oluşturduğu görülürken, TDZ + IAA ve TDZ + IBA kombinasyonlarının ise kalluslarda arzu edilen özellikte, daha iyi ve daha sağlıklı kalluslar meydana getirdiği

gözlenmiştir. Kin + IAA; Kin + IBA; BAP + IBA ve TDZ + 2,4-D kombinasyonlarında ise, yer yer doku kararması ile kalluslarda kahverengileşme görülmüştür. En yüksek ortalama kallus yaş ağırlığı ($2,69 \pm 0,11$ mg) 1 mg/l TDZ+ IBA kombinasyonunda gözlenirken, en yüksek ortalama kallus kuru ağırlığı ise ($0,107 \pm 0,020$ mg), 1 mg/l Kin + IAA kombinasyonundan elde edilmiştir. 1 mg/l Kin + IAA kombinasyonu, en yüksek ortalama kuru ağırlığa sahip kallusları oluşturmaya rağmen meydana gelen kalluslar iyi kalitede olmadığından dolayı tercih edilmemiştir. Keza, daha düşük değere sahip olduğu bilinen ($0,082 \pm 0,003$ mg) 1 mg/l TDZ+ IBA kombinasyonu (Şekil 4.1 C) morfolojik yönden istenen özellikte kalluslar (yeşil ve dağılgan) oluşturduğundan ve yapılan alt kültürleme çalışmalarında bu özelliklerini de koruduklarından dolayı bir sonraki aşama olan optimizasyon denemelerinde de aynı kombinasyon kullanılmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.1. A- 1 mg/l TDZ+ IBA içeren MS besiy ortamında kültüre alınan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* tohum eksplantları, (Bar: 1 cm), B- Kültürün 45. gününde gelişen kalluslar, (Bar: 1 cm) C- 3. alt kültürlemenin sonunda gelişen kalluslar (Bar: 1 cm)

Bitki büyüme düzenleyicileri, bitkilerin büyüme ve gelişme aşamalarında farklı fizyolojik süreçlerde kilit rol oynarlar (Ashry ve ark., 2018). Bu durum, bitkileri yüksek rejenerasyon ve geniş uygulama sağlayan biyoteknolojik manipülasyon için tercih edilen bir araç haline getirir. Oksin ve sitokininlerin, büyüme ve farklılaşma aşamalarında kültüre alınan hücrelerin metabolizması üzerinde dikkate değer etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Cuenca ve Amo-Marco 2000). Oksinler genellikle kallus ve hücre süspansiyonlarında kök oluşumunu indüklemek, uzama ve hücre bölünmesini uyarmak için kullanılırken, sitokininler ise, daha çok hücre bölünmesini, büyümesini ve gelişimini

sağlayan BBD'leridir. Oksinin adaçayında farklı konsantrasyonlarda *in vitro* köklenme için de gerekli olduğu rapor edilmiştir (Jan ve Khatoon, 2014; Petrova ve ark., 2015; Fu ve ark., 2016; Erişen ve ark., 2020). Oksinin bitki dokusundaki fizyolojik aktivitesi, kallus oluşumu ve morfolojisinde fark yaratır (Anjusha ve Gangaprasad 2017). Ayrıca, oksinlerin ve sitokinlerin karşılıklı etkisi, hücre bölünmesi sürecini kontrol eder. Oksinler, siklin bağımlı kinazların cdc2/cdk2 sınıfı ile ilgili hücre döngüsündeki proteinlerin uyarılmasında hayati bir rol oynar. Üstelik, oksinlerin sitokinin ile kombinasyonlarının, daha fazla kallus üreten cdc2/cdk2 benzeri kinaz aktivitesinde bir artışı sinerjistik olarak etkilediği (Pasternak ve ark., 2000) ve optimum oksin/sitokin oranının maksimum seviyede kallus başlatılması için gerekli olduğu bildirilmiştir (Rahman ve ark., 2019). Birçok araştırmacı tarafından 2,4-D, TDZ, BAP, Kin ve NAA gibi BBD'leri *Salvia* türlerinde genellikle kallus oluşumunu başlatmak amacıyla kullanılmıştır (Tawfik ve Mohamed 2007; Marconi ve ark., 2013; Modarres ve ark., 2018; Bano ve ark., 2022). Fatima ve ark. (2009), kallus dokusunun oluşumunun genellikle eksplant kaynağına ve ayrıca oksin ve sitokin kombinasyonuna bağlı olduğunu, bu eksojen olarak uygulanan BBD'lerinin endojen sitokin ve oksin sentezini arttırdığını ve sonuç olarak kallus büyümesi ve kütlesinde artışa yol açtığı belirtilmiştir. Kallus biyokütlesindeki (taze ve kuru) artış, oksinler ve sitokin tarafından embriyogenezdeki artıştan da kaynaklanabilir. Bu tez kapsamında en yüksek kallus oluşumu 1 mg/l TDZ + IBA uygulamasından elde edilmiş olup bu yöndeki bulgularımız, TDZ uygulamasıyla *S. officinalis*'te kallus biyokütlesinin önemli ölçüde arttığını bildiren Tawfik ve Mohamed (2007) ile Chung ve Ouyang (2021)'in çalışmaları ve ayrıca IBA uygulamasıyla da Farzinebrahimi ve ark. (2016)'nin çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

Kallusun tekstürü, besi ortamında bulunan farklı konsantrasyonlar ve BBD türleri tek başına veya kombinasyon halinde kullanılarak değiştirilebilir (Siddique ve ark., 2014). Eksojen BBD'lerinin uygulanması ayrıca enzimlerin ve bitki hormonlarının iç konsantrasyonunu da etkiler. Endojen bitki hormonları, bu eksojen bitki hormonlarının yardımıyla sentezlenir ve böylece kallus rengini, dokusunu ve yapısını etkiler. Elaleem ve ark. (2009) besi ortamlarının hazırlanması sırasında kullanılan BBD'nin konsantrasyonu ve kombinasyonunun kallus tekstürünü etkilediğini gözlemlenmiştir. Nitekim çalışmamızda 1 mg/l TDZ+ IBA kombinasyonunun koyu yeşil ve dağılgan kalluslar oluşturduğu görülmüştür. Benzer şekilde *S. fruticosa*'da TDZ ve IAA destekli besi ortamından iyi tekstürde kallus dokuları elde edilmiştir (Karam ve ark., 2003). *S.*

officinalis üzerine yapılan bir araştırmada ise, BAP + NAA kombinasyonunun dağılgan bir kallus tekstürüne yol açarken, BAP + NAA kombinasyonunun ise kompakt kallus oluşumuna yol açtığı rapor edilmiştir (Abdipour ve ark., 2019). NAA+ Kin veya Pikloram ile destekli MS besi ortamlarında ise *S. hispanica* kalluslarının dağılgan yapılarını uzun süre korudukları bildirilmiştir (Marconi ve ark., 2013). Düşük NAA + BAP konsantrasyonlarında kültüre alınan *S. tomentosa* eksplantları kompakt bir tekstür gösterirken, yüksek konsantrasyonları ise dağılgan bir kallus tekstürü sergilemiştir (Georgiev ve ark., 2011). Yanıtlardaki farklılığın nedeni *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in farklı bitki dokularında bulunan hormon konsantrasyonlarına ve bunların spesifik reseptörlerine karşı hücre duyarlılığındaki değişiklikler olabilir.

4.2. Kallus Kültürlerinin Optimizasyonu Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma

4.2.1. Farklı besi ortam tipinin kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma

Kallusların gelişimine farklı besi ortamı çeşitlerinin etkisini belirlemek amacıyla, her biri 1/1 kuvvette hazırlanan farklı besiyeri tiplerinin (MS, Gamborg B5, SH, WPM, SH) etkileri test edilmiştir. Kalluslardan ortalama 4. haftanın sonunda elde edilen kallusların, taze ve kuru ağırlık değerleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Çizelge 4.2'de ve ayrıca morfolojik verileri ise Şekil 4.2. A-B-C-D'de sunulmuştur.

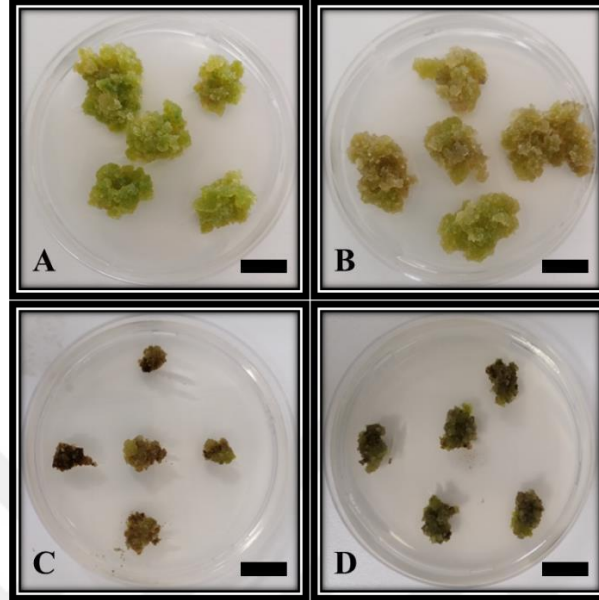
Çizelge 4.2. Farklı besi ortam tiplerinin *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in kallus gelişimi üzerine etkisi

Besi Ortamı (1/1X)	Yaş Ağırlık (*g) (Ort±SH)	Kuru Ağırlık (*g) (Ort±SH)	Kallus Morfolojisi
MS (Kontrol)	1,36±0,09 b	0,050±0,003 b	Yeşil, dağılgan
Gamborg B5	1,75±0,10 a	0,061±0,004 a	Açık yeşilimsi kahve, kompakt
SH	0,28±0,02 c	0,012±0,001 c	Kahverengi, yumuşak
WPM	0,36±0,02 c	0,018±0,001 c	Koyu kahverengimsi yeşil, yumuşak

*Her denemede ortama 50 eksplant kullanıldı.

Çizelge 4.2. irdelendiğinde, besi ortam tiplerinin etkisiyle farklı renk ve yapıda kallusların oluştuğu gözlenmiştir. Hem ortalama yaş ağırlık hem de ortalama kuru ağırlık bakımından en yüksek kallus gelişimi 1,75±0,10 g ile Gamborg B5 ortamından elde edilmiştir. Ancak kallus ortalama ağırlıkları en yüksek parametre olmasına rağmen, Gamborg B5 (Şekil 4.2. B) besi ortamından alınan kallusların morfolojik olarak açık yeşilimsi kahverengi olduğu ve ayrıca kompakt bir tekstüre sahip oluşu nedeniyle test edilen diğer besi ortamları arasında ortalama yaş ve kuru ağırlık bakımından daha düşük ağırlığı veren ancak aranan nitelikte yeşil renk ve dağılgan kallusların oluştuğu MS (Şekil 4.2. A) besi ortamı tercih edilmiştir. SH (Şekil 4.2. C) ve WPM (Şekil 4.2. D) besi

ortamlarının da yine Gamborg B5 besi ortamı gibi kahverengileşmeye yol açtığı dolayısıyla istenen kallus tekstürünü muhafaza edemedikleri ve ayrıca düşük seviyede ağırlık oluşturduğu da tespit edilmiştir.



Sekil 4.2. Farklı besi ortam tiplerinde kültüre alınan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus dokularının gelişimi, Bar: 1 cm (A-MS, B-Gamborg B5, C-SH ve D-WPM besi ortamları).

Her bitki, tür, çeşit ve genotip için *in vitro* çoğaltımda farklı doku kültürü protokolleri gerekmektedir. Doku kültürü protokolü belirlenirken, çalışılan bitkinin besin ortamının kompozisyonu önemli kıstaslar arasında yer alır (Tekdal, 2020). Belirli bir kültür aşaması için optimal tuz formülasyonu kültürün diğer aşamaları için olumlu sonuç vermeyebilir. *In vitro* kültürlerde, azot konsantrasyonunun protein veya aminoasit ürünlerinin miktarı üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Bitki doku kültürü ortamları olan MS ve Gamborg B5'te azot kaynağı olarak daha yüksek nitrat ve amonyum tuzları bulunurken SH ve WPM de ise daha düşük seviyelerde bulunur (Phillips ve Garda 2019). Tuz miktarlarındaki değişiklikler hem kallus oluşumunu hem de bitki sekonder metabolit üretimini etkilemektedir. Örneğin, toplam azot miktarının artması Vitis türlerinde antosiyanin üretimini artırmıştır (Keskin ve Kunter, 2010).

