



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Doktora Tezi

***Echium L.*'de STEARİDONİK ASİT ve ŞİKONİN İÇERİĞİNİN
BELİRLENMESİ ve *In Vitro* KOŞULLARDA ARTTIRILMASI**

Veysel SÜZERER

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tamer ÖZCAN**


**II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ**

Mayıs, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 27.05.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

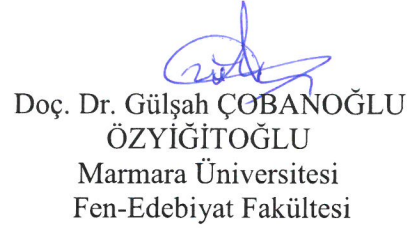
Tez Jürisi



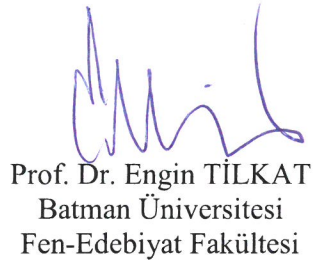
Prof. Dr. Tamer ÖZCAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Gül ÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Gülşah ÇOBANOĞLU
ÖZYİĞİTOĞLU
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Engin TILKAT
Batman Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Gülriz BAYÇU KAHYAOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Akademik yaşamımda, üzerimde emeği olan o kadar kişi var ki umarım tek bir sayfa da kendilerine minnettarlığımı sunabilirim, aslında emeklerinin karşılığını hiçbir zaman ödeyemem...

Doktora öğrenimim sürecinde değerli bilgilerine her zaman başvurduğum ve vermiş olduğu fikirlerle ufkumun daha da açılmasını sağlayan, sadece bir tez danışmanı değil bir abi gibi olarak hissettiğim kıymetli danışmanım, Prof. Dr. Tamer ÖZCAN,

Lisans öğrenimimin son yıllarında tanıştım kendisiyle, belki de birlikte bu kadar başarılı olacağımızı hiç kimse tahmin edememiştir (Bkz. Bingöl Üniversitesi...). Lisans öğrenimim sonrası danışmanım olarak bilinse de, ben açıkçası kendisini bir danışman olarak değil öz ablam olarak hissediyorum, Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ (Çok şanslıyım ki ailemde akademik yaşamımda yön belirlerken yardımına başvurduğum çok mükemmel bir pusulam var...),

Yine lisans öğrenimimin ilk yıllarında tanıştım kendisiyle, her ne kadar mezun olduktan sonra ayrılmış olsak da tabiki kısa süreli bir ayrılış, büyük bir grup içerisinde birlikte çalışıyor olarak bulduk kendimizi ve doktora tezimi eğer başarılı bir şekilde tamamlayabiliyorsam sayesinde. Yelda Hocamı öz ablam olarak hissediyorsam, kendisini de öz abim gibi hissettiğim Prof. Dr. Engin TILKAT ve ayrıca sevgili Eşi Prof. Dr. Emine AYAZ TILKAT (Enes Berke seni de unutmadım...),

Kendisine teşekkürden daha çok şey yazmak istiyorum, ama sayfalar yetmeyebilir onu tek kelimeyle izah edilebilirim Baba, Prof. Dr. Ahmet ONAY,

O benim için bir İsviçre çakısı gibidir, her nerede olsam ve yardıma ihtiyacım varsa o ordadır, tezimdaki gizli kahraman Remzi ERDÖL,

Ayrıca;

Gebze Teknik Üniversitesi Dr. Hülya AKDEMİR, Dr. Pelin Balçık ERCİN, Prof. Dr. Devrim ATILLA, Melike TEPE ve Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvar Ekibine (HE, İB, MA, İÜ, NT),

Batman Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı Ekibine (MA, GBC, AH, HB ve OY),

İstanbul Üniversitesi'nden Dr. Yusuf Can GERÇEK ve Dr. Almila ÇİFTÇİ,

Bingöl Üniversitesi SHMYO ve PİKOM ekibine (İÇ, RS, RM, NE, HŞ, YD, AS, HE, MG, AS, ÖS, ST, AT ve SC),

... ve son olarak Ailem iyiki de varsınız, hiçbir zaman elinizi üzerimden çekmeyin...

Sizlere sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım...

Mayıs 2019

Veysel SÜZERER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xvi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xviii
ÖZET	xx
SUMMARY	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. SEKONDER METABOLİTLER: BİTKİSEL SEKONDER METABOLİTLER.....	3
2.2. BORAGINACEAE FAMILYASI VE <i>ECHIMUM</i> L.	11
2.3. BİTKİSEL SEKONDER METABOLİTLERİN ÜRETİLMESİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR VE UYGULAMALAR	16
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	35
3.1. MALZEME	35
3.1.1. Bitkisel Materyal	35
3.1.1.1. <i>Şikonin ve Yağ Asitleri Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması</i> <i>Kapsamındaki Örnekler</i>	35
3.1.1.2. <i>In vitro</i> Çalışmalar Kapsamında Kullanılan Tohum	38
3.1.2. Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar.....	39
3.2. YÖNTEM.....	42
3.2.1. Besi Ortamları, BBD ve Elisitörlerin Hazırlanması, Malzemelerin Sterilizasyonu, İnkübasyon Koşulları ve Deney Verilerinin Hesaplanması.....	42
3.2.2. Tohumların Sterilizasyonu ve Çimlendirme Çalışmaları	46
3.2.3. Çimlenen Tohumlardan Elde Edilen Akselik Materyallerden Kallus Kültürlerinin Elde Edilmesi Çalışmaları	46
3.2.3.1. <i>Kallus Kültürü Oluşturma Çalışması</i>	46
3.2.3.2. <i>Stok Kallus Kültürü Eldesi ve Kallus Gelişiminin Karakterizasyonu</i> <i>Çalışması</i>	54
3.2.4. Oluşturulan Kök ve Kotiledon Yaprağı Kaynaklı Kalluslardan Süspansiyon Kültürlerinin Elde Edilmesi Çalışmaları	56

3.2.4.1. Süspansiyon Kültürü Oluşturma Çalışması.....	56
3.2.4.2. Stok Süspansiyon Kültür Hatları Oluşturma Çalışması	59
3.2.4.3. Süspansiyon Kültürlerinde Optimizasyon Çalışması.....	61
3.2.4.4. Süspansiyon Kültürlerinde Büyümenin Karakterizasyonu Çalışması	62
3.2.5. Çimlenen Tohumlardan Elde Edilen Köklerden Saçak Kök Kültürlerinin Elde Edilmesi Çalışmaları.....	62
3.2.5.1. Tohum Kökenli Köklerden Saçak Kök Kültürlerinin Oluşturma Çalışması..	62
3.2.5.2. Stok Saçak Kök Kültürü Hatları Oluşturma Çalışması	63
3.2.5.3. Stok Saçak Kök Kültürlerinden Sıvı Ortamda Stok Saçak Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Optimizasyon Çalışması	63
3.2.5.4. Sıvı Ortamda Saçak Kök Kültürlerinde Büyüme Eğrisi Elde Edilmesi Çalışması.....	65
3.2.6. Kök ve Kotiledon Yaprağı Süspansiyon Kültürleri ile Sıvı Ortamdaki Saçak Kök Kültürlerinden Metabolit Üretimi ve Arttırımı İçin Elisitasyon Uygulama Çalışmaları	65
3.2.7. <i>In vivo</i> Bitki Kısımlarından ve <i>In vitro</i> Kültür Uygulamalarında Şikonin ve Türevlerinin ile Yağ Asidi Tipi ve Miktarlarının Belirlenmesi Çalışmaları	67
3.2.7.1. <i>In vivo</i> ve <i>In Vitro</i> Kök Örneklerinden (Kök Süspansiyon ve Saçak Kök Kültürleri) Şikonin ve Türevlerinin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması.....	67
3.2.7.2. Tohum ve <i>In Vitro</i> Kotiledon Yaprağı Süspansiyon Kültürlerinde Toplam yağ ve Yağ Asidi Miktarlarının Tespiti Çalışmaları	69
3.2.8. <i>In Vitro</i> Kültürlerden Elde Edilen Ekstraktlardan Antikanser Aktivite Belirlenmesi Çalışmaları	72
3.2.9. İstatistiksel Analizler	72
4. BULGULAR.....	73
4.1. TOHUMLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU VE ÇİMLENDİRİLMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR	73
4.2. ÇİMLENDİRİLEN TOHUMLARDAN ELDE EDİLEN KÖK VE KOTİLEDON YAPRAĞI EKSPANTLARINDAN KALLUS OLUŞTURULMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR	75
4.2.1. Kök ve Kotiledon Yaprağı Eksplantlarının BBD Destekli Farklı Besi Ortamlarında ve Normal Fotoperiyot ile Karanlık Koşullarda İnkübasyonu Sonrası Kallus Oluşturma Çalışmaları.....	75
4.2.2. Kök ve Kotiledon Yaprağından Elde Edilen Kallus Kültürlerinden Stok Kallus Kültürleri Oluşturma Çalışmaları.....	94
4.2.3. Kök ve Kotiledon Yaprağı Stok Kallus Kültürlerinin Gelişiminin Karakterizasyonu Çalışmaları.....	95
4.3. KÖK VE KOTİLEDON YAPRAĞI KALLUSLARINDAN SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR	97

4.3.1. Kök ve Kotiledon Yaprağı Kalluslarından Süspansiyon Kültürü Oluşturma Çalışmaları.....	97
4.3.2. Kök ve Kotiledon Yaprağı Süspansiyon Kültürlerinden Stok Süspansiyon Kültürü Oluşturma Çalışmaları.....	98
4.3.3. Kök ve Kotiledon Yaprağı Süspansiyon Kültürlerinde Optimizasyon Çalışmaları.....	103
4.3.4. Kök ve Kotiledon Yaprağı Süspansiyon Kültürlerinde Büyümenin Karakterizasyonu Çalışmaları.....	110
4.4. ÇİMLENEN TOHUMLARDAN ELDE EDİLEN KÖKLERDEN SAÇAK KÖK KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR	112
4.4.1. Tohum Kaynaklı Köklerden Saçak Kök Kültürü Oluşturma Çalışmaları.....	112
4.4.2. Oluşturulan Saçak Kök Kültürlerinden Stok Saçak Kök Kültürü Oluşturma Çalışmaları.....	112
4.4.3. Stok Saçak Kök Kültürlerinden Sıvı Ortamda Stok Saçak Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Optimizasyon Çalışmaları	113
4.4.4. Sıvı Gamborg 0 Besi Ortamındaki Saçak Kök Kültürlerinde Büyümenin Karakterizasyonu Çalışmaları.....	116
4.5. KÖK VE KOTİLEDON YAPRAĞI SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ İLE SIVI ORTAMDAKİ SAÇAK KÖK KÜLTÜRLERİNDE METABOLİT ÜRETİMİ VE ARTTIRIMI İÇİN ELİSİTASYON UYGULAMALARINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR.....	118
4.5.1. Sıvı Saçak Kök Kültürlerinde Şikonin Tipi ve Miktarının Elisitasyon Uygulamaları ile Arttırılması Çalışması	118
4.5.2. Kök Süspansiyon Kültürlerinde Şikonin Tipi ve Miktarının Elisitasyon Uygulamaları ile Arttırılması Çalışması	122
4.5.3. Kotiledon Yaprağı Süspansiyon Kültürlerinde Yağ Asidi Miktarlarının Elisitasyon Uygulamaları ile Arttırılması Çalışması	126
4.6. <i>IN VIVO</i> KÖK VE <i>IN VITRO</i> KÖK SÜSPANSİYONU VE SAÇAK KÖK KÜLTÜRÜ UYGULAMALARINDA ŞİKONİN VE TÜREVLERİNİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ İLE TOHUM VE <i>IN VITRO</i> KOTİLEDON YAPRAĞI SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜ UYGULAMALARINDA YAĞ ASİDİ TİPİ VE MİKTARLARININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR.....	132
4.6.1. <i>In Vivo</i> Köklerden Şikonin ve Türevlerinin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması.....	132
4.6.2. <i>In Vitro</i> Kültür Uygulamalarından Elde Edilen Örneklerden Şikonin ve Türevlerinin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması	134
4.6.2.1 <i>Sıvı Ortam Saçak Kök Kültürlerine Elisitasyon Uygulamaları Sonrası Şikonin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması.....</i>	134
4.6.2.2 <i>Kök Süspansiyon Kültürlerine Elisitasyon Uygulamaları Sonrası Şikonin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması.....</i>	136
4.6.3. Tohumların Yağ Asidi İçerik ve Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması	137

4.6.4. Kotiledon Yaprağı Süspansiyon Kùltürlerine Elisitasyon Uygulamaları Sonrası Yağ Asidi İçerik ve Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması	139
4.7. <i>IN VITRO</i> KùLTùRLERDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARDAN ANTİKANSER AKTİVİTENİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK ÇALIşMALAR	143
5. TARTIşMA VE SONUÇ	146
5.1. TOHURLARIN YùZEY STERİLİZASYONU VE ÇİMLENDİRİLMESİNE YÖNELİK TARTIşMA	146
5.2. KÖK VE KOTİLEDON YAPRAğI EKSPANTLARINDAN KALLUS OLUşUMU VE GELİşİMİNE YÖNELİK TARTIşMA.....	147
5.3. KÖK VE KOTİLEDON YAPRAğI KALLUSLARINDAN SÜSPANSİYON VE SIVI ORTAMDA SAÇAK KùLTÜRÜ OLUşUMU VE GELİşİMİNE YÖNELİK TARTIşMA	149
5.4. KÖK VE KOTİLEDON YAPRAğI SÜSPANSİYON VE SIVI SAÇAK KÖK KùLTùRLERİNE METABOLİT ARTTIRIMI İÇİN ELİSİTASYON UYGULAMASINA YÖNELİK TARTIşMA.....	151
5.5. <i>IN VIVO</i> VE <i>IN VITRO</i> KùLTÜR UYGULAMALARINDAN ELDE EDİLEN ÖRNEKLERİN METABOLİT MİKTARININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK TARTIşMA	153
5.6. ANTİKANSER ÇALIşMALARA YÖNELİK TARTIşMA	156
KAYNAKLAR.....	159
EKLER	184
ÖZGEÇMİş	205

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Şikimat ve mevalonat yollarından şikonin/alkanin biyosentezi (Singh ve diğ., 2010).....7
- Şekil 2.2:** Fenilproponoid ve tirozin yollarında rosmarinik asit biyosentezi (Petersen ve diğ., 2009).....8
- Şekil 2.3:** Omega yağ asitlerinin biyosentez yolağı (Akoh ve Min, 2008).9
- Şekil 2.4:** Boraginacea familyası üyelerinde doğal olarak bulunan metabolitler..... 11
- Şekil 2.5:** *Alkanna tinctoria*.12
- Şekil 2.6:** *Borago officinalis*.13
- Şekil 2.7:** *Lithospermum erythrorhizon*.13
- Şekil 2.8:** *Onosma tauricum*.....14
- Şekil 2.9:** *Anchusa officinalis*.....14
- Şekil 2.10:** *Arnebia hispidissima*.15
- Şekil 2.11:** *Echium italicum*.15
- Şekil 2.12:** Bitki hücre, doku ve organ kültürleri aracılığıyla sekonder metabolit üretimi.
A) Transgenik bitkilerin yetiştirilmesi, (B) Saçak kök kültürü, (C) Bitki hücre-süspansiyon kültürü, D) Adventif kök kültürü (Lu ve diğ., 2016; Tilkat ve diğ., 2019'dan modifiye edilmiştir).20
- Şekil 2.13:** Bitki doku ve hücre kültürlerinde sık kullanılan elisitasyon tipleri (Kaynak: Naik ve Al-Khayri, 2016; Tilkat ve diğ., 2019'dan modifiye edilmiştir).21
- Şekil 3.1:** A) *E. italicum* bitkisine ait, B) çatlatılmış ve kabuklu tohum, (Bar A; 8 cm, Bar B : 0.6 cm).38
- Şekil 3.2:** *In vitro* çalışmalarda kullanılacak *E. italicum* bitkisine ait tohumlar (Bar: 0.5 cm).39
- Şekil 3.3:** Tohumların çimlendirilmesi. A) Kabuklu, kabuğu çatlatılmış ve B) kabuksuz tohumlar, C) Tohumların 20 dk, %20 NaOCl çözeltilisinde çalkalanması D) Çalkalama işlemlerinin çalkalayıcıda yapılması, E) Tohumların 3 defa 5' er dakika steril distile suda yıkanmasına, F) yüzey sterilizasyonu yapılan tohumların ekilmeden önce laminar akımlı kabinde steril filtre kağıtları üzerinde kurutulması, G) kabuklu, kabuğu çatlatılmış, H) kabuksuz tohumların BBD içermeyen MS ortamına transfer

edilmesi. (Barlar; A) 0.6 cm, B) 0.6cm, C) 1cm, D) 5cm, E) 1cm, F) 0.9cm, G) 0.9cm, H) 0.9cm).....	46
Şekil 3.4: <i>E. italicum</i> bitkisine ait tohumların <i>in vitro</i> ortamda çimlendirilmesi sonrası oluşan kotiledon yaprağı ve kök.....	47
Şekil 3.5: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli LS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1 cm).....	48
Şekil 3.6: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli LS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	48
Şekil 3.7: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli ½ LS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	49
Şekil 3.8: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli ½ LS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	49
Şekil 3.9: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli Gamborg besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	50
Şekil 3.10: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli Gamborg besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	50
Şekil 3.11: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli White besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	51
Şekil 3.12: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli White besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	51
Şekil 3.13: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli MS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	52
Şekil 3.14: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli MS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	52
Şekil 3.15: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli SH besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	53

