

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TETRAPLOİD *Trifolium pratense* L. (ÇAYIR ÜÇGÜLÜ) KALLUSLARINDA BAZI
İZOFLAVONLARIN (FİTOÖSTROJEN) ANALİZİ**

Tuğba ERÇETİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2007

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TETRAPLOİD *Trifolium pratense* L. (ÇAYIR ÜÇGÜLÜ) KALLUSLARINDA BAZI İZOFLAVONLARIN (FİTOÖSTROJEN) ANALİZİ

Tuğba ERÇETİN

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Cihat TOKER

Fitoöstrojenler östrojen hormonuna benzer etki gösteren bitki sekonder metabolitleridir. Fitoöstrojenler; menopoz ve osteoporoz şikayetlerinin giderilmesinde ve atardamarların elastikiyetinin artırılması yoluyla kalp damar hastalıklarının ve hipertansiyonun engellenmesinde etkili olmalarının yanında göğüs, prostat, rahim, kolon kanserlerine karşı da koruyucu özellik gösteren besin destekleridir. En çok çalışılan fitoöstrojenler, izoflavonlar ve lignanlardır. *Trifolium pratense* L.(Çayır üçgülü)'de izoflavonlardan formononetin, biokanin A, genistein ve daidzein tespit edilmiştir. Çalışmada doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. tohumlarının çimlendirilmesiyle elde edilen fidelerden alınan eksplantlardan kallus oluşturuldu. En iyi kallus oluşumunu sağlayabilmek amacıyla farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren PCL-2 ve B5 ortamları kullanıldı. Oluşan kallusların ikinci ve üçüncü alt kültürleri ile diploid ve tetraploid bitkinin çiçek kısımları, asit hidrolizi içeren ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra ince tabaka kromatografisine (İTK) tatbik edildi. Ardından diyot-array dedektör (DAD) kullanılarak, ters fazlı kolonda (Lichrospher 100 RP-18), yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC), lineer gradient yöntemle, formononetin, biokanin A, genistein, daidzein içerikleri tespit edildi. HPLC'de *Trifolium pratense* L.'nin diploid çiçeğinde miktar tayinini yaptığımız izoflavonlara ait hiç bir pike rastlanmazken, tetraploid çiçekte en çok formononetin olmak üzere genistein ve biokanin A tespit edildi. Kalluslarda en yüksek izoflavon içeriği (% 0.115= 1.15mg/g formononetin) B5 ortamının (11 mg /L NAA 10 mg /L 2,4-D 10 mg /L KIN) ikinci altkültür kalluslarında belirlendi Geri kalan ortamların kalluslarında ise en çok formononetin olmak üzere çeşitli miktarlarda diğer izoflavonları tespit edildi.

2007 , 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: Tetraploid *Trifolium pratense* L., Çayır üçgülü, İzoflavon, Fitoöstrojen, Kallus, HPLC

ABSTRACT

Master Thesis

ANALYSIS OF SOME ISOFLAVONES (PHYTOESTROGENS) IN TETRAPLOID
Trifolium pratense L. CALLUSES
Tuğba ERÇETİN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. M. Cihat TOKER

Plant derived estrogens, which are called phytoestrogens, are plant secondary metabolites which influence similar to the estrogen hormones. Phytoestrogens are nutrient support to show protective attribute for remove menopause and osteoporosis complaints. Besides phytoestrogens effective to prevent cardiovascular disease via increase elasticity of artery vessel and hyper blood pressure. The two most studied groups of phytoestrogens are the isoflavones and lignans. It was determined isoflavones such as formononetin, biochanin A, genistein, daidzein in *Trifolium pratense* L. (Red clover). In this study, calli were formed from explants which were obtained from in vitro germinated natural tetraploid *T. pratense* L. seedlings. Different plant growth regulators used in PCL-2 and B5 media for provide best callus formation. Calli of second and third subcultures and diploid and tetraploid plant flowers, following an extraction procedure employ in acid hydrolysis were applied to thin layer chromatography (TLC). Than extracts were revealed for contents of formononetin, biochanin A, genistein, daidzein with using a reversed-phase C column (Lichrospher 100 RP-18) with linear gradient elution on a high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with photodiode array detector (DAD). Natural tetraploid *T. pratense* L. flower have biochanin A, genistein beside maximum formononetin, while none of our isoflavones peak were observed on HPLC chromatograms of diploid flower extracts. In calli, the highest isoflavones contents (% 0.115= 1.15mg/g formononetin) are confirmed in second subculture callus of B5 medium (11 mg /L NAA 10 mg /L 2,4-D 10 mg /L KIN). In the calli of remained media were determined main isoflavone formononetin but they have different amount of other isoflavones.

2007 , 66 pages

Key Words: Tetraploid *Trifolium pratense* L., Red clover, Isoflavones, Phytoestrogen, , Callus, HPLC

TEŞEKKÜR

Bana çalışma konumu veren ve araştırmalarımın her aşamasında yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. M. Cihat TOKER (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi) ve Sayın Prof. Dr. Gülnur TOKER (Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilimdalı)'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ve her konuda ilgi ve yardımlarını gördüğüm, Yrd.Doç.Dr.Nurhan BÜYÜKKARTAL (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)'a, Yrd.Doç.Dr. Hatice ÇÖLGEÇEN (Karaelmas Üniversitesi Fen Fakültesi)'e, Arş. Gör. Canan Yağcı (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)'ya ve Yrd.Doç.Dr. Ufuk Koca (Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilimdalı)'ya teşekkürlerimi sunarım.

Analiz aşamasını gerçekleştirmemi sağlayan ve bilgilerini benimle büyük bir özveri ile paylaşan Doç.Dr. Murat KARTAL (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Güvenlerinden her zaman destek aldığım, bugünlere gelmemde benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan babam Mustafa ERÇETİN'e, annem Sabiha ERÇETİN'e ve abim Teoman ERÇETİN'e binlerce kez teşekkür ederim.

Tuğba ERÇETİN
Ankara, Şubat 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Botanik Bilgiler.....	4
2.1.1 <i>Trifolium pratense</i> L.bitkisinin sınıflandırılması.....	4
2.1.2 Leguminosae familyası.....	4
2.1.3 <i>Trifolium</i> L. cinsi.....	5
2.1.4 <i>Trifolium pratense</i> L.....	6
2.1.5 Türkiye'deki yayılışı.....	7
2.1.6 Habitatı.....	8
2.2 <i>Trifolium pratense</i> L'nin Kimyasal İçeriği.....	9
2.3 Fitoöstrojenler.....	10
2.3.1 Fitoöstrojenlerin yapısı ve sınıflandırılması.....	10
2.3.1.1 İzoflavonlar.....	10
2.3.1.1.1 İzoflavonların biyosentezi.....	13
2.3.1.2 İzoflavanlar.....	14
2.3.1.3 Lignanlar.....	14
2.3.1.4 Makrolitler.....	15
2.3.1.5 Diğer Fitoöstrojenler.....	15
2.3.2 Doğada bulunan fitoöstrojen kaynakları.....	16
2.3.4 Fitoöstrojenlerin biyolojik aktiviteleri ve kullanılışları.....	20
2.3.4.1 Östrojenik/ antiöstrojenik aktivite.....	20
2.3.4.1.1 Menopoz öncesi kadınlarda.....	21
2.3.4.1.2 Menopoz sonrası kadınlarda.....	22
2.3.4.1.3 Osteoporozda.....	22

2.3.4.2 Antikarsinojenik aktivite.....	23
2.3.4.2.1 Göğüs kanseri.....	23
2.3.4.2.2 Prostat kanseri.....	24
2.3.4.2.3 Diğer kanserler.....	25
2.3.4.3 Antioksidan aktivite.....	25
2.3.4.4 Kardiyovasküler hastalıklarda.....	26
2.3.5 <i>T. pratense</i> L.'de yapılan fitoöstrojenlerin analiz çalışmaları.....	26
2.3.6 <i>T. pratense</i> L. ile yapılan doku kültürü çalışmaları.....	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1 Materyal.....	31
3.1.1 Doku kültürü aşaması.....	31
3.1.2 Analiz aşaması.....	31
3.1.2.1 Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar.....	32
3.1.2.2 Kromatografik çalışmalarda kullanılan solvan sistemleri.....	32
3.2 Yöntem.....	33
3.2.1 Doku kültürü aşaması.....	33
3.2.1.1. Besin ortamının hazırlanması.....	35
3.2.1.1.1 Stok çözeltiler.....	35
3.2.1.1.2 Bitki büyüme düzenleyicileri.....	38
3.2.1.1.3 pH ayarı.....	39
3.2.1.1.4 Sterilizasyon.....	39
3.2.1.1.5 Ortamların petrilere dökülmesi ve ekim yapılması.....	41
3.2.1.1.6 Tohum ve eksplantların ekimi.....	41
3.2.1.2 Kallus oluşumu için inkübasyon.....	41
3.2.2 Kimyasal analiz.....	42
3.2.2.1 Metanollü ekstrenin hazırlanması.....	42
3.2.2.2 Standart (izoflavon) çözeltilerinin hazırlanması.....	42
3.2.2.3 İTK analizi.....	42
3.2.2.4 HPLC analizi.....	42
4. BULGULAR.....	44
4.1 Kallus Oluşturma ile İlgili Bulgular.....	44
4.2 Kallus ve Bitki Analizi ile İlgili Bulgular.....	48

4.2.1 İTK analizi.....	48
4.2.2 HPLC ile miktar tayini.....	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER DİZİNİ

2,4 D	2,4 diklorofenoksiasetik asit
BAP	Benzil Aminopürin
6-AP	6-aminopürin
cm	Santimetre
g	Gram
DAD	Diyot-array dedektör
GB5	Gamborg B5 besi ortamı
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
IAA	İndol-3- Asetik Asit
KIN	Kinetin
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
MS	Murashige ve Skoog besi ortamı
NAA	Naftalen-3 Asetik Asit
NaOCl	Sodyum hipoklorit (Çamaşır suyu)
nm	nanometre
PCL-2	Phillips ve Collins besi ortamı
UV	Ultraviyole

KISALTMALAR

P1	0,5 mg/L BAP, 5 mg/L NAA içeren PCL-2 ortamı
P2	2 mg/L BAP, 1 mg/L NAA içeren PCL-2 ortamı
P3	0,06 mg /L 2,4-D, 0,03 mg /L NAA, 0,1 mg /L BAP içeren PCL-2 ortamı
P4	0,06 mg /L 2,4-D, 0,1 mg /L BAP içeren PCL-2 ortamı
B5	11 mg /L NAA, 10 mg /L 2,4-D 10 mg /L KIN içeren Gamborg B5 ortamı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Trifolium pratense</i> L.bitki örneği.....	6
Şekil 2.2 <i>T. pratense</i> L.'nin Türkiye'deki yayılışı.....	8
Şekil 2.3 <i>T. pratense</i> var. <i>pratense</i>	9
Şekil 2.4 İzoflavonların formülü.....	11
Şekil 2.5 Aglikon yapısındaki izoflavonlar: Genistein,Daidzein ve Glisitein.....	12
Şekil 2.6.a. Oz b. Asetil, c. Malonil grupları bağlanmış daidzein izoflavonlar....	12
Şekil 2.7 Genisteinin biyosentez yolu.....	13
Şekil 2.8 İzoflavan yapısı.....	14
Şekil 2.9 Lignanların yapıları.....	14
Şekil 2.10 Zearalenon.....	15
Şekil 2.11 Bir Kumestan olan Kumestrol'ün yapısı	15
Şekil 2.12.a. Naringenin (flavanon) b. Sitosterol (sterol) c.Resveratrol (stilben)	16
Şekil 2.13. İnsan östrojeni olan 17-β östradiol (a) ile bir izoflavon (b)' un yapısal benzerliği.....	20
Şekil 3.1 a. Tetraploid <i>T. pratense</i> 'nin çiçeği b. 3. alt kültür kallusu.....	32
Şekil 4.1 Eksplant kaynağı olarak kullanılan 15 günlük aseptik fideler.....	44
Şekil 4.2 Hormonsuz MS ortamında gözlenen üçlü kotiledon yapısı.....	44
Şekil 4.3 P1 ortamına ekilen 20 günlük eksplantlarda oluşan kallus.....	45
Şekil 4.4 P1 ortamında gözlenen hava kökleri.....	46
Şekil 4.5 Kallusların P ve B5 ortamlarında g olarak ağılık artışları.....	47
Şekil 4.6 İzoflavon standartlarının, çiçeklerin ve kallusların İTK görünümleri (UV ₃₆₆).....	48
Şekil 4.7 Genisteinin kalibrasyon grafiği.....	50
Şekil 4.8 Daidzeinin kalibrasyon grafiği.....	50
Şekil 4.9 Formononetinin kalibrasyon grafiği.....	51
Şekil 4.10 Biokanın A'nın kalibrasyon grafiği.....	51

Şekil 4.11 Standart karışımının HPLC’de ayrımı.....	52
Şekil 4.12 Tetraploid <i>T. pratens</i> çiçeğinin HPLC kromatogramı.....	52
Şekil 4.13 B5 ortamı 2.alt kültür kallusunun HPLC kromatogramı.....	53
Şekil 4.14 Bitki kısımları ve kalluslarda belirlenen % izoflavon miktarları.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 İzoflavonların yapısının radikal gruplara göre değişimleri.....	11
Çizelge 2.2 USDA-Iowa State Üniversitesi Database'ine göre bazı besinlerin 100 gramlarında içerdikleri Genistein, Daidzein ve Glisitein izoflavonlarının miligram (mg) cinsinden miktarları.....	18
Çizelge 2.3 Bazı besinlerin 100 gramlarının Formononetin ve Biokanin A içeriklerinin miligram (mg) cinsinden miktarları.....	19
Çizelge 2.4 Çeşitli besinlerin 1 gramında bulunan lignan miktarları (µg cinsinden).....	19
Çizelge 3.1 Kullanılan MS, PC-L2 ve B5 ortamlarının içerikleri.....	34
Çizelge 3.5 Gradient yöntemine göre solvan kullanımı.....	43
Çizelge 4.1 PCL-2 ve Gamborg B5 ortamlarında, kallusların g cinsinden ağırlık artışı.....	47
Çizelge 4.2 İzoflavonların S2 solvan sisteminde R _f değerleri ve UV ₃₆₆ de verdikleri floresans renkleri.....	49
Çizelge 4.3 İzoflavon standartlarının dilüsyon serisi.....	49
Çizelge 4.4 <i>T. pratense</i> çiçek ve kalluslarında belirlenen % izoflavon miktarları...	54

1. GİRİŞ

Bitkiler insan hayatındaki beslenme, giyim ve sağlık ihtiyaçlarını karşılayan önemli bir kaynaktır. Günümüzde sağlık için kullanımları daha da ön plana çıkmıştır. Bitkilerden ilaç, ilaç hammaddesi ve gıda desteği olan çeşitli maddeler elde edilmektedir. Bu maddeler içinde, fitoöstrojenler de önemli bir grubu oluştururlar. Son yıllarda fitoöstrojenlerin özellikle memelilerin sağlık problemleri üzerine etkileri yoğun olarak çalışılmaktadır. Östrojenik bileşikler 300' den fazla bitki türünde görülmesine karşılık, bu bitkilerin çok az bir kısmı insanlar ve hayvanlar tarafından besin olarak tüketilir (Dixon 2004).

Fabaceae (Leguminosae=baklagiller) familyasından *Trifolium pratense* L. (çayırüçgülü) iyi bir yem bitkisi olmasının yanında içeriğindeki fitoöstrojenlerden dolayı da kaydadeğer bir bitkidir.

T. pratense L. çok yıllık, 20-60 cm boyunda gövde uzunluğuna sahip otsu bir bitkidir. Üçlü yaprağa sahip olan bitkinin yaprakçıklarının ortalama uzunlukları 1.5-3.0 cm'dir. Korolla alacalı mor renktedir. Çiçekler kömeç (kapitatus) halinde ve terminal durumludur (Davis 1970). Meyveleri çok küçüktür ve içerisinde bir ya da iki tohum bulunur.

Kuzey Yarımkürenin ılıman bölgelerinden, tropiklerdeki dağlara kadar geniş bir alanda yaşayabilen bitki, çayırlar, yol kenarları, kesilmiş orman alanları gibi yerlerde, yaklaşık 2300 m yüksekliğe kadar yayılış gösterir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak tarımı yapılan *T. pratense* L. doğal olarak Güneydoğu Avrupa ve Anadolu'da bulunmaktadır. Yurdumuzda özellikle Orta ve Doğu Anadolu'nun taban meralarında, su kenarlarında ve Karadeniz Bölgesi'nde bitki örtüsü içinde yaygın olarak bulunur (Elçi 1994). Anadolu'da büyük bir form zenginliği gösteren ve üç varyetesi bulunan *T. pratense* L. diploiddir. Elçi (1982) tarafından Erzurum'un Tortum yöresinden toplanıp, kültüre alınan *T. pratense* var. *pratense* L. ise doğal tetraploiddir.

Kuru ot için tarımı yapılan çok değerli bir yem bitkisidir (Elçi 1988). Sulanabilen, yıllık yağışı yüksek ve düzenli olan bölgelerde kuru ot üretimi ve hayvan otlatmak amacıyla yetiştirilen *T. pratense* L. içeriğindeki fitoöstrojenlerden dolayı hayvanlardaki süt verimini de artırmaktadır (Van de Weijer and Barentsen 2002). Köklerindeki yumrular sayesinde topraktaki azot birikimine yardımcı ve proteince zengin olan bitki, toprak ıslahı çalışmalarında da kullanılmaktadır. Düşük ışık yoğunluğuna ve kuraklığa dayanıklı olan bitkinin, toprak özelliklerine karşı geniş bir toleransı vardır. Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Fransa bitkinin başlıca tohum üreticisi ülkeleridir.

Diploid formlara göre pek çok özelliğinden dolayı tetraploid formlar oldukça üstündür. Doğal tetraploid *T. pratense*, vejetatif yünden üstün olmasının yanında doğal gen kaynağıdır. Diploid form genellikle 3-4 yıl yaşarken doğal tetraploid *T. pratense* tarlada 7 yıla kadar kalabilmektedir.

T. pratense L. bitkisinin, taşıdığı ve fitoöstrojen olarak bilinen izoflavonlarından dolayı yaygın olarak tıbbi amaçlı kullanımı vardır. Son yıllarda özellikle Avrupa ve Amerika'da tıbbi ilaç preparatlarında ve halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Menopoz döneminde uygulanan ve pek çok risk taşıyan hormon tedavisi yerine bitkisel tedavi tercih edilmektedir. Fitoöstrojenler östrojen hormonuna benzer yapılarından dolayı pek çok önemli etkiye sahiptir. Bunların en başında da menopozun başlangıç döneminde nörovejetatif bulgular olarak isimlendirilen sıcak basması, el ve ayaklarda karıncalanma, terleme, uykusuzluk, sinirlilik hali, yorgunluk, çarpıntı hissi, baş ağrısı, kas ve eklem ağrıları gibi şikayetleri hafifleterek bireyin yaşam kalitesini yükseltmesi gelir. Yine fitoöstrojenler menopoz sonrası dönemde sıklıkla görülen rahatsızlıklar olan kemik erimesinin (osteoporoz) önlenmesi ve kemik yoğunluğunun artırılması, kalp ve damar hastalıklarının engellenmesi, algılama bozukluklarının düzeltilmesi, kan lipid profilinin düzenlenmesi, kolesterol ve trigliserit düzeylerinin düşürülmesi amacıyla kullanılır. Ayrıca fitoöstrojenler, hormon replasman tedavisi ile ortaya çıkma riski artan meme ve rahim içi kanserlerine karşı korunma da sağlayarak menopoz döneminde kadın sağlığını bir bütün olarak korurlar.

