



Tarım Bilimleri Dergisi
Tar. Bil. Der.

Dergi web sayfası:
www.agri.ankara.edu.tr/dergi

Journal of Agricultural Sciences

Journal homepage:
www.agri.ankara.edu.tr/journal

***Gentiana olivieri* Griseb.’in Kallus Kültürlerinin Kurulması ve Sekonder Metabolitlerin Araştırılması**

Canan YAĞCI TÜZÜN^a, Mehmet CİHAT TOKER^a, Gülnur TOKER^b

^a Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tandoğan, Ankara, TÜRKİYE

^b Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognози Anabilim Dalı, 06330, Etiler, Ankara, TÜRKİYE

ESER BİLGİSİ

Araştırma Makalesi — Bitkisel Üretim

Sorumlu Yazar: Canan YAĞCI TÜZÜN, E-posta: yagcicanan@gmail.com, Tel: +90 (312) 343 10 50 / 1397

Geliş Tarihi: 8 Ekim 2009, Düzeltmelerin Gelişi: 17 Haziran 2013, Kabul: 17 Haziran 2013

ÖZET

Gaziantep yöresinde Afat olarak bilinen *Gentiana olivieri*'nin herbası, halk arasında iştah açıcı, sindirime yardımcı, antidiyabetik, antianemik, antihepatotoksik ve sakinleştirici olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *in vitro* çimlendirilen *G. olivieri*'den alınan kök ve yaprak eksplantlarının karanlıkta kallus üretim kapasitesi araştırılmıştır. WPM ve MS ortamlarına kallus dokusu oluşumunu uyarmak için 0.5 mg L⁻¹ BAP - 1 mg L⁻¹ NAA ile 0.2 ve 0.5 mg L⁻¹ Kinetin - 1 mg L⁻¹ NAA kullanılmıştır. Kalluslar her 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Kallus miktarındaki artışı belirlemek için kallus büyüme indeksi hesaplanmıştır. En iyi kallus gelişimi yaprak eksplantında, 0.5 mg L⁻¹ BAP -1 mg L⁻¹ NAA içeren WPM'de eksplant ekimini takiben 4 hafta sonra gözlenirken, kök eksplantında ise 0.2 mg L⁻¹ Kinetin- 1 mg L⁻¹ NAA içeren MS ortamında, 8 hafta sonra gözlenmiştir. Yaprak eksplantından WPM'de üç alt kültür süresince oluşan kalluslar, metanol ile ekstre edilmiştir. Sekonder metabolitler ince tabaka kromatografisiyle (İTK) incelenmiştir. Plaklarda, iridoit yapısında olduğu düşünülen lekeler gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Gentiana olivieri*; Kallus kültürü; Kallus büyüme indeksi; Sekonder metabolit üretimi

Establishment of Callus Cultures of *Gentiana olivieri* Griseb. and Investigation of Secondary Metabolites

ARTICLE INFO

Research Article — Crop Production

Corresponding Author: Canan YAĞCI TÜZÜN, E-mail: yagcicanan@gmail.com, Tel: +90 (312) 343 10 50 / 1397

Received: 8 October 2009, Received in Revised Form: 17 June 2013, Accepted: 17 June 2013

ABSTRACT

Flowered herba of *Gentiana olivieri* which is known as Afat in Gaziantep region is used in traditional folk medicine as appetizer, digestive aid, antidiabetic, antianemic, antihepatotoxic and antidepressant. In this study, callus production capacity of root and leaf explants obtained from *in vitro* germinated seeds of *G. olivieri* were investigated in dark.

WPM or MS medium containing 0.5 mg L⁻¹ BAP - 1 mg L⁻¹ NAA or 0.2 and 0.5 mg L⁻¹ Kinetin-1 mg L⁻¹ NAA were used for stimulating the induction of callus tissue. The calli were subcultured every 4 weeks. Callus growth index was calculated for determination of increasing the callus quantity. The best callus growths were observed in leaf explants formed on WPM containing 0.5 mg L⁻¹ BAP - 1 mg L⁻¹ NAA after 4 weeks followed by explants sowing and in root explants formed on MS medium containing 0.2 mg L⁻¹ Kinetin - 1 mg L⁻¹ NAA after 8 weeks of culture. Calli which were induced on leaf explants grown on WPM during three subcultures were extracted with methanol. Secondary metabolites were investigated by thin layer chromatography (TLC). Spots, which were expected to have iridoidal structure, were observed on TLC plates.

