YYÜ TAR BİL DERG
(YYU J AGR SCI)
2017, 27(3): 337-346

Geliş Tarihi (Received): 06.02.2017
Kabul Tarihi (Accepted): 11.09.2017

Araştırma Makalesi/*Research Article (Original Paper)*

Catharantus roseus L.'den Elde Edilen Kallus ve Çoklu Sürgünlerde Alkaloidlerin Araştırılması

Filiz ALTAN[1*], Betül BÜRÜN[2], Mehmet Emin DURU[3]

[1]Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Muğla, Türkiye
[2]Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla, Türkiye
[3]Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Muğla, Türkiye
*e-posta: afiliz@mu.edu.tr; Tel: +90 (252) 211 5104

Özet: Bu çalışmada içerdiği alkaloid sayısı bakımından zengin olan ve özellikle kanser tedavisinde büyük ilgi uyandıran *Catharanthus roseus* L. bitkisinde *in vitro* steril bitkiciklerin kök ve sürgün eksplantları ile kallus ve bir bitkicikten, çoklu sürgün üretimi araştırılmış olup, kalluslarda ve sürgünlerde alkaloid analizi yapılmıştır. *C. roseus* tohumları öncelikle Murashige-Skoog (MS) ve ½ MS besin ortamında çimlendirilmiş, 21 günlük bitkiciklerin kök ve sürgün kısmı ayrılmış ve iki farklı eksplant olarak (kök ve kotiledonlu hipokotil) farklı bitki büyüme düzenleyicileri ilaveli MS ortamında kallus üretimine teşvik edilmiştir. 0. 1 mg L^{-1} kinetin+ 1 mg L^{-1} NAA ve 0.1 mg L^{-1} kinetin+ 2 mg L^{-1} 2.4 D ilaveli besin ortamlarında üretilen kallus ekstrelerinde triptofan alkaloidinin baskın olarak varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca 1/2 MS ortamınında *in vitro* steril bitkicikler (21 günlük) köklerinden ayrılıp çoklu sürgün gelişimini teşvik için farklı konsantrayonlardaki BA ilaveli MS ortamında kültüre alınmıştır. Kontrol olarak *in vivo* koşullarda yetiştirilmiş olan (çiçeklenme döneminde temin edilmiş) *C. roseus* bitkilerinden alınan örneklerde (kök ve sürgün) alkaloid analizleri yapılmıştır. En iyi çoklu sürgün gelişimi 1 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamında görülmüştür. Bu besin ortamında yetişen sürgünlerden elde edilen alkaloidlerin kontrol bitkisi ile aynı bileşikler olmasının yanı sıra elde edilen serpentin indol alkaloidinin kontrol grubuna göre miktarı daha yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca triptamin alkaloidine de yalnızca kontrol ve 1 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamından elde edilen çoklu sürgünlerde rastlanılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Catharanthus roseus*, Çoklu sürgün, *In vitro* tohum çimlenmesi, Kallus, Triptofan

Investigation of Alkaloids in Callus and Multiple Shoots Obtained from *Catharantus roseus* L.

Abstract: In this study, the *in vitro* sterile plantlets and callus production in *Catharanthus roseus* L., which is rich in the number of alkaloid and arouses interest especially in cancer treatments, the multiple shoot production from sterile plantlets and the alkaloid analysis were made in both productions. *C.roseus* seeds were firstly germinated in full-power MS medium, the hypocotyl, cotyledon and root explants were promoted to callus production in different plant growth regulators supplemented basic MS medium. The dominant presence of a class of alkaloid (tryptophan) was identified in the 0. 1 mg L^{-1} kinetin+ 1 mg L^{-1} NAA and 0.1 mg L^{-1} kinetin+ 2 mg L^{-1} 2.4 D supplemented nutrition environment. In the study, the plantlets (root and hypocotyl + cotyledon) germinated in 1/2 MS medium were also separated from their roots and were cultivated in basic MS medium supplemented with different concentrations of BA for promotion of multiple shoot growth. To control alkaloid analyses were made for *in vivo* grown *C.roseus* plant (provided during the flowering period). The best shoot growth was seen in 1 mg L^{-1} BA supplemented nutrition environment and the obtained serpentine indol alkaloid was determined to be higher than the control plant although alkaloids obtained from the shoots grown in that nutrition environment were the same compounds as the control plant. Additionally, tryptamine alkaloid occurred only in control and the shoots obtained from that nutrition environment.

Keywords: Callus, *Catharanthus roseus*, *In vitro* seed germination, Multiple shoot, Tyrptophan

Giriş

Catharanthus roseus (L.) G. Don bitkisi *Apocynaceae* familyasına ait çok önemli bir tıbbi bitkidir. 130'dan fazla indol alkaloid içermektedir (Yahia ve ark. 1998; Van der Heijden ve ark. 2004; Gajalakshmi ve ark 2013; Almagro ve ark. 2015) ve içerdiği alkaloidler bakımından da kanser tedavilerinde büyük ilgi uyandırır. Özellikle; antilösemik aktivite gösteren vinblastin ve vinkristin indol alkaloidleri *C. roseus*'tan ekstrakte edilerek kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Iskandar ve Iriwati 2016). Son zamanlarda bu bitkiyle yapılan çalışmalarda kanser tedavisinin yanısıra diyabet üzerinde de başarılı sonuçlar gözlenmeye başlanmıştır (Tiong ve ark. 2013). Oldukça zengin alkaloid içeren bu bitkide geleneksel üretime alternatif olan doku kültürü ile üretim metodu oluşturmak için pek çok çalışma yapılmaktadır (Kutney ve ark. 1980; Kutney ve ark. 1983; Döller ve ark. 1976; Ataei-Azimi ve ark 2008; Verma ve ark. 2012, Iskandar ve Iriwati 2016).

In vitro kültür çalışmalarında kallus kültürleri, vejatatif çoğaltma varyasyondan yararlanma ve hücre süspansiyon kültürlerinin elde edilmesi gibi amaçlar için sıklıkla kullanılmaktadır. Kallus hatları, pek çok tıbbi bitki üzerinde yapılan çalışmalardan da elde edilen bitkiye göre bitki hücresi tarafından çeşitli yollarla üretilen ve bitki hücresi tarafından geliştirilen savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi faaliyetlerin ürünleri olan sekonder metabolit dediğimiz yapıların üretimi için de bir kaynak oluşturur (Sökmen ve Gürel 2001). Sekonder metabolitler, metaboliti üreten bitkinin en çok üretim miktarına sahip doku veya organlarının yapay besin ortamında kültüre alınması ile elde edilmektedir (Sökmen ve Gürel 2001).