T. pratense L. bitkisinin içeriğinde bulunan izoflavonlar Avrupa ve Amerika'da birçok ticari preparatta kullanılmaktadır. Ülkemizde de son yıllarda bu preparatlardan Sağlık

Bakanlığı'nın onayı ile kullanılanları vardır. Mikro-Gen firması tarafında üretilen İsoflavin genistein ve daidzein içerirken, Gynogen genistein izoflavonunu içermektedir. *T. pratense* L. halk arasında kanser, bronşit, karaciğer hastalıkları, yanık ve yaralar, romatizma, deri hastalıkları, ülser, egzema ve sedef hastalığına karşı kullanılan bir bitkidir (Kledjus *et al.* 2001). Ayrıca içinde bulundurduğu yüksek orandaki izoflavonlardan dolayı *T. pratense* ilaç sanayiinde dikkat çeken önemli bir bitkidir.

Çalışmanın amacı doğal tetraploid *T. pratense* tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ile elde edilen sürgünlerden alınan eksplantlardan, çeşitli ortam ve büyüme düzenleyiciler kullanılarak elde edilen kalluslar ile bitkinin diploid ve tetraploid formlarının isoflavonoid içeriklerini önce İTK ile belirlemek ve ardından HPLC ile miktarlarını tayin etmektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Botanik Bilgiler

T. pratense L. Leguminosae (Baklagiller) ailesine ait, çok yıllık, 20-60 cm boyunda gövde uzunluğuna ve üçlü yaprağa sahip otsu bir bitkidir.

Yurdumuzda özellikle Orta ve Doğu Anadolu'nun taban meralarında, su kenarlarında ve Karadeniz Bölgesi'nde bitki örtüsü içinde yaygın olarak bulunur (Elçi 1994). Anadolu'da büyük bir form zenginliği gösteren bitki dünyada da geniş yayılım gösterir.

2.1.1 *Trifolium pratense* L. bitkisinin sınıflandırılması

Trifolium pratense L.'nin sistematığı (Davis 1970) ise şöyledir:

- Divisio: Spermatophytae (=Phanerogamae)
- Classis: Magnoliopsida
- Subclassis: Dicotyledoneae
- Ordo: Fabales
- Familia: Fabaceae
- Tribus: Trifolieae
- Genus: *Trifolium*
- Sectio: *Trifolium*
- Species: *Trifolium pratense*
- Varyete: *Trifolium pratense* var. *pratense*

2.1.2 Fabaceae (Leguminosae = Baklagiller) familyası

450-500 cinsi dahil 1300 kadar türü olan Fabaceae familyası büyük ve önemli familyalardan birisidir ve otsu, çalı ve ağaçlar, otsu veya odunsu sarılıcı bitkileri içerir (Seçmen 1995). Yapraklar çoğunlukla tüysü, trifoliat (üçgül), ender olarakta basittir. Sürgünlere sarmal veya almaçlı olarak dizilmiştir; kulakçıkları (stipul) bulunmakta;

yaprak sapında ve pinnaların tabanında özel hareket organları (pulvinus) gelişmektedir. Pulvinuslar sayesinde bazı cinslerde yapraklar niktinastik bazen autonom hareketler yapma yeteneğindedirler. Kök yumrucuklarında havanın serbest azotunu bağlayan *Rhizobium* cinsine mensup bakteriler simbiyoz halde yaşarlar. Çiçekler aktinomorf veya zigomorf, hermafrodit (erselik), $S_5 P_5 A_{10} G_1$ üst durumdadır. Meyve bakla (legümen, apokarp meyve) dir. Bazı türlerde endosperm (besi doku) yoktur, besin kotiledonlarda depo edilir ve Mimosoideae, Caesalpinioideae ve Faboideae (Papilionaceae) olmak üzere üç alt familyaya ayrılır. Fabaceae familyası bitkileri insan ve hayvanlar için büyük önem taşırlar. Proteince zengin olan bu familyaya ait yem bitkisi olarak kullanılan bazı türlerin otlarının beslenme değerlerinin fazla olmasının yanında hayvansal metabolizma için çok önemli olan ve sitrik asit döngüsünde rol oynayan süksinik asidi (kehribar asiti) genç sürgünlerinde bol miktarda bulundurlar. Ayrıca birçoğunun yan ürünlerinden yararlanıldığı gibi birçoğu da süs bitkisi olarak değerlendirilmektedir.

Türkiye Florasıyla ilgili en kapsamlı çalışma olan " Flora of Turkey and East Aegean Islands " (Davis 1970) adlı eserin 3.cildinde Fabaceae familyası'nın Türkiye'de 68 cins ve 926 türün yayılışı verilmektedir.

2.1.3 *Trifolium* L. cinsi

Tek veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar trifoliat (üçgül) veya ender olarak 5-9 adet, genellikle dişli yaprakçıktan oluşan digitat tiptedir. Kulakçıklar (stipullar) belirgin genellikle tam olup, yaprak sapına birleşiktir. Çiçekler sapsız veya saplı, başak yada rasemoz halinde kurul oluştururlar veya ender olarak da teker teker bulunurlar. Brakte bulunur veya bulunmaz. Çanak varyasyonlar gösterir. Taç pembe, kırmızı, morumsu, beyaz veya sarı renkli olup genellikle kalıcıdır. Stamenler diadelftir ((9)+1). Legümen düzdür, açılmaz veya gayri muntazam yırtılır. Genellikle Mart- Eylül aylarında çiçek açarlar.

Flora Europaea (Tutin *et al.* 1964) adlı eserde ise Türkiye'de 43 taksonun yayılış gösterdiği saptanmıştır. " Flora of Turkey and the East Aegean Islands" (Davis 1970) adlı eserde Zohary tarafından Türkiye' de 101 tür veya 130 taksonun yayılış gösterdiği saptanmış olup, 13 taksonu endemiktir. Dolayısıyla endemizm oranı % 10 'dur.

2.1.4 *Trifolium pratense* L.

Dikten yatığa, çok yıllık ve 20-60 cm'ye varan gövde uzunluğu görülür (Şekil 2.1). Stipullar ovat-lanseolat, serbest uçları mukronat veya kuspıdattır. Yaprakçıklar 1.5-3.0 (-5.0) cm. obovattan geniş eliptiğe, 0.7-2.2 cm genişlikte, sapsız veya nadiren saplı, genellikle indirgenmiş yaprakların stipulları vardır. Kaliks tüpsü-kampanulat, 10-damarlı patuloz-tüylü, nadiren tüysüz; tüp boynu dairesel tüylü bir kalınlaşma ile açılır. Korolla kırmızımsı-mor ila pembe, nadiren beyazımsı olup, 13-18 mm boyundadır. Çiçeklenmeleri 5.-9. aylar arasında gerçekleşir. Çayırlar, yol kenarları, kesilmiş orman alanları gibi yerlerde, yaklaşık 2300 m.'ye kadar yayılış gösterir.



Şekil 2.1 Tetraploid *Trifolium pratense* bitki örneği

Trifolium pratense var. *pratense* anahtarda şöyle belirlenir: Gövdeler genellikle 20-40 cm, yoğun basık tüylü; yaprakçıklar 1.5-3.0 cm dir (Davis 1970).

Çiçek topluluğu kömeç, durumu ise terminaldir. Tetraploid çayır üçgülünde çiçekler daha büyük ve çiçek borusu dar uzundur (Elçi 1994).

Meyve çok küçüktür. İçerisinde tek, çoğunlukla iki tohum bulunur. Meyve kabuğu enine bölünerek tohum üzerinde şapka şeklinde kalır. Diploid ve doğal tetraploid *T. pratense* L.'nin polen ve tohum morfolojisi Pınar et al. (2001) tarafından çalışılmıştır. Polenlerin büyüklükleri birbirine yakındır. Diploid polenler simetrik iken tetraploid polenlerde asimetri görülmektedir. Diploid formun tohumları sarı, büyük ve ağır iken tetraploid formun tohumları koyu kahverengi ve daha küçüktür.

Bitkinin tetraploid formu, diploid formu ile kıyaslandığında vejetatif üstünlükler gösterir.

2.1.5 Türkiye'deki yayılışı

Diploid *Trifolium pratense* var. *pratense* L.'nin Türkiye'de yayılışı (Şekil 2.2) (Davis 1970)

A 1 (E) Kırklareli: Kırklareli- Demirköy arası, 200 m.

A 2 (E) İstanbul: Sarıyer

A 3 Bolu: Bolu-Sakarya arası 25 km., 500

A 4 Zonguldak: Keltepe Karabük arası Sorgun'da 1300 m.

A 5 Çorum: Alaca Sungurlu arası 20 km.1200 m.

A 6 Ordu: Aybastı'nın 1100 m. yukarısı

A 7 Giresun: Tamdere 1600 m.

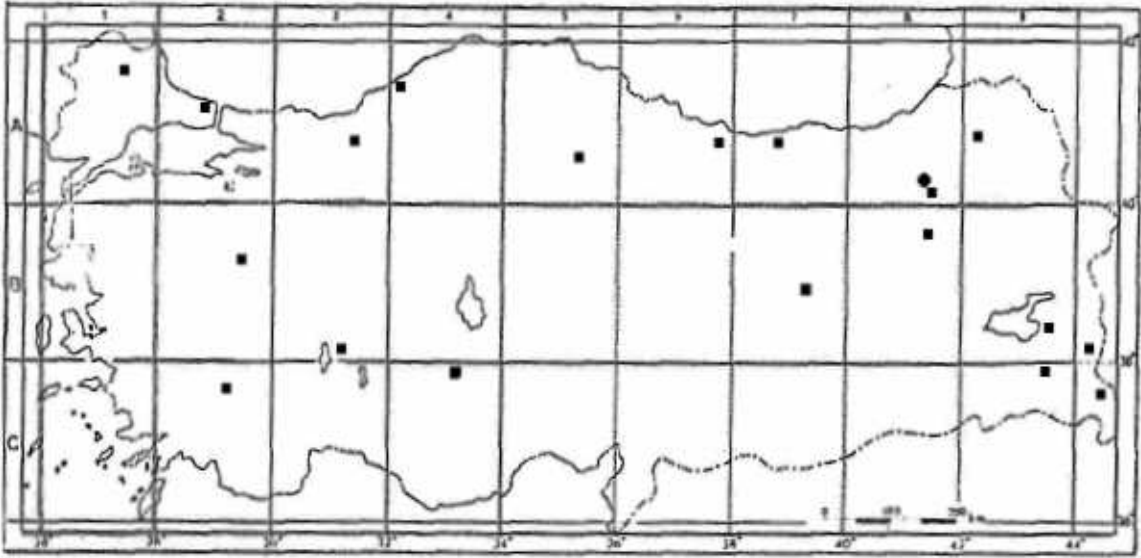
A 8 Erzurum: Tortum ve Oltu arası 2300 m.

A 9 Çoruh: Kordeven ile Ardanuç arası 1400 m.

B 2 Kütahya: Simav 1650 m.

B 3 Isparta: Eğridir- Barla Dağı 1200 m.

- B 7 Tunceli: Pülümür'ün 1900 m.yukarısı
B 8 Erzurum: Varto- Hınıs arası 20 km. 1900 m.
B 9 Van: Timar 1750 m.
B 10 Van: Başkale'nin 3-4 km. kuzeybatısı 2300 m.
C 2 Denizli: Honaz Dağı 1250 m.
C 4 Konya: Karaman
C 9 Van: Erek Dağı 2200 m.
C 10 Hakkari: Yüksekova Şemdinli arasında 10 km. 1950 m.



Şekil 2.2 *T. pratense* var. *pratense* L.'nin Türkiye'de yayılışı

- Diploid
- Tetraploid (Tortum)

2.1.6 Habitatı

Sulanabilen, yıllık yağışı yüksek ve düzenli olan bölgelerde ve yaklaşık 2300 m yüksekliğe kadar yayılış gösterir.

Düşük ışık yoğunluğuna ve kuraklığa dayanıklı olup toprak özelliklerine karşı geniş bir toleransı olan *T. pratense* fosfor ve yüksek miktarda potasyum içeren nodülasyon için ise nötral pH'a sahip toprakları tercih etmektedir.



Şekil 2.3 *Trifolium pratense* var. *pratense*

2.2 *Trifolium pratense* L'nin Kimyasal İçeriği

T. pratense L. flavonoidler olarak adlandırılan pigmentlerden izoflavonları bulundurlar. İzoflavonlar fitöstrojen etkilidir. *T. pratense* L.'nin içeriğinde bulunan izoflavonların başlıcaları formononetin, biokanin A, genistein, daidzeindir. Bunlar da bitkide aglikon halinde ve glikozitleri halinde bulunurlar.

2.3 Fitoöstrojenler

Fitoöstrojen terimi ilk kez 1980 yılında ortaya çıkmıştır. Fitoöstrojenler, nutrasotik maddeler içinde yer almaktadır. Nutrasotikler hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde sağlığa yararları bilimsel olarak ispatlanmış, toksik olmayan, herhangi bir gıda desteğini ifade eden bileşiklerdir (Başer ve Kırimer 2002).

Fitoöstrojenler üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalar, fitoöstrojen zengin diyetle beslenen toplumlarda kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz, göğüs, prostat ve barsak kanserlerinin daha az görüldüğünü ve menopoz sonrasında bayanlarda östrojen yetersizliğine bağlı semptomların daha hafif yaşandığını göstermiştir.

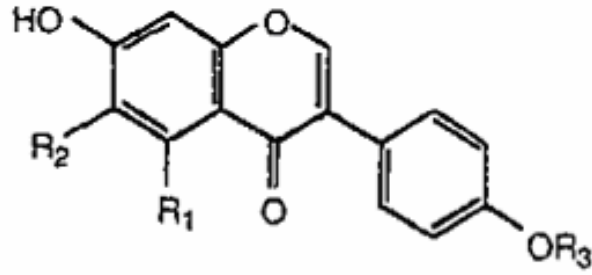
2.3.1 Fitoöstrojenlerin yapısı ve sınıflandırılması

Bitkilerde fenilpropan ve basit fenollerden sentezlenen fitoöstrojenler kimyasal yapılarına göre İzoflavonlar , İzoflavanlar, Flavanonlar, Lignanlar, Kumestanlar, Stilbenler, Steroller, Makrolitler olarak sınıflandırılırlar (Büyüktuncer ve Başaran 2005).

Fitoöstrojenlerin önemli bir grubunu flavonoidler oluşturur. Endojen östrojenlere benzer özellik taşımaları nedeniyle bu maddeler zayıf östrojenik ve antiöstrojenik aktivite (östradiolün 0,001-0,002'si kadar) gösteren bileşiklerdir (Cassidy *et al.* 1995).

2.3.1.1 İzoflavonlar

İzoflavonlar bitkilerde doğal olarak ozlarla konjuge yapılar olan glikozit halinde bulunurlar. Oz veya dioz izoflavonun çoğunlukla 7.C atomuna glikozidik bağ ile bağlanmış durumdadır. 6-O-asetilglikozitler ve 6-O-malonilglikozitlerde ise aglikona bağlanan karbohidrat molekülüne ek olarak asetil ve malonil grubu vardır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 İzoflavonların formülü

Çizelge 2.1 İzoflavon yapısının radikal gruplara göre değişimleri

İZOFLAVON	R ₁	R ₂	R ₃
Formononetin	H	H	CH ₃
Biokanin A	OH	H	CH ₃
Genistein	OH	H	H
Daidzein	H	H	H
Daidzin	H	H	Glukoz
Genistin	OH	H	Glukoz
Glisitein	H	OCH ₃	H
Glisitin	H	OCH ₃	Glukoz

İzoflavonlar bitkilerde dört temel yapıda bulunabilir. Bunlarda radikal gruplarına göre farklılaşırlar (Çizelge 2.1)

I. Aglikon yapısındaki konjuge olmamış izoflavonlar: Daidzein (4,7-dihidroksi izoflavon), Genistein (4,5,7-trihidroksi izoflavon), Glisitein (7,4-dihidroksi 6-metil izoflavon) (Şekil 2.5)

II. 7-O-glukozitler: Daidzin (Şekil 2.6 a), Genistin, Glisitin

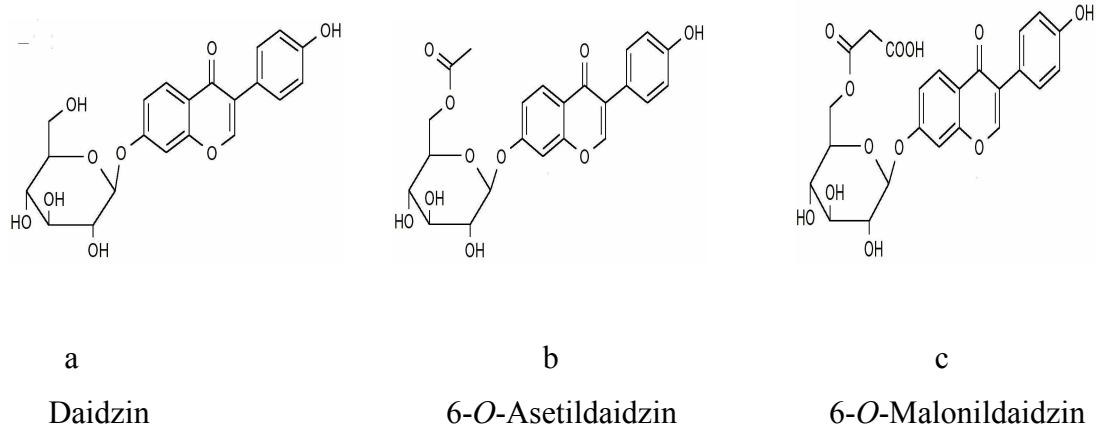
III. 6-O-asetilglukozitler: 6-O-asetildaidzin (Şekil 2.6 b), 6-O-asetilgenistin

IV. 6-O-malonilglukozitler: 6-O-malonildaidzin (Şekil 2.6 c), 6-O-malonilgenistin (Sam and Chang 2002).

İzoflavonların östrojenik aktivite gösterebilme yetenekleri farklıdır. Genistein güçlü östrojenik aktivite gösterirken, glisitein diğer izoflavonlardan çok daha zayıf östrojenik özelliğe sahiptir (Büyüktuncer ve Başaran 2005).



