

T.C
Niğde Üniversitesi
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇİNKO SÜLFAT VE GÜMÜŞ NİTRAT UYGULAMALARININ BİBER HÜCRE
SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ, ANTİOKSİDAN
ENZİMLER VE FENOLİK BİLEŞİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ

SİNAN AYDIN

Ekim 2015

T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇİNKO SÜLFAT VE GÜMÜŞ NİTRAT UYGULAMALARININ BİBER HÜCRE
SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ, ANTİOKSİDAN
ENZİMLER VE FENOLİK BİLEŞİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ

SİNAN AYDIN

Yüksek Lisans Tezi

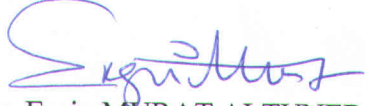
Danışmanlar

Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK

Yrd. Doç. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL

Ekim 2015

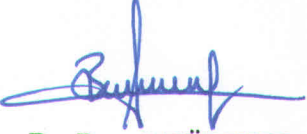
Sinan AYDIN tarafından Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK ve Yrd. Doç. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL danışmanlığında hazırlanan “ÇİNKO SÜLFAT VE GÜMÜŞ NİTRAT UYGULAMALARININ BİBER HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ, ANTIOKSİDAN ENZİMLER VE FENOLİK BİLEŞİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan : Doç.Dr. Ergin MURAT ALTUNER, Kastamonu Üniversitesi



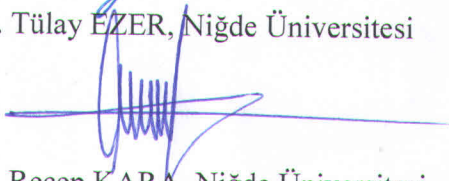
Üye : Yrd. Doç.Dr. Cemil İŞLEK, Niğde Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç.Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL, Niğde Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Tülay EZER, Niğde Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Recep KARA, Niğde Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../20... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Sinan AYDIN

ÖZET

ÇİNKO SÜLFAT VE GÜMÜŞ NİTRAT UYGULAMALARININ BİBER HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE KAPSAİSİN ÜRETİMİ, ANTİOKSİDAN ENZİMLER VE FENOLİK BİLEŞİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ

AYDIN, Sinan

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK

Yrd. Doç. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL

Ekim 2015, 69 sayfa

Bu tez çalışmasında, biber hücre süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda $AgNO_3$ ve $ZnSO_4$ ilave edilmiştir. Hücrelerdeki ve bunların süzüntülerindeki kapsaisin miktarları HPLC cihazında belirlenmiştir. Hücrelerde toplam protein ve toplam fenolik madde miktarları ile süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri incelenmiştir. Uygulanan tüm $AgNO_3$ ve $ZnSO_4$ konsantrasyonları kapsaisin miktarını kontrol grubuna oranla önemli derecede artırmıştır. $AgNO_3$ uygulamalarında süzüntüye geçen kapsaisin miktarı $ZnSO_4$ uygulamalarına göre daha yüksektir. $ZnSO_4$ uygulaması kapsaisin birikimini artırmada $AgNO_3$ uygulamasına göre daha etkili bulunmuştur. Çinko uygulanan hücrelerde tüm zamanlarda konsantrasyon artışına paralel şekilde toplam protein miktarının arttığı, süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzim aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarının ise konsantrasyon artışına paralel olarak 72. saatte arttığı tespit edilmiştir. Gümüş metalinin biber bitkisi üzerindeki etkisi incelendiğinde protein ve fenolik madde miktarı azalmış, özellikle yüksek konsantrasyonlarda ilk 24 saatlik süre içerisinde antioksidan enzim aktiviteleri artmıştır.

Anahtar Sözcükler: Ağır metaller, *Capsicum annuum* L., fenolik bileşik, peroksidaz, süperoksit dismutaz

SUMMARY

THE EFFECTS OF ZINC SULPHATE AND SILVER NITRATE TREATMENTS ON CAPSAICIN PRODUCTION, ANTIOXIDANT ENZYMES AND PHENOLIC COMPOUNDS IN PEPPER CELL SUSPENSION CULTURES

AYDIN, Sinan

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Ass.Prof. Dr. Cemil İŞLEK

Ass.Prof.Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL

October 2015, 69 pages

In this study, different concentrations and times of AgNO₃ and ZnSO₄ were added to cell suspension cultures of pepper. The amounts of capsaicin in cells and their filtrates were identified by HPLC. Total protein and total phenolic compound amounts, superoxide dismutase and peroxidase enzyme activities of the cells were determined. The amount of capsaicin in AgNO₃ and ZnSO₄ concentration of all treatments increased significantly compared to the control group. ZnSO₄ treatment has been found more effective increasing the amount of capsaicin to the AgNO₃ treatment. It was determined that total protein amount was increased, superoxide dismutase and peroxidase enzyme activities were decreased at all times. In zinc applied cells in parallel with the increase of concentration. Otherwise, the total amount of phenolic compounds was found to be increased in parallel with the increase of concentration at 72 hours. When the effects of silver metal on pepper plant is examined, protein and phenolic compound amounts decreased, and especially at higher concentration, in the first 24 hour period antioxidant enzyme activities increased.

Key words: Heavy metals, *Capsicum annuum* L., phenolic compounds, peroxidase, superoxidisedismutase

ÖN SÖZ

İlk olarak bu çalışmada emeklerini asla unutamayacağım değerli danışmanlarım Yrd. Doç. Dr. Cemil İŞLEK'e ve Yrd. Doç. Dr. Bengü TÜRKYILMAZ ÜNAL'a, benim bu eğitim hayatımda çok fazla değerleri bulunan kendilerini ailemden bir parça olarak gördüğüm çok kıymetli hocalarım Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER, Doç. Dr. Talip ÇETER ve Doç. Dr. Özlem FINDIK'a

Eğitim hayatım boyunca bana desteklerini asla esirgemeyen başta babam Hüseyin Aydın annem Feride Aydın ablam Sinem Soytürk kardeşlerim Furkan Huzeyfe Aydın ve Bilal Aydın'a

Çalışmalarımnda desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Soner Kaya ve Dilek Arık Kaya'ya

Kısa bir süre önce askerde beyin kanaması geçiren kendisini kardeşim olarak gördüğüm Uğur Hayal'e teşekkürlerimi sunarım

Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG 113O518 nolu proje ile desteklenmiştir. Aynı zamanda tez süresince burs desteği sağlayan TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
FOTOĞRAF DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
BÖLÜM I	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM II	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1 Bitki Hücre Kültürleri Tarafından İkincil Metabolit Bileşiklerin Üretimi	3
2.2. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırma Stratejileri.....	6
2.3. Biber (<i>Capsicum</i>) Bitkisi	8
2.4. Kapsaisinoidler	9
2.5 Kapsaisin Elde Edilmesi İle İlgili Doku Kültürü Çalışmaları	10
2.6 Kapsaisin sentezini uyarmak için kullanılan ağır metaller.....	14
BÖLÜM III	17
MATERYAL VE METOD.....	17
3.1 Bitkisel materyal	17
3.2 Tohumların yüzeysel sterilizasyonu	17
3.3 Tohum Çimlendirme Ortamı ve Bileşenlerinin Hazırlanması	18
3.4 Kültür Koşulları	19
3.5Eksplant tipi ve Kallus Eksplantın Ortamına Dikimi	19

3.6 Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması	21
3.7 Uyarıcı Uygulamaları ve Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması.....	22
3.8 Ekstraksiyon İşlemleri	23
3.8.1 Hücrelerden kapsaisin ekstraksiyonu.....	23
3.8.2 Hücrelerin süzüntülerinden kapsaisin ekstraksiyonu.....	23
3.9 Kapsaisin Analizi	23
3.9.1 Kapsaisin standartının hazırlanması	23
3.9.2 Kapsaisin tayininde HPLC koşulları.....	25
3.10 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	25
3.10.1 Enzim ekstraktlarının hazırlanması	25
3.10.2 Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi	25
3.10.3 Peroksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi	26
3.11 Total Fenolik Bileşik Belirlenmesi	26
3.12. İstatistiksel Analizler	26
BÖLÜM IV	27
BULGULAR.....	27
BÖLÜM V	43
SONUÇ.....	43
Kaynaklar.....	45
Özgeçmiş	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	2.1. Bitkilerden elde edilen önemli farmasotikler	4
Çizelge	3.1. MS temel besin ortamı.....	18
Çizelge	4.1. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda AgNO ₃ uygulamalarının <i>Capsicum annuum</i> L. hücreleri ve süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkileri (n=3).....	27
Çizelge	4.2. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda ZnSO ₄ uygulamalarının <i>Capsicum annuum</i> L. hücreleri ve süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkileri (n=3).....	28
Çizelge	4.3. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda AgNO ₃ uygulamalarının <i>Capsicum annuum</i> L. hücrelerinde toplam protein ve fenolik madde miktarı üzerine etkileri (n=3).....	31
Çizelge	4.4. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda AgNO ₃ uygulamalarının <i>Capsicum annuum</i> L. hücrelerinde SOD ve POX enzim aktiviteleri üzerine etkileri (n=3).....	34
Çizelge	4.5. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda ZnSO ₄ uygulamalarının <i>Capsicum annuum</i> L. hücrelerinde toplam protein ve fenolik bileşik miktarı üzerine etkileri (n=3).....	37
Çizelge	4.6. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda ZnSO ₄ uygulamalarının <i>Capsicum annuum</i> L. hücrelerinde SOD ve POX enzim aktiviteleri üzerine etkileri (n=3).....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Spektrofotometrede ölçüm için kapsaisin standartı ile çizilen grafik.....	24
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda AgNO ₃ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi kapsaisin miktarı üzerine etkisi.....	29
Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda triakontanol uygulamalarının farklı zamanlarda serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi	29
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda AgNO ₃ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi toplam protein miktarı üzerine etkisi.....	32
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda AgNO ₃ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi	33
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda AgNO ₃ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi	35
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda AgNO ₃ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi POX enzim aktivitesi üzerine etkisi	36
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda ZnSO ₄ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi toplam protein miktarı üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda ZnSO ₄ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda ZnSO ₄ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda ZnSO ₄ uygulamalarının farklı zamanlarda <i>Capsicum annuum</i> L. bitkisi POX enzim aktivitesi üzerine etkisi	42

FOTOĞRAF DİZİNİ

Fotoğraf 3.1 Biber tohumlarının steril besin ortamına ekimi.	17
Fotoğraf 3.2 Biber tohumunun ekimden 4 hafta sonraki gelişimi	19
Fotoğraf 3.3 MS Besiyeri ortamında gelişen kallus dokuları	20
Fotoğraf 3.4 Alt kültürde çoğalan kallus dokusu.....	21
Fotoğraf 3.5 Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri	22

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TRIA	Triakontanol
MS	Murashige ve Skoog
t.a.	Taze ağırlık
μg	Mikrogram
k.a.	Kuru ağırlık

BÖLÜM I

GİRİŞ

Bitkiler primer ve sekonder metabolit olarak adlandırılan çok çeşitli organik bileşikler sentezlemektedirler. Primer metabolitler; amino asitler, fitosteroller, lipitler, karbonhidratlar, nükleotidler ve proteinler olup büyüme, gelişme, fotosentez ve solunum gibi bir çok süreçte önemli rol oynamaktadırlar (Crozier vd., 2006; Ramawat, 2007). Sekonder metabolitler ise temel büyüme ve gelişme için gerekli olmayan fakat biyotik ve abiyotik streslere karşı çevresel uyumda görev alan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Nascimento ve Fett-Neto, 2010). Bitkilerde herbivor ve mikroorganizmalara karşı korunmada, tozlaşma ve tohumun yayılmasında, UV ışınlarla karşı korunmada önemli görevler üstlenirler. Ayrıca boya, lif, yapıştırıcı, yağ, mum, tatlandırıcı, ilaç, parfüm, insektisit ve herbisit olarak insanlar tarafından kullanılabilirler (Crozier vd., 2006).

Ancak biyotik ve abiyotik etmenlerden dolayı bu değerli bileşikler klasik tarım yöntemleriyle yeteri kadar elde edilememektedir. Sekonder metabolitlerin üretiminde hızlı, sabit kalitede ve çevre koşullarından etkilenmeden sürekli ürün sağlanmasıyla bitki doku ve hücre kültürü yöntemlerinin önemli alternatif bir yöntem olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca, çeşitli stratejilerle metabolit üretimi artırılabilir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Metabolit üretiminin artırılmasında yararlanılan başlıca stratejiler arasında biyotik veya abiyotik (ağır metal tuzları) elisitör uygulanması, öncül bileşiklerin kültür ortamına ilave edilmesi, yüksek üretken hücre hatlarının seçilmesi, kültür besi ortamının manipasyonu ve mutajenlerin kullanımı yer almaktadır (Sasson, 1991; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Savitha vd. 2006; Zhao vd. 2005; Shilpa vd., 2010).

Capsicum annuum L. cinsi, *Dicotyledonae* sınıfının, *Tubiflorae* (*Solanales*) takımının, *Solaneceae* familyasında bulunur. Anavatanı Güney Amerika olmakla birlikte ülkemizde özellikle Güney Doğu Anadolu bölgesinde tarla tarımıyla, Akdeniz bölgesinde ise seracılıkla üretilmektedir. Yemeklerde baharat ve sos olarak tüketilmesinin yanı sıra sağlık, kozmetik, zirai vb. sektörlerde kullanılmaktadır (Şener, 2010).

Kırmızı biberin (*Capsicum annuum* L.) yapısında başlıca; acılık veren etken madde kapsaisin, bazı vitaminler, kırmızı karotenoidler, yağ, mineraller ve aromatik bileşikler bulunmaktadır. *Capsicum annuum* L.'de kapsaisin miktarı % 1.5-1.8'e kadar çıkmaktadır (Romero-Castillo vd., 2015). Kapsaisinin antitümoral, antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, immünmodülatör analjezik, ülseri ve obeziteyi engelleyici etkileri olduğu bilinmektedir (Maggi vd., 1989).

Kapsaisin üretimini artırmada kitosan, kurdlan, ksantan (Johnson vd. 1990), fikosiyenin (Ramachandra Rao vd. 1996), protokatekuik aldehit, kafeik asit (Ramachandra Rao ve Ravishankar. 2000), salisilik asit, metil jasmonat (Sudha ve Ravishankar. 2003), gibberellik asit, indol asetik asit, naftalen asetik asit, 2,4 D ve kinetin (Umamaheswari ve Lalitha. 2007) elisitör olarak kullanılmıştır. Ancak kapsaisin üretiminin artırılmasında ağır metal uygulamalarına ait çok az veri mevcuttur.

Bu çalışmada *Capsicum annuum* L. biber tohumlarına ait hücre süspansiyon kültüründe, kapsaisin üretimi üzerine farklı konsantrasyonlarda gümüş nitrat ve çinko sülfat uygulamalarının farklı zamanlardaki etkileri incelenmiştir. Aynı zamanda bu ağır metallerin etkisinde süperoksit dismutaz, peroksidaz enzim aktivitelerinde ve fenolik madde miktarlarındaki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Bitki Hücre Kültürleri Tarafından İkincil Metabolit Bileşiklerin Üretimi

Sekonder metabolitler, bitkinin ekosistemle olan ilişkisinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda çeşitli avantajlar sağlayan kimyasal maddelerdir. Bunlar arasında; bitkiyi patojenlere karşı koruyan anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral; diğer bitkilere karşı doğal yaşamda rekabet gücünü arttıran anti-germinatif ve toksik maddeler; UV ışınları, tuzluluk, kuraklık gibi zararlı çevresel etmenlerin neden olduğu stres koşullarında direnç arttırıcı metabolitler; zararlı hayvanlar ve otlara karşı korunmayı sağlayan insektisit, pestisit, molluskusit ve herbisidler; polinasyon ve tohum dağılımını sağlamak üzere hayvanları cezbedecek renkli ve güzel kokulu metabolitler bulunmaktadır (Bourgaud vd., 2001; Sökmen ve Gürel, 2001).