Literatürde bulgularımıza paralel şekilde MS besi ortamının kallus gelişimi üzerinde optimum yanıtlar oluşturduğuna dair *Salvia* türleri üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır. *S. leriifolia* (Modarres ve ark. 2018), *S. officinalis* (Grzegorzcyk ve ark. 2005), *S. santolinifolia* (Jan ve ark., 2018), *S. miltiorrhiza* (Szymczyk ve ark., 2021), *S. nemorosa* (Khoshsokhan ve ark., 2018) ve *S. fruticosa* (Karam ve ark., 2003) türlerinin MS besi ortamında iyi tekstürde kallus dokuları elde edildiği bildirilmiştir. Bunun

yanısıra *S. tomentosa*'da Gamborg B5 besi ortamının (Georgiev ve ark., 2011) nitelikli kallus oluşumunu sağladığı da rapor edilmiştir. Besi ortamları içindeki tuzların miktarlarındaki değişiklikler doku kültürü sırasında bitki genotipinin bazal tuz gereksinimleriyle ve kültür aşamasındaki rolleri ile ilgili de olabildiği ve dolayısıyla farklılık gösterebileceği düşünülmüştür.

4.2.2. Farklı MS besi ortam tipi kuvvetlerinin kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma

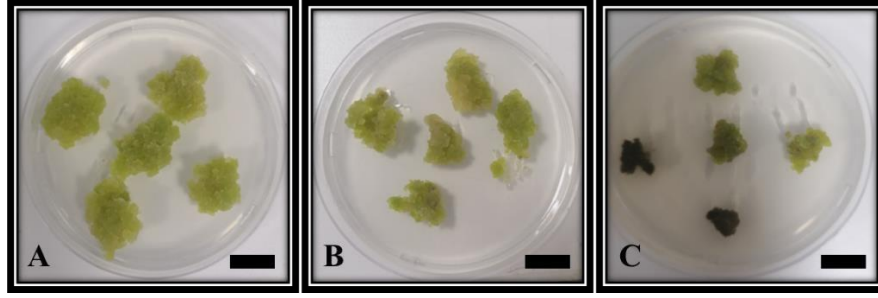
1/2, 1/1 ve 2/1 kuvvette hazırlanan MS besi ortamında kontrollü şartlarda gelişmeye bırakılan kalluslardan ortalama 4. haftanın sonunda elde edilen kallusların, morfolojik verileri **Şekil 4.3 A-B-C** ve taze ve kuru ağırlık değerlerine yönelik istatistiksel veriler ise, **Çizelge 4.3**'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. MS besi ortam tipi kuvvetlerinin *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in kallus gelişimi üzerine etkisi

MS Besi Ortamı	Yaş Ağırlık (*g)	Kuru Ağırlık (*g)	Kallus Morfolojisi
Kuvveti	(Ort±SH)	(Ort±SH)	
1/2	1,30±0,09 a	0,043±0,003 a	Açık yeşil, dağılgan
1/1 (Kontrol)	1,31±0,10 a	0,042±0,003 a	Açık yeşil, yumuşak
2/1	0,69±0,06 b	0,027±0,003 b	Açık yeşilimsi kahve, kompakt

*Her denemede ortama 50 eksplant kullanıldı.

Elde edilen veriler ışığında, 1/2 ve 1/1 kuvvette hazırlanan besi ortamında gelişmeye bırakılan kallusların, ortalama 4. hafta sonunda elde edilen yaş ve kuru ağırlıkları arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmemiştir. Ancak en yüksek ortalama yaş ağırlık (1,31±0,10 g) 1/1kuvvette hazırlanan MS besi ortamından elde edilirken (**Şekil 4.3. B**), en yüksek ortalama kuru ağırlık ise (0,043±0,003 g), 1/2 kuvvette hazırlanan MS besi ortamından elde edilmiştir. Açık yeşil, dağılgan kallusların ise yine 1/2 kuvvette hazırlanan MS besi ortamına ait olduğu görülmüştür (**Şekil 4.3. A**). 2/1 kuvvette hazırlanan besi ortamındaki kalluslarda kahverengileşme meydana gelmiş ve büyümenin diğer parametrelere oranla çok daha az olduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.3. C**).



Sekil 4.3. Farklı MS besi ortam tipi kuvvetlerinde kültüre alınan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus dokularının gelişimi, Bar:1 cm. (A-1/2MS, B-1/1MS, C-2/1MS).

Ortamın optimizasyonu, kallus dokularının geliştirilmesinin ana noktalarından biridir. Bu bağlamda MS besi ortamları en yaygın olarak kullanılan ortamlardan biridir. Çeşitli araştırmacılar tarafından, yüksek şeker konsantrasyonlarının büyümeyi önleyici bir etkisi olduğu öne sürülmüştür (Ciereszko, 2018). Kültür ortamında daha yüksek sükroz konsantrasyonlarının, dokularda nekroza ve fenolik bileşiklerin konsantrasyonunda bir artışa yol açtığı üç şeker pancarı (*Beta vulgaris*) hattında yapılan bir çalışmada rapor edilmiş ve sürgün rejenerasyonunda keskin bir düşüş gözlenmiştir (Setiaji ve ark., 2020). Karbon kaynakları, ortamın su potansiyelini etkileyerek hücre büyümesini etkileyebilir. Bu faktör çok önemlidir, çünkü karbon kaynakları mineral ve su bileşenlerinin bitki dokularına hareketini belirler ve ayrıca bitki hücreleri için turgoru sağlar (Buah et al., 2011). Nitekim çalışmamızda, 2/1 kuvvette hazırlanan MS besi ortamı da yer yer kararma ve kahverengileşmeye yol açarak kallus gelişimini olumsuz yönde etkilemiştir. 1/2 kuvvetteki MS ortamının ise, ortamdaki fenolik ve toksik bileşik üretimini azaltabildiği bildirilmiştir (Sagharyan ve ark., 2020). *S. splendens* (Kabir ve ark., 2014), *S. brachyodon* (Misic ve ark., 2006) ve *S. officinalis* (Grzegorzcyk ve ark., 2005) *in vitro* doku kültürü çalışmalarında 1/2 kuvvette MS ortamı kullanılmıştır.

4.2.3. Farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonlarının kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma

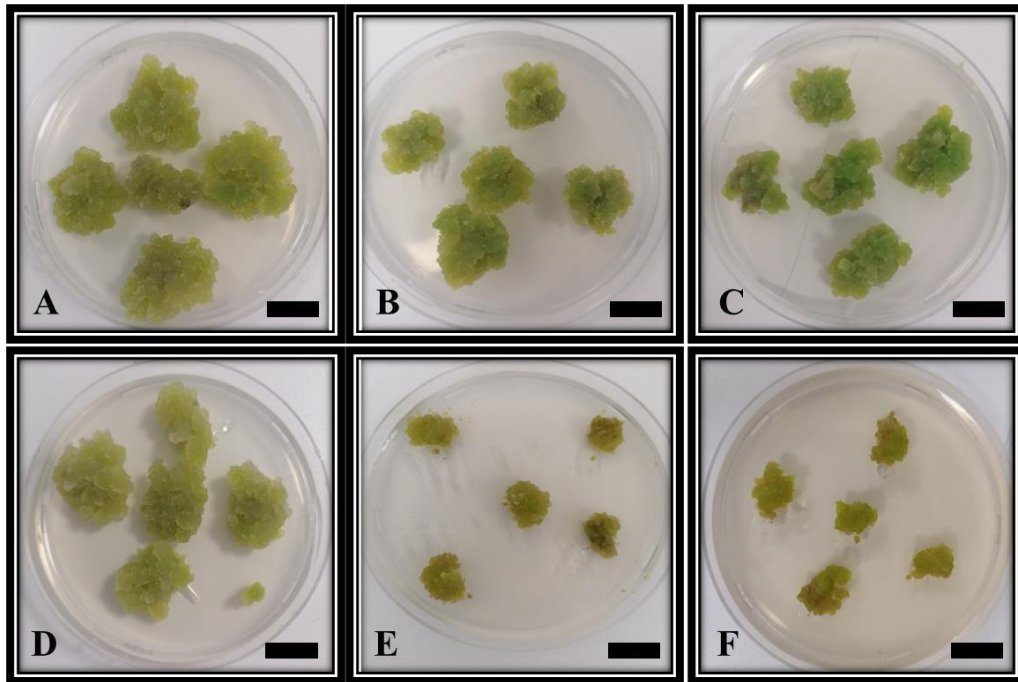
Sükroz ve glukozun 15, 30 ve 45 g/l'lik konsantrasyonlarına ortalama 4 hafta süresince bırakılan kallusların gelişimine ait morfolojik veriler **Şekil 4.4 A-B-C-D-E-F** ve istatistiksel veriler ise, **Çizelge 4.4**'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonlarının *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in kallus gelişimi üzerine etkisi

Karbon Kaynağı ve Kuvveti (g/l)	Yaş Ağırlık (*g) (Ort±SH)	Kuru Ağırlık (*g) (Ort±SH)	Kallus Morfolojisi
Sükroz 15	2,03±0,07 a	0,040±0,001 c	Yeşil, dağınık
Sükroz 30 (Kontrol)	1,40±0,07 c	0,049±0,002 b	Yeşil, yumuşak
Sükroz 45	1,43±0,05 c	0,068±0,002 a	Koyu yeşil, yarı-kompakt
Glukoz 15	1,60±0,07 b	0,037±0,001 c	Yeşil, yarı-dağınık
Glukoz 30	0,26±0,02 d	0,012±0,001 d	Açık yeşilimsi kahve, kompakt
Glukoz 45	0,41±0,02 d	0,015±0,001 d	Açık yeşilimsi kahve, kompakt

*Her denemede ortama 50 eksplant kullanıldı.

Çizelge 4.4. incelendiğinde, genel anlamda sükroz ilave edilen kültür ortamlarında daha fazla biyokütleyle sahip kallusların varlığı dikkati çekmiştir. Ayrıca her iki karbon kaynağı bakımından da artan konsantrasyonların morfolojik olarak kompakt bir yapıya ve yer yer kararmalara yol açtığı gözlenmiştir. 15 g/l sükroz içeren kallus gelişim ortamında en yüksek ortalama yaş ağırlık ($2,03\pm0,07$ g) elde edilirken (**Şekil 4.4 A**), 45 g/l sükroz içeren kallus gelişim ortamında ise en yüksek ortalama kuru ağırlık ($0,068\pm0,002$ g) elde edilmiştir (**Şekil 4.4 C**). Yeşil ve dağınık tekstürde aranan nitelikte iyi kalluslar, yine 15 g/l sükroz içeren kallus gelişim ortamında oluşmuştur.



Sekil 4.4. Farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonlarında kültüre alınan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus dokularının gelişimi, Bar: 1cm. (A-15 g/l sükroz, B-30 g/l sükroz, C-45 g/l sükroz, D-15 g/l glukoz, E-30 g/l glukoz, F-45 g/l glukoz).

Nispeten yüksek seviyede (30 ve 45 g/l) glukoz ilave edilen kültür ortamlarında gelişen kallusların ortalama yaş ve kuru ağırlık bakımından istatistiksel olarak herhangi bir fark göstermediği, bunun yanısıra kahverengileşme ile beraber yer yer kararmalar sergilediği görülmüştür (**Şekil 4.4 D-E**). En düşük ortalama kallus yaş ($0,26 \pm 0,02$ g) ve kuru ağırlığı ($0,012 \pm 0,001$ g) da 30 g/l glukoz destekli kallus kültür ortamından elde edilmiştir. Ancak düşük seviyede (15 g/l) glukoz içeren besi ortamında ise, açık yeşil ve yarı-dağılgan özellikteki kallusların meydana geldiği tespit edilmiştir.

Sükroz, bulunabilirliği ve diğer karbon kaynaklarına göre daha ucuz fiyatı nedeniyle bitki doku kültüründe en yaygın kullanılan karbon kaynaklarından biridir. Sükrozun hücrelerdeki etkisi, hücrelerde yeterli karbon talebinin fotosentez sürecini engelleyebileceğidir (Lobo ve ark., 2015). Öte yandan, kullanılan karbon kaynağı ve konsantrasyonu da kallus kültürlerinde strese neden olabilir. Sükroz, glukoz ve fruktoz oluşturmak için hızla hidrolize edilebilir. Bu işlemler ortamın ozmolalitesini artırır. Sükrozla muamele edilmiş ortam, bitki hücrelerine difüzyon ve ozmoz süreçleri yoluyla girebilir. Shahnewaz ve Bari (2004) çalışmalarında sükroz konsantrasyonunun etkisinin, karbon kaynağı olarak kullanılmasından ziyade ortamın ozmotik potansiyeline katkısından kaynaklanabilecek kallus indüksiyon sıklığının artışı etkilediğini ortaya koymuştur. *S. tomentosa* (Georgiev ve ark., 2011) kallus kültürü ve *S. brachyodon* (Misic ve ark., 2006) mikroçoğaltım çalışmalarında 30 g/l sükroz kullanılmıştır. Costa ve ark. (2015)'nin yaptığı bir başka çalışmada ise, *S. hispanica* tohumların 30 g/l sükroz içeren MS sıvı ortamında sükroz içermeyen ortamlara kıyasla daha yüksek çimlenme sergilediğini bildirmiştir. Çalışmamızda istenen tekstürde kallusların oluşumu için kullanılan karbon kaynağı bakımından önceki bulgular ile uyum içerisindedir. Ancak optimum konsantrasyon miktarı 15 g/l olarak bulunmuştur.