Şekil 2.5 Aglikon yapısındaki izoflavonlar: Genistein, Daidzein ve Glisitein



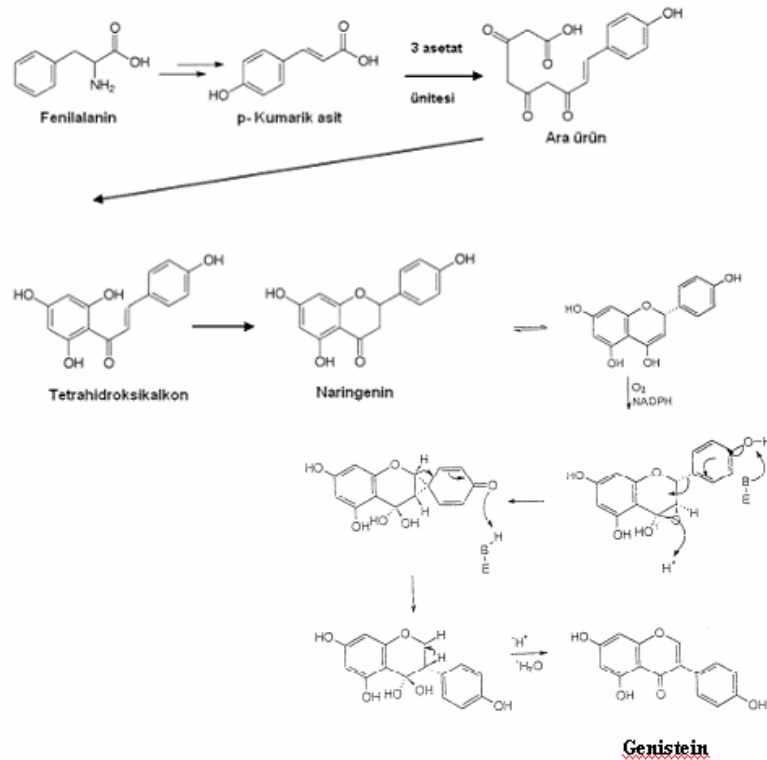
Şekil 2.6.a. Oz, b. Asetil, c. Malonil grupları bağlanmış daidzein izoflavonlar (<http://www.lclabs.com>, 2005)

İzoflavonların östrojenik aktivite gösterebilme yetenekleri farklıdır. Genistein güçlü östrojenik aktivite gösterirken, glisitein diğer izoflavonlardan çok daha zayıf östrojenik özelliğe sahiptir.

2.3.1.1.1 İzoflavonların biyosentezi

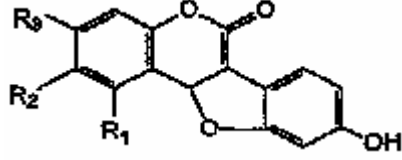
Şikimat-asetat yolunun son ürünü olan Fenilalanin, Sinamik asite ve daha sonra okside olarak *p*-Kumarik asite dönüşür. *p*-Kumarik asit, 3 asetat ünitesiyle kondansasyona uğrayarak A halkasını oluşturup, tetrahidrochalkona dönüşecek olan ilk ara ürünün oluşmasını sağlar. Diğer kapalı halka yapısı (C halkası) oluştuğunda bir flavonon olan Naringenin meydana gelir. Bundan sonra flavonlar arasında değişik formlar oluşur (Şekil 2.7), (Jensen and Schripsema 2002).

Flavonon oluşumundan sonra izoflavonların oluşum meknizması iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta, bir flavonon enol formunun oksidasyonu ve reanjanmanı; ikinci basamakta, su molekülünün eliminasyonu sonucu izoflavon molekülü oluşumu gerçekleşir.



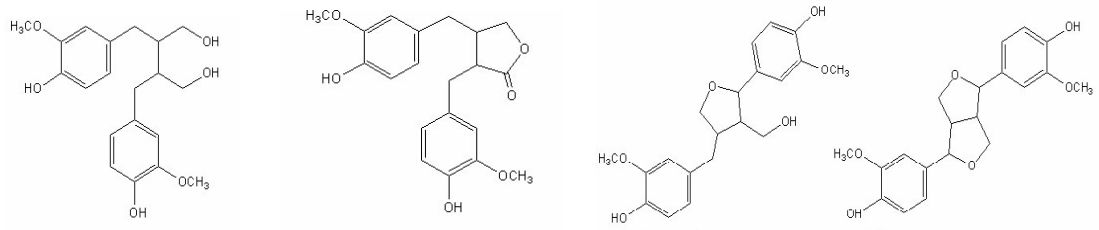
Şekil 2.7 Genisteinin biyosentez yolu (Jensen and Schripsema 2002)

2.3.1.2 İzoflavanlar



Şekil 2.8 İzoflavan yapısı

2.3.1.3 Lignanlar



Sekoizolarikiresinol

Metairesinol

Larikiresinol

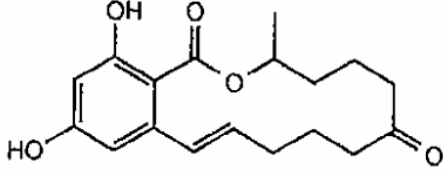
Pinoresinol

Şekil 2.9 Lignanların yapıları ([http://lpi.oregonstate.edu/.../ plantlignans.html](http://lpi.oregonstate.edu/.../plantlignans.html), 2005)

İzoflavonlardan sonra üzerinde durulan fitoöstrojenler olan lignanlar tahıl, sebze ve meyvelerde bulunurlar, en iyi bilinen kaynakları ise *Linum usitatissimum* (keten tohumu)'dur.

Bitkilerde bulunan temel lignanlar metairesinol, sekoizolarikiresinol, larikiresinol (Şekil 2.9) ve izolarikiresinol olup bunlar insanlarda östrojenik aktivite gösteren enterolakton ve enterodiol dönüşebilmektedir. Enterolakton ve enterodiol barsak mikroflorasının lignan öncüleri üzerindeki aktivitesi sonucunda oluşurlar. Ayrıca enterolakton enterodiolün oksidasyonu ile de oluşabilir (Davis *et al.* 1999).

2.3.1.4 Makrolitler

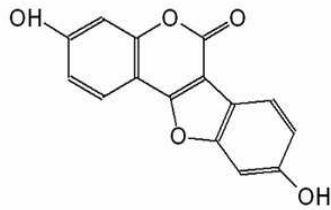


Şekil 2.10 Zearalenon (Wang 2002)

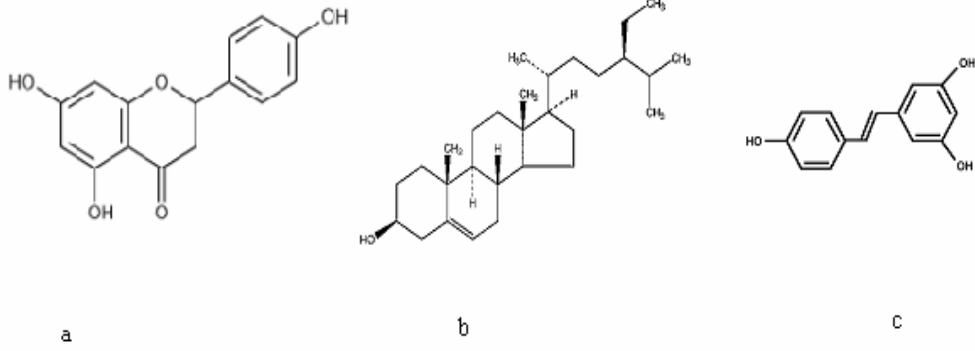
Özellikle uygun olmayan koşullarda depolanan tahıllar, yağlı tohumlar ve otlarda hızla çoğalan organizmalar olan *Fusarium* gibi mantarların sekonder metabolitleridir. Genellikle tohumların kabuk kısmında bulunurlar. Zearalenon (Şekil 2.10), α ve β -zearalanol östrojenik aktiviteye sahip olan ve mikoöstrojenler olarak adlandırılan bileşiklerdir (Davis *et al.* 1999).

2.3.1.5 Diğer fitoöstrojenler

Bazı kumestanlar, flavanonlar, steroller ve stilbenler bu gruba girerler (Şekil 2.11 ve Şekil 2.12 a,b,c).



Şekil 2.11 Bir Kumestan olan Kumestrol'ün yapısı (Makela *et al.* 1995)



Şekil 2.12.a. Naringenin (flavanon) (Rice C.A. *et al.*,1999), b. Sitosterol (sterol) (<http://www.nutranews.org>,2004), c. Resveratrol (stilben) (<http://www.pdrhealth.com>, 2005)

2.3.2 Doğada bulunan fitoöstrojen kaynakları

Birçok alt gruba ayrılan fitoöstrojenler, buldukları besin kaynakları bakımından çeşitlilik gösterirler. İzoflavonlar temel olarak Leguminosae ailesinin üyelerinde (soya fasulyesi, bezelye, mercimek) bulunsalar da Graminae, Rosaceae (*Prunus* sp.), İridaceae (*İris* sp.) ve Solanaceae (*Nicotiana tabacum*) türlerinde de tanımlanmışlardır.

Östrojenik aktiviteye sahip izoflavon içeren birçok bitki çeşidi bitkisel ilaç olarak kullanılır. *Glycine max* (soya fasulyesi) ve *T. pratense* L. (çayır üçgülü) bu konuda büyük ilgi görmektedir.

İzoflavon kaynağı olarak kuru baklagiller, tahıl ürünleri, *Cimicifuga racemosa* (Black cohosh), *Pueraria lobata*, *Glycyrrhiza echinata* (meyan kökü) sayılabilir.

Glycyrrhiza echinata glabridin izoflavonunu içerirken, Kudzu asması olarak bilinen *Pueraria lobata* puerarin içermektedir (Tamir *et al.* 2001). Kuzey Amerika'da bulunan çok yıllık bir bitki olan *Actaea racemosa* ise izoflavon içeriğinden dolayı menopozal rahatsızlıkların giderilmesi amacıyla Amerika'da kullanılan birçok ticari preparatın birleşimine girmektedir (Kennely *et al.* 2002).

Meyve ve yağlı tohumlar içerisinde kuş üzümü ve kuru üzüm gibi küçük taneli meyvelerin yüksek östrojenik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Liggins *et al.* 2000).

Günümüzde en çok kullanılan izoflavon kaynakları soya fasulyesinin işlenmesi ile elde edilen soya unu, soya protein izolatları, soya sütü, soya yoğurdu, miso, tofu, tempeh'dir. Bunlardan soya unu, soya fasulyesinin kavrulup öğütülmesi sonucunda elde edilir ve protein, demir, çinko, B vitaminleri, lif, yağ asitleri bakımından zengin bir üründür. Japonya ve Çin'de günlük olarak üretilen soya sütü soyanın ısıtılıp, pişirildikten sonra öğütülüp sıkılması ile elde edilmektedir. Tofu; Nagari adlı bir maddenin soya ile karıştırılması ile elde edilmektedir. Tempeh, Endonezya'nın geleneksel yemeklerinden biridir ve soya fasulyesinin pirinç ya da darı ile karıştırılıp pişirilmesiyle elde edilir. Soya fasulyesinin pirinç ya da arpa, tuz ve bir tür bakteri ile karıştırılmasıyla elde edilen miso, Japonya'da tercih edilen bir yemektir (<http://www.finspor.com.tr/saglik> 2005).

Soya unundan sonra, işlenmiş soya ürünleri olan miso ve tofu Asyalıların diyetlerinde izoflavonların ana kaynağıdır. Çünkü bunların hazırlanması sırasındaki fermentasyon sürecinde, mikroorganizmalar izoflavonların β -glikozit bağınyı kopararak glikozitlerin aglikonlara dönüşümünü sağlarlar (Liggins *et al.* 1998). Böylelikle serbest formdaki izoflavonların konsantrasyonları ile birlikte yararlılıkları da artar. Grün ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmada fermentasyonla genistein miktarının arttığı, ancak toplam izoflavon miktarının fermente olmayanlardan pek farklı olmadığı belirlenmiştir.

Soya yağı ve soya sosunda hidrofilik glikozitler ayrılamadığından izoflavon miktarları azdır (Fukutake *et al.* 1996). Soya tohumlarındaki fitoöstrojen seviyeleri çevresel faktörlere önemli bir şekilde bağlıdır. Amerika'da üretilen soya fasülyesinin (Roundup) %75'inden fazlası bir herbisitden glifosfata karşı dirençli olacak şekilde genetik olarak düzenlenmiştir yani transgeniktir. Glifosfat fenilalanin aminoasidinin habercisi ve izoflavonların kaynağı olan şikimatların biyosentezine engel olur. Glifosfat'ın tarlalarda

çeşitli dozlarda kullanımının Roundup soyalardaki fitoöstrojen seviyelerini etkilemediği gösterilmiştir (Dixon 2004).

Genel olarak soya ürünlerinin 1 gramlarında 1-3 mg izoflavon içerdikleri kabul edilir. İzoflavonların günlük dozu yaklaşık 3 mg/kg olduğunda, kanser oluşumunun engellendiği gözlenmiştir (Rowland 1999).

Bir besinin fitoöstrojen içeriği bitkinin genetik yapısı, yetiştiği bölge ve mevsim özellikleri, mantarlar ile enfekte olma durumu ve besin işleme yöntemleri gibi birçok faktörden etkilenir (Davis *et al.* 1999). Aynı bitkinin farklı ürünlerinin fitoöstrojen içeriği farklılık gösterdiği gibi, farklı coğrafyada yetişen türlerde de değişiklikler gözlemlenmektedir.

Çizelgelerde bazı besinlerin 100 gramlarında bulunan izoflavon (mg) ve lignan ($\mu\text{g/g}$) içerikleri gösterilmektedir (Çizelge 2.2.- 2.4).

Çizelge 2.2 USDA-Iowa State Üniversitesi Database'ine göre bazı besinlerin 100 gramlarında içerdikleri Genistein, Daidzein ve Glisitein izoflavonlarının miligram (mg) cinsinden miktarları (http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isfl_tbl.pdf, 2002)

Besin (mg/100g)	Daidzein	Genistein	Glisitein	Toplam
Soya tohumu	46,64	73,76	10,88	128,35
Soya unu	37,47	71,21	7,55	131,19
Soya sütü	2,41	4,60		7,01
Soya peyniri	11,24	20,08		31,32
Soya protein izolatu	33,59	59,62	9,47	102,68
Soyafasulyesi Brezilya	20,16	67,47		87,63
Soyafasulyesi Japonya	34,52	64,78		87,63
Miso	16,13	24,56	2,87	42,55
Tofu	13,60	13,90	2,00	29,50
Tempeh	17,59	24,85	2,10	43,52
Yonca filizi	0,00	0,35		0,35
Yesil Cav	0,01	0,04		0,05
Fıstık	0,03	0,24		0,27

Çizelge 2.3 Bazı besinlerin 100 gramlarının Formononetin ve Biokanin A içeriklerinin miligram (mg) cinsinden miktarları ([http:// www. nal. usda. gov / fnic / foodcomp / Data / isoflavisoflav. html](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflavisoflav.html), 2002)

Besin (mg/100g)	Formononetin	Biokanin A	Toplam
Soya unu	0,03	0,07	0,10
Soya fasulyesi	0,07	0,01	0,08
Kuru fasulye	0,00	0,01	0,01
Yeşil fasulye	0,15	0,00	0,15
Fıstık	0,01	0,01	0,02
Mercimek	0,01	0,00	0,01
Çayır üçgülü	1322	833	2155
Yonca filizi ile çayır üçgülü filizinin karışımı	1771	2946	4717

Çizelge 2.4 Çeşitli besinlerin 1 gramında bulunan lignan miktarları (µg cinsinden)

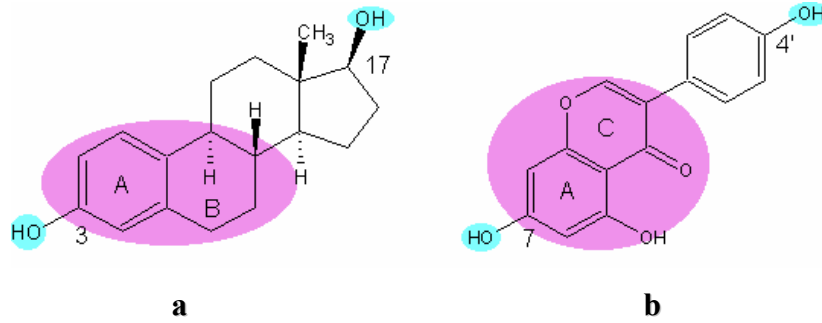
Besin (µg/g)	Lignan	Besin (µg /g)	Lignan
Keten tohumu	675	Yulaf	3.4
Keten tohumu unu	527	Havuç	3.5
Soya fasulyesi	8.6	Patates	3.0
Buğday kepeği	5.7	Pırasa	2.0
Yulaf kepeği	6.5	Brokoli	2.3
Kuru fasulye	5.6	Armut	1.8
Sarımsak	4.1	Erik	1.5

2.3.4 Fitoöstrojenlerin biyolojik aktiviteleri ve kullanılışları

2.3.4.1 Östrojenik/ antiöstrojenik aktivite

Fitoöstrojenlerin östrojenik ve antiöstrojenik özellikleri; endojen östrojen olan 17- β -östradiole olan yapısal ve işlevsel benzerliklerinden (Şekil 2.13) dolayı östrojen reseptörlerine (**ER**) daha kolay bağlanabilmelerinden dolayıdır. ER- α ve ER- β için bir ligand olan fitoöstrojenlerin etki mekanizmaları çok kompleksdir.

Fitoöstrojenlerin aktivitelerinin ortamın endojen östrojen düzeyi ile ilişkili olabileceği ve bunun sonucunda yüksek östrojenli durumda yani menopoz öncesi kadınlarda antiöstrojenik etki gösterirken, düşük östrojenli yani menopoz sonrası kadınlarda östrojenik etki gösterebilecekleri düşünülmektedir (Martini *et al.* 1999).



Şekil 2.13. İnsan östrojeni olan 17- β östradiol (**a**) ile bir izoflavonun (**b**) yapısal benzerliği (<http://www.herbal.chem.net/Advanced.htm>, 2005)

- İzoflavonlarda ve östradiolde C3 ve C17 ile 7-4' OH hidroksillerinin bulunması ve aralarındaki mesafenin hemen hemen aynı olması ,
- İzoflavonların A ve C halkaları ile 17- β östradiolün A ve B halkalarının benzerliği,
- İki molekülün polaritelerinin ve moleküler ağırlıklarının benzerliği yapısal yakınlıklarının işaretidir.

Fitoöstrojenler, ER- β 'ya ER- α 'dan daha güçlü bağlanma kapasitesine sahiptir. ER- β prostat salgılama epitelinde, beyinde, idrar yolunda, düz kas hücreleri ve göğüs hücrelerinde görülür ve mRNA ekspresyonu ER- α 'dan daha yüksektir (Davis *et al.* 1999)

Fitoöstrojenlerin steroid metabolizmasını etkileyen enzimler üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir. Genistein ve kumestrolün östronun östradiole çevrilmesinden sorumlu olan 17- β -östradiol oksidoredüktaz enzimini baskıladığı araştırmalar sonucunda gözlemlenmiştir (Wu *et al.* 2002).

Genistein ve daidzein ER ve Seks Hormonu Bağlayıcı Proteine (SHBG) bağlanma yeteneğindedir ve ER'ne bağlanmak için östradiol ile rekabete girerler. Genistein ve ekuol SHBG'ne bağlanarak östrojen ve testosteronun yerine geçer ve SHBG'nin hücresel seviyesini etkiler. Böylece östrojen ve androjen yolunda hedef hücreler için güçlü etki yaparlar (Pino *et al.* 2000).

2.3.4.1.1 Menopoz öncesi kadınlarda

Fitoöstrojenle zengin diyetle beslenen kadınlarda; östradiol, progesteron, seks hormon bağlayıcı globülin (SHBG) düzeylerinde azalma, FSH (Folikül stimüle edici hormon) ve LH (Luteinize edici hormon) da baskılanma gibi endokrin değişiklikler görülmesi fitoöstrojenlerin menopoz öncesi dönemdeki kadınlarda antiöstrojenik etki gösterdiğini kanıtlar niteliktedir (Lu *et al.* 2001).

Ayrıca fitoöstrojenlerin SHBG aktivitesini düzenlenmesi ile östradiolün hedef organlara dağılımını ve menstural siklus uzunluğunu etkilediği gözlemlenmiştir (Brzezinski and Debi 1999).

