



Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi

Dergiye Geliş Tarihi: 08.04.2013

Yayına Kabul Tarihi: 05.08.2013

Baş Editör: Naim Çağman

Alan Editörü: Sinan Eğri

Siyah Havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef) Kallus Kültüründe Antosiyanin Üretimine Bazı Uygulamaların Etkisi

İlhami KARATAŞ^{a,1} (ilhamik60@yahoo.com)
Mahfuz ELMASTAŞ^b (mahfuz.elmastas@gop.edu.tr)
Rahime KARATAŞ^c (memrem60@gmail.com)

^aGaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı 60250 Tokat

^bGaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü 60250 Tokat

^cGıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Orta Karadeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araş. İstasyonu 60250 Tokat

Özet – Bu çalışmada, siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) bitkisinden oluşturulan kallus kültüründe antosiyanin üretimine bazı uygulamaların etkisi incelenmiştir. Kallus indüksiyonu steril şartlarda yetiştirilen fidelerin hipokotil eksplantlarının 2 mg/L NAA (Naftalenasetik asit), 0,2 mg/L BAP (Benzilaminopürin), 30 g/L sukroz ve 2 g/L phtagel içeren MS (Murashigeand ve Skoog, 1962) besi ortamında kültüre alınmasıyla başlatılmıştır. Bu ortam şartlarında elde edilen kallusların antosiyanin üretimini artırmak için farklı konsantrasyonlarda riboflavin ile değişik sürelerde UV-C elisitör olarak kullanılmıştır. UV-C (254 nm) ışığı kalluslara 10 cm mesafeden günlük 10 dakika ve 15 dakika olarak 10 gün uygulanmıştır. UV-C uygulamasından sonra kalluslar 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperyotta ve 25 ± 2 °C inkübe edilmişlerdir. Riboflavin uygulaması 4, 8 ve 10 mg/L olmak üzere üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler neticesinde kalluslara uygulanan riboflavin veya UV-C'nin antosiyanin sentezini güçlü bir şekilde artırsa da hücre büyümesini önemli ölçüde yavaşlatmıştır. En yüksek antosiyanin içeriği 4 mg/L riboflavin (1,18 mg/g TA) ve 15 dakika UV-C (1,02 mg/g TA) uygulan kalluslardan elde edilmiş ve sonuçlar kontrolle kıyaslandığında sırasıyla 2,51 ve 2,17 kat fazla olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler –
Antosiyanin, kallus kültürü, riboflavin, UV-C, siyah havuç

¹Sorumlu Yazar

Effects of Some Applications on Anthocyanin Production in Callus Culture of Black Carrot (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef)

Abstract – In this study, effect of some applications on the production of anthocyanin in the callus culture of black carrot (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) were studied. Hypocotyle explants excised from sterile seeding were cultured on MS (Murashigeand ve Skoog, 1962) media containing 2 mg/L NAA (Naphthalene acetic acid), 0,2 mg/L BAP (Benzylaminopurine), 30 g/L sucrose and 2 g/L phytigel. Riboflavin and UV-C as an elicitor were applied to callus culture at different concentrations and durations in order to increase the production of anthocyanin. Callus tissues were exposed to UV-C (254 nm) light at 10 cm distance from the source for 10 and 15 minute in a day. After UV-C application, callus tissues were incubated under 16 h. light and 8 h. dark photoperiod at 25 °C ± 2 and harvested after 10 days. The effects of riboflavin at the concentrations of 4, 8 and 10 mg /L on enhancement of anthocyanin production were studied. In a callus culture of black carrot, anthocyanin biosynthesis was strongly enhanced, whereas cell growth was inhibited, eliciting either the addition of riboflavin or UV-C light irradiation. The highest values of anthocyanin production were obtained from callus cultures applied 4 mg/L riboflavin (1.18 mg/g FCW) and 15 min. UV-C (1,02 mg/g FCW), attaining amounts 2,51 and 2,17 times greater than the control, respectively.