Bu çalışmada *C. roseus* bitkisinin kök ve sürgün eksplantlarından farklı büyüme düzenleyicisi ilaveli MS ortamında üretilen kallusların alkaloid içeriği araştırılmış ayrıca üç farklı konsantrasyonda BA içeren MS ortamında üretilen çoklu sürgünlerde alkoloid sentezine BA'nın etkisi üzerinde durulmuştur.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada bitki materyali olarak *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Syn. *Vinca rosea* L.) tohumları *in vitro* Murashige Skoog (MS, 1962) besin ortamında çimlendirilmiş ve elde edilen 21 günlük steril bitkiciklerin kök ve sürgün kısmı eksplant olarak kullanılmıştır. Ayrıca *in vivo* yetiştirilen bitkilerin (çiçeklenme döneminde olan bitkiler) kök ve sürgünleri de kontrol örnekleri olarak analiz edilmiştir.

Alkaloid analizleri için, 1.05554 25TLC plates 20 x20 0.25 mm silica jel 60F 254 (Merck) ve 1. 13895 15 PLC 20x20 cm silica jel 60 F 254, 1 mm (Merck) kullanılmıştır.

Tohum Sterilizasyonu

Tohumların yüzeysel sterilizasyonu; % 70'lik etilalkolde 2 dakika daldırma sonra, 100 ml'ye 2 damla Tween 20 damlatılmış % 2.25'lik sodyumhipokloritte (NaOCl) 10 dakika bekletme ve 3-4 kez steril saf sudan geçirme şeklinde yapılmıştır.

Besin Ortamı

Tohumların çimlendirilmesinde Murashige Skoog (1962) (MS) besin ortamı ve yarı güçlü (1/2) MS ortamı kullanılmıştır (Bitki büyüme düzenleyicisi içermemektedir). Besin ortamına 30 g L^{-1} şeker ilave edilmiş pH 5.6'ya ayarlanmış ve 8 g L^{-1} agar eklenmiştir. Sterilizasyonu 1.5 atm'de 121 ^{o}C'de 15 dk otoklavda yapılmıştır (Franklin ve Dixon 1993).

C. roseus tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ile elde edilen 21 günlük bitkiciklerin (Şekil 1a) kök kısmı ayrılmış, kök ve sürgünler (kotiledon yaprakları ile beraber hipokotil) ayrı ayrı bitki büyüme düzenleyicisi olarak benziladenin (BA), naftalenasetik asit (NAA), diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve kinetini farklı kombinasyonlarda içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Bunlar:
I: 1 mg L^{-1} BA+ 2 mg L^{-1} NAA
II: 0.1 mg L^{-1} kinetin + 2 mg L^{-1} 2.4 D
III: 0.1 mg L^{-1} kinetin + 1 mg L^{-1} NAA
IV: 5 mg L^{-1} BA + 2 mg L^{-1} NAA

Çoklu sürgün üretimi için de 21 günlük steril bitkiciklerin (Şekil 1a) kökleri ayrılmış sürgünler üç farklı dozda (1, 3 ve 5 mg L^{-1}) BA içeren temel MS ortamında kültüre alınmıştır.

Kültür Odası Koşulları

In vitro çimlendirme için kültüre alınan tohumlar 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyodunda 1600 lux aydınlatmalı beyaz floresan ışıkta çimlendirilmiştir.Kallus kültürü için steril bitkiciklerden alınan eksplantlar ile yapılan kültürler devamlı karanlık ortamda bırakılmıştır. Çoklu sürgün üretimi için yapılan kültürler de çimlendirme de olduğu gibi 1600 lux aydınlatmalı beyaz floresan ışıkta 16/8 saat fotoperiyodik koşulda bırakılmıştır. Kültür odası sıcaklığı çalışma süresince 23±2 ºC'de nem ise % 50-55 arasında değişiklik göstermiştir.

Alkaloid Analizleri

Farklı büyüme düzenleyicisi ilaveli MS ortamında kök ve sürgün kökenli kallus örneklerinden ayrı ayrı 1 gram tartılıp methanol: kloroform (1:1) çözücüleri içerisinde 2 dk bekletilerek ekstraksiyon yapılmıştır. Yine aynı şekilde 3 farklı konsantrasyonda BA ilaveli MS ortamında kültüre alınmış sürgünlerden gelişen çoklu sürgünlerden de aynı metot uygulanarak ekstraksiyon sağlanmıştır. Elde edilen ekstreler tartılarak verim hesaplaması yapılmıştır. Ekstrelerdeki bileşikler ince tabaka kromotografisi (İTK) ile belirlenmiştir (Kaya ve Lockwood 1999, Hoopen ve ark. 2002; Tikhomiroff ve Jolicoeur, 2002). Elde edilen ekstreler silica jel 60F254 absorbansında, toluene-ethylacetate-diethylamine (70:20:10) sisteminde yürütülmüştür. İnce tabaka kromatografisi ile ayrılan ve karşılaştırılan ekstreler Dragendorff reaktifinde kontrol edilmiştir. *Catharanthus roseus* bitkisinde bulunan triptofan, triptamin, ajmalisin ve serpentin adlarıyla bilinen indol alkaloidleri araştırılmıştır. Bunun için, UV 254 nm ile UV 366 nm ve reaktif püskürtülerek tespit edilen alkaloid tipli bileşikler işaretlenmiş ve onların Rf değerleri hesaplanmıştır. Tespit edilen bileşiklerin yapılarının ve miktarlarının hesaplanabilmesi için ekstreler silica jel 60F254 (1 mm) preparatifi absorbanında tamamen ayrılmış ve ayrılan bileşenler kazınıp alınmıştır. Silica jeldeki bileşenler metanol ekstraksiyonu ile ayrılmıştır. Çözücü rotary evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Elde edilen saf bileşenlerin UV visible'de 190-500 nm aralığında absorbansları hesaplanmıştır. Rf değerleri, ince tabaka reaktifine karşı renkleri UV max absorbansları ve literatür bilgileri kullanılarak bileşenlerin sınıfları ve miktarları tespit edilmiştir (Thomas ve ark. 1999; Collu ve ark. 2001; Zhao ve ark. 2001a). Ayrıca bazı bileşenlerin analizleri Varian Mass 2100 sisteminde 70 eV ve elektron impact (EI) tekniğinin kullanılmasıyla desteklenmiştir. Alkaloid analizlerinde, % oransal değerler ile, belirlenen alkaloidin eksplantta toplam oransal değerleri belirtilmiştir.

