



Acı Kavun (*Eballium elaterium* (L.) A. Rich.) Bitkisinde Kallus Kültürü Araştırmaları

Sevil Sağlam YILMAZ¹ Elif AKYILDIZ²

¹Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kırşehir, Türkiye

²Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji A.B.D., Kırşehir, Türkiye

*Sorumlu Yazar

E-mail: ssaclam@ahievran.edu.tr

Geliş Tarihi: 16 Ekim 2018

Kabul Tarihi: 24 Aralık 2018

Özet

Türkiye’de insanlar birçok bitkiyi, hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanmışlardır. *Eballium elaterium* (L.) A. Rich. (Cucurbitaceae) (Acı kavun) bitkisi de ülkemizde tedavi amacıyla kullanılan önemli tıbbi bitkilerden biridir. Meyve suyu, içeriğinde bulunan ve kukurbitasin B adı verilen triterpenik yapıda maddeler sinüzit tedavisinde kullanılmaktadır. Kukurbitasinler sitotoksik, antitümoral, antienflamatuar, antimikrobiyal çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Ayrıca karaciğer koruyucu ve pürgatif özellikleri de bilinmektedir. Acı kavun bitkisinden kukurbitasin etken maddesinin elde edilmesini sağlayarak ülke ekonomisine katkı sağlamak, ilaç sanayine katma değer yaratmak ve bitkisel kökenli sekonder metabolitlerin üretilmesi oldukça önemlidir. Bunun için yapılacak gerek genetik mühendisliği çalışmaları; gerekse doku kültürü çalışmalarında kallus kültürü ile uygun dokuyu oluşturmak ve çoğaltmak çalışmaların en çok zaman harcanan kısımlarını oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *E. elaterium* bitkisinde kallus kültürüne etki eden faktörlerin belirlenmesidir. *In vitro* koşullarda sürdürülebilir bir kallus rejenerasyonunun sağlanabilmesi için farklı lokasyonlardan bitkiler toplanmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonunda NaOCl ve H₂O₂ kullanılmıştır. Kotiledon boğum, yaprak, petiol, meyve, gövde ve tohum eksplantlarının kallus kültürüne tepkisi incelenmiştir. Tohumların *in vivo* ve *in vitro* çimlenmelerine etki eden faktörler araştırılmıştır. Üç farklı sukroz dozu ve iki farklı büyüme düzenleyicinin acı kavun bitkisinde kallus oluşumuna etkilerine bakılmıştır. En iyi sonuçlar tohum eksplantlarından elde edilmiştir. Bütün parametreler bakımından elde edilen sonuçlar, *E. elaterium* bitkisinde büyüme ve kallus oluşumuna çok sayıda faktörün etki ettiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Acı kavun, *Eballium elaterium*, Kallus kültürü

Callus Culture Researches on Bitter Melon (*Eballium elaterium* (L.) A. Rich.)

Abstract

In Turkey, people have used many plants to treat diseases. *Eballium elaterium* (L.) A. Rich. (Bitter melon) is one of the important medicinal plants used for treatment in our country. The triterpenic chemical materials called Cucurbitasin B use for the treatment of sinusitis. Cucurbitacins have cytotoxic, antitumoral, antiinflammatory, antimicrobial and various biological activities. In addition, liver protective and purge characteristics are known. To contribute to the economy of the country by provide from bitter melon, to add value to the pharmaceutical industry and production of plant secondary metabolites is very important. To do this, genetic engineering studies; if necessary, to create and reproduce the appropriate tissue with callus culture in tissue culture studies, constitutes the most time consuming part of the studies. The aim of this study is to determine factors affecting callus cultures in *E. elaterium*. Plants from different locations were collected to provide a sustainable callus regeneration *in vitro* conditions. NaOCl and H₂O₂ were used for surface sterilization of explants. The reaction of cotyledon node, leaf, petiol, fruit, stem and seed explants to callus cultures have been investigated. Factors affecting *in vivo* and *in vitro* germination of seeds were investigated. Three different sucrose doses, two different photoperiods and two different growth regulators have been tested for the effect of callus formation on bitter melon. The best results were obtained from seed explants. The results obtained with respect to all parameters are the result of numerous factors affecting growth and callus formation on *E. elaterium*.