Keywords -
Anthocyanin, black carrot, callus culture, UV-C, riboflavin

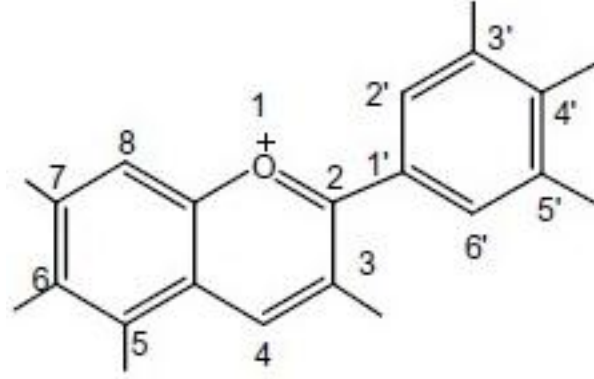
Received: 08.04.2013

Accepted: 05.08.2013

1. Giriş

Antosiyaninler sekonder metabolitlerin yaygın bir grubu olan flavanoidlerin önemli bölümünü oluşturmaktadır. Kimyasal açıdan antosiyaninler 2-fenilbenzopirilium'un (flavilium katyonu) polihidroksi ve polimetoksi türevlerinin glikozitleridir (Galvano ve ark., 2004; Ghosh ve Konishi, 2007). Bu bileşiklerin temel kısmını antosiyanidin (aglikonlar) olarak adlandırılan flavilium katyonu oluşturmaktadır (Şekil 1.1) (Kong ve ark., 2003). Bitkilerde siyanidin, delfinidin, malvidin, peonidin, pelargonoidin ve petunidin olarak adlandırılan altı antosiyanidin yaygın şekilde bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan antosiyaninler arasındaki farklılıklar antosiyanidin molekülündeki hidroksil grubunun sayısı ve pozisyonu, hidroksil gruplarının metilasyon derecesi, ilave edilen şekerin çeşidi, sayısı ve bağlanma bölgesi ve şeker molekülüne bağlanmış alifatik veya aromatik asitlerden ileri gelmektedir (Galvano ve ark., 2004; Ghosh ve Konishi, 2007).

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



Şekil 1.1. Antosiyanidin olarak adlandırılan flavilium katyonu (Kong ve ark., 2003)

Antosiyaninlerin çekici kırmızı, turuncu ve mor renklerinin yanında suda çözünmeleri bu bileşiklerin doğal renklendirici olarak kullanım imkanı sağlamıştır (Bakowska-Barczak, 2005). Renk gıdaların kabul edilebilirliğinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Tüketiciler bir gıda ürününün kalitesini ilk olarak onun rengiyle sorgulamaktadır. Gıda sanayisi renklendiricileri gıdalara orijinal görünüm kazandırmak, standart hale getirmek veya kalitenin bir göstergesi olması bakımından kullanılmaktadır (Giusti ve Wrolstad, 2003). Bu amaçlarla gıda sanayinde sentetik renklendiriciler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak yapay renklendiricilerin kullanımı gerek yasal gerekse tüketici kaygısı oluşturması nedeniyle alternatif doğal bir kaynak olan antosiyaninlere talebi artırmıştır (Giusti ve Wrolstad, 2003; Deroles, 2009).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlar altında ve yapay bir besin ortamında bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesi olarak tanımlanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001). Bir doku kültürü yöntemi olan kallus kültürü, ana bitkiden kesip çıkarılan ve bölünme özelliğini kaybetmemiş organ veya doku parçalarının karbon kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicilerini içeren yarı katı besi ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip yapılar olarak ifade edilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001). Bitki doku kültürü yöntemlerinin birçok uygulama alanının bulunmasının yanında değerli sekonder metabolitlerin araştırılması ve üretilmesi için de elverişli biyoteknolojik bir yöntem olduğu ifade edilmektedir (Zhong, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Vanisree ve ark., 2004). Bu yöntemler kozmetik, farmositik veya tarımsal açıdan değerli sekonder metabolitlerin üretimi için geleneksel ekim ve kimyasal yöntemlere alternatif bir yöntemdir (Kieran ve ark., 1997; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Yağcı ve ark., 2008; Vijaya ve ark., 2010). Sekonder metabolitlerin bitki doku kültürü yöntemleriyle üretimi birçok açıdan avantajlıdır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Bu avantajlar arasında hızlı, sabit kalitede ve çevre şartlarından etkilenmeden sürekli ürün elde edilmesi sayılabilmektedir. Söz konusu yöntemin bir diğer önemli üstünlüğü ise çeşitli stratejilerle üretimin artırılabilmesidir. Metabolit üretiminin artırılmasında yararlanılan başlıca stratejiler arasında biyotik veya abiyotik elisitör uygulanması, öncül bileşiklerin kültür ortamına ilave edilmesi, yüksek üretken hücre hatlarının seçilmesi, kültür besi ortamının manipülasyonu ve mutajenlerin kullanımı yer almaktadır (Sasson, 1991; Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Antosiyaninlerin bitki hücre kültürüyle üretimi gerek akademik gerekse endüstriyel açıdan önemli ölçüde ilgi çeken bir teknolojidir. Bitki hücre kültürü yöntemleriyle antosiyanin