İstatistiki Analiz

Verilerin istatistiki analizi için SPSS 22 programında One Way Anova (Tek yönlü varyans analizi) testi uygulanmıştır. Uygulamalar arasındaki farkı belirleyebilmek için Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmış, anlamlılık $p<0.05$ alınmıştır.

Bulgular ve Tartışma

In vitro çimlenme

C. roseus tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesinde MS ve ½ MS ortamları kullanılmış, çimlenme yüzdeleri Çizelge 1'de verilmiştir. Her iki çimlenme ortamında da 4 gün sonra ilk çimlenme gözlenmekle birlikte 21 gün sonra temel MS ortamında çimlenme yüzdesi 64.6 iken ½ MS ortamında bu % 87.19 olmuş ve çimlenme için ½ MS ortamı istatistiki olarak önemli düzeyde daha elverişli bulunmuştur (Şekil 1a). Bu çalışmada olduğu gibi, Yokaş ve ark. (2008)'nın farklı tuz formu ve oranlarına maruz kalan domates bitkisinin yanıtı ile ilgili çalışmalarında da *in vitro* ½ MS ortamında çimlendirmenin daha uygun olduğu belirtilmiştir.

Çizelge 1- *Catharanthus roseus* tohumlarının MS ve ½ MS ortamlarında çimlenme yüzdeleri

Ortam	Kültüre alınan tohum sayısı		Çimlenen tohum sayısı			Kontamine olan tohum sayısı			% çimlenme		
	1.tek	2.tek	1.tek	2.tek	Standart hata	1.tek	2.tek	Standart hata	1.tek	2.tek	Standart hata
½ MS	188	189	156	157	156,50 ±0.05[a]	9	9	9±0.00	87.15	87.22	87.19 ± 0.04[a]
MS	132	132	84	84	84 ±0.00[b]	2	2	2±0.00	64.6	64.6	64.6 ± 0.00[b]

Kallus Kültürü

In vitro çimlendirilmiş olan 21 günlük *C. roseus* bitkiciklerinin kök ve kotiledon yapraklı hipokotil eksplantlarının büyüme düzenleyicileri BA, kinetin, NAA ve 2,4-D'nin MS ortamına farklı kombinasyonlarda ilaveleri ile (dört farklı kombinasyon: I, II, III, IV) yapılan tüm kültürlerde kallus formasyonu gözlenmiştir. Eksplant tipine ve ortamlara büyüme düzenleyicisi ilavelerine göre kallus oluşumu % 100 olmuştur. Ancak gerek kök gerekse kotiledonlu hipokotil eksplantlarından en iyi kallus (açık beyaz renkte) gelişimi bitki büyüme düzenleyicisi olarak kinetinin bulunduğu ortamlarda (0.1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA ve 0.1 mg L^{-1} kinetin+2 mg L^{-1} 2,4-D) gözlenmiştir (Şekil 1b ve 1c). BA + NAA ilaveli besin ortamlarında gelişen kalluslarda ise hızlı bir kararma görülmüştür. Datta ve Srivastava (1997) *C. roseus*'un *in vivo* ve *in vitro* üretiminde vinblastin alkaloidinin oluşumundaki farklılıklar ile ilgili çalışmalarında *in vitro* çalışması için, *C. roseus* tohumlarını temel MS ortamında çimlendirmişler ve 4 hafta sonra elde edilen bitkicikleri eksplant olarak ve kallus indüksiyonuna teşvik için 2 mg L^{-1} NAA ve 5 mg L^{-1} BAP, 1000 mg L^{-1} CH ve 100 mg L^{-1} asparagin ilaveli MS ortamında kültüre almışlardır. Dört hafta sonra sürgün rejenerasyonu için 0.1 mg L^{-1} NAA+5 mg L^{-1} BAP ve 1 mg L^{-1} zeatin+100 mg L^{-1} asparagin+100 mg L^{-1} glutamine ilaveli MS ortamına transfer ederek vinblastin alkaloidini hem *in vitro* hem de *in vivo* yetiştirilen bitkilerde analiz etmişlerdir. Çalışmalarında *in vivo*'ya oranla *in vitro*'da vinblastin üretiminin hızlı bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir. Singh ve ark (2011) *C. roseus*'un farklı eksplantlarından (yaprak, hipokotil, epikotil ve kök) NAA ve BAP ve IBA bitki büyüme düzenleyicileri ile kültüre aldıklarında en erken ve en iyi kallus oluşumunu (% 99) 1 mg L^{-1} BAP ve 1 mg L^{-1} NAA ilaveli MS ortamında karanlık koşulda hipokotil ekplantlarından sağlamışlardır. Akçam ve Yürekli (1995) *in vitro* çimlendirmek suretiyle elde ettikleri *C. roseus* bitkiciklerinden alınmış yaprak ve gövde eksplantlarını 2 mg L^{-1} NAA+3 mg L^{-1} BA veya 2 mg L^{-1} NAA+5 mg L^{-1} BA büyüme düzenleyicileri ilaveli MS ortamında ve 2 mg L^{-1} kinetin+5 mg L^{-1} BA düzenleyicileri ilaveli MS ortamında ve 2 mg L^{-1} kinetin veya 2 mg L^{-1} NAA+5 mg L^{-1} BA eklenmiş modifiye Murashige Skoog (MMS) ortamı ile Philips-Collins ortamlarında inkübe etmişlerdir. Sonuç olarak en iyi kallus oluşumunu oksinlerden 2 mg L^{-1} NAA ve sitokinlerden 3 mg L^{-1} BA'nın ilave edildiği MS ortamında gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda da en iyi kallus gelişimi, 0.1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA ve 0.1 mg L^{-1} kinetin+2 mg L^{-1} 2,4-D ilaveli MS ortamında elde edilmiştir. Verma ve ark (2012), farklı oksin ve sitokinin kombinasyonlarında kültüre aldıkları yaprak eksplantlarından en iyi kallusun 0.5 mg L^{-1} 2.4 D ve 1 mg L^{-1} BA kombinasyonlarında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Zhao ve ark. (2001b) 5.37 mM NAA ve 4.69 mM kinetin ilaveli modifiye ilave edilmiş likit MS ortamında *C. roseus*'un gövde eksplantlarından özel bir kültür sistemi ile yoğun kallus kümeleri geliştirmişlerdir. Bu çalışmada da MS ortamına ilave etmiş olduğumuz kinetin+NAA kombinasyonlarında kültüre alınan eksplantlarda en iyi kallus gelişimi gözlenmiştir.