2.3.4.1.2 Menopoz sonrası kadınlarda

Epidemiyolojik alışmalar, menopozun ilk dönemlerinde görülen ateş basması, gece terlemesi, uyku düzensizliği gibi rahatsızlıkların batı toplumlarında, daha çok soya ve soya kaynaklı besinlerle beslenen Asya toplumlarına oranla çok daha fazla rastlandığını göstermektedir. Bu araştırmalara dayandırılarak, diyetle soya tkretimini artırarak, östrojenik özellik gösterebilen izoflavonların serum konsantrasyonlarını artırmak ve bu bileşiklerin bir çeşit seçici östrojen reseptör modlatr gibi davranmaları ile menopozda gelişebilecek semptomları önleyebilmek mümkün olabilmektedir (Burke *et al.* 2000).

2.3.4.1.3 Osteoporozda

Östrojen eksikliği ile ortaya çıkan , kemik oluşumundaki azalma ve emiliminin artması sonucunda osteoporoz adı verilen kemik kayıplarının soya izoflavonlarınca azaltılabildiği çeşitli raporlarda ileri sürülmüştür. İzoflavon fitoöstrojenlerin etki mekanizması, kemik yapımından sorumlu olan osteoblast hücrelerinin çoğalmasını uyarması, oksidasyona bağlı hasara karşı bazı hücrelerin korunması ve kemik yıkımında etkili osteoklast hücrelerinin apoptozisinin artmasını içerir (Dixon 2004). Soya ağırlıklı beslenen Asya lkelerinde kalça kırıklarının görülme sıklığı batı ülkelerine oranla %50 daha azdır. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, genisteinin osteoblast hücrelerindeki alkalen fosfataz enzim aktivitesini uyararak kemik oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (Arjmandi *et al.* 2003). Yine ovaryumları çıkarılmış sıçanların diyetlerine soya fasulyesi eklenmesiyle kemik kaybının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Davis *et al.* 1999). Sentetik bir izoflavon olan İpriflavon'un kemik kaybını azaltıcı tedavide uygulanıyor olması da izoflavonların osteoporozdaki etkilerini gösterir niteliktedir. (Messina and Loprinzi 2001).

2.3.4.2 Antikarsinojenik aktivite

İzoflavonca zengin soya bazlı diyetlerin idrardaki izoflavon seviyesi ile insanlardaki göğüs ve prostat kanserlerinden ölüm oranının azaltılması arasında önemli bir ilişki vardır (Dixon 2004). Singapur'da Çinli kadınlar üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, soya tüketiminin doğrudan kanser riskinin azaltılmasında etkili olduğunu ortaya koymuştur (Lee *et al.* 1991). Bu pozitif etki, genetik olmaktan çok soya diyetiyle beslenme ile ilgilidir çünkü Amerika'ya göç eden ve batılı beslenme tarzını seçen Asyalılar da göğüs ve prostat kanseri Asyada kalanlara göre daha yüksek oranda görülmektedir (Dai *et al.* 2002). Japonların idrarlarındaki genistein, daidzein ve ekuol seviyeleri Amerikalı ve Avrupalılarla karşılaştırıldığında soya ürünlerinin izoflavonlarının kanser riskinin azaltılmasında sorumlu etmen olduğu ileri sürülmüştür (Ganry 2002). Bu koruyucu etkiler; tümörün artışının ve tekrar oranının azaltılması, farklılaşmamış lobüllerin farklılaşmış olanlara göre daha hızlı olgunlaşmasını içerir (Cotroneo *et al.* 2002).

Fitosterojenlerin tümör oluşumunda önemli rol oynayan DNA topoizomeras I ve II, tirozin kinaz, ribosomal S6 kinaz, 5 α -redüktaz enzimlerinin etkinliklerini baskıladıkları belirlenmiştir. Ayrıca fitoöstrojenlerin antiproliferatif özellikleri, hücrelerin bölünerek çoğalmasını önler, antianjiyogenetik etki ile de tümör hücrelerinin metastaz yapmalarını azaltırlar (Umland *et al.* 2000).

Fitoöstrojenlerin göğüs, prostat, endometrium gibi hormonal kanser türleri ile kolon, mide, pankreas gibi diğer kanser türlerine karşı koruyucu olabileceği epidemiyolojik, *in vivo*, *in vitro* hayvan ve insan çalışmaları ile gösterilmektedir.

2.3.4.2.1 Göğüs kanseri

Fitoöstrojenlerin etkilerinin araştırıldığı kanser türleri arasında en çok çalışılanıdır. Göğüs kanserine karşı fitoöstrojenlerin koruyucu olabileceğine dair çeşitli dayanaklar vardır. Bunlardan birincisi göğüs kanserinin, Asya ülkelerinde görülme sıklığı batı

toplumlarındakinin ¼'ü kadardır (Bingham *et al.* 1998). İkincisi ise Tamoksifen adlı ilacın tedavide başarı ile kullanılmasıdır. Bir diğer görüşe ise, fitoöstrojenlerin menstural siklusu uzatarak ve maruz kalınan östrojen düzeyinin artırılması yoluyla kanser riskinin azaltılmasıdır. Diyetle eklenen 45 mg izoflavon foliküler fazda geçen süreyi 2-3 gün artırmaktadır. Biokanin A göğüs karsinoma hücrelerinde çok aşamalı aktiviteye sahiptir. 10µg/ml'den az konsantrasyonlarda gelişmeyi teşvik etmekte, 40 µg/ml olan orta düzeyde etkisiz, yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etki yapmaktadır. Bu etkiler ER'ne bağlıdır ve ER mRNA seviyesi, farklı Biokanin A konsantrasyonu içeren hücrelerin artma oranı ile paraleldir.

Tamoksifen göğüs kanseri için yüksek risk taşıyan kadınlarda kimyasal önleyici olarak kullanılan drogdur. Düşük Genistein konsantrasyonu, yapısal olarak ilgili bileşik olan Tamoksifenin ile zıt etkili olabilir. Fitoöstrojenlerin antiöstrojenik özellik göstermelerine dayanarak doğal bir koruyuculuk oluşturduğu düşünülmektedir (Cassidy *et al.* 2000). Genistein göğüs kanseri hücrelerine karşı güçlü büyüme inhibitörü etkisine sahiptir.

2.3.4.2.2 Prostat kanseri

Amerika'da erkeklerde kanserle olan ölümlerde, ikinci sırayı alan prostat kanserinden ölüm ve tekrar oranı ile, yüksek fitoöstrojen alınması arasında ters orantı görülmüştür. Amerika'da 1996-1998 yılları arasında 83 prostat kanserli ve 107 kontrollü çalışmada, kumestrol ve daidzeince zengin diyetin genisteine göre önemli şekilde kanseri azalttığı gözlemlenmiştir (Aldercreutz 1998). İnsan prostat epitel hücrelerinde iyi ve kötü huylu tümör gelişiminde daidzein güçlü inhibitör etki gösterirken, onun metaboliti olan ekuol, mikromolar konsantrasyonlarda bile daha güçlü inhibitör etki gösterir. Daidzeinin ekuole dönüşmesi prostat kanserini önleyici diyetle önemli bir faktördür (Hedlund *et al.* 2003).

Fitoöstrojenlerin steroid metabolizmasında yer alan aromataz, 17-β-hidroksisteroiddehidrogenaz, 5α-redüktaz gibi enzimleri baskılayabilme yetenekleri ve

antikarsinojik özellikleri ile prostat kanserine karşı koruyucu olabildikleri ileri sürülmektedir. Asyalı erkeklerin plazma ve prostatik sıvılarındaki izoflavon seviyesi Avrupa'lı erkeklerden daha yüksektir (Guo *et al.* 2001).

2.3.4.2.3 Diğer kanserler

Genistein ve Biokanin A'nın *in vitro* çalışmalarda insan mide kanser hücrelerinin gelişiminin inhibisyonunda, apoptozisi uyaran temel bileşikler olduğu gözlenmiştir. (Yanagihara *et al.* 1993). Genistein güçlü bir şekilde monoklonal antikora bağlanarak kan kanseri gelişimini engeller (Uckun *et al.* 1995). San Fransisco'da 800 kadın üzerinde yapılan çalışmada izoflavonca zengin diyetin tiroid kanseri riskini azalttığı görülmüştür (Horn-Ross *et al.* 2002).

Kolon kanserinde çok az konsantrasyondaki Genistein, faz II detoksifiye edici enzim kuinon redüktazı teşvik eder (Wang *et al.* 1998).

2.3.4.3 Antioksidan aktivite

Vücutta antioksidatif koruma sisteminin iyi çalışmadığı durumlarda serbest radikallerin vücutta fazlalaştığı görülür. Bu da vücutta bazı hasarlara neden olur. Serbest radikallerin miktarı arttıkça önce yaşlanma hızlanır, hücre ölümü, sonra doku ölümü daha sonra ise beyin damarlarının tahribatına varan hasarlar oluşur (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

38 çalışmanın birarada toplandığı genişçaplı bir araştırmada günlük ortalama 47 gram soya proteini alımının plazma LDL kolesterol düzeyini % 12,9; trigliserit düzeyini % 10 oranında düşürdüğünü ve HDL kolesterol düzeyini % 2 oranında artırdığını göstermektedir.

İzoflavonlar, serbest radikalleri doğrudan yada enzimleri etkileyerek, hücrelerde DNA'nın oksidantlara maruz kalmasını ve hasar görmesini engelleyebilirler. Diyetle

alınan izoflavonlar LDL oksidasyonuna karşı oluşturulan direnci artırarak lipit oksidasyonunu azaltırlar (Djuric *et al.* 2001).

2.3.4.4 Kardiyovasküler hastalıklarda

Kalp damar hastalıklarında önemli bir risk etkeni olan arter elastikiyetinin endojen östrojen düzeyi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çünkü östrojen, kasılacak damarların gevşemesinin sağlanması, kalsiyum girişinin baskılanması, nitrik oksit sentez ekspresyonunun artırılması gibi endotel üzerinde sahip olduğu etkiler yoluyla düz kas hücreleri ve endotel üzerinden arter elastikiyetini etkileyebilir (Lissin and Cooke 2000).

Fitoöstrojenlerin antioksidan özellikleri lipit oksidasyonu ve membran lipit peroksidasyonunu azaltarak koroner kalp hastalığına karşı koruyucu olabilmektedir. Birleşmiş Milletler Besin ve İlaç Örgütü doymuş yağ ve kolesterol yönünden sınırlandırılmış diyetle birlikte günde 25 gram soya proteini tüketiminin kalp hastalığı riskini azaltabileceğini kabul etmiştir (Clarkson 2002).

2.3.5 *T. pratense* L.'de yapılan fitoöstrojenlerin analiz çalışmaları

Besinlerin içerdiği izoflavonların miktar tayinlerinde kromatografik yöntemler kullanılır. Bu yöntemler içerisinde fitoöstrojenlerin bitki ekstraktlarından, vücut doku ve sıvılarından tam olarak ölçümünü sağlayan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) en sık kullanılanıdır. Diğer yöntemler gaz kromatografisi, gaz kromatografi-kütle spektroskopisi (GC-MS), daha basit olarak da ince tabaka kromatografisi ve kağıt kromatografisi şeklinde sıralanabilir (Oomah 2002).

Ayrıca *in vitro* östrojen testleri, idrar tahlilleri, mikrotitrasyon tahlilleri (Garrett *et al.* 1999), insan östrojen reseptörleri ile bağlanmayı bildiren genleri kullanan analiz yöntemleri de bulunmaktadır (Miller-Martini *et al.* 2001).

Cesar *et al.* (2006), soyada fazla miktarda bulunan aglikonlar olan genistein, daidzein ve glisitein ters fazlı HPLC ile analiz etmişlerdir. Asit hidrolizi ile ekstraksiyonu sağladıktan sonra %0.1 asetik asitli su ve metanol çözücülerini 52:48 oranında ve pH'ı 3.7 olacak şekilde kullanarak akış hızı dakikada 1ml olacak şekilde HPLC'de izoflavonların miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Hutabarat *et al.* (2000), dört ayrı kolonda çeşitli solvanlar kullanarak soyada, daidzein, genistein, formononetin, biokanin A ve kumestrol ayırımını yapmışlardır. 24 dakikada izoflavonların ve kumestrolün ayırımını asetonitril:su (33:67) hareketli fazı ile sağlamışlardır. Soyada, tofuda ve soya sütünde genistein ve daidzein miktarlarını, asit hidrolizi uygulayarak (pH:0.6) ve asit hidrolizi uygulamayarak (pH:7) tayin etmişlerdir. Asit hidrolizi uygulandığında bu miktarın çok fazla olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Wu *et al.* (2003), *T. pratense*'de ve diğer *Trifolium* türlerinde HPLC ile birlikte kütle spektrometresi kullanarak izoflavonların ayırımını gerçekleştirmişlerdir. *T. pratense*'de 9 izoflavon aglikonu, 8 glikozit ve 14 glikozit malonat olmak üzere 31 izoflavon belirlemişlerdir. *T. repense* L., *T. hybridum* L. ve *T. campestre* Schreber'de bazı izoflavonların ayırımını ilk kez yapmışlardır. Bitkilerin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarını kullanmışlar ve asit ile muamele ederek ekstre etmişlerdir. Daidzein, formononetin, genistein, psödobaptigenin, glisitein, kalikosin, prunetin, biokanin A, irilon ve pratensein aglikonlarının ayırımını ters fazlı HPLC'de 40 dakikada gerçekleştirmişlerdir.

Delmonte *et al.* (2006), ekstreleri Avrupa ve Amerika'da pek çok diyeteye eklenen *Glycine max.*, *T. pratense* ve *Pueraria lobata*'nın izoflavonlarının ayırımını çalışmışlardır. Soyada genistein, daidzein ve glisitein; *T. pratense*'de formononetin ve biokanin A; *Pueraria lobata*'da puerarin ve daidzein'in fazla miktarda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Örnekleri oda sıcaklığında MeCN:su (50:50) ile ekstre edip, asit ve bazla hidroliz ettikten sonra analiz etmişlerdir. Tüm örneklerle 2-metoksiflavon ve 6-metoksiflavon eklenmiştir. Daidzein, glisitein, genistein, biokanin A, formononetin,

puerarin, kalikosin, pratensein, psödobaptigenin ve prunetini fotodiyot dedektöre sahip HPLC’de belirlenmiştir.

Kledjus *et al.* (2001), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ile iki boyutlu sıvı faz ekstraksiyonu (2D-SPE) kullanarak *T. pratense*’de 14 izoflavon glikozit malonat ve 6 asetil glikozitin ayrımını gerçekleştirmişlerdir.

Krenn *et al.* (2002), *T. pratense*’nin içeriğindeki izoflavonları HPLC ile belirlemişlerdir. Ters fazlı kolonda sülfirik asitli su (pH: 2.7) ve asetinitrili hareketli faz olarak kullanmışlardır. Gradient yöntemi uyguladıkları çalışmalarında 254 nm’de genistein, daidzein, formononetin, biokanin A ve 6-metoksiizoflavonun miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir.

2.3.6 *T. pratense* L. ile yapılan doku kültürü çalışmaları

Kasparova *et al.* (2006) *T. pratense*’de kallus ve süspansiyon kültürü üzerinde çalışmışlar, 2 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L BAP içeren GB5 ortamı kullanmışlardır. Kallus kültürünü 29-43 günde alt kültüre alırken, süspansiyon kültürlerinde bu süre 16-23 güne düşmüştür. İTK ve HPLC analizleri ile formononetin içeriğine bakmışlardır.

Phillips and Collins (1979), çalışmalarında 5 tane *T. pratense* çeşidi üzerinde bitki oluşumu ve bazı yem bitkilerinde *in vitro* doku kültürü çalışması gerçekleştirmişlerdir. *T. pratense*’nin (2n=14) ‘Altaswede’, ‘Arlington’, ‘Kenstar’, ‘Redman’ ve ‘Tensas’ çeşitlerini kullanmışlar ve aynı zamanda *Medicago sativa* L., *Glycine max* L. ve *Canavalia ensiformis* L. gibi türlerin kültürü için uygun ve destekleyici bir ortam geliştirmişlerdir. Çayır üçgülü için kültürel farklılıklar belirlenmiş ve olgun ya da olgunlaşmamış bitkilerin çiçek organları (üreme organları) ve vejetatif eksplantlarından rutin bir kallus kültürü kurmak için uygun bir ortam (PC-L2) bildirmişlerdir. Bu yeni ortamı sıvı kültür ortamına çevirerek hızlı hücre bölünme oranı veren hücre süspansiyon kültürlerini kurmuşlardır. Kallus kültürleri organogeneze teşvik edilmiş ve bu 5 çeşitte kallusdan bitki rejenerasyonu başarılıdır. Fakat bu çeşitler eş oranda rejenerasyona

cevap vermemişlerdir. Rejenere olan bitkiler olgunlaşınca kadar yetiştirilmiş ve verimli (fertil) hale gelmiştir 3-AP (3-aminopiridin) denenmiş ve gelişimi etkileyebilecek özellikte olduğu anlaşılmıştır. Çayır üçgülü yetiştirme programlarında doku ve hücre kültürü tekniklerinin kullanılmasının mümkün olduğunu bildirmişlerdir. *T. pratense*'nin hipokotil, epikotil, kotiledon, ilk yaprak ve apikal meristem eksplantlarında kallus geliştirmek amacıyla SH, GB5, MS ve PC-L2 ortamlarını kullanmışlar ve PC-L2 ortamının en iyi sonuç verdiğini gözlemişlerdir. Kallus kültürü denemelerinde 0,06 mg/L Picloram ve 0,1 mg/L BAP kullanmışlardır.

Beach and Smith (1979) ise *T. pratense* ve *T. incarnatum* L.'de hipokotil eksplantlarından mikroçoğaltım gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla ilk olarak eksplant ekiminde en iyi sonucu alabilmek amacı ile MS, Blaydes, SH ve Tiyamin ve KIN oranları bakımından farklılık gösteren GB5 ortamlarını kullanmışlardır. Bu ortamlarda en iyi sonucu 11 mg/L NAA, 10 mg/L 2,4- D ve 10 mg/L KIN içeren GB5 ortamında almışlardır ve bu ortamı kullanmışlardır. Daha sonra oluşan kallusları 28-35 gün sonunda 11 mg/L NAA, 15 mg/L Adenin ve 20 mg/L Tiyamin içeren ortama transfer etmişlerdir ve sürgün oluşumunu bu ortamda elde etmişlerdir. Kök oluşumunu uyarmak amacıyla ise yalnızca 1,1 mg/L NAA içeren GB5 ortamı kullanmışlardır. Tüm aşamalar bakımından SH ortamı da GB5 kadar başarılı olmuştur. Farklılaşan bitkiler steril edilmiş ve nemli toprakta 18°C'de 10-14 gün tutulduktan sonra bahçeye aktarılmıştır. Rejenere edilen bitkilerin verimli ve normal kromozom sayısına sahip oldukları gözlenmiştir.