üretimini incelenmesinin temel nedeni, ticari kullanıma uygun ekonomik olarak fayda sağlayacak geçerli bir sürecin oluşturulmasıdır. Bu amaçla yaklaşık 33 farklı bitki türünde çalışma yapıldığı ve en yaygın olarak çilek (*Fragaria ananassa*), üzüm (*Vitis vinifera*) ve havuç (*Daucus carota*) bitkilerinin kullanıldığı bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2002; Deroles, 2009). Birçok kültür sisteminde antosiyanin biyosentezini artırarak ticari amaca elverişli bir teknoloji oluşturmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan stratejiler arasında yüksek üretken hücre hatlarının seçimi, öncül bileşiklerin ilave edilmesi, besin ortamının ve kültür şartlarının optimizasyonu, elitasyon ve iki aşamalı kültür sistemlerinin kurulması sayılabilmektedir (Zhang ve Furusaki, 1999). Bu amaçla yapılan farklı çalışmalarda kültüre uygulanan UV-B (Takeda ve Abe, 1992), riboflavin (Mori ve Sakurai, 1996), fungal elisitör (Gläbgen ve ark., 1998), jasmonik asit (Zhang ve ark., 2002), mekanik stres (Strazzer ve ark., 2011) ve UV-C (Çetin ve ark., 2011)'nin antosiyanin üretimini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir.

Siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) Türkiye, Orta ve Uzak doğu orijinli olup en az 3000 yıldır kültürü yapılmaktadır. Siyah havuç yüksek antosiyanin içeriğinin yanında çekici mavimsi mor renge sahiptir. Bu bitkide iki tanesi açılız, üç tanesi açilli siyanidin türevi beş antosiyanin pigmenti bulunmaktadır. Siyah havuçta bulunan antosiyaninlerin yüksek ışık, ısı ve pH stabilitelerinden dolayı doğal gıda renklendiricileri olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle siyah havuç ekstraktları meyve suları, şekerler, dondurma, alkolsüz içecekler ve diğer fermente içeceklerin renklendirilmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Montilla ve ark., 2011). Bu çalışmada renklendirici olarak kullanılan bitki sekonder metabolitlerden antosiyaninlerin bitki doku kültürü yöntemleriyle üretimi ve çeşitli uyarıcıların bu bileşiğin üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) bitkisinden oluşturulan kallus kültürüne UV-C ve riboflavin uygulamanın antosiyanin içeriğinde meydana getirdiği değişim incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Materyal

Havuç maydanozgiller (Apiaceae) familyasından, koni biçimindeki etli kökü için sebze olarak yetiştirilen iki yıllık otsu bir kültür bitkisidir (Anonim, 2013). Havuç kültürleri botaniksel olarak iki gruba ayrılmış olup, bunlar doğu veya antosiyanin (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) grubu ile batı veya karotenoid (*Daucus carota ssp. sativus var. sativus*) grubudur. Siyah havuç (antosiyanin grubu) çeşitleri batılı ülkelere çok bilinmese de, ana çeşit olarak kabul edilen turuncu havuç varyetelerinden çok daha eski olduğu ve Türkiye, Afganistan, Mısır, Pakistan ve Mısır gibi ülkelerde geleneksel olarak kültürü yapılmakta ve tüketilmektedir (Kammerer ve ark., 2004). Bu çalışmada kullanılan siyah havuç bitkisinin tohumları ticari amaçlı tohum üreten bir firmadan temin edilmiştir.

2.2. Tohumların Çimlendirilmesi ve Steril Fidelerin Elde Edilmesi

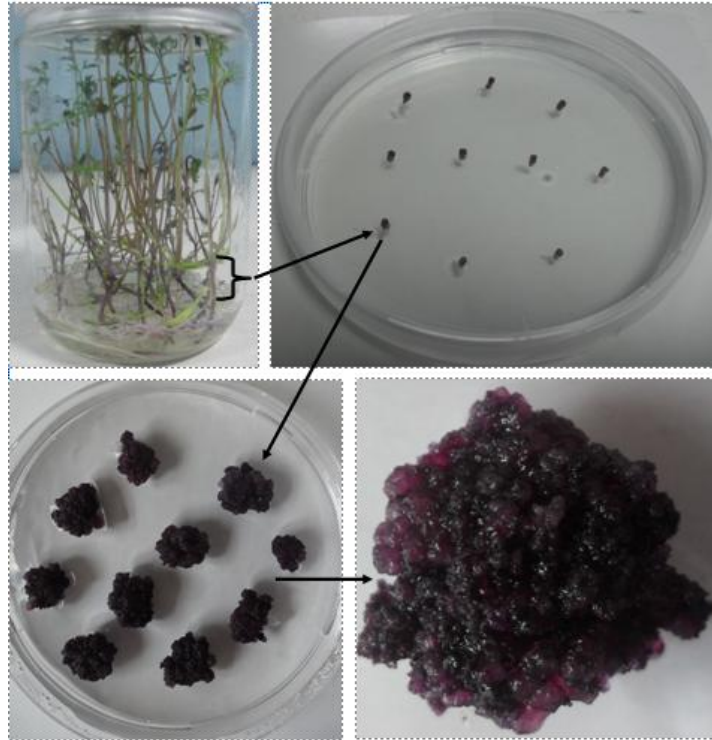
Deneyde kullanılacak bitkiler steril şartlarda çimlendirilen tohumlardan yetiştirilmiştir. Tohumların çimlendirilmesinde ve steril fidelerin yetiştirilmesinde kullanılan besiyeri 4,4 g/L MS (Murashigeand ve Skoog, 1962) temel besi ortamına 30 g/L sukroz ve 2 g/L