4.2.4. Farklı ışık yoğunluklarının kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma

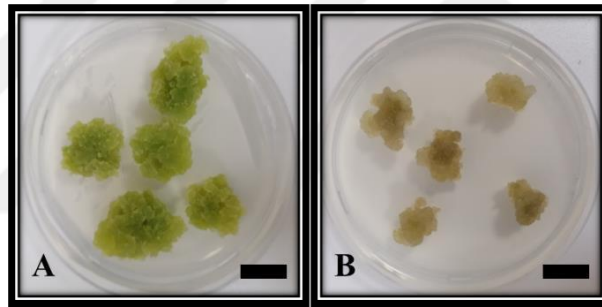
Farklı ışık yoğunluklarının kallus gelişimine etkisinin belirlenebilmesi amacıyla ortalama 4 hafta süreyle karanlık ve aydınlık ortamlarda gelişime bırakılan kallusların ortalama yaş ve kuru ağırlıkları her bir deneme için ayrı ayrı kaydedilerek istatistiksel olarak hesaplanmış ve elde edilen veriler **Çizelge 4.5'**te, morfolojik bulgular ise, **Şekil 4.4. A-B'**de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Farklı ışık yoğunluklarının *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in kallus gelişimi üzerine etkisi

Işık Yoğunluğu	Yaş Ağırlık (*g) (Ort±SH)	Kuru Ağırlık (*g) (Ort±SH)	Kallus Morfolojisi
Aydınlık (Kontrol)	1,74±0,11 a	0,056±0,003 a	Yeşil, dağınık
Karanlık	0,46±0,04 b	0,011±0,001 b	Açık kahve, kompakt

*Her denemede ortama 50 eksplant kullanıldı.

Çizelge 4.5. doğrultusunda aydınlık ve karanlık ortam şartlarının istatistiksel ve morfolojik olarak oldukça farklı yanıtlar verdiği gözlenmiştir. Aydınlık koşullar, kallusların gelişimi bakımından pozitif etki göstermiş olup hem yeşil ve dağınık (**Şekil 4.4. A**) özellikle nitelikli kallusların oluşumuna yol açarken, hem de biyokütle (ort. yaş ağırlık: 1,74±0,11 g; ort. kuru ağırlık: 0,056±0,003 g) bakımından çok daha yüksek sonuçlar vermiştir. Karanlık ortam şartları ise, kalluslarda hem kahverengileşmeye hem de daha düşük ortalama yaş ve kuru ağırlığa sahip kallus oluşumuna neden olmuştur.



Sekil 4.5. Farklı ışık yoğunluklarında kültüre alınan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus dokularının gelişimi, Bar: 1cm. (**A**-Aydınlık, **B**-Karanlık).

Belirli niteliklere sahip ışığın, kallus dokularının büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde işlev gördüğü bilinmektedir (Sıddique ve Islam 2015). *S. officinalis* apikal sürgünlerinin eksplant kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada, kültürlerin 1 hafta karanlık ve 4 hafta aydınlık koşullarda bırakıldıktan sonra kallus dokularının meydana geldiği bildirilmiştir (Tawfik ve Mohamed, 2007). *S. miltiorrhiza* aksenik yapraklarından kallus başlatılması çalışmalarında, kültüre alınan eksplantların etrafı folyo ile kaplanarak 1 ay boyunca karanlık şartlarda kültürlendiği, altkültürlemenin ise 20 günde bir yine tamamen karanlık koşullarda yapıldığı ve kallus oluşumunun gözlemlendiği rapor edilmiştir (Szymczyk ve ark., 2021). Yukarıda verilen ve *Salvia* türlerinde yapılan bu çalışmaların aksine karanlık ortam koşullarının *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in kallus gelişimi üzerine olumsuz yönde bir etki gösterdiği, ayrıca morfolojik olarak da kahverengileşmeye yol açtığı görülmüştür. Keza ışık koşullarının *S. hispanica*

eksplantlarında yeşil, dağınık ve hızlı büyüyen kallus oluşumunu teşvik ettiği Marconi ve ark., (2013) tarafından bildirilmiş olup elde edilen sonuçlar bu kapsamda bulgularımız ile paralellik göstermektedir.

4.2.5. Farklı pH uygulamalarının kallus gelişimine ait bulgular ve tartışma

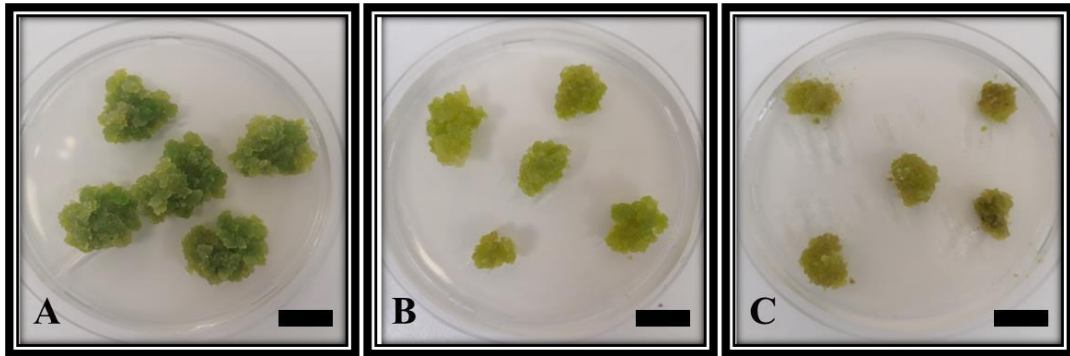
Farklı pH derecelenmelerinde (4.5, 5.8 ve 7.0) kültüre alınan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kalluslarının ortalama 4. hafta sonunda gelişimlerine ait morfolojik veriler Şekil 4.6 A-B-C’de, ortalama yaş ve kuru ağırlıklarına ait istatistiksel veriler ise Çizelge 4.6’da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Farklı pH uygulamalarının *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*’in kallus gelişimi üzerine etkisi

pH	Yaş Ağırlık (*g) (Ort±SH)	Kuru Ağırlık (*g) (Ort±SH)	Kallus Morfolojisi
7	1,46±0,07 a	0,053±0,002 a	Koyu yeşil, dağınık
5,8 (Kontrol)	0,72±0,03 b	0,031±0,002 b	Yeşil, yumuşak
4,5	0,51±0,02 c	0,027±0,006 b	Açık kahverengimsi yeşil, kompakt

*Her denemede ortama 50 eksplant kullanıldı.

Yukarıda verilen çizelge irdelendiğinde, uygulanan pH derecelenmelerine bağlı olarak üç farklı kallus dokusunun (dağınık, yumuşak ve kompakt) geliştiği görülmektedir. İstenen özellikte yeşil ve dağınık tekstürde ve biyokütle bakımından da en yüksek kallusların nötr pH ortamında (pH 7) oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.6 A). Besi ortamının asitliği yükseldikçe ise, ortalama yaş ve kuru ağırlıklarında düşüş meydana gelmiştir. Uygulamalar arasında en asidik ortam olan pH 4,5 uygulamasında, artık kahverengileşmenin başladığı ve yer yer kararmaların oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6 C). Ortalama kuru ağırlık bakımından pH 5,8 ve 4,5 uygulamaları arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4.6. Farklı pH uygulamalarında kültüre alınan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus dokularının gelişimi, Bar: 1cm. (A-pH 7, B- pH 5,8 ve C- pH 4,5).

Bitki hücreleri ve dokuları, kültürlerde büyüme ve gelişme için optimum bir pH gerektirir. pH, bitkilerde besin alımının yanı sıra enzimatik ve hormonal aktiviteleri etkiler. Optimum pH seviyesi, hücre bölünmesini ve sürgünlerin büyümesini etkileyen sitoplazmik aktiviteyi düzenler. Hücrelerin aşırı düşük pH'ya maruz kalması, hücre dışı bölgede inorganik fosfatın organik fosfata dönüştürülmesine yol açar. Buna ayrıca ATP'lerde bir azalma eşlik eder ve bu da bitki büyümesinin gerilemesine neden olur. pH ayrıca bir ortamdaki katılaştırıcı maddenin durumunu da etkiler. Bu nedenle, pH seviyesi sürgün rejenerasyonunu doğrudan etkilediğinden, kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu için pH seviyesinin optimize edilmesi gereklidir (Rashid ve ark., 2018).

Salvia türleri üzerine yapılan kallus çalışmalarında genellikle pH 5,5-5,8 aralığı kullanıldığı bildirilmiştir (Krajewska-Patan ve ark., 2007; Szymczyk ve ark., 2021; Jan ve ark., 2021; Bano ve ark., 2022). Oysa ki çalışmamızda *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in kallus morfolojisi ve biyokütlesi üzerine optimum pH aralığı 7 olarak tespit edilmiş olup ilgili literatür bulgularından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Genellikle ortam, kullanılan bitki türüne ve amaca bağlı olarak belirli bir pH'ya ayarlanır. Ortamın pH'sı genel olarak 5.5-6.0 olarak önerilse de bu konuda çok fazla araştırma bildirilmemiştir Nitekim Elma doku kültürü için nispeten geniş bir pH aralığı (5.5-7.5) uygun bulunmuştur (Shi ve ark., 2017).

4.2.6. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonu

Yukarıda tek tek değinildiği üzere bu tez kapsamında öncelikle *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu üzerine pek çok çalışma uygulanmıştır. Geliştirilen kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonunu ifade eden çalışmalara ait en başarılı uygulama sonuçlarına ait veriler bir bütün halinde **Çizelge 4.7'** de sunulmuştur.

Deney süresince *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* tohumlarından yüksek biyokütle ve istenen tekstürde yeşil ve dağılgan kallusların oluşması için ortam kombinasyonlarının aydınlık koşullarda, 15g Sükroz, 1 mg/l TDZ – 1 mg/l IBA BBD kombinasyonlarını içeren, 6.2 g agar destekli, ½ kuvvette hazırlanmış ve pH 7'ye ayarlanmış MS besi ortamı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.7. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* eksplantlarından gelişen kallus kültürlerinde büyümenin karakterizasyonu

Uygulama Tipi	En Başarılı Uygulama	Uygulama sonucu		
		Max. Ort. Yaş Ağırlık (g)	Max. Ort. Kuru Ağırlık (g)	Kallus Morfolojisi
Besi Ortamları ve Konsantrasyonları	1 mg/l TDZ+ IBA	2,69±0,11	0,082±0,003	Koyu yeşil, dağınık
Besi Ortam Tipleri	MS	1,36±0,09	0,050±0,003	Yeşil, dağınık
MS Besi Ortam Kuvveti	1/2	1,30±0,09	0,043±0,003	Açık yeşil, dağınık
Karbon Kaynağının Tipi ve Konsantrasyonları	15g Sukroz	2,03±0,07	0,040±0,001	Yeşil, dağınık
Işık Yoğunlukları	Aydınlık	1,74±0,11	0,056±0,003	Yeşil, dağınık
pH	7	1,46±0,07	0,053±0,002	Koyu yeşil, dağınık

*Her denemede ortama 50 eksplant kullanıldı.

4.3. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular ve Tartışma

4.3.1. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini ile antioksidan aktivite çalışmalarına ait bulgular ve tartışma

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin toplam fenolik miktarı Pirokatekole, toplam flavonoid miktarı ise kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Ekstreya ait toplam fenolik ve flavonoid içerikleri (IC₅₀) ile antioksidan aktivitelerine ait sonuçlar Çizelge 4.8’de sunulmuştur.