Wang and Holl (1988) *T. pratense*'nin Altaswede ve Norseman çeşitlerini somaklonal varyasyon ve bitki rejenerasyonu bakımından inceleyerek doku kültürü çalışmışlardır. 20 mg/L Tiyamin, 2 mg/L NAA ve 2 mg/L AP hormonlarını içeren GB5 ortamında hızlı kallus artışı ve köklenme gözlemişlerdir. Daha sonra sürgün artırılması amacıyla 2 mg/L 2,4- D, 2 mg/L BAP ve 2 mg/L AP içeren L2 ortamı kullanmışlar ve bunu 0,05 mg/L NAA ve 0,5 mg/L KIN içeren ortamda alt kültüre almışlardır. Daha sonra ise embriyonik kalluslar oluşturmak amacıyla 0,002 mg/L Picloram ve 0,2 mg/L BAP içeren L2 ortamında alt kültüre almışlardır. Organogenezis yoluyla bitki rejenerasyonunu sağlamak amacıyla çoklu sürgünler kullanmışlardır. Farklı

rejenerasyona sahip yeni bitkileri kromozom sayıları, morfolojileri ve birçok biyokimyasal özellikleri bakımından incelemiştir.

Çölgeçen (2005), tetraploid *T. pratense*'de kallus kaynaklı organogenez ve sonrasında mikroçoğaltım gerçekleştirmiştir. Doku kültürü ortamı olarak MS ve PC-L2 ortamları ile BAP ve NAA hormonlarının çeşitli konsantrasyonlarını kullanmıştır. Hipokotil, epikotil, kotiledon, ilk yaprak ve apikal meristem eksplantlarını kullandığı çalışmada en iyi kallus ve sürgün oluşumunu apikal meristem eksplantlarında elde etmiştir. Köklenme elde edilen fidelerde organogenez gerçekleştirilmiş ve klon bitkiler toprağa geçirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma, 2004-2006 yılları arasında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütüldü.

Analiz aşaması ise Ankara ve Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Ana Bilim Dalları'nda gerçekleştirildi.

3.1 Materyal

3.1.1 Doku kültürü aşaması

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak Elçi (1982) tarafından Erzurum'un Tortum yöresinden alınan $2n = 4x = 28$ kromozomlu bir bitki olduğu belirlenen doğal tetraploid *T. pratense* L. (Çayırüçgülü, Kırmızı çiçekli tırfıl) bitkisinin E2 çeşidi kullanıldı. Doğal tetraploid *T. pratense* L. diploid çeşitlere göre vejetatif özellikleri bakımından üstün bir formdur (Elçi 1982).

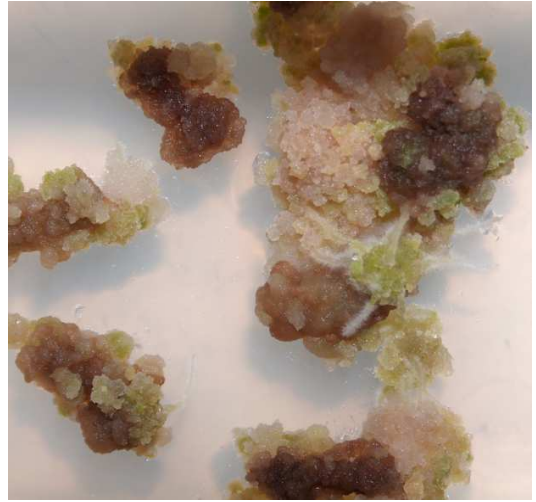
Doğal tetraploid *T. pratense* L. E2 çeşidi A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü deneme bahçelerinde yetiştirilmektedir. Bitki Mayıs ayı sonunda ve Haziran ayı başında çiçeklenmekte ve Temmuz ayında kuruyan çiçekler toplanarak tohum elde edilmektedir. 2004 ve 2006 yıllarında bu bitkilerden elde edilen tohumlar aseptik şartlarda çimlendirilmiş ve oluşan aseptik fideler doku kültürü çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.1.2 Analiz aşaması

İTK ve HPLC analizinde *T. pratense* L. bitkisinin diploid ve doğal tetraploid formlarının kurutulmuş çiçekleri ile tetraploid *T. pratense* L.'den alınan hipokotil eksplantlarının farklı büyüme düzenleyicileri içeren, iki farklı ortamda gelişmiş 1., 2. ve 3. alt kültür kallusları kullanılmıştır (Şekil 3.1).



a



b

Şekil 3.1.a.Tetraploid *T. pratense*'nin çiçeği, b. 3. alt kültür kallusu

3.1.2.1 Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kieselgel 60 F254 0.2 mm, Merck 5554 (İTK hazır plak)

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Lichrospher 100 RP-18, 5µm partikül büyüklüğünde (250 mm x 4.6 mm)

3.1.2.2 Kromatografik çalışmalarda kullanılan solvan sistemleri

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Sistem 1: Kloroform- Aseton- Formik asit (75:16,5:8,5) (S1)

Sistem 1: Kloroform-Etil asetat (1:1) (S2)

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sistem 1: % 0.1 Asetik asitli su : Metanol (52:48)

Sistem 2: % 0.1 Formik asitli su : % 0.1 Formik asitli Asetonitril (% 70 Su
: % 30 Asetonitril)

Lekelerin Belirlenmesi

UV 254/366 nm

Amonyak buharı (NH₃-UV₃₆₆)

Cihazlar

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HP Agilent 1100 Serisi

Foto-diyot array dedektör (254-265 nm)

3.2 Yöntem

3.2.1 Doku kültürü

Çalışmada *T. pratense* tohumları hormon içermeyen Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında *in vitro* olarak çimlendirildi. Daha sonra elde edilen aseptik fidelerin hipokotil kısımlarından alınan eksplantlardan kallus oluşturuldu. Denemelerimizde en iyi kallus oluşumunu sağlayabilmek amacıyla Leguminosae familyasında çalışılmış olan iki farklı temel besin ortamı ve çeşitli oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri kullanıldı. Bu ortamlar (Çizelge 3.1):

1. Murashige ve Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962)
2. Phillips ve Collins (PC-L2) (Phillips and Collins 1979)
3. Gamborg B5 (B5) (Gamborg 1976)

Çizelge 3.1 Kullanılan MS, PC-L2 ve B5 ortamlarının içerikleri

MS ORTAMI (mg/l)		PC-L2 ORTAMI (mg/l)		GB5 ORTAMI (mg/l)	
NH ₄ NO ₃	1650	NH ₄ NO ₃	1000	KNO ₃	2500
CaCl ₂ .H ₂ O	440	KNO ₃	2100	(NH ₄) ₂ SO ₄	134
MgSO ₄	370	KH ₂ PO ₄	325	MgSO ₄ .7H ₂ O	250
KH ₂ PO ₄	170	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	85	CaCl ₂ .2H ₂ O	150
KNO ₃	1900	CaCl ₂ .2H ₂ O	600	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150
		MgSO ₄ .7H ₂ O	435		
H ₃ BO ₃	6.2	H ₃ BO ₃	5	H ₃ BO ₃	3
KI	0.83	KI	1	KI	0,75
MnSO ₄ .4H ₂ O	16.8	MnSO ₄ .H ₂ O	15	MnSO ₄ .H ₂ O	10
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.4	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	ZnSO ₄ .7H ₂ O	5	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1	CoCl ₂ .6H ₂ O	2.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1	CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.2	FeSO ₄ .7H ₂ O.EDTA	25	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.2
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8			FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Miyo-inositol	100	Miyo-inositol	250	Miyo-inositol	
Tiyamin-HCl	0.1	Tiyamin-HCl	2.0	100	
Nikotinik asit	0.5	Pridoksin-HCl	0.5	Tiyamin-HCl	10
Pridoksin-HCl	0.5			Nikotinik asit	1
				Pridoksin-HCl	1
Sakaroz	20000	Sakaroz	25000	Sakaroz	20000
Agar	8000	Agar	8000	Agar	8000
pH = 5.8		pH = 5.8		pH = 5.8	

3.2.1.1 Besin ortamının hazırlanması

3.2.1.1.1 Stok çözeltiler

Besin ortamı hazırlanırken ortamın içerdiği maddeler hassas terazi kullanılarak tartıldı. Düşük miktarların tartılmasının zorluğu ve hassasiyetin azalması nedeni ile stok çözeltileri hazırlandı. Böylelikle zaman kaybının da önüne geçilmiş olundu. Makro elementler için 10x'lik; mikro elementler, vitaminler ve demir tuzları için 100x'lik stok çözeltiler hazırlandı. Stok çözeltiler renkli cam şişelere konup etiketlenerek +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Besin ortamı hazırlarken stokların gerçek değerlerinin ortamda bulunması için seyreltme yapıldı. Maddelerin normal konsantrasyonun 10 veya 100 katı şeklinde hazırlanan stok çözeltilerden uygun hacimlerde alınarak ortama katıldı. Çalışmalar sırasında hazırlanan 1 litre besin ortamına % 2 (20 g/l) sakkaroz ve % 0.8 (8 g/l) agar ilave edildi.

Stok çözeltilerden alınacak miktarlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Slack and Tufford 1995).

İstenilen stok hacmi = (istenilen konsant. x ortam hacmi) / (stok solüsyonun konsant.)

MS Ortamının Stok çözeltilerin hazırlanması

Majör tuz stok çözeltisi (10x), (g/l):

Amonyum nitrat (NH ₄ NO ₃)	16.5
Kalsiyum klorür (CaCl ₂ . 2H ₂ O)	4.4
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	3.7
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	1.7
Potasyum nitrat (KNO ₃)	19

1 litrelik balon joje içine 700 ml distile su koyulduktan sonra maddeler sırasıyla tartılarak balon jöjeye eklendi. Homojen dağılımı sağlamak amacıyla çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde devamlı karıştırıldı ve distile su ile ölçü çizgisine kadar (1 litreye) tamamlandı. 1 litrelik besin ortamı için önceden hazırlanan bu majör tuz stoğundan 100 ml alındı.

Majör tuz stokları içindeki kimyasal maddeler çökelti oluşturma eğiliminde olduğundan dayanıksızdır. Majör stoğun sık sık hazırlanması kullanılırken içinde çökelti oluşup oluşmadığının kontrol edilmesi, besin ortamının kalitesi için gereklidir.

Minör tuz stok çözeltisi (100x), (mg/l) :

Borik asit (H_3BO_3)	620
Potasyum iyodür (KI)	83
Mangan sülfat ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	1680
Sodyum molibdat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	25
Çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	860
<hr/>	
Kobalt klorür ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	2.5
Bakır sülfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	2.5

Minör tuz stokları da majör tuz stoklarına benzer şekilde 1 litrelik balon jöjelerde hazırlandı. Çözelti içerisindeki kobalt klorür ve bakır sülfatın miktarlarının düşük olmasından dolayı bu iki madde ayrı bir stok olarak hazırlandıktan sonra minör stok çözeltisine ilave edildi. Bunun için 25 mg kobalt klorür ve 25 mg bakır sülfat tartılıp, 100 ml distile suda çözüldü. Bu çözeltiden 10 ml alınıp önceden hazırlanan minör stok çözeltisine ilave edildi. Minör tuz stoğu bu şekilde hazırlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı. 1 litrelik besiyeri hazırlanırken bu minör tuz stok çözeltisinden 10 ml alındı.

Minör tuz stokları majör tuz stoklarından daha dayanıklı olduğundan sık sık hazırlanması gerekmemektedir.

Demir stok çözeltisi (100x), (g/l) :

Demir sülfat ($\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.78
Sodyum EDTA (Na_2EDTA)	3.72

1 litrelik balon jøjeye 700 ml distile su koyulduktan sonra balon joje manyetik karıştırıcı üstüne koyuldu. Maddeler tartılıp balon joje içine katıldı ve erimeleri sağlandı. Daha sonra karışım distile su ile 1 litreye tamamlandı. 1 litrelik besiyerinin hazırlanmasında demir stoğundan 10 ml alındı. Hazırlanan demir stokları buzdolabında ve renkli şişelerde saklandı. Işık karşısında dayanıksız olması nedeni ile demir stoğunun karanlıkta kalmasına dikkat edildi.

Vitamin stok çözeltisi (100x), (mg/l) :

Tiyamin HCl	10
Nikotinic asit	50
Piridoksin HCl	50

Maddeler sırayla tartıldı. 100 ml lik balon joje içine yaklaşık 70 ml distile su koyularak manyetik karıştırıcı kullanılarak maddelerin tam olarak çözünmeleri sağlandı. Karışım distile su ile 100 ml ye tamamlandı. 1litrelik besin ortamının hazırlanırken bu vitamin stoğundan 1 ml alındı.

PC-L2 ve Gamborg B5 ortamlarının hazırlanması

Çizelge 3.4'de gösterilen sıra ve miktarlarda madde kullanılarak hazırlanan stok çözeltilerden uygun hacimler alınarak PC-L2 ve GB5 ortamları hazırlandı, pH ayarı yapıldıktan sonra agar eklendi.

3.2.1.1.2 Bitki büyüme düzenleyicileri

Tohumların *in vitro* çimlendirilmesinde ortama büyüme düzenleyicisi katılmadı. Kallus oluşumu çalışmalarında 6-Benzilaminopürin (BAP) , Naftalen asetik asit (NAA), Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve Kinetin farklı konsantrasyonlarda besin ortamlarına ilave edildi.

Naftalen asetik asit (NAA) stok çözeltisi (1mg/ ml)

250 mg Naftalen asetik asit tartılıp 400 ml'lik ölçülü bir beherde 5 ml distile su içinde ezilerek, çözülmüneye kadar damla damla 1M NaOH ilave edildi. Maddenin tamamı çözüldükten sonra çözelti distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Etiketlenerek koyu renkli şişede buzdolabında saklandı.

6-Benzilaminopürin (BAP) stok çözeltisi (1 mg/l)

250 mg 6-Benzilaminopürin tartılıp 400 ml'lik ölçülü bir beherde 5 ml distile su içinde ezilerek, 1 M HCl hormon tamamen eriyene kadar damla damla ilave edildi. Çözelti distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Etiketlenerek koyu renkli şişede buzdolabında saklandı.

Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) stok çözeltisi (1 mg/l)

250 mg Diklorofenoksiasetik asit tartılıp 400 ml'lik ölçülü bir beherde 5 ml distile su içinde ezilerek, çözülmüneye kadar damla damla 1M NaOH ilave edildi. Maddenin tamamı çözüldükten sonra çözelti distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Etiketlenerek koyu renkli şişede buzdolabında saklandı.

Kinetin stok çözeltisi (1 mg/l)

250 mg Kinetin tartılıp 400 ml'lik ölçülü bir beherde 5 ml distile su içinde ezildikten sonra hormon tamamen eriyene kadar damla damla 1 M HCl ilave edildi. Çözelti distile

su ile 250 ml'ye tamamlandı. Etiketlenerek koyu renkli şişede buzdolabında saklandı. Çözeltinin 1 ml'sinde 1 mg kinetin bulunmaktadır. 1 litrelik MS ortamına 1 mg/l kinetin ilave etmek için stok çözeltisinden 1 ml alındı.

3.2.1.1.3 pH ayarı

Besin ortamının pH ayarı agar ilave edilmeden önce yapıldı. Önceden hazırlanmış olan ve geniş ağızlı erlenmayere koyulan besin ortamı, manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli karıştırılarak ve 1 M HCl ile 1 M NaOH damla damla ilave edilerek optimum pH değerine ayarlandı. Kullanılan ortamın pH'sı literatür taramalarıyla tespit edilen, doku külürü çalışmalarında en iyi sonucun ve verimin alındığı 5.8'e ayarlandı.

3.2.1.1.4 Sterilizasyon

Denemeler öncesinde çalışma yapılacak laboratuvarın alet ve ekipmanların sterilizasyonu yapıldı. Materyal olarak kullanılan bitkinin tohumlarının yüzey sterilizasyonu ve ekim yapılacak olan kabinin bulunduğu ekim odasının da temizliği ve sterilizasyonu yapıldı.

Besin ortamının sterilizasyonu

Hazırlanmış olan besin ortamları otoklavda 121° C'de, 1.2 bar basınç altında 15 dakika steril edildi.

Diğer malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmaların ekim safhasında, tohumları süzmek amacıyla kullanılacak olan kurutma kağıdı (kare şeklinde kesilip dörde katlanmış) ve bir adet küçük cam huni, 1000 ml'lik boş beher içine koyuldu. Eksplant ekimi sırasında trimleme yapılacak olan kurutma kağıtları petri içine sığacak şekilde kesildikten sonra bir petriye yerleştirildi. Yüzey sterilizasyonu için kullanılacak olan distile su, ihtiyaç duyulduğu miktarda erlenmayerlere konulup ağızları pamuk tıkaçla kapatıldı. Tüm bu malzemeler ile metal

malzemeler (bisturi, pens gibi) alüminyum folyo ile sarıldı. Hepsi birden yüzey sterilizasyonu için kullanılacak olan metal kapaklı cam kavanozlar ile birlikte otoklavda steril edildi. Petriler de alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra ya etüvde 160 °C’de 2 saat bırakılarak kuru sterilizasyonla veya otoklavda buhar sterilizasyonu ile steril edildi.

Ekim odasının temizliği ve sterilizasyonu

Ekim işleminin yapılacağı kabinin bulunduğu oda, odadaki ekipmanlar (masa, tabure vs.) ve laminar kabin antiseptik bir çözelti olan %1’lik zefiranla veya % 10’luk NaOCl ile silindi. Bu işlemden sonra ekim odasında bulunan laminar kabinin tüm yüzeyleri % 96’lık etanol ile silinerek dezenfekte edildi. Dezenfeksiyon işleminden sonra, ekimde kullanılacak steril metal ve cam malzemeler kabine yerleştirildi. İleri sterilizasyon için kabin içindeki UV-C lambası 24 saat açık bırakıldı.

Ekim odasına girilmeden önce önlük giyildi, galoş ve maske takılarak eller alkolle silindikten sonra steril cerrahi eldiven giyildi. Ellerin sterilizasyonu, ekim işlemi boyunca aralıklarla alkol püskürtülerek yapıldı.

Ekim odasında yapılan tüm sterilizasyon işlemlerinin yanı sıra ekim anında, kullanılan bisturi, pens gibi metal malzemeler her kullanışta % 96’lık alkole batırılıp bek alevinden geçirildi.

Tohum için yüzey sterilizasyonu

Aseptik fide elde edebilmek için *in vitro* tohum çimlendirmede, tohumlar önce %96’lık etil alkol içinde manyetik karıştırıcı üstünde 1 dakika süresince karıştırıldı. Alkolden alınan tohumlar %10’luk sodyum hipoklorid (ACE marka ticari çamaşır suyu) ile 10 dakika sterilize edildi. Steril kabin içinde 3 kere steril su ile yıkandı. Sert tohumlar otoklavda sterilize edilmiş zımpara ile zımparalandı.

3.2.1.1.5 Ortamların petrilere dökülmesi ve ekim yapılması

Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilen besin ortamları otoklavdan çıkarıldı ve vücut sıcaklığına yakın bir sıcaklığa düşene kadar bekletildi. Böylece ortam katılaştırken meydana gelen buharlaşma ile ortaya çıkacak olan serbest suyun oluşması önlendi.

Steril ortamlar ve petrilere, ekim odasına alındı. Ortamlar, steril laminar kabin içinde, steril petrilere döküldü. Ortamların petrilere döküm işlemleri tamamlandıktan sonra petrilere üstüne ortamın adı ve varsa önemli özellikleri çıkmayacak bir biçimde yazıldı. Petrilere dökülen besin ortamlarının iyice katılaşması ve olası kontaminasyonların ekim yapılmadan önce görülebilmesi için 24 saat bekletildi.

3.2.1.1.6 Tohum ve eksplantların ekimi

Ekime hazır steril edilmiş tohumlar steril pens yardımıyla ekildi. Ekim yapılırken her petriye 15-20 tohum ekildi. Ekim işlemi bittikten sonra petrilere kenarları streç filmle sarıldı.