Şekil 3.16: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli SH besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).....	53
Şekil 3.17: Kallus oluşturulması için uygun besi ortamlarına ekilen A. Kök ve B ve C. kotiledon yaprakları (Barlar: 1.3 cm).	55
Şekil 3.18: Kotiledon yaprakları ve kök kaynaklı kallus kültürlerinde kallus gelişimi ve karakterizasyonu için besi ortamına ekilen kalluslar (Barlar: 1.3 cm).	55
Şekil 3.19: Kotiledon yaprakları ve kök kallus hatlarından süspansiyon kültürlerinin başlatılması. A) ve E) Kök, B), C), F) ve G.) Kotiledon Yaprakları (Barlar; A), B) ve C) Bar: 1.4 cm, D) Bar: 1.1 cm, E), F) ve G) Bar: 1.5 cm).....	58
Şekil 3.20: Kotiledon yaprağı ve kök kökenli kalluslardan başlatılan süspansiyon kültürlerinden stok süspansiyon kültürlerin elde edilmesine ait şekil.....	60
Şekil 3.21: Kotiledon yaprağı ve kök kaynaklı stok süspansiyon kültürlerinden kümeleşme gözlenen süspansiyon kültürlerinin yeniden elekten geçirilmesi ile stok süspansiyon kültürlerinin elde edilmesine ait şekil.....	61
Şekil 3.22: Sıvı ortamda saçak kök kültürü oluşturma. A) Saçak kökler, B) Saçak köklerin alt kültürünün yapılması, C) Stok saçak kök kültürlerinin elde edilmesi, D) Sıvı saçak kök kültürlerinin oluşturulması (Bar: 0.9 cm).	64
Şekil 3.23: Örneklerden şikonin ve türevlerinin tespitine ve miktar tayinine yönelik şekil. .	69
Şekil 3.24: Örneklerden yağ eldesine, tiplerinin ve miktarlarının belirlenmesine yönelik diagram.	71
Şekil 4.1: BBD içermeyen MS besi ortamına aktarılan A) kabuklu, B) kabuğu çatlatılmış ve C) kabuksuz tohumların inkübasyonu sonrası çimlenen tohumların görüntüleri (Bar: 1cm).....	73
Şekil 4.2: A) Çimlenmiş tohumlar ve B) çimlenmiş tohumlara (2.5 haftalık) ait köklerin görüntüleri. (Bar: 1cm).	73
Şekil 4.3: A) Normal fotoperiyot ve B) karanlık ortamda inkübe edilen tohumların çimlenmesine ait görüntüler (Bar: 1cm).	74
Şekil 4.4: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli LS besi ortamında ve normal fotoperiyod koşullarında kallus oluşumu. (Bar: 1cm).....	76
Şekil 4.5: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli LS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu. Kırmızı ok pigmentli kallus (Bar: 1cm).....	76
Şekil 4.6: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli ½ LS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu. (Bar: 1cm).....	79

Şekil 4.7: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli ½ LS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).....	79
Şekil 4.8: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli Gamborg besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu (Bar: 1cm).....	82
Şekil 4.9: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli Gamborg besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).	82
Şekil 4.10: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli White besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu (Bar: 1cm).....	85
Şekil 4.11: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli White besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).....	85
Şekil 4.12: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli MS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu (Bar: 1cm).....	88
Şekil 4.13: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli MS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).....	88
Şekil 4.14: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli SH besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu (Bar: 1cm).....	91
Şekil 4.15: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli SH besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).....	91
Şekil 4.16: Kök ve kotiledon yaprakları kallus hatlarından stok kallus kültürlerinin elde edilmesi (Barlar: 1.4 cm).....	94
Şekil 4.17: Kök ve kotiledon yapraklarından elde edilen kallusların gelişiminin karakterizasyonu (Barlar: 1.3 cm).	95
Şekil 4.18: Kök ve kotiledon yaprakları stok kallus hatlarından süspansiyon kültürlerinin başlatılması (Barlar: 1.2 cm).	97
Şekil 4.19: Kök ve kotiledon yaprakları stok kallus hatlarından oluşturulan süspansiyon kültürlerinin 500 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası elde edilen kültürlerden yeniden süspansiyon kültürlerinin oluşturulması (Barlar: 1.2 cm). Kök ve kotiledon yaprakları stok kallus hatlarından stok kallus hatlarından oluşturulan süspansiyon kültürlerinin 500 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası mikroskop görüntüleri (Barlar: 50 µm).	99

Şekil 4.20: Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin 250 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası elde edilen kültürlerden yeniden süspansiyon kültürlerinin oluşturulması (Barlar: 1.2 cm). Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin 250 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası mikroskop görüntüleri (Barlar: 50 µm).....	100
Şekil 4.21: Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin 100 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası elde edilen kültürlerden yeniden süspansiyon kültürlerinin oluşturulması (Barlar: 1.2 cm). Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin 100 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası mikroskop görüntüleri (Barlar: 50 µm).....	101
Şekil 4.22: Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin periyodik alt kültürlemeleri sonrası oluşturulan stok süspansiyon kültür hatları (Barlar: 1.2 cm) .	102
Şekil 4.23: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kök süspansiyonları (Barlar: 1.2 cm).....	104
Şekil 4.24: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kök süspansiyonlarının büyümelerine ait grafik.....	104
Şekil 4.25: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve normal fotoperiyot ortamında yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonları (Barlar: 1.2 cm).	106
Şekil 4.26: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve normal fotoperiyot ortamında yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonların büyümelerine ait grafik.....	106
Şekil 4.27: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonları (Barlar: 1.2 cm).....	108
Şekil 4.28: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonların büyümelerine ait grafik.....	108
Şekil 4.29: Kök süspansiyonuna ait büyüme eğrileri.....	110
Şekil 4.30: Kotiledon yaprağı süspansiyonuna ait büyüme eğrileri.....	111
Şekil 4.31: Saçak kök oluşturulması (Barlar: 0.8 cm).	112
Şekil 4.32: Saçak kök kültürlerinden stok saçak kök kültürleri oluşturulması. A) <i>A. tumefaciens</i> enfeksiyonu sonrası saçak köklerin oluşumu, B) Saçak köklerin gelişimi, C) Saçak köklerin alt kültüre edilmesi, D) Saçak köklerden stok saçak kök kültürlerinin elde edilmesi (Barlar: 1.1 cm).	113
Şekil 4.33: Sıvı Gamborg 0 besi ortamında stok saçak kök kültürlerinin oluşturulması. A) Yarı katı Gamborg 0 besi ortamında saçak kökleri, B) Yarı katı besi ortamında saçak köklerin alt kültür edilmesi, C) Yarı katı ortamda stok saçak kök kültürlerinin elde	

edilmesi, D) Yarı katı besi ortamındaki saçak köklerin sıvı Gamborg 0 besi ortamına alınması, E) Sıvı besi ortamında saçak köklerin büyümesi, F) Sıvı ortamda gelişen saçak köklerin alt kültürlenmesi, G) Sıvı ortamda stok saçak kök kültürlerinin elde edilmesi (Barlar: 1.3 cm).....	114
Şekil 4.34: Sıvı Gamborg 0 besi ortamında farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası saçak kökler (Barlar: 1.2 cm).	115
Şekil 4.35: Sıvı Gamborg 0 besi ortamında farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası saçak köklerin büyümelerine ait grafik.....	115
Şekil 4.36: Sıvı Gamborg 0 besi ortamında saçak köklerin farklı günlerde gelişimleri (Barlar: 1.4 cm).	117
Şekil 4.37: Saçak kök kültürlerine ait büyüme eğrileri.....	117
Şekil 4.38: Sıvı saçak kök kültürlerinde elisitasyon uygulamasına ait kontroller (Barlar: 1.4 cm).	119
Şekil 4.39: Sıvı saçak kök kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde MeJA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).	119
Şekil 4.40: Sıvı saçak kök kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde ABA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).	120
Şekil 4.41: Sıvı saçak kök kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde DMSO uygulaması (Barlar: 1.4 cm).	120
Şekil 4.42: Sıvı saçak kök kültürlerine farklı sürelerde soğuk uygulaması (Barlar: 1.4 cm).....	121
Şekil 4.43: Kök süspansiyon kültürlerinde elisitasyon uygulamasına ait kontroller (Barlar: 1.4 cm).	124
Şekil 4.44: Kök süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonda MeJA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).	124
Şekil 4.45: Kök süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonda Maya Özü (SC) uygulaması (Barlar: 1.4 cm).	125
Şekil 4.46: Kök süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonda AgNO ₃ uygulaması (Barlar: 1.4 cm).	125
Şekil 4.47: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinde elisitasyon uygulamasına ait kontroller (Barlar: 1.4 cm).....	127
Şekil 4.48: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde MeJA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).....	128

Şekil 4.49: Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine 10 µM (24 Saat) MeJA uygulaması sonrası kaba filtreden geçirilen A) kuru örnek, B ve C) kuru örneğin filtre kağıdı üzerinde bıraktığı pigmentler, oklar kırmızı pigmentleri göstermektedir (Barlar 1.5 cm).....	128
Şekil 4.50: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde ABA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).....	129
Şekil 4.51: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde DMSO uygulaması (Barlar: 1.4 cm).....	129
Şekil 4.52: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerine farklı sürelerde soğuk uygulaması (Barlar: 1.4 cm).....	130
Şekil 4.53: <i>In vivo</i> köklerin ekstraksiyonu ve İTK'larına ait görüntüler.	132
Şekil 4.54: Sıvı ortamda kültüre edilen saçak köklere uygulanan elisitasyon sonrası saçak köklerin ekstraksiyonu ve İTK'larına ait görüntüler.	135
Şekil 4.55: Kök süspansiyon kültürlerine uygulanan elisitasyon sonrası örneklerin ekstraksiyonu ve İTK'larına ait görüntüler.	137
Şekil 4.56: Tohumların ekstraksiyon sonrası yağ eldesi ve örneklerin esterleştirilmesine ait görüntüler.	138
Şekil 4.57: Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine uygulanan elisitasyon sonrası örneklerin ekstraksiyonu sonrası yağ eldesi ve örneklerin esterleştirilmesine ait görüntüler.	140
Şekil 4.58: MCF-7 hücrelerine şikonin ekstraktı uygulaması sonrası proliferasyon grafiği. Kırmızı çizgi: sadece besiyeri. Açık yeşil çizgi: DMSO ve besiyeri. Lacivert çizgi: 2 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Pembe çizgi: 4 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Turkuvaz çizgi: 6 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Mor çizgi: 8 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Kahverengi çizgi: 10 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Koyu yeşil çizgi: 12 µM Türev-3 şikonin ekstraktı uygulanan hücrelerin proliferasyonunu göstermektedir.	143
Şekil 4.59: MDA-MB-231 hücrelerine şikonin ekstraktı uygulaması sonrası proliferasyon grafiği. Kırmızı çizgi: sadece besiyeri. Açık yeşil çizgi: DMSO ve besiyeri. Lacivert çizgi: 2 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Pembe çizgi: 4 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Turkuvaz çizgi: 6 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Mor çizgi: 8 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Kahverengi çizgi: 10 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Koyu yeşil çizgi: 12 µM Türev-3 şikonin ekstraktı uygulanan hücrelerin proliferasyonunu göstermektedir.	144

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerin genel olarak sınıflandırılması ve kullanım alanları.	4
Tablo 2.2: Farklı Boraginaceae türlerinde şikonin ve türevlerinin tespit edilmesi.	23
Tablo 2.3: Çeşitli prekürsör, biyotik ve abiyotik elisitörlerin şikonin ve şikonin türevlerinin üretimine etkisi.	25
Tablo 2.4: Bazı <i>Boraginaceae</i> familyasına ait türlerde yer alan önemli çoklu doymamış yağ asidi oranları.	30
Tablo 3.1: Şikonin miktarı belirlenmesinde kullanılan <i>Echium</i> türlerine ait lokalite bilgisi.	36
Tablo 3.2: Yağ asidi çeşitlerinin ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan <i>E.italicum</i> örneklerine ait lokalite bilgisi.	37
Tablo 3.3: Laboratuvar çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeleri ve bilgileri.	39
Tablo 3.4: Besi Ortamlarının içeriği.	40
Tablo 3.5: Laboratuvar çalışmalarında kullanılan cihazlar ve bilgileri.	41
Tablo 3.6: Kallus üretimi için kullanılan besi ortamı tipleri.	47
Tablo 3.7: <i>In vitro</i> kültürlere uygulanan elisitasyon tip, miktar ve zaman tablosu.	66
Tablo 3.8: Doğal ortamda yetişen <i>Echium</i> cinslerinden elde edilen kuru kök miktarları ve lokalite bilgileri.	68
Tablo 3.9: Doğal ortamda yetişen <i>Echium italicum</i> türlerinden elde edilen tohumlar ve lokalite bilgileri.	70
Tablo 3.10: GC-MS cihazı bilgileri ve deney koşulları.	71
Tablo 4.1: Farklı tipte ekilen tohumların çimlenmeye etkisi.	74
Tablo 4.2: Işığın çimlenmeye etkisi.	75
Tablo 4.3: LS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.	77
Tablo 4.4: ½ LS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.	80

Tablo 4.5: Gamborg besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.	83
Tablo 4.6: White besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.	86
Tablo 4.7: MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.	89
Tablo 4.8: SH besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.	92
Tablo 4.9: Kök kalluslarının gelişiminin karakterizasyonu.	95
Tablo 4.10: Kotiledon yaprağı kalluslarının gelişiminin karakterizasyonu.	96
Tablo 4.11: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kök süspansiyonlarının büyümelerine ait sonuçlar.	104
Tablo 4.12: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve normal fotoperiyot ortamında yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonlarının büyümelerine ait sonuçlar.	106
Tablo 4.13: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonlarının büyümelerine ait sonuçlar.	108
Tablo 4.14: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası saçak köklerin büyümelerine ait sonuçlar.	115
Tablo 4.15: Sıvı saçak kök kültürlerine elisitasyon uygulaması sonrası saçak köklere ait yaş ve kuru ağırlıklar.	121
Tablo 4.16: Kök süspansiyon kültürlerine elisitasyon uygulaması sonrası yaş ve kuru ağırlıklar.	126
Tablo 4.17: Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine elisitasyon uygulaması sonrası yaş ve kuru ağırlıklar.	130
Tablo 4.18: <i>In vivo</i> köklerden elde edilen şikonin miktarı.	133
Tablo 4.19: Saçak kök ekstraktlarından tespit edilen şikonin tipi ve miktarları.	135
Tablo 4.20: Tohum ekstraktlarından tespit edilen yağ asidi tipi ve miktarları.	138
Tablo 4.21: Kotiledon yaprağı süspansiyonları ait ekstraktlarında tespit edilen yağ asidi tipi ve miktarları.	141

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

g	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar
M	: Molar
N	: Normal
l	: Litre

Kısaltmalar Açıklama

2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
AA	: Omega-6 (ω -6), [C20:5 Δ 5,8,11,14 (5,8,11,14,17-eikosapentaenoik asit)]
ABA	: Absisik Asit
ALA	: α -Linolenik Asit Omega-3 (ω -3), [C18:3 Δ 9,12,15 (oktadekatrienoik asit)]
AgNO₃	: Gümüş Nitrat
BAP	: Benzilaminopürin
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicisi
BBO	: Bitki Büyütme Odası
Dk	: Dakika
dH₂O	: Distile Su
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPA	: Omega-3 (ω -3), [C22:6 Δ 4,7,10,13,16,19 (dokosahekzaenoik asit)]
EPA	: Omega-3 (ω -3), [C20:5 Δ 5,8,11,14 (eikosapentaenoik asit)]
EtOH	: Etilalkol
EIN5	: Etilene duyarsız 5 (Ethyleneinsensitive5)
GA2ox	: Gibberellin 2-oksidad
GLA	: γ -Linolenik Asit Omega-3 (ω -3), [C18:3 Δ 6,9,12 (oktadekatrienoik asit)]
HCl	: Hidroklorik Asit
HgCl₂	: Civa Klorür

HMA5	: Ağır Metal ATPaz 5 (Heavy Metal ATPase 5)
IAA	: Indol-3 Asetik Asit
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
JA	: Jasmonik Asit
KIN	: Kinetin
LA	: Linoleik Asit Omega-6 (ω -6), [C18:2 Δ 9,12 (oktadekadienoik asit)]
LB	: Luria-Bertani Besi Ortamı
LeMDR	: <i>L. erythrorhizon</i> ATP-bağlanma kaset protein geni
LOX	: Linoleate 13S-Lipoksijenaz
LS	: Linsmaier and Skoog Besi Ortamı
MeJA	: Metil Jasmonat
MS	: Murashige and Skoog Besi Ortamı
MUFA	: Mono Doymamış Yağ Asiti (Mono Unsaturated Fatty Acid)
NaOH	: Sodyum Hidroksit
OA	: Oleik Asit Omega- (ω -6), [C16 Δ 9 (9-oktadekaenoik asit)]
OD	: Optik Yoğunluk (Optical Density)
ORCA3	: Octadecanoid Derivative Responsive Catharanthus AP2-Domain
PA	: Palmitik Asit, [C16 (hekzadekaenoik asit)]
PAL	: Fenilalenin Amonyum-Liyaz (Phenylalanine Ammonia-Lyase)
PEG	: Polietilen Glikol
PHB	: Poli3-Hidroksibutirat (Poly 3-Hydroxybutyrate)
PUFA	: Poli Doymamış Yağ Asiti (Poly Unsaturated Fatty Acid)
RPM (rpm)	: Dakikada Dönme Hızı (Rotation Per Munite)
SA	: Salisilik Asit
SC (Maya Özü)	: <i>Saccharomyces crevisiae</i> (Maya Özü)
SDA	: Stearidonik Asit Omega-3, [C18:4 Δ 6,9,12,15 (oktadekatetraenoik asit)]
SH	: Schenk ve Hildebrandt Besi Ortamı
UV	: Ultraviyole

ÖZET

DOKTORA TEZİ

Echium L.'de STEARİDONİK ASİT ve ŞİKONİN İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ ve *In Vitro* KOŞULLARDA ARTTIRILMASI

Veysel SÜZERER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tamer ÖZCAN

II. Danışman : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

Bitkiler uzun yıllardan beri farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Tez kapsamında çalışılan Boraginaceae familyası üyesi *Echium L.* cinsi de, içermiş olduğu metabolitlerin sayısının fazlalığı nedeniyle endüstride kullanılabilir bitkilerdendir. *E. italicum L.*'de bulunan şikonin ve türevleri ile yağ asitlerinin üretimi ve arttırımı için farklı kültürler (kotiledon yaprağı ve kök süspansiyon ile saçak kök kültürleri) oluşturulmuştur. Oluşturulan kültür hatlarına elisitasyon (+4 °C, MeJA, DMSO, ABA, AgNO₃, SC Ekstraktı) uygulanarak metabolit üretiminin arttırımı hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda, en yüksek miktarda şikonin eldesi 10 µM MeJA'nın 24 saat uygulandığı saçak kök kültürlerinde tespit edilirken, en yüksek düzeylerde yağ asidi üretimi ise herhangi bir elisitasyon uygulamasının olmadığı kontrol grubu kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerinde elde edildi. Bununla birlikte, saçak köklere MeJA uygulaması sonucunda üretilen kültürlerden saflaştırılan Şikonin Türev-3 ekstraktı, [(İzovaleril/2-Metil Bütiril Şikonin) elisite edilmiş saçak kök kültürleri kaynaklı] meme kanseri hücre hatlarından MCF-7 ve MDA-MB-231'e uygulandı. Düşük miktarlarda denenen Şikonin Türev-3

fraksiyonu, MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarında antiproliferatif etki göstermiştir. *E. italicum* L.'nin *in vitro* kültür hatlarına metabolit üretimi için uygulanan yöntemlerin, *Echium* L. cinsinin yanı sıra diğer türlerde de mevcut biyoaktif bileşiklerin endüstriyel ölçekte kitlesel üretimleri için kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır.