Çizelge 4.8 incelendiğinde, ekstreya ait toplam fenolik içerik 52.65±1.87 µg PEs/mg, toplam flavonoid içeriği ise, 16.19±0.81 µg QEs/mg olarak bulunmuştur. Fenolik bileşikler, çeşitli bitki türlerinde bulunan ve çeşitli hastalıklara karşı yararlı olan düşük moleküler ağırlıklı antioksidan bileşiklerdir. Flavonoidler ise, antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar ve antialerjik aktivitelere sahip fenolik bileşiklerin bir sınıfıdır. Fenolik ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşikler, elektron verici olarak işlev görür ve serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürür (El-Beltagi ve ark., 2019; Bano ve ark., 2022). *Salvia* türlerinin içerdikleri fenolik bileşikler ve yüksek antioksidan etkileri nedeniyle son yıllarda birçok araştırmaya konu olduğu bilinmektedir. In vivo *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türü için toplam fenolik ve flavonoid içerik bakımından yaprak ekstresinin daha zengin olduğu tespit edilmiştir (Balur Adsız 2018). *S. tebesana* kalluslarında BBD kombinasyonlarının polifenol, fenolik asit ve flavonoid bileşiklerin artışına yol açtığı bildirilmiştir (Hemmati ve ark., 2020). *S. verticillata* L. var. *amasiaca*’nın total fenolik içeriği 119.45 mgGAE/g, *S. microstegia*’nın ise, 118.08 mg GAE /g olduğu bildirilmiştir (Erbil ve Dıgrak, 2015). *S. virgata* metanol ekstrelerinin ise,

fenolik bileşen ve özellikle rosmarinik asit bakımından yüksek seviyede olduğu rapor edilmiştir (Karatoprak ve ark., 2016). Son çalışmalar fenolik bileşiklerin önemli antioksidan aktivitelerini ve gıda endüstrilerinde doğal antioksidanlar olarak uygulamalarının avantajlarını açıkça göstermiştir (Ghorbanpour 2015). Bahsi geçen çalışmalara paralellik gösterecek şekilde, *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kalluslarının fenolik bileşikler bakımından aktif ve antioksidan özelliğe sahip olduğu dikkate alınarak biyoteknolojik tabanlı bazı çalışmalar ile gıda koruyuculuğu olan bu bileşiklerin miktarlarının artırılması yoluna gidilebilir.

Çizelge 4.8. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus ekstresine ait toplam fenolik ve flavonoid içerikleri^a ile antioksidan aktiviteleri

Örnek	Toplam fenolik içeriği (μg PEs/mg) ³	Toplam flavonoid içeriği (μg QEs/mg) ⁴	Antioksidan Aktivite ($\mu\text{g/mL}$)		
			DPPH (IC_{50})	ABTS (IC_{50})	CUPRAC ($\text{A}_{0.5}$)
Ekstrakt	52.65 $\pm$ 1.87	16.19 $\pm$ 0.81	90.24 $\pm$ 1.13	56.80 $\pm$ 1.09	56.98 $\pm$ 1.03
BHT	-	-	50.69 $\pm$ 1.44	14.87 $\pm$ 0.93	10.56 $\pm$ 0.38
α -TOC	-	-	15.28 $\pm$ 0.98	9.15 $\pm$ 0.29	15.20 $\pm$ 0.67

a: Sonuçlar IC_{50} değerleri olarak, 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

b: Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik. ($y = 0.0548(\mu\text{g}) + 0.0333$ ($r^2: 0.9949$))

c: Kersetine eşdeğer flavonoid içerik. ($y = 0.0398$ (μg) + 0.0039 ($r^2: 0.9936$))

Çizelge 4.8’de görüldüğü üzere, *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus ekstresinde antioksidan aktivite tayini 3 farklı yöntemle (DPPH, ABTS ve CUPRAC) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan ekstrenin DPPH serbest radikal giderme ve ABTS katyon radikal giderme aktiviteleri, mevcut serbest radikallerin %50’sini temizlemek için gereken konsantrasyon olarak tanımlanan IC_{50} değeri olarak hesaplanmıştır. Aktivite sonuçları standart olarak kullanılan BHT ve α -TOC’ün serbest radikal giderme aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Her üç metotta da kontrol ekstrelerinin antioksidan özellik sergilediği, ancak sözkonusu aktiviteler arasında DPPH ve ABTS değerlerinin karşılaştırılan standartlara oranla daha düşük, ancak Cu^{+2} indirgeme kapasitesi bakımından ise 56.98 $\pm$ 1.03 $\mu\text{g/mL}$ değeri ile standartlara oranla oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Karatoprak ve ark., (2017) tarafından *S. virgata* sulu metanol ekstresinin (IC_{50} : 0.20 mg/ml), sulu ekstresine kıyasla (IC_{50} : 0.16 mg/mL) daha aktif DPPH aktivite gösterdiği bildirilmiştir. DPPH, ABTS ve FRAP analizlerine göre Sırbistan orjinli *S. officinalis* toprak üstü kısımlarına ait ekstrelerinin doğal bir antioksidan kaynağı olabileceği rapor edilmiştir (Duletic ve ark., 2016). *S. halophila*, *S. tomentosa*, *S. heldreichiana* ve *S. dichroantha* türlerine ait bitkilerin toprak üstü

kısımlarının ekstraktlarının *in vitro* antioksidan kapasitelerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise söz konusu türlerin antioksidan kapasite değeri bakımından birbirine yakın sonuçlar verdiği ancak en yüksek aktivitenin *S. heldreichiana* (80.207 mg GAE/g)'ya ait olduğu belirtilmiştir (Er, 2012). *Salvia* türleri üzerine yapılan antioksidan çalışmaların sayısını attırmak mümkündür. Genel anlamda antioksidan özellik göstermeleri türlerin içerdikleri fenolik bileşiklere atfedilmektedir. Nitekim *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus ekstresinin de yukarıda verilen çalışmalarda değinildiği üzere fenolik bileşiklerine ait bulgularının antioksidan kapasiteleri ile pozitif bir korelasyon sergilediği görülmüştür.

4.3.2. Enzim inhibisyonu aktivite çalışmalarına ait bulgular ve tartışma

4.3.2.1. Antikolinesteraz aktiviteye ait bulgular ve tartışma

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin antikolinesteraz aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. irdelendiğinde, kontrol grubu olarak test edilen *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus etanol ekstresinin asetilkolinesteraz aktivite için herhangi bir yanıt oluşturmadığı görülmüştür. Enzim inhibisyon yüzdelere ait maksimum sonuçlar, standart olarak kullanılan galantamin (AChE % 87,54±1,68; BChE % 81,37±1,29)'den elde edilmiştir.

Çizelge 4.9. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus ekstresine ait antikolinesteraz aktivitesi (% inhibisyon^a)

Örnek	AChE	BChE
Ekstrakt	AD	AD
Galantamin ^b	87.22±1.68	81.37±1.29

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (50 µg/mL).

b: Standart madde, A.D.: Aktif değil

Ön beyin kolinerjik sisteminin öğrenme ve hafızadaki rolü oldukça önemlidir. ACh, öğrenme ve hafıza işleyişi için önemli olan uyarılma ve dikkat gibi bir dizi bilişsel/davranışsal süreci düzenler. ACh, öğrenme ve bellek işleme ile ilgili davranışların üretiminde merkezi bir role sahip olmaktan çok modülatör bir role sahiptir. Çoğu farmakolojik olarak araştırılmamış olmasına rağmen, Çin bitkisel ilaçlarında kullanılan birçok reçetede depresyon, epilepsi ve yaşa bağlı hafıza kaybı gibi bozuklukların tedavisi için *Salvia* türlerinin kullanıldığı bildirilmiştir (Jia ve ark., 2018; Lin ve Hsieh, 2021). *S. officinalis* etanol ekstrelerinin sıçanlarda hafıza tutulmasını arttırmış ve pilokarpin ve nikotin hafıza gelişimini güçlendirmiştir (Eidia ve ark., 2006). *S. cryptantha* (Orhan ve ark., 2013) diklorometan ve etanol ekstreleri ile *S. pseudoeuphratica* (Temel ve ark., 2016)

ekstresinin hem AChE hem de BChE aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Antikolinesteraz bulgularımıza kısmen benzerlik gösterecek şekilde *In vivo* yetişen *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* dal kısmından hazırlanan etanol ekstresinin araştırıldığı bir çalışmada, asetilkolinesteraz aktivitesinin bulunmadığı fakat düşük derecede butirilkolinesteraz enzim aktivitesi gösterdikleri bildirilmiştir (Balur Adsız, 2018).

4.3.2.2. Tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyon aktivitesine ait ait bulgular ve tartışma

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyon aktivitelerine ait sonuçlar **Çizelge 4.10.**'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10.'da görüldüğü üzere, en yüksek tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyon aktiviteleri sırasıyla standart olarak kullanılan kojik asit (% 87.43±1.38) ve tiyoüre (% 97.12±1.53)'den elde edilmiştir. Örneğimiz olan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin ise kojik asit ile kıyaslandığında düşük oranda ve sadece antitirozinaz aktiviteye sahip olduğu (% 4.27±0.01) antiüreaz aktivite bakımından ise aktif olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.10. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus ekstresine ait tirozinaz ve üreaz aktivitesi (% inhibisyon^a)

Örnek	Tirozinaz	Üreaz
Ekstrakt	4.27±0.01	AD
Kojik Asit ^b	87.43±1.38	-
Tiyoüre ^b	-	97.12±1.53

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (50 µg/mL).

b: Standart madde, A.D.: Aktif değil

Tirozinaz (EC 1.14.18.1) memelilerde, bitkilerde, bakterilerde ve mantarlarda bulunan bakır içeren bir enzimdir ve melanin oluşumu için kilit rol oynar. Memelilerde cilt ve saç renginden sorumlu pigmenti oluşturur ve cildin ultraviyole (UV)'ye karşı korunmasında rol oynar (Chai ve ark., 2018). Ek olarak, tirozinazın etkisiyle meyve, sebze ve içeceklerin enzimatik esmerleşmesi, besin ve organoleptik kalitelerinin kaybına yol açar ve gıda endüstrisinde büyük bir sorun teşkil edebilir (Kim ve Uyama 2005). Antioksidan özelliklere sahip tirozinaz inhibitörleri bu nedenle farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde çeşitli uygulamalara sahip olabilir. Nitekim bulgularımız kapsamında *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin düşük te olsa tirozinaza karşı bir inhibitör etki gösterdiği ifade edilmiştir. El

Aanachi ve ark. (2021) ise, *S. officinalis*'in sırasıyla $20.43 \pm 1.39 \mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri ile tirozinaz üzerinde standart olarak kullanılan kojik asitten daha güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğunu saptamıştır. Ayrıca *S. modesta* üzerine yapılan bir çalışmada ise türün metanol ekstraktlarının yüksek miktarda antitirozinaz aktivite gösterdiği Zengin ve ark. (2019) tarafından belirlenmiştir. Söz konusu aktivite sonuçlarının da, enzimin inhibisyonuna katkıda bulunan flavonoidler, tanenler ve aldehitler gibi farklı moleküllerin varlığı ile açıklanabileceği bildirilmiştir (Chang 2009, Suntar ve ark., 2011).

Üreaz (EC 3.5.1.5; üre amidohidrolaz) bir dizi bitki, mantar, bakteri ve omurgasız tarafından üretilen bir enzimdir ve ürenin amonyağa hidrolizinde rol oynar (Hassan ve Žemlička, 2016) *H. pylori* başta olmak üzere bazı insan ve hayvan patojenlerinin üreolitik aktivitesi, bazı durumlarda kansere yol açabilen gastrit ve üriner rahatsızlıkların nedeni olarak kabul edilir (Upadhyay, 2012). Midede üreden amonyak oluşumu pH'ın yükselmesine neden olur ve bu nedenle bakteriler için ideal büyüme koşullarını sağlar ve hayatta kalmalarını sağlar (Kosikowska ve Berlicki, 2011). Üreazın *H. pylori* üzerindeki önemli rolü ve tarımsal ürünler üzerindeki olumsuz etkisi, *H. pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde ve tarımsal amaçlar için üreaz inhibitörlerini bulmak ve tanımlamak için çeşitli çalışmaların yapılmasına neden olmuştur. Yine, bu kapsamdaki bulgularımız *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin ilgili aktivite için uygun olmadığı ancak literatürde *S. officinalis* ve *S. poculata*'nın (Yener, 2020) üreaza karşı oldukça fazla inhibitör etki gösterdiğini ve dolayısıyla bu bitkilerden yararlanılabileceği rapor edilmiştir.