Ekilen tohumlar çimlenerek, 15. günde ilk üç parçalı yaprağa sahip fideleri oluşturdu. Bu fidelerden alınan hipokotil eksplantları hazırlanan ortamlara ekildi. Fidelerin steril olması nedeniyle ekim yapılırken eksplant sterilizasyonu yapılmadı. Alınan hipokotil eksplantları yaklaşık 1 cm uzunluğundaki parçalar halinde ve her petride 6-7 adet olmak üzere ortama ekildi. Ekim yapılırken eksplantların birbirine çok yakın olmamasına, besiyerine batırılmamasına ve dengeli dağılmalarına dikkat edildi. Ekim işlemi bittikten sonra petrilere kenarları streç filmle sarıldı.

3.2.1.2 Kallus oluşumu için inkübasyon

İnkübasyon için fotoperiyot 16/8 saat ışık şiddeti 3000 lux ve ortam sıcaklığı 25±1°C olarak ayarlandı. 26-28. günde oluşan kalluslar alt kültüre alındı. Tüm denemeler iki kere tekrarlandı.

3.2.2 Kimyasal Analiz

3.2.2.1 Metanollü ekstrenin hazırlanması

T. pratense L. bitkisinin diploid ve doğal tetraploid formlarının çiçek kısımları 400 mg tartıldı. Liyofilize edilen hipokotil kallusları da 100-400 mg olarak tartıldı. Tartılan numuneler havanda toz edildi. Toz edilmiş numuneler 50 ml'lik erlene konuldu ve üzerine 5 ml % 80'lik metanol ve 1 ml 2M HCl ilave edildi. Numuneler 10 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra 80 dakika 80°C'de su banyosunda bekletildi. Filtre kağıdından süzöldükten sonra % 80'lik metanolla 10 ml'ye tamamlandı.

3.2.2.2 Standart (izoflavon) çözeltilerinin hazırlanması

Standart maddelerinin her birinden (formononetin (Fluka), biokanin A (Fluka), genistein (Fluka), daidzein (Fluka)) 10'ar mg tartıldı. Balonjojede 10 ml'ye tamamlandı. Her bir standarttan 1mg/ml çözelti elde edilmiş oldu. Bu çözeltilerin her birinden 1'er ml alınarak elde edilen karışım 10 ml'ye tamamlandı. Böylelikle 0,1 mg/ml formononetin, biokanin A, genistein, daidzein içeren çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden sırasıyla 1, 1,5, 2 ve 3 ml alınarak balonjojede 10 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltilerden 1 ml'lik olanından yine 1 ml alınıp 10 ml'ye tamamlanarak dilüsyonlar elde edildi.

3.2.2.3 İTK analizi

Numuneler eşit dilüsyonlarda, kılcal cam borularla, tatbik miktarı UV ışık altında kontrol edilerek Kieselgel 60 F254 hazır plaklara tatbik edildi. Yürütme iki farklı solvan sistemi kullanılarak yapıldı. Belirteç olarak UV₃₆₆ ve amonyak buharı kullanıldı.

3.2.2.4 HPLC analizi

Standart ve numune çözeltilerinden hazırlanan uygun dilüsyonlar filtrelerden geçirildi ve 2 ml'lik viallere konuldu. Örnekler kolona uygulanmadan önce ultrasonik banyoda degaze edildi. 10µl'lik miktarlarda, hassas olarak her örnek için en az 3 defa enjeksiyon

yapıldı. Elde edilen piklerin alanları (y) konsantrasyona (x) karşılık grafiğe geçirildi. Çizilen grafiğin denklemi ($y=mx+n$) “Mikrolocal Origin” programında “Lineer Regresyon” yöntemine uygun olarak elde edildi.

Cihaz : HP Agilent 1100 Serisi

Kolon : Lichrospher 100 RP-18, 5µm partikül büyüklüğünde (250 mm x 4.6 mm)

Solvan sistemi : % 0,1 Formik asitli su : % 0,1 Formik asitli Asetonitril (% 70 Su : % 30 Asetonitril) (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2 Gradient yöntemine göre solvan kullanımı

Zaman	% 0,1 Formik asitli Su	% 0,1 Formik asitli Asetonitril
0	70	30
30	60	40
40	50	50

Akış hızı : 1,5 ml/ dakika

Dalga boyu : UV 265 nm

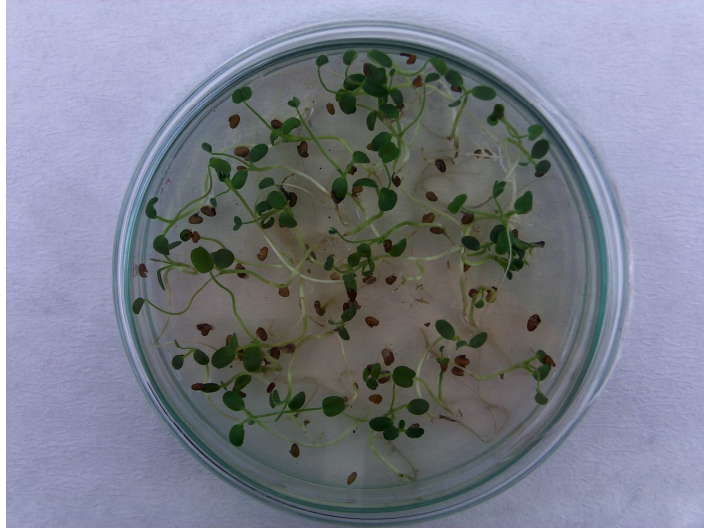
Kolon basıncı : 179-181 bar

Enjeksiyon hacmi: 10 µl

4. BULGULAR

4.1 Kallus Oluşturma ile İlgili Bulgular

Tohumların ekildiği hormonsuz MS ortamında 15 günün sonunda oluşan ilk üçlü yaprağı çıkmış olan aseptik fidelerin (şekil 4.1 ve 4.2) hipokotilleri eksplant olarak kullanıldı.



şekil 4.1 Eksplant kaynağı olarak kullanılan 15 günlük aseptik fideler



şekil 4.2 Hormonsuz MS ortamında gözlenen üçlü kotiledon yapısı

Denemelerimizde en iyi kallus oluşumunu sağlayabilmek amacıyla Leguminosae familyasında çalışılmış olan MS, PC-L2 ve Gamborg B5 besin ortamları ve bu ortamlarda da çeşitli oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır.

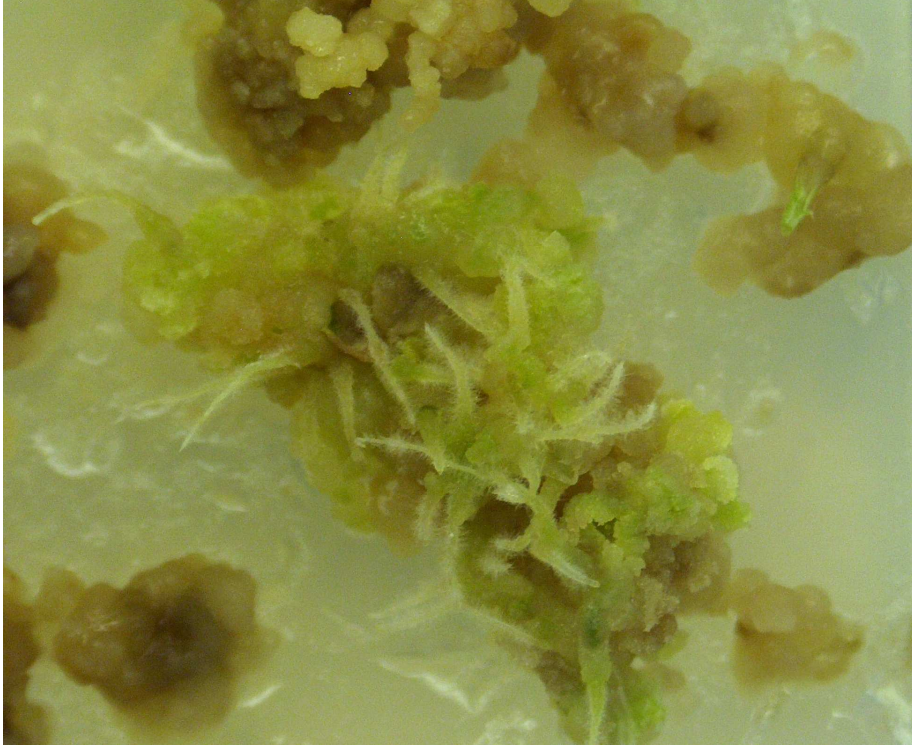
MS ve PC-L2 ortamlarında yapılan ön çalışmalarda PC-L2 ortamı MS'e göre daha iyi sonuç verdiği için MS ortamından vazgeçildi.

PC-L2'de dört farklı bitki büyüme düzenleyici karışımı ve Gamborg B5'te de bir karışım çalışıldı (Çizelge 4.1). Bu karışımlar; PC-L2 ortamında 0,5 mg/L BAP, 5 mg/L NAA (**P1**); 2 mg/L BAP, 1 mg/L NAA (**P2**); 0,06 mg /L 2,4-D, 0,03 mg /L NAA, 0,1 mg /L BAP (**P3**) ve 0,06 mg /L 2,4-D, 0,1 mg /L BAP (**P4**) ve Gamborg B5 ortamında 11 mg /L NAA, 10 mg /L 2,4-D 10 mg /L KIN (**B5**) içermektedir.



Şekil 4.3 P1 ortamına ekilen 20 günlük eksplantlarda oluşan kallus

Bu ortamlara ekilen, 0.002-0.0025g ağırlığında ve yaklaşık 1cm uzunluğundaki hipokotil eksplantlarında 6. günde kallus oluşumu başladı. Gelişen kalluslar (Şekil 4.3) 26-28 günde bir olacak şekilde 3 kez alt kültüre alındı. Gram olarak kallus artışı ile ilgili bulgular Çizelge 4.1 ve Şekil 4.5 de verilmektedir. GB5 ortamında koyu sarı ve beyaz renkte mukus benzeri yumuşak yapıda kalluslar oluşurken, diğer ortamlarda yeşil, beyaz, kahverengi, koyu ve açık sarı renklerde parçalanabilir karakterli kalluslar oluştu. Yeşil renkli kallusların daha sert yapıda olduğu görüldü. P1 ortamında 1. alt kültürden itibaren bazı kalluslarda hava kökü oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.4).

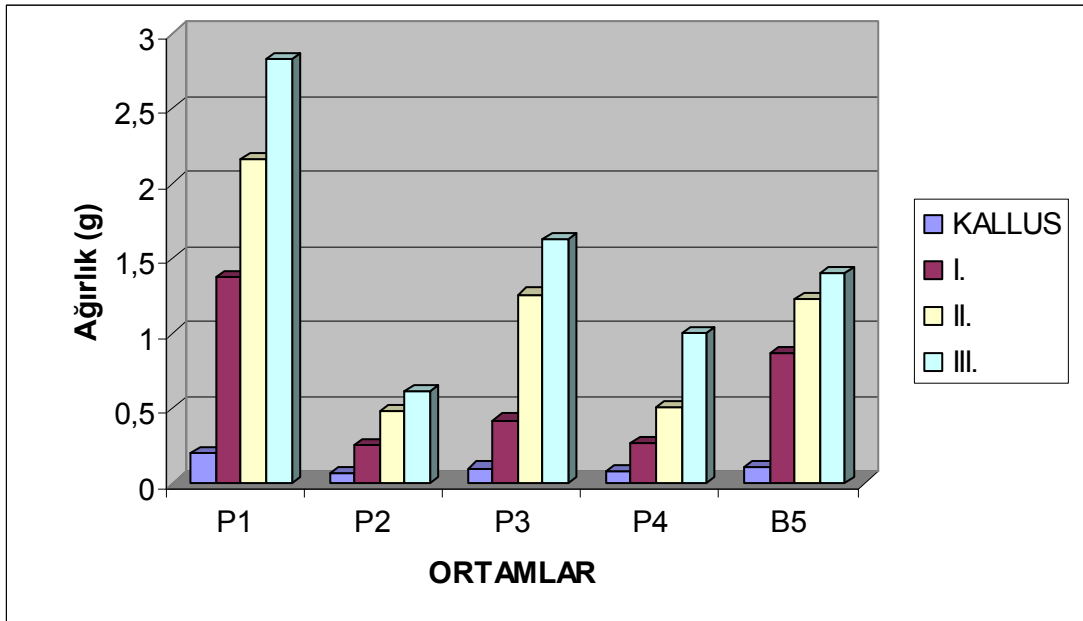


Şekil 4.4 P1 ortamında gözlenen hava kökleri

Bu ortamlardaki kallus gelişimlerini kıyaslayabilmek amacıyla istatistik programları kullanıldı. Kallus gelişimi açısından; en iyi bitki büyüme düzenleyicisini içeren ortamını belirlemek amacı ile Duncan Testi, ortamlar arasındaki benzerlik ve ayrılıkları belirlemek amacı ile Student –T Testi yapıldı. Bu veriler Çizelge 4.1’de görülmektedir.

Çizelge 4.1 PC-L2 ve Gamborg B5 ortamlarında, kallusların g cinsinden ağırlık artışı

ORTAMLAR	Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)		KALLUS	ALT KÜLTÜR		
				I.	II.	III.
PC-L2	0,5 BAP 5 NAA	P1	0,2± 0,0087 ^b	1,37± 0,120 ^b	2,16± 0,566 ^b	2,83±0,591 ^{ab}
	2 BAP 1 NAA	P2	0,07± ,0186 ^a	0,25± 0,045 ^a	0,48± 0,126 ^a	0,61± 0,009 ^a
	0,06 2,4-D 0,03 NAA 0,1 BAP	P3	0,1± 0,0076 ^a	0,42±0,044 ^a	1,26±0,078 ^a	1,63± ,426 ^{ab}
	0,06 2,4-D 0,1BAP	P4	0,082± ,022 ^a	0,27±0 ,094 ^a	0,51± 0,178 ^a	1,0 ± 0,366 ^{ab}
Gamborg B5	11 NAA 10 KIN 10 2,4-D	B5	0,11± 0,017	0,87± 0,161	1,23±0 ,013	1,4± 0,5067



Şekil 4.5 Kallusların P ve B5 ortamlarında g olarak ağırlık artışı

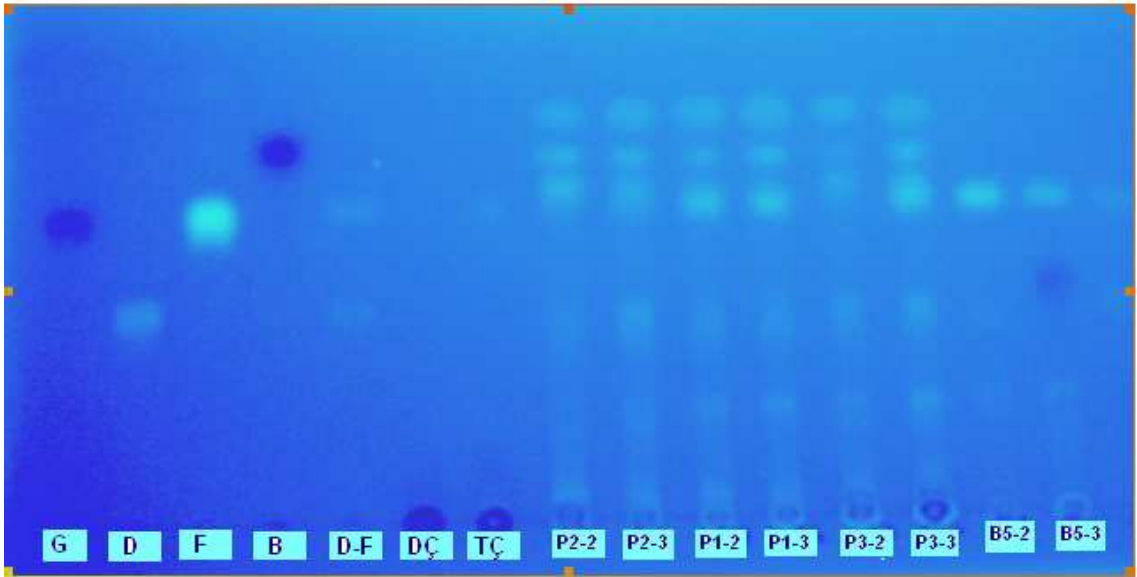
4.2 Kallus ve Bitki Analizi ile İlgili Bulgular

4.2.1. İTK analizi

Bitkilerin ve kallusların ekstraktları Kieselgel 60 F254 adsorbanında, Kloroform- Aseton-Formik asit (75:16.5:8.5) (S1) ve Kloroform-Etil asetat (1:1) (S2) olmak üzere, iki değişik solvan sisteminde geliştirilmiştir. S2 solvan sistemi ile daha iyi ayırım elde edilmiştir (Şekil 4.6).

Daidzein ve formononetin UV₃₆₆ nm'de amonyak buharında açık mavi florasan gösterirken, genistein ve biokanin A mor renk vermiştir.

S2 solvan sisteminde standart maddelerin R_f değerleri: daidzein 0.37, genistein 0.51, formononetin 0.54 ve biokanin A 0.63 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.6 İzoflavon standartlarının, çiçeklerin ve kallusların İTK görünüşleri (UV₃₆₆)G:Genistein, D:Daidzein, F:Formononetin, B:Biokanin A, D-F:Daidzein ve Formononetin standart karışımı, DÇ: Diploid çiçek, TÇ : Tetraploid çiçek P2-2: P2 nin 2.alt kültür kallusu, P2-3: P2 nin 3.alt kültür kallusu, P1-2 : P1 in 2.alt kültür kallusu, P1-3: P1 in 3.alt kültür kallusu, P3-2 : P3 ün 2.alt kültür kallusu, P3-3 : P3 ün 3.alt kültür kallusu B5-2: B5 in 2. alt kültür kallusu, B5-3: B5 in 3. alt kültür kallusu

Çizelge 4.2 İzoflavonların S2 solvan sisteminde R_f değerleri ve UV_{366} de verdikleri floresans renkleri

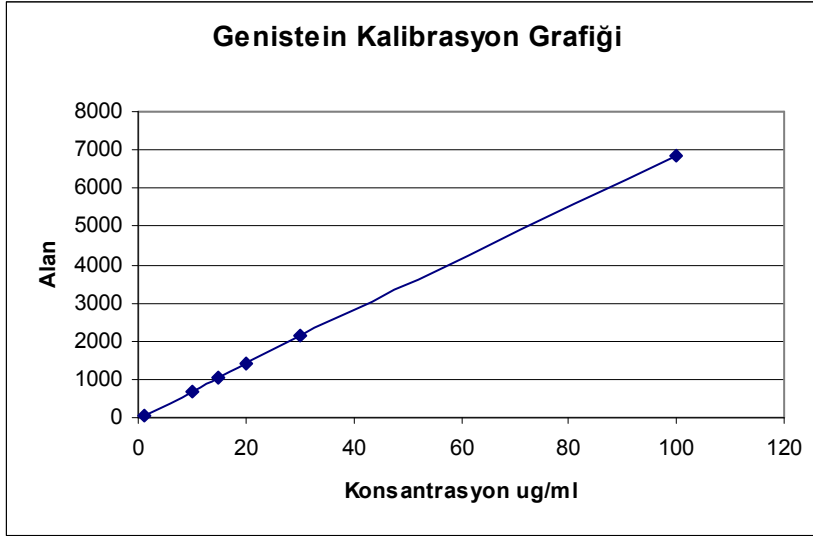
İZOFLAVONLAR	R_f değerleri	UV_{366}	UV_{366}-NH_3 Reaktifi
Daidzein	0.37	Açık mavi	Açık mavi parlak
Genistein	0.51	Mor	Mor (Renk değişimi az veya yok)
Formononetin	0.54	Açık mavi	Açık mavi parlak
Biokanin A	0.63	Mor	Mor (Renk değişimi az veya yok)

4.2.2 HPLC ile miktar tayini

Standart çözeltilerinden hazırlanan uygun seri dilüsyonların (Çizelge 4.3) HPLC kolonona uygulanması ile her bir izoflavon (genistein, daidzein, formononetin, biokanin A) için elde edilen piklerin alanlarının (y), konsantrasyon değerine (x) karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.7 - 4.10'da gösterilmiştir.