Mayıs 2019, 229 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Echium* L., Şikonin, Şikonin Türevleri, Yağ Asitleri, Elisitör, Kallus Kültürü, Saçak Kök Kültürü, Süspansiyon Kültürü



SUMMARY

Ph.D. THESIS

DETERMINATION of STEARIDONIC ACID and SHIKONIN CONTENT in *Echium L.* and ELEVATION in *In Vitro* CONDITIONS

Veysel SÜZERER

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Tamer ÖZCAN

Co-Supervisor : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

Plants have been used for different purposes for many years. The genus *Echium L.* from Boraginaceae family examined in the present study are among the plants that can be used in industry as it contains various secondary metabolites. Different cultures (cotyledone leaves, root suspension and hairy root cultures) for the production and elevation of fatty acids and shikonin with its derivatives have been initiated in *E. italicum L.* Moreover, elicitation (+4 °C, MeJA, DMSO, ABA, AgNO₃, SC Extract) is also carried out to increase metabolite production in these cultures. The highest amount of shikonin was determined in the hairy root cultures with 10 µM MeJA applied for 24 hours, while the highest concentrations of fatty acids was observed in the control group of cotyledon leaf suspension cultures without any elicitation. However, purified Shikonin Derivative-3 [Isovaleryl/2-Methyl Butyryl Shikonin (derived from elicited hairy root cultures)] was applied on MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cell lines. Low amounts

of shikonin Derivative-3 fraction was examined antiproliferative effect in MCF-7 and MDA-MB-231 cancer cell lines. The methods used for the production of metabolites to *in vitro* culture lines of *E. italicum* L. have the potential for the mass production of bioactive compounds found in the genus *Echium* L. as well as other species.

May 2019, 229 pages.

Keywords: *Echium* L., Shikonin, Shikonin Derivatives, Fatty Acids, Elicitor, Callus Culture, Hairy Root Culture, Suspension Culture



1. GİRİŞ

Bitkiler milattan önceki yıllardan günümüze kadar gıda, kozmetik ve sağlık gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmak üzere insanların hizmetine sunulmaktadır. Bitkilerin bu kadar geniş ölçekte kullanılmalarının nedeni, bünyelerinde bulundurmuş oldukları ve yaşamları boyunca abiyotik ve biyotik etkenlere karşı yaşamlarını idame ettirmelerini sağlayan, aynı zamanda insan sağlığı açısından da birtakım biyolojik aktivite ve koruyucu işlevlere (antimikrobiyal, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar, antipiretik, antidiyabetik, antiaterojenik, antitümöral, yara iyileşmesi, karaciğer koruyucu, antiproliferatif, proapoptotik ve antihipertansif aktivite) sahip metabolitlerdir. Bu metabolitler, bitkisel ikincil metabolitler (sekonder metabolitler) olarak da adlandırılan ve farklı yapı ve fonksiyonlara sahip (Örn: Alkaloid, terpen, fenolik bileşikler, nadir aminoasitler, bitki aminleri, glikosidler vb.) organik yapıya sahiptirler. Bu amaçla bitkiler, parçasal veya bütün olarak herhangi bir işlemden geçmeden kullanıldığı gibi, bazen hedef etken maddelerini elde etmek için değişik fiziksel ve kimyasal farklı işlemlerden geçirildikten sonra da kullanılabilir. Bu nedenle, insanoğlu bitkileri kendi amaçlarına uygun olarak (içeriklerinin özelliklerine göre) toplayıp kullanmaktadır. Son zamanlarda, artan nüfusla birlikte, gereken talebi karşılamak üzere bitkilerin doğal yaşam ortamlarından aşırı miktarda ve kontrolsüz bir şekilde toplanmasını da beraberinde getirmiş, bu durum bitki türlerinin populasyon miktarında azalmalara hatta yok olmalarına sebep olmaktadır.

Bilim insanları artan nüfus ve gerekli talebin karşılanmasının beraberinde getirdiği olumsuz durumların üstesinden gelmek için gelişen teknolojiyle birlikte farklı stratejiler geliştirmeye çalışmışlardır. Bu stratejilerden birisi olan bitkilerin kullanımı için tercih sebebi olan doğal madde(ler)in kimyasal analoglarının sentezidir. Ancak, bu üretim her metabolitin üretimi için kolay ve ekonomik olmadığından fazla tercih edilmemiştir.

Gelişen teknolojiyle birlikte farklı çalışma disiplinlerini bir araya getirerek oluşturulan bitki biyoteknolojisi, ifade edilen olumsuzlukları ortadan kaldırmaya yönelik yeni stratejiler oluşturma ve geliştirmenin yanında mevcut durumda uygulanan stratejilerin başarısının artmasına da katkı sağlamaktadır.

Bitki biyoteknolojisi yöntem ve uygulamaları kullanılarak geliştirilen stratejiler sadece biyolojik olarak aktif olan bitkisel ikincil metabolitleri üretmekle kalmaz, aynı zamanda miktarlarını arttırmak için de yeni fırsatlar sunar.

Tez çalışması kapsamında, gıda, sağlık ve kozmetik endüstrisi alanında kullanılabilecek değerli bitkisel ikincil metabolitler barındıran, ayrıca bal arılarının bal üretiminde nektar kaynağı olarak tercih ettikleri Boraginacea familyası üyesi, *Echium italicum* L.'un biyoteknolojik yöntemler kullanılarak, i) şikonin ve türevleri ile çoklu doymamış yağ asitlerinin üretimi ve ii) elisitasyon ile üretim miktarlarının artırılması amaçlanmıştır. Tez çalışmasında elde edilen veriler, Vizyon 2023 hedefleri kapsamında, ülkemizin endüstriyel hammadde ihtiyacında dışa bağımlılığının azaltılmasının yanında, dünya endüstriyel hammadde pazarında ülkemizin de söz sahibi olmasına katkı sağlayabilecektir.

Bu kapsamda; Biyoteknolojik yöntem ve uygulamaları kullanılarak, literatürde benzer ve farklı metabolitlerin üretilmesine ve miktarının artırılmasına yönelik çalışmalar derlenerek “**GENEL KISIMLAR**” başlığı altında sunulmuştur.

Amaçlanan hedeflere ulaşmak için, sarf malzeme, cihaz ve materyal ile literatürde yer alan yöntem ve uygulamalar benzer ve/veya modifiye edilmiş bir şekilde kullanılarak tez çalışması gerçekleştirilmiş ve bu kapsamda yer alan bilgiler “**MALZEME VE YÖNTEM**” başlığı altında sunulmuştur.

Kullanılan benzer ve/veya modifiye yöntem ve uygulamalarla gerçekleştirilen çalışmalar sonrası elde edilen sonuçlar, hem sayısal hem de görselleriyle “**BULGULAR**” başlığı altında sunulmuştur.

Kullanılan yöntem ve uygulamalarla elde edilen sonuçlar, literatürde rapor edilen benzer çalışmalarla karşılaştırılmış, ayrıca çalışma çıktıları özetlenerek, çalışmadaki çıktıları arttırabilecek öneriler ile birlikte “**TARTIŞMA VE SONUÇ**” başlığı altında sunulmuştur.

Deneysel çalışmalarda elde edilen, Kromatogram ve NMR analiz sonuçları “**EKLER**” başlığı altında sunulmuştur.

Yararlanılan literatürlere ait künyeler “**KAYNAKLAR**” başlığı altında sunulmuştur.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SEKONDER METABOLİTLER: BİTKİSEL SEKONDER METABOLİTLER

Metabolizma, organizma tarafından gerçekleştirilen tüm biyokimyasal reaksiyonların toplamı olarak adlandırılır. Metabolitler ise bu süreç içerisinde oluşan ara ürünler veya son ürünlerdir. Sekonder metabolit terimi 1891 yılında Albrecht Kossel tarafından tanımlanmış ve primer metabolit bölünen her hücrede bulunurken, sekonder metabolitler daha az miktarlarda bulunur ve yaşam için olağanüstü önem derecesine sahip değildir. Sekonder metabolitler, primer metabolitlerden türetilir ancak organizmanın temel moleküler iskeletini oluşturmaz. Dolayısıyla, ikincil metabolitler veya doğal ürünler, doğal metabolik ürünlerin heterojen grupları olarak, vegetatif büyüme için temel değil ama adaptif roller sağlayan (örneğin; savunma bileşikleri, ekolojik ilişkiler, simbiyozis, metal taşınımı, rekabet, vb.) durumlar için sinyal molekülü olarak da farklılaşma bileşenleri olarak kabul edilir. İki milyonun üzerinde bilinen sekonder metabolit bulunurken genelde yapı, fonksiyon ve biyosentezlerine göre sınıflandırılmaktadır. Sekonder metabolitler beş ana sınıfa ayrılır; Terpenoidler ve steroidler, yağ asidi türevleri ve poliketidiler, alkaloidler, ribozomal olmayan polipeptitler ve enzim kofaktörleridir. (Demain ve Fang, 2000; Mc Murry, 2015; Tiwari ve Rana, 2015; Thirumurugan ve diğ., 2018). Genel olarak sekonder metabolitler; A) Canlı hayvan, bitki, böcek ve mikroorganizmalara karşı rekabetçi silah, B) Metal taşıyıcı ajan, C) Diğer organizmalarla simbiyotik ilişki ajanları, D) Üreme ajanı, E) Farklılaştırma efektörü ve F) Mikroorganizmalar arası iletişimi fonksiyonlarını sağlar. Ağırlıklı olarak ise birçok biyokimyasal faaliyette (antimikrobiyal, antiparazitik, enzim ve tümör baskılayıcı ve immünosüresif) kullanılmaktadır. (Demain ve Fang, 2000; Thirumurugan ve diğ., 2018). Sekonder metabolitlerin major kaynaklarını; bitkiler (sekonder metabolitlerin %80'i), mikroorganizmalar, mantarlar, ve denizel organizmalar (süngerler, tunikatlar, mercanlar ve kabuklular) oluşturmaktadır (Berdy, 2005; Thirumurugan ve diğ., 2018). Özetle bitkiler sekonder metabolit üretimi için en zengin kaynaktır. Bitkisel sekonder metabolitler, yüksek ekonomik değere sahip ürünleri temsil eder. İnsanlık tarihinden beri bitkiler, gıda (kıvamlayıcı), sağlık (enfeksiyonların giderilmesi, çeşitli sağlık problemleri ve hastalıklar), kozmetik, yapı vb. endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Bitkiler çeşitli sekonder metabolitler (Tannin, terpenoitler, alkaloidler ve flavonoitler) bakımından zengindir ve çoğu fenol ve onun oksijen-substüte türevleri olan aromatik maddeleri sentez etmede sınırsız yeteneğe sahiptir. Yaklaşık, 25.000 terpenoidin, 12000 alkaloidin ve

8000 fenolik bileşimin sentezi bilinmektedir (Thirumurugan ve diğ., 2018). Bu konuya ilişkin olarak, bitkilerde tanımlanan sekonder metabolitlerin sınıflandırılması, ticari örnekleri, kaynak bitki ve kullanım alanları Tablo 2.1’de sunulmuştur.

Tablo 2.1: Bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerin genel olarak sınıflandırılması ve kullanım alanları.

Sekonder Metabolit Sınıfı	Sekonder Metabolit	Kaynak Bitki	Kullanım Alanı
TERPENOİDLER			
Monoterpenler	Limonen	Citrus türleri	Gıda: Aroma Verici Kozmetik: Koku Verici Sağlık: İnsektisit, Anti Tümör
	Linalool	Lavanta	
	Geraniol	Tütün	
	Loganik Asit	Pervane çiçeği	
Seskuiterpenler	Sekologanin	Pervane çiçeği	Gıda: Aroma Verici Sağlık: Anti Fungal
	Zingiberin	Zencefil	
	Artemisinin	<i>A. annua</i>	
	Dihidroartemisininik Asit		
Artesiminik Asit		Sağlık: Anti Malaria	
Diterpenler	Karyofilen	Şerbetçi Otu	Gıda: Aroma Verici Sağlık: Anti Tümör, Anti Enflamatuvar, Anestezik
	Taksol	Kenevir	
	Paclitaxel	Biberiye	
	Tanshinon	Fesleğen	
Triterpenler <i>Saponin</i>	Ginsenosides	Çin porsuğu	Sağlık: Anti Tümör, Kardiyoprotektif, Anti Alzheimer
	Dammarenediol	<i>T. chinensis</i>	
		<i>S. miltiorrhiza</i>	
		<i>G. biloba</i>	
Tetraterpenler (Karetenoid)	Karoten	Asya Ginsengi	Gıda: Enerji Verici Sağlık: Anti Tümör, Anti Oksidant, Antidepresan
	Likopen	Panax ginseng	
Politerpenler	Kauçuk	Tütün	Gıda: Aroma Verici Kozmetik: Deri Koruyucu, Dolgunluk Verici, Renk Verici Sağlık: Anti Tümör, Anti Oksidant, Antidepresan Otomotiv: Lastik Tekstil: Uyuma Yatakları
Steroller	Spinasterol	Kara Hindiba	Sağlık: Anti Tümör, Antiülser, Anti Testosteron
FENOLİKLER			
Fenolik Asitler <i>hidroksibenzoik asit</i>	Salisilik Asit	Söğüt	Kozmetik: Akne Sağlık: Ağrı Kesici, Anti Koagulan, Anti Fungal
	Kafeik Asit	Kahve	Sağlık: Anti Enflamatuvar, Uyarıcı
		Tarçın	
Kumarinler	Kumarin	Kumaru	Gıda: Katkı Maddesi Kozmetik: Katkı Maddesi Sağlık: Anti Koagulant, Anti Mikrobiyal, Anti Diyabetik
Taninler	Tannik Asit	Mazi Meşesi	Gıda: Aroma ve Tat Verici Berraklaştırma Sağlık: Anti Mutajen Anti Mikrobiyal, Anti Viral
Flavonoidler <i>flavanol flavanon izoflavonoid antosiyanin şalkon</i>	Kersetin	Soğan	Gıda: Pestisit Sağlık: Anti Enflamatuvar, Antioksidant, Anti Tümör, Anti Mikrobiyal
	Naringenin	Propolis	
	Genistein	Soya	
	Siyanidin	Çilek, Bögürtlen	
	Arubutin	Domates	

Tablo 2.1 Devamı: Bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerin genel olarak sınıflandırılması ve kullanım alanları.

Lignin	Alkali Lignin	Akasya	Sağlık: Anti Diyabetik, Anti Viral Anti Koagülant
Lignanlar	Sesamin	Susam	Gıda: Kıvam Arttırıcı Sağlık: Anti Oksidant, Anti Enflamatuvar
AZOT İÇERENLER			
Alkaloidler	Nikotin	Tütün	Sağlık: Anti Oksidant, Anti Enflamatuvar, Ağrı Kesici
	Kokain	Koka Bitkisi Karnabahar	Sağlık: Anestetik, Ağrı Kesici Gıda: Tat Arttırıcı
Glikozinatlar	Sinigrin	Lahana Brokoli Hardal	Sağlık: Anti Tümör, Yara İyileştirici, Anti Fungal, Anti Tümör, Anti Bakteriyel

Tez çalışması kapsamında çalışılan, diğer bir metabolik yolak ürünü ise yağ asitleridir. Yağ asitleri, 4 ile 36 karbon sayısına sahip ve hidrokarbon zincirlerinin son ucunda ise karboksil (-COOH) grubu bulunduran bileşiklerdir. Doğal olarak çift sayıda karbon atomu bulundurmaları birlikte, isimlendirilmesi -COOH grubundan başlayarak yapılmaktadır. Karboksil karbonuna komşu ilk karbon atomuna α , ikinci karbon atomuna β , üçüncü karbon atomuna ise γ karbonu ismi verilir.