Çoklu sürgün gelişimi

21 günlük *C. roseus* steril bitkiciklerinin kökleri ayrıldıktan sonra sürgünlerin üç farklı konsantrasyonda (1, 3, 5 mg L^{-1}) sadece BA ilaveli MS ortamındaki kültürü ile çoklu sürgün teşvik edilmiştir (Şekil 1d, 1e, 1f). Eksplantlardan on gün içerisinde sürgün gelişimleri başlamıştır ve kültüre alınmasından 26 gün sonra da tüm ortamlarda çoklu sürgün gelişimleri gözlenmiştir. En iyi çoklu sürgün gelişimi MS ortamına 1 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamında gözlenmiştir (Şekil 1d). 1 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamında ortalama 2 adet çoklu sürgün gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 2). ANOVA analizi ile, sürgün sayısı oluşumunda, BA'nin uygulama dozlarındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3; $F=39{,}904$; $p<0.05$). Bu farklılığın hangi uygulamalar arasında olduğunu belirlemek için uygulamalar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Çizelge 4'te Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları görülmektedir. Uygulamaların sürgün sayısınına ilişkin tukey testi karşılaştırılmasında; uygulama konsantrasyonu azaldıkça sürgün sayısında gözlenen artışın fazla olması anlamlı bulunmuştur. Çizelge 5'te uygulamalara ilişkin sürgünlerdeki ortalama ağırlık değerleri verilmiştir. Değerlerin hemen hemen aynı ağırlıkta (g) oldukları, sürgün ağırlığı açısından yapılan ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile BA konsantrasyonun anlamlı farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 2. Uygulamalara bağlı örneklerde görülen ortalama sürgün sayısı (adet)

Uygulama mg L^{-1} BA	Örnek sayısı	Ortalama Sürgün sayısı (adet)	Standart hata
1	77	2.0000	0.10458
3	77	1.3506	0.07570
5	80	1.0625	0.03253
Toplam	234	1.4658	0.05071

Islam ve ark (2001) *C. roseus*'ta boğum parçaları ve sürgün ucu kültürleri ile yaptıkları çalışmalarında en başarılı sürgün rejenerasyonunu 1.5 mg L^{-1} BAP+ 0.2 mg L^{-1} NAA ilaveli temel MS ortamından sağlamışlardır. Bu kombinasyonda boğum parçaları 20-24 tane ilk sürgün tomurcuklarını oluştururken, sürgün uçları yalnızca 12-16 tane sürgün tomurcukları üretmiştir. Araştırmacılar, bu sürgünlerde kök gelişimi gözlemezken kök üretimi için yarı güçlü MS ortamına 0.2 mg L^{-1} BA ilave edildiğinde başarılı sonuçlar almışlar ve bu rejenere edilmiş bitkiciklerin % 90' nının tarla şartlarında canlılıklarını devam ettirdiğini rapor etmişlerdir.

Çizelge 3. Uygulamalara göre sürgün sayısının ANOVA analizi sonuçları

Varyansın Kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	Önem düzeyi (P)
Gruplar arası	36.007	2	18.003	39.904	0.000
Grup içi	104.220	231	0.451		
Toplam	140.226	233			

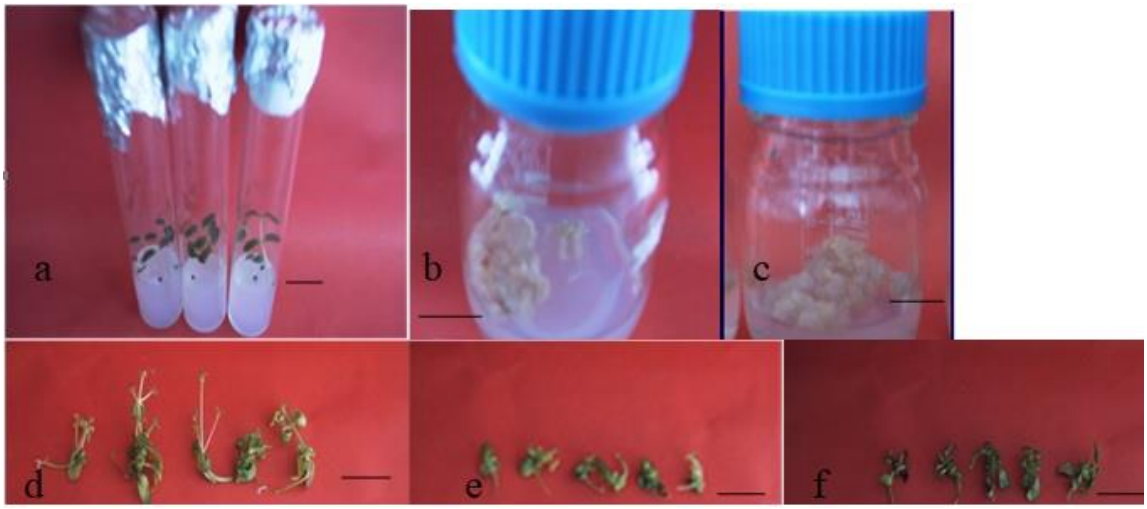
Çizelge 4.Uygulamalara (BA) göre çoklu karşılaştırma çizelgesinde Tukey testi sonuçları

(I) Uyg. (mg L^{-1})	(J) Uyg. (mg L^{-1})	Ortalama farklılık (I-J)	Standart Hata	Önem düzeyi (P)
1	3	0.64935*	0.10825	0.000
	5	0.93750*	0.10723	0.000
3	1	-0.64935*	0.10825	0.000
	5	0.28815*	0.10723	0.021
5	1	-0.93750*	0.10723	0.000
	3	-0.28815*	0.10723	0.021

*Uygulamalar arasındaki istatistiki farklılığı ifade eder ($p<0.05$)

Çizelge 5. Uygulamalara bağlı sürgünlerde görülen ortalama sürgün ağırlığı (g)

Uygulama (mg L^{-1}) BA	Örnek sayısı	Sürgün ağırlık (g) ortalaması	Standart hata
1	77	0.0999	0.00571
3	77	0.1016	0.00573
5	80	0.1085	0.00640
Total	234	0.1034	0.00344



Şekil 1- a) ½ MS ortamında *C. roseus* tohumunun çimlenmesi ile elde edilen bitkicikler b) 0.1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA ilaveli MS besin ortamında gözlenen kallus gelişimi c) 0.1 mg L^{-1} kinetin+2 mg L^{-1} 2,4-D ilaveli MS besin ortamında gözlenen kallus gelişimi d), e) ve f) sırasıyla; 1 mg L^{-1} BA, 3 mg L^{-1} BA ve 5 mg L^{-1} BA ilaveli MS ortamında gözlenen çoklu sürgünler (barlar: 1 cm).