phytagel (katılaştırıcı) ilave edilerek hazırlanmıştır. Besiyerinin pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 121°C, 1,2 atmosfer basınçta 20 dakika otoklav edilmiştir.

Steril bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılan tohumlar çimlendirilmeden önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Tohumlarının yüzey sterilizasyonu % 70'lik etil alkol içerisine iki dakika ve 2-3 damla twenn 20 içeren % 2'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 25 dakika bekletilmesiyle sağlanmıştır. Steril edilen tohumlar besi ortamı içeren petri kaplarına 20-25 adet olacak şekilde ekilerek karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. Karanlık ortamda 7-10 gün bekletilerek çimlenmesi sağlanan tohumlar aydınlık ortama çıkarılarak fide gelişimi sağlanmıştır. Petri kaplarında gelişimi iyi olan fideler seçilerek pens yardımıyla kavanozlara aktarılmıştır. Söz konusu fideler 25 ± 2 °C' sıcaklık, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta yetiştirilmiştir.

2.3 Kallus Kültürünün Oluşturulması

Kallus kültürünün oluşturulmasında steril şartlarda yetiştirilen bir aylık fidelerin hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kallus kültürünün oluşturulmasında kullanılan besi ortamı 4,4 g/L MS, 2 g/L phytagel, 30 g/L sukroz, 2 mg/L NAA ve 0,2 mg/L BAP içermektedir. Hipokotiller yaklaşık 0,3 cm boyunda kesilerek her petride 10 adet eksplant olacak şekilde besi ortamına dikey şekilde ekilmiştir. Petriler 25 ± 2 °C' sıcaklık, 2500 lüks ışık şiddeti, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta kallus oluşumu için inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan kalluslar aynı içerikli taze besi ortamlarına 2 hafta arayla alt kültüre alınmıştır.



Resim 2.1. Kallus kültürünün oluşturulması

2.4 Kallus Kültürüne Riboflavin Uygulanması

Kallus kültürüne riboflavin uygulanmasında 2 mg/L 2,4-NAA ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besin ortamında oluşturulan 45 günlük kalluslar kullanılmıştır. Söz konusu uygulama kallusların 4, 8 ve 10 mg/L riboflavin (Mori ve Sakurai, 1996) içeren aynı özellikteki besi ortamlarına alt kültüre alınmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada her bir konsantrasyon için üç petri ve her petride beş adet kallus bulunmaktadır. Kalluslara riboflavin 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta 10 gün boyunca uygulanmıştır

2.5 Kallus Kültürüne UV-C Uygulanması

Kallus kültürüne UV-C uygulaması 2 mg/L 2,4-NAA ve 0,2 mg/L BAP içeren MS besin ortamında oluşturulan 45 günlük kalluslara Keskin ve Kunter (2007)'in belirttiğinde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kalluslara UV-C ışığı 10 cm mesafeden günlük 10 dakika ve 15 dakika olmak üzere iki farklı sürede laminer kabin içerisinde uygulanmıştır. UV-C ışığı uygulamalarında petri kapaklarının ağzı açılarak kallusların ışıkla direk teması sağlanmıştır. Işık kaynağı olarak 254 nm dalga boyuna sahip Philips TUV 6W'lık (G6 T5) bir lamba kullanılmıştır. Bu uygulamada her bir süre için üç petri ve her petride beş adet kallus bulunmaktadır. Kalluslara UV-C ışığı 10 gün süreyle uygulanmıştır. Günlük UV-C uygulamalarının sonunda kalluslar 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta inkübe edilmiştir.

2.6 Antosiyanin Analizi

Antosiyaninlerin analizi, Giusti ve Wrolstad, (2001)'in belirttiği yöntemde küçük değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Uygulamalar sonucunda elde edilen numuneler %1 HCl ve Metanol karışımı kullanarak ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt 0.22 µ çaplı filtreden geçirildikten sonra çözücüye karşı absorbanı 530 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Örneklerin antosiyanin içeriği siyanidin 3-O- glukozitin molar absorpsivite katsayısı (ϵ :30200, MA :449,2) kullanılarak hesaplanmıştır.