Yağ asitleri **A) Doymuş (satüre);** Hidrokarbon zinciri içerisinde karbon atomları arasında herhangi bir çift bağ bulunmaz, daha çok akışkan olmayan yapıya sahiptir; (Örneğin, PA), **B) Doymamış (ansatüre);** Hidrokarbon zinciri içerisinde karbon atomları arasında birden fazla çift bağ bulunmakta olup; tek çift bağdan oluşanlara monoansatüre (MUFA), birden fazla çift bağdan oluşanlara ise poliansatüre (PUFA) doymamış yağ asidi denir (Örn: OA, GLA). Ayrıca, PUFA'larda hidrokarbon zincirinin sonundaki metil grubu ile karboksil grubuna en uzak konumda bulunan çift bağ arasındaki karbon atomu sayısına göre n-3 (Omega3), n-6 (Omega6), n-7 (Omega7) ve n-9 (Omega9) olarak 4 gruba ayrılmaktadır. **C) Ek Gruplu;** (hidrokarbon zincirlerinde -OH veya -CH₃ ek grup içerir) ve **D) Halkalı Yapılı;** yağ asitleridir]. Yağ asitlerini daha çok sağlık açısından değerlendirmekle birlikte, insan sağlığı açısından iki veya daha fazla çift bağ içeren ve insan vücudunda sentezlenemeyen yağ asitlerine esansiyel yağ asitleri ismi verilmektedir. Daha çok bitkilerde ve bazı deniz canlılarında bulunan esansiyel yağ asitleri, hücre membranı yapısına katılma, antiviral, antiinflamatuvar, antidiyabetik etkilere sahip olup, kalp ve damar sağlığı, mental gelişim ve steroid tabanlı bileşenlerin sentezlenmesi (bazı hormonlar, taşıyıcı moleküler) açısından önemlidir. Esansiyel yağ asitlerinin, daha yüksek karbona sahip yağ asitlerine dönüştürülmesinde bitkiler ve insanlar arasında bir devamlılık

süreci vardır. Bitkilerde, onsekiz karbonlu çoklu doymamış yağ asitlerinin daha yüksek karbon sayısı (20 karbon ve üzeri) içeren yağ asitlerine dönüştürülmesi metabolik yolaktaki enzimlerin eksiklikleri nedeniyle gerçekleştirilememekte, bu durumda da LA, ALA, GLA, SDA gibi yağ asitleri yüksek miktarda depo edilmesine sebep olmaktadır. İnsanlar da, bitkilerde depo edilen bu yağ asitlerini alarak, metabolizmalarıyla bunları daha yüksek karbon sayısı içeren EPA, DHA ve AA gibi çoklu doymamış yağ asitlerine çevirebilirler (Bruneton, 1999; Clough, 2001; Guil-Guerrero ve diğ., 2006; Blasbalg ve diğ., 2011; Arm ve diğ. 2013).

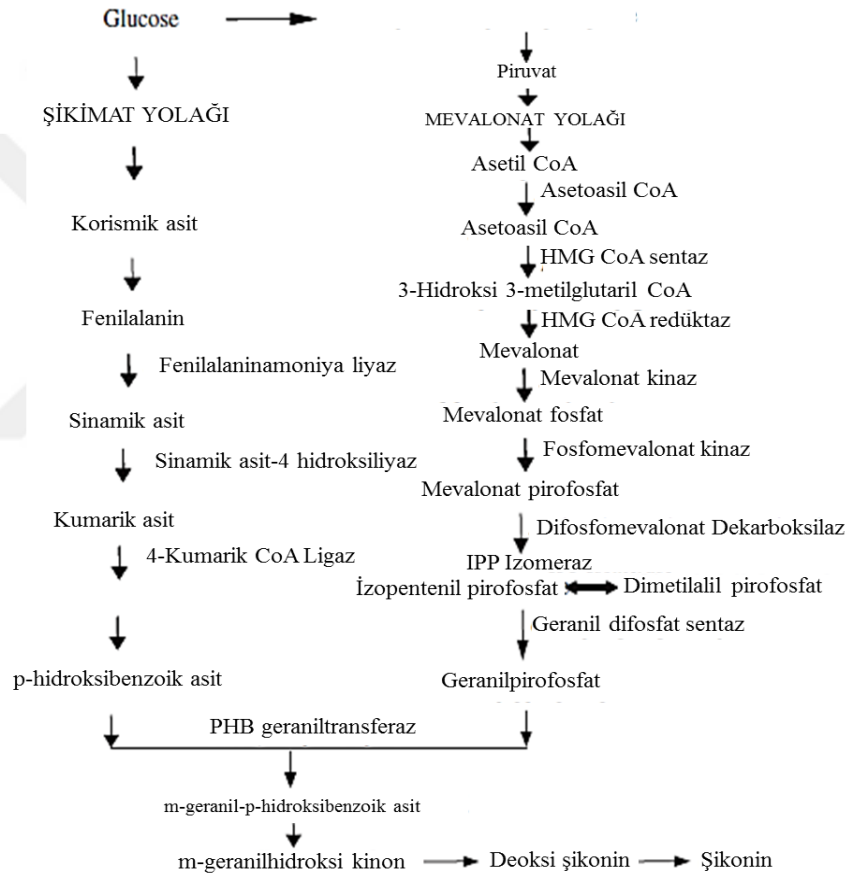
Sağlık açısından önemli olan bu metabolit ihtiyaçlarını insanlar, günlük beslenme menülerine dahil edecekleri besinlerle giderebilmektedir. Daha önceki paragrafta ifade edildiği üzere, esansiyel yağ asitleri kaynakları daha çok bazı deniz canlıları ve bitkiler olarak bilinmektedir. Denizlerin aşırı kirlenmesi (ağır metal vb.), düzensiz avlanma, ekonomik problemler (deniz ürünlerin pahalılığı), vejeteryan/vegan bireylerin besin tercihi gibi durumlar, esansiyel yağ asitleri açısından bitkilere yönelimi artırmaktadır. Ayrıca bazı bitki familyaları esansiyel yağ gereksinimi karşılamak için kullanılabilir (Welch ve diğ., 2010; Guil-Guerrero ve diğ., 2013b). Bunların arasında; Boraginaceae, Onagraceae, Brassicaceae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Poaceae, Fabaceae, Rosaceae familyasına ait cins ve türler sayılabilir (Hildebrand, 2011).

İfade edilen bilgilerde yer aldığı üzere bitki türlerinin bir çoğu ve özellikle tez çalışması kapsamında araştırılan Boraginaceae familyası üyesi *Echium* L.'de gıda, sağlık, kozmetik, yapı vb., bir çok endüstriyel alanda kullanılabilir biyoaktif bileşenler bulunmakta olup, doğrudan veya dolaylı olarak bir işlemde geçirdikten sonra değerlendirilmektedir.

Bunlar arasında, Şikonin/Alkanin, Rosmarinik Asit, Omega-3 grubu yağ asitlerinden ALA ve SDA, Omega-6 grubu yağ asitlerinden LA ve GLA en önemlilerindedir.

Şikonin/Alkanin: Birbirinin enantiyomeri (R/S), lipofilik kırmızı pigmentli iki madde, izohekzenilnaftarizinler ya da naftakinonlar olarak da bilinmektedir. Glikoz kullanılarak doğrudan Şikimat yolağından, yine glikozdan türevlendirilmiş Gliseraldehit-3-fosfat kullanılarak Mevalonat yolağında sententezlenen iki prekürsör 4-hidroksibenzoat (4HB) ve geranildifosfat (GPP) aracılığıyla (Şekil 2.1) sentez edilen Şikonin/Alkanin (Şekil 2.4), ilk olarak Çin'de Boraginaceae ailesinden *Lithospermum erythrorhizon* türünden izole edilmiş bir naftokinon bileşeni olup, Çin tıbbında antienflamatuar, yara iyileştirici ve yine Eski Çin'de

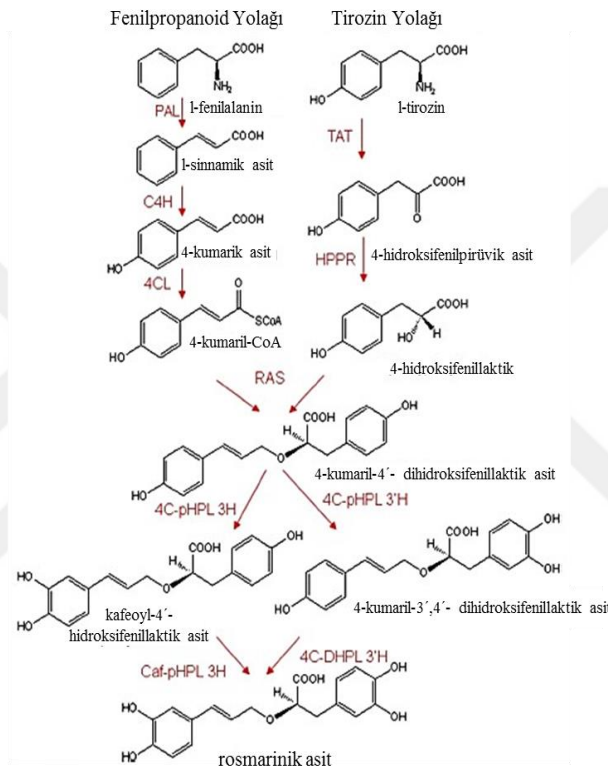
boyar madde özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Boraginaceae familyasında *Lithospermum* dışında *Arnebia*, *Alkanna*, *Anchusa*, *Borago*, *Onosma* ve *Echium* cinsleri de şikonin ve alkanin barındırmaktadır (Singh ve diğ., 2010). Bu maddelerin biyolojik aktivite bakımından çok geniş etkileri bulunmaktadır; bunlar arasında antimikrobiyal, antitümoral, yara iyileştirici, antiviral, analjezik, antienflamatuar, antialerjenik, antipiretik, ve anti oksidan özelliklerinin yanında boyar madde olarak dudak nemlendirici olarak da Japon kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır (Papageorgiou ve diğ., 2006, 2008; Singh ve diğ., 2010, Pal ve diğ., 2018).



Şekil 2.1: Şikimat ve mevalonat yolaklarından şikonin/alkanin biyosentezi (Singh ve diğ., 2010).

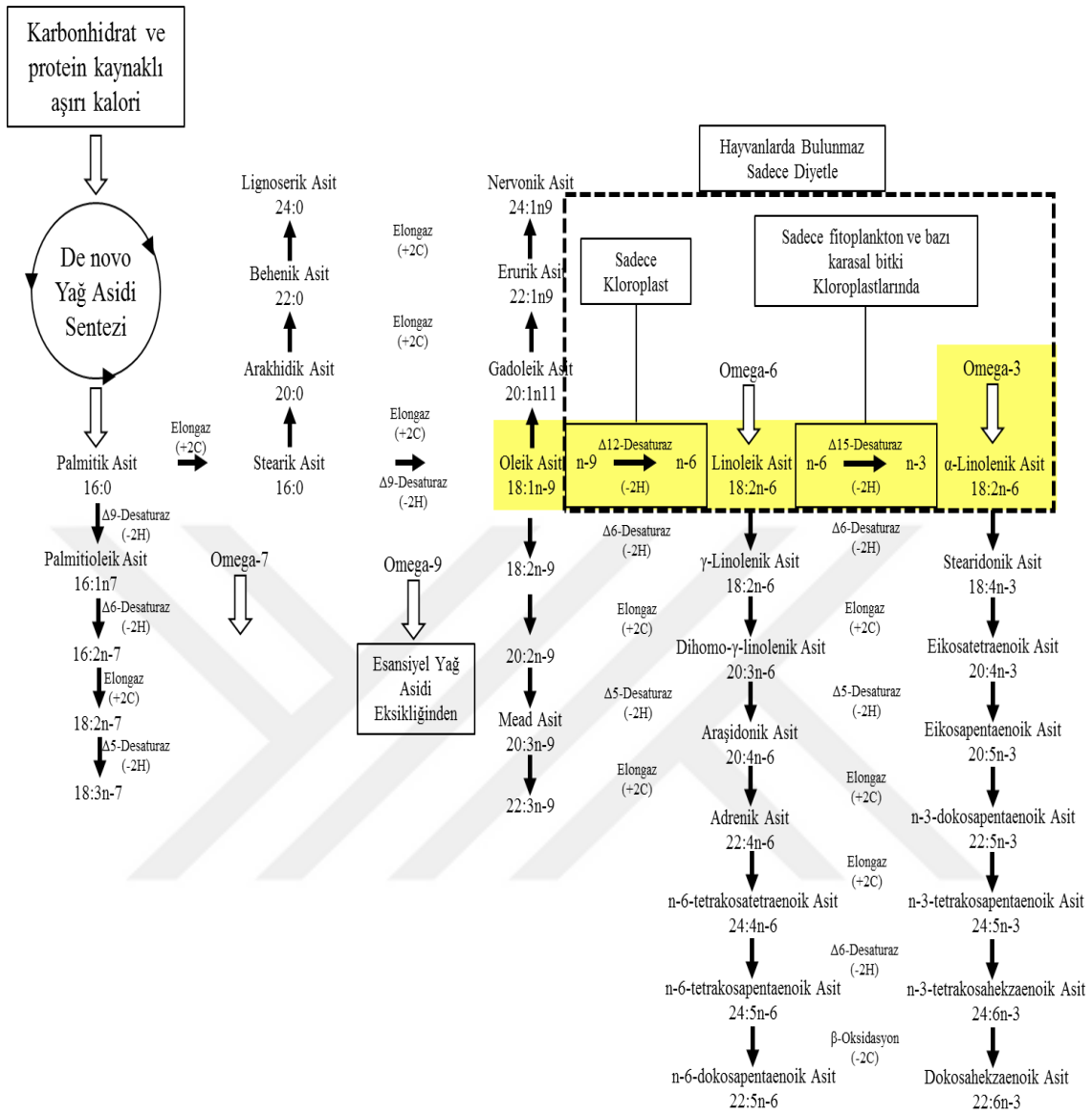
Rosmarinik Asit; Rosmarinik asit (Şekil 2.4) ilk olarak 1958 yılında biberiyeden (*Rosmarinus officinalis*) özütlenen kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenilaktik asit esteri olarak tespit edilmiştir. Rosmarinik asit, fenilproponoid ve tirozin yolaklarından (Şekil 2.2) türevlendirilmekte olup, iki yolakta şikimat yolağına bağımlıdır. Boraginaceae, Lamiaceae, Anthocerotaceae ve Blechnaceae

familyası üyesi bitkiler tarafından üretilen rosmarinik asit birçok biyolojik aktiviteye sahiptir; Antioksidant, anti-enflamatuar, anti-mutajenik, anti-genotoksik, antialzeimer, antimetastatik, antianjiyogenik, nöroprotektif, antimikrobiyal, immunomodülatör, antivenom, antimelanogenik (Scarpati ve diğ., 1958; Petersen ve diğ., 2009; Petersen, 2013; Khojasteh ve diğ., 2014; Pezeshki ve Petersen, 2018).



Şekil 2.2: Fenilpropanoid ve tirozin yolaklarında rosmarinik asit biyosentezi (Petersen ve diğ., 2009).

Tez çalışması kapsamında, çalışma materyali olarak kullanılan *Echium L.*'den elde edilen ve omega-3 ve omega-6 gruplarında yer alan ALA, SDA, LA ve GLA'ya ait biyosentez yolağı Şekil 2.3' de ve ilgili doymamış yağ asitlerine yönelik kısa özet bilgi ise paragrafın devamında sunulmuştur.



Şekil 2.3: Omega yağ asitlerinin biyosentez yolağı (Akoh ve Min, 2008).

ALA; (Şekil 2.4), 18 karbonlu 3 çift bağ içeren ve Omega-3 sınıfında esansiyel bir yağ asidi olup, romatoid artrit, mental rahatsızlıklar, lupus, diyabet, böbrek rahatsızlıkları, ülseratif kolit, Crohn hastalığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, migren, deri kanseri, depresyona karşı ve kanser önleyici olarak kullanılmaktadır (Blondeau, 2016).

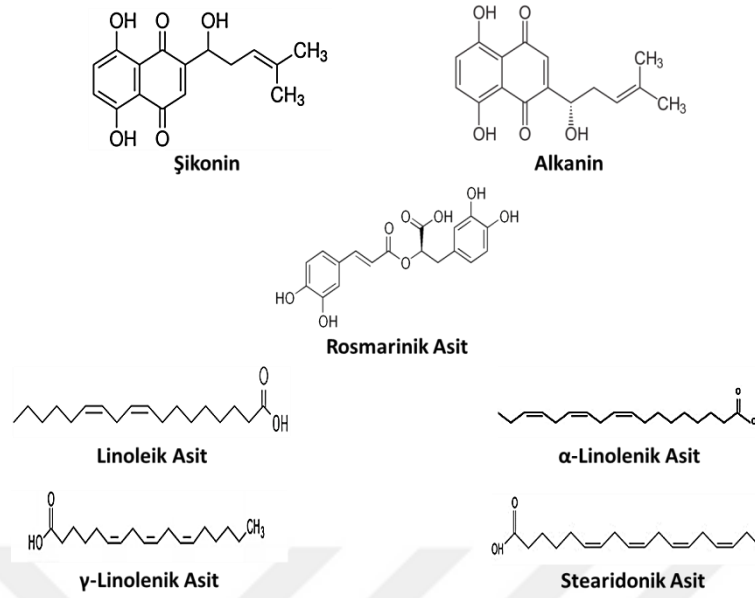
SDA; (Şekil 2.4), 18 karbonlu 3 çift bağ içeren ve Omega-3 sınıfında esansiyel bir yağ asidi olup 1960 yılında keşfedilmiştir. ALA'nın Δ^6 Desaturaz enzimiyle dönüştürülmesi sonucu elde edilen ilk çoklu doymamış yağ asitidir. EPA ve DHA gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin

insanlarda sentezlenmesi için gerekli bir yağ asididir. Zaman zaman LA vücutta $\Delta 6$ desaturaz enzimi için ALA ile yarışmakta ve buna ek olarak bu enzimin aktivitesinin düşük ve inaktif oluşu SDA ve dolayısıyla EPA'ya dönüşümü sınırlayabilmektedir. Bu durum, trans ve doymuş yağ asidi alımı, yüksek alkol ve şeker tüketimi, diyabet, yaşlılık, yüksek tansiyon, egzema, stres, sigara alışkanlığı, B6 vitamini ve çinko alımının yetersizliği durumunda meydana gelmektedir (Clough, 2001; Zhang ve diğ., 2008). Diğer Omega-3 sınıfı esansiyel yağ asitleri gibi; romatoid artrit, diyabet, mental rahatsızlıkların önlenmesi, böbrek rahatsızlıkları ve kanser önleyici olarak da kullanılmaktadır (Coupland ve diğ., 2008).