Alkaloid Analizi

Kallusların alkaloid analizi

Bitki büyüme düzenleyicilerinin dört farklı kombinasyonunu içeren besin ortamında gelişen kalluslarda altı hafta sonra alkaloid analizi yapılmıştır. Tüm besin ortamlarında gelişen kallus ekstrelerinde görülen alkaloidler; triptofan (a), triptamin (b), ajmalisin (c) ve serpentin (d) olmak üzere dört farklı sınıf oluşturmuştur. Kontrol örneklerinde ise toprak üstü aksamında dört, kökte ise bunlara katarantin ilavesi ile beş sınıf belirlenmiştir (Çizelge 6).

1 mg L^{-1} BA+2 mg L^{-1} NAA içeren MS ortamında kotiledonlu hipokotil eksplantlarından gelişen kallus (I-A) ekstrelerinin alkaloidlerinde a (triptofan) ve c (ajmalisin) bileşikleri görülürken c alkaloidlerinin oranı a'nın yaklaşık 2 katı kadar bulunmuştur (Çizelge 6). Ancak aynı besin ortamında kök eksplantları kalluslarından (I-B) elde edilen ekstrelerin alkaloidleri ile kıyaslandığında b (triptamin) alkaloidi dikkate değer bir oranda (% 34.54) gözlenirken I-A'da bu alkaloide rastlanmamıştır. Çizelge 6'da I-A ve I-B kalluslarının c bileşeni farklı Rf değerlerinde bulunmasına karşılık 270 nm civarında UV max göstermesi aynı sınıf alkaloid olduğunu göstermektedir. 0.1 mg L^{-1} kinetin+2 mg L^{-1} 2.4D içeren MS ortamında (II) gelişen kotiledonlu hipokotil eksplantının ürettiği kalluların (II-A) ekstreleri ile aynı ortamdaki kök eksplantı kalluslarının (II-B) ekstreleri karşılaştırıldığında her iki eksplant tipi kalluslarında da 204 nm'de UV max veren aynı sınıf alkaloide rastlanılmıştır. Ancak bu alkaloidler ince tabaka kromatogrofisinde triptofan (a), triptamin (b), ajmalisin (c) sırasıyla II-A 'da 41.71, 17.79, 9.20, II-B'de 43.55, 27,60, 13.49 Rf değerinde gözlenmiştir. Bu ekstrelerde a, b, c olarak kodladığımız alkaloid bileşikleri oransal olarak çok düşük farklılıkla birbirinden ayrılmaktadır. Öyleki Çizelge 6'da görüldüğü üzere II-B'de a ve b bileşikleri II-A'ya göre yaklaşık % 1.5 kat kadar artarken II-B'de c ise % 3 kadar bir azalma göstermiştir. 0.1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA (III) besin ortamında kültüre alınan eksplantlardan da elde edilen kalluslarda 3 farklı alkaloide rastlanmıştır. Bu ortamda gelişen kotiledonlu hipokotil eksplantı kallusları (III-A) ekstrelerinde tespit edilen alkaloidlerden triptofan (a) % 19.5, triptamin (b) % 39.6 ve ajmalisin (c) % 40.9 bulunurken aynı büyüme düzenleyicileri ilaveli ortamda kök eksplantı kallusları (III-B) ekstrelerinde ise bu alkaloidler sırasıyla % 22.2 ve % 40.6 olarak bulunmuş, c (ajmalisin)'ye rastlanmamış ve III-A'da saptanmayan serpentin (c) bu örnekte % 37.2 bulunmuştur. Ayrıca a ve b bileşikleri kısmi olarak artarken serpentin % 3.7'lik oranda gözlenmiştir. 5 mg L^{-1} BA+ 2 mg L^{-1} NAA ilaveli MS ortamında da (IV) 3 farklı alkaloide rastlanmıştır. a,b,c kodu verdiğimiz bu üç bileşen kantitatif olarak incelendiğinde kök eksplantı kallusları (IV-B) ekstrelerinde kotiledonlu hipokotil eksplantı kallusları (IV-A) ekstrelerine göre a bileşiği (triptofan) % 1.5, c bileşiği (ajmalisin) % 15.3 oranında artarken b bileşiğinin (triptamin) miktarında % 16.9 oranında azalma gözlenmiştir.

Kontrol bitkilerinin toprak üstü aksamı (gövde+yaprak) ekstrelerinde (V-A) 4 farklı alkaloid tespit edilirken, kök (V-B) kısmından hazırlanan ekstrelerde ise 5 farklı bileşen gözlenmiştir. Gövde+yaprak ekstrelerindeki bileşenler kendi aralarında sırasıyla % 20.6, % 11.6, % 33.7 ve % 34.1 olarak tespit edilirken V-B'de (kök ekstreleri) sırasıyla % 22.5,% 42.1, % 12.1 ve % 13.5 olarak bulunmuştur. Kök ekstrelerinde c olarak kodladığımız ve katarantin olabileceğini düşündüğümüz bileşen UV max 220 nm'de % 16.8 olarak tespit edilirken bu bileşen gövde+yaprak ekstrelerinde tespit edilmemiştir. Özellikle V-B-d (ajmalisin) ve V-B-e (serpentin) oransal olarak dikkate değer miktarda azalma gösterirken V-B-b (triptamin) bileşiği ise kök ekstrelerinde % 31 oranında artmıştır.

Kalluslardan elde edilen ekstreler ve kontrol bitki ekstrelerinin alkaloid sınıflarını kendi aralarında bulunma oranları ile kıyasladığımızda;

Triptofan; En yüksek triptofan miktarı, 1 mg L^{-1} BA+ 2 mg L^{-1} NAA içeren MS ortamında kotiledonlu hipokotil eksplantı kalluslarından elde edilen ekstrelerden (% 36.21), en düşük ise % 19.5 olarak aynı eksplantın 0.1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA (III) ilaveli ortamda gelişen kalluslarının ekstrelerinde görülmüştür ve bu miktar, diğer ortamlarda bulunan miktarlar ile kontrol bitkilerinin sürgün kısmı ekstrelerindeki % 20.6 miktarına çok yakın ve biraz daha yüksek olmuştur. Triptamin alkaloidi, kontrol bitkilerinin kök kısmından elde edilen ekstrelerde % 42.1 olarak gözlenmiş ve 1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA (III) ilaveli MS ortamında kök eksplantı kallusları ekstrelerinde de buna çok yakın bir değer olarak % 40.6 bulunmuştur. Ayrıca, bu alkaloid aynı büyüme düzenleyicileri ilaveli besin ortamında kotiledonlu hipokotil eksplantları kallus ekstrelerinde % 39.6 oranında elde edilirken, kontrol bitkilerinin gövde+yaprak ekstrelerinde % 11.6 olarak çok düşük bulunmuştur. Ajmalisin indol alkaloidi ise, 1 mg L^{-1} BA+ 2 mg L^{-1}