Sekonder metabolit kavramı ilk olarak A. Kossel (1891) tarafından ileri sürülmüş; bundan otuz yıl sonra F. Czapek (1921) birincil metabolitlerden modifiye olan bu metabolitleri 'en son ürün' terimi ile tanımlamıştır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Son yıllarda birçok endüstriyel alanda insan sağlığını tehdit edici sentetik ürünlerin yerini doğal olan bitkisel sekonder metabolitler almıştır. Gıda sektöründe tatlandırıcı, kıvam arttırıcı, renk ve koku verici birçok madde; kozmetik endüstrisinde parfüm ve kozmetik ürün (krem, tonik, maske), tarım alanında insektisit gibi kimyasallar; tekstilde kumaş boyamada kullanılan doğal boyalar çeşitli bitkisel sekonder metabolitlerden elde edilmektedir (Çizelge 2.1). Ayrıca, Dünya Sağlık Örgütü tarafından temel ilaçlar kapsamında ilan edilen 252 ilacın %11'i bitkisel sekonder metabolitlerden üretilmektedir. Bunlardan en önde gelenler; *Salix* türlerinden izole edilen antipiretik ve analjezik özelliği olan salisin (aspirin), *Taxus brevifolia*'dan elde edilen anti kanser etkisi olan taxol (paclitaxel) ve *Papaver somniferum*'dan elde edilen güçlü analjezik, narkotik etkisi olan morfindir (Raskin vd., 2002; Tolonen, 2003; Verpoorte ve Memelink, 2002).

Son yıllarda bitki biyoteknolojisi yöntemleri ile sekonder metabolitlerin elde edilmesi üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Sentetik kimyadaki ilerlemelere rağmen, kompleks yapı özellikleri nedeniyle sentezlenemeyen biyolojik kaynaklı birçok sekonder metabolit, bitki hücre ve doku kültürleri yoluyla kültür koşulları optimizasyonu sağlanarak ve metabolik yolda genetik farklılıklar oluşturularak uygun miktarlarda elde edilmeye başlanmıştır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Sekonder metabolitler birincil metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilirler ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılırlar (Bourgaud vd., 2001). Bu metabolitler, bitkiler tarafından çok az miktarlarda sentezlenirler ve bazı bileşikler belirli türlere özeldirler. Çoğunlukla bitkilerin belli organlarında, hatta belli organların belli hücrelerindeki belli kompartmanlarda bulunurlar ve bitkinin belli bir gelişim periyodu süresince üretilirler (Sökmen ve Gürel, 2001).

Çizelge 2.1. Bitkilerden elde edilen önemli farmasötikler
(Ramachandra ve Ravishankar 2002'den uyarlanmıştır)

Ürün	Kullanım	Bitki Türleri	(US \$ % kg)
Aymalisin	Tansiyon düşürücü	<i>Catharanthus roseus</i>	37
Artemisin	Sıtma tedavisi	<i>Artemisia annua</i>	400
Berberin	Bağırsak hastalıkları	<i>Coptis japonica</i>	3250
Eliptisin	Kanser tedavisi	<i>Orchrosia elliptica</i>	240,000
Ginsenosidler	Sakinleştirici	<i>Panax ginseng</i>	n/a
Kamfotesin	Kanser tedavisi	<i>Camptotheca acuminata</i>	432
Kapsaisin	Ağrı giderici	<i>Capsicum sp.</i>	700
Kinin	Öksürük kesici, aneljezik	<i>Cinchona ledgeriana</i>	500
Kodein	Öksürük kesici, aneljezi	<i>Papaver somniferum</i>	17
Kolşisin	Kalp uyarıcı	<i>Colchium autumnale</i>	35
Morfin	Kanser tedavisi	<i>Podophyllum petalum</i>	340,000
Şikonin	Antibakteriyel	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	4500
Taksol	Kanser tedavisi	<i>Taxus brevifolia</i>	600,000

(n/a: bilinmiyor)

Canlı bitkilerden elde edilen bileşiklere yakın özellikleri taşıyan ya da onlardan daha üstün özellikte ikincil metabolit bileşikler sentezleyebilen hücre kültürlerinin oluşturulması özellikle son yıllarda hız kazanmıştır. Biyolojik analiz teknikleri kullanılarak fizyolojik aktivite gösteren yeni bileşikler bulunmuştur. Yapılan çalışmalar kültür ortamının özelliklerinin düzenlenerek, hücrelerin biyosentetik aktivitelerinin arttırılabileceğini göstermiştir. Yapay seçim ve metabolik aktiviteleri yüksek olan hücrelerin uyarımı ile hücrelerin ürettikleri bileşiklerin miktarları önemli düzeyde arttırılabilmektedir. Canlı bitkilerde morfolojik ve fizyolojik olarak farklılaşmış belli organlar tarafından üretilen bileşikler, laboratuvar ortamında yapısal olarak organize olan hücrelerin uyarılması ile üretilmektedir (Vanisree vd., 2004).

Kültür sistemlerinin, canlı bitkileri kullanan geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında sunduğu en önemli avantajlar:

- a) Yararlı bileşikler kontrol altında tutulan laboratuvar ortamında, iklim ve toprağın özelliklerindeki değişimlere bağlı olmadan üretilmektedir.
- b) Kültür ortamında hücreler mikroorganizmaların ve böceklerin kontaminasyonuna uğramazlar.
- c) Herhangi bir bitkinin hücreleri (tropikal ya da daha yüksek yerlerde yetişen) kolaylıkla çoğaltılarak bitkiye özgü bileşiklerin üretilmesi için kullanılabilir.
- d) Hücre büyümesinin otomatik kontrol altında olduğu sistemler sayesinde metabolik fonksiyonlar kolayca düzenlenebilmekte ve bu sayede harcanan emek ve iş gücü de azaltılarak üretim arttırılabilmektedir.
- e) Organik bileşikler kallus kültüründen kolayca çıkarılabilir.

Bazı bitkisel ikincil metabolit bileşiklerin sentezi çeşitli biyotik ya da abiyotik (ağır metal tuzları) uyarıcı moleküllerin kültür ortamına eklenmesi ile arttırılabilir (Di Cosmo ve Misowa 1985; Zhao vd., 2005; Savitha vd., 2006; Namdeo, 2007). Sentezlenen ürün miktarını arttıran bu moleküller, genellikle hücre büyümesini ve canlılığını azalttığından, iki aşamalı kültür uygulamaları gündeme gelmiştir. Bu uygulama dahilinde hücreler, ilk aşamada optimum şartlar altında büyür ve daha sonraki aşamada da üretim ortamına (bir hücre döngüsü periyoduna eş zamanlı olarak) aktarılırlar. Üretim ortamındaki çevresel koşullar, ürün sentezini uyaracak ve arttıracak şekilde düzenlenmiştir. (Parr, 1989; Yeoman ve Yeoman, 1996).

Yapısal organizasyonu düşük olan hücrelerin aksine farklılaşmış hücrelerden elde edilen kültürlerin fizyolojik gelişimleri önceden tahmin edilebilir. Bu tür kültürlerde üretilen ikincil metabolit bileşikler hem nicelik hem de nitelik bakımından canlı bitkilerin kendi doğal ortamlarında ürettikleri ürünlere benzerlik gösterirler. Ayrıca bu kültürlerin biyokimyasal ve genetik özellikleri kararlı yapıdadırlar. Böylece ekstra bir optimizasyon aşamasına ihtiyaç duyulmadan oldukça verimli üretim sistemleri olarak kullanılabilirler (Parr, 1989).

Bitki hücre kültürlerinde ikincil metabolitlerin uyarımı bitki türlerinin birçoğunda bildirilmiştir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Çeşitli biyotik ve abiyotik uyarıcıların kültür hücrelerinde fitokimyasalların üretimini birkaç kat artırdığı bilinmektedir (Johnson vd., 1991).

2.2 Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırma Stratejileri

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

Bunlardan birincisi üretim gücü yüksek hücre hatlarının taranması ve seçilmesi arzu edilen bileşiği en yüksek seviyede elde etme imkânı sağlayabilmektedir. Hücre hattının geliştirilmesi hedeflenen bileşiğin yüksek miktarda üretildiği ana bitkinin seçimiyle başlar ve bundan elde edilecek kallus kültüründen yüksek verimli hücre hatlarının seçimiyle devam ettirilir. İstenilen bileşiğin renkli bir pigment olması durumunda seçim kolaylıkla yapılabilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Yağcı vd., 2008).

İkinci olarak kültürün oluşturulduğu besin ortamının standardizasyonu hem yüksek miktarda biyomas elde etme açısından hem de sekonder metabolit üretimi açısından önemli bir parametredir.

Hücrelerdeki metabolit birikimi besin ortamının içeriği, dışarıdan uygulanan bitki hormonları ve kültür ortamının şartları tarafından düzenlenmektedir (Shilpa vd., 2010).

Bitki doku ve hücre kültürlerinin gerçekleştirildiği besi ortamında bulunan her kimyasal büyüme ve sekonder metabolit üretimi için teşvik edici olabildiği gibi sınırlayıcı da olabilmektedir.

Örneğin besi ortamında yer alan herhangi bir madde hücrelerin büyümesini teşvik ederken sekonder metabolit birikimini azaltabilmektedir. Kültür ortamında metabolit üretimini etkileyen başlıca kimyasal koşullar arasında karbon, azot ve fosfor kaynağı, bitki hormonlarının çeşidi ve derişimi, kültür ortamında bulunan makro ve mikro elementler, pH ve osmotik basınç sayılabilmektedir. Kültür ortamında metabolit üretimini etkileyen fiziksel koşullar ise ışık ve sıcaklıktır. Çalkalama ve havalandırma gibi fiziksel etmenler de hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme ve metabolit birikimini etkileyen diğer önemli faktörlerdir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Sekonder metabolit üretiminin artırılması için öncül bileşiklerin besi ortamına ilave edilmesi de güncel yaklaşımdır. Üretilmesi istenen metabolitin biyosentez mekanizmasının bilinmesi durumunda bu süreçte yer alan başlangıç veya ara ürünlerin kültür ortamına katılması metabolit üretimini artırabilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Elisitör olarak tanımlanan mikrobiyal, fiziksel veya kimyasal stres faktörlerinin sekonder metabolizmada artışa yol açması bu metabolitlerin üretiminde bir strateji olarak kullanılabilmektedir (Mulabagal ve Tsay, 2004; Shilpa vd., 2010).

Elisitör olarak tanımlanan ve stres ortamının oluşmasına neden olarak metabolitlerin sentezini artıracak uygulamaların da kültür ortamlarında kolaylıkla yapılabilmesi, kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin bir diğer avantajlı yönünü oluşturmaktadır. Nitekim elisitör uygulamalarıyla söz konusu metabolitlerin daha yüksek miktarlarda elde edilebildikleri araştırma sonuçları ile de tespit edilmiş bulunmaktadır (Antognoni vd., 2007; Çetin, 2010).

Bitki sekonder metabolitleri çoğunlukla bitkileri çevresel stres faktörlerinden korumak için sentezlenmektedir.

Bu nedenle bitki hücre kültürlerine ozmotik şok, ağır metal iyonlarının ilave edilmesi, inorganik tuzlar, mikrobiyal homojenat veya UV radyasyonu gibi stres faktörlerinin uygulanması bazı sekonder metabolitlerin birikimini artırmaktadır (Verpoorte vd., 2002, Elmastaş ve Karataş 2013).

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bitkilerde savunma mekanizmalarını tetiklediği ve bu savunma sisteminin önemli birer ögesi olan sekonder metabolitlerin sentezini artırdığı bilinmektedir (Ramakrishna ve Ravishankar, 2011). Bu nedenle in vitro koşullarda kültürleri strese sokan faktörler kullanılarak sekonder metabolit birikimini artırma eğilimi birçok bitkide farklı metabolitlerin elde edilmesinde yaygın olarak uygulanmaktadır (Tumova, 1999; Zhao vd., 2010; Çetin vd., 2011; Çetin vd., 2012).

2.3 Biber (*Capsicum*) Bitkisi

Biber dünyanın tropikal, subtropikal ve ılıman iklim etkisindeki birçok ülkede önemli yer tutan bir sebzedir. Ülkemizde de Kahramanmaraş ve Gaziantep, Urfa, Diyarbakır, Adıyaman, Hatay illerinin bazı yörelerinde tarla tarımı Antalya, İçel, Muğla ve İzmir illerinde ise seracılık üretiminde önemli bir yere sahiptir (Üstün, 1990).

Solanaceae familyasının bir üyesi olan biberin anavatanı Amerika olup, Amerika kıtasında kültüre alınan ilk bitkiler arasındadır. Amerika'nın keşfinden sonra İspanya'ya getirilen bu bitkinin 30 kadar türü olduğuna dair bilgiler mevcuttur. Ancak bu türlerden *Capsicum annuum* L. dışında kalanların ekonomik anlamda sebze olarak tarımı yalnızca Amerika'nın orta ve güney bölümlerinde yapılmaktadır (Abak, 1981).

Beslenmede büyük öneme sahip biber insan sağlığında aranılan bir materyaldir. Biber, meyvesi yenen sebzeler arasında, farklı şekillerde en çok tüketilenlerden birisidir. Biberin kendine özgü aroması ve görünüşü nedeniyle çok değişik kullanım alanları vardır. Yemeklere aroma ve lezzet vermek için taze tüketimi yanında, kurutularak toz biber şeklinde baharat sanayinde, sos, konserve, salça yapımında, renk maddesi olarak ilaç sanayisinde ve süs bitkisi olarak çevre düzenlemede kullanılmaktadır. Egzotik bir bitki türü olan biber, yıllar öncesinde İnkalar tarafından kutsal bir bitki olarak kabul edilmiş ve içerdiği acılık nedeniyle artrit (eklem iltihabı) tedavisinde kullanılmıştır.

İçeriğindeki C vitamini ve antioksidant maddeler nedeniyle her geçen gün değeri artan bir bitki türüdür (Bosland ve Votava, 2000).

Türkiyede biber (*Capsicum annuum* L.) üretimi, 2004 verilerine göre yaklaşık 1,76 milyon ton ve % 7,44 pay ile dünyada 3. sırada yer almaktadır. Türkiye’de üretilen domates, karpuz, kavun, hıyar sebze türlerinden sonra biber üretim miktarı dördüncü sırada yer almaktadır (Ölmez, 2006).

2.4 Kapsaisinoidler

Bibere acılığını veren maddenin ne olduğu her zaman merak konusu olmuştur. 1816 yılında Bucholtz, bibere acılık veren maddenin organik çözücüler aracılığı ile ayırt edilebileceğini söylemiştir. Tresh, 1876 yılında acı veren maddenin kristal yapısında olduğunu tespit ederek, adını "kapsaisin" koymuştur. Hogyes, 1878 yılında acı hissi veren bu maddeyi biberden ayırt etmeyi başarmış ve kapsaisinin ağız ve mide salgılarını artırdığını keşfetmiştir. 1930 yılında, Spath ve Darling, laboratuvarında kapsaisini sentezlemeyi başarmışlardır (Morrow, 1999). Kosuge vd. ince tabaka kromatografisinin (TLC) geliştirilmesi ile acılık uyarıcı özelliğe birbiriyle ilişkili iki komponent belirlemişler ve komponent karışımına “kapsaisinoid” adını vermişlerdir (Kosuge vd., 1961;Poyrazoğlu vd., 2005).