LA; (Şekil 2.4), 18 karbonlu 2 çift bağ içeren ve Omega-6 sınıfında esansiyel bir yağ asidi olup GLA'nın oluşumu için bir prekürsör olarak kullanılmaktadır. Nörolojik hastalıkların önlenmesinde, diyabet rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Lankinen ve diğ., 2019).

GLA; (Şekil 2.4.), 18 karbonlu 3 çift bağ içeren ve Omega-6 sınıfında esansiyel bir yağ asidi olup LA'nın $\Delta 6$ Desaturaz enzimi ile reaksiyonu sonucu oluşur. Özellikle AA gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin insanlarda sentezlenmesi için gerekli bir yağ asididir. Boraginaceae familyası üyelerinde yüksek miktarda tespit edilmiştir. Ekzema, diyabet, kanser, viral enfeksiyonlara, osteoporoz, alkolizm gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Horrobin, 1992; Gunstone, 1992; Velasco ve Goffman, 1999; Guil-Guerrero ve diğ., 2001b).

Boraginaceae familyası üyesi birçok bitki yukarıda ifade edilen metabolitler başta olmak üzere çok sayıda metaboliti (şikoin türevleri, alkaloidler vb.) içermekte olup, tez konusu çalışma materyali olan Boraginaceae familyası üyesi *Echium* L. türünün botanik özellikleri, coğrafik yayılışı ve ekonomik önemi bir sonraki başlıkta sunulmuştur.



Şekil 2.4: Boraginacea familyası üyelerinde doğal olarak bulunan metabolitler.

2.2. BORAGINACEAE FAMILİYASI ve *ECHIMUM* L.

Dünya’da ve Ülkemizde yayılış gösteren bitkilerin birçoğu başta tıbbi amaçlı olmak üzere gıda, kozmetik, yapı gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Tez çalışması kapsamında araştırılan ve ekonomik olarak değerli metabolitleri içeren *E. italicum* L. türünün üyesi olduğu Boraginaceae familyası ise, Dünya’da 145 cins ve 2213 tür, Ülkemiz’de ise 44 cins, 345 tür ve 38 alttür ile yayılış gösterirken yüksek oranda endemizm görülmektedir (Santana ve diğ., 2012; Aymelek, 2015). Boraginaceae familyasına ait bitkiler genellikle tek yıllık ya da çok yıllık, çalı ve ağaç formunda olup, diken ve tüy barındıran gövdeler ile mavi, pembe, sarı, beyaz renkli çiçeklere sahiptir (Wickens, 1978).

Echium L. Dünya’da Asya’nın Batısı, Güney ve Kuzey Afrika, Avrupa, Atlantik Okyanusu’nun kıyısında yer alan ve *Echium* L.’ye ait endemiklerin bir çoğunun bulunduğu Makorenezya (Azore, Madeyra, Kanarya ve Kap Verde)’da yayılış gösterirken, Ülkemizin hemen hemen bir çok bölgesinde dağılış göstermekte ve 9 türle temsil edilmektedir. Hilger ve Böhle (2000)’nin yayınlamış olduğu DNA sekanslama çalışmalarına göre *Echium* L. cinsi, *E. russicum* farklı bir cinse dahil edildiği için 8 tür ile (*E. orientale* L., *E. glomeratum* Poir., *E. italicum* L., *E. vulgare* L. subsp. *vulgare*, *E. plantagineum* L., *E. angustifolium* Mill., *E. parviflorum* Moench., *E.*

arenarium Guss.) temsil edilmekte olup, bunlardan *E. orientale* L. türü endemik olarak rapor edilmiştir (Davis, 1978; Güner ve Ekim, 2014).

Echium L. cinsine ait türler Boraginaceae familyası üyelerinde olduğu üzere, tek yıllıktan çok yıllığa değişen bir yaşam skalası gösterirken, tüylü ve dikenli gövdeye ve böcekler tarafından döllenmiş zigomorfik çiçeklere sahiptirler (Özcan, 2013). 7.5 ila 9.5 mm uzunluğunda, sıkı huniler şeklinde, soluk mavi-eflatun-pembemsi-beyazımsı renklerde taç yaprakları vardır (Edmondson, 1978). Bazaldaki yapraklar saplı olup rozet biçiminde şekil gösterirken, yaprak sapsızları mevcut olmayıp, tohumları dörtlü nutlet şeklindedir (Davis,1978; Güner ve Ekim, 2014).

Boraginaceae familyası üyesi cinslerin birçoğu, doğrudan ve/veya dolaylı olarak sağlık, peyzaj, gıda, kozmetik, boya vb. alanlarda kullanılmaktadır. Familya üyeleri, ifade edilen alanlarda kullanılan ve kullanılabilir bir çok metaboliti (şikoinin, alkanin, rosmarinik asit, linoleik asit, stearidonik asit, α - ve γ -linolenik asit gibi doymamış yağ asitleri vb.) çeşitli organlarında bulundurmaktadır. Bazı Boraginaceae familyasından bazı cinslerin belirtilen alanlarda kullanımı ile ilişkili örnekleri inceleyecek olursak;

Alkanna (Havaciva otu), uzun yıllardan beri, deri hastalıkları ile ilgili problemlerde yararlanılmasının yanında boyar madde olarak kozmetik ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. 1976 yılında modern tıpta yeni bir gelişme olarak yara iyileştirici olarak tespit edilmiş olup, antik çağlarda köklerinin yaralarda kullanıldığı ile ilgili kayıtlar bulunmaktadır (Şekil 2.5), (Kheiri ve diğ., 2017).



Şekil 2.5: *Alkanna tinctoria*.

Borago (Hodan), antik çağdan beri medikal ve beslenme uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmakta olup, özellikle antidepresan, diüretik ve yaralanmış veya tahriş dokularda gelişen ağrıları azaltıcı etkilerinin yanında, tohumlarının içerdiği yağ (yüksek miktarda γ -linolenik asit) sayesinde hormonal sistemini düzenleme ve düşük kan basıncı oluşturma gibi etkileri nedeniyle de kullanılmıştır (Şekil 2.6) (Bown, 1995; Hendawy ve El-Gengaihi, 2010; Asadi-Samani ve diğ., 2014).



Şekil 2.6: *Borago officinalis*.

Lithospermum (Taşkesen Otu), köklerinden elde edilen kırmızı-mor renk antik çağdan beri boyar madde olarak kullanılmaktadır. Örneğin, *L. erythrorhizon*'dan elde edilen mor renk Japon üst düzey bürokratların elbiselerinin boyanmasında ve ayrıca, kurutulmuş kökleri ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktaydı. “Shikon-Borei-Toh” adıyla antitümör olarak oral yolla, “Shu-Un-Koh” adıyla merhem olarak deride meydana gelen bazı hastalıklarda (yara, yanık, soğuk ısırması, şişlik ve hemoroidde) kullanılmaktaydı (Şekil 2.7), (Fujita ve Yoshida 1937; Ootsuka ve diğ., 1972; Yazaki, 2017).



Şekil 2.7: *Lithospermum erythrorhizon*.

Onosma (Emzikotu), orjini Grekçe koku anlamına gelen, Latince “osma” kelimesinden kökenlenmiş, içeriğinde birçok metaboliti barındırmaktadır. Geleneksel tedavide laksatif, antihelmintik, taş düşürücü ve panzehir olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, çiçekleri; uyarıcı ve kardiotonik, yaprakları; müshil ve egzama tedavisinde, kökleri: gıda boyar madde, yağlı boya ve tekstil boyası ve medikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Şekil 2.8) (Kumar ve diğ., 2013).



Şekil 2.8: *Onosma tauricum*.

Anchusa (Sığırdili), Uygur geleneksel tıbbında kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların tedavilerinde, bunun yanında ağrı kesici, gaz giderici, antidiyabetik, yara iyileştirici olarak geleneksel tıp uygulamalarında kullanılmaktadır (Şekil 2.9) (Hou ve diğ., 2017; Taban ve diğ., 2018).



Şekil 2.9: *Anchusa officinalis*.

Arnebia (Eğnik), Pers ve geleneksel tıpta, “Aboukhalsa”, “Havachoobeh” ve “Sorkh Giyah” adlarıyla bilinmekte olup, yanıkların iyileştirilmesi ile çeşitli deri hastalıklarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte içermiş olduğu metabolitler nedeniyle antimikrobiyal, antitümör, antiinflamatuvar ve antiplatelet aktiviteleri de bulunmaktadır (Hosseini, 2018).



Şekil 2.10: *Arnebia hispidissima*.

Echium (Engerek Otu), içerdiği nektar yoğunluğundan kaynaklı olarak bal bitkisi olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, içeriğinde yüksek miktarda doymamış yağ asitleri (ALA, GLA, SDA) sayesinde balık yağına alternatif olarak özellikle vejeteryan kişilerin kullanımına sunulabileceği gibi hali hazırda gıda, sağlık ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta kökleri yılan zehirlenmelerinde panzehir, balgam söktürücü, sara hastalığının tedavisinde, diüretik, yatıştırıcı, romatizmal hastalıklarda, ciltteki kırıksıklıklara, güneş ışığının zararlı etkilerine karşı kullanılırken, köklerden elde edilen boyar madde ise kozmetikte kullanılmaktadır (Şekil 2.11) (Çakıloğlu ve diğ., 2007; Oral ve Aslan 2007; Yıldırım ve Özkum 2010; Aymelek, 2015).



Şekil 2.11: *Echium italicum*.

Başlık 2.1 ve 2.2’de ifade edilen bilgiler özetlendiğinde, bitkiler birçok endüstriyel alanda kullanılan ya da kullanılabilir bileşenler/metabolitler bulundurmaktadır. Bitkiler, metabolit açısından zengin olmaları ve ilgili metabolitleri içeren diğer canlılardaki bazı sorunlardan dolayı (Örneğin; soğuk sularda yaşayan denizel canlılar bünyelerinde bulundurdukları yüksek doymamış yağ asitleri bakımından tercih edilmekte olup denizlerdeki ekosistemin olumsuz etkilenmesiyle beraber getirdiği biyoçeşitliliğin azalması durumu, yine buna bağlı olarak denizlere dökülen sanayi atıklarından gelen ağır metal birikimleri, aşırı avlanma gibi durumların yanında vejeteryan ve veganların beslenme durumları vb.) alternatif tüketim kaynağı olabilir. Ancak, karasal bitkilerin alternatif kaynak oluşu, popülasyon yapısı ve endemizm özelliği dikkate alındığında yoğun ve kontrolsüz bir şekilde doğadan toplanmasına yol açmakta, bu durum ise bitki çeşitliliğinin azalmasına, hatta yok olmasına neden olmaktadır. İfade edilen durumların üstesinden gelmek için bitki biyoteknolojisi alanlarında çalışan bilim insanları, ilgili metabolitlerin bitkilerin doğal yaşamlarından toplanarak elde edilmesi yerine farklı ve başarılı stratejiler geliştirmeye çalışmışlardır.

2.3. BİTKİSEL SEKONDER METABOLİTLERİN ÜRETİLMESİNDE YENİ YAKLAŞIMLAR ve UYGULAMALAR

Birleşmiş Milletler Sosyal ve Ekonomi Bölümü Nüfus Biriminin tahminlerine göre, Dünya nüfusunun 2023 yılında 8 milyar, 2050 yılında ise 10 milyar olması beklenmektedir (<http://www.worldometers.info/world-population>). Dünya nüfusunun bu denli hızlı bir şekilde yükselmesi sağlık ve gıda alanlarında kaynak ihtiyaçlarını artırmaktadır. Bahsi geçen kaynakların büyük bir bölümünü bitkiler oluşturmakta olup, var olan bitkisel kaynağın etkin bir şekilde kullanılmasının yanında, artan nüfusa karşı yeterli bitkisel kaynak ihtiyacının da karşılanabilmesi için stratejilerin oluşturulması gerekmektedir.

Bununla birlikte, Dünya’da nüfusun artmasına paralel olarak sanayideki gelişmeler, ekilebilen arazi alanını azaltmakta aynı zamanda var olan alanların da hem doğrudan hem de dolaylı bir şekilde kirlenmesine sebep olmaktadır. Bu durum tarımsal üretimdeki verimi de etkilemektedir. Bilim insanları, var olan genetik kaynağın korunmasının yanında, doğal süreçte karşılaşılan tarımsal problemlerin üstesinden gelmek için, geleneksel üretim teknikleriyle güncel teknolojiyi birleştirmek suretiyle yeni teknikler geliştirmeye çalışmıştır. Ortaya çıkan füzyon teknoloji güncel sorunların üstesinden gelmesinin yanında, gerekli ihtiyaçların karşılanmasına da katkı sağlamaktadır. Bitki Biyoteknolojisi olarak adlandırılmakta olan bu teknoloji,

geleneksel tekniklerin modern teknolojiyle birlikte yoğrulmasıyla ortaya çıkmıştır. İlk çalışmaları 1902 yılında Haberland ile başlamış ve günümüzde moleküler biyoloji ve genetik alanındaki yeni gelişmeler de dahil edilmesiyle (Moleküler Temelli Islah, Genom Editing vb.) farklı bir boyuta ulaşmıştır.

İlk zamanlardan günümüze değin Bitki Biyoteknolojisiyle; mevsimden bağımsız üretim/seri üretim, genetik olarak birbirine benzer nitelikte bitkilerin üretilmesi, geleneksel çoğaltımda problemlerle karşılaşılan bitkilerin kolay üretimi, yüksek verimli türlerin seçilimi ve üretimi, farklı canlılarda var olan özelliklerin kazandırıldığı zengin içerikli bitkilerin üretimi, ekonomik olarak değerli ve endemik bitkilerin orta ve uzun süreli korunması gibi çalışmaların yanında, belki de en ilgi çekici çalışma konusu olarak değerlendirilebilecek olan, bitkisel gen kaynaklarının içerdiği maddelerin üretimi, üretiminin artırılması gibi çalışmalar yapılabilmektedir.

Metabolit üretimi ve üretiminin artırılması çalışmaları, Bitki Biyoteknolojisinde yer alan yöntem ve metotlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Çalışma aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında, hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarından, kontrollü sıcaklık ve ışık şartlarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin eldesini amaçlamaktadır (Thorpe, 2007). Gerçekleştirilen çalışmalar, bitkilerin doğadan yoğun bir şekilde bilinçsiz toplanarak popülasyon yoğunluğunun kritik eşiklere düşmesinin önlenmesinde, mevsimden bağımsız üretime ve geniş alana ihtiyaç olmadan çalışmaya olanak sağlamanın yanında, uygulanan bazı manipülasyonlarla hedef madde ya da maddelerin üretiminin artırılmasına da olanak sağlamaktadır.

Son zamanlarda Bitki Biyoteknolojisi yöntem ve metotlar kullanılarak, bitkilerde çok önemli etkilere sahip ve birçok alanda kullanılan ve/veya kullanılabilir madde üretiminin ve üretimlerinin artırıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda genelde kullanılan biyoteknolojik yaklaşımlar;

- A) Bitki hücre, doku ve organ kültürleri yoluyla üretim (hücre, sürgün, gövde ve kök kültürleri, büyük ölçekli kültürler)
- B) Transgenik bitkiler yoluyla üretim (metabolizma mühendisliği, heterolog ekspresyon, moleküler şekillendirme)

şeklinde iki farklı yaklaşımla yapılan bir çok çalışmaya literatürde; *Hyoscyamus* spp. kök kültürlerinde Tropan alkaloidleri üretimi, *Hypericum perforatum* sürgün kültürlerinde hiperisin ve psödohiperisin üretimi, Lotus embiryo kültürlerinde neferin üretimi, *Stevia rebaudiana* da nodal ve yaprak eksplantlarından oluşturulan kallus kültürlerinden steviosid üretimi, *Spilanthes acmella* hücre kültürlerinde skopoletin üretimi, *Datura metel* saçak kök kültürlerinde atropin üretimi, *Mentha citrate* gövde teratomalarında terpen üretimi, Japonya'da Mitsui Petrochemical Industries tarafından, 4000 ila 20.000 litrelik ölçeklerde, berberin, ginseng ve şikonin üretimi, metabolik mühendisliği örneği olarak *Panax ginseng* bitkisine ait dammarendiol-II-sentaz (pgDDS) ve CYP716A47 genlerinin tütün bitkisinde ekspresyonuyla protopanaksadiol üretimi, son olarak heterelog ekspresyon yardımıyla metabolit üretimine örnek olarak *E. coli*'de artemisinik asit üretilmesi çalışmalarına rastlanmaktadır. (Spencer ve diğ., 1990; Janarthanam ve diğ., 2010; Filova, 2014; Sonja ve diğ., 2014; Bhatia ve diğ., 2015; Chun ve diğ., 2015; Shakeran ve diğ., 2015; Abyari ve diğ., 2016)

Tez çalışması kapsamında, sekonder metabolit üretiminde ve üretimin arttırılmasında farklı biyoteknolojik yöntemler ve uygulamalar kullanılmıştır (Şekil 2.12).