2.7 İstatistiksel Analizler

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

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Riboflavin ve UV-C Uygulanan Kallusların Antosiyanin İçeriği

Riboflavin ve UV-C uygulanan kallusların antosiyanin içerikleri Çizelge 3.1’de ve Şekil 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Riboflavin ve UV-C uygulanan kallusların antosiyanin içerikleri

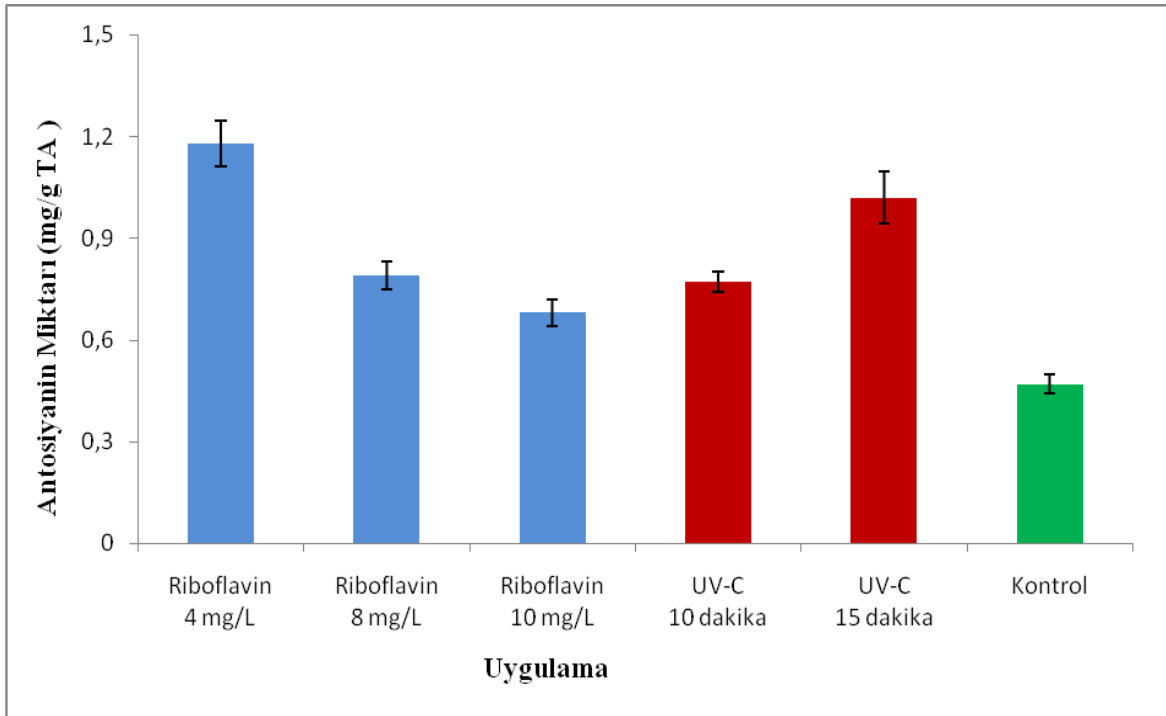
Uygulama	Antosiyanin içeriği (mg/ g taze ağırlık(TA))
Riboflavin 4 mg/L	1,18 ± 0,068 a
Riboflavin 8 mg/L	0,79 ± 0,040 c
Riboflavin 10 mg/L	0,68 ± 0,039 c
UV-C 10 dakika	0,77 ± 0,030 c
UV-C 15 dakika	1,02 ± 0,078 b
Kontrol	0,47 ± 0,028 d

Çizelgede her bir sütunda gösterilen farklı harfin ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. n:5