İlk olarak bulunan kapsaisinoid bileşikler, kapsaisin (8-metil-trans-enoic asit in vanillyamide türevi), dihidrokapsaisin (8-metil-nonanoic asitin vanillyamide türevi),nordihidro-kapsaisin I (9-metil-trans-7-enoic asitin vanillyamide türevi) ve homodihidro-kapsaisin (9-metil-decanoic asitin vanillyamide türevi) dir (Bennett ve Kirby, 1968). Daha sonra birçok doğal kapsaisinoid bileşiği daha bulunmuştur : homodihidro-kapsaisin II, homokapsaisin II, octanoic, nonanoic ve decanoic asitlerin vanillyamide türevleri, bishomokapsaisin, nordihidro-kapsaisin II, zukapsaisin (civamide), nonivamide ve *u*-hidroksikapsaisin (Jurenitsch vd., 1979; Ochi vd., 2003). Bu bileşikler arasında kapsaisin ve dihidrokapsaisin *Capsicum* türlerinde en çok rastlanan bileşiklerdir. Kapsaisinoid bileşiklerinin bitki dokularındaki toplam miktarı farklılıklar göstermekte ancak kapsaisin ve dihidrokapsaisin oranları, *C. annuum*

türünde %77-90 arasında, *C. frutescens* türünde ise %89-98 arasında değişmektedir (Govindarajan vd., 1987).

2.5 Kapsaisin Elde Edilmesi İle İlgili Doku Kültürü Çalışmaları

Lindsey vd. (1983), yaptıkları çalışmada besin içeriği yönünden iki farklı ortam kullanmışlardır. Bunlardan biri büyüme ortamı (bütün besin maddeleri + büyümeyi düzenleyen hormonlar) diğeri ise minimum ortam (sadece bazı besinler) dir. Minimum ortam içerisinde hücre bölünmesi ve hücre büyümesi için gerekli hormonlar ve diğeri düzenleyici moleküller olmadığı için büyüme engellenmiştir. Bu iki farklı ortamdaki hücrelerin ürettiği kapsaisin beş günlük bir süreden sonra ortamdan alınarak HPLC ile ölçümler yapılmıştır. Büyüme ortamında kültürü yapılan hücrelerden elde edilen ortalama kapsaisin miktarı 1.397 ± 0.136 mg k.a. ve minimum ortamda kültürü yapılan hücrelerden elde edilen kapsaisin miktarı ise 2.636 ± 0.298 mg k.a. olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi, hücre bölünmesi ve büyüme gibi birincil metabolik fonksiyonların, büyük ölçüde engellendiği minimum ortamda bitki hücreleri büyüme ortamındaki hücrelere göre yaklaşık 2 kat daha fazla kapsaisin sentezlemişlerdir. Bu sonuçlar daha önce elde edilen verileri destekleyici nitelikte olup, kültür büyüme hızı ile ikincil metabolik bileşiklerin sentezlenme hızı arasında, antagonistik bir bağıntı olduğunu bir kez daha göstermiştir.

Lindsey ve Yeoman. (1984a), süspansiyon kültürü ve tutuklanmış hücre kültürü için 8 grup hazırlamışlardır. Hazırlanan kültür ortamları içerisinde kapsaisin molekülüne yakın benzerlikte ya da sentezde kullanılan bir metabolik öncü bileşik bulunmamaktadır. 5. ve 10. günlerin sonunda kültür gruplarının yarısı alınarak ortamda biriken kapsaisin moleküllerinin miktarlarının belirlenmesi için analiz yapmışlardır. Bu veriler göstermektedir ki; ortama konulan bitkilerin kuru ağırlığı baz alındığında, metabolik öncü moleküllerin yokluğunda, hem büyümenin yavaş olduğu son beş günde, hem de daha fazla büyüme hızının saptandığı ilk beş günde kültür ortamı içerisinde poliüretan ile tutuklanan hücrelerin, süspansiyon kültüründe büyüyen hücrelere oranla 3 kat daha fazla miktarda kapsaisin sentezlediğini göstermektedir. 5. ve 10. günler arasında biriken

kapsaisin miktarındaki artış, tutuklanmış hücrelerin kapsaisin sentezleme hızının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durumun araştırılması ve artışın gerçek nedeninin belirlenmesi için tutuklanmış hücreler ve serbest süspansiyon kültürü içerisindeki hücreler L-[U- ¹⁴C] fenil alanin ile işaretlenmiştir.

Kültür ortamında biriken kapsaisin kloroform kullanılarak ortamdan çıkarılmış ve TLC plakaları üzerinde kromatografik analiz yapılmıştır. Elde edilen ve kapsaisin molekülüne karşılık gelen noktalar bu plakalar üzerinde belirlenmiştir. Radyoaktif işaretli molekülün hücreler tarafından alınma hızı yüksek olmasına rağmen bu hız tutuklanmış hücrelerde ve serbest süspansiyon kültürü içerisindeki hücrelerde yaklaşık olarak aynıdır. Ancak işaretli molekülün kapsaisin sentezinde kullanılma hızı tutuklanmış hücrelerde çok daha fazla gerçekleşmiştir.

Lindsey ve Yeoman (1984b), fenilalanin ve isokaprik asit gibi metabolik öncü moleküllerin kapsaisin sentezinde kullanılmasının üretimi (11 mg kapsaisin/1g bitki) maksimum seviyelere taşıdığını belirlemişlerdir. Elde edilen bu miktar 1 g taze bitkinin hücrelerinin (hücreler içinde %90 oranında su olduğu varsayılarak) 1.1 mg kapsaisin sentezleyebildiği anlamına gelmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar göstermektedir ki; 1 g bitkinin plasental doku hücreleri 2.04 mg kapsaisini metabolik öncü moleküller olmadan sentezleyebilme kapasitesine sahiptir. Başka bir çalışmada kültür ortamına 2.5 mM ferulik asit eklenmesinin plasental doku hücreleri tarafından kapsaisin sentezini 3.22 mg/g seviyesine çıkardığı belirlenmiştir. Bu sonuç plasental doku hücrelerinin, metabolik öncü moleküllerin varlığında çok daha fazla miktarlarda kapsaisin sentezleyebildiklerini göstermektedir.

Holden vd. (1987), ikincil metabolik bileşiklerin (fenolik bileşikler ve kapsaisin), *Gliocladium deliquescens* tarafından arttırılmasının aynı zamanda fenilalanin amonyum liyaz aktivitesinde de artışa neden olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmada kurdan bileşiği kültür ortamına tutuklanmış hücrelerin ortamına eklendiğinde ikincil metabolik bileşiklerin sentezini uyarıcı etki göstermiş ve *A. niger* ve *R. oligosporus* hücrelerinden elde edilen bileşikler de kültür ortamına eklendiğinde ikincil metabolik bileşiklerin üretimini arttırmışlardır. Bu sonuçlar mikroorganizmalardan ve mantarlardan elde edilen

bileşiklerin, bitki hücresi kültür ortamında uyarıcı ve üretimi arttırıcı moleküller olarak kullanılabileceklerini göstermektedir.

Johnson vd. (1990), yaptıkları çalışmada kitosan, kurdlan ve ksantan'ın kapsaisin üretimi üzerine uyarma kapasitesi ve sodyum aljinatın etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre kapsaisin üretimi tutuklanmış hücrelerde kurdlan ve ksantan kullanımında kontrole göre sırasıyla 1.8 ile 2 kat daha fazla artmıştır. Kurdlan ve ksantan kombinasyonu daha etkilidir ve kültürün 14. gününde kapsaisin üretimini 7.9 kat artırmıştır. Kitosan'la muamele edilmiş serbest hücrelerde ise maksimum kapsaisin üretimi 6. günde gerçekleşmiştir. % 0.05 sodyum aljinat uyarımı kültürün 10. gününde hücre süspansiyonundaki hücrelerde kapsaisinde 1.6 kat artış sağlamıştır.

Johnson vd. (1991), tutuklanmış hücreler ve plasental dokularda kapsaisin üretimi, fungal preparasyonların (*Aspergillus niger* ve *Rhizopus oligosporus* ekstraktları ve süzüntüsü) ve mikrobiyal polisakkaritlerin (kurdlan) kapsaisin üretimi üzerine etkileri ve kapsaisin üretimi üzerine öncü maddelerin etkisini çalışmışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre kapsaisin üretimi tutuklanmış plasental dokularda tutuklanmış hücrelere göre daha yüksektir.

Maksimum kapsaisin üretimi tutuklanmış plasentada başlangıç günündeki 700 µg dan 14. günde 1345 µg değerine ulaşmıştır. Kültürün besin ortamının yenilenmesi sonucu, 28 günlük kültür hücrelerinden 2400 µg miktarında kapsaisin elde edilmiştir. Tutuklanmış hücrelerde kapsaisin üretimi 28. günde 3 µg/g dan 47 µg' a çıkmıştır. Tutuklanmış hücre sisteminde kapsaisin sentezinde kurdlan daha etkili bulunmuştur ve kontrol ile karşılaştırıldığında sentez yaklaşık iki kat artmıştır. Tutuklanmış hücreler, plasental dokulara göre kurdlan etkisine daha etkili cevap vermişlerdir. Her iki fungal türün miselar ekstraktları tutuklanmış plasental dokularda yaklaşık % 25 civarında kapsaisin artışına neden olmuştur.

Ramachandra vd. (1996), *Capsicum frutescens* ve *Daucus carota* hücre süspansiyon kültürlerine *Spirulina platensis*' den elde ettikleri fikosiyanini farklı konsantrasyonlarda uygulamışlardır. *Capsicum frutescens* hücre süspansiyonunun bu şekilde uyarımı ile kapsaisin miktarı yaklaşık olarak iki kat artmıştır. Benzer şekilde *Daucus carota* hücre kültürlerinde de antosiyanın miktarında iki kat artış gözlenmiştir.

Ramachandra ve Ravishankar (2000), *Capsicum frutescens*' in serbest süspansiyon hücreleri ve tutuklanmış hücre kültürlerini fenil propanoid öncü maddeleri protokatekuik aldehit ve kafeik asit ile muamele ederek biyodönüşüm özelliklerini araştırmışlardır. Dışardan bu metabolik öncülerin ilavesi ile protokatekuik aldehit ve kafeik asitin vanilin ve kapsaisine biyodönüşümü belirlenmiştir. Burada önemli nokta ise metabolik öncü ile besleme sonucu protokatekuik aldehitin vaniline biyodönüşümünün kapsaisine çevriminden çok daha fazla olmasıdır. Hâlbuki kafeik asit ile muamele edilen kültürlerde kapsaisin birikimi vanilin birikiminden daha fazladır.

Sudha ve Ravishankar (2002), *Capsicum frutescens* Mill. hücre süspansiyon kültüründe kapsaisin üretimi üzerine kalsiyum kanal araçlarının etkilerini araştırmışlardır. Kalsiyum iyonofor A23187'nin toplam kapsaisin miktarını 1.43 kat artırdığını belirlemişlerdir. Kalsiyum kanal modulatörleri verapamil ve kloropromazin uygulamalarında ise kapsaisin üretiminde ve büyümede azalma belirlemişlerdir.

Sudha ve Ravishankar (2003a), poliamin bileşiklerinin kapsaisin birikimine etkisini araştırmışlardır. *Capsicum frutescens* hücrelerinin süspansiyon kültür ortamına putresin uygulanması sonucu büyüme hızında ve kapsaisin sentezlenmesinde artış gözlemlenmiştir. Kapsaisin miktarındaki bu artışa, kapsaisin sentaz enziminin aktivitesinin artması sebep olmuştur.

Sudha ve Ravishankar (2003b), iki farklı bileşik; salisilik asit (SA) ve metil jasmonat'ı (MeJa) ayrı ayrı ve birlikte *Capsicum frutescens* hücrelerinin süspansiyon kültürlerine uygulamışlar ve her iki bileşiğin de kültür hücrelerinde kapsaisin sentezini ve birikimini arttırdığını belirlenmiştir. Ancak bu bileşiklerden sadece biri; salisilik asit aynı zamanda kapsaisin sentaz enziminin aktivitesini de arttırmıştır. Metil jasmonat bileşiğinin ise enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara göre metil jasmonat bileşiğinin kapsaisin miktarını arttırıcı etkisinin kapsaisin yıkımını ya da diğer moleküllere katılımını engelleyici aktivitesinden kaynaklandığı söylenebilir. Hücrelere SA uygulanması sonucu, etilen üretimi engellenmiş, MeJa uygulanması ise etilen üretiminin artmasına neden olmuştur. Hücrelerin poliamin üretimi de SA uygulanması ile artmış, MeJa uygulanması sonucu da düşmüştür (Sudha ve Ravishankar, 2003b). Poliamin ve etilen biyosentezlerinin, ortak olarak kullanılan S-

adenozil metiyonin (SAM) molekülleri için rekabet halinde oldukları düşünülürse elde edilen sonuçlar şaşırtıcı değildir.

Umamaheswari ve Lalitha (2007), *Capsicum annuum* kallus hücrelerinden kapsaisin üretiminin artırılması için yeni bir yöntem geliştirmeye çalışmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda gibberellik asit, indol asetik asit, naftalen asetik asit, 2.4 D ve kinetin ilave edilmiş Murashige Skoog (MS) besiyerinde kültüre almışlardır. Kallus gelişimi ve plasental dokuların büyümesini en fazla 2 mg/L 2.4 D ve 0.5 mg/L kinetin içeren MS besiyerinde belirlemişlerdir.

İşlek (2009), yapmış olduğu doktora tez çalışmasında Kahramanmaraş Hat-187 biber tohumlarına ait hücre süspansiyon kültüründe, kapsaisin üretimi üzerine tutuklama işleminin ve farklı konsantrasyonlarda selülaz, ksantan, kurdlan, salisilik asit ve metil jasmonat uyarıcılarının farklı zamanlardaki etkilerini incelemiştir. Tutuklama işleminin kapsaisin birikimi üzerine artırıcı etki yaptığını belirlemiştir. Tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı, kontrol gruplarında ve uyarıcı uygulaması yapılan örneklerde, serbest hücrelere göre daha yüksek bulunmuştur. Selülaz ve kurdlan uyarıcılarının kapsaisin birikimi üzerine etkisini diğer uyarıcılara göre daha etkili bulmuştur.

2.6 Kapsaisin Sentezini Uyararak İçin Kullanılan Ağır Metaller

Kaya (2015), yapmış olduğu yüksek lisans çalışmasında Maraş-1 biber tohumlarına ait hücre süspansiyon kültüründe, kapsaisin üretimi üzerine tutuklama işleminin ve farklı konsantrasyonlarda triakontanol'un değişen zamanlardaki etkilerini incelemiştir. Tutuklama işleminin kapsaisin birikimi üzerine artırıcı etki yaptığını belirlemiştir. Tutuklanmış hücrelerdeki kapsaisin miktarı, kontrol gruplarında ve uyarıcı uygulaması yapılan örneklerde, serbest hücrelere göre daha yüksek bulunduğunu belirtmiştir.

Özgül ağırlıkları 5 gr/ cm³ den, atom numarası 20 den fazla olan elementler periyodik cetvelin geçiş elementleri olarak tanınan geniş bir gruba aittirler. Ağır metal terimi kirlenme ve toksisite bakımından bir yan anlam olarak kullanılmaktadır. Bu grubun içine 70 kadar element girmekle birlikte ekolojik bakımdan önemli 20 element dikkati çekmektedir (Fe, Mn, Zn, Cu, V, Mo, Co, Ni, Cr, Pb, Be, Cd, Tl, Sb, Se, Sn, Ag, As, Hg, Al). Bunların bir kısmı, bitki ve hayvanlar için mikrobisin (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo,

Ni) maddesi olabilmekte, belirli sınırlar ölçüsünde toksik olmamaktadırlar (Yıldız, 2004).