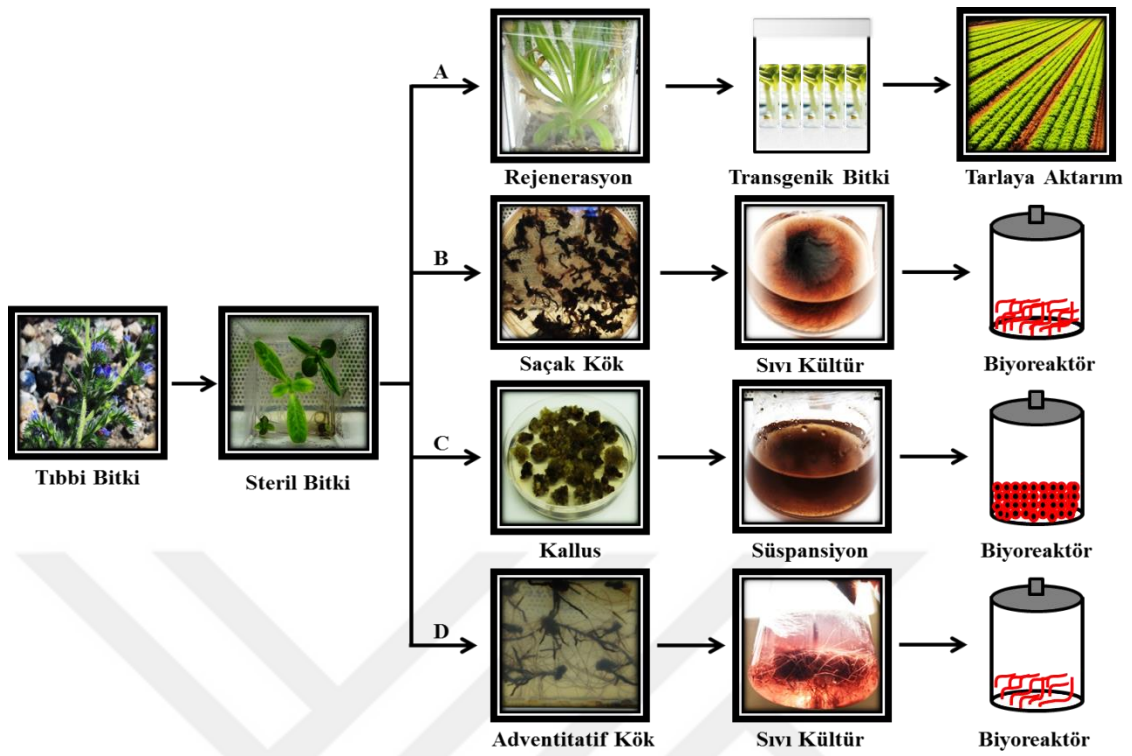
Kallus Kültürleri; Ana bitkiden kesilip çıkartılan ve bölünme yeteneklerini kaybetmemiş organ ve doku parçalarının, gerekli bileşenlerin (besi ortamı ve BBD) sağlandığı *in vitro* ortama aktararak oluşturulan düzensiz kütleler olarak adlandırılmakta olup, metabolit üretiminde kallus kültürünün başlatılacağı eksplant kaynağı önemlidir (Sökmen ve Gürel, 2001). Kallus kültürü, sekonder metabolit üretiminde doğrudan kullanılacak bir *in vitro* kültür kaynağı olabildiği gibi, daha yüksek hacimde üretim sağlanabilecek süspansiyon kültürü çalışmalarında da belli işlemler sonrası kullanılabilir. Süspansiyon kültürü ile ilgili bilgiler daha sonraki başlıklarda değinilecektir, ancak süspansiyon kültürünün başlatılması çalışmaları için kallus morfolojisi önem arz etmekte olup, ufalanabilir (kolay dağılıbilir) kallus morfolojisi, süspansiyon çalışmasında tercih edilen bir özelliktir (Güven ve Gürsul, 2014).

Süspansiyon Kültürleri; Kültürün başlatılmasında, istenen sekonder metaboliti üretebilme potansiyeli bulunan eksplanttan oluşturulan dağılgan tipteki kalluslardan yararlanılmaktadır. Genel olarak, bir organizmadan hücrelerin izole edilmesi ve daha sonra bu hücrelerin laboratuvar koşullarında uygun yapay bir besi ortamında üretilmesini ve çoğaltılmasını ifade eder ve hızlı bölünen hücrelerin homojen bir süspansiyonu şeklinde tanımlanmaktadır. Aseptik kültür koşullarının sağlandığı ortamda belli miktardaki dağılıbilir karakterdeki kallus

parçalarının, sıvı besi ortamı bulunan bir erlen içerisine transfer edilmesi ve belli dönme hızına sahip çalkalayıcılar üzerinde çalkalanmasıyla başlatılan kültürler, akabinde belirli zaman periyotlarında (yaklaşık 1 aylık süreçler halinde taze besi ortamına 1/1 hacimde kültür ve besi ortamı şeklinde), hücrelerin birbirlerinden ayrılması için, por çapları 500 ile 40 µm arasında değişen eleklerden geçirmek suretiyle alt kültürlenmesi ile kültürlerin homojen hal alması sağlanmaktadır. İdeal bir süspansiyon kültürünün bölünme, büyüme ve farklılaşmalarında benzer zaman senkronizasyonu gösteren hücrelerden oluşması beklenmektedir. Süspansiyon kültürleri büyüme süreci farklı aşamalardan oluşmakta olup bunlar; Lag Fazı-Log veya Üstel Faz-Linear Faz-Yavaşlama Fazı ve Duraklama Fazıdır. Süspansiyon kültürü çalışmaları küçük hacimlerden başlayarak, daha yüksek hacimde biyoreaktör ismi verilen sistemlerde devam ettirebilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle sekonder metabolit üretiminde çokça tercih edilen bir Bitki Biyoteknolojisi uygulamasıdır.

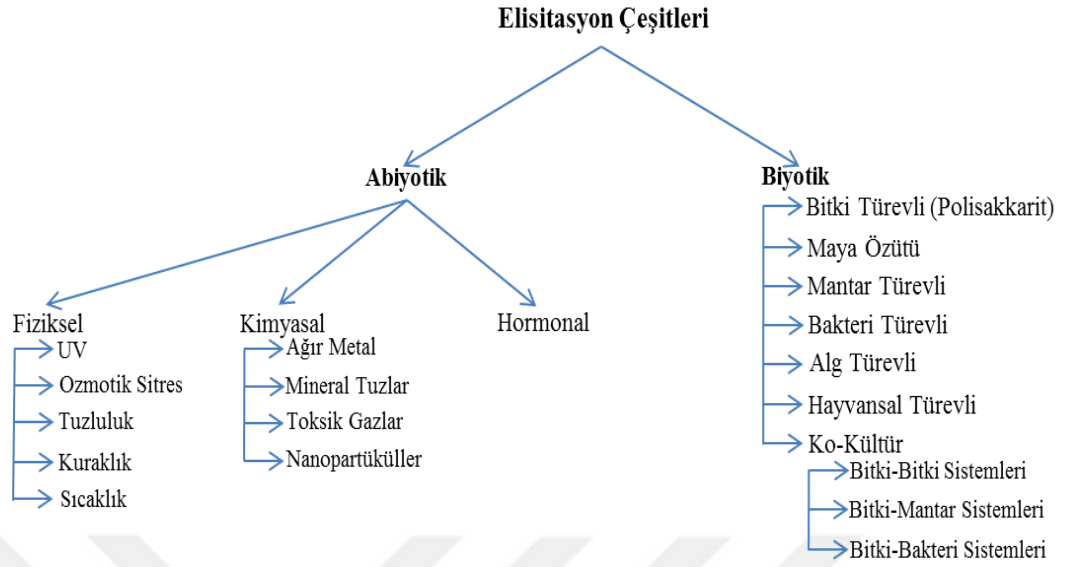
Kallus ve süspansiyon kültürlerinde üretim bazı faktörlerce etkilenebilmekte olup, ideal bir kültür oluşturmada dikkat edilmesi gerekmektedir. Bunlar; eksplant tipi, besi ortamı tipi ve içeriği, pH, sıcaklık, ışık, havalandırma olarak sayılabilir.

Saçak Kök Kültürleri; Kallus ve hücre süspansiyon kültürleri, sekonder metabolit üretimi açısından, büyümede hız avantajı sağlaması nedeniyle tercih edilmektedir (Giri ve Narasu, 2000). Bitkilerin *Agrobacterium rhizogenesis* bakterisi ile enfekte edilmesi sonucunda, bu bakterinin sahip olduğu kök uyarıcı plazmitlerinde (Root Inducing Plasmid, Ri) bulunan rol genlerinin bitkiye aktarılması ile saçak kökleri oluşmaktadır. Saçak kökleri oluşuktan sonra, rol genlerinin bitkiye aktarılması sayesinde köklerin altkültürlenmesi sırasında besi yerine ilave oksijen eklenmesine gereksinim olmadan saçak köklerinin çoğalması ve büyümesi sağlanır.



Şekil 2.12: Bitki hücre, doku ve organ kültürleri aracılığıyla sekonder metabolit üretimi. A) Transgenik bitkilerin yetiştirilmesi, (B) Saçak kök kültürü, (C) Bitki hücre-süspansiyon kültürü, (D) Adventif kök kültürü (Lu ve diğ., 2016; Tilkat ve diğ., 2019'dan modifiye edilmiştir).

Kullanılan biyoteknolojik yaklaşımlarla birlikte, bitkilerin büyüme ortamlarına ilave edilen bazı kimyasal uyarıcılarla (prekürsör ve elisitör) veya fiziksel uyarımlarla var olan sekonder metabolitin miktarı artırılabilir, eser miktarda olan ya da üretilmeyen metabolitlerin üretilmesi de sağlanabilir (Naik ve Al-Khayri, 2016). Bununla birlikte sekonder metabolit üretimi açısından, uygulanan kimyasal maddenin miktarı, zamanı ve süresi veya fiziksel uyarıcılarının uygulama zamanı ve süresi önemlidir (Namdeo, 2007). Bu uyarıcılar, maddenin sentezlenmesini sağlayan yolaktaki başlatıcı molekül (prekürsör) olabildiği gibi, Şekil 2.5'de ifade edildiği üzere abiyotik veya biyotik stres ajanları da olabilir.



Şekil 2.13: Bitki doku ve hücre kültürlerinde sık kullanılan elisitasyon tipleri (Kaynak: Naik ve Al-Khayri, 2016; Tilkat ve diğ., 2019'dan modifiye edilmiştir).

Literatürde, Şekil 2.13'de sunulan uygulamalar ve tez çalışması kapsamında da yararlanılan bazı Bitki Biyoteknoloji yöntem ve uygulamaları ile prekürsör ve elisitör/elisitasyonlar kullanılarak, bitkisel sekonder metabolit üretimi ile ilgili benzer birçok çalışmaya rastlanılmaktadır;

Rapor edilen çalışmalarda; *Silymarin marianum* saçak kök kültürlerine L-fenilalanin uygulaması silimarin miktarını arttırdığı, *Catharanthus roseus* hücre süspansiyon kültürlerine triptofan uygulaması katarantin miktarını arttırdığı, *Corylus avellana* L. hücre süspansiyon kültürlerine fenilalanin uygulaması paklitaksel miktarını arttırdığı, *Arachies hypogea* hücre süspansiyon kültürlerine Malonyl CoA uygulaması resveretrol miktarını arttırdığı, *Citrus grandis* kallus kültürlerine mevalonik asit ve linalol uygulaması limonen miktarını arttırdığı, *Plumbago indica* kök kültürlerine uygulanan L-alanin plumbagin miktarını arttırdığı, *Catharanthus roseus* saçak kök kültürlerine uygulanan UV-B ışığı önemli ölçüde vinkristin ve vinblastin üretimini arttırdığı, *Vitis vinifera* süspansiyon kültürlerine UV-C ile MeJA veya UV-C ile Salisilik Asit uygulaması stilben miktarını arttırdığı, *Artemisia annua in vivo* kültürlerine NaCl uygulaması artemisin miktarını arttırdığı, *Bacopa monnieri* gövde kültürlerine MeJA uygulaması bakosit A miktarını arttırdığı, *Vitis vinifera* L. cv. cabernet sauvignon süspansiyon kültürlerinde MeJA uygulaması stilben miktarını arttırdığı, *Malus sieversii* F. niedzwetzkyana

kallus kültürlerine MeJA uygulaması antosiyanin miktarını azalttığı, *Salvia lerrifolia* Benth kallus kültürlerine MeJA uygulaması rosmarinik asit miktarını arttırdığı, *Lepechinia caulescens* kallus kültürlerine MeJA uygulaması ursolik asit ve oleanolik asit miktarlarını arttırdığı, *Dracocephalum moldavica* L. *in vivo* kültürlerine ABA uygulaması rosmarinik asit miktarını arttırdığı, *Stevia rebaudiana* kallus ve süspansiyon kültürlerine osmotik stres ajanı olarak proline ve PEG uygulaması steviyol miktarını arttırdığı, *Ononis arvensis* kallus kültürlerine AgNO₃ uygulaması flavanoid miktarını arttırdığı, *Eschscholtzia californica* CHAM hücre süspansiyon kültürlerine AgNO₃ uygulaması sanguarin miktarını arttırdığı, *Calendula officinalis* kallus kültürlerine AgNO₃ uygulaması esansiyel yağ miktarını arttırdığı, *Silybum marianum* (L.) Gaertn hücre süspansiyon kültürlerine AgNO₃ uygulaması bazı flavanolignan miktarlarını arttırdığı, *Datura metel* saçak kök kültürlerine AgNO₃ uygulaması bazı atropin miktarını arttırdığı, *Perovskia abrotanoides* Karel. adventitatif kök kültürlerine AgNO₃ uygulaması taşınım miktarını arttırdığı, *Echinacea purpurea* L. hücre süspansiyon kültürlerine AgNO₃ uygulaması alkamid ve kafeik asit miktarını arttırdığı, *Glycyrrhiza glabra* tohumlarının çimlenme besi ortamına AgNO₃ uygulaması kersetin miktarını arttırdığı, *Hypericum perforatum* gövde kültürlerine bakteriyel elisitör uygulaması hiperisin ve psödohiperisin miktarını arttırdığı, *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. kök kültürlerine fungal ekstrakt uygulaması glisirizik asit miktarını arttırdığı, *Echinacea purpurea* L. hücre süspansiyon kültürlerine fungal ekstrakt uygulaması alkamid ve kafeik asit miktarını arttırdığı, *Salvia miltiorrhiza* bunge saçak kök kültürlerine ABA uygulaması fenolik asit miktarını arttırdığı, *Artemisia annua in vivo* kültürlerine ABA uygulaması artemisin miktarını arttırdığı, *Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana* kallus kültürlerine ABA uygulaması antosiyanin miktarını azalttığı, *Catharanthus roseus* hücre süspansiyon kültürlerinde normal sıcaklığın üzerinde inkübasyon ajmalisin miktarını arttırdığı, *Panax ginseng* saçak kök kültürlerine gece ve gündüz uygulanan farklı sıcaklık uygulamalarında gece gündüz aynı sıcaklık uygulaması, gündüz yüksek gece düşük uygulamasına görece biraz daha fazla ginsenosit miktarını arttırdığı, *Silybum marianum* saçak kök kültürlerine gece gündüz uygulanan farklı sıcaklık uygulamalarında, düşük ve yüksek gece gündüz uygulamalarında metabolit miktarında azalttığı, *Cichorium intybus* L. saçak kök kültürlerine DMSO uygulaması kumarin miktarını arttırdığı, *Artemisia annua* gövde kültürlerine DMSO uygulaması artemisin ve dihidroartemisin miktarını arttırdığı, *Phoenix dactylifera* L. hücre süspansiyon kültürlerine DMSO uygulaması fenolik bileşiklerin miktarını arttırdığı, *Taxus baccata* hücre süspansiyon kültürlerine DMSO uygulaması takzol miktarını

arttırdığı, *Ammi majus* saçak kök kültürü ile *Ruta graveolens* sürgün kültürlerinin bir arada kültürlenmesi ksantonin miktarını arttırdığı, *Ocimum basilicum* saçak kök kültürleri ile fungus *Rhizophagus irregularis* kültürlerinin bir arada kültürlenmesi rosmarinik asit miktarını arttırdığı ve *Pinellia ternate* protokorm kültürleri ile *Enterobacter* sp. kültürlerinin bir arada kültürlenmesi alkaloid miktarını arttırdığı (Bais ve diğ., 2001; Ten Hoopen ve diğ., 2002; Sidwa-Gorycka ve diğ., 2003; Yu ve diğ., 2005; Tumova ve Polivkova, 2006; Bernard ve diğ., 2009; Liu ve diğ., 2010; Mannan ve diğ., 2010; Taha ve diğ., 2010; Kajani ve diğ., 2012; Manero ve diğ., 2012; Bilka ve diğ., 2013; Liang ve diğ., 2013; Pandiangan ve diğ., 2013; Sharma ve diğ., 2013; Wang ve diğ., 2013; Awad ve diğ., 2014; Mohammed Al-oubaidi ve Mohammed-Ameen, 2014; Vildova ve diğ., 2014; Arehzoo ve diğ., 2015, Pratibha ve diğ., 2015; Rahpeyma ve diğ., 2015; Shakeran ve diğ., 2015; Xu ve diğ., 2015; Jaisi ve Panichayupakaranant 2016; Rahimi ve diğ., 2016; Rahimi ve Hasanloo, 2016; Srivastava ve diğ., 2016; Açıkgoz ve diğ., 2017; Fadholi ve Hamzah 2017; Raghavendra ve diğ., 2017; Sun ve diğ., 2017; Hagh ve diğ., 2018; Nik Norulaini ve diğ., 2018; Martinez ve diğ., 2018; Khaleghnezhad ve diğ., 2019; Tahoori ve diğ., 2019) tespit edilmiştir.

Bunun yanısıra, bu tez çalışması konusu ile ilgili şikonin ve türevlerinin farklı Boraginaceae familyası türlerinde tespitine yönelik çalışmalar Tablo 2.2’de sunulmuş ve özetlenmiştir.

Tablo 2.2: Farklı Boraginaceae türlerinde şikonin ve türevlerinin tespit edilmesi.