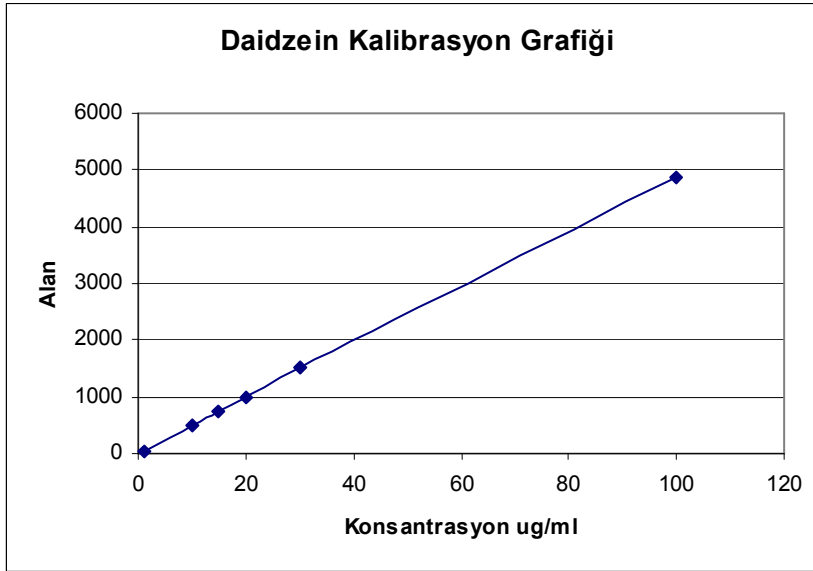
Çizelge 4.3 İzoflavon standartlarının dilüsyon serisi

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)
1. Dilüsyon	100
2. Dilüsyon	30
3. Dilüsyon	20
4. Dilüsyon	15
5. Dilüsyon	10
6. Dilüsyon	1



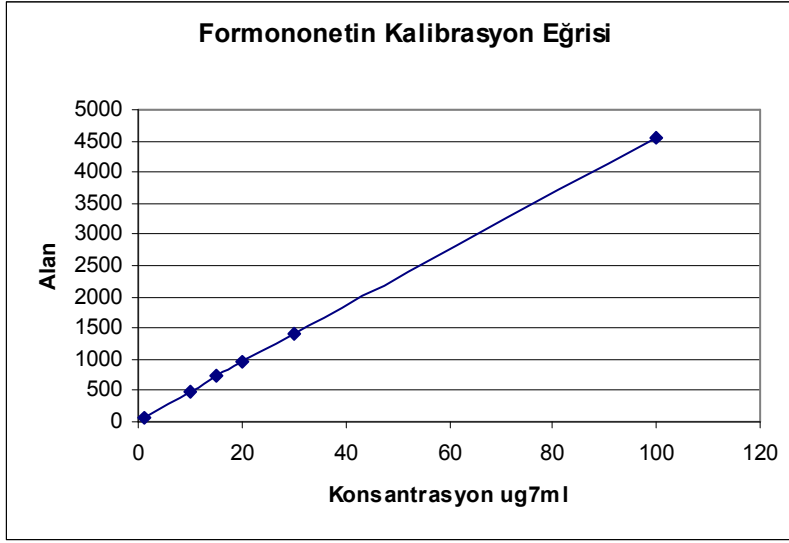
Şekil 4.7 Genisteinin kalibrasyon grafiği

Doğru denklemi
 $y = 68,0299x + 44,9278$
 $R^2 = 0,9997$



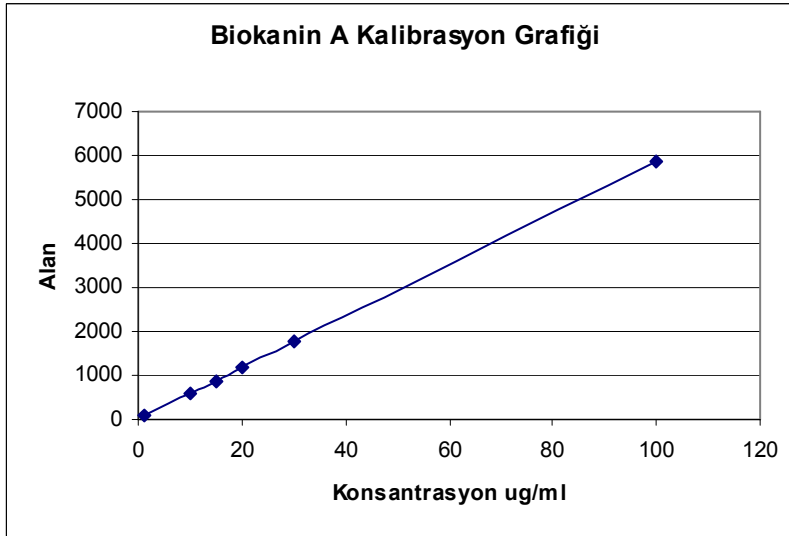
Şekil 4.8 Daidzeinin kalibrasyon grafiği

Doğru denklemi
 $y = 48,5306x + 15,3230$
 $R^2 = 0,9997$



Şekil 4.9 Formononetinin kalibrasyon grafiği

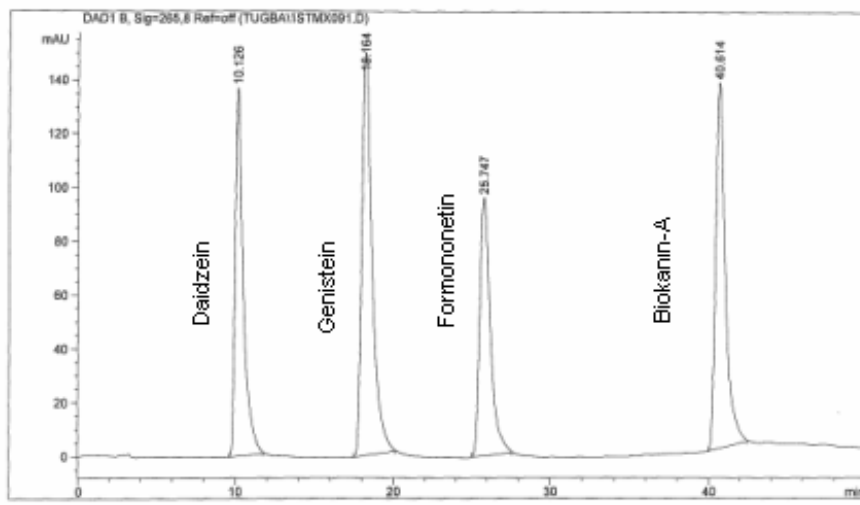
Doğru denklemi
 $y = 45,2471x + 33,0911$
 $R^2 = 0,9998$



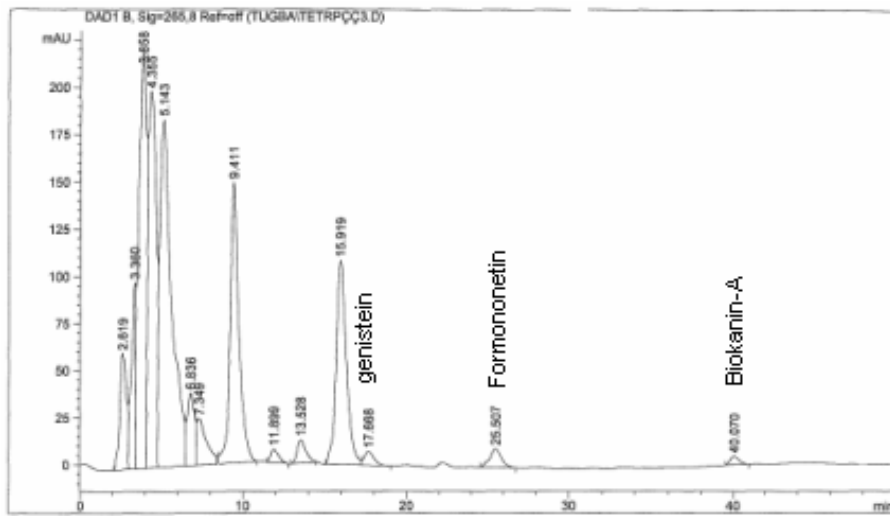
Şekil 4.10 Biokanin A'nın kalibrasyon grafiği

Doğru denklemi
 $y = 58,6493x + 1,3293$
 $R^2 = 0,9999$

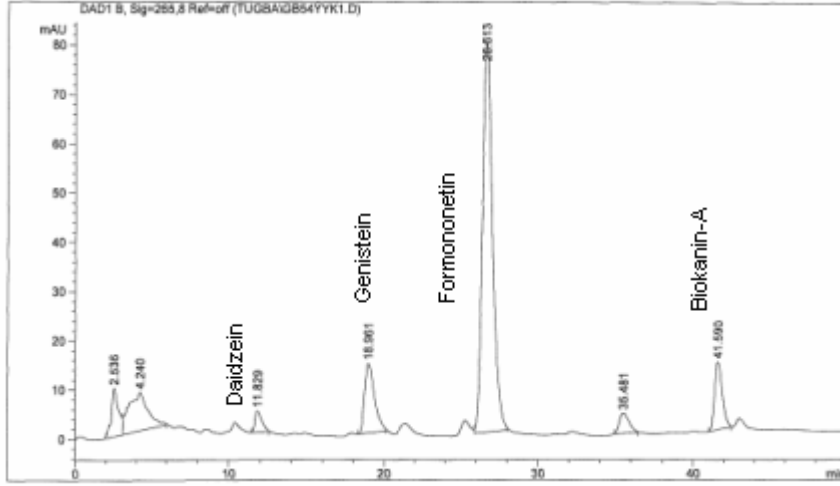
Standart çözeltileri kolona üçer defa enjekte edilerek alıkonma süreleri (bağlı tutuş zamanı) tespit edildi (Şekil 4.11). Alıkonma zamanları (R_t); Daidzein için 9-10 dakika, genistein için 17-18 dakika, formononetin için 24-25 dakika ve biokanin A için 39-40 dakika olarak tespit edildi. Bitkilerin çiçek kısımlar ve 2., 3. alt kültür kallus ekstraları 3'er kez enjekte edilmiş (Şekil 4.12 ve 4.13) ve elde edilen sonuçlar (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.4) SPSS istatistik programına göre değerlendirilerek standart hata değerleri hesaplanmıştır. P4 ortamında gelişen kallus miktarları P3 ortamından daha az olduğundan HPLC analizinde kullanılmadı.



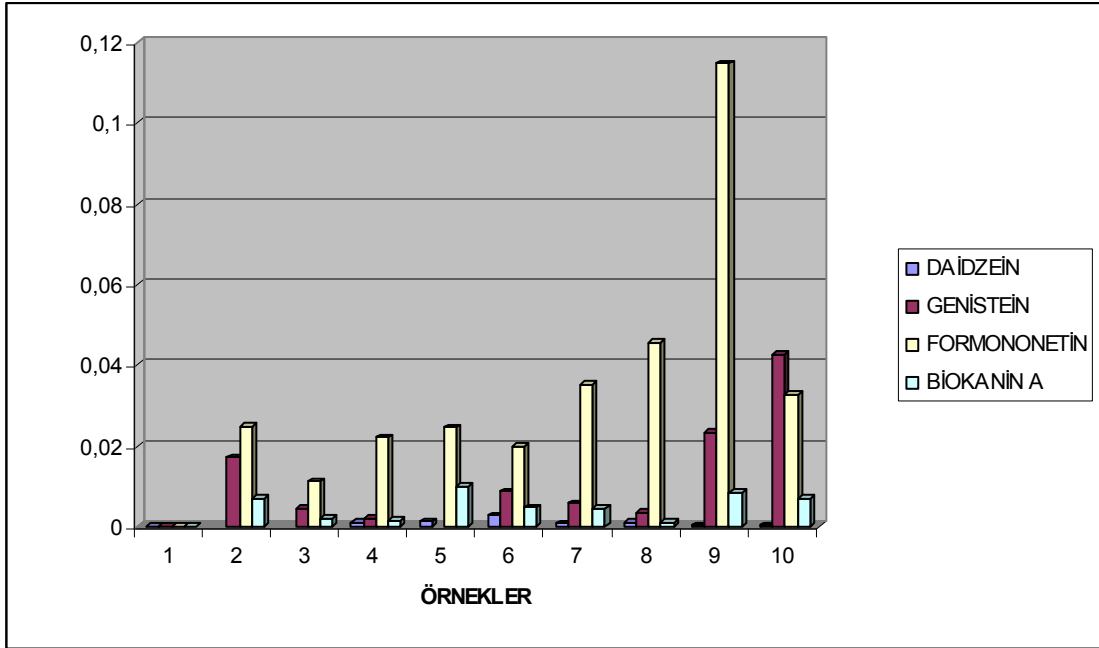
Şekil 4.11 Standart karışımının HPLC'de ayrımı



Şekil 4.12 Tetraploid *T. pratense* çiçeğinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.13 B5 ortamı 2. alt kültür kallusunun HPLC kromatogramı



Şekil 4.14 Bitki kısımları ve kalluslarda belirlenen % izoflavon miktarları Diploid çiçek 1; Tetraploid çiçek 2; P3 ortamının 2.alt kültür kallusu 3, 3.alt kültür kallusu 4; P2 ortamının 2.alt kültür kallusu 5, 3.alt kültür kallusu 6; P1 ortamının 2.alt kültür kallusu 7, 3.alt kültür kallusu 8; B5 ortamının 2.alt kültür kallusu 9, 3. alt kültür kallusu 10

Çizelge 4.4 *T. pratense* çiçek ve kalluslarında belirlenen % izoflavon miktarları

Ortamlar	Büyüme düzenleyiciler mg/L		İzoflavonlar			
			Daidzein	Genistein	Formononetin	Biokanin A
PCL-2	2 BAP 1 NAA	II.alt	0.00128 ± 0.00001	*	0.02445 ± 0.00002	0.00993 ± 0.00126
		III.alt	0.00271 ± 0.0000008	0.00847 ± 0.0007	0.01975 ± 0.015	0.00463 ± 0.00047
	0.5 BAP 5 NAA	II.alt	0.00099 ± 0.000003	0.00578 ± 0.0006	0.03531 ± 0.00003	0.00444 ± 0.00061
		III.alt	0.00087± 0,000006	0.00346 ± 0.00066	0.04576 ± 0.00045	0.00983 ± 0.00005
	0.06 2.4-D 0.03 NAA 0.1BAP	II.alt	*	0.00451 ± 0.00171	0.01114 ± 0.0005	0.002 ± 0.00019
		III.alt	0.00106 ± 0.00002	0.00209 ± 0.00021	0.02197 ± 0.00008	0.00154 ± 0.0006
Gamborg B5	11 NAA 10 KIN 10 2.4-D	II.alt	0.00028 ± 0.0001	0.02316 ± 0.00028	0.11476 ± 0.0004	0.00829 ± 0.00022
		III.alt	0.00016 ± 0,000006	0.04256 ± 0.00025	0.03273 ± 0.00018	0.00706 ± 0.00003
Diploid çiçek			-	-	-	-
Tetraploid çiçek			-	0.00199 ± 0.000055	0.02485 ± 0.0007	0.00718 ± 0.00013

* Tayin edilemeyecek kadar az
- Pik gözlenmedi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L. diploid formuna göre daha iyi vejetatif karakterlere sahip olduğundan iyi bir yem bitkisi olmasının yanında, taşıdığı fitoöstrojenler bakımından da değerlendirilmesi gereken bir bitkidir. *Trifolium pratense* L. üzerinde doku kültürü çalışmaları sınırlı sayıda olup, çalışmalar daha çok *in vitro* çoğaltım amacı ile yapılmıştır. Son zamanlarda fitoöstrojenik aktivitesinin önem kazanması ile üzerinde pek çok biyolojik aktivite çalışılması yapılmıştır. Tetraploid form üzerinde yapılmış çalışmalar da çok az olmakla birlikte, mikroçoğaltım (Çölgeçen 2005), anatomi (Algan ve Bakar 1999) ve morfoloji (Pınar vd 2001) üzerinedir. Tetraploid formu üzerinde doku kültürü ile birlikte etken madde analizini içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmada eksplant elde etmek için steril şartlarda tohum çimlendirilerek bitkicik oluşturulmuştur. Tohumlar yüzey sterilizasyonundan sonra, hiçbir işlem yapılmadan ve zımparalanarak, hormonsuz MS ve filtre kağıtları üzerinde çimlendirildi (Çölgeçen 2005). Tohumun çimlendirilmesi ile ilgili bir sorun yaşanmamış ve hormonsuz MS ortamına ekilen tohumlar 15 günde eksplant almaya hazır bitkicikler haline gelmiştir.

Denemelerimizde en iyi kallus oluşumunu sağlayabilmek amacıyla Leguminosae familyasında çalışılmış olan iki farklı temel besin ortamı ve çeşitli oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri kullanıldı. Bu ortamlar Phillips and Collins (PC-L2) ve Gamborg B5 (B5) dır. Phillips and Collins (1979)'in çayır üçgülünde kallus elde etmek için geliştirdikleri PC-L2 ortamı çalışmamızda da en iyi sonuçları vermiştir (Çizelge 4.1). Phillips and Collins (1979) kallus ve sürgün oluşturma denemelerinde 0,06 mg/L Picloram ve 0,1 mg/L BAP kullanmışlardır. 2,4-D'nin kallus üretiminde zayıf etkili olduğunu ancak NAA kullanımıyla 2,4-D'nin etkinliğinin artırılabilceğini vurgulamışlardır. Aynı zamanda NAA'nın ortamda kararmalara neden olduğunu ve bunun fenolik ve benzer bileşiklerin üretiminde etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Sitokinin olarak ise BAP'in kallus ve sürgün gelişimi açısından 2 IP ve KIN'e göre daha etkili olduğunu açıklamışlardır.

Bizde denemelerimizde bu bilgilerden de yararlanarak 0,5 mg/L BAP ve 5 mg/L NAA (**P1**), 2 mg/L BAP, 1 mg/L NAA (**P2**), 0,06 mg/L 2,4-D, 0,03 mg/L NAA ve 0,1 mg/L BAP (**P3**), 0,06 mg/L 2,4-D, 0,1 mg/L BAP (**P4**) içeren PC-L2 ortamları ve 11 mg/L NAA, 10 mg/L KIN, 10 mg/L 2,4-D ihtiva eden Gamborg **B5** ortamını kullandık. En iyi kallus gelişimi P1 ortamında gözlenirken bunu sırası ile P3, B5, P4 ve P2 ortamları takip etti (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.5).