Keywords: Bitter melon, *Eballium elaterium*, callus culture

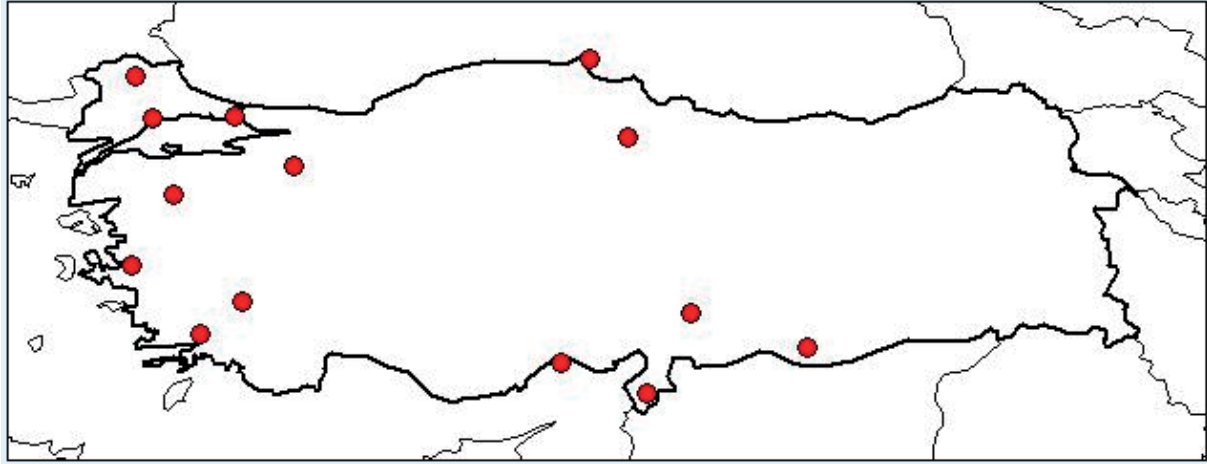
GİRİŞ

Eballium elaterium (L.) A. Rich., (acı kavun) yatık gövdeli, gövde ve yaprakları sert tüylerle kaplı, çiçekleri açık sarı renkli, meyveleri oval, çok yıllık, otsu bir bitkidir [1]. Bitki, iç mekanlarda, ormanlık, dağlık, alanlarda, yaylalar, yamaçlar, otlaklar, çayırlar, meralar, yol kenarları, çalılıklar, makiler, kayalık, taşlı, çakıllı, kurak yamaçlar, bozkırlar, bataklıklar, sulak alanlar, tarlalar, ekili alanlar, tuzlu alanlar, akarsu kıyıları, göl kıyıları, kıyı kumulları ve fundalıklar ve yüksek dağ alanlarında yetişmektedir. Bitkinin meyvesi, olgunlaştığında iç basınç etkisi ile sapa bağlandığı yerden kopmakta ve bitki tohumlarını uzak mesafelere fırlatmaktadır. Tohumlarını şiddetli fırlatması nedeniyle, bu bitkiye, halk arasında cırtatan, cırtlatan, cırtlağan, ciritatan, eşek hıyarı, acı dülek, yabani hıyar, acı kavun gibi çeşitli isimler verilmiştir. Bitkinin meyve suyu halk arasında sinüzit tedavisi amacıyla kullanılmaktadır.