Keywords: *Gentiana olivieri*; Callus culture; Callus growth index; Secondary metabolite production

© Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

1. Giriş

Gentiana olivieri Griseb. (Gentianaceae) 350-2300 m yükseklikte, killi, kireçli, marnlı topraklarda ve nemli otlaklarda yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir (Pritchard 1978). Gaziantep yöresinde Afat olarak bilinen bitkinin çiçekli toprak üstü kısımları halk arasında kan şekerini düzenleyici, yara iyileştirici, antianemik, antihepatotoksik, sakinleştirici ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop 1984; Başer et al 1986; Ersöz & Çalış 1991; Deliorman Orhan et al 2003; Sezik et al 2005). Yapılan araştırmalarda *G. olivieri*'nin metanollü ekstresinin yüksek antidiyabetik özellik gösterdiği ve bu özelliğin de bir flavonoit olan izoorientinden kaynaklandığı bulunmuştur (Aslan 2000). Yapılan çok sayıda çalışma sonucunda Gentianaceae familyasına dahil bitkilerde iştah açıcı ve sindirime yardımcı olduğu bilinen iridoit ve sekoiridoitler; antidiyabetik, antihepatotoksik, antianemik özellikleri bulunan flavonoitler ile antihipertansif özelliği bulunan alkaloidler saptanmıştır. (Tan et al 1998; Mansoor et al 2004). Bu özellikler seneler önce fark edilerek özellikle Çin geleneksel tedavi sisteminde kullanıldığı bilinmektedir (Yang 2001).

İçerdikleri ilaç hammaddelerinin yanında gösterişli çiçeklere sahip olan ve Gentian genel ismiyle anılan bu bitkiler, Avrupa ve Uzakdoğu ülkeleri başta olmak üzere birçok ülkede saksı çiçeği ve kesme çiçek olarak da tüketilmektedir. Tüm bu kullanım alanları nedeniyle bazı Gentian'ların nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalmış ve korumaya alınmıştır. Türkiye'de de *G. lutea*, 2008 yılından itibaren toplanması ve ihracatı yasaklanan

20 bitki türü içinde yer almaktadır (RG 2013). Gentianlar üzerinde *in vitro* organogenez (Butiuc-Keul et al 2005); somatik embriyogenez (Bach & Pawlowska 2003; Fiuk & Rybczynski 2008); kallus (Morgan et al 1997; Momcilovic et al 1997), hücre süspansiyon (Chueh et al 2000) ve protoplast kültürü (Meng et al 1996) ile rejenerasyon ve mikroçoğaltım vb. çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, *G. olivieri*'den alınan kök ve yaprak eksplantlarının farklı besin ortamı ve büyüme düzenleyicilerinin etkisi ile kallus oluşturabilme kapasitesini gözlemlemek ve elde edilen kalluslarda üretilen sekonder metabolitleri ince tabaka kromatografisiyle (İTK) araştırmaktır.

2. Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan *G. olivieri* tohumları Gaziantep açık piyasadan satılan kurutulmuş bitkilerden alınmıştır. Bitkinin teşhisi Ankara Üniversitesi Herbariyumu'nda yapılmış ve bir örnek Herbariyum'a verilmiştir (08CYT01). Tohumlar *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş ve elde edilen fideliklerden alınan kök ve yaprak eksplantları kullanılmıştır.

2.1. *In vitro* çimlendirme

In vitro çimlendirme için 10 mg L⁻¹ myo-inositol, 0.04 mg L⁻¹ tiyamin HCl, 30 g L⁻¹ sükröz ve 8 g L⁻¹ agar içeren MS (Murashige & Skoog 1962) besin ortamı kullanılmıştır. Çimlenmeyi teşvik için MS ortamına 0.2 mM GA₃ eklenmiştir. Ekilen tohumlar 3000 lux ışık şiddetinde 24-25°C'de 8 hafta inkübe edilmiştir (Momcilovic et al 1997; Yağcı 2005).