4.3.2.3. Elastaz ve kollajenaz enzim inhibisyon aktivitesine ait bulgular ve tartışma

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin elastaz ve kollajenaz enzim inhibisyon aktiviteleri ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.11.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.11.'de görüldüğü gibi, elastaz ve kollajenaz enzim inhibisyon aktiviteleri için sırasıyla oleanolik asit ve epikateşin gallat standart olarak kullanılmıştır. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin elastaz enzim inhibisyonu için herhangi bir aktivite göstermezken, antikollajenaz aktivite bakımından ise aktif olduğu ve bu aktif değer 16.48±0.19 %inhibisyon değeri ile Epikateşin gallat ile mukayese edildiğinde daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus ekstresine ait elastaz ve kollajenaz aktivitesi (% inhibisyon^a)

Örnek	Elastaz	Kollajenaz
Ekstrakt	AD	16.48±0.19
Oleanolik Asit ^b	62.25±1.76	-
Epikateşin gallat ^b	-	86.11±1.19

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (50 µg/mL).

b: Standart madde, A.D.: Aktif değil

Matriks metalloproteinleri olan elastaz özellikle elastinin, kollajenaz ise özellikle kollajenin parçalanmasından sorumludur (Imokawa ve Ishida, 2015). Bu enzimlerin yanlış düzenlenmesi cildin yaşlanma süreçlerinde rol oynar. Aslında, dermal elastin lif ağının aşırı hidrolizi, cilt elastikiyetinin kaybolmasına ve bunun sonucunda cilt sarkmasına neden olur. Temelde, elastaz ve kollajenaz inhibitörleri, cilt elastikiyetinin korunmasını destekleyen kırışıklık önleyici aktiviteye sahiptir. Bitkilerden elde edilen doğal ürünler, içsel cilt yaşlanma süreçlerini yavaşlatma ve dışsal olanlara zıtlık oluşturma yetenekleri nedeniyle kozmetik veya kozmetik içerik maddeleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkilerin yaşlanma karşıtı özellikleri genellikle serbest radikal aktiviteyi en aza indiren ve cildi güneş ışınlarına karşı koruyan antioksidan metabolitlerine atfedilir (Sahu ve ark., 2013). Yapılan literatür taramalarında *S. poculata*'nın etanol ekstrelerinin orta seviyede antielastaz aktivite gösterirken, bulgularımıza benzerlik gösterecek şekilde *S. ekimiana*'nın ise metanol, etil asetat ve n-butanol ekstrelerinin elastaz üzerinde herhangi bir inhibe edici aktivite göstermediği ancak kollajenaz üzerinde önemli bir inhibitör aktivite sergilediği bildirilmiştir.

4.3.24. Antihipertansif aktiviteye ait bulgular ve tartışma

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* kalluslarından elde edilen etanol ekstresinin antihipertansif aktiviteleri ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12'ye göre, kontrol ekstresinin antihipertansif aktivite sergilediği, ancak bu aktivitenin standart olarak kullanılan lisinopril'e karşı düşük değerde kaldığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus ekstresine ait antihipertansif aktivite (% inhibisyon^a)

Örnek	ACE
Ekstrakt	15.44±0.12
Lisinopril ^b	99.10±2.23

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (50 µg/mL).

b: Standart madde

Kardiyovasküler hastalıklar, erken ölümün önemli bir nedeni olduğundan temel bir toplumsal sağlık sorunu oluşturur. Yüksek tansiyon genetik ve çevresel bileşenlerin etkileşimi de dâhil olmak üzere bir dizi faktör tarafından tetiklenir. Hipertansiyon dünya çapında yıllık yaklaşık %16.5 ölümden sorumludur. Hastalığın tedavisinde ACE inhibitörleri, beta-blokörleri ve kalsiyum kanalı bloke edicileri gibi çeşitli antihipertansif ilaçlar kullanılmakta olup hastalık semptomları ve ilaçların yan etkilerini azaltmak amacıyla yeni terapötiklerin araştırılması önem arz etmektedir. *Salvia* cinsine ait bitkilerin, kafeik asit, rosmarinik asit ve litospermik asit gibi antioksidan fonksiyonlara sahip (Segura-Campos ve ark., 2016) yüksek oranda aromatik bileşikler içeriğinden ACE aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir Pellegrini ve ark., 2016; Poullos ve ark., 2020). Hidroalkolik *S. elegans* ekstrelerinin ise, sistolik kan basıncını önemli ölçüde azalttığı, hatta standart olarak kullanılan Losartandan daha yüksek bir antihipertansif etki gösterdiği rapor edilmiştir (Jimenez-Ferrer ve ark., 2010). Arredondo-Mendoza ve ark. (2020) tarafından ise, *S. hispanica* etanol ekstresinin hipertansif sıçanlarda sağlıklı sıçanlara kıyasla ACE aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır. Test edilen parametre ile ilgili olarak, *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kalluslarının yukarıda değinilen önceki çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür.

4.3.3. Terpenoid bileşiklerin analizine ait bulgular ve tartışma

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* kallus ekstresine ait triterpenoid bileşiklerin çeşit ve miktarı ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.13'te verilmiştir. Çizelge 4.13'te görüldüğü üzere, kallus dokularının incelenen triterpenler arasında en fazla 1172,745 ppm değeri ile oleanonik asiti akabinde ise sırasıyla 878,191 ppm ile oleanolik asit ve 519,113 ppm ile moronik asit triterpenlerini barındırdığı gözlenmiştir. Ancak alfa amirin, betulinik, ursolik ve ursonik asit gibi triterpen çeşitleri ise tespit edilememiştir.

Çizelge 4.13. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* kallus ekstresine ait triterpenoid bileşiklerin çeşit ve miktarı (ppm)

Triterpenoid çeşidi	Triterpenoid miktarı
Alfa Amirin	TE
Moronik Asit	519,113
Oleanonik Asit	1172,745
Oleanolik Asit	878,191
Betulinik Asit	TE
Ursolik Asit	TE
Ursonik Asit	TE

*TE; Tespit edilemedi

Tüm dünyaya dağılmış olan *Salvia* türleri, terpenoidler ve fenolik türevler dâhil olmak üzere çok çeşitli sekonder metabolitler içerir. Tıbbi bitkilerde, meyvelerde ve sebzelerde yaygın olarak bulunan terpenoidler, beş karbonlu izopren biriminden türetilir içerdiği karbon sayısına göre farklı kategorilerde sınıflandırılır. Triterpenoidler ($C_{30}H_{48}$) çeşitli yapılara sahip organik bileşiklerdir ve bugüne kadar 15.000'den fazla türü benzersiz ve potansiyel olarak kullanılabilir biyolojik özelliklere sahiptir (Lewinska ve ark., 2017). Betulinik asit, oleanolik asit ve ursolik asit, geniş biyolojik aktiviteleri nedeniyle oldukça değerli triterpenik asitlerdir (Pai ve ark., 2016). Terpenik asitlerin antienflamatuar, antioksidan, antiHIV, antifungal aktiviteleri içeren çeşitli biyolojik etkileri karakterize edilmiştir. Son zamanlarda, tip 2 diyabet tedavisi için yukarıda değinilen terpenik asitlerin potansiyel etkileri de vurgulanmıştır (Silva ve ark., 2016). Yakın zamanlarda ise, farklı insan kanser hücre hatlarına karşı terpenik asitlerin biyotahlili kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır (Gai ve ark., 2016; Potze ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada *S. multicaulis* toprak üstü kısımlarının maksimum betulinik asit (3.12 ± 0.03 mg/g DW) ve oleanolik asit (1.96 ± 0.05 mg/g DW) içerdiği, *S. officinalis* toprak üstü kısımlarının ise maksimum ursolik asit içerdiği (4.34 ± 0.1 mg/g DW) ve 9 türde ise, (*S. aristata*, *S. atropatana*, *S. candidissima*, *S. hydrangea*, *S. limbata*, *S. mirzayanii*, *S. syriaca*, *S. urmiensis* ve *S. xanthocheila*) betulinik asite rastlanmadığı bildirilmiştir (Abdollahi-Ghehi ve ark., 2019). Bir diğer çalışmada ise, *S. palaestina*'dan 3 sesterterpenoid, 1 triterpen ve 5 diterpen dâhil 9 yeni terpen bileşiği ortaya konmuştur (Cioffi ve ark., 2008). Ertaş ve ark., (2018) 6 *Salvia* türünde 4'ü yeni olmak üzere toplam 52 bileşik elde etmiştir. HPLC ile elde edilen maddelerin çok yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu, özellikle yüksek miktarda elde edilen 6,7-dehidroroyleanon bileşiğinin ve türevi olan asetil royleanon bileşiklerinin elde edilen terpenler içinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. *S. rosifolia* ve *S. cerinopruinosa* var. *elazigensis* türlerin etanol ekstraktlarının bilinen yapıya sahip 39 sekonder metabolit izole edilmiş, 17'sinin fenolik-flavonoid yapıda, 7'sinin abietan tipi diterpen, 4'ünün lupan yapıda olan triterpen yapısında olduğu bildirilmiştir. Ayrıca izole edilen bileşiklerden fenolik bileşiklerin terpenoidal bileşiklere göre daha aktif olduğu belirlenmiştir (Yaris ve ark., 2021). Çalışılan *Salvia* türleri arasındaki terpen bileşiklerin nicel değişkenliği, belirli çevresel ve iklim koşullarının yanı sıra genetik varyasyona da atfedilebilir. Bu bağlamdaki bulgularımız yukarıda değinilen diğer bitkilerden elde edilen ve literatürde bildirilen verilerle benzerlik göstermiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Tıbbi ve aromatik bitkiler, dünya üzerindeki doğal zenginlikler ve kimyasal rezervleri arasındadır. Ne yazık ki, tıbbi bitkilerin pazarlanmasına yönelik artan ilgi, bu doğal kaynaklar için sorunlar yaratmış ve birçok tıbbi türünü risk altında bırakarak tahribata yol açmıştır. Bu nedenle, tıbbi türlerin genetik rezervlerinden yararlanmak ve korumak için, özellikle tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi ve sanayisi nedeniyle bu gereklilik, bu türlerin ıslahı ve tarımsal sistemlere girmesi lehinde görünmektedir. Bu nedenle, bu bitkilerin kimliklerini ve doğalarını çeşitli genetik, kimyasal ve üretim perspektifleri ile değerlendirmek gerekir. Bu nedenle tez çalışmamızda, ülkemizde Elazığ-Pertek yöresinde doğal olarak yetişen ve endemik bir tür olan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* bitkisinden, ilk kez biyoteknolojik olarak kallus kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonunu içeren etkin bir protokol tanımlanmış akabinde kallus kültürlerinden hazırlanan ekstrelerin biyolojik aktiviteleri ortaya konmuştur.

Bu tez kapsamında elde edilen veriler aşağıda ana başlıklar halinde sıralanmıştır;

- Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar (% 5'lik NaOCl-10 dk), 30g süktroz, 1 mg/l TDZ+ IBA ve 6.2 g agar destekli MS besisi ortamına inoküle edildi ve 3. alt kültürlemenin sonunda yeşil ve dağılgan tekstürde kallus dokularının oluştuğu gözlemlendi.

- Aydınlik koşullarda, 15g Süktroz, 1 mg/l TDZ + 1 mg/l IBA içeren, 6.2 g agar destekli, ½ kuvvette hazırlanmış ve pH 7'ye ayarlanmış MS besisi ortamında optimum kallus gelişimi elde edildi.

- Kallus dokularına ait etanol ekstresinin toplam fenolik içeriği $52.65 \pm 1.87 \mu\text{g PEs/mg}$ ve toplam flavonoid içeriği ise, $16.19 \pm 0.81 \mu\text{g QEs/mg}$ olarak bulundu. Ayrıca DPPH ve ABTS değerlerinin karşılaştırılan sırasıyla karşılaştırılan BHT ve α -TOC'e oranla daha düşük, CUPRAC değeri bakımından ise oldukça yüksek aktivite sergilediği ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu görüldü.

- Kallus dokularına ait etanol ekstresinin asetilkolinesteraz aktivite göstermediği ancak karşılaştırılan standarda oranla düşük derecede butirilkolinesteraz enzim aktivitesi gösterdiği ayrıca, kojik asit ile kıyaslandığında düşük oranda antitirozinaz aktiviteye sahip olduğu ancak antiüreaz aktivite göstermediği saptandı.

- Örnek ekstresinin elastaz enzim inhibisyonu için aktif olmadığı ancak düşük seviyede antikollajenaz aktivite gösterdiği ayrıca Lisinoprile karşı düşük değerde antihipertansif aktivite sergilediği tespit edildi.

- Kallus dokularının incelenen triterpenler arasında oleanonik, oleanolik ve moronik asit triterpenlerini barındırdığı ancak alfa amirin, betulinik, ursolik ve ursonik asit gibi triterpen çeşitlerini ise içermediği görüldü.