Örnek	Kaynak	Sonuç	Referans
<i>Macrotomia usamensis</i>	Kök	Şikonin tespiti	Romanova ve Bankovskii, 1965
<i>Echium lycopsis</i> L.	Kök	Şikonin tespiti	Shcherbanovskii ve Luks, 1974
<i>Arnebia densiflora</i> (Nordm.) Ledeb (Türkiye)	Kök	4 alkanin türevinin tespiti	Bozan ve diğ., 1997
<i>Arnebia densiflora</i> (Türkiye)	Kök	β,β -Dimetilakrilşikoinin, Terakrilalkanin, İzovalerilalkanin, α -Metil-n-bütillalkanin	Bozan ve diğ., 1999
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Kök	Propionilşikoinin tespiti	Cho ve diğ., 1999
<i>A. hispidissima</i>	Kök	Arnebifuranon tespiti	Shukla ve diğ., 2001
<i>Onosma argentatum</i> Hub.-Mor. (Türkiye)	Kök	3’ü bilinen 1 yeni 4 şikonin türevi tespiti	Özgen ve diğ., 2004
<i>L. canescens</i> . (Michx.) Lehm. (Kanada)	Kök	Asetilşikoinin ve İzobutirilşikoinin tespiti	Pietrosuik ve Wiedenfeld, 2005
9 Farklı Boraginaceae (Çin)			
<i>A. euchroma</i> (Royle) Johnston., <i>A. guttata</i> Bunge, <i>L. erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc., <i>O. paniculatum</i> Bur. et Franch., <i>O. exsertum</i> Hemsl., <i>O. confertum</i> W.W. Smith, <i>O. hookerii</i>	Kök	8 şikonin türevinin tespiti	Hu ve diğ., 2006

Tablo 2.2 Devamı: Farklı Boraginaceae türlerinde şikonin ve türevlerinin tespit edilmesi.

<i>O. echioide</i>	Kök	0.24 mg/kg Şikonin	Sagratini ve diğ., 2008
<i>Bothriospermum secundum</i> Maxim	Kök	Bothriodumin tespiti	Liu ve diğ., 2009
<i>E. italicum</i> (Makedonya)	Kök	8 şikonin türevinin tespiti	Albreht ve diğ., 2009
<i>E. fruticosum</i> (Mısır)	Kök	Ekhioşilokinon	Sherif ve diğ., 2009
<i>A. decumbens</i> (Irak)	Kök	Şikonin tespiti	Al-Mussawi, 2010
<i>Alkanna spp.</i> (Yunanistan)	Kök	Maksimum 1.41 mg/100 mg Kök	Assimopoulou ve diğ., 2011
<i>L. erythrorhizon</i>	Kök	Tigloyilşikoinin	Ito ve diğ., 2011
<i>A. euchroma</i> (Royle) Johnst <i>L. erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc. <i>O. confertum</i> W. W. Smith (Çin Endemikleri)	Kök	<i>A. euchroma</i> (Royle) Johnst; S-Form Naftakinonlar Baskın <i>L. erythrorhizon</i> ve <i>O. confertum</i> 'da R-Form Naftakinonlar Baskın	Zhou ve diğ., 2011
<i>O. nigricaulis</i> (Türkiye)	Kök	(Deoksişikoinin, /β,β- Dimetilakrilşikoinin, Asetilşikoinin 214.6 mg/100 g Kök/ 220.6 mg/100 g Kök	Özgen ve diğ., 2011
<i>E. pycnanthum</i> Pomel	Kök	Angelişikoinin tespiti	Chaouche ve diğ., 2012
11 <i>Alkanna</i> Türü (Yunanistan)	Kök	Alkanin türevlerinin Tespiti	Tappeiner ve diğ., 2014
<i>E. vulgare</i> <i>E. russicum</i> (Polonya)	Kök	<i>E. vulgare</i> Şikonin (4.4 mg/kg) <i>E. russicum</i> Şikonin (4.8 mg/kg)	Dresler ve diğ., 2015
<i>L. erythrorhizon</i> <i>A. euchroma</i> <i>A. guttata</i> .	Kök	58 Farklı Şikonin ve şikonofuran tespiti	Liao ve diğ., 2015
<i>E. plantagineum</i> (Avustralya)	Kök	9 Naftakinon tespiti	Zhu ve diğ., 2016
<i>A. euchroma</i>	Kök	8 Hidroksil Naftaokinon tespiti	Zan ve diğ., 2017
<i>E. plantagineum</i> <i>E. vulgare</i> (Avustralya)	Kök	Düşük Moleküler Ağırlıklı 9 şikonin türevi tespiti	Skoneczny ve diğ., 2017
<i>E. russicum</i> (Rusya)	Kök	Yüksek oranda asetilşikoinin tespiti	Olenikov ve diğ., 2017
<i>O. visianii</i>	Kök	11 Naftakinon tespiti	Sut ve diğ., 2017
<i>A. densiflora</i> (Nordm.) Ledeb	Kök	İzovalerilalkanin, α-Metil-n- bütilalkanin, asetilalkanin β- asetoksizovalerilalkanin, alkani ve yeni bir türev 4-hidroksi 4-metil valeril alkanin	Yüzbaşıoğlu Baran ve diğ., 2018

Tablo 2.2. incelendiğinde; Naftakinon grubunda yer alan şikonin ve türevlerinin genellikle doğal yaşam ortamlarındaki bazı Boraginaceae türlerinin köklerinden elde edilmekte olup, kök dışındaki diğer organlarında, köklerden elde edildiği kadar tespit edilememiştir. Bununla birlikte, sadece ilgili bitkilerden elde edilen türevler de gözlenmiştir [propiyonilşikoinin (Cho

ve diğ., 1999), arnebifuranon (Shukla ve diğ., 2001), bothriodumin (Liu ve diğ., 2009), ekhioşilokinon (Fathy ve diğ., 2009), tigloyilşikinin (Ito ve diğ., 2011), ngelişikinin (Chaouche ve diğ., 2012)]. Genel olarak değerlendirildiğinde, asetilşikinin-izovalerilşikinin gibi türevler daha baskın bir şekilde tespit edilmiştir. Skoneczny ve diğ., 2017 yılında yaptığı çalışmada, olgun dönemde daha yüksek miktarda şikonin türevleri elde edildiği ifade edilmiştir.

Bitki biyoteknolojisi metot ve uygulamalarına ek olarak elisitör, prekürsör veya fiziksel uygulamalarla şikonin ve türevlerinin üretimi ve artırımına yönelik çalışmalar ise Tablo 2.3’de sunulmuş ve özetlenmiştir.

Tablo 2.3: Çeşitli prekürsör, biyotik ve abiyotik elisitörlerin şikonin ve şikonin türevlerinin üretimine etkisi.

Tür	Kültür Tipi	Elisitör/Prekürsör /Yöntem	Sonuç	Kaynakça
<i>Arnebia euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	MeJA, 12-oxo-Fitodienoik Asit	Artırmıştır	Bychkova ve diğ., 1993
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	<i>A. niger</i> (160µg/ml)	Artırmıştır	Chang-Jun ve Song-Sheng., 1998
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	<i>n-Hekzadekan</i> <i>Oktan</i> <i>Sikloheksan</i> <i>Oleik Alkol</i> <i>Oleik Asit</i> <i>Bütülasetat</i> <i>Kastor Yağı</i> <i>Bütülasetat:Oleik Asit</i> <i>Sikloheksan:Kastor Yağı</i> <i>N-Hekzadekan</i>	Artmıştır Artmıştır Azalmıştır Artmıştır Azalmıştır Azalmıştır Artmıştır Artmıştır Artmıştır Artmıştır	Fu ve Lu, 1998
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	Fungal Elisitör <i>Aspergillus niger:Rhizopus oryzae</i>	Normal Kültür Koşullarına Göre Tek Fungal Elisitör Kullanımında 2 kat 2 li Kullanımında 5 Kata Kadar Şikonin Miktarında Artış	Fu ve Lu, 1998
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	Nadir Toprak Elementleri Karışımı	Tek Kullanımlarına Karşın Şikonin Türevlerinde 2 Kata Kadar Artış	Ge ve diğ., 2006
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	pH (Bazik)	Artırmıştır	Malik ve diğ., 2008
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	Işık Sıcaklık (25 °C) pH (Bazik) Sukroz (%6)	Azalmıştır Artmıştır Artmıştır Artmıştır	Malik ve diğ., 2011
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	L-Fenil Alanin	Hücre Çoğalmasını Tetiklemekte ancak Şikonin Türevlerinin Artışında Etki Göstermemektedir.	Syklowska-Baranek ve diğ., 2012
<i>A. euchroma</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>A. niger: A. oryzae</i> Kombine Kullanımı	Total Naftakinon Üretimi Artmıştır	Zhang ve diğ., 2013
<i>A. euchroma</i>	Kallus Kültürü	MeJA	Şikonin Türevlerinde Artış	Hao ve diğ., 2014

Tablo 2.3: Çeşitli prekürsör, biyotik ve abiyotik elisitörlerin şikonin ve şikonin türevlerinin üretimine etkisi.

<i>Arnebia sp.</i>	Süspansiyon Kültürü	Karanlık Ortam Besi Ortamı Bileşeni Artırılması (Na ₂ SO ₄) Air Lift Biyoreaktör	Artırmıştır Artırmıştır Artırmıştır	Gupta ve diğ., 2014
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	Salisilik Asit	Şikonin Üretimini Azaltmıştır.	Kumar ve diğ., 2014
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	Perflorodekalin	Alkanin/Şikonin Artışı	Syklowska-Baranek ve diğ., 2014
<i>A. euchroma</i>	Süspansiyon Kültürü	MeJA	MeJA Kültüre İlave Edilişinden 1 Saat Sonra Total Şikonin Miktarı Artmaktadır.	Wang ve diğ., 2014
<i>A. euchroma</i>	Kallus Kültürü	<i>R. solani</i> , Cu ⁺² , MeJA, SA	Sikalkin üretiminde <i>R. solani</i> kontrole göre 7 kat artış sağlamakta, Cu ⁺² , MeJA, SA ise yine kontrole göre artış sağlamaktadır.	Arghavani ve diğ., 2015
<i>A. euchroma</i>	Kallus Kültürü	Amonyum İyonu	Artan Amonyum Konsantrasyonu Pigmenti Azaltmıştır	Hao ve diğ., 2015
<i>A. euchroma</i>	Saçak Kök Kültürü	CYP76B74 Aşırı Ekspresyonu İçin RNAi	Şikonin ve Türevlerinin Üretimi Azalmıştır	Wang ve diğ., 2018
<i>A.hispidissima</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>A.rhizogenesis</i> Transformasyon	Artmıştır	Chaudhury ve Pal, 2010
<i>A.hispidissima</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Propionillalkanin Miktarı Artmıştır	Singh ve Sharma, 2016
<i>Echium italicum</i>	Süspansiyon Kültürü	Sıvı Parafin	Pigment Üretiminin Artması	Zare ve diğ., 2010
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Indol Asetik Asit	Şikonin Türevlerinin Artması	Tabata ve diğ., 1974
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Glikoz Yüksek Nitrojen Streptomisin Sülfat Askorbik Asit Ca ⁺² ve Fe ⁺²	Artırmıştır Azaltmıştır Artırmıştır Artırmıştır Azaltmıştır	Mizukami ve diğ., 1977
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Amonyum Bağlı Nitrat	Azaltmıştır	Fujita ve diğ. 1981a
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Nitrat Konsantrasyonu	6.7-10 mM Nitrat Konsantrasyonunda Yüksek Miktarda Üretim	Fujita ve diğ., 1981b
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Agaropektin	Artırmıştır	Fukui ve diğ., 1983
<i>L. erythrorhizon</i>	Kallus Kültürü	Gibberellin A3	Azaltmıştır	Yoshikawa ve diğ., 1986
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Organik Solvent Yağ Asidi Esterleri n-Parafin n-hekzadekan(Az Miktar)	Azaltmıştır Azaltmıştır Azaltmıştır Artırmıştır	Deno ve diğ., 1987
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Besi Ortamına Glutamin İlavesi	Şikonin Üretimini Azalmakta	Yazaki ve diğ., 1987
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Endojen Polisakkarit	Şikonin Türevlerinin Artması	Fukui ve diğ., 1990
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Fungal Elisitör <i>Penicillium</i>	Kontrol Grubuna Göre 24 Kat Şikonin Miktarının Artması	Kim and Chang, 1990
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	Sıvı Parafin	Şikonin Miktarının 3 Kat Artması	Shimomura ve diğ., 1991

Tablo 2.3 Devamı: Çeşitli prekürsör, biyotik ve abiyotik elisitörlerin şikonin ve şikonin türevlerinin üretimine etkisi.

<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Mevinolin	Artırmıştır	Tani ve diğ., 1992
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	İki Fazlı Baloncuklu Biyoreaktör	Artırmıştır	Sim ve Chang, 1993
<i>L. erythrorhizon</i>	<i>A. tumefaciens</i> ile transforme edilmiş Süspansiyon Kültürü	Yüksek Kons. Sukroz ve Nitrat	Şikonin Türevlerinde Artış	Srinivasan ve Ryu, 1993
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Oligogalakturninaz	Azaltmıştır	Tani ve diğ., 1993
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	%0.2 surfactant Tween 20	Artırmıştır	Lihong ve diğ., 1994
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	MeJA 2-Aminoindan-2-phosphonic acid	Artırmıştır Azaltmıştır	Gaisser ve Heide, 1996
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	MeJA, JA, Oligogalaktronit, Cu ⁺²	MeJA, JA, Oligogalaktronit tek kullanıldıklarında artırmıştır, Ancak Cu ⁺² MJ ⁺ ile birlikte kullanıldığında artırmıştır.	Yazaki ve diğ., 1997
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	Fungal Elisitör <i>R. solani</i> , <i>P. aphanidermatum</i> ve <i>N. hematoococca</i>	<i>R. solani</i> şikonin türevlerinde 30 kat artış	Brigham ve diğ., 1999
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>Ubi C</i> geninin transformasyonu	Şikonin Miktarında Belirgin Artış Sağlanamama	Sommer ve diğ., 1999
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>Ubi A</i> geninin transformasyonu	Kontrolle Göre %22 Oranında Şikonin Miktarında Artış	Boehm ve diğ., 2000
<i>L. erythrorhizon</i>	Kallus Kültürü	Paraflofenilalanin	Şikonin Türevlerinde Artış	Bulgakov ve diğ., 2001
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	Antisens DNA (LeDIs)	Şikonin Miktarında Azalma	Yazaki ve diğ., 2001
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>Ubi C</i> geninin transformasyonu	Şikonin Miktarında Artış	Köhle ve diğ., 2002
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Düşük Enerjili Ultra Ses	Artmıştır	Lin ve Wu, 2002
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Mavi Işık	Azaltmıştır	Yamamoto ve diğ., 2002
<i>L. erythrorhizon</i>	Süspansiyon Kültürü	Gama Işığı	16 Saat'lik Gama Işığı Etkisiyle %400'lük Şikonin Miktarında Artış	Chung ve diğ., 2006
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>LeMYB1</i> Aşırı Ekspresyonu İçin Transformasyon	Şikonin Üretimi Artmıştır	Zhao ve diğ., 2015
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>LeACS-1</i> Aşırı Ekspresyonu İçin RNAi	Şikonin Üretimi Artmıştır	Fang ve diğ., 2016a
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>LeEIL-1</i> Aşırı Ekspresyonu İçin RNAi	Şikonin ve Türevlerinin Üretiminde Artmıştır	Fang ve diğ., 2016b
<i>L. erythrorhizon</i>	Saçak Kök Kültürü	<i>LeMDR</i> Aşırı Ekspresyonu İçin RNAi	Şikonin Üretimi Artmıştır	Zhu ve diğ., 2017
<i>Onosma echinoides</i>	Süspansiyon Kültürü	Mavi-Beyaz Işık	Azalmıştır	Lattoo, 2005
<i>O. paniculatum</i>	Süspansiyon Kültürü	Fungal Elisitör <i>Aspergillus</i> sp.	Şikonin Türevlerinde Artış	Ning ve diğ., 1994

Tablo 2.3 Devamı: Çeşitli prekürsör, biyotik ve abiyotik elisitörlerin şikonin ve şikonin türevlerinin üretimine etkisi.

<i>O. paniculatum</i>	Süspansiyon Kültürü	<i>A.oryzae</i> Ca ⁺² EGTA A2318 Verapamil TFP ABA	Artırmıştır Azaltmıştır Artırmıştır Artırmıştır Artırmıştır Artırmıştır Azaltmıştır	Ning ve diğ., 1998
<i>O. paniculatum</i>	Süspansiyon Kültürü	Brassinolide (Başlangıç ve 4. Günden sonra)	Şikonin Türevlerinde Artış	Yang ve diğ., 1999
<i>O. paniculatum</i>	Süspansiyon Kültürü	MeJA (IAA ve BAP'lı Besi Ortamı)	4. Günden İtibaren eklendiğinde en yüksek konsantrasyonda Şikonin Eldesi	Ding ve diğ., 2004
<i>O. paniculatum</i>	Süspansiyon Kültürü	Karanlık ve Farklı Işık (Beyaz-Kırmızı ve Mavi) Kaynaklarında Kültür	Mavi ve Beyaz Işık Tamamiyle Şikonin Üretimini Baskımlarken, Kırmızı Kısmen etkilemekte. Ancak Karanlık Ortam Şikonin Üretimi Üzerine Etkilidir.	Liu ve diğ., 2006
<i>O. paniculatum</i>	Süspansiyon Kültürü	Sodyum Nitropurusit Rhizoctonia cerealis N ω -nitro- L -arginine Sodyum Azide	Artırmıştır Artırmıştır Azaltmıştır Azaltmıştır	Wu ve diğ., 2009

Tablo 2.3. irdelendiğinde bitki biyoteknoloji yöntemleri uygulamalarıyla ile birlikte çeşitli elisitasyon uygulaması ve prekürsör ilavesiyle şikonin ve türevlerinin üretimine yönelik olarak daha çok Boraginaceae familyası üyesi *Lithospermum*, *Arnebia* ve *Onosma* cinslerine ait türlerde çalışmalara rastlanmıştır.