2.2. Kallus kültürü

In vitro çimlendirilen fidelerden kök ve yaprak eksplantları alınarak kallus geliştirme ortamlarında kültüre alınmıştır. Kallus üretme çalışmaları için *in vitro* çimlenmede kullanılan MS ortamı ile 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 0.5 mg L⁻¹ piridoksin HCl, 2 mg L⁻¹ glisin, 20 g L⁻¹ sükröz ve 8 g L⁻¹ agar içeren Woody Plant Medium-WPM (Lloyd & McCown 1980) besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlara NAA, BAP ve Kinetin büyüme düzenleyicileri eklenmiştir (Çizelge 1).

Çalışmada kullanılan tüm büyüme düzenleyiciler otoklavdan önce eklenmiştir. 1 M HCl/1 M NaOH ile pH, 5.8'e ayarlanmış ve ortamlar 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir. 10 cm çapında cam petrilere yaprak 5-6, kökten ise 5 adet eksplant ekilmiştir. İnkübasyon karanlıkta ve 24-25°C'de gerçekleştirilmiştir.

Eksplant kültürü (ilk 4 hafta) ve kallus oluşumu aşaması (ikinci 4 hafta) sonrasında gelişimlerine devam eden kalluslar, her 4 haftada

bir aynı içeriğe sahip taze ortamlara aktararak alt kültüre alınmıştır. Bu şekilde ilk kallus kültürü denemesinde kök ve yaprak eksplantından oluşan kalluslar 3 alt kültür boyunca izlenmiştir. Her alt kültüre aktarım aşamasında kallusların ağırlıkları tartılmış ve bir miktar kallus ayrıca tartılarak analiz için derin dondurucuya alınmıştır. Kallusların yaş ağırlıklarına göre gelişiminin izlenmesi için kallus büyüme indeksi (KBİ) hesaplanmıştır (Memişoğlu 2005). Deneyle üç tekrarlı tasarlanmıştır.

2.3. Kallusların ekstraksiyonu ve kromatografik analiz (İTK)

1., 2. ve 3. alt kültür sonunda elde edilen kalluslar, yapısındaki sekonder metabolitlerin bozulmaması için analiz edilene kadar -20°C'de dondurulmuştur. Derin dondurucudan alınan kalluslar, liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulan ve ezilerek toz haline getirilen kalluslar (0.1 g), %80'lik metanol ile 10 dakika ultrasonik banyoda, ardından 1 saat 50°C'lik su banyosunda ve tekrar 10 dakika ultrasonik banyoda bekletilip süzülerek ekstratlar hazırlanmıştır.

Çizelge 1- MS ve WPM ortamlarına ekilen yaprak (Y) ve kök (K) eksplantlarının Kallus Büyüme İndeksleri (KBİ)

Table 1- Callus Growth Index of leaf and root explants which were sown on MS and WPM media

Ortamlar	Eksplant tipi	Büyüme düzenleyiciler (mg L ⁻¹)			Kallus büyüme indeksi (KBİ)			
		NAA	BAP	Kinetin	K	1 ^a	2 ^b	3 ^c
MS1Y*	Yaprak	1	0.5	-	38.63	3.09	1.88	2.38
MS2Y	Yaprak	1	-	0.5	39.58	3.86	2.06	2.4
MS3Y	Yaprak	1	-	0.2	46.25	3.22	2.33	2.49
WPM1Y	Yaprak	1	0.5	-	59.52	11.9	1.73	1.71
WPM2Y	Yaprak	1	-	0.5	48.51	5.67	2.18	2.34
WPM3Y	Yaprak	1	-	0.2	48.21	3.27	1.81	2.27
MS1K	Kök	1	0.5	-	7.7	14.78	2.58	1.82
MS2K	Kök	1	-	0.5	4.15	16.17	3.23	2.2
MS3K	Kök	1	-	0.2	8.51	17	2.41	2.67
WPM1K	Kök	1	0.5	-	6.14	4.36	3.37	3.77
WPM2K	Kök	1	-	0.5	7.35	4.09	2.24	1.94
WPM3K	Kök	1	-	0.2	6.89	8.71	3.28	2.36

*, 1 mg L⁻¹ NAA ve 0.5 mg L⁻¹ BAP içeren MS ortamında yaprak eksplantı

K, Kallus oluşumu (ilk 4 hafta); 1^a, birinci alt kültür; 2^b, ikinci alt kültür; 3^c, üçüncü alt kültür.