Köklerden hazırlanan lapa ve merhemlerin haricen tümör ve ekzama tedavisinde de kullanılmaktadır [2, 3, 13]. Yapılan araştırmalarda *E. elaterium*’un meyve suyunda doza bağımlı olarak artan bir antienflamatuar aktivite tespit edilmiş ve bu aktivitenin kukurbitasin B’den kaynaklandığı açıklanmıştır [4, 16]. Yapılan çok sayıda çalışma sonucunda kukurbitasinlerin pürgatif (müshil, sitotoksik (kemoterapi), antitumor (antikanser), antienflamatuar (iltihaplanma azaltıcı), hepatoprotektif (karaciğer koruyucu), antimikrobiyal gibi biyolojik aktiviteleri saptanmıştır [5, 6]. Acı kavun bitkisinin meyve ve kökleri, eski Mısırlılar döneminden beri tanınan ve yaygın kullanımı olan bir drog olarak bilinmektedir [7]. Bitki güney Avrupa, özellikle de Karadenizi çevreleyen ülkeler ve Akdeniz bölgesinde yetişmektedir (Arnavutluk, Belarus, Bulgaristan, Fransa, Yunanistan, İtalya, Malta, Portekiz, Romanya, Sicilya, Sardinya, İspanya, Türkiye, Yugoslavya). Türkiye’deki

yayıllık alanları Şekil 1.'de verilmiştir. Tüm bu kullanım alanlarına rağmen bitki üzerinde herhangi bir *in vitro* organogenez, somatik embriyogenez, hücre süspansiyon ve protoplast kültürü ile rejenerasyon, mikroçoğaltım, gen

transformasyon vb. çalışmalar yapılmamıştır. Ancak, çok az sayıda kallus kültürü çalışması mevcuttur [14, 15, 17]. Bu çalışmanın amacı, *E. elaterium* bitkisinde kallus kültürüne etki eden faktörlerin belirlenmesidir.



Şekil 1. Türkiye'deki *Ecballium elaterium* taksonunun yayılış alanı (İstanbul, Amasya, Balıkesir, Bilecik, Denizli, Hatay, İçel, İzmir, Kırklareli, Kahramanmaraş, Muğla, Sinop, Tekirdağ, Karaman) [8]

Bitki hücre ve doku kültürü ile sekonder metabolitlerin üretiminde temelde 2 farklı sistem kullanılmaktadır. Bunlar; "farklılaşmış ve organize olmuş kültürler ile metabolit üretimi" (kök kültürleri, sürgün kültürleri, embriyo kültürleri) ve "farklılaşmamış ve organize olmamış kültürler ile metabolit üretimi" (kallus kültürleri, hücre süspansiyon kültürleri)'dir.

Kallus kültürleri, ana bitkiden kesilip çıkartılan ve bölünme özelliğini yitirmemiş organ ve doku parçalarının, karbon kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicileri içeren yarı katı besin ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip kütleler olarak tanımlanmaktadır [19]. Bitki hücre kültürleri sekonder metabolit üretimi için verimli bir yoldur. Fakat ürün verimini, kalitesini artırmak ve maliyeti düşürmek için etkili bir kallus oluşum sisteminin geliştirilmesi gerekmektedir [9].

Kukurbitasinlerin üretiminde önemli bir hücre kültürü olan kallus kültürünün kullanımında kallus ve ürün veriminin artırılmasında bilinmesi ve dikkat edilmesi gereken bazı stratejiler mevcuttur. Bitkinin toplandığı bölge, sterilizasyon teknikleri, kullanılan eksplant, bitkinin *in vivo* ve *in vitro* çimlenme kabiliyeti, besin ortamı içeriği, sukroz tipi ve dozu, büyüme düzenleyicilerin tipi ve miktarı vb. birçok faktör etki etmektedir. Örneğin, *Azadirachta indica* (Nim ağacı) bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada, besin ortamındaki sukroz miktarının azaltılması (15 mg/l) biyokütle ve azadiraktin üretiminde düşüşe neden olmuştur [20]. Bu ve benzeri çalışmalar, sekonder metabolit üretim çalışmalarında bitkinin toplandığı lokasyondan kültür ortamının içeriğine kadar pek çok faktörün bitki türüne göre optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.