5.2 Öneriler

Tez konumuz, özellikle tıbbi ve aromatik bitki kategorisinde önemli bir yere sahip Lamiaceae familyasına mensup endemik bir bitki olan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* bitkisinin biyoteknolojik uygulamalarla farmasötik sanayiye kazandırılması ile kallus ve hücre süspansiyon kültürleri gibi biyoteknolojik çalışmalara da temel oluşturması potansiyelinden dolayı önem arz etmektedir.

Literatürde Akdeniz ve ark. (2022), yaptığı çalışmada *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* dâhil olduğu 6 *Salvia* türünün ferruginol, kriptanol, 6,7-dehidroroylenon, lup-(20)29-ene-2 α -hydroxy-3 β -acetate, salvigenin ve β -sitosterol bileşikleri bakımından oldukça zengin oldukları ve bu türlerin bu bileşenler için kaynak tür olarak çoğaltılmaları gerektiğini belirtmişlerdir. Bu yüzden bu türün bu bileşenlerin eldesi için biyoteknolojik olarak çoğaltılması ayrı bir önem kazanmıştır.

Optimize edilmiş kallus kültürleri sekonder metabolit sentezi için alternatif bir yöntem olup bu kültürler üzerinde denenecek öncül ve elisitör uygulamaları ile mevcut olan değerli sekonder metabolitlerin de artışına yol açabilecek bir platform oluşturmaktadır. Endüstride etken madde olarak kullanılabilecek aday maddelerin belirlenmesinin sağlanması ülke kaynaklarının potansiyel ilaç ham veya katkı maddesi eldesi için kullanılmasına ve bu yolla ülkemizin sürdürülebilir kalkınmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelkader, M., Ahcen, B., Rachid, D., Hakim, H., 2014, Phytochemical Study and Biological Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.). Int J Biol Biomol Agric Food Biotech Engin, 8 (11): 1253-1257.
- Abdollahi-Ghehi. H., Ali, Sonboli., Samad, N.E., Esmaeili, M.A., Mohammad, 2019, Hossein Mirjalili Triterpenic Acid Content and Cytotoxicity of Some *Salvia* Species From Iran Hoda Natural Product Communications:1–8.
- Ahmad, N., Anis, M., 2016, Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement, DOI:10.1007/978-981-10-1917-3.
- Akdeniz, M., Yener, İ., Dincel, D., Firat, M., Degirmenci, D.K., Ertas, A., 2022, Determination of fingerprints contents of different extracts and parts of six endemic *Salvia taxa* by GC MS: Source species for valuable compounds with drug or drug potential. Biomedical Chromatography, e5263.
- Akdeniz, M., Yener, İ., Yilmaz, M.A., Kandemir, S.I., Tekin, F., Ertas, A., 2021, A potential species for cosmetic and pharmaceutical industries: Insight to the chemical and biological investigation of naturally grown and cultivated, Industrial Crops and Products, 168, 113566.
- Amtul, Z., Rasheed, M. ve Choudhary, M.I., 2004. Kinetics of novel competitive inhibitors urease enzymes by a focused library of oxadiazoles/thiadiazoles and triazoles, Biochemical and Biophysical Research Communications, 319, 1053-1063.
- Anjusha S, Gangaprasad A. Callus culture and *in vitro* production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* L. Razafim and B. Bremer (Rubiaceae). Ind. Crops Prod. 2017; 95: 608-14.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:7970-7981.
- Arredondo-Mendoza, GI., Jiménez-Salas, Z., Garza, F.J.G., Solís-Pérez, E., López-Cabanillas-Lomelí, M., González-Martínez, B.E., 2020, Ethanolic Extract of *Salvia hispanica* L. Regulates Blood Pressure by Modulating the Expression of Genes Involved in BP-Regulatory Pathways,. Campos-Góngora E.Molecules, 25(17):3875.
- Ashry NA, Ghonaim MM, Mohamed HI, Mogazy AM. Physiological and molecular genetic studies on two elicitors for improving the tolerance of six Egyptian soybean cultivars to cotton leafworm. Plant Physiol Biochem. 2018; 130:224-34.
- Atri, A., 2019, The Alzheimer's disease clinical spectrum: diagnosis and management, Medical Clinics, 103(2): 263-293.
- Avcı, M., 2005, Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü, Coğrafya Dergisi, 13:27-55.
- Balur Adsız, L., 2018, *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* Türünün Antioksidan Aktivite Kontrollü Sekonder Metabolit İzolasyonu Yüksek Lisans Tezi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Türkiye Cumhuriyeti Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Banglao, W., Thongmee, A., Sukplang, P., Wanakhachornkrai, O., 2020, Determination of antioxidant, anti-ageing and cytotoxicity activity of the essential oils from *Cinnamomum zeylanicum*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(3), 436–440.
- Bano, Aneela Shah, Khattak, Abdul Mateen, Basit, Abdul, Alam, Mehboob, Shah, Syed Tanveer, Ahmad, Naveed, Gilani, Syed Abdul Qadir, Ullah, Izhar, Anwar, Sumera, & Mohamed, Heba Ibrahim. (2022). Callus Induction, Proliferation, Enhanced Secondary Metabolites Production and Antioxidants Activity of *Salvia moorcroftiana* L. as Influenced by Combinations of Auxin, Cytokinin and Melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, e22210200.
- Batıbay, H., 2020, *İn vitro* ve *in vivo* şartlarda yetiştirilen Bıttım (*Pistacia khinjuk* Stocks) türünün etanol ekstraktlarının sitotoksik ve antihipertansif etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Batman.
- Bhatia, V., Nodoushan, M.A.S., 2015, Genre Analysis: The State of the Art (An Online Interview with Vijay Kumar Bhatia), Corpus ID:145750151.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 29:1199-1200.
- Boix, Y.F., Arruda, R.C.O., Defaveri, A.C.A., Sato, A., 2012, Callus in *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae): A morphoanatomical, histochemical and volatile analysis, *Plant Biosystems*, 1473:751-75
- Brahmkshatriya, P.P., Brahmkshatriya, P.S., 2013, Natural Products, DOI:10.1007/978-3-642-22144-6_120 In book: Natural Products, 2665-2691.
- Buah, J.N., Tachie-Menson, J.W., Addae G. and Asare P., 2017, Sugarcane Juice as an Alternative Carbon Source for *in vitro* Culture of Plantains and Bananas., *American Journal of Food Technology*, 6: 685-694.
- Costa, D.C., Costa, H.S., Gonçalves Albuquerque, T., Ramos, F., Castilho, M.C., Sanches-Silva, A., 2105, Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications, *Trends in Food Science & Technology*, 45(2): 336-354.
- Cavinato, M., Waltenberger, B., Baraldo, G., Grade, C.V.C., Stuppner, H., Jansen-Duerr, P. 2017, Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*, 18: 499–516.
- Chai, W.M., Huang, Q., Lin, M.Z., Ou-Yang, C., Huang, W.Y., Wang, Y.X., Xu, K.L., H.-L., 2018, Feng, Condensed tannins from longan bark as an inhibitor of tyrosinase: structure, activity, and mechanism. *J. Agric. Food Chem*, 66: 908–917.
- Chang, T.S., 2009, An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440–2475.
- Chung, H.H., Ouyang, H.Y., 2021, Use of Thidiazuron for High-Frequency Callus Induction and Organogenesis of Wild Strawberry (*Fragaria vesca*), Department of Horticulture, National Ilan University, Yilan 26047, Taiwan.
- Ciereszko I., 2018, Regulatory roles of sugars in plant growth and development., *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 87(2).
- Cioffi, G., Bader, A., Malafronte, A., Dal Piaz, F., De Tommasi, N., 2008, Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia palaestina* Benth. *Phytochemistry*, 69:1005-1012.
- Collin, M., Bigley, V., 2018, Human dendritic cell subsets: an update, Dedicated to the memory of Derek NJ Hart, friend and mentor in human dendritic cells, 154(1):3-20.

- Cuenca S, Amo-Marco JB. *In vitro* propagation of two Spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 2000; 36: 225–9.
- Currin, A., Parker, S., Robinson, C. J., et al., (2021). The evolving art of creating genetic diversity: From directed evolution to synthetic biology. *Biotechnology Advances*, 50, September-October 2021, 107762.
- Çalışkan, T., Hatipoğlu, R., Kirici, S., 2019, Sekonder Bitki Metabolitlerinin *In vitro* Koşullarda Üretimi, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(7):971.
- Demir, E., 2018, Aksenik Jüvenil Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* L.) Eksplantlarından Kallus Kültürlerinin Başlatılması ve Optimizasyonu, Yüksek lisans tezi, Batman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Batman.
- Doğan, M., Pehlivan, S., Akaydın, G., Bağcı, E., Uysal, İ., Doğan, H.M., 2008, Türkiye’de yayılış gösteren *Salvia* L. (Labiatae) cinsinin taxonomik revizyonu, Proje No: 104 T 450, TÜBİTAK TBAG, 94 s.
- Efferth, T., 2019, Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures, *Research Traditional Chinese Medicine—Review, Engineering*, 5(1):50-59.
- Eidia, A., Eidib, M., Esmaeil, E., 2006, Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Phytomedicine*, 13: 624–629.
- Elaleem kGA, Modawi RS, Khalafalla MM. Effect of plant growth regulators on callus induction in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar diament. *Afr J Biotechnol*. 2009; 8(11): 2529-34.
- El-Beltagi, H., Aly, A., El-Desouky, W., 2019, Effect of Gamma-irradiation on some biochemical properties, antioxidant and antimicrobial activities of Sakouti and Bondoky dry dates fruits genotypes, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 12(1):437-446.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961, A new and rapid colourimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm*, 7:88-95.
- Er, M., 2012., Konya’da yetişen bazı *Salvia* L. (adaçayı) türlerinin biyokimyasal ve biyoaktif özellikleri. MSc, Konya Selçuk University, Konya, Turkey (in Turkish).
- Erbil, N., Digrak, M., 2015, Total phenolic and Flavonoid Contents, Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Salvia verticillata* L. var. amasiaca and *Salvia microstegia* Boiss & Bal from Turkish Flora.
- Erişen, S., Kurt-Gür, G., Servi, H., 2020, *In vitro* propagation of *Salvia sclarea* L. by meta-Topolin, and assessment of genetic stability and secondary metabolite profiling of micropropagated plants, *Industrial Crops and Products*, 157(2):112892.
- Ertaş, A., Akdeniz, M., Yener, İ., Ozturk, M., Olmez, O.T., Firat, M., Kolak, U., 2022, Essential Oil, Aroma, and Fatty Acid Profiles of Five Endemic *Salvia* Taxa from Turkey with Chemometric Analysis, 19(1):e202100408.
- Ertaş, A., Hatice Cakirca, H., Yener, İ., Akdeniz, M., Firat, M., Topcu, G., Kolak, U., 2021, Bioguided isolation of secondary metabolites from *Salvia cerino-pruinosa* Rech. f. var. *cerino-pruinosa*, *Records of Natural Products*, 15(6):568-584
- Ertaş, A., 2015-2018, Tubitak, 1001Projesi, 114Z801, Proje yürütücüsü, Bazı *Salvia* (Ada Çayı) Türlerinin HPLC-IT-TOF-MS ile Taranması, Sekonder Metabolitlerinin Saflaştırılması ve Antikanser Özelliklerinin Belirlenmesi.