NAA (I) ilaveli besin ortamlarında kotiledonlu hipokotil eksplantları elde edilen kallus ekstrelerinde % 63.79, kontrol bitkilerinin sürgün ekstrelerinde % 33.7 oranında gözlenmiştir. 2 mg L^{-1} NAA+ 5 mg L^{-1} BA (IV) ilaveli besin ortamında kök eksplantı kalluslarının ekstrelerinde ajmalicine alkaloidi % 54.6 iken kontrol bitkileri kök kısmından elde edilen ekstrelerde %12.1 olarak gözlenmiştir. Serpentin indol alkaloidi ise, 0.1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA ilaveli MS ortamında kök eksplantı kallusları ekstrelerinde % 37.2 oranda gözlenmiştir. Bu alkaloid, kontrol bitkilerin kök ekstrelerinde % 13.5, gövde+yaprak ekstrelerinde ise %34.1 oranında gözlenmiştir. Ayrıca kontrol bitkilerin kök kısmından elde edilen ekstrelerde katarantin alkaloidine de rastlanılmıştır (% 16.8).

Çizelge 6- Kültürlere göre kallus ekstrelerinin alkaloid sentezi

Bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonu–eksplant tipi–bileşenler*			Rf değeri	Miktar (g)	Oranlar (%)**
I	A	a-Triptofan	40.74	0.0002	36.21
		c-Ajmalisin	8.64	0.0012	63.79
	B	a- Triptofan	40.74	0.0012	30.08
		b-Triptamin	20.37	0.0015	34.54
		c- Ajmalisin	9.25	0.0019	35.37
II	A	a- Triptofan	41.71	0.0011	34.29
		b- Triptamin	17.79	0.0018	33.14
		c- Ajmalisin	9.20	0.002	32.56
	B	a- Triptofan	43.55	0.0012	35.49
		b- Triptamin	27.60	0.0017	34.97
		c-Ajmalisin	13.49	0.0013	29.52
III	A	a- Triptofan	73.65	0.0015	19.5
		b- Triptamin	40.11	0.0005	39.6
		c- Ajmalisin	18.56	0.0011	40.9
	B	a- Triptofan	75.30	0.002	22.2
		b- Triptamin	43.37	0.002	40.6
		c-Serpentin	19.27	0.0022	37.2
IV	A	a- Triptofan	78.91	0.0028	21.6
		b- Triptamin	47.59	0.001	39.4
		c- Ajmalisin	7.83	0.0017	38.9
	B	a- Triptofan	75.30	0.0003	23.1
		b- Triptamin	44.57	0.0028	22.3
		c- Ajmalisin	7.22	0.0035	54.6
V	A	a- Triptofan	83.55	0.0011	20.6
		b- Triptamin	65.83	0.0027	11.6
		c- Ajmalisin	48.44	0.0016	33.7
		d-Serpentin	9.93	0.0019	34.1
	B	a- Triptofan	85.62	0.003	22.5
		b- Triptamin	78.12	0.0039	42.1
		c-Katarantin	68.75	0.0034	16.8
		d- Ajmalisin	38.12	0.0023	12.1
		e-Serpentin	11.25	0.003	13.5

* **I:** 1 mg/l BA+2 mg/l NAA, **II:** 0.1 mg/l kinetin+2 mg/l 2.4-D,
III: 0.1 mg/l kinetin+1 mg/l NAA, **IV:** 5 mg/l BA+2mg/l NAA,
V: Kontrol. **A:** kotiledonlu hipokotil eksplantı, **B:** kök eksplantı.
** % olarak belirtilmek istenen, belirlenen alkaloidin eksplantta toplam oransal değeridir.

Çoklu sürgünlerde alkaloid analizi

Çoklu sürgün elde edilmesi için MS ortamına 3 farklı konsantrasyonda BA ilavesinden, 1 mg L^{-1} BA içeren ortamda gelişen çoklu sürgünlerde tespit edilen bileşenler ajmalicine, triptofan, triptamin, serpentine olmak

üzere kontrol bitkilerinde tespit edilenler ile aynı bileşenlerdir (Çizelge 7). 3 mg L^{-1} BA ve 5 mg L^{-1} BA ilaveli ortamlarda ise bu alkaloidlerden yalnızca triptamin alkaloidine rastlanmamıştır. Kontrol ile kıyaslandığında; Ajmalisin indol alkaloidi en yüksek 3 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamındaki çoklu sürgünlerde % 28.4 olarak belirlenmiş bunu 5 mg L^{-1} BA ilaveli ortamda gelişen çoklu sürgünlerin ajmalisin içeriği (% 24.7) izlemiştir (Kontrol % 18.4 ve 1 mg L^{-1} BA ilaveli ortam sürgünlerinde % 16.1). Triptofan indol alkaloidi de ajmalisin de olduğu gibi en yüksek 3 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamı sürgünlerinde (% 38) belirlenmiş bunu sırasıyla 5 mg L^{-1} BA ilaveli ortamda gelişen sürgünler (% 30.9), kontrol ve 1 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamı sürgünleri izlemiştir. Triptamin alkalloidi kontrol bitkilerinde % 21.4 iken 1 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamında gelişen sürgünlerde % 14.4 olarak gözlenmiştir. Serpentin alkaloidi ise en yüksek 1 mg L^{-1} BA ilaveli ortam sürgünlerinde (% 51.3) ve 5 mg L^{-1} BA ilaveli ortam sürgünlerinde (% 44.4) bulunmuştur. En düşük 3 mg L^{-1} BA ilaveli ortamda gelişen sürgünlerde (% 33.6) tespit edilmiştir (kontrol bitkilerinde % 40.2'dir).