Çizelge 3.1’deki veriler incelendiğinde uygulanan tüm riboflavin miktarları antosiyanin içeriğini istatistiksel olarak önemli ölçüde artırmıştır ($P \leq 0.05$). En yüksek antosiyanin içeriği 4 mg/L riboflavin uygulanan kalluslarda $1,18 \pm 0,068$ mg/g TA olarak elde edilmiştir. Bu miktar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2,51 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Antosiyanin içeriği tüm riboflavin uygulamalarında kontrole göre önemli ölçüde artış olsa da uygulanan riboflavin miktarının artması paralelinde antosiyanin içeriğinde bir düşüşe neden olmuştur. En düşük antosiyanin içeriği 10 mg/L riboflavin uygulan kalluslarda $0,68 \pm 0,039$ mg/g TA olarak elde edilmiştir. Bu miktarın kontrol grubundan 1,44 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Çilek (*Fragaria anansa* Shikinari) hücre süspansiyon kültürüne yapılan farklı uygulamalar neticesinde en yüksek antosiyanin içeriğinin 4 mg/L riboflavin uygulanan kültürlerden elde edildiği ve bunun miktarının kontrol grubununun 2.8 katı olduğu bildirilmiştir (Mori ve Sakurai, 1995). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan benzer bir çalışmada 4, 8 ve 10 mg/L riboflavin uygulanan çilek süspansiyon kültüründe en yüksek antosiyanin içeriğinin iki hafta 4 mg/L riboflavin uygulan kültürden elde edildiği ifade edilmiştir (Mori ve Sakurai, 1996). Miyanaga ve ark. 2000, çilek bitkisinin yapraklarından 1 mg/L 2,4-D ve 0,1 mg/L BAP içeren LS (Linsmaier-Skoog) sıvı besi ortamında hücre kültürü oluşturulmuş ve 4 mg/L riboflavinin uygulayarak antosiyanin üretimi incelenmiştir. Bu uygulama neticesinde antosiyanin miktarı kontrole göre üç kat arttığı ifade edilmiştir.

Çizelge 3.1’deki verilere bakıldığında UV-C uygulamasının antosiyanin içeriğini istatistiksel olarak önemli ölçüde artırdığı görülmüştür ($P \leq 0.05$). En yüksek antosiyanin içeriği $1,02 \pm 0,078$ mg/g TA olarak 15 dakika UV-C uygulanan kalluslardan elde edilmiştir. Bu miktarın kontrol grubununun 2,17 katı olduğu görülmüştür. Antosiyanin içeriğinin tüm uygulamalarda kontrolden yüksek olduğu ve uygulama süresi arttıkça içeriğinde istatistiksel olarak önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada, *Malva neglecta* kalluslarına UV-C uygulaması antosiyanin içeriğini anlamlı

ölçüde artırmıştır (Khatami ve Ghanati, 2011). Gläßgen ve ark. (1998), havuç hücre kültüründe UV ışığının antosiyanin üretimine ve antosiyanin biyosenteziyle ilgili genlerin düzenlenmesine etkisi incelenmiştir. UV uygulaması antosiyanin birikimini güçlü şekilde artırdığı ve fenilpropanoid ile flavanoid yolunun son aşama enzimlerinin aktivitelerinde geçici bir artışa neden olduğu ifade edilmiştir. Çetin ve ark. (2011), Gamay üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşidinden oluşturulan kallus kültürüne UV-C uygulanmasının sekonder metabolit birikimi üzerine etkisini incelemiştir. Kalluslara 10 ve 15 cm uzaklıktan 10, 15 ve 20 dakika UV-C radyasyonu uygulanmıştır. Bu araştırmanın neticesinde UV-C uygulamanın başta fenolik bileşikler olmak üzere sekonder metabolit üretimini artırdığı belirtilmiştir. En yüksek değerlerin 10 cm mesafeden 15 dakika uygulanan kalluslardan elde edildiği ifade edilmiştir.



Şekil 3.1. Riboflavin ve UV-C uygulanan kallusların antosiyanin içerikleri

3.2 Riboflavin ve UV-C Uygulanan Kallusların Taze Ağırlıklarındaki Değişim

Farklı miktarlarda riboflavin ve değişik sürelerde UV-C uygulanan kallusların ortalama taze ağırlıklarında meydana gelen değişim Çizelge 3.2’de verilmiştir.