G. olivieri herba ekstresi de aynı yöntemle hazırlanmıştır. Bu ekstratlar flavonoid yapısındaki izoorientin, izoviteksin ve viteksin standartları ile birlikte İTK'ya uygulanmıştır. İTK'da Silikagel 60 plaklar (Merck, Germany) ile Etil asetat: Formik asit: Asetik Asit: Su (100:11:11:27) solvan sistemi kullanılmıştır. Revelatör olarak plaklara flavonoidler için Naturstoff reaktifi (NA) ve iridoitler için % 30'luk H₂SO₄ püskürtülüp 100°C'de 5 dk. bekletilmiştir. Lekeler UV₃₆₆ ve günışığında gözlenerek değerlendirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Kallus kültürü

Çalışmamızda *G. olivieri* tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ile elde edilen kök ve yaprak eksplantlarında kallus oluşumunun en iyi olduğu ortam, büyüme düzenleyicisi ve kallus büyüme indeksi (KBİ) (Çizelge 1) belirlenmiştir. Yaprak eksplantının cevabı her iki ortam tipi için ilk 4 haftalık periyotta (kallus oluşum aşaması) hem kallus artışı hem de büyüme hızı bakımından kök eksplantına göre daha iyi bulunmuştur. Buna karşılık kök eksplantından oluşan kallusların miktarı ve büyüme hızları, 1. alt kültür sonunda (ekimden 8 hafta sonra) artışa geçmiştir. Yaprak eksplantında 1. alt kültür, kök eksplantında ise 2. alt kültürden sonra kallus artışı ve büyüme hızları genellikle düşüşe geçmiş veya sabit kalmıştır (Çizelge 1).

Kallus artışının en yüksek olduğu kallus oluşumu aşamasında, yaprak eksplantından elde edilen kalluslarda, WPM ortamının MS ortamına göre daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Buna karşın kök eksplantından oluşan kalluslarda, 1. alt kültürden sonra MS ortamının WPM ortamına göre daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur (Çizelge 1).

Bu çalışma ile toprak üstü (yaprak) ve toprak altı (kök) eksplantlarının sabit konsantrasyonda oksin (NAA) ve değişken konsantrasyonda sitokinin (BAP ve Kinetin) içeren iki farklı ortama verdikleri tepkiler araştırılmıştır. Sitokininler ve konsantrasyonları kallus artışını da etkilemiştir. 0.5 mg L⁻¹ BAP içeren

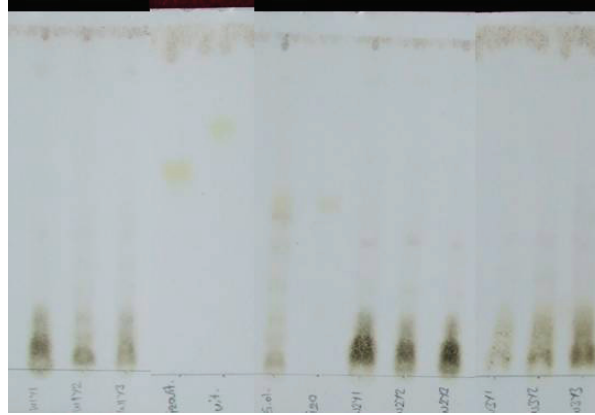
WPM1 ortamında, ilk 4 haftada yapraktan gelişen kallus dokusu, çalışmamızda doku kültürüne en hızlı cevap veren ortam olmuştur. MS1 ve WPM1 ortamlarında, yapraklardan gelişen kallus dokusu artışında oldukça önemli bir fark vardır (KBİ: 38.63 ve 59.52). MS ve WPM ortamlarında ilk 4 haftada gelişen kallusların artışına bakıldığında, WPM'nin kallus gelişiminde MS ortamına göre daha başarılı görülmektedir. Kinetin kullanılan MS2 ve WPM2 ortamlarında ise yaprak eksplantında WPM2 daha başarılı olmuştur (KBİ: 48.51). MS3 ve WPM3 ortamlarında kallus büyüme indeksleri arasında fark görülmemiştir (Çizelge 1).