Çizelge 7-Çoklu sürgün üretimi için yapılan uygulamalardaki alkaloid sentezi

Besin ortamı-	bileşenler	Rf değeri	Miktar (g)	Oranlar (%)**
Kontrol	Ajmalisin	75.15	0.0007	18.4
	Triptofan	58.18	0.0013	20.0
	Triptamin	42.42	0.0007	21.4
	Serpentin	14.54	0.0020	40.2
1 mg L^{-1} BA	Ajmalisin	74.54	0.0030	16.1
	Triptofan	61.81	0.0036	18.2
	Triptamin	33.93	0.0052	14.4
	Serpentin	5.45	0.0045	51.3
3 mg L^{-1} BA	Ajmalisin	72.72	0.0014	28.4
	Triptofan	49.09	0.0038	38.0
	Serpentin	10.30	0.0014	33.6
5 mg L^{-1} BA	Ajmalisin	72.72	0.0123	24.7
	Triptofan	53.33	0.0045	30.9
	Serpentin	9.69	0.0058	44.4

**: % olarak belirtilmek istenen; belirlenen alkaloidin eksplantta toplam oransal değeridir.

El-Sayed ve Verpoorte (2002), loganin ve triptamin öncülleri ile beslenen *C. roseus*'un hücre süspansiyon kültürlerinde büyümede ve terpenoid indole alkaloidlerinin birikiminde farklı fitohormonlarının etkisi üzerine yaptıkları çalışmada; 2,4-D, salisilik asit, methyl-jasmonate ve absisik asitin olduğunu belirlemişler ve bunlardan yalnızca methyl-jasmonate'in alkaloid birikimini arttırdığını, absisik asitin alkaloid birikimini artırmadığını ancak, sitrik asit katobolizmasını geciktirdiğini belirtmişlerdir. Piovan ve ark (2000), *C. roseus*'ta indol alkaloid üretimi ve somatik embriyogenesis ile ilgili çalışmalarında, embriyonik hücre hatlarında hızlı büyüme oranının yüksek alkaloid üretimi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Datta ve Srivastava (1997), *C. roseus*'un *in vivo* ve *in vitro* üretilen bitkilerin vinblastin üretimindeki farklılıklar ile ilgili çalışmalarında *in vivo*'ya oranla *in vitro*'da vinblastin üretiminin hızlı bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada da elde ettiğimiz indol alkaloid sınıflarını kendi aralarında kıyasladığımızda kontrol olarak belirtiğimiz *in vivo* ortamda yetişen bitki ekstrelerinde alkaloid oranının, *in vitro* kallus kültürleri ekstrelerindekilere oranla daha az olduğu görülmüştür (Çizelge 6 ve 7).

Carew ve Krueger (1977), 2,4-D ve IAA büyüme düzenleyicilerinin yanısıra çok sayıda besin faktörünün de *C. roseus*'un süspansiyon kültürlerinde büyüme ve alkaloid formasyonuna etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Büyüme ve alkaloid üretimi için optimal 2,4-D konsantrasyonunu 1 mg L^{-1} olarak belirlemişlerdir. Zhao ve ark. (2001b), *C. roseus*'un kallus kültürlerinde vindolin ve diğer indol alkaloidlerin biyosentezinde ışığın ve büyüme regülatörlerinin etkisini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada, vindolin biyosentezinin yanısıra diğer indol alkaloidlerin biyosentezi için *C. roseus*'un çok sayıdaki yaprak kalluslarından sabit ve iyi özellikli bir kallus hattı seçmişler ve bu hatta ışık ve büyüme düzenleyicilerinin asit ve bazik peroksidaz aktivitelerini etkilemesinin yanısıra vindolin ve diğer alkaloidlerin biyosentezini de kayda değer bir şekilde etkilediğini ayrıca plastid gelişimini ve peroksidaz aktivitesini teşvik ettiğini gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte 2,4-D'nin tüm indol alkaloidlerinin ve peroksidaz aktivitesinin biyosentezini durdurucu etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Ataei-Azimi ve ark. (2008), *C. roseus* tohumlarından elde ettikleri fidelelerden 0.1 mg L^{-1} NAA ve 0.1 mg L^{-1} kinetin içeren

besin ortamından elde ettikleri kalluslarda vindolin, katarantin ve vinkristin akaloidlerini belirlediklerini bildirmişlerdir. Zhao ve ark (2001c), *C. roseus*'tan yoğun kallus kümeleri oluşturmuşlar ve yoğun kallus kümelerinin normal hücre kültüründen yaklaşık 2 kat daha fazla indole alkaloidi içerdiğini gözlemlemişlerdir. Ortama KCl, mannitol ve çeşitli sentetik öncüllerin ve biyoregülatörlerin eklenmesi ile kallus kültürünün pazarlanabilir indol alkaloid üretimini arttırdığını gözlemlemişlerdir. Arvy ve ark (1994), *C. roseus* hücrelerinin alt kültürleri boyunca, kültür ortamından 2,4-D'nin uzaklaştırılmasının büyümede etkisiz olduğunu ancak alkaloid birikimini arttırdığını ve büyümeden ziyade alkaloid birikiminin 2,4-D'ye daha fazla duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda 2.4-D ilaveli besin ortamında kültüre alınan kök ve kotiledonlu hipokotillerden üretilen kallusların ekstrelerinde triptofan alkaloidinin oranı (sırasıyla % 35.49 ve % 34.29) kontrol bitkileri kök ve sürgünlerindekinden (sırasıyla % 22.5 ve % 20.6) daha yüksek bulunmuş olup aynı zamanda diğer büyüme düzenleyicilerinin ilave edildiği ortamlarda gelişen kallus ekstrelerindekinden de yüksek bulunmuştur (Çizelge 6). *C. roseus*'un kök eksplantlarının karanlıkta ve yüksek konsantrasyonda IBA içeren ortamdaki kültürlerinde katarantin ve ajmalisin gibi indol alkaloidlerinin ana bitkininkine eşit miktarda olduğu belirtilmiştir (Sökmen ve Gürel 2001). Bu çalışmada ise ajmalisin, BA + NAA ilaveli MS ortamında kültüre alınan eksplantların kallus ekstrelerinde *in vivo* yetiştirilen bitkilerdekine oranla daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç

Bu çalışmada, *C. roseus*'un farklı besin ortamlarında kallus üretimi sağlanmış, en başarılı kallus gelişimi 0.1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA ve 0.1 mg L^{-1} kinetin+2 mg L^{-1} 2.4-D ilaveli besin ortamında görülmüştür. Çoklu sürgün üretimi için MS ortamına üç farklı BA ilavesinden, 1 mg L^{-1} BA ilaveli ortamda gelişen çoklu sürgünlerde kontrol bitkilerindekiler ile aynı alkaloidler gözlenmiştir. *C. roseus* bitkisinde bulunan triptofan, triptamin, ajmalisin ve serpentin adlarıyla bilinen indol alkaloidleri incelenmiştir. Kısmi değişiklikler olmakla birlikte bütün örneklerde triptofan, triptamin ve ajmalisin rastlanılmıştır. Serpentin ise 0.1 mg L^{-1} kinetin+1 mg L^{-1} NAA besin ortamının kök eksplantlarında gelişen kallus ekstrelerinde ve kontrol bitkilerinin kök ve sürgün kısımları ekstrelerinde gözlenmiştir. Çoklu sürgünlerde belirlenen alkaloidler triptofan, triptamin, ajmalisin ve serpentindir. Bu alkaloidlerden triptamin alkaloidine yalnızca kontrol ve 1 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamında gelişen sürgünlerde rastlanmıştır ve en yüksek 1 mg L^{-1} BA ilaveli besin ortamında gelişen sürgünlerde gözlenmiştir (%51.3).