- Farjaminezhad, R., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., Farjaminezhad, M., 2013, Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum*: A biotechnology approach for thebaine production, Turkish Journal of Biology, 37(6):689-697.
- Farzinebrahimi R, Mat Taha R, Rashid KA, Ali Ahmed B, Danaee M, Rozali SE., 2016, Preliminary Screening of Antioxidant and Antibacterial Activities and Establishment of an Efficient Callus Induction in *Curculigo latifolia* Dryand (Lemba). Evid Based Complement Alternat Med. 2016:6429652.
- Fatima, Z., Mujib, A., Fatima, S., Arshi, A., 2009, Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: Influence of plant growth regulators and carbohydrates, Doga, Turkish Journal of Botany, 33(6).
- Fidan, H. S., 2019, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yetişen 6 endemik *Salvia* (ada çayı) türünün ve elde edilen bazı sekonder metabolitlerin sitotoksik etkilerinin ve gen düzeyinde antikanser aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Fidan, H.S., Kilinc, F.M., Yilmaz, M.A., Mehmet Akdeniz, M., 2021, Comparison of chemical and biological properties of in vivo and in vitro samples of *Salvia siirtica* Kahraman, Celep & Dogan extracts prepared with different solvents, South African Journal of Botany, 142(6).
- Förstermann, U., Xia, N. & Li, H. 2017. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. Circulation Research, 120(4): 713-735.
- Gai, Q.Y., Jiao, J., Luo, M., Wang, W., Gu, C.B., Fu, Y.J., Ma, W., 2016, Tremendous enhancements of isoflavonoid biosynthesis, associated gene expression and antioxidant capacity in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures elicited by methyl jasmonate, Process Biochem, doi:10.1016/j.procbio.
- Ganceviciene, R., Liakou, A.I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., Zouboulis, C.C., 2012, Skin anti-ageing strategies, Derm.-Endocrinol, 4:308–319.
- Garibaldi, N., Contento, B.M., Babini, G., Morini, J., Siciliani, S., Biggiogera, M., Raspanti, M., Marini, C.M., Rossi, A., Forlino, A., Besio, R., 2021, Targeting cellular stress in vitro improves osteoblast homeostasis, matrix collagen content and mineralization in two murine models of osteogenesis imperfecta, 98:1-20
- Georgiev V., Marchev A., Haas C., Weber J., Nikolova M., s Bley T., Pavlov T., 2011., Production of Oleanolic and Ursolic Acids by Callus Cultures of *Salvia tomentosa* Mill., Biotechnology & Biotechnological Equipment, 25(4): 34-38.
- Ghorbanpour M. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. Indian J. Plant Physiol. 2015;20:249–256. doi: 10.1007/s40502-015-0170-7.
- Gryszczynska, A., Opala, B., Lowicki, Z., Dreger, M., Gorska-Paukszta, M., Szulc, M., Kaminska, E., Litwin, E., Struzik, P., Dyr, W., Wyszogrodzka, E., Mikolajczak, P.L., 2015, Bioactive compounds determination in the callus and hydroalcoholic extracts from *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia przewalskii* – Preliminary study on their anti-alcoholic activity effects, Phytochemistry Letters, 11: 399-403.
- Grzegorzczuk, I., Bilichowski, I., Mikiciuk-Olasik, E., Wysokinska, H., 2005, *In vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds., Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 74(1):17-21.

- Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M. Q., et al. (2020). Plant tissue culture: agricultura and industrial applications. In: U. Kiran, M. Abdin & Kamalubbin (Eds). Transgenic Technology Based Value Addition in Plant Biotechnology (pp. 25-49). Academic Press.
- Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T.Y., Xu, H., Zhao, Y., 2020, Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Molecular Neurodegeneration* 15,40.
- Hamidpour, R., Hamidpour S., Hamidpour, M., Shahlari, M., 2013, Chemistry, Pharmacology and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease and Cancer. *GJMR-B: Pharma Drug Discov Toxic Med*, 13(7): 1-8.
- Hassan, S.T.S., Žemlička, M., 2016, Plant-derived urease inhibitors as alternative chemotherapeutic agents. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 349:1–16.
- Hemmati, N., Cheniany, M., Ali Ganjeali, A., 2020, Effect of plant growth regulators and explants on callus induction and study of antioxidant potentials and phenolic metabolites in *Salvia tebesana* Bunge, *Botanica Serbica* 44(2):163-173.
- Hina, Z., Ghazala, H.R., Arfa, K., Huma, S., Sabiha, T., Ajmal, K., 2015, Anti-urease Activity of *Mimusops elengi* L. (Sapotaceae). *E. J. Med. Pl*, 6: 223--230.
- Huii, L., Z. Guoping, S. Guozheng, R. Songlin and F. Qiaojuan, 2012. Callus induction and plant regeneration from mature seeds of *Salvia splendens*. *Int. J. Agric. Biol.*, 14: 445–449
- Imokawa, G., Ishida, K., 2015, Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging I: Reduced Skin Elasticity, Highly Associated with Enhanced Dermal Elastase Activity, Triggers Wrinkling and Sagging, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4):7753-7775.
- Inoue, M., Hayashi, S. and Craker, L.E., 2019, Role of medicinal and aromatic plants: past, present, and future. In S. Perveen, and A. Al-Taweel (Eds.), *In Pharmacognosy-medicinal plants*, IntechOpen, London, UK, pp. 1-13.
- İçen, M.S., 2019, *Salvia palaestina* Benth. Bitkisinin Lipoksijenaz Enzimi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, İnönü Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı Ortak Doktora Tezi.
- İpek, A., Gürbüz, B., 2010, Türkiye Florasında Bulunan *Salvia* Türleri ve Tehlike Durumları, *Tarla Bitkileri Araştırma Merkezi Dergisi*, 19:1-2, 30 – 35.
- İpek, H.O., 2018, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryum'undaki (Ank) *Salvia* (Lamiaceae) Cinsinin Revizyonu, Yüksek Lisans Tezi.
- İrtegün Kandemir, S., Fidan, H. S., Yener, I., Mete, N., Ertas, A., Topcu, G., & Kolak, U. (2022). Investigation of cytotoxic and apoptotic effects of 63 compounds obtained from *Salvia* species: Promising anticancer agents. *Journal of Food Biochemistry*, 00, e14226.
- Jain, C., Khatana, S., Vijayvergia, R., 2019, Bioactivity of Secondary Metabolites of Various Plants: A Review, Department of Botany, Laboratory of Plant Pathology and Biochemistry, University of Rajasthan, Jaipur - 302004, Rajasthan, India, 10(2): 494-504.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H., 2018, Medicinal plants: past history and future perspective. *J Herbmed Pharmacol*, 7(1):1-7.
- Jan, J.T., Rachel, T.J.R., Juang, Y., Wong, C., 2021, Identification of existing pharmaceuticals and herbal medicines as inhibitors of SARS-CoV-2 infection., *Pnas*, 118 (5), e202157911.

- Jan, T., Khatoon, K., 2014, *In vitro* regeneration of *Salvia santolinifolia*, Pakistan Journal of Botany, 46(1):325-328.
- Jan, T., Qadri, R., Naqvi, B., Adhikari, A., Nadeem, S., Muhammad, A., 2018, A novel Salvialactomine from the callus culture of *Salvia santolinifolia* Boiss., Natural Product Research Formerly Natural Product Letter, 32(7).
- Jia, C., Han, S., Wei, L., Dang, X., Niu, Q., Chen, M., et al. (2018). Protective effect of compound Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) dripping pills alone and in combination with carbamazepine on kainic acid-induced temporal lobe epilepsy and cognitive impairment in rats. Pharm. Biol. 56, 217–224. doi: 10.1080/13880209.2018.1432665
- Jiménez-Ferrer, E., Badillo, F.H., González-Cortazar, M., Tortoriello, J., Herrera-Ruiz, M.J., 2010, Antihypertensive activity of *Salvia elegans* Vahl. (Lamiaceae): ACE inhibition and angiotensin II antagonism., 130(2):340-6.
- Ju Y.H., Clausen LM, Allred KF, Almada AL, Helferich WG (2004), b-Sitosterol, b-sitosterol glucoside, and a mixture of b-sitosterol and b-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen responsive breast cancer cells in vitro and ovariectomized athymic mice. J Nutr 134, 1145–1151.
- Kabir, M.H., Mamun, A.N.K., Roy, P.K., Islam, M.R., Jahan, M.T., Talukder, S.U., 2014, *In vitro* Mass Propagation of *Salvia* (*Salvia splendens*) from Nodal Explant., Nuclear Science And Applications, 23(1)&2.
- Karakuş, M., 2014, Tıbbi Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) Populasyonundan Seçilmiş Klon Hatlarının Drog Verimleri ve Kalite Özellikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 92s, Isparta.
- Karam N.S., Jawad, F.M., Arikat, N.A., Shibl, R.A., 2003, Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*., Springer., Plant Cell, Tissue and Organ Culture volume 73:117–121.
- Karatoprak, G.Ş., İlğün, S., Koşar, M., 2016, Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq, Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 13(2):87-104.
- Karatoprak, G.Ş., İlğün, Ş., Koşar, M., 2017, Phenolic Composition, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm, 14(9), e1700150.
- Keskin, N., Kunter, B., 2010, Production of trans-resveratrol in callus tissue of öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) in response to Ultraviolet-C irradiation., The Journal of Animal & Plant Sciences, 20(3): 197-200 ISSN: 1018-7081
- Khoshshokhan, F., Babalar, M., Salami, A., Mirjalili, M., Mehr., R.S., 2021, Callus induction and rosmarinic acid accumulation in callus culture of *Salvia nemorosa* L, 52 (1):61-68.
- Kim, Y.J., Uyama, H., 2005, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. Cell. Mol. Life Sci. C, 62, 1707–1723
- Kocakaya, Ş.O., Ertaş, A., Yener, İ., Ercan, B., Oral, E., Akdeniz, M., Kaplaner, E., Topcu, G., Kolak, U., 2020, Selective in-vitro enzymes' inhibitory activities of fingerprints compounds of *Salvia* species and molecular docking simulations. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 19(2): 187-198.

- Kolak, U., Ertaş, A., Cakirca, H., Yener, İ., 2021, Bioguided Isolation of Secondary Metabolites from *Salvia cerino-pruinosa* Rech. f. var. *cerino-pruinosa*, Records of Natural Products 15(6):585-592.
- Kosikowska, P., Berlicki, L., 2011, Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review. Expert Opin. Ther. Pat, 21: 945–957.
- Krajewska-Patan, A., Dreger, M., Górska-Paukszta, M., Mścisz, A., Mielcarek, S., Baraniak, M., Buchwald, W., Marecik, R., Grajek, W., & Mrozikiewicz, P.M. (2007). *Salvia miltiorrhiza* BUnge in vitro cultivation in callus cultures. Herba Polonica, 53.
- Kraunsoe, J.A.E., Claridge, T.D.W., Lowe, G., 1996, Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Biochem, 35:9090-9096.
- Kumar, H.A., Mandal, B.K., Kumar, K.M., Maddinedi, S.B., Kumar, T.S., Madhiyazhagan, P., Ghosh, A.R., 2014, Antimicrobial and antioxidant activities of *Mimusops elengi* seed extract mediated isotropic silver nanoparticles, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 130:13-18.
- Kwon, Y.I., Vatter, D.A., Shetty, K., 2006, Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. Asia Pac. J. Clin. Nutr, 15:107-118.
- Lewinska, A., Adamczyk-Grochala, J., Kwasniewicz, E., Deregowska, A., Wnuk, M., 2017, Ursolic acid-mediated changes in glycolytic pathway promote cytotoxic autophagy and apoptosis in phenotypically different breast cancer cells. Apoptosis, 22:800-815.
- Lin C.H and Hsieh C.L, 2021, Chinese Herbal Medicine for Treating Epilepsy. Front. Neurosci. 15:682821. doi: 10.3389/fnins.2021.682821
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J.B., Mezzetti, B., 2017, New Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of Major Woody Fruit Species, Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy²J. T. Environmental Consultants Ltd, Cambridge, United Kingdom.
- Lobo, A.K.M., Martinsa, M.O., Neto, M.C.L., Machado, E.C., Ribeiro, R.F., Silveiraa, J.A.G., 2015, Exogenous sucrose supply changes sugar metabolism and reduces photosynthesis of sugarcane through the down-regulation of Rubisco abundance and activity, Elsevier, 179: 113-121.
- Marconi, LauraIcon, P., María, L., Meester, D., Bovjin J., Alvarez, C., AlejandraIcon, M., 2013, *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus., Instituto de Biotecnología de las Plantas., Biotecnología Vegetal., ISSN: 1609-1841.
- Misic, D., Grubisic, D., Konjevic, R., 2006, Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants, Springer, Biologia Plantarum, 50:473–476.
- Modarres M., Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi S.E., Yazdi M.E.T., 2018, Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose, Springer, Cytotechnology volume 70, 741–750 (2018)
- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2000, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, Journal of Ethnopharmacol, 71:109-114.
- Mossi A.J., Cansian R.L., Paroul N., Toniazzo G., Oliveira J.V., Pierozan M.K., Pauletti G., Rota L., Santos A.C., Serafini L.A., 2011, Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp. (Lamiaceae). Braz J Biol. 71: 121-129.