Elisitör olarak kullanılan çinkonun bitkiler için suda çözünen formları uygundur ve çinko alınışı, maddenin topraktaki konsantrasyonu arttıkça artar. Çinko alınımı, bitkinin türüne bağlı olduğu kadar bulunduğu ortama da bağlıdır. Özellikle ortamdaki kalsiyum miktarı çinko alınımını etkiler. Çinko, genellikle bitki köklerinde bulunur. Çinko, bitki metabolizması için çok gerekli bir elementtir. Karbonhidrat, protein, fosfat, RNA oluşumunda görev aldığı söylenebilir. Membranların geçirimsizliğinde rolü olduğu bulunmuştur. Ayrıca bakteri ve mantarların yol açtığı hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğu da bilinir (Okçu vd., 2009).

Abiyotik stres şartları altında bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan oldukça toksik ve reaktif moleküller oluşmaktadır. Bu moleküller protein, lipid karbohidrat ve DNA'nın yapısını bozarak oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır. Bu hasarın önlenmesine yönelik olarak bitkiler de antioksidant savunma sistemlerine sahiptir. Bu antioksidant sistemler enzimatik (süperoksit dismutaz, SOD; katalaz, CAT; askorbat peroksidaz, APX; glutatyon redüktaz, GR vb.) ve enzimatik olmayan (fenolik bileşikler, alkoloid, askorbik asit, glutatyon vb.) olmak üzere ikiye ayrılır (Gill ve Tuteja, 2010).

Bitkilerin savunma mekanizmasında görev alan çeşitli enzimler sentezlenmekte ve gerekli durumlarda bitkiyi korumaktadır. Bu enzimlerden savunma mekanizmasının işleyişinde etkin olarak yer alan öncül enzimlerden biride peroksidazdır (POX) (Ali vd.2003; Düzcan ve Arabacı, 2010). Peroksidaz bitkilerdeki çoklu savunma sisteminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve bitkilerin çoğunda kloroplastlarda sentezlenmektedir. Yapılan araştırmalarda peroksidaz enzimi bayırturpu kökü, ıspanak yaprakları, domates tohumları, patates yumruları ve kültürlü yerbıstığı gibi çeşitli bitkilerden karakterize edilmiştir (Boeuf vd., 2000). Peroksidaz (POX hidrojen veren bileşiklerle bunu alan hidrojen peroksit arasındaki reaksiyonları katalizleyen bir oksidoredüktaz enzimidir. Peroksidaz enzimi aktif merkezinde demir bulundurarak reaksiyonları katalizler (Dziki vd., 2008). Bakır, demir, çinko gibi metaller enzimlerin aktivitesini artırarak bitki ve canlıların yaşamına katkıda bulunurken kurşun, kalay gibi

ağır metaller toksik etkilerle canlıların, bitkilerin gelişimini etkiler (Düzcan ve Arabacı, 2010).

Sekonder metabolitler içerisinde en yaygın olanı fenolik bileşikler olup, bitkinin meyve, tohum, yaprak ve gövde gibi farklı kısımlarında bulunabilmektedirler (Coşkun, 2006). Fenolik bileşiklerin özellikle insan sağlığı üzerine olan olumlu etkilerinin ortaya konulması ile bu bileşiklere olan ilgi günümüzde önemli ölçüde artmıştır. Nitekim fenolik bileşikler, serbest radikaller olarak adlandırılan ve zararlı bileşikleri kendilerine bağlama yeteneğinde olan antioksidan özellikler sergileyen bileşiklerdir.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

3.1 Bitkisel Materyal

Proje çalışmasında kullanılan biber tohumu (Maraş-1) Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

3.2 Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılacak olan biber tohumları ekim öncesinde yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuştur. Biber tohumları kapaklı cam bir kavanoza konularak üzerine % 70' lik etil alkol ilave edilmiş ve 3 dk bekletilmiştir. Etil alkol steril kabinde süzülerek , % 40'lık ticari sodyum hipoklorit ilave edilmiş ve 30 dakika süreyle çalkalayıcıda çalkalanarak, hipoklorit ayrılmıştır. Daha sonra 3 kez 5'er dakika beklenerek şekilde steril su ilave edilmiş ve süzümüştür. İçerisinde yaklaşık 50'şer ml steril agarlı besin ortamı konulan magenta kaplarının her birinin içine yüzeysel sterilizasyonu biten tohumlardan 9 adet yerleştirilmiştir (Fotoğraf 3.1.). Kapakları kapatılmış ve üzerine streç film sarılmıştır (Ellialtıoğlu vd., 1998).



Fotoğraf 3.1. Biber tohumlarının steril besin ortamına ekimi.

3.3 Tohum Çimlendirme Ortamı ve Bileşenlerinin Hazırlanması

Biber tohumlarının çimlendirilmesi için hormonsuz Murashige ve Skoog (1962)(MS) temel besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.1.).

Besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan saf maddelerden hazırlanan stok çözeltiler +4 C°' deki buzdolabında saklanmıştır. Makro ve mikro element tuzları ile vitaminlerin 100 kat derişik 250 ml'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Tohum çimlendirme ortamı olan hormonsuz MS besin ortamına % 3 sakkaroz ile % 0.7 agar ilave edilmiş ve besiyerinin pH' ı 5.7' e ayarlanmıştır (Ellialtıoğlu vd. 1998)

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

Bileşenler	MS Ortamı, mg/L
Makro bileşenler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
NaFeEDTA	36,7
Mikro Bileşenler	
MnSO ₄ .2H ₂ O	16
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Vitaminler	
Myo-Inositol	100
Glycin	2
Thiamine-HCl	0,1
Nikotinik Asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5

3.4 Kültür Koşulları

Tohum imlendirme aşamasında magenta kutuları 25 C° ±1 sıcaklığına sahip iklim odasında bir hafta süreyle karanlıkta tutulmuş, tohumlarda çimlenmenin başladığı görüldükten sonra 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyodik düzene geçilmiştir. Biber tohumunun Ekimden 4 hafta sonraki gelişimi Fotoğraf 3.2' de görülmektedir.



Fotoğraf 3.2. Biber tohumunun Ekimden 4 hafta sonraki gelişimi

3.5 Eksplant Tipi ve Kallus Eksplantın Ortamına Dikimi

Steril koşullarda çimlendirilen tohumlardan gelişen biber fideleri, dört haftalık inkübasyon süresini tamamladıktan sonra eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Her bir fideden hipokotil eksplantı kesilmiştir. Öncelikle kkboğazından kesim yapılarak kökler uzaklaştırılmış, hipokotil bölgesi yaklaşık 15 mm'lik parçalara ayrılmış hipokotil eksplantı hazırlanmıştır. Hipokotil eksplantından kallus eldesinde 1.0 mg/L 2,4-D ile 0.1 mg/L kinetin ve % 3 sakkaroz ile % 0.7 agar ilave edilmiş MS besin ortamı kullanılmıştır. Besiyerinin pH' ı 5.7' e ayarlanmıştır.

Hipokotil eksplantları MS besiyerine yatay olarak yerleştirilmiştir (Elliltıoğlu vd., 1998). Hipokotil eksplantından gelişen kallus dokuları 16 saat aydınlık ve 8 saat

karanlık olacak şekilde fotoperiyodik düzende iki hafta süreyle iklim odasında geliştirilmiştir. Gelişen kallus dokuları Fotoğraf 3.3.' de görülmektedir. Gelişen kallus dokuları, magenta kutuları içindeki 1.0 mg/L 2,4-D ile 0,1 mg/L kinetin ve % 3 sakkaroz ile % 0,7 agar ilave edilmiş MS besin ortamına transfer edilmiştir. Magenta kutularındaki kallus dokuları yine aynı periyodik düzende iklim odasında geliştirilmiştir. Alt kültürde gelişen kallus dokusu Fotoğraf 3.4.' de görülmektedir.



Fotoğraf 3.3. MS besiyeri ortamında gelişen kallus dokuları



Fotoğraf 3.4. Alt kültürde çoğalan kallus dokusu

3.6 Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması

Kallus oluşumu için kullanılan 1.0 mg/L 2,4-D ile 0,1 mg/L kinetin ve % 3 sakkaroz ilave edilmiş MS besin ortamı süspansiyon kültüründe de kullanılmış, sadece ortama agar ilavesi yapılmamıştır. Kallus dokuları steril kabin içerisine yerleştirilen ve % 70'lik alkole batırılmış pamukla silinen hassas terazide steril kurutma kağıtları üzerinde tartılarak transfer edilmiştir. Magenta kutuları içerisinde geliştirilmiş olan kallus dokuları, içlerine 40'ar ml sıvı besin ortamı konulmuş 100 ml'lik erlenlere aseptik koşullarda her birine 2 gr olacak şekilde konulmuştur. Hücre süspansiyonlarını bulunduran erlenmayerler $25C^{\circ} \pm 2$ dereceye ayarlanmış çalkalayıcı üzerine yerleştirilmişlerdir (Fotoğraf 3.5). Çalkalayıcının hızı 110 devir/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır (Ellialtıoğlu vd., 1998).



Fotoğraf 3.5. Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri

3.7 Uyarıcı Uygulamaları ve Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması

Bir ay boyunca geliştirilen hücre süspansiyon kültürleri taze besiyeri ortamına alındıktan sonra uyarıcı uygulamaları yapılmıştır. Uyarıcı olarak çinko sülfat ve gümüş nitrat sulu çözeltileri kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Steril kabin içinde, serbest ve tutuklanmış hücreler ile 40'ar ml süspansiyon kültürü içeren 100 ml'lik erlenmayerlere, steril stok çözeltilerinden seyreltilerek son konsantrasyonları şeklinde, gümüş nitrat ve çinko sülfat (0.1, 0.2 ve 0.4 M) uyarıcıları steril mikropipet yardımıyla 1 ml olarak ilave edilmiştir. Uyarıcı uygulanmayan kontrol örnekleri oluşturulmuştur.

Uyarıcı uygulamalarının ardından yine çalkalayıcılar üzerine yerleştirilen süspansiyon kültürleri 24, 48 ve 72 saat sonra hücre ve süzütüsünün birbirinden ayrılması için whatman no:2 filtre kâğıdı üzerinde buhner hunisi vakum pompası yardımıyla vakumla süzme işlemine tabi tutulmuş, doku ve süzüntü kısımları birbirinden ayrılmıştır. Süzme işleminin sonunda kallus yaş ağırlığı (g) ölçülmüş, süzüntü kısmı 100 ml'lik plastik şişelerde, kallus dokusu ise ağzı kilitlenen küçük plastik poşetlere konularak analiz yapılncaya dek -70C° deki derin dondurucuda saklanmıştır.

3.8 Ekstraksiyon İşlemleri

3.8.1 Hücrelerden kapsaisin ekstraksiyonu

Kapsaisin ekstraksiyonu için hücrelerden 0.1 g alınarak 3 kez 8 ml etil asetat ile havanda ezilmiştir. Daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir ve üstteki süpernatantlar toplanmıştır (Johnson vd., 1990). Toplanan süpernatant bir döner buharlaştırıcı balonuna doldurularak 55 C° sıcaklıkta, 180 devir/dakika hızda ve düşük basınç altında etil asetat kısım, kuruluğa yakın olacak şekilde buharlaştırılmıştır. Kalan tortu 1 ml etil asetat ile çözülmüş ve etiketlenmiş örnek şişelerine alınmıştır. Örnekler analiz edilinceye kadar -70C°'de derin dondurucuda bekletilmiştir.

3.8.2 Hücrelerin süzüntülerinden kapsaisin ekstraksiyonu

Hücrelerin süzüntülerinden kapsaisin ekstraksiyonu için 0.4 ml süzüntü alınarak 3 kez 8 ml etil asetat ilave edilerek 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatant alınarak bir döner buharlaştırıcı balonuna doldurulmuştur (Johnson vd., 1990). Döner buharlaştırıcıda 55 C° sıcaklıkta, 180 devir/dakika hızda ve düşük basınç altında etil asetat kısım kuruluğa yakın olacak şekilde buharlaşmaya kadar ekstrakte edilmiştir. Kalan tortu kısmı 1 ml etil asetat ile çözülmüş ve örnekler analiz edilinceye kadar -70 C°'de derin dondurucuda bekletilmiştir.

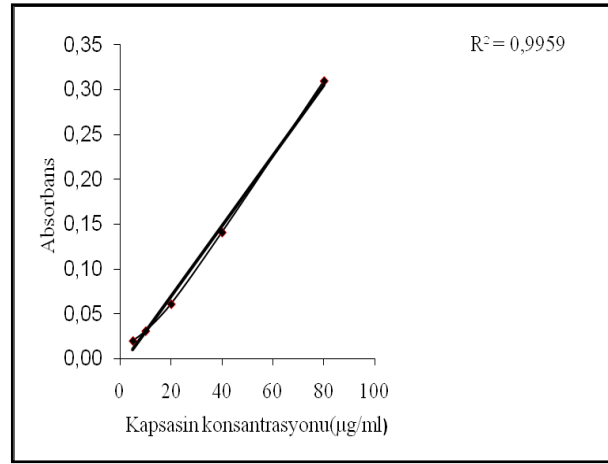
3.9 Kapsaisin Analizi

HPLC cihazında ölçüm yapmadan önce örneklerde kapsaisin varlığının belirlenmesinde zaman kazanmak amacıyla ön çalışma olarak spektrofotometre de ölçüm ile kapsaisin tayini yapılmıştır (Ramos Palacio, 1977; Ramos Palacio, 1979).

3.9.1 Kapsaisin standartının hazırlanması

Kapsaisin standartı olan N-Vanillynonamide, Sigma (V-9130)'dan temin edilmiştir. Spektrofotometrede ölçüm için, kapsaisinin 50 ml 100 µg/ml'lik stok standart çözeltisi etil asetat ile hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltiden sırasıyla 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 µg/ml'lik standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Bu standart çözeltilerden 0.2 ml alınarak üzerine 1 ml etil asetat ilave edilmiştir. Spektrofotometrede ölçüm yapmadan önce 0.1 ml % 1'lik Vanadyum oksitriklorit (VOCl_3) ilave edilmiştir. Renk kaybını engellemek için VOCl_3 ilave edildikten sonra ölçüm işlemi hızlı bir şekilde yapılmıştır. Kapsaisin standartlarının ölçüm işlemleri spektrofotometrede 720 nm'de 5 tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Ölçüm işlemi sonunda elde edilen standart grafik Şekil 3.1.'de görülmektedir.



Şekil 3.1 Spektrofotometrede ölçüm için kapsaisin standartı ile çizilen grafik.

HPLC cihazında ölçüm için, kapsaisinin 50 ml 100 µg/ml'lik stok standart çözeltisi metanol ile hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltilerden sırasıyla 5, 10, 20, 40, 80 ve 100 µg/ml'lik standart çözeltiler hazırlanmıştır. HPLC analizlerinden önce standart çözeltiler 0.45 µm'lik filtrelerden geçirilmiştir.