Kaynaklar

Akçam E, Yürekli AK (1995). Effect of different nutrient media and explant sources on callus induction of *Catharanthus roseus* L. G. Don plant. Turkish Journal of Botany, (19): 569-572.

Almagro L, Fernandez-Perez F, Pedreno MA (2015). Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human helath. Molecules 20:2973-3000.

Arvy MP, Imbault N, Naudascher F, Thiersault M, Doircau P (1994). 2.4 D and alkaloid accumulation in periwinkle cell suspensions. Biochimie 76(5): 410-416.

Ataei-Azimi A, Hashemloian BD, Ebrahimzadeh H, Majd A (2008). High *in vitro* production of ant-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. African Journal of Biotechnology 7(16): 2834-2839.

Carew DP, Krueger RJ (1977). *Catharanthus roseus* tissue culture: the effects of medium modifications on growth and alkaloid production. Lloydia 40(4): 326-336.

Collu G, Ünver N, Peltenburg-Looman AMG, Vander Heijden R, Verpoorte R, Memelink J (2001). Gereniol 10-hydroxylase a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. FEBS Letters, 508(2): 215-220.

Datta A, Srivastava PS (1997). Variation in vinblastine production by *Catharanthus roseus*, during *in vivo* and *in vitro* differentiation. Phytochemistry, 46(1): 135-137.

Döller G, Alfermann AW, Reinhard E (1976). Production of indole alkaloids in tissue cultures of *Catharanthus roseus*. Planta Medica 30(1): 14-20.

El-sayed M, Verpoorte R (2002). Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* cell suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin. Plant Cell Tissue and Organ culture, 68(3): 265-270.

Franklin CI, Dixon RA (1993). Initiation and maintenance of callus and cell süspension cultures. Plant Cell Culture A. Practical Approach. (Eds. Dixon RA, Gonzales RA), Oxford University Press, Oxford Newyork, Tokyo, Second edition, pp:1-25.

Gajalakshmi S, Vijayalakshmi S and DeviRajeswari V (2013). Pharmacological activities of *Catharanthus*

roseus: A perspective review. Int J Pharm Bio Sci Apr; 4(2): (P) 431 – 439.

Hoopen HJG, Vinke JL, Moreno PRH, Verpoorte R, Heijnen JJ (2002). Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharanthus roseus* suspension cultures. Enzyme and Microbial Technology, 30: 56-65.

Iskandar NN, Iriwati (2016). Vinblastine and Vincristine Production on Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) Callus Culture Treated with Polethylene Glycol. Makara Journal of Science, 20(1): 7-16.

Islam MR, Hossain SN, Munshi MK, Hakim L, Hossam M (2001). *In vitro* regeneration of plantlets from shoot tip and nodal segments in Nayantara (*Catharanthus roseus* L.). Plant Tissue Culture 11(2): 173-179.

Kaya N, Lockwood B (1999). A study of the alkaloids in callusing plant tissues from a range of Turkish cultivars of Papaver somniferum Turkish Journal Agriculture and Forestry 23(4): 377-381.

Kutney JP, Cinoi LSL, Kolodziejczyk P, Sleigh SK, Stuart KL, Worth BR, Kurz WG W, Chartson KB, Constabel F (1980). Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures: Isolation and Charac. Of alkaloid from one cell line. Phytochemistry 19: 2589-2595.

Kutney JP, Aweryn B, Choi LSL, Honda T, Kolodziejczyk P, Lewis NG, Sato T, Sleigh SK, Stuart KL, Worth BR, Kurz WGW, Chatson KB, Constabel F (1983). Studies in plant tissue culture: The synthesis and biosynthesis of indole alkaloids. Tetrahedron 39(32): 3781-3795.

Murashige T, Skoog F (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 9:8-11.

Piovan A, Filippini R, Caniota R, Dalla Vecciha F, Innocenti G, Coppelleti EM, Puricelli L (2000). Somatic embriyogenesis and indole alkaloid production in *Catharanthus roseus*. Plant Biosystems, 134(2): 179-184.

Singh R, Kharb P, Rani K (2011). Rapid Micropropagation and Callus Induction of *Catharanthus roseus in vitro* using different explants. World Journal Agricultural Sciences 7 (6):699-704.

Sökmen A, Gürel E (2001). Secondary metabolit production. p.211-261 In: Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. (eds), Biotechnology of Plant: Plant Tissue Culture and Application, Selçuk University of Publications, Konya, Turkey.

SPSS (2009). Statistical Packages for Social Sciences sürüm 22.00

Thomas JC, Akroush AM, Adamus G (1999). The indole alkaloid tryptamine produced in transgenic *Petunia hybrida*. Plant Physiol Biochem 37(9): 665-670.

Tiong SH, Looi CY, Hazni H, Arya A, Paydar M, Wong WF, Cheah SH, Mustafa MR, Awang K (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *C. roseus* (L.) G. Don. Molecules. 18: 9770-9784.

Tikhomiroff C, Jolicoeur M (2002). Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolites by high performance liquid chromatography. Journal of Chromotography A. 955: 87-93.

Van der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W, Hallrd D, Verpoorte R (2004). The *Catharanthus* Alkaloids: Pharmacognosy and Biotechnology. Current Medicinal Chemsitry 11: 607-628.

Verma AK, Singh RR, Singh S (2012). Improved alkaloid content in callus culture of *Catharanthus roseus*. Botanica Serbica 36(2):1 23-130.

Yahia A, Kevers C, Gaspar T, Chenieux JC, Rideau M, Creche J (1998). Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. Plant Science (133): 9-15.

Yokaş İ, Tuna AL, Bürün B, Altunlu H, Altan F, Kaya C (2008). Responses of the Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Plant to Exposure to Different Salt Forms and Rates. Turkish J Agric For 32:319-329.

Zhao J, Zhu WH, Hu Q (2001a). Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture. Enzyme and Microbial Technology 28: 666-672.

Zhao J, Zhu WH, Hu Q (2001b). Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. Plant Growth Regulation 33(1): 43-49.

Zhao J, Hu Q, Guo YQ, Zhu WH (2001c). Effects of stress factors, bioregulators and systhetic precursors on indole alkaloid production in compact callus cultures of *Catharanthus roseus*. Applied Microbiology and Biotechnology 55 (6): 693-698.