MS ortamlarında, kökten elde edilen kalluslarda, kallus oluşumu aşamasına göre 1. alt kültürde 2 ila 3.9 kat artış sağlamış ardından düşüş olmuştur. WPM'de ise kallus büyüme indeksi ilk 4 haftadan sonraki alt kültürlerde biraz düşmüş ve sabit kalmıştır (Çizelge 1).

3.2. Kromatografik analiz (İTK)

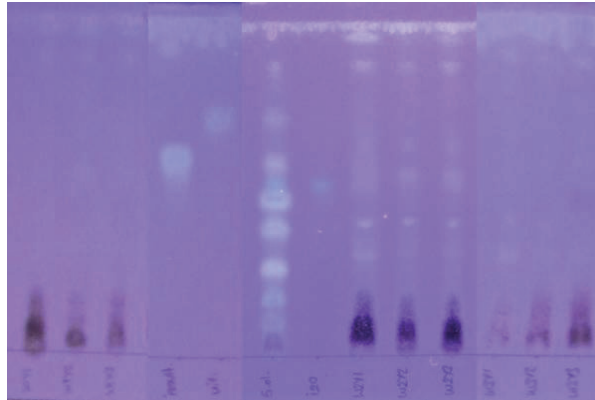
Önceki çalışmalarda *G. olivieri* herbasında flavonoidlerin varlığı tespit edilmiştir (Aslan 2000; Edis 2003). Çalışmamızda elde edilen kallusların İTK'sı sonucu, karanlıkta gelişen kalluslarda flavonoid grubundan olan izoorientin, izoviteksin ve viteksin tespit edilmemiştir. Plaklara H₂SO₄ çözeltisi püskürtülünce meydana gelen kahve-viyole renkli lekelerden dolayı iridoit ve sekoiridoit yapıları bileşiklerin üretildiği düşünülmektedir (Şekil 1 ve 2). Özellikle WPM2 ortamında gelişen kalluslarda üretilen sekonder metabolit miktarının (lekelerin koyuluğu) daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 1 ve 2).

Gentianaceae familyasındaki türler üzerinde doku kültürü yöntemleri kullanılarak genellikle sekoiridoitler üretilmektedir. Menkovic et al (2000a), *in vitro* kültür ile elde edilen *G. lutea*'nın gövde, kök ve saçak köklerindeki sekoiridoit ve γ-piron bileşiklerin kantitatif belirlenmesi için çalışma yapmışlardır. Chueh et al (2000) Çin halk tıbbında *G. davidii* var. *formosana*'dan elde edilen ve Long-Dan adıyla kullanılan ilacın etken maddeleri olan gentiopikrozit ve svertiamarinin büyük ölçülerde üretilebilmesi, bu sayede bitkinin



Şekil 1- WPM ortamında gelişen yaprak kaynaklı kalluslardan elde edilen ekstrelerin, gün ışığında görüntülenen İTK kromatogramı (Plaklara H_2SO_4 püskürtülmüştür) (tatbikler soldan sağa sırasıyla W1Y1-W1Y2-W1Y3- izoviteksin-viteksin-G. *olivieri* herba ekstresi-izoorientin W2Y1-W2Y2-W2Y3-W3Y1-W3Y2-W3Y3. Örnek kodlama; W1Y1- WPM1 ortamında 1. alt kültürde gelişen yaprak kaynaklı kalluslar)