- Mpumelelo, N., 2014, Metabolomic profiling and Micropropagation of *Salvia africana* L. Potent Against *Fusarium Verticillioides*, Thesis (PhD)--Stellenbosch University.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15 (3):473-497.
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., 2021, Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences (IPP_CAAS), Beijing 100193, 22(11): 5710.
- Okunade, A., Elvin-Lewis, M., Lewis, W.H., 2007, Natural Antimycobacterial Metabolites: Current Status, *Phytochemistry*, 65(8):1017-32.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Ercetin, T., Kahraman, A., Celep, F., Akaydin, G., Sener, B and Dogan, M. 2013. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Industrial Crops and Products*, 41: 21-30.
- Osman, N.I., Sidik, N.J., Awal, A., 2016. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L., *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2): 143-147.
- Ovidi, E., Masci, V.L., Zambelli, M., Tiezzi, A., 2021, *Laurus nobilis*, *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis* Essential Oils and Hydrolates: Evaluation of Liquid and Vapor Phase Chemical Composition and Biological Activities, *Plants* 10(4):707.
- Özkan, G., Özcan, M.M., 2015, Welcome to NIScPR Online Periodicals Repository, Determination of antioxidant activity and total phenol contents of two *Salvia* extracts, 14(2): 226-230.
- Pai, S.R., Upadhyay, V., Hegde, H.V, Joshi, R.K, Kholkute, S.D., 2016, Determination of betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid from *Achyranthes aspera* L. using RP-UFLC-DAD analysis and evaluation of various parameters for their optimum yield. *Indian J Exp Biol*, 54:196-202.
- Pasternak T, Miskolczi P, Ayaydin F, Mészáros T, Dudits D, Fehér A., 2000, Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regul.* 2000; 32: 129-41.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., Viuda-Martos, M., 2016, Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Plant. Foods Hum. Nutr*, 73:47–53.
- Petrova, M., Zayova, E., Dincheva, Ĭ., Badjakov, Ĭ., Vlahova, M., 2015, Influence of carbon sources on growth and GC-MS based metabolite profiling of *Arnica montana* L. hairy roots. *Turkish Journal of Biology*, 39(3): 469-478.
- Phillips C., Garda, M., 2019, Plant tissue culture media and practices: an overview., Springer., *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55:242–257.
- Pijacka, W., Moraes, D.J.A, Ratcliffe, L.E.K, Nightingale, A.K., Hart, E.C., da Silva, M.P., Machado, B.H., McBryde, F.D., Abdala, A.P., Ford, A.P. & Paton, J.F.R. 2016. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nature Medicine*, 22(10): 1151-1159.

- Pike, E., Fagerlund, B.C., Giske, L., Desser, A. & Harboe, I. 2017. Baroreflex Activation Therapy for Drug-Resistant Hypertension: A Single Technology Assessment [Internet]. Report from the Norwegian Institute of Public Health, 17, Oslo - Norway. PMID: 29553677.
- Potze, L., di Franco, S., Kessler, J., Stassi, G., Paul Medema, J., 2016, Betulinic acid kills colon cancer stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 11:427-433.
- Poulios E., Giaginis C., Vasios, G.K., 2020, Current State of the Art on the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia spp.*) and Its Bioactive Components. *Planta Med*, 86:224–238.
- Précoma, D.B., de Oliveira, G.M.M., Simão, A.F., Dutra, O.P., Coelho, O.R., Izar, M.C.O, Póvoa, R.M.S., 2019, Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 113(4): 787-891.
- Purwianingsih, W., Febri, S., Kusdianti, 2016, Formation flavonoid secondary metabolites in callus culture of *Chrysanthemum cinerariifolium* as alternative provision medicine, *AIP Conf Proc*, 1708 (1) (2016), Article 030005.
- Qadri, R., Naqvi, B., Adhikari, A., Nadeem, S., Akhtar Muhammad, A., 2018, A novel Salvialactomine from the callus culture of *Salvia santolinifolia* Boiss, *Natural Product Research, Formerly Natural Product Letters* 32(7): 749-754.
- Rahman NNA, Rosli R, Kadzimin S, Hakiman M. Effects of auxin and cytokinin on callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Fundamental App Agri*. 20019; 4(3): 928-32.
- Rashid, R., Bhat, J.A., Bhat, M.I. and Bhat, B.A., Effect of pH on Callus Induction and Shoot Regeneration from Cotyledon and Leaf and Hypocotyl Explants of Tomato., 2018, *Int. J. Pure App. Biosci*.6(2): 806-809 (2018). doi: <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.5984>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237.
- Sagharyan, M., Ganjeali, A., Heniany, M., Kouhi, S.M.M., 2020, Optimization of Callus Induction with Enhancing Production of Phenolic Compounds Production and Antioxidants Activity in Callus Cultures of *Nepeta binaloudensis* Jamzad (*Lamiaceae*), 18(4).
- Sahu, P., Giri, D., Singh, R., Pandey, P., Gupta, S., Shrivastava, A., Kumar, A. and Pandey, K., 2013, "Therapeutic and Medicinal Uses of *Aloe vera*: A Review," *Pharmacology & Pharmacy*, Vol. 4 No. 8, 2013, pp. 599-610. doi: 10.4236/pp.2013.48086.
- Santosh P, Venugopl R, Nilakash A S, Kunjbihari S, Dr. Mangala L. Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. *Int J of Pharm Pharmaceut Sci*. 2011; 3: 112-115.
- Sathuluri, R.R., Gokare, R., 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 20(2):101-53.
- Sefalı, A., Gıdık, B., 2018, Bazı *Salvia* L. türleri ve uçucu yağ içerikleri, *Tıbbi ve aromatik bitkiler: Uçucu yağlı bitkiler*, Betül Gıdık (Eds), Iksad Publishing House, 5-21.
- Segura-Campos, M.R., Chel-Guerrero, L.A., Rosado-Rubio, J.G., Betancur-Ancona D.A., 2016, Functional Properties of Traditional Foods. Volume 12. Springer; Boston, MA, USA, Biofunctionality of Chia (*Salvia hispanica* L.) Protein Hydrolysates: 199–206
- Setiaji A., Annisa, R.R., Rumiati, R., Semiarti, E., 2020, Effect of Different Strength of Media on Germination and Seedling Growth of Tomato and Sucrose Effect on Biomass of Its Callus, *Jurnal Biota* Vol. 6 No. 1, 2020

- Shahnewaz, S., Bari, M.A., Siddique, N.A., Khatun, N., 2004, Induction of haploid rice plants through *in vitro* anther culture From the journal., Pakistan Journal of Biological Sciences (Pakistan) ISSN, 1028-8880.
- Sharangi, A.B., 2017, Secondary metabolites in spices and medicinal plants: an overview. In: Siddiqui MW, Prasad K (eds) Plant secondary metabolites. Giovanni Geller with Jon W. Thompson. Oakville, ON: Apple Academic Press.
- Shi., Fan, D., Xiang H., Li H., 2017, Effective synthesis of magnetic porous molecularly imprinted polymers for efficient and selective extraction of cinnamic acid from apple juices. Elsevier., Food Chemistry, 237: 198-204.
- Siddique, A.B., Islam, S.S., 2015, Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Bangladesh J. Bot, 44(4): 643-651.
- Silva, F.S., Oliveira, P.J., Duarte, M.F., 2016, Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion? J Agric Food Chem, 64:2991-3008
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977, Total Phenol Analysis Automation and Comparison with Manual Methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49-55.
- Sotiropoulou, N.S., Megremi, S.F.P., Tarantilis, P.A., 2020, Evaluation of Antioxidant Activity, Toxicity, and Phenolic Profile of Aqueous Extracts of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and Sage (*Salvia officinalis* L.) Prepared at Different Temperatures, Applied Sciences 10(7):2270.
- Subramanian, V., Sahithya, D., Preliminary screening of selected plant extracts for anti-tyrosinase activity, PSG College of Technology, Department of Biotechnology, Coimbatore, Tamil Nadu, 641 004, India, 16 (1):18-21.
- Suntar I, Akkol EK, Senol FS, 2011, Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using in vivo and *in vitro* experimental models. J Ethnopharmacol 135:71--77.
- Suntar, I., Bahadır, O., Çitoğlu, G.S., Keles, H., 2021, Therapeutic Potential of Some Turkish Scorzonera Species as Wound Healing Agent, Current Pharmaceutical Design, 18(10):1421-33.
- Szymczyk, P., Szymańska, G., Kočan, E., Szemraj, J., Grąbkowska, R., 2021, Elicitation of solid callus cultures of *Salvia miltiorrhiza* Bunge with salicylic acid and a synthetic auxin (1-naphthaleneacetic acid), Springer, 147:491–502.
- Taqi, R., Debnath, M., Ahmed, S., Ghosh, A., 2022, Advances on plant extracts and phytocompounds with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease, Phytomedicine Plus, 2(1).
- Tawfik, A.A., Mohamed, F.M., 2007, Regeneration of *Salvia* (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus, Springer, volume, 43:21–27
- Tekdal, D., 2020, Bezelye Bitkisinin Organogenez Yöntemi ile Rejenerasyonu, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3(2): 103-107.
- Temel, H.E., Demirci, B., Demirci, F., Ferhat Celep, F., Ahmet, K., Doğan, M., Başer, K.H.C., 2016, Chemical characterization and anticholinesterase effects of essential oils derived from *Salvia* species, Journal of Essential Oil Research, 28(4):322-331.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S., Vijayakumar, R., 2018, An introductory chapter: secondary metabolites, Second Metab- Sources Appl, 1-21.

- Thring, T.S.A., Hili, P., Declan, Naughton, D.P., 2009, Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants, BMC Complement. Altern. Med. 9, 1-11, 2009.
- Traykova, B., Stanilova, M., Nikolova, M., Berkov, S., 2019, Growth and Essential Oils of *Salvia officinalis* Plants Derived from Conventional or Aeroponic Produced Seedlings, Agriculturae Conspectus Scientificus, 84 (1), 77-81.
- Trindade, M. A., Silva, F. C., Araújo B. J., Silva J. L., Araújo T. G., & Fürstenau C. R. 2021, Medicinal plants with potential antihypertensive properties: emphasis on natural products from the Brazilian Cerrado, Hoehnea 49: e1232020.
- Twaij, B.M., Hasan, M.N., 2022, Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. Int. J. Plant Biol, 13: 4-14.
- Upadhyay, L.S.B., 2012, Urease inhibitors: a review. Indian J. Biotechnol, 11:381–388.
- Uyanik, M., 2017, Türkiye'de tehlike altındaki bazı endemik *Salvia* türlerinin *in vitro* çoğaltımı ve tarla şartlarına adaptasyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı.
- Uysal, S., Zengin, G., Sinan, K.I., Ak, G., Ceylan, R., Mahomoodally, M., Uysal, A., N. Sadeer, N., Jekő, J., Cziáky, Z., Rodrigues, M., Yıldıztuğay, E., Elbasan, F., Custódio, L., 2021, Chemical characterization, cytotoxic, antioxidant, antimicrobial, and enzyme inhibitory effects of different extracts from one sage (*Salvia ceratophylla* L.) from Turkey: open a new window on industrial purposes, Medicine, Chemistry RSC Advance.
- Vardar, D.Ö., Mollahaliloğlu, S., Öztaş, D., 2018, Fitoterapide kullanılan bazı fitokimyasalların toplum sağlığına etkilerinin değerlendirilmesi. J Health Sci, 1(4); 99-105.
- Weisshaar, B., Jenkins, G.I., 1998, Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation, Current Opinion in Plant Biology, 1(3): 251-257.
- Yagi, M., Takabe, W., Ishizaki, K., Yonei, Y., 2017, The glycativ stress and skin aging, and its countermeasure. Fragr. J, 45:14–21.
- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008, Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler, Türk Bilimsel Derleme Dergisi, 1:47 – 58
- Yaris, E., Adsiz, L.B., Yener, İ., Tuncay, E., Yilmaz, M.A., Akdeniz, M., Kaplaner, E., Firat, M., Ertas, A., Kolak, U., 2021, Isolation of secondary metabolites of two endemic species: *Salvia rosifolia* Sm. and *Salvia cerino-pruinosa* Rech. f. var. *elazigensis* (Lamiaceae), Journal of Food Measurement and Characterization.
- Yener, İ., 2020, Determination of antioxidant, cytotoxic, anticholinesterase, antiurease, antityrosinase, and antielastase activities and aroma, essential oil, fatty acid, phenolic, and terpenoid-phytosterol contents of *Salvia pocalata*, Industrial Crops and Products 155(2):112712.
- Yigitkan, S., Akdeniz, M., Yener, İ., Oral, E.V., Firat, M., Kavak, D.E., Ertas, A., Kolak, U., Orhan, İ.E., 2022, Comprehensive study of chemical composition and biological activity of *Thymus pubescens* Boiss. et Kotschy ex Celak.
- Yilmaz, M.A., Ertas, A., Yener, İ., Olmez, O.T., Firat, M., Temel, H., Ozturk, M., Kolak, U., 2021, Development and validation of a novel LC-MS/MS method for the quantitation of 19 fingerprint phytochemicals in *Salvia* species: A chemometric approach. Journal of Chromatographic Science, bmab125.

Zahid, H., H. Rizwani, G., Kamil, A., Shareef, H., Tasleem, S., & Khan, A. (2015). Anti-urease Activity of *Mimusops elengi* Linn (Sapotaceae). *European Journal of Medicinal Plants*, 6(4), 223-230. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2015/12240>