3.9.2 Kapsaisin tayininde HPLC koşulları

HPLC analizlerinden önce sıvı ekstraktlar 0.45 µm' lik filtrelerden geçirilmiştir. Analiz işlemleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde Agilent 1260 model HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Kromatografi koşulları aşağıdaki gibidir;

Dedektör: 1260 Infinity Diode Array Detector

Dalga boyu: 280 nm

Kolon: ACE C18 (150 mm x 4,56 mm), 5 µm por çapı

Akış hızı: 1ml/dk

3.10 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.10.1 Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Enzim ekstraktlarının hazırlanması için öncelikle her deneme serisine ait kontrol ve uygulama gruplarından 1'er g yaş kallus örneği (n=3 olduğu için) üçer kez tartılmıştır. SOD enzim aktivitesi tayini için 1 mM EDTA içeren, 5 ml pH 7.8'lik 0.05 M Na-fosfat tamponunda; POX enzim aktivitesi tayini için % 17 sakkaroz içeren, 3 ml pH 8.3'lük 0.05 M tris-glisin tamponunda buz banyosu içerisinde ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstrakt 13000 rpm'de mikrosantrifüjde 30 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen ekstraktlardan toplam protein miktar tayinleri, Bradford'a (1976) göre BSA (Bovine Serum Albümin) standartları kullanılarak yapılmıştır.

3.10.2 Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Bitkisel materyaldeki süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından belirtilen yönteme göre yapılmıştır. Yöntem, 560 nm'de nitroblue tetrazolium'un (NBT) fotokimyasal indirgenmesinin örnekte bulunan SOD enzimi tarafından engellenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.8), 33 µM NBT, 10 mM L-Methionine, 0.66 mM EDTA ve 0.0033 mM Riboflavin içermektedir. Süpernatant uygun miktarda seyreltilerek reaksiyon karışımı (3 ml) ilave edilmiştir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için bu karışım, 10 dakika 300 µmol-1 m-1 s-1 ışık şiddeti altında, oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Bu süre sonunda spektrofotometre ile 560 nm'de örneklerin absorbans değerleri alınmıştır. Enzim aktivitesi, NBT'nin % 50 inhibisyonu için gerekli SOD miktarı, 1 enzim ünitesi olarak hesaplanmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein-1.g yaş ağırlık⁻¹ olarak belirlenmiştir.

3.10.3 Peroksidaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) enzimi aktivitesinin belirlenmesi, Herzog ve Fahimi (1973) yöntemine göre yapılmıştır. Elde edilen süpernatantlara (200 µl), 2.75 ml DAB (diaminobenzidin-tetrahidroklorid dihidrat) çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra çözeltiliye 25 ml 0.15 M Sodyum-Fosfat-Sitrat Tamponu (pH 4.4) ilave edilerek, geniş porlu filtre kağıdından süzülerek siyah bir şişe içerisine konulup serin bir yerde muhafaza edilmiştir ve 50 µl % 0.6 H₂O₂ eklenmiştir. Spektrofotometrede 465 nm dalga boyundaki absorbans değişimi 1 dk gözlenerek ve 1 enzim ünitesi dakikada tüketilen µmol⁻¹.m⁻¹ H₂O₂ miktarı olarak hesaplanmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹.g taze ağırlık⁻¹ olarak belirtilmiştir.

3.11 Total Fenolik Bileşik Belirlenmesi

Total fenolik madde içeriğinin tespiti için toz hâline getirilmiş örneklerden fenolik maddeler metanol kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Fenolik madde miktarı tayini için gallik asit eşleniği olarak da bilinen Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılmıştır (Singleton v.d., 1999). Her 100 µl ekstrakt üzerine 750 µl Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve 5 dakika sonra %6'luk Na₂CO₃ çözeltisinden 750 µl eklenmiştir. 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra kör tüpe karşı 765 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Total fenolik madde içeriği ise µg GAE/mL olarak ifade edilmiştir (Gayosa vd., 2004; Singleton and Rossi, 1965).

3.12 İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasında bütün deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Üzerinde durulan özellikler bakımından elde edilen sonuçlar, SPSS 16.0 paket programı kullanılarak Tukey (SPSS 16.0 One-Way Anova) testine göre p<0.05 seviyesinde analiz edilmiştir.

BÖLÜM IV

BULGULAR

Capsicum annuum L. (Maraş-1) hücre süspansiyon kültürlerine 0.1 M, 0.2 M ve 0.4 M AgNO₃ ve ZnSO₄ 24, 48 ve 72 saat uygulandıktan sonra alınan hücre ve süzüntülerdeki kapsaisin miktarları Çizelge 4.1 ve 4.2’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda AgNO₃ uygulamalarının *Capsicum annuum* L. hücreleri ve süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkileri (n=3)

Zaman (saat)	Uygulama Dozu	Kapsaisin (µg/g)	
		Hücre	Süzüntü
24	Kontrol	56,842 ± 2,632	21,316 ± 1,316
	0.1 M AgNO ₃	50,702 ± 3,038	34,474 ± 3,947*
	0.2 M AgNO ₃	43,684 ± 2,632*	79,210 ± 3,947*
	0.4 M AgNO ₃	36,667 ± 5,478*	78,772 ± 1,519*
48	Kontrol	62,105 ± 5,263	33,158 ± 2,632
	0.1 M AgNO ₃	51,579 ± 2,632*	75,921 ± 4,605*
	0.2 M AgNO ₃	46,316 ± 2,632*	95,000 ± 1,316*
	0.4 M AgNO ₃	40,175 ± 1,519*	71,000 ± 1,732*
72	Kontrol	47,632 ± 1,316	32,281 ± 3,038
	0.1 M AgNO ₃	50,263 ± 3,947	73,509 ± 3,039*
	0.2 M AgNO ₃	91,053 ± 2,632*	67,368 ± 5,263*
	0.4 M AgNO ₃	89,737 ± 1,316*	102,895 ± 1,316*

* kontrol grubuna göre önemlilik derecesinde farklılığı (p<0.05) göstermektedir (Tukey test)

Hücre ve süzüntüdeki en yüksek kapsaisin miktarı 0.4 M AgNO₃ 72 saat uygulamasında tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 24 saat ve 48 saat uygulamalarında kapsaisin miktarı hücrelerde azalmakta, süzüntüde artmaktadır. AgNO₃ uyarıcısının hücre çeperlerini daha fazla etkileyip kapsaisinin süzüntüye geçmesini sağladığı düşünülmektedir.

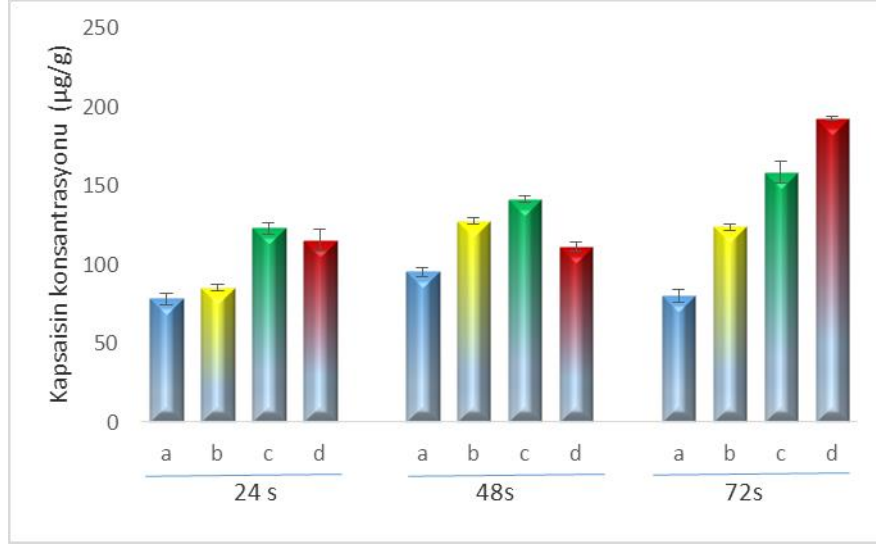
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda ZnSO₄ uygulamalarının *Capsicum annuum* L. hücreleri ve süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkileri (n=3)

Zaman (saat)	Uygulama Dozu	Kapsaisin (µg/g)	
		Hücre	Süzüntü
24	Kontrol	56,842 ± 2,632	21,974 ± 0,657
	0.1 M ZnSO ₄	112,105 ± 2,632*	56,842 ± 2,632*
	0.2 M ZnSO ₄	134,474 ± 3,947*	63,421 ± 3,947*
	0.4 M ZnSO ₄	148,947 ± 2,632*	55,965 ± 1,519*
48	Kontrol	62,105 ± 5,263	34,474 ± 1,316
	0.1 M ZnSO ₄	121,316 ± 1,316*	60,526 ± 1,823*
	0.2 M ZnSO ₄	181,842 ± 3,947*	59,298 ± 0,304*
	0.4 M ZnSO ₄	171,316 ± 6,579*	21,316 ± 1,316*
72	Kontrol	50,702 ± 5,478	33,158 ± 2,632
	0.1 M ZnSO ₄	162,105 ± 6,963*	17,895 ± 0,526*
	0.2 M ZnSO ₄	145,000 ± 11,842*	23,947 ± 1,316*
	0.4 M ZnSO ₄	184,474 ± 14,474*	30,526 ± 2,632

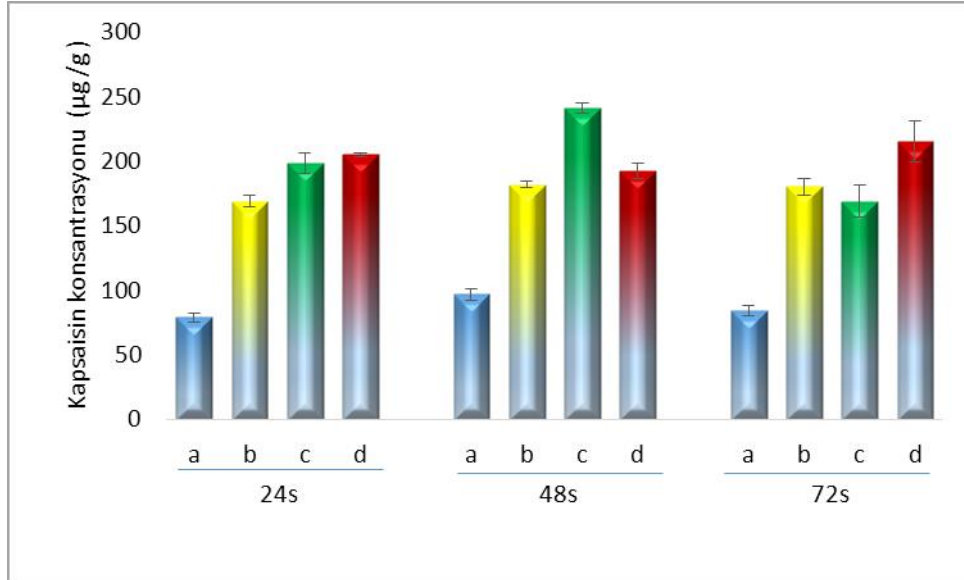
* kontrol grubuna göre önemlilik derecesinde farklılığı (p<0.05) göstermektedir (Tukey test)

Çinko uygulamasında tüm uygulama gruplarında kapsaisin miktarında kontrole göre artış görülmüştür. En fazla birikim hücrede 0.4 M ZnSO₄ 72 saat uygulamasında, süzüntüde 0.2 M ZnSO₄ 24 saat uygulamasında meydana gelmiştir.

Hücre ve süzüntülerdeki toplam kapsaisin miktarları Şekil 4.1 ve 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi kapsaisin miktarı üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M AgNO₃ c: 0.2 M AgNO₃ d: 0.4 M AgNO₃



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda ZnSO₄ uygulamalarının farklı zamanlarda serbest ve tutuklanmış hücrelerin süzüntülerinde kapsaisin miktarı üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M ZnSO₄ c: 0.2 M ZnSO₄ d:0.4 M ZnSO₄

Uygulanan tüm ZnSO₄ ve AgNO₃ konsantrasyonları tüm zamanlarda toplam kapsaisin miktarını kontrole göre artırmıştır. ZnSO₄ uygulaması kapsaisin birikimini artırmada AgNO₃ uygulamasına göre daha etkili bulunmuştur.

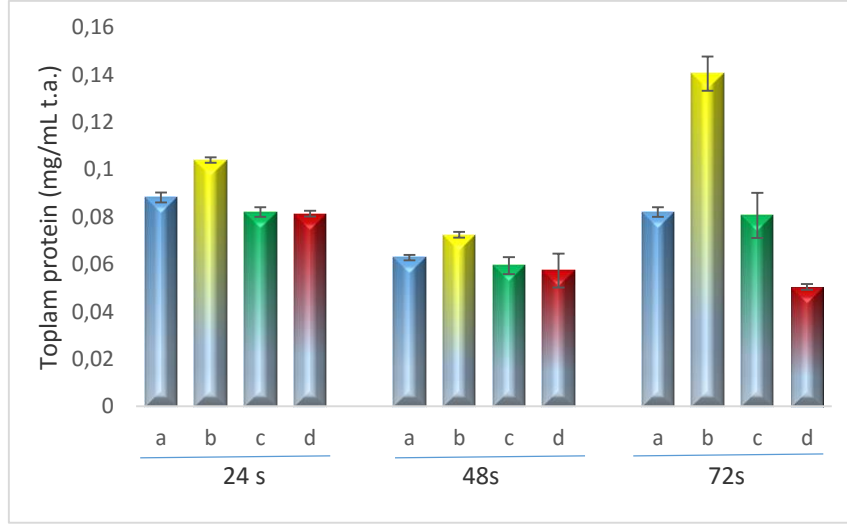
Kapsaisin biber bitkisinden elde edilen önemli bir alkaloidtir. Kapsaisin eldesi için kullanılacak biber bitkisini normal koşullarda yetiştirmek 4-5 ayı almaktadır ve bu nedenle de kapsaisinin sürekli bir üretim süreci uzun zamanda ve kısıtlı bir zaman periyodunda gerçekleştirilebilmektedir. Biberin serbest hücre kültürlerinin in vitro şartları altında sürekli yetiştirilebilmesi kapsaisin eldesi için sürekliliği sağlayabilecek bir yoldur.