MATERYAL ve METOD

Bitkinin Toplandığı Lokasyonlar

Hücre hattı geliştirmek, istenen ürünün yüksek miktarda elde edilebildiği ana bitkinin seçimi, kallus oluşum oranını artırma ve kallustaki yüksek verimli hücrelerin gözlenmesi ile başlamaktadır. Karışık populasyon arasından istenen ürünü

en çok üreten hücre hatları taranır ve bu hücrelerle çalışmaya devam edilir [9]. Genetik yapıdan kaynaklanan çeşitlilik, yüksek verimli hücrelerin var olmasını sağlayabilmektedir. Bu çalışmada, kukurbitasin içeriği yüksek hücre hatlarının taranması ve seçilmesi amacıyla; dört farklı lokasyondan acı kavun bitkisi toplanmış ve laboratuvar koşullarında kukurbitasin içerikleri araştırılmaya çalışılmıştır. Bitki materyalleri, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi kampüs alanı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi kampüs alanı (Şekil 2.), Kırşehir/Boztepe/Harmanaltı ve Adana/Kozan/Postkabasakal köylerinden 2015-2016 yıllarının Nisan-Ekim aylarında temin edilmiştir.



Şekil 2. *E. elaterium* bitkisinin Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi kampüs alanında görünümü

In vitro Sterilizasyon

In vitro çimlendirme ve kallus kültürü çalışmaları Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bitki doku kültürlerinde sterilizasyon işlemleri çalışmanın ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan meydana gelebilecek kontaminasyonların önlenmesinde oldukça önemlidir. Bu nedenle kallus kültürü çalışmalarının başarısının en temel koşulu sterilizasyondur. Kullanılacak her türlü malzemenin, besin ortamlarının, kullanılacak bitkiye ait tohumların ve her türlü bitkisel materyalin sterilizasyonunun en uygun şekilde yapılması gerekmektedir.

Bitkisel materyallerin yüzey sterilizasyonunda tohumun yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Siyanid, florid, florid, halojenler gibi maddeler mikroorganizmaların hücre enzimlerine zarar vermekte ya da enzim işlevlerini bozmaktadır. Bunlar arasında; cıva, gümüş, bakır %12' lik gümüş nitrat çözeltisi gibi ağır metal tuzları; hidrojen peroksit, potasyum permanganat, ozon, klor, brom, iyodür gibi oksitleyici ajanlar ve formalin, etilen oksit gibi alkilleyici ajanlar yer almaktadır [21]. Dolayısıyla en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi için hidrojen peroksit (H_2O_2), cıva, gümüş nitrat vb. kullanılabilir. Hidrojen peroksit renksiz kokusuz bir kimyasal madde olup genel olarak dezenfeksiyon amaçlı olarak %3 oranında kullanılmaktadır. H_2O_2 yüksek oranda H^+ ve OH^- iyonları taşımaktadır. H^+ ve OH^- iyonlarının oranı sterilizasyonda önemli rol oynamaktadır. Su ile karıştırıldığında her ikisinin konsantrasyonu düşmektedir. Ancak genel olarak doku kültürü çalışmalarında ticari sodyum hipoklorit ($NaOCl$) en yaygın kullanıma sahiptir. Bu çalışmada, eksplantlar $NaOCl$ ve H_2O_2 'in farklı doz ve sürelerinde sterilizasyona tabi tutulmuştur. Kotiledon boğum, yaprak, petiol, meyve, gövde ve tohum eksplantları (Şekil 3.), %10 ve %20 $NaOCl$ çözeltisinde 20 ve 30 dk steril edilmiş 5'şer dk'lık 3 kez durulama yapılmıştır. Solüsyona 2 damla/100 ml olacak şekilde Tween 20 eklenmiştir. Ayrıca eksplantlar, %50'lik H_2O_2 'de 10 dk. sterilizasyona tabi tutulmuştur (Şekil 4.).