Figure 1- TLC chromatogram of extracts obtained from leaf derived callus grown on WPM medium, viewed in daylight (H_2SO_4 was sprayed on TLC plates) (The order of application is left to the right; W1Y1-W1Y2-W1Y3- isovitexin-vitexin-G. *olivieri* herba extract- isoorientin-W2Y1-W2Y2-W2Y3-W3Y1-W3Y2-W3Y3. Sample coding; W1Y1- Leaf derived calli grown on WPM1 medium in the first sub-culture)



Şekil 2- WPM ortamında gelişen yaprak kaynaklı kalluslardan elde edilen ekstrelerin, UV₃₆₆'da görüntülenen İTK kromatogramı (Plaklara H_2SO_4 püskürtülmüştür) (Tatbikler soldan sağa sırasıyla W1Y1-W1Y2-W1Y3-izoviteksin-viteksin-G. *olivieri* herba ekstresi-izoorientin-W2Y1-W2Y2-W2Y3-W3Y1-W3Y2-W3Y3. Örnek kodlama; W1Y1- WPM1 ortamında 1. alt kültürde gelişen yaprak kaynaklı kalluslar)

Figure 2- TLC chromatogram of extracts obtained from leaf derived callus grown on WPM medium, viewed in UV₃₆₆ (H_2SO_4 was sprayed on TLC plates) (The order of application is left to the right; W1Y1-W1Y2-W1Y3- isovitexin-vitexin-G. *olivieri* herba extract- isoorientin-W2Y1-W2Y2-W2Y3-W3Y1-W3Y2-W3Y3. Sample coding; W1Y1- Leaf derived calli grown on WPM1 medium in the first sub-culture)

doğal yaşamının korunması amacıyla süspansiyon kültürü yapmışlardır. Devic et al (2006), yaptıkları çalışmada *G. asclepiadea*'yı *in vitro* çoğaltmışlar ve elde ettikleri bitkilerdeki ksanton yapısındaki mangiferin ve sekoiridoit yapısındaki gentiopikrozit miktarını belirlemişlerdir. Buna göre kültüre alınan bitkilerde sitokininlerin varlığında mangiferin ve gentiopikrin birikiminin doğal gelişen bitkilere göre dikkate değer biçimde uyarıldığını gözlemişlerdir.

4. Sonuçlar

Çalışmamızda yaprak eksplantında en fazla kallus artışı, ilk 4 haftalık periyotta 1 mg L⁻¹ NAA ve 0.5 BAP içeren WPM ortamında (WPM1) gözlenmiştir. Kök eksplantında ise eksplant ekimini takiben 8 hafta sonra yani 1. alt kültürde MS ortamlarında kallus artışları fazla bulunmuştur (Çizelge 1). Bu sonuçlara göre WPM ortamı, yaprak eksplantında kallus oluşumunu daha çok uyarırken kök eksplantından kallus oluşumunda MS ortamı daha etkili olmuştur. İTK'da oluşan lekelerle göre, karanlıkta inkübe edilen kalluslarda flavonoit yapısında maddeler yerine, iridoit karakterindeki maddelerin üretildiği düşünülmektedir.

Flavonoit yapısındaki maddelerin genellikle topraküstü organlarda daha çok bulunması nedeniyle flavonoit üretimi için yapılacak ileri çalışmalarda inkübasyonun aydınlıkta yapılması önerilebilir. İridoit ve sekoiridot yapısındaki maddelerin iştah açıcı ve mide rahatsızlıklarını azaltıcı etkilerinden dolayı bu maddelerin üretimi ve artırılması yönünde çalışmalar da yapılabilir (Menkovic et al 2000a; Chueh et al 2000; Devic et al 2006).

Kaynaklar

- Aslan M (2000). Şeker Hastalığına Karşı Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış), Ankara
- Bach A & Pawlowska B (2003). Somatic Embryogenesis in *Gentiana pneumonanthe* L. *Acta Biologica Cracoviensia* **45** (2): 79-86