PC-L2 ortamında her bir alt kültürdeki kallus artışının kıyaslanmasında, Duncan Testi'ne göre PC-L2 ortamlarından P3 ortamı, P4 ortamı ve P2 ortamında kallusta, birinci ve ikinci alt kültürlerde benzerlik gözlenirken, P1 ortamında farklılık gözlemlendi. Üçüncü alt kültürde ise P2 ortamında, diğer PC-L2 ortamlarından farklılık belirlendi. PC-L2 ortamları arasında kallus gelişimi açısından en iyi sonucu veren ortam olan P1 ortamı ile B5 ortamı Student-T Testi ile karşılaştırıldı. Buna göre; kallusta t_{hesap} değeri t_{tablo} değerinden fazla çıktığında dolayı iki ortam arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi. Birinci, ikinci ve üçüncü alt kültürde ise kültürde t_{hesap} değeri t_{tablo} değerinden küçük olduğu için iki ortam arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi.

B5 ortamında koyu sarı ve beyaz renkte mukus benzeri yumuşak yapıda kalluslar gözlenirken diğer ortamlarda yeşil, beyaz, koyu sarı, açık sarı ve kahverengi renkte parçalanabilir kalluslar gözlemlendi. Yeşil kalluslar daha sert yapıdadır. P1 de bir, P4 de iki, P3 de üç, P2 de de üç eksplantta anormal sürgün oluşumu tespit edildi.

Horvath Beach and Smith (1979) *T. pratense* L. (red clover) ve *T. incarnatum* (crimson clover)'da kallustan bitki geliştirme çalışmalarında, eksplant olarak hipokotil ve ovaryumları kullanmışlar, en iyi kallus gelişimini, hipokotil eksplantlarından, Gamborg B5 ortamında 11 mg/L NAA, 10 mg/L 2,4-D ve 10 mg/L Kinetin hormon karışımında 7 haftada elde etmişlerdir. Çalışmamızda da hipokotil eksplantlarından, bütün ortamlarda 26-28 günde (4 hafta) hasat edilecek miktarlarda kalluslar elde edildi.

Bhojwani (1981), Bhojwani *et al.* (1984), Mclean and Nowak (1989) gibi araştırmacılar invitro çoğaltım amaçlı çalışmalarında, değişik ortamlarda organogenesisine yönelecek kalluslar geliştirmeye çalışmışlardır. Ortamlarımız oldukça iyi sonuçlar verdiği için,

ortam çeşitlendirilmesine gerek duyulmadı.

Çiçek ve kallusların ekstralarının İTK analizinde, Kieselgel 60 F254 adsorbanında, Kloroform-Etil asetat (1:1) (S2) solvan sistemi ile izoflavonlarda iyi bir ayırım elde edilmiştir. S2 solvan sisteminde standart maddelerin R_f değerleri: daidzein 0.37, genistein 0.51, formononetin 0.54 ve biokanin A 0.63 olarak belirlenmiştir. Diploid çiçekte standartlarımıza ait hiç bir izoflavon lekesi görülmezken, tetraploid bitkinin çiçeğinde formononetin varlığı tespit edilmiştir. Kalluslarda ise dört izoflavon da tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Daha sonra bulunan HPLC sonuçları da bu bulguları doğrulamıştır (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.14).

Lichrospher 100 RP-18 kolonda, % 0,1 Formik asitli su : % 0,1 Formik asitli Asetonitril (% 70 Su : % 30 Asetonitril) solvan sistemi kullanılarak izokratik olarak yapılan HPLC analizinde, diploid çiçekte miktar tayinini yaptığımız izoflavonlara ait hiç bir pike rastlanmazken, tetraploid çiçekte en çok formononetin olmak üzere genistein, biokanin A tespit edildi. Elde edilen kalluslarda (P1, P2, P3 ve B5) ise en çok formononetin olmak üzere çeşitli miktarlarda diğer izoflavonlar tespit edildi. Kalluslarda en yüksek izoflavon içeriği (% 0.115= 1.15mg/g formononetin) B5 ortamının ikinci alt kültür kalluslarında belirlendi. Kallusların çoğunda madde miktarları III. alt kültürlerde düşmüştür. Sadece P2, P3 te formononetin, B5 te genistein miktarları II. alt kültüre göre, III. alt kültürde artmıştır.

Wu *et al.* (2003), *T. pratense*'de ve diğer *Trifolium* türlerinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarında HPLC ile birlikte kütle spektrometresi kullanarak izoflavonların ayırımını gerçekleştirmişlerdir. *T. pratense*'de 9 izoflavon aglikonu, 8 glikozit ve 14 glikozit malonat olmak üzere 31 izoflavon belirlemişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız standartlardan daidzein, formononetin, genistein ve biokanin A, Wu *et al.*(2003)' nin çalışmasındaki kromatogramdaki major pikler arasındadır.

Delmonte *et al.* (2006), çiçek, herba ve yaprak kısımları Avrupa ve Amerika'da pek çok diyeteye eklenen *T. pratense*'nin izoflavonlarının ayırımını çalışmışlardır. Buldukları izoflavonlar içinde, formononetin ve biokanin A'nın fazla miktarda bulunduğunu tespit

etmişlerdir. Krenn *et al.*(2002), Melbrosin International (Viyana/Avusturya) firmasından temin ettiği *T. pratense* örneklerinin ve ekstrelerinin içeriğindeki izoflavonları HPLC ile belirlemişlerdir. Daidzein ve genistein'e göre biokanın A ve formononetin miktarlarının fazla olduğunu bulmuşlardır. Tetraploid kalluslarımızda da en çok bulunan izoflavon formononetindir.

Sonuç olarak; kallus oluşumunda en iyi gelişim P1 ortamında ve sırası ile P3, B5, P4 ve P2 ortamlarında görüldü. Elde edilen kalluslar oldukça iyi olup, süspansiyon kültürüne de elverişlidirler. ITK'da tetraploid bitkinin çiçeğinde formononetin, kalluslarda ise dört izoflavon da tespit edildi. HPLC analizinde ise; diploid çiçekte miktar tayinini yaptığımız izoflavonlara ait hiç bir pike rastlanmazken, tetraploid çiçekte en çok formononetin olmak üzere genistein ve biokanın A tespit edildi. Kalluslarda en yüksek izoflavon içeriği (% 0.115= 1.15mg/g formononetin) B5 ortamının ikinci alt kültür kalluslarında belirlendi P1, P2 ve P3 ortamlarında oluşan kalluslarda ise en çok formononetin olmak üzere çeşitli miktarlarda diğer izoflavonları tespit ettik.

KAYNAKLAR

- Adlercreutz, M. 1998. Epidemiology of phytoestrogens. *Bailieres Clinical Endocrinology Metabolism*,12, 605-623.
- Algan, G. and Bakar, H.N. 1999. Tetraploid çayırüçgülü (*Trifolium pratense* L.)'nde apomiktik gelişme. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23; 519-525.
- Arjmandi, B.H., Khalil, D.A. and Smith, B.J. 2003. Soy protein has a greater effect on bone in postmenopausal women not on hormone replacement therapy, as evidenced by reducing bone resorption and urinary calcium excretion. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, 88, 1048-1054.
- Başer, K.H.C. ve Kırimer, N. 2002. Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasotikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler.Eskişehir.
- Beach K. H. and Smith R. R.1979. Plant regeneration from callus of red and crimson clover. *Plant Science Letters*, 16, 2-3, 231-237.
- Bhojwani, S.S. 1981. A tissue culture method for propagation and low twmperture storage of *Trifolium repens* genotypes. *Physiol. Plant.* 52; 187-190.
- Bhojwani, S.S., Mullins, K. and Cohen D. 1984. Intra-varietal variation for in vitro plant regeneration in the genus *Trifolium*. *Euphytica*, 33; 915-921.
- Bilaloğlu, G. V. ve Harmandar, M. 1999. Flavonoidler . 336-343. Bakanlar Matbaacılık Ltd. Şti. İstanbul.
- Bingham, S.A., Atkinson, C. and Liggins, J. 1998. Phyto-oestrogens: Where Are We Now? *British Journal of Nutrition*. 79, 393-406.
- Brzezinski, A. and Debi, A. 1999. Phytoestrogens: The Natural Selective Estrogen Receptor Modulators? *European Journal of Obstetrics & Gynecology*, 85, pp.47-51.
- Burke, G.L., Vitolins, M.Z. and Bland, D. 2000. Soybean isoflavones as an alternative to traditional hormone replacement therapy: Are we there yet? *Journal Nutrition*, 130, pp.664-665.
- Büyüktuncer, Z. ve Başaran, A. A. Fitoöstrojenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Rollerini. 2005. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. Cilt 25, sayı 2, 79-94.

- Cassidy, A., Bingham, S. and Setchell, K. 1995. Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *British Journal of Nutrition*, 74, 587-601.
- Cassidy, A., Hanley, B. and Raventos, R. 2000. Isoflavones, Lignans and Stilbens origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1044-1062.
- Cesar, I.C., Braga, F.C., Soares, C.D.V., Nunan, E.A., Pianetti, G.A., Condessa, Barbosa, A.T.A.F. and Campos, L.M.M. 2006. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. *Journal of Chromatography B*, 836, 1-2, 74-78.
- Çölgeçen H. 2005. Doğal tetraploid *Trifolium pratense* L.'de *In vitro* Organogenez. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Clarkson, T.B. 2002. Soy, Soy Phytoestrogens and Cardiovascular Disease. *Journal Nutrition*, 132, 167-172.
- Cotroneo, M.S., Wang, J., Fritz, W.A., Eltoum, I.E., and Lamartiniere, C.A. 2002. Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model. *Carcinogenesis*, 23, 1467-1474.
- Dai, Q., Franke, A.A., Jin, F., Shu, X.O. and Hebert, J.R. 2002. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 11, 815-821.
- Davis, P.H. 1970. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Davis, P.H. (Ed.) Edinburgh University Press, Edinburgh, Vol. 3: 415-416.
- Davis, S., Dalais, F., Simpson, E. and Murkies, A. 1999. Phytoestrogens In Health and Disease. *Recent Progress In Hormone Research*, 54, 185-211.
- Delmonte P., Perry J. and Rader J.I. 2006. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis. *Journal of Chromatography A*, 1107, 1-2, 59-69.
- Dixon, R. A. 2004. Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 225-261.
- Djuric, Z., Chen, G. and Doerge D.R. 2001. Effects of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer Letters*, 172, 1-6.
- Elçi, Ş. 1982. The utilization of genetic resource in fodder crop breeding. Eucarpio, Fodder Crop Section, 13-16 September, Aberystwyth, UK.

- Elçi, Ş. 1988. Ziraatte Baklagiller. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü Yayınları: 1, 422.
- Elçi, Ş. 1994. Baklagil (Leguminosae) ve Buğdaygil (Gramineae) Yem bitkileri Tanıtma kılavuzu. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü Yayınları, 240.
- Finspor. 2005. http://www.finspor.com.tr/saglik.asp?type=1&health_id=30, Erişim Tarihi: 12.10.2005.
- Fukutake, M., Takahashi, M. and Ishida, K. 1996. Quantification of genistein and daidzein in soybeans and soybean products. Food and Chemical Toxicology, 34, 457-461.
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A. and Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. In Vitro, 12; 473-478.
- Ganry, O. 2002. Phytoestrogen and breast cancer prevention. Europa Journal Cancer Prevention..., 11, 519-522.
- Garrett, S.D., Lee, H.A., Friar, P.M.K. and Morgan M.R.A. 1999. Validation of a novel estrogen receptor-based microtitration plate assay for the determination of phytoestrogens in soy-based foods. Journal agriculture food chemistry, 47, 106-111.
- Grün, I.U., Adhikari, K. and Li, C. 2001. Changes in the profile of Genistein, Daidzein and their conjugates during thermal processing of Tofu. Journal Agriculture Food Chemistry, 49, 2839-2843.
- Guo, T.L., McCay, J.A., Zhang, L.X., Brown, R.D. and You, L. 2001. Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B6C3F1 mice. Journal Nutrition, 131, 3251-3258.
- Hedlund, T.E., Johannes, W.U. and Miller, G.J. 2003. Soy isoflavonoid equol modulates the growth benign and malignant prostatic epithelial cells in vitro. Prostate, 54, 68-78.
- Horn-Ross, P. L., K. J. Hoggatt K. J. and Lee M. M. 2002. Phytoestrogens and Thyroid Cancer Risk. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention ,11, 43-49.
- Hutabarat, L.S., Mulholland, M. and Greenfield, H. 2000. Development and validation of an isocratic high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of phytoestrogens in soya bean Journal of Chromatography A, 795, 2, 377-382.
- Jensen, S. R. and Schripsema, J. 2002. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. Gentianaceae- Systematics and Natural History, Struwe, L. & Albert, V. (Eds.), Cambridge University Press.

- Kasparova, M., Siatka, T., Spilkova, J. and Dusek J. 2006. Explant culture of *Trifolium pratense* L. *Ceska Slov Farm.*, 55(1), 44-7.
- Kennely, E., Baggett, S., Nuntanakorn, P., Ososki, A. and Mori, S. 2002. Analysis of thirteen populations of black cohosh for formononetin. *Phytomedicine*, 9, 461-467.
- Kledjus, B., Vitamvasova-Sterbova, D., Kuban, V., 2001. Identification of isoflavone in red clover (*T. pratense* L.) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. *Analytica Chiama Acta* 450 81-97.
- Krenn L., Unterrieder I. and Rupprechter R. 2002. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 777,1-2, 123-128.
- LC Laboratories, 2005. Web sitesi: <http://www.lclabs.com>, Erişim Tarihi: 07.10.2005.
- Lee, H.P., Gourley, L., Duffy, S.W., Esteve, J., Lee, J. and Day, N.E. 1991. Dietary effects on breast cancer risk in Singapore. *Lancet.*, 337, 1197-1120.
- Liggins, J., Bluck, L.J. and Coward, A. 1998. Extraction and quantification of Daidzein and Genistein in food. *Analytical Biochemistry*, 264, 1-7.
- Liggins, J., Bluck, J.C. and Runswick, S. 2000. Daidzein and Genistein content of fruits and nuts. *Journal Nutr. Biochemistry*, 11, 326-331.
- Lissin, L.W. and Cooke, J.P. 2000. Phytoestrogens and Cardiovascular Health. *Journal Am. Coll. Cardiology*, 35, pp.1403-1410.
- Lu, W., Anderson, K.E. and Grandy, J.J. 2001. Effects if an isoflavone-free soy diet on ovarian hormones in premenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 3045-3052.
- Makela, S., Santti, R., Salo L. and McLachlan, J.A. 1995. Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. In *Estrogens in the Environment (Proceedings Estrogens in the Environment, III: Global Health Implications)*. *Environmental Health Perspectives* 103 (Supplement 7),123-127.
- Martini, M.C., Dancisak, B.B. and Haggans, C.J. 1999. Effects of soy intake on sex hormone metabolism in premenopausal women. *Nutrition and Cancer*, 34 (2), pp.133-139.
- McLean, N. L. and Nowak, J. 1989. Plant regeneration from hypocotyl and petiole callus of *Trifolium pratense* L. *Plant Cell Reports*, 8; 395-398.
- Messina, M.J. and Loprinzi, L. 2001. Soy For Breast Cancer Survivors: A Critical Review Of The Literature. *Journal Nutrition*. 131:3095-3108.

- Miller-Martini, D.M., Chan, R.Y.K., Ip, N.Y., Sheu, S.J. and Wong Y.H. 2001. A reporter gene assay for the detection of phytoestrogens in traditional Chinese medicine. *Phytotherapy Research*, 15, 487-492.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15; 473-497.
- Nutranews, 2004. Web sitesi. <http://www.nutranews.org>, Erişim Tarihi: 12.10.2005.
- Oomah, B.D. 2002. Phytoestrogens. In: *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals* Hurst WF., CRC Press, Washington, 1-54.
- Phillps, G.C. and Collins, G.B. 1979. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19, 59-64.
- Pınar M., Büyükkartal, H.N. and Çölgeçen, H. 2001. Pollen and Seed Morphology of Diploids and Natural Tetraploids of *Trifolium pratense* L. (Leguminosae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 43; 27-32.
- Pino, A.M., Valladares, L.E., Palma, M.A, Mancilla, A.M., Yanez, M. and Albala, C. 2000. Dietary isoflavones affect sex hormone-binding globulin levels in postmenopausal women. *Journal Clin. Endocrinology Metabolism*. 85, 2797-2800.
- PDR health, 2005. Web sitesi. <http://www.pdrhealth.com>, Erişim Tarihi: 12.10.2005.
- Rice-Evans, C.A. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. & Med.*, 20, 933.
- Rowland, I. 1999. Optimal Nutrition: Fibre and phytochemicals. *Proceedings of The Nutrition Society*, 58, 415-419.
- Sam, K. and Chang, C. 2002. Isoflavones From Soybeans and Soy Foods. “ Functional Foods Biochemical and Processing Aspects ” (Ed. Gazza M.) de CRC Press, New York.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Leblebici, E., Görk, G. ve Bekat L.1995. Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üni. Bornova.
- Slack, S. A., Tufford, L. A. 1995. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods. In: O.L. Gamborg and G.C. Phillips (eds), Springer-Verlag, Berlin.
- Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Sarit, I. and Vaya, J. 2001. Estrogen-like activity of glabrene and other constituents isolated from licorice root. *Steroid Biochemical Molecular Biology*, 78, 291-298.

- The Linus Pauling Institute, Higdon, J. and Duncan, A. M., 2004. Web sitesi: <http://www.lpi.oregonstate.edu/.../soyiso/isostructure.html>, Erişim Tarihi: 07.10.2005.
- The Phytochemistry of Herbs, Ganora, L., 2003. Web sitesi. <http://www.herbalchem.net/Intermediate.htm>, Erişim Tarihi: 07.10.2005.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters S.M. and Webb. D.A. 1964. Flora Europaea. vol 1. Cambridge University Press. 267.
- Uckun, F.M., Evans, W.E, Forsyth, C.J., Waddick, K.G. and Ahlgren, L.T. 1995. Biotherapy of B-cell precursor leukemia by targeting genistein to CD19-associated tyrosine kinases. Science, 267, 886-891.
- Umland, E.M., Pharm, D. and Cauffield, J.S. 2000. Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. Pharmacotherapy, 20, 981-990.
- USDA-Iowa State University Database verileri. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2002. Web sitesi. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>. Erişim Tarihi: 11.11.2005.
- Van de Weijer, P.H.M. and Barentsen, R. 2002. Isoflavones from red clover (Promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. Maturitas, 42 (3), 187-193.
- Wang, C., Prasain, J. K. and Barnes S. 2002. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens., Journal of Chromatography B, 777, 3-28.
- Wang H. and Holl F. B. 1988. In vitro culture and the incidence of somaclonal variation in regenerated plants of *Trifolium pratense* L. Plant Science, 55 (2), 159-167.
- Wang, W., Liu, L. Q., Higuchi, C.M. and Chen, H. 1998. Induction of NADPH: quinone reductase by dietary phytoestrogens in colonic colo205 cells. Biochemical Pharmacology, 56, 189-195.
- Wu, A.H., Stanczyk, F.Z. and Seow, H.L. 2002. Soy intake and other lifestyle determinants of serum estrogen levels among postmenopausal Chinese women in Singapore. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 11, pp. 844-851.
- Wu Q., Wang M. and Simon J.E. 2003. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A, 1016(2), 195-209.

Yanagihara, K., Ito A., Toge, T. and Numoto, M. 1993. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Research*, 53, 5815-5821.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğba Erçetin

Doğum Yeri: Altındağ/ Ankara

Doğum Tarihi : 07.06.1982

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Gazi Lisesi (1996 - 1999)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1999 - 2004)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(2004-2007)