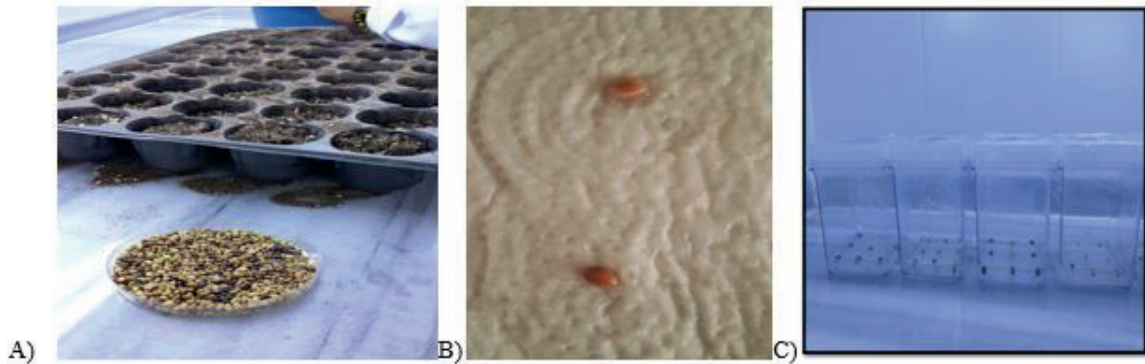
Şekil 3. Çalışmada kullanılan *E. elaterium* bitkisine ait eksplantlar



Şekil 4. A) Bitkinin musluk suyu altında ön sterilizasyonu, B) Eksplantların biyogüvenlik kabininde sterilizasyonu

Tohumların Çimlendirilmesi

E. elaterium bitkisine ait tohumlar oldukça inatçı ve çimlenmesi zor tohumlardır. Tohumların *in vivo* (viyoller ve kağıt havlu) ve *in vitro* çimlendirme denemeleri yapılmıştır (Şekil 5.). Tohumlar bir ay süreyle *in vitro* şartlar altında MS [18] besin ortamında kültüre alınmıştır. MS kültür ortamları magenta kaplarına dökülmüş ve sterilize edilen tohumlar bu kaplara ekilmiştir. Magenta kapları, tohumların çimlenmesi için 24-25 °C ve 16/8 foto periyodunda kültür odasına yerleştirilmiştir. Bütün eksplantlar sterilizasyon işleminden sonra her bir magentaya 5 adet olacak şekilde ekilmiştir. Karbon kaynağı olarak % 3 sukroz, jelleştirici olarak ise % 0.5 plant agar kullanılmıştır. Ortamların pH düzeyleri 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlanmıştır. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmıştır.



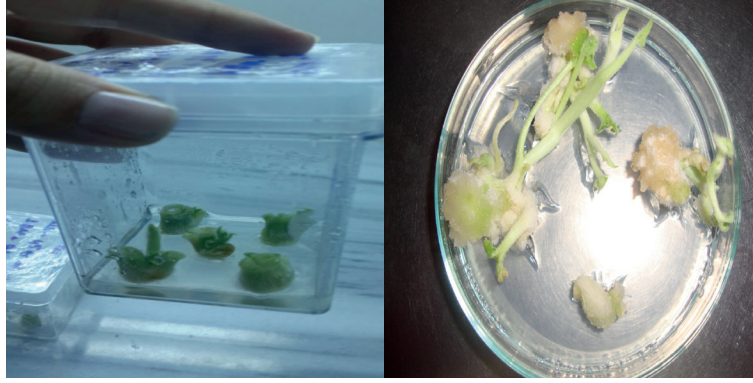
Şekil 5. *E. elaterium* bitkisinin tohumlarının *in vivo* (A.B) ve *in vitro* (C) çimlendirme çalışması

Besin Ortamındaki Sukroz Miktarı

Bitki hücre kültürleri genellikle heterotrof olarak karbonu sukroz gibi basit şekerlerden, inorganik maddeleri de diğer bileşenlerden karşılayarak gelişmektedirler. Sukroz miktarı sekonder metabolit birikimi yapan kültürlerin üretkenliklerini etkilemektedir. *Aralia cordata* (Aralya) hücre süspansiyonunda %5 sukroz ile antosiyanin üretimi düşmüş, %3 dozunda ise artmıştır [11]. Çalışmamızda; 0,5 mg/l BAP+5 mg/l NAA ve 1,0 mg/l BAP+0,5 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarına 30, 40, 50, 60 gr/l dozlarında sukroz eklenerek sukroz dozlarının kallus oluşumuna etkisi gözlemlenmiştir.