- Başer K H C, Honda G & Miki W (1986). Herb Drugs and Herbalists in Turkey, *Studia Culturae Islamicae* **27**, Tokyo
- Baytop T (1984). Türkiyede Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3255, İstanbul, s.194-195
- Butiuc-Keul A, Şuteu A & Deliu C (2005). *In vitro* Organogenesis of *Gentiana punctata*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* **33** (1): 38-41
- Chueh F, Chen C & Tsay H (2000). Studies on Factors Affecting the Establishment of *Gentiana davidii* var. *formosana* (Hayata) T.N. Ho Cell Suspension Cultures. *Journal of Food and Drug Analysis* **8** (4): 297-303
- Deliorman Orhan D, Aslan M, Aktay G, Ergun E, Yesilada E & Ergun F (2003). Evaluation of Hepatoprotective Effect of *Gentiana olivieri* Herbs on Subacute Administration and Isolation of Active Principle. *Life Sciences* **72**: 2273-2283
- Devic M, Momcilovic I, Krstic D, Maksimovic V & Konjevic R (2006). *In vitro* Multiplication of Willow Gentian (*Gentiana asclepiadea* L.) and the Production of Gentiopicroside and Mangiferin. *Phyton* **46** (1): 45-54
- Edis M (2003). Türkiye'de Yetişen Bazı *Gentiana* L. Türlerinin İzootentin Yönünden Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış), Ankara
- Ersöz T & Çalış İ (1991). C-Glucosylflavones from *Gentiana olivieri*. *Hacettepe University, Journal of Faculty of Pharmacy* **11** (1): 29-36
- Fiuk A & Rybczynski J J (2008). Genotype and Plant Growth Regulator-dependent Response of Somatic Embryogenesis from *Gentiana* spp. Leaf Explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **44**: 90-99
- Lloyd G & McCown B H (1980). Commercially Feasible Micropropagation of the Mountain Laurel, *Kalmia latifolia* Linn. by Using Shoot-tip Culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society* **30**: 421-427
- Mansoor A, Zaidi M I, Hyder M & Rasheed R (2004). Antihypertensive Effect of *Gentiana olivieri*. *Journal of Medical Sciences* **4** (3): 176-178
- Memişoğlu M (2005). *Ecballium elaterium* Bitkisinde Hücre Süspansiyon Kültürü Tekniği ile Sekonder Metabolit (Kukurbitasin B) Üretimi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış), Ankara

- Meng Y, Gao Y & Jia J (1996). Plant Regeneration from Protoplasts Isolated from Callus of *Gentiana crassicaulis*. *Plant Cell Reports* **16**: 88-91
- Menkovic N, Savikin-Fodulovic K, Momcilovic I & Grubisic D (2000 a). Quantitative Determination of Secoiridoid and γ -Pyrone Compounds in *Gentiana lutea* Cultured *in vitro*. *Planta Medica* **66**: 96-98
- Morgan E R, Butler R M & Bicknell R A (1997). *In vitro* Propagation of *Gentiana cerina* and *Gentiana corymbifera*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **25**: 1-8
- Momcilovic I, Grubisic D & Neskovic M (1997). Micropropagation of Four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **49**:141-144
- Murashige T & Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* **15**: 473-497
- Pawlowska B& Bach A (2003). *In vitro* Propagation of Protected Species *Gentiana pneumonanthe* L. for Ornamental Horticultural Use. *Folia Horticulturae* **15** (1): 113-122
- Pritchard N M (1978). *Gentiana* L. In: H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and East Eagean Islands*, vol 6, Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 183-190
- R G (2013). Doğal Çiçek Soğanlarının 2013 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğ. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2012/12/20121206-16.htm> (Erişim tarihi:2013)
- Tan R X, Kong L D & Wei H X (1998). Secoiridiod Glycosides and An Antifungal Anthranilate Derivative from *Gentiana tibetica*. *Phytochemistry* **47**: 1223-1226
- Sezik E, Aslan M, Yesilada E & Ito S (2005). Hypoglycaemic Activity of *Gentiana olivieri* and Isolation of the Active Constituent through Bioassay-directed Fractionation Techniques. *Life Sciences* **76**: 1223-1238
- Yağcı C (2005). *Gentiana olivieri* Griseb. (Afat)'nin Bitki Doku Kültürüne Cevabı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış), Ankara
- Yang Y (2001). Chinese Herbal Medicines Comparisons and Characteristics. Elsevier Health Sciences, China, pp.41-63