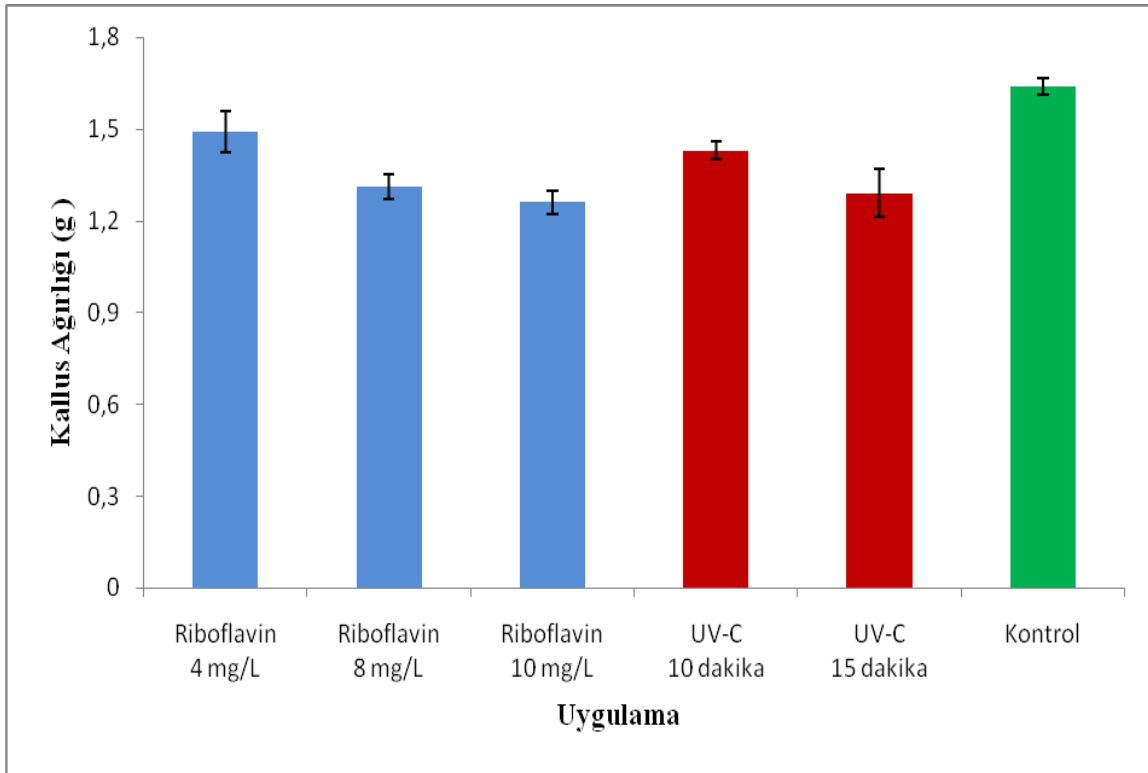
Çizelge 3.2.’de verilen sonuçlar incelendiğinde riboflavin ve UV-C uygulanan kallusların ortalama taze kallus ağırlığındaki artış kontrole göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azalmıştır ($P \leq 0.05$). Yapılan tüm uygulamalarda büyümenin kontrole göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Uygulanan riboflavin miktarının ve UV-C süresinin artırılması büyümedeki yavaşlamayı artırmıştır. Ortalama kallus ağırlığındaki artış en az 10 mg/L riboflavin uygulanan kalluslarda gözlenmiştir. Bu kallusların ağırlıklarında meydana gelen artış kontrol grubundan % 23,17 daha az olduğu belirlenmiştir. Yapılan benzer birçok çalışmada da riboflavin uygulamanın büyümeyi önemli ölçüde baskıladığı ifade edilmiştir (Mori ve Sakurai, 1995; Mori ve Sakurai, 1996; Miyanaga ve ark., 2000). Liu ve ark.

(2010)'nın üzüm kallus kültüründe yaptıkları çalışma incelediğinde benzer çalışmalardan farklı bir sonucun elde edildiği dikkat çekmektedir. Bu çalışmada kallus kültürüne 10 ve 20 dakika UV-C uygulanması büyümeyi kontrole göre önemli ölçüde artırdığı ifade edilmiştir. Fakat 30 dakika UV-C ışığı uygulamanın büyüme üzerine negatif bir etkisinin olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca UV-C ışığının bitkilerin hücre büyümesi ve sekonder metabolizması ile ilgili spesifik genlerin ekspresyonunu kontrol eden ve değiştiren önemli bir faktör olduğu ifade edilmiştir (Liu ve ark., 2010). Riboflavin ve UV-C uygulanan kallusların ağırlıklarındaki değişim Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Riboflavin ve UV-C uygulanan (10 gün süreyle) kallusların ortalama taze ağırlıkları

Uygulama	Taze Kallus Ağırlığı (g) (TA)	Kontrole göre meydana gelen azalma (%)
Riboflavin 4 mg/L	1,49 ± 0,051 b	9.14
Riboflavin 8 mg/L	1,31 ± 0,044 cd	20.12
Riboflavin 10 mg/L	1,26 ± 0,055 d	23.17
UV-C 10 dakika	1,43 ± 0,041 bc	12,80
UV-C 15 dakika	1,29 ± 0,037 d	21.34
Kontrol	1,64 ± 0,040 a	-

Çizelgede her bir sütunda gösterilen farklı harfin ortalamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. n:5



Şekil 3.2. Riboflavin ve UV-C uygulanan kallusların ortalama taze ağırlığı

4. Sonuç

Kallus kültüründe antosiyanin üretimine çeşitli uyarıcıların etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmanın neticesinde en yüksek antosiyanin içeriği 4 mg/L riboflavin ve 15 dk UV-C uygulanan kalluslardan elde edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ışığında siyah havuç bitkisinin doku kültürü yöntemiyle antosiyanin üretimi için uygun olduğu ve çeşitli uyarıcılarla metabolit veriminin artırıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle söz konusu bitkiden elde edilen kallusların ticari amaç için antosiyanin üretiminin geliştirilmesine oldukça elverişli olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmayla ileride yapılacak olan hücre süspansiyon kültürü ve biyoreaktör sistemlerinin oluşturulmasına öncülük etmesi nedeniyle önem arz etmektedir.