Büyüme Düzenleyiciler ve Kallus Kültürü

Büyüme düzenleyiciler ve konsantrasyonları sekonder ürün birikiminde oldukça karmaşık role sahiptirler [12]. Oksin veya sitokininin çeşidi ve konsantrasyonu veya oksin/sitokinin oranı, kültüre alınmış bitki hücrelerinde gelişme ve ürün biçiminde dikkat çekici değişikliklere neden olmaktadır [13]. Çalışmamızda, 0,5 mg/l BAP+5,0 mg/l NAA; 1,0 mg/l BAP+0,5 mg/l NAA ve ayrıca 5,0, 10,0, 20,0 ve 30,0 mg/l NAA içeren MS besin ortamları kullanılmış ve kallus oluşumuna etkisi gözlemlenmiştir.



Şekil 6. *E. elaterium* bitkisinin gövde eksplantlarından kallus oluşumu

SONUÇ ve ÖNERİLER

Kukurbitasinlerin üretimi konusunda bitki doku kültüründen doğrudan veya dolaylı olarak yararlanılan çok sayıda çalışma maalesef mevcut değildir. Az sayıda mevcut çalışmaların ise bir kısmı deneysel aşamada olup, ticari üretime henüz geçilmemiştir. Kukurbitasinlerin üretiminde kallus ve süspansiyon kültürleri çalışmalarına başlanmış olsa da, biyoreaktörler ve gen transformasyon yöntemleri henüz bu bileşiklerin üretiminde kullanılabilir sistemlere dönüşmemiştir. Bu tip çalışmaların daha fazla yapılması, ilaç sektörü başta olmak üzere ülke ekonomisine kayda değer katkılar sağlama bakımından oldukça önemlidir. Biyolojik yöntemlerle üretim, tarım alanlarındaki kısıtlamaları, bitkilerin doğadan toplanmasında mevsimlere bağlı kalma, iklimsel değişiklikler gibi dezavantajları ortadan kaldırmaktadır. Bu çalışma, bütün parametreler bakımından ele alındığında; *E. elaterium* bitkisinde kallus oluşumu ile büyümesine çok sayıda faktörün birlikte etki ettiği sonucuna varılmıştır. Bitki doku kültürleri ile sekonder metabolitlerin üretim çalışmaları halihazırda ülkemiz için yeterli değildir ve buna karşın bitki sekonder metabolitleri insan sağlığı açısından oldukça önemli materyallerdir. Hücre süspansiyon kültürleri bilimsel açıdan sekonder metabolitlerin üretiminde avantajlı bir yöntemdir, dolayısıyla süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan kallus kültürleri tüm tıbbi öneme sahip bitkiler için geliştirilmelidir. Bitkisel

BULGULAR

Bitkinin toplandığı lokasyonlar bakımından herhangi bir farklılık gözlenmemiş, benzer sonuçlar alınmıştır. *In vitro* sterilizasyon çalışması sonunda yalnızca tohum eksplantlarının yüzey sterilizasyonunda %20 NaOCl dozunda 30 dk. uygulamasında başarılı olunmuştur. Diğer eksplantların tamamında kontaminasyon meydana gelmiştir. Tohumların çimlendirilmesinde heriki ortamda da herhangi bir çimlenme gözlenmemiştir. Bundan dolayı eksplantlar araziden toplanan bitkilerden izole edilerek kullanılmıştır. Sukroz dozlarının kallus oluşum oranını nasıl etkilediğini gözlemlmek için yapılan çalışmada, kontaminasyon nedeniyle herhangi bir kallus oluşumu meydana gelmemiş ve istatistik analiz gerektirecek herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Eksplant kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicilerin kallus oluşum oranı (%) üzerine etkileri bakımından üç hafta sonunda tohum eksplantlarından %20, yaprak ve gövde (Şekil 6.) eksplantlarında ise % 4 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. Aynı çalışmada, diğer eksplantlarda kontaminasyon sebebi ile herhangi bir kallus oluşumu gözlenmemiştir.