Kapsaisin üretiminde elisitör olarak ağır metal uygulamalarına dair henüz bir literatür bulunmamakla birlikte, çeşitli elisitörler kullanılarak sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik çalışmalar mevcuttur. Jiang-ning vd. (2009), *Rhodiola sachalinensis* in vitro kültürlerinde 60 µmol / L AgNO₃ uygulamışlar ve salidroside üretimini iki kat artırdığını belirlemişlerdir. Cai vd. (2013), yaptıkları çalışmada gümüş ve kadmiyum'un *Vitis vinifera* hücre süspansiyon kültürlerinde resveratrol üretimini kontrole göre 1.6 kat artırdığını tespit etmişlerdir. Riahi-Madvar vd. (2014), *Lepidium draba*' da çinko uygulayarak sulforaphane üretimini asidik ortamda kontrole göre 3.6 kat artırdığını bildirmişlerdir. Uygulanan ağır metalin reaktif oksijen türlerini tetiklediğini ve bu yolla sekonder metabolit üretimini artırabileceğini ifade etmişlerdir. Mehdy (1994) ise Metal iyonları'nın birçok sekonder metabolit biyosentezini uyarabileceğini belirtmiştir. Metal iyonlarının aynı zamanda oksidatif strese neden olarak hidrojen peroksit üretimini arttırdığı ve hidrojen peroksitin savunma ve sekonder metabolit sentezi ile ilgili genlerin ekspresyonuna (Sesquiterpen siklaz ve fenil amonyum liyaz enzimi gibi) yol açtığını ortaya çıkarmıştır.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda AgNO₃ uygulamalarının *Capsicum annuum* L. hücrelerinde toplam protein ve fenolik madde miktarı üzerine etkileri (n=3)

Zaman (saat)	Uygulama Dozu	Toplam Protein (mg/mL)	Toplam Fenolik Madde (µg GAE/mL)
24	Kontrol	0,0882 ± 0,0020	2,792 ± 0,0020
	0.1 M AgNO ₃	0,1040 ± 0,0012*	2,798 ± 0,0020
	0.2 M AgNO ₃	0,0834 ± 0,0031	2,547 ± 0,0020*
	0.4 M AgNO ₃	0,0814 ± 0,0012	2,03 ± 0,0020*
48	Kontrol	0,0628 ± 0,0011	2,719 ± 0,0020
	0.1 M AgNO ₃	0,0724 ± 0,0012	2,508 ± 0,0020*
	0.2 M AgNO ₃	0,0594 ± 0,0036	2,031 ± 0,0020*
	0.4 M AgNO ₃	0,0573 ± 0,0071	2,03 ± 0,0010*
72	Kontrol	0,0820 ± 0,0020	2,287 ± 0,0020
	0.1 M AgNO ₃	0,1404 ± 0,0072*	1,523 ± 0,0020*
	0.2 M AgNO ₃	0,0807 ± 0,0095	0,742 ± 0,0316*
	0.4 M AgNO ₃	0,0504 ± 0,0012*	0,512 ± 0,0015*

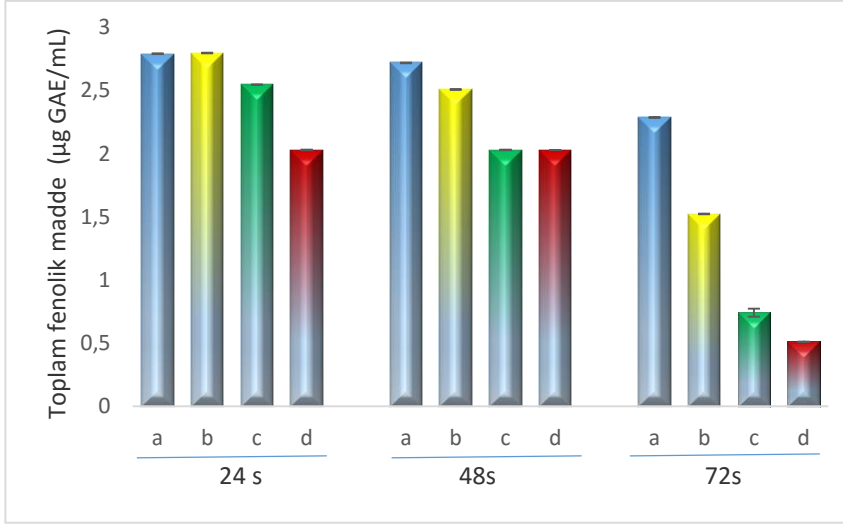
* kontrol grubuna göre önemlilik derecesinde farklılığı (p<0.05) göstermektedir (Tukey test)



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi toplam protein miktarı üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M AgNO₃ c: 0.2 M AgNO₃ d:0.4 M AgNO₃

Gümüş nitrat uygulamasının biber bitkisi üzerindeki etkisi incelendiğinde kontrol grubuna oranla tüm uygulama zamanlarında 0.1 M AgNO₃'ün toplam protein miktarını artırdığı, 0.2 M AgNO₃ ve 0.4 M AgNO₃'ün ise konsantrasyon artışına paralel olarak azalttığı görülmektedir. İstatistiki açıdan önemli artışlar %17.91 ile 0.1 M AgNO₃ 24 saat ve %71.22 ile 0.1 M AgNO₃ 72 saat, önemli azalma ise %38.54 ile 0.4 M AgNO₃ 72 saat uygulamalarındadır (p<0.05).

Elde ettiğimiz verilere paralel şekilde yüksek konsantrasyonda ağır metallere maruz kalan ayçiçeği bitkilerinde toplam protein miktarında azalmalar meydana gelmiştir (Kastori vd., 1992). Ayçiçeği fidelerinin civa klorüre maruz bırakıldığı bir çalışmada da toplam çözünebilir protein miktarında kontrole göre azalmalar bulunmuştur (Kırbağ, Zengin ve Munzuroğlu, 2006).



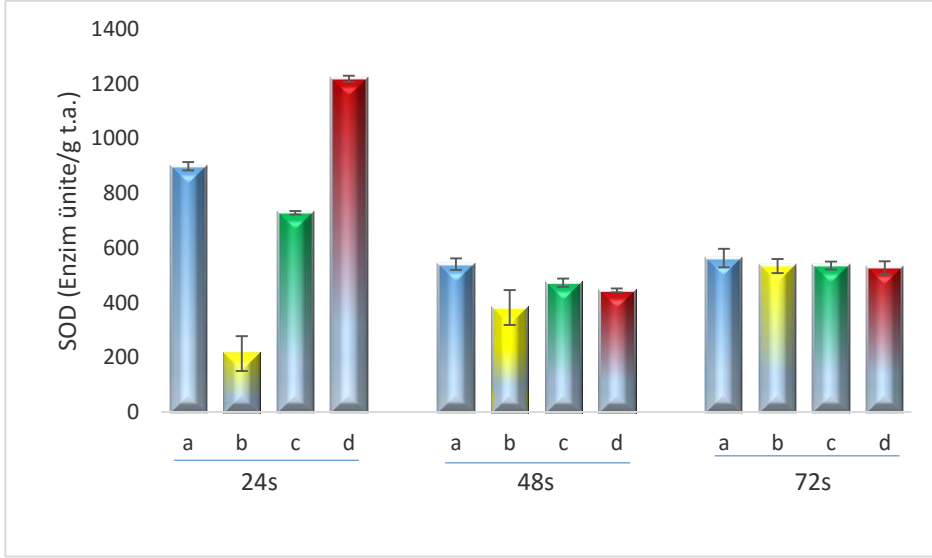
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M AgNO₃ c: 0.2 M AgNO₃ d:0.4 M AgNO₃

Toplam Fenolik madde miktarı % 0.2 artış gösteren 0.1 M AgNO₃ 72 saat uygulaması dışındaki tüm uygulama konsantrasyon ve zamanlarında kontrol grubuna oranla azalma göstermiştir. Doğan ve Çolak. (2009), da ekmeleklik buğdaya uygulanan kurşun konsantrasyonlarının bitkinin kök ve otsu gövdelerinde protein ve fenolik bileşiklerin miktarını azalttığını tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda AgNO₃ uygulamalarının *Capsicum annuum* L. hücrelerinde SOD ve POX enzim aktiviteleri üzerine etkileri (n=3)

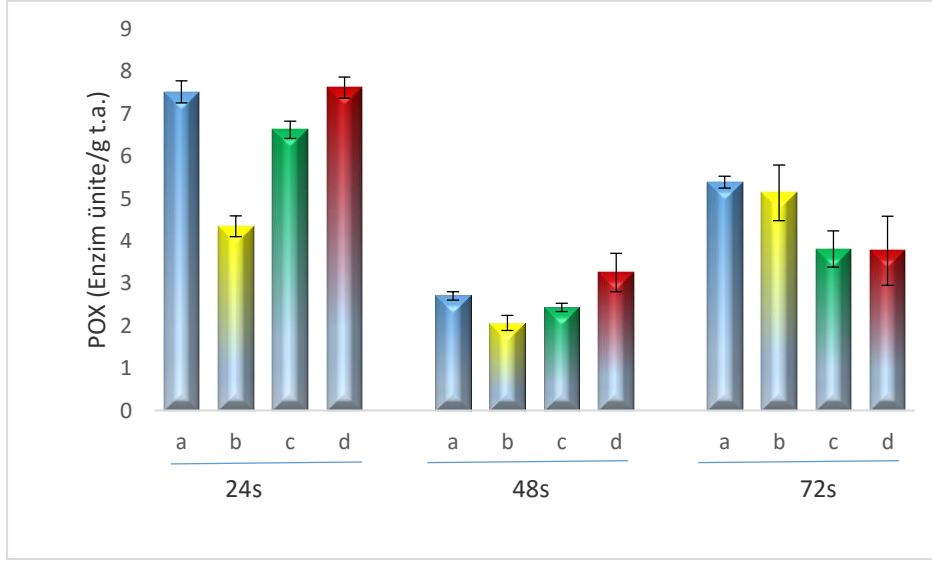
Zaman (saat)	Uygulama Dozu	SOD (Enzim ünite/g t.a.)	POX (Enzim ünite/g t.a.)
24	Kontrol	899,2067 ± 15,3296	7,5226 ± 0,2605
	0.1 M AgNO ₃	213,7291 ± 63,6974*	4,3482 ± 0,2451*
	0.2 M AgNO ₃	728,9037 ± 6,4265*	6,6297 ± 0,2046
	0.4 M AgNO ₃	1218,904 ± 10,9892*	7,6254 ± 0,2474
48	Kontrol	540,634 ± 21,1126	2,7071 ± 0,0997
	0.1 M AgNO ₃	382,3730 ± 63,6117*	2,0667 ± 0,1783
	0.2 M AgNO ₃	472,8833 ± 14,8253	2,4371 ± 0,0980
	0.4 M AgNO ₃	445,2387 ± 7,10439	3,2577 ± 0,4541
72	Kontrol	562,6863 ± 33,9328	5,3895 ± 0,1412
	0.1 M AgNO ₃	533,9719 ± 25,5431	5,1407 ± 0,6559
	0.2 M AgNO ₃	535,9886 ± 14,5248	3,8100 ± 0,4269*
	0.4 M AgNO ₃	527,5666 ± 24,0108	3,7744 ± 0,8148*

* kontrol grubuna göre önemlilik derecesinde farklılığı (p<0.05) göstermektedir (Tukey test)



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M AgNO₃ c: 0.2 M AgNO₃ d:0.4 M AgNO₃

Biber bitkisinde süperoksit dismutaz enzim aktivitesi 0.4 M AgNO₃ 24 saat uygulaması dışında tüm uygulama grup ve zamanlarında kontrol grubuna göre azalma göstermiştir. En düşük değer 213,7291 EU/g t.a. ile 0.1 M AgNO₃ 24 saat uygulamasında, en yüksek değer ise 1218,904 EU/g t.a. ile 0.4 M AgNO₃ 24 saat uygulamasındadır (p<0.05) .



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi POX enzim aktivitesi üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M AgNO₃ c: 0.2 M AgNO₃ d:0.4 M AgNO₃

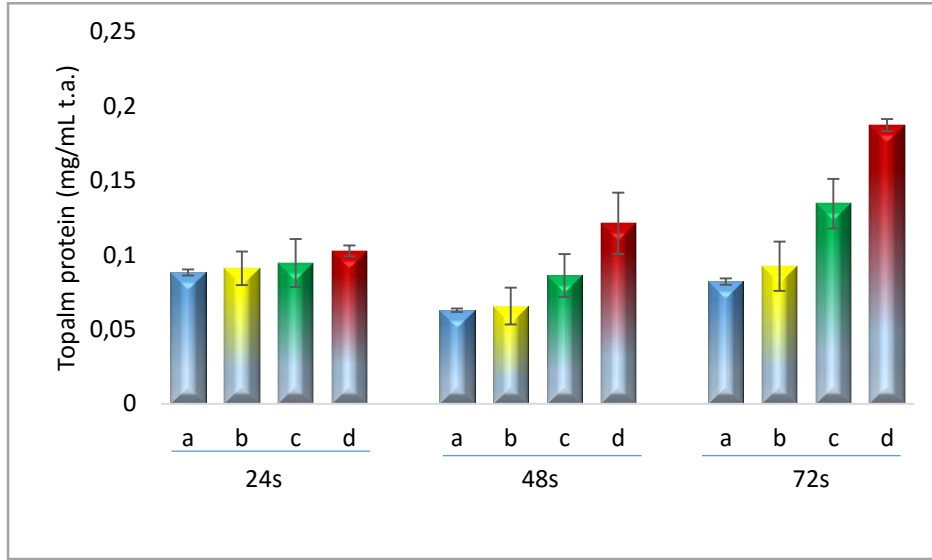
Peroksidaz enzimi aktivitesinde ise 0.4 M AgNO₃ 24 saat ve 48 saat uygulamaları haricindeki tüm uygulama zaman ve konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre azalmalar tespit edilmiştir. %42.2 ile 0.1 M AgNO₃ 24 saat, %29.31 ile 0.2 M AgNO₃ 72 saat ve %29.97 ile 0.4 M AgNO₃ 72 saat uygulamaları önemlilik derecesinde azalmaya sahiptir.

Metaller, çoğunlukla enzimlerin aktif bölgelerde bulunan sülfidril gruplarına bağlanarak inaktivasyona yol açarlar (Ayhan vd., 2006). Fakat yüksek konsantrasyonlu metal uygulamalarında oksidatif strese bağlı olarak peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz vb. enzimlerin aktivitelerinde artma da görülebilmektedir. Doğanlar vd. (2012), manganez ve nikel uyguladıkları *Lemna gibba*'da uygulamadan 24 saat sonra peroksidaz aktivitesinde artış saptamıştır.

Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda ZnSO₄ uygulamalarının *Capsicum annuum* L. hücrelerinde toplam protein ve fenolik bileşik miktarı üzerine etkileri (n=3)

Zaman (saat)	Uygulama Dozu	Toplam Protein (mg/mL)	Toplam Fenolik Madde (µg GAE/mL)
24	Kontrol	0,0882 ± 0,0021	2,792 ± 0,0021
	0.1 M ZnSO ₄	0,0910 ± 0,0114	3,049 ± 0,0020*
	0.2 M ZnSO ₄	0,0944 ± 0,0161	2,490 ± 0,0015*
	0.4 M ZnSO ₄	0,1027 ± 0,0036	2,030 ± 0,0016*
48	Kontrol	0,0628 ± 0,0012	2,719 ± 0,0020
	0.1 M ZnSO ₄	0,0655 ± 0,0124	3,807 ± 0,0020*
	0.2 M ZnSO ₄	0,0862 ± 0,0144	2,792 ± 0,0015
	0.4 M ZnSO ₄	0,1212 ± 0,0206*	2,538 ± 0,0008
72	Kontrol	0,0820 ± 0,0020	2,297 ± 0,0020
	0.1 M ZnSO ₄	0,0923 ± 0,0165	4,061 ± 0,0025*
	0.2 M ZnSO ₄	0,1343 ± 0,0167*	3,554 ± 0,0020*
	0.4 M ZnSO ₄	0,1872 ± 0,0042*	3,231 ± 0,2925*

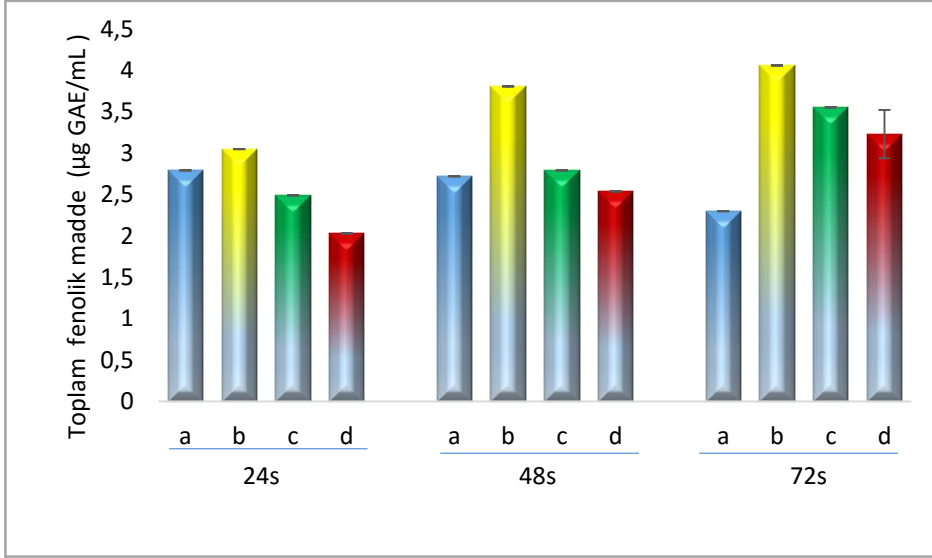
* kontrol grubuna göre önemlilik derecesinde farklılığı (p<0.05) göstermektedir (Tukey test)



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda ZnSO₄ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi toplam protein miktarı üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M ZnSO₄ c: 0.2 M ZnSO₄ d:0.4 M ZnSO₄

ZnSO₄ uygulamalarının toplam protein miktarı üzerine etkileri araştırıldığında tüm uygulama zamanlarında konsantrasyon artışına paralel olarak artış saptanmıştır. 0.2 M ZnSO₄ 72 saat (%63.78) ve 0.4 M ZnSO₄ 48saat (%92.99) ve 72 saat (%128.29) uygulamalarındaki artışlar önemlilik derecesindedir.