Teşekkür

Bu projeyi (Proje No: 2010/78) desteklediği için Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Anonim, 2013. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Havu%C3%A7> (30.01.2013).
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.1-35.
- Bakowska-Barczak, A., 2005. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 14/55 (2) 107-116.
- Close, D. C., Beadle, C. L., 2003. The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69(2) 149-161.
- Çetin, E. S., Uzunlar, F., Baydar, N.G., 2011. UV-C uygulamasının Gamay üzüm çeşidine ait kalluslarda sekonder metabolit üretimi üzerine etkileri. *Gıda*, 36(6) 319-326.
- Deroles, S., 2009. Anthocyanins, Biosynthesis, functions, and applications. *Anthocyanin biosynthesis in plant cell cultures: A potential source of natural colourants*. Editors: Gould, K., Davies, K., Winefield, C. (5) 107-155.
- Galvano, F., Fauci, L.L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., Battistini, N. C., Tavazzi, B., Galvano, G., 2004. Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal Nutritional Biochemistry*, (15) 2-11.
- Ghosh, D., Konishi, T., 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr*, 16(2) 200-208.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, (14) 217-225.

- Gläßgen, W. E., Rose, A., Madlung, J., Koch, W., Gleitz, J., Seitz, H. U., 1998. Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta*, (204) 490-498.
- Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A., 2004. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. *Eur Food Res Technol*, (219) 479-486.
- Keskin, N., Kunter, B., 2007. Eriş üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde UV ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, (4) 379-384.
- Khatami, F., Ghanati, F., 2011. Effect of UV irradiation on cell viability, anthocyanin, and flavonoid contents of callus-cultured *Malva neglecta* cells. International Conference on life Science and Technology, IPCBEE 3, Singapore.
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P.F., Malone, D.M., 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, (59) 39-52.
- Kong, J-M., Chia, L-S., Goh, N-K., Chia, T-F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, (64) 923-933.
- Liu, W., Liu, C., Yang, C., Wang, L., Li, S., 2010. Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation, *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.55.
- Mazza, G., 2007. Anthocyanins and heart health. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 43(4) 369-374.
- Miyanağa, K., Seki, M., Furusaki, S., 2000. Quantitative determination of cultured strawberry-cell heterogeneity by image analysis: effects of medium modification on anthocyanin accumulation. *Biochemical Engineering Journal*, (5)201-207.
- Montilla, E. C., Arzaba, M. R., Hillebrand, S., Winterhalter, P., 2011. Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *Atrorubens* Alef.) cultivars antonina, beta sweet, deep purple, and purple haze. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (59) 3385-3390.
- Mori, T., Sakurai, M., 1995. Effects of riboflavin and increased sucrose on anthocyanin production in suspended strawberry cell cultures. *Plant Science*, (110)-147-153.
- Mori, T., Sakurai, M., 1996. Riboflavin affects anthocyanin synthesis in nitrogen culture using strawberry suspended cells. *Journal of Food Science* (61) 698-702.
- Murashigeand, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*(15) 473-497.
- Ramachandra, R. S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, (20) 101-153.
- Sasson, A., 1991. Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures : biotechnological and economic aspects. *Options Méditerranéennes*, (14) 59-74.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Sekonder metabolit üretimi, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.211-261.
- Strazzer, P., Guzzo, F., Levi, M., 2011. Correlated accumulation of anthocyanins and rosmarinic acid in mechanically stressed red cell suspensions of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Plant Physiology*, (168) 288-293.
- Takeda, J., Abe, S., 1992. Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension-IV. The action spectrum. *Photochemistry and Photobiology*, 56 (1) 69
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S. M., Lin, C.Y., Tsay, H.S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (45) 1-22.
- Vijaya S. N., Udayasri P., Aswani kumar V.V. Y., Ravi Babu B., Phanin kumar Y., Vijay V. M., 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. (3) 112

- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. Türk Bilimsel Derlemler Dergisi, 1 (1) 47-58.
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., Franco, C., 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. Plant Science, (162) 459-468.
- Zhang, W., Furusaki, S., 1999. Production of Anthocyanins by plant cell cultures. Biotechnol Bioprocess Eng., (4) 231-252.
- Zhong, J-J.,2001. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. Edited: Scheper, T., (72) 1-26.