sekonder metabolitlerin endüstriyel boyutta üretiminin sağlanabilmesi yönünde çalışmalara hız verilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Bozdoğanlı, E.E., 1996. Çukurova Bölgesinde Doğal Olarak Bulunan Faydalı Bitkiler Ve Kültür Olanakları Üzerinde Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- [2] Baytop, T., 1984. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları. No: 3255, İstanbul, s:194-195.
- [3] Yeşilada E., Tanaka S., Sezik E., Tabata M., 1988. Isolation of an Antiinflammatory Principle from the Fruit Juice of *Ecbalium elaterium*. Journal of Natural Products, 51:3, 504-508.
- [4] Cingi M., Erkuş S, Cingi E, Başer H.C., Keçik M.C., Öner, Ü.,1983. Kronik sinüzitlerde *Ecbalium elaterium*'ün etkilerinin araştırılması. Anadolu Tıp Dergisi, 5:123-136.
- [5] Sezik, E., Kaya, S., Aydan, M., 1982. *Ecbalium elaterium* Meyvelerinin Sinüzite Etkisi, Eczacılık Bil., 24: 33-36.
- [6] Agil M.A, Risco S., Miro M., Navarro M.C., Oceta M.A., Jimenez J., 1995. Analgesic and antipyretic effects of *Ecbalium elaterium* (L.) A. Richard. extract in rodent. Phytother. Res., 9:135-138.

[7] Grieve, M., Oswald, E., 1911. Squirting cucumber, melons, water melon, pumpkin and colocynth. Chalfont St Peter, UK: Whin's Cottage.

[8] Tubives, http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=3911 (25.09.2014)

[9] YAĞCI, C., TOKER, M.C., TOKER, G., 2008. Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 1(1):47-58.

[10] Duman, İ., 2006. Domates tohumlarında çimlenme ve fide çıkışının iyileştirilmesi. Ege Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü.

[11] Sakamoto, K., Iida, K., Sawamura, K., Hajiro, K., Asada, Y., Yoshikawa, T., Furuya T., 1993. Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*. *Phytochemicals*, 33: 357–360.

[12] DiCosmo, F., Towers, G.H.N., 1984. Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In: *Recent advances in phytochemistry* (ed. Timmerman BN, Steelink FA and Loewus FA), Plenum, New York., 18:97–175.

[13] Güllü, İ.B., Öcal, N., 2016. Tıbbi Bir Bitki olarak *Ecballium elaterium* (L.)'un Tedavi Alanlarının Araştırılması, Araştırma Makalesi, Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi.

[14] Memişoğlu, M., 2000. Doku kültürü metodları ile *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. bitkisinden kallus üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.

[15] Toker, G.,M., Memişoğlu, M., Toker, C., Yeşiladaa, E., 2003. Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. *Fitoterapia*, 74:7–8. pp: 618-623.

[16] Ekici, M., Satılmış, A., Ay, Y.D., 1998. *Ecballium elaterium* (L.) Meyvelerinin Sinüzite karşı kullanımı. Ulu- dağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü.

[17] Everaldo, G.A, Scicluna-Spiteri, A., 2001. *Ecballium elaterium*: an *in vitro* source of cucurbitacins. *Fitoterapia* 72: 46-53.

[18] Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473-497.

[19] Sökmen, A., Gürel, E. 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 211-261.

[20] Sujanya, S., Poornasri, D.B., Sai, I. 2008. *In vitro* production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Biosciences*, 33(1):113–120.

[21] Şelimen D., 2003. Dezenfektanların Yanlış Kullanımı ve Sonuçları. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi, 2-4 Ekim, Samsun.