Arpa'da köklendirme ortamına konulan çinko'nun konsantrasyon artışına bağlı olarak apoplastik protein miktarında üç katlık yükselmeye neden olduğu bilinmektedir (Brune vd., 1994). Maydonoz bitkisine kadmiyum uygulanan bir başka çalışmada ise toplam protein ve fenolik madde miktarının arttığı belirlenmiştir (Ulus, 2007).



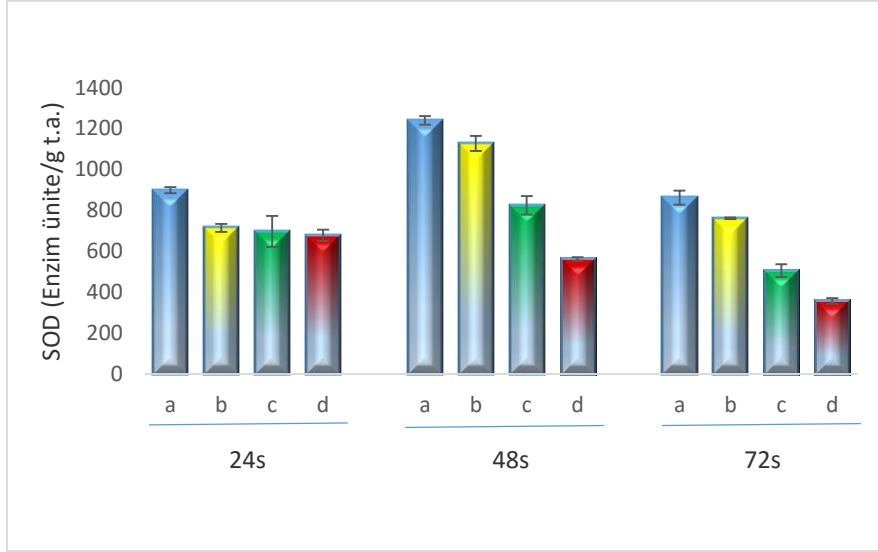
Şekil 4.8 Farklı konsantrasyonlarda ZnSO₄ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M ZnSO₄ c: 0.2 M ZnSO₄ d:0.4 M ZnSO₄

Toplam fenolik madde miktarı 24 saat uygulamasında 0.1 M ZnSO₄, 48 saat uygulamasında 0.1 M ZnSO₄ ve 0.2 M ZnSO₄ ve 72 saat uygulamasında her üç ZnSO₄ konsantrasyonunda kontrole göre artış göstermiştir. Çalışmamıza benzer şekilde fasulye bitkisinde kadmiyum Mithöfer vd., (2006), ve biber bitkisinde bakır sülfat Islek ve Turkyilmaz (2015), uygulamaları sonucunda da fenolik madde miktarının kontrol grubuna göre artış gösterdiği, artışın uzun süreli ve yüksek konsantrasyonlu uygulamalarda daha fazla olduğu bilinmektedir.

Çizelge 4.6 Farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda ZnSO₄ uygulamalarının *Capsicum annuum* L. hücrelerinde SOD ve POX enzim aktiviteleri üzerine etkileri(n=3)

Zaman (saat)	Uygulama Dozu	SOD (Enzim ünite/g t.a.)	POX (Enzim ünite/g t.a.)
24	Kontrol	899,2067 ± 15,3296	7,5226 ± 0,2605
	0.1 M ZnSO ₄	714,6006 ± 19,1907*	5,6758 ± 0,3343*
	0.2 M ZnSO ₄	697,2761 ± 75,9916*	5,5822 ± 0,3036*
	0.4 M ZnSO ₄	678,8555 ± 27,3144*	5,3351 ± 0,5049*
48	Kontrol	1240,634 ± 21,1126	2,7071 ± 0,0997
	0.1 M ZnSO ₄	1127,434 ± 37,3248*	2,5427 ± 0,3758
	0.2 M ZnSO ₄	825,3224 ± 45,5492*	2,0272 ± 0,1713
	0.4 M ZnSO ₄	562,5701 ± 8,4462*	1,0726 ± 0,1668*
72	Kontrol	862,6863 ± 33,9328	5,7035 ± 0,1494
	0.1 M ZnSO ₄	760,9666 ± 3,8891*	7,5297 ± 0,6337*
	0.2 M ZnSO ₄	505,5698 ± 31,7273*	3,5428 ± 0,4000*
	0.4 M ZnSO ₄	357,2877 ± 14,5746*	2,3329 ± 0,3964*

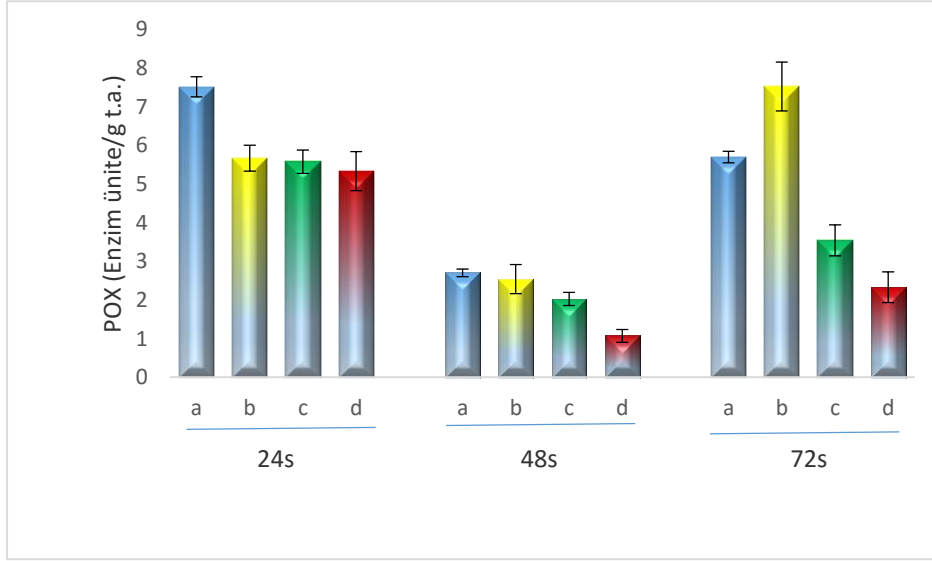
* kontrol grubuna göre önemlilik derecesinde farklılığı (p<0.05) göstermektedir (Tukey test)



Şekil 4.9 Farklı konsantrasyonlarda ZnSO₄ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M ZnSO₄ c: 0.2 M ZnSO₄ d:0.4 M ZnSO₄

Çinko sülfat uygulamalarında süperoksit dismutaz enzim aktivitesi tüm zamanlarda konsantrasyon artışına paralel olarak önemlilik derecesinde ($p < 0.05$) azalmıştır. En fazla azalma %54.66 ile 0.4 M ZnSO₄ 48 saat uygulamasında saptanmıştır.

Sonuçlarımızla uyumlu şekilde, *Triticum aestivum* cv. Alpu ile yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda (100, 200 ve 300 µM) uygulanan ağır metaller (kadmiyum kurşun ve kadmiyum + kurşun) süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitesinde azalmalara neden olmuştur (Ak ve Yücel, 2011). Ayçiçeği bitkisine demir ve kadmiyum ağır metallerinin uygulanması sonucu da SOD, CAT ve POX enzim aktivitelerinde azalmalar meydana gelmiştir (Gallego vd., 1996).



Şekil 4.10 Farklı konsantrasyonlarda ZnSO₄ uygulamalarının farklı zamanlarda *Capsicum annuum* L. bitkisi POX enzim aktivitesi üzerine etkisi
a: Kontrol b:0.1 M ZnSO₄ c: 0.2 M ZnSO₄ d:0.4 M ZnSO₄

Peroksidaz aktivitesinde 0.4 M ZnSO₄ 72 saat uygulaması dışındaki tüm çinko sülfat uygulama zaman ve konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre azalmalar meydana gelmiştir. 24 ve 72 saat uygulamalarının tüm konsantrasyonlarındaki azalmalar önemlilik derecesindeyken, 48 saat uygulamasındaki azalmalardan yalnız 0.4 M ZnSO₄ uygulamasındaki önemlilik derecesindedir (p<0.05).

Düzcan ve Arabacı. (2010), nane bitkisinde çeşitli ağır metallerin peroksidaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerine bakmış ve 1-10 mM konsantrasyonlarda enzim aktivitelerinde azalmalar tespit etmiştir. Yine Nepovim vd. (2004), da turpta ağır metal uygulamalarında peroksidaz aktivitelerinde azalma belirlemişlerdir.

BÖLÜM V

SONUÇ

Çinko, bitki metabolizması için çok gerekli bir elementtir. İçinde yer aldığı enzimlere bakarak, karbonhidrat, protein, fosfat ve RNA oluşumunda görev aldığı söylenebilir. Elisitör olarak çinko uyguladığımız gruplarda konsantrasyon artışına paralel şekilde protein miktarının arttığı, stres koşullarında artan süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzim miktarlarının azaldığı görülmüştür. Gümüş ise kirletici sınıftan bir metaldir. Biber bitkisi üzerindeki etkisini incelediğimizde protein ve fenolik madde miktarını azalttığı ve özellikle yüksek konsantrasyonlarda ilk 24 saatlik süre içerisinde antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar bu bileşiklerin, bitki hücresi kültür ortamında uyarıcı ve üretimi artırıcı moleküller olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak bu uygulamaların endüstriyel amaçlı kullanımına geçilmeden önce elde edilen çeşitli bileşiklerin etkilerinin önceden yapılacak çalışmalarla belirlenmesi gerekmektedir.

Uygulanan yöntemlerin ekonomik olduğunun söylenebilmesi için, daha önce geleneksel yöntemlerle elde edilen sonuçlardan çok daha verimli sonuçlar alınması gerekmektedir. Özellikle bitkilerden elde edilen bileşiklerin geleneksel yöntemlerle üretilmesi daha ucuza mal olmakta ancak yine de bu yöntemlerle tam optimizasyon sağlandığında bile elde edilen ürün genellikle çok düşük olmamakla birlikte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenlerden dolayı hücre kültürü teknolojisinde günlük verimi arttırmaya yönelik yeni sistemler geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun da anlamı, yüksek miktarda ürün veren hücrelerin elde edilmesi ve bu hücrelerden devamlı ürün alınmasını sağlayacak sistemlerin oluşturulması gerektiğidir. Bugünün şartları altında oldukça az bitkisel ikincil metabolit bileşik kültür teknolojisi yöntemleri ile ekonomik olarak elde edilebilmektedir.

Sonuç olarak, hücrelerin buldukları ortamın kimyasal içeriğinin değiştirilmesi ve hücrelerin kültür ortamına dışarıdan ağır metaller gibi uyarıcıların ilave edilmesi bitki hücrelerinin ikincil metabolit bileşikleri sentezlemelerini düzenleyen metabolik olayların anlaşılmasını kolaylaştırabilecek olanaklar sağlamaktadır. Kullanılabilecek bu teknikler sundukları avantajlar sayesinde, bitki hücrelerinin ikincil metabolit bileşiklerinin endüstriyel üretimlerine de önemli katkılar sağlayabilirler.

KAYNAKLAR

- Abak, K. ve Pitrat, M., “Biberlerde kok bogazı yanıklığı (*Phytophthora capsici* Leon.) hastalığına dayanıklılık üzerinde bir araştırma”. *A.U.Z.F. yillığı*, 29 (2-3-4), 943-947, 1981.
- Abenavoli, M.R., Sorgona, A., Sidari, M., Badiani, M. and Fuggi, A., “Cumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L cv. Saint Valery) cells in suspension culture”. *Journal. Plant Physiol*, (160), 227-237, 2003.
- Ahmed, E.S., El-Essaway, A.A., Abou El-Hawa, M.E., Ezzat, S.M. and Metwaly, M.B., “Biotic and abiotic initiators for rishitin formation and accumulation in tomato”, *Folia Microbiol* , 42(5), 468-472, 1997.
- Ahmed, M. and Ahmed A.E.M., “Influence of certain abiotic elicitors on production of anthraquinones in cell cultures of *Rubia tinctorum*”, *Spatula DD*, 2(2), 89-94, 2012.
- Ak, A. and Yücel, E., “Ecotoxicological effects of heavy metal stress on antioxidant enzyme levels of *Triticum aestivum*” cv. *Alpu. Biodican*, 4(3), 19-24, 2011.
- Ali, M.B., Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Singh, S.N. and Singh, S.P., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 462–469, 2003.
- Arafeh, R.M., Shibli, R.A., Al-Mahmoud, M., Mohamad, A. and Jordan S., “Callusing, Cell Suspension Culture and Secondary Metabolites Production in Persian Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Arabian Oregano (*O. syriacum* L.)”, *Journal of Agricultural Sciences.* 2,3, 2006.
- Ayhan, B., Ekmekçi, Y. ve Tanyolaç, D., “Bitkilerde Ağır Metal Zararları ve Korunma Mekanizmaları”. *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi*, 7(1), 1-16, 2006.
- Barbero, G.F., Liazid, A., Palma, M. and Barroso, C.G., “Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers”, *Talanta* 75, 1332-1337, 2008.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., Superoxide Dismutase: “Improved assay and applicable to acrylamide gels”. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287, 1971.
- Bennett, D. J. and Kirby, G.W., “Constitution and biosynthesis of capsaicin”, *Journal of Chemical Society C* 442-446, 1968.

- Boeuf, G., Bauw, G., Legrand, B. and Rambour S., *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 217-224, 2000.
- Bosland, P.W. and Votava, E.J. “Peppers; vegetable and spice Capsicums”, *Crop Production Science in Horticulture*, (12), 8, 2000.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E., “Production of plant secondary metabolites: historical perspective”, *Plant Science* 161, (5), 839-851, 2001.
- Bradford, M. M., A dye binding assay for protein. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, 1976.
- Brune, A., Urbach, W. and Dietz, K.J., “Zinc stress induces changes in apoplasmic protein content and. polypeptide composition of barley primary leaves”. *Journal of experimental botany* 45(9), 1189-1196, 1994.
- Cai, Z., Kastell, A., Speiser, C. and Smetanska, I., “Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability”, *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(2), 330-340, 2003.
- Crozier, A., Jaganath, I.B. and Clifford, M.N., Phenol, polyphenols and tannins : an overview. Edited: Crozier, A., Clifford, M.N. and Ashihara, H., Plant Secondary “Metabolites and the human diet”. *Oxford Blackwell Publishing*, 1-24, 2006.
- Çetin, E.S., Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimi üzerine araştırmalar.Doktora Tezi, *Süleyman Demiral Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta,2010.
- Çetin, E.S., Uzunlar, F. ve Baydar, N.G., “UV-C Uygulamasının gamay üzüm çeşidine ait kalluslarda sekonder metabolit üretimi üzerinde etkileri” *Gıda* 36, 319-326, 2011.
- Çetin, E.S., Babalık, Z., Hallaç Türk, F. ve Göktürk Baydar, N., “The effects of different training systems on phenolic composition in some table grape varieties”. *35th. World Congress of Vine and Wine*, İzmir, Turkey, 18-22 Haziran.2012.
- Coşkun, F. “Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2: 27-33, 2006.

- Demirci, T., Özdamar, P. ve Göktürk Baydar., N. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ile Sebzelerde Kök Kaynaklı Sekonder Metabolitlerin Üretimine Artırılmasına Yönelik In Vitro Uygulamalar, *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(5), 261-270, 2015.
- Di Cosmo, F. and Misawa, M., “Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures, *Trends in Biotechnology* 3, 318-322, 1985.
- Doganlar, Z. B., Cakmak, S. ve Yanik, T., “Metal uptake and physiological changes in Lemna gibba exposed to manganese and nickel”.*International Journal of Biology*, 4(3), 148, 2012.
- Doğan, M. ve Çolak, U., “*Triticum aestivum* L. cv. Tosunbey'e Uygulanan Kurşunun Bazı Fizyolojik Özelliklere Etkisi” *Ekoloji*, 19(73), 98-104, 2009.
- Düzcan, B. ve Arabacı, G., “Çeşitli Metallerin Nane (*Mentha arvensis*) Bitkisindeki Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkileri”.**24. Ulusal Kimya Kongresi**, Zonguldak, 2010.
- Düzcan, B. ve Arabacı, G., “Roka (*Eruca Sativa*) Bitkisindeki Peroksidaz Aktivitesine Çeşitli Metallerin Etkilerinin İncelenmesi” **24. Ulusal Kimya Kongresi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi**, 29 Haziran-2 Temmuz, Zonguldak,2010.
- Dziki, U. G., Złotek, U. and Swieca, M., “Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.”.*Food Chemistry*, 107, 129–135, 2008.
- Ellialtıoğlu, Ş., Üstün, A.S. ve Mehmetoğlu, Ü., “Bazı biber çeşitlerinde *İn vitro* kallus oluşumu için en uygun besin ortamı bileşiminin belirlenmesi”, **II-Kızılırmak Uluslararası Fen Kongresi**, Kırıkkale, 51-58, 20-22 Mayıs 1998.
- Elmastaş, M. ve Karataş, İ., “Siyah havuç (*Daucus carota*) Kallus ve hücre Süspansiyon Kültüründe Antosiyanin Üretimine Uv-C Stresine Ve Riboflavin Etkilerinin Belirlenmesi” **T.C. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu** Sonuç Raporu Proje No:2010/78, 2013.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L., “Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress”.*Plant Science*, 121(2), 151-159, 1996

Gayosa, C., Pomar, F., Merino, F. and Bernal, M.A., “Oxidative Metabolism and Phenolic Compounds in *Capsicum Annuum* L. Var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon”. *Scientia Horticultures*, 102 (1), 1-13,2004.

Georgiev, G.I., Maslenkova, L., Ivanova A., Lazarova, I. and Evstatieva L., “The effect of thidiazuron (dropp r) on the growth, photosynthetic activity and saponin content of puncture vine (*Tribulus terrestris* l.)”, *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 25 (2), 2362 – 2365, 2011.

Govindarajan, V.S., Rajalakshmi, D. and Chand, N., “Capsicum–production, technology, chemistry, and quality”, *Part IV. Evaluation of quality. Crit. Rev. Food. Science Nutr.* 25, 185-282, 1987.

Hayman, M. and Kam, P. C. A., “Capsaicin : A review of its pharmacology and clinical applications”, *Current Anaesthesia&Critical Care* 19, 338-343, 2008.

Herzog, V. and H. D. Fahimi., “A new sensitive colorimetric assay for peroxidase, using 3,3-diaminobenzidine as hydrogen donor”, *Analytical Biochemistry.* 55, 554-562, 1973.

Holden, R.R., Holden, M.A. and Yeoman, M. M., “The effects of fungal elicitation on secondary metabolism in cell cultures of *Capsicum frutescens*. In R.J. Robins and M.J.C Rhodes, Manipulating Secondary metabolism in culture”. *Cambridge University Press* 67-72, 1987.

İşlek, C., “Serbest ve tutuklanmış *Capsicum annuum* L. hücre süspansiyon kültürlerinde kapsaisin üretimi üzerine bazı uyarıcıların etkisi”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora tezi, 2009.

Islek, C. and Turkyilmaz, B., “Copper toxicity in *Capsicum annuum*: Superoxide dismutase and catalase activities, phenolic and protein amounts of in-vitro-grown plants”. *Pol. J. Environ. Stud.* DOI: 10.15244/pjoes/59035, 2015

Jiang-ning, A.I., Bin, Z. and Jing-ming, J.I.A., “The Effects of NO and AgNO₃ on Cell Growth and Salidroside Synthesis in *Rhodiola sachalinensis* A.” *Bor. Cell Suspension Culture. J Microbial Biochem. Technology*, 1, 011-014, 2009.

Johnson, T. S., Ravishankar, G.A. and Venkataraman, L.V. “In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium” *Plant Science* 70, 223-229, 1990.

Johnson, T. S., Ravishankar, G. A. and Venkataraman, L. V., “Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens* Mill” *Food Biotechnology* 5, 197-205, 1991.

Jurenitsch, J., Bingler, E., Becker, H. and Kubelka, W. “Simple HPLC method for determination of total and single capsaicinoids in capsicum fruits”, *Planta Med*, 36(1), 54-57, 1979.

Kastori, R., Petrović, M. and Petrović, N. “Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower”. *Journal of Plant Nutrition*, 15(11), 2427-2439, 1992.

Kaya, S., “Triakontanol'un erbest ve tutuklanmış *Capsicum annuum* L. hücre süspansiyon kültüründe kapsaisin üretimi üzerine etkisi” Yüksek lisans tezi *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2015.

Kırbağ, Z.F. ve Munzuroğlu, Ö., “Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Fidelerinin Toplam Çözünebilir Protein, Prolin ve Klorofil Miktarları Üzerine Civa Klorürün (HgCl₂) Etkileri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 18 (1): 25-30, 2006

Koç, E., Üstün, A. S. ve Arıcı, Y. K., “Biber (*Capsicum annuum* L.) Fidelerinde Farklı Çinko Konsantrasyonlarının Total Protein, Hidrojen Peroksit İçeriği ve Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi”. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 13(2), 205. 2012

Kosuge, S., Inagaki, Y. and Okumura, H., “Studies on the pungent principles of red pepper”, *Part VIII. On the chemical constitutions of the pungent principles. NipponNogei Kagaku Kaishi (Journal of Agricultural Chemistry Society)* 35, 923–927, 1961.

Lindsey, K. and Yeoman, M.M., “Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures” Plant biotechnology, In:Mantell SH, Smith H, editors, *Cambridge University Press*, 39-66, London, 1983.

- Lindsey, K. and Yeoman, M.M., “The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum* immobilized in reticulate polyurethane” ***Journal of Experimental Botany*** 35(160), 1684-1696, 1984a.
- Lindsey, K. and Yeoman, M.M., “The synthetic potential immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*” ***Planta*** 162, 495-501, 1984b.
- Maggi, C., Barbanti, G., Santicioli, P., Beneforti, P., Misuri, D., Meli, A. and Turini, D., "Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturition reflex in humans" ***J Urol***, 142(1), 150- 154,1989.
- Mehdy, M.C., “Active oxygen species in plant defense against pathogens”.***Plant Physiology***, 105, 467-472, 1994.
- Michalak, A., “Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress”. ***Pol. J. Environ. Stud.*** 15 (4), 523, 2006.
- Morrow, W., “The chile pepper encyclopedia by Dave De Witt”,***William Morrow Company Inc Company*** New York, 1999.
- Murashige, T. and Skoog, F., “A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures”, ***Physiologia Plantarum*** 15, 473-497, 1962.
- Mulabagal, V. and Tsay, H.S., “Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites”.***International journal of Applied Science and Engineering***, 2 (1) 29-48, 2004.
- Namdeo, A.G., “Plant cell elicitation for Production of secondary metabolites: a review”, ***Pharmacognosy Reviews*** 1(1), 69-79, 2007.
- Nascimento, N.C. and Fett-Neto, A.G., “Plant Secondary Metabolism Engineering, Methods and Applications”, Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation :An Overview. Edited: Fett-Neto, A. G., ***Methods in Molecular Biology*** ,643 (1), 1-13, 2010.
- Nepovím, A., Podlipná, R., Soudek, P., Schröder, P., and Vaněk, T. “Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase”. ***Chemosphere***, 57(8), 1007-1015, 2004.

- Ochi,T., Takaishi, Y., Kogure, K. and Yamauti, I., “Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annuum*.” *Journal of Naturel Product* 66, 1094-1096, 2003.
- Ochoa-Alejo, N. and Gómez-Peralta J.E., “Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annuum* L.)”, *Journal of Plant Physiology*, 141, 147-152, 1993.
- Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. M. ve Pehlivan, M., “Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri” *Alnteri Zira Bilimler Dergisi*, 17(2), 2009.
- Ölmez, F.. “Organik madde ve bazalt tufunun kullanımının biberde kök ve kök boğazı yanıklığı *Phytophthora capsici* uzerine etkisinin belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi*, Adana. 2006.
- Parr, A.J. “The production of secondary metabolites by plant cell cultures”, *Journal of Biotechnology*, 10, 1-26, 1989.
- Poyrazoğlu, E.S., Yemiş, O., Kadakal, Ç. and Artık, N., “Determination of capsaicinoid profile of different chilli peppers grown in Turkey”, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 85, 1435-1438, 2005.
- Ramachandra, R. S., Sarada, R. and Ravishankar, G.A., “Phycocyanin, a new elicitor for capsaicin and anthocyanin accumulation in plant cell cultures”, *Applied Microbial Biotechnology* 46, 619-621, 1996.
- Ramachandra, R.S. and Ravishankar, G.A., “Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*”, *Journal of Biotechnology* 76, 137-146, 2000.
- Ramachandra, R. and Ravishankar, G.A., “Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites”, *Biotechnology Advances* V 20, (2) , 101-153, 2002.
- Ramawat, K.G., “Secondary Metabolites, Secondary plant products in nature”, Edited: Ramawat, K. G., Merillon, L.M., *Biotechnology* 2, 21,2007.
- Ramos-Palacio, J.J., “Spectrophotometric determination of capsaicin” *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 60, 970-972,1977.

- Ramos-Palacio, J.J. "Further study of the spectrophotometric determination of capsaicin", *Journal-Association of Official Analytical Chemists* ,62, 1168-1170, 1979.
- Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J. M., Cornwell, T., Pastor, I. and Fridlender, B., "Plant and human health in the twenty-first century", *Trends in Biotechnology* 20 (12):522-531, 2002.
- Riahi-Madvar, A., Mohammadi, M. and Pourseyedi, S., "Elicitors Induced Sulforaphane Production in *Lepidium draba*", *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4 (35), 64-70, 2014.
- Romero-Castillo, R.A., Roy Choudhury, S., Leon-Felix, J. and Pandey, S., "Characterization of the heterotrimeric G-protein family and its transmembrane regulator from capsicum (*Capsicum annum* L.)", *Plant Science*, 234, 97-109, 2015.
- Sasson, A., "Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects". *Options Méditerranéennes*, 14, 59-74, 1991.
- Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyarakshmi, N. and Ravishankar, G.A., "Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor", *Process Biochemistry* 41, 50-60, 2006.
- Shilpa, K., Selvakkumar, C., Senthil, A.K. and Lakshmi, B.S., "In vitro root culture of *Ocimum sanctum* L. and evaluation of its free radical scavenging activity", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(1), 105-109, 2010.
- Singleton, V. L. and Rossi, J.A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158, 1965.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M., "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent". *Method Enzymol.* 299, 152–178, 1999.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., "Sekonder Metabolit Üretimi, Bitki Biyoteknolojisi". Doku Kültürü ve Uygulamaları, 211-261, *S.Ü.Vakfi Yayınları* Konya, 2001.

Sudha, G. and Ravishankar, G.A., "Influence of calcium channel modulators in capsaicin production by cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill", **Current Science** 83(4), 8, 480-484, 2002.

Sudha, G. and Ravishankar, G.A., "Putrescine facilitated enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens*", **Journal of Plant Physiology** 160, 339-346, 2003a.

Sudha, G. and Ravishankar, G.A., "Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill", **Current Science** 85, 1212-1217, 2003b.

Sukrasno, N. and Yeoman, M.M., "Phenyl propanoid pathway metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits", **Phytochemistry**, 32, 839-844, 1993.

Şener, E. ve Şahin, S., "Kapsaisin farmakokinetik, toksikolojik ve farmakolojik özellikleri", **Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 29(2), 149-163, 2010.

Tolonen, A., "Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of *Hypericum perforatum* L. and *Rhodiola rosea* L." Doktora Tezi, **Qulu Üniversitesi**, 2003.

Tumova, L., "The Effect of Elicitors from *Pseudomonas aeruginosa* on the production of flavonoids in cultures of *Ononis arvensis* L". **Ceská a Slovenská Farmacie.**, 48: 262-264, 1999.

Umamaheswari, A. and Lalitha, V. "In vitro effect of various growth hormones in *Capsicum annum* L. on the callus induction and production of capsaicin", **Journal of Plant Sciences**, 2(5), 545-551, 2007

Ulus, Y., "Farklı dozlardaki kadmiyumun maydonoz (*Petroselinum hortense* Hoffm) bitkisinde fotosentetik pigmentler ve oksidatif enzim aktivitelerine etkisi". Yüksek Lisans tezi, **Gaziosmanpaşa Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü**, Tokat, 2007.

Umamaheswari, A. and Lalitha, V., "In vitro effect of various growth hormones in *Capsicum annum* L. on the callus induction and production of capsaicin" **Journal of Plant Sciences** 2(5), 545-551, 2007.

Ustun, A.S., “Biberlerde kok bogazı yanıklığı (Phytophthora capsici Leon.) hastalığına dayanıklılığın nedenlerinin fizyolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi”. Doktora tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 1990.

Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y. and Tsay, H.S., “Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures” *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45,1-22, 2004.

Verpoorte, R. and Memelink, J., “Engineering secondary metabolite production in plants”, *Current Opinion in Biotechnology* V 13 (2), 181-187, 2002.

Yağcı, C., Toker, M.C. ve Toker, G., “Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler”. *Türk Bilimsel Derlemler Dergisi*, 1 (1) 47-58, 2008.

Yeoman, M.M. and Yeoman, C.L., “Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells”, *New Phytologist* 134, 553-569, 1996.

Yıldız, N., “Toprak ve Bitki Ekosistemindeki Ağır Metaller”. *Yüksek Lisans Ders Notları*. Erzurum. 2004.

Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., “Elicitor signal production leading to secondary metabolites”, *Biotechnology Advances* 23, 283-333, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

Sinan AYDIN 1989 yılında İSTANBUL'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul ili Tuzla ilçesinde tamamladı. 2008 yılında girdiği Kastamonu Üniversitesi Biyoloji Bölümünü 2012 yılında bitirdi. Aynı yıl Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Lisans öğrenimi süresince TÜBİTAK 2209 PROJEDE lisans öğrencisi olarak görev aldı. Birçok ulusal ve uluslararası katılımlı biyoloji kongrelerine katılım sağladı.