L. erythrorhizon türü ile ilgili çalışmalarda kallus, hücre süspansiyon ve kallus kültürlerine farklı prekürsör, elisitörlerin eklemesi ve genetik transformasyon çalışmaları [Glikoz, Streptomisin Sülfat, Askorbik Asit, Agaropektin, n-hekzadekan, endojen polisakkarit, Penicillum, Sıvı Parafin, Mevinolin, Sukroz, Tween 20, MeJA, JA, *R. solani*, Paraflorofenilalanin, Düşük Enerjili Ultra Ses, Gama Işığı ile bazı genetik transformasyonlar (*Ubi C* geni, *Ubi A* geni, *LeMYB1* Aşırı Ekspresyonu, *LeACS-1* Aşırı Ekspresyonu, *LeEIL-1* Aşırı Ekspresyonu, *LeMDR* Aşırı Ekspresyonu)] ile şikonin ve türevlerinde artış sağlandığı rapor edilmiştir.

Arnebia cinsine ait türler ile ilgili çalışmalarda kallus, hücre süspansiyon ve kallus kültürlerine farklı prekürsör, elisitörlerin eklemesi yoluyla [MeJA, 12-oxo-Fitodienoik Asit, *A. niger*, n-Hekzadekan, Oktan, Oleik Alkol, Kastor Yağı, Sikloheksan:Kastor Yağı, *Aspergillus*

niger:Rhizopus oryzae, Nadir Toprak Elementleri Karışımı, Bazik Ph, L-Fenil Alanin, *A. niger: A. oryzae*, Karanlık Ortam, Perflorodekalin, *R. solani*, *Azotobacter chroococcum* ile bazı genetik transformasyonlar (CYP76B74 Aşırı Ekspresyonu)] şikonin ve türevlerinde artış sağlandığı rapor edilmiştir.

Onosma cinsi türleri ile ilgili çalışmalarda hücre süspansiyon kültürlerine farklı prekürsör, elisitörlerin eklenmesi (*Aspergillus* sp., *A.oryzae*, EGTA, A2318, Verapamil, TFP, Brassinolide, MeJA, Karanlık Ortam, Sodyum Nitropurusit, *Rhizoctonia cerealis*) ile şikonin ve türevlerinde artış sağlandığı bildirilmiştir.

Echium türleri ile ilgili olarak sadece hücre süspansiyon kültürlerinde sıvı parafin kullanılmış ve şikonin miktarında artış sağlandığı rapor edilmiştir.

Şikonin miktarının üretimi ve üretimin artırılması ile ilgili çalışmalarda birçok kimyasal uyarıcı maddenin şikonin/türevlerinin üretimini artırdığı kanıtlanmıştır. Ancak, bazı kimyasal uyarıcıların ise; açık renkli ışıklar, Ca, Fe, Cu gibi elementler, salisilik asit, aşırı amonyum konsantrasyonu, düşük ve yüksek sıcaklıkların şikonin ve türevlerinin üretimini azalttığı rapor edilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen diğer çalışma ise yağ asitlerinin Bitki Biyoteknolojisinin bazı yöntem ve uygulamalarıyla üretilmesi ve miktarının artırılmasıdır. Daha önceki başlıklarda belirtildiği üzere sekonder metabolitlerin elde edilmesinde bitkiler kaynak olarak tercih edilirken, bazı esansiyel yağ asitleri içerikleri bakımından da bitkilerin kullanılabilirliği önemlidir. Esansiyel yağ asitleri, bazı sağlık problemlerinin; kardiyovasküler hastalıklar, romatoid artrit, astım, sistik fibrozis, sedef hastalığı ve bazı sindirim sistemi hastalıklarının iyileştirilmesinde kullanıldığı gibi, kanser ve mental hastalıkların iyileştirilmesinde ve önlenmesinde de kullanılmaktadır. Bununla birlikte, insanlar bazı omega 3 ve 6 yağ asitlerini sentezleyememekte (LA ve ALA gibi esansiyel yağ asitleri), bu durumda da uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin (DHA-EPA-AA) üretimi yapılamamaktadır (Rubio-Rodríguez ve diğ., 2010). Başta denizel bazı organizmalar (balık ve bazı kabuklu deniz canlıları) ve bitkiler olmakla birlikte, farklı kaynaklardan da yağ asitlerini temin etmek mümkündür; bunlar arasında bakteriler, algler, protistler, yosunlar, mantarlar sayılabilir (Dyal ve Narine, 2005; Rubio-Rodríguez ve diğ., 2010; Francisco ve diğ., 2017).

Boraginaceae familyasına ait bazı türler, ifade edilen çoklu doymamış yağ asitlerini doğal olarak barındırmaktadır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: Bazı *Boraginaceae* familyasına ait türlerde yer alan önemli çoklu doymamış yağ asidi oranları.

Örnek	Kaynak	Sonuç	Referans
19 <i>Echium</i> türü (Makaronezya)	Tohum	GLA içeriği en fazla % 5.02 (<i>Echium. nervosum</i>) SDA içeriği içeriği en fazla% 12.94 (E. plantagineum)	Guil-Guerrero ve diğ., 2000a
25 <i>Echium</i> türü (Makaronezya)	Yaprak	ALA içeriği en fazla % 54.4 (E. simplex)	Guil-Guerrero ve diğ., 2000b
14 endemik <i>Echium</i> (Makaronezya)	Tohum	SDA içeriği içeriği en fazla %8.81 (E. pininana) Endemik türlerinde yüksek oranda GLA	Guil-Guerrero ve diğ., 2001a
11 Tür <i>Boraginaceae</i> (Polonya)	Tohum	Doymamış yağ asidi içeriği en fazla <i>L. officinale</i>	Cisowski ve diğ., 2001
11 Tür <i>Boraginaceae</i> (Türkiye)	Tohum	GLA içeriği en fazla %13.7 (<i>Anchusa leptophylla</i> ssp. leptophylla)	Erdemoğlu ve diğ., 2004
20 Tür <i>Boraginaceae</i> (Fas)	Tohum	GLA içeriği en fazla % 20.2 (<i>Lithodora maroccana</i> I.M. Johnst.) SDA içeriği içeriği en fazla % 16.02 (<i>E. humile</i> ssp. pycnanthum(Pomel) Greuter & Burdet)	Guil-Guerrero ve diğ., 2006
<i>E. vulgare</i> L. (Polonya)	Çiçeklenme sonrası tohum (20 güne kadar)	Genel olarak çiçeklenme zamanı boyunca LA miktarında artış	Stolyhwo ve Mol, 2007
24 Tür <i>Boraginaceae</i> (Türkiye)	Tohum	LA içeriği en fazla % 42.7 (<i>Heliotropium dolosum</i>) GLA içeriği içeriği en fazla% 24.03 (<i>Symphytum tuberosum</i>) ALA içeriği en fazla % 43.00 (<i>Echium italicum</i>) SDA içeriği içeriği en fazla% 14.59 (<i>Echium italicum</i>)	Özcan, 2008
5 Farklı <i>Boraniceae</i> (İspanya)	Tohum (SCE Sistemle)	LA içeriği en fazla % 63.6 (<i>Scrophularia sciophila</i>) GLA içeriği içeriği en fazla% 20.5 (E. fastuosum) ALA içeriği en fazla % 24.6 (E. fastuosum) SDA içeriği içeriği en fazla% 11.5 (E. fastuosum)	Guil-Guerrero ve diğ., 2008
<i>E. italicum</i> ve <i>E. amoenum</i> (İran ve Azerbaycan farklı lokasyon)	Tohum Yaprak Gövde	LA içeriği en fazla % 16.23 (E. italicum Kaleybar-Tohum) GLA içeriği içeriği en fazla% 9.79 (E. italicum Kaleybar-Tohum) ALA içeriği en fazla % 44.15 (E. amoenum Hezar Jari-Tohum) SDA içeriği içeriği en fazla% 12.45 (E. italicum Kaleybar-Tohum)	Abbaszadeh ve diğ., 2011

Tablo 2.4 Devamı: Bazı Boraginaceae familyasına ait türlerde yer alan önemli çoklu doymamış yağ asidi oranları.

Farklı Bölgelerdeki <i>Echium</i> cinsleri ile İran <i>Echium</i>'ların karşılaştırılması	Tohum	Makaronezya <i>Echium</i> türleri GLA ve SDA miktarı Avrupa ve İran'a göre fazla içermekte	Shokri ve diğ., 2012
3 Tür Boraginaceae (Rusya)	Tohum	LA içeriği en fazla % 28.1 (<i>Cynoglossum officinale</i>) GLA içeriği içeriği en fazla% 8.3. (<i>C. officinale</i>) ALA içeriği en fazla % 37.8 (<i>E. vulgare</i>) SDA içeriği içeriği en fazla% 16.8 (<i>Lappula squarrosa</i>)	Yunusova ve diğ., 2012
20 Tür Boraginaceae (Fas ve Tunus)	Tohum	LA içeriği en fazla % 54.9 (<i>Heliotropum bacciferum</i> Forssk.) Tunus GLA içeriği içeriği en fazla% 19.5 (<i>Borago officinalis</i> L.) Fas ALA içeriği en fazla % 47.6 (<i>E. parviflorum</i> Moench) Tunus SDA içeriği içeriği en fazla% 15.5 (<i>E. plantagineum</i> L.) Fas	Guil-Guerrero ve diğ., 2013a
<i>E. italicum</i> L. (Türkiye Populasyon)	Tohum	LA içeriği en fazla % 18.85 (<i>E. italicum</i> L.) B3 GLA içeriği içeriği en fazla% 7.66 (<i>E. italicum</i> L.) A2(E) ALA içeriği en fazla % 43.45 (<i>E. italicum</i> L.) B3 SDA içeriği içeriği en fazla% 15.48 (<i>E. italicum</i> L.) A2(E)	Özcan, 2013
25 Boraginaceae Tür (Genellikle İspanya)	Tohum	LA içeriği en fazla % 42.3 (<i>A. puechii</i>) GLA içeriği içeriği en fazla% 22.9 (<i>S. caucasicum</i>) ALA içeriği en fazla % 40.3 (<i>O. rigada</i>) SDA içeriği içeriği en fazla% 13.6 (<i>L. patula</i>)	Guil-Guerrero ve diğ., 2014
2 farklı bölgede yetişen <i>Borago officinalis</i>	Tohum	LA içeriği en fazla % 20.3 (Shahriyar Bölgesi) GLA içeriği içeriği en fazla% 20.3 (Shahriyar Bölgesi) ALA içeriği en fazla % 9.5 (Shahriyar Bölgesi)	Morteza ve diğ., 2015
<i>Paracaryum</i> (Boraginaceae) Türkiye	Meyve	LA içeriği en fazla % 20.99 (<i>Paracaryum calycinum</i>) GLA içeriği içeriği en fazla% 5.99 (<i>P. hirsutum</i>) ALA içeriği en fazla % 14.20 (<i>P. paphlagonicum</i>)	Doğru-Koca ve diğ., 2016
Sardinya Boraginaceae Türleri	Tohum	LA % 34.1, GLA % 24.6, ALA % 43.1, SDA % 15.0	Guil-Guerrero ve diğ., 2017

Tablo 2.4 Devamı: Bazı Boraginaceae familyasına ait türlerde yer alan önemli çoklu doymamış yağ asidi oranları.

<i>E. vulgare</i> Farklı metal içeriğine sahip bölgelerde	Tohum	LA içeriği en fazla % 21.65 (Normal)	Dresler ve diğ., 2017
		GLA içeriği içeriği en fazla% 10.94 (Kontamine)	
		ALA içeriği en fazla % 36.25 (Kontamine)	
Farklı Coğrafik Bölgeler	Tohum	SDA içeriği içeriği en fazla% 11.10 (Kontamine)	Guil-Guerrero ve diğ. 2018
		LA içeriği en fazla % 37.6 (<i>B. trabuti</i>)	
		GLA içeriği içeriği en fazla% 23.1 (<i>B. morisiana</i>)	
		ALA içeriği en fazla % 1.3 (<i>B. pygmaea</i>)	
		SDA içeriği içeriği en fazla% 1.9 (<i>B. morisiana</i>)	

Tablo 2.4. irdelendiğinde, rapor edilen çalışmalarda doğal olarak yetişen Boraginaceae familyası üyesi *Echium*, *Lithospermum*, *Anchusa*, *Borago*, *Onosma*, *Paracaryum*, *Cynoglossum*, *Heliotropum*, *Lappula* ve *Lithodora* cinslerine ait türler arasında en yüksek ALA ve SDA değerleri *Echium* türlerinde tespit edilmiştir [*E. italicum* ALA: %43.1, *E. plantagineum* SDA: %15.0 (Dresler ve diğ., 2017)], [*E. italicum* ALA: % 43.45, SDA: %15.48]. Bununla birlikte, bitkinin farklı kısımları değerlendirildiğinde, çoklu doymamış yağ asitlerinin en fazla bulunduğu organ genelde tohum olurken, bazı çalışmalarda [Meyve: LA : % 20.99 (*Paracayum calycinum*), GLA: % 5.99 (*P. hirsutum*), ALA: % 14.20 (*P. paphlagonicum*), Doğru-Koca ve diğ., 2016], [Yaprak: ALA % 54.4 (*E. simplex*). Guil-Guerrero ve diğ., 2000b] bitkinin farklı kısımlarında da yüksek düzeylerde yağ asitleri tespit edilmiştir.

Bitkisel kaynaklardan uzun zincirli doymamış esansiyel yağ asitlerini elde etmek mümkün iken (Rubio-Rodríguez ve diğ., 2010; Francisco ve diğ., 2017), bazı biyoteknolojik yöntem ve uygulamalarla üretim miktarını arttırmak da mümkün olabilmektedir (Rubio-Rodríguez ve diğ., 2010).

Yağ asidi üretimi ve üretim miktarının artırılmasına yönelik rapor edilen çalışmalarda; *Spirulina platensis* kültürlerinde düşük sıcaklıklarda γ -linolenik asit miktarını arttırdığı, *Escherichia coli* fabF rekombinant suşlarda bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı, *Mucor circinelloides* kültürlerinde farklı aminoasitlerin kültürlere uygulanması sonrası, özellikle tirozin uygulamasının bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı *Nannochloropsis* sp. kültürlerine UV-C uygulaması sonrası EPA miktarını arttırdığı, *Chlorella*

vulgaris (mikroalg) kültüre uygulanan JA'nın bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı, *Pichia pastoris* (fungus) kültürlerine TiO₂ uygulaması bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı, mikroalglerde DHA üretiminde oksijen kapasitesinin olumlu etki gösterdiği, *Cryptocodinium cohnii* kültürlerine n-dodekan, *Schizochytrium* sp. kültürlerine askorbik asit ilavesi DHA üretimini olumlu yönde etkilediği, *Chlamydomonas* sp. KNF0008 suşunda, düşük sıcaklık ortamda kültürlendiğinde bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı (Da ve diğ., 2006; Ronda ve diğ., 2008; Lee ve diğ., 2013; Tang ve diğ., 2014; Jusoh ve diğ., 2015; Sharma ve Schenk 2015; Yu ve diğ., 2015; Ren ve diğ., 2017; Kim ve diğ., 2018; Sun ve diğ., 2018) tespit edilmiştir.

Yüksek organizasyonlu bitkilerde, Bitki Biyoteknolojisi yöntem ve uygulamaları kullanılarak, çoklu doymamış yağ asitlerinin üretimiyle ilgili çalışmalar irdelendiğinde; Soya süspansiyon kültürlerine sitokin ve giberellik asit kombinasyonu uygulamasında LA miktarını arttırdığı, Maydanoz'un farklı *in vitro* kültürlerinde ileri zaman dilimlerinde alınan örneklerde bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı, *Brassica napus*'dan elde edilen BnDGAT2 geninin *Chlamydomonas reinhardtii*'ye aktarılmasıyla çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı, *Cereus peruvianus* kallus kültürlerinde, uzun süreli kallus kültürlerinde LA miktarının arttığı, siyah frenk üzümü (sfü) *in vivo* kültürlerine farklı oranlarda MeJA içeren solüsyon uygulamasında sfü tohumlarında GLA miktarını arttırdığı, *Jatropha curcas*, kallus kültürlerinde salisilik asit uygulaması sonrası yağ asidi miktarını arttırdığı, *Theobroma cacao* L. süspansiyon kültürlerine biotin uygulaması sonrası bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı, *Arachis hypogaea* L. transgenik hatlarında, kontrole göre bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı (Stearns ve Morton, 1975; Lopez ve diğ., 1999; Mahalakshmi ve diğ., 2013; Ahmad ve diğ., 2014; Da Silva Assis Machado ve diğ., 2016; Flores ve Castillo, 2016; Parra ve diğ., 2017; Wang ve diğ., 2018) tespit edilmiştir.

Bununla birlikte, tez çalışması konusunu oluşturan *Echium* cinsine ait türlerle gerçekleştirilen çalışmalarda literatürde daha çok Tablo 2.3'de ifade edildiği üzere yağ asidi profillerinin belirlenmesine ilişkin çalışmalara rastlanırken Bitki Biyoteknolojisi yöntem ve uygulamaları kullanılarak çoklu doymamış yağ asidi üretimi ve miktarının artırılması çalışmalarına sınırlı sayıda rastlanmıştır.

Rapor edilen çalışmalar irdelendiğinde; *Echium acanthocarpum* saçak köklerinde, farklı zaman dilimlerinde alınan örneklerde bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı, *E.*

acanthocarpum $\Delta 6$ Desaturaz geninin transfer edildiği saçak kök kültürlerinde bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarını arttırdığı (Sanchez ve diğ., 2011; Zarate ve diğ., 2016) tespit edilmiştir.

Tez alışması kapsamında, *E. italicum* L.'de bitki biyoteknoloji yöntem ve uygulamalarına ek olarak bazı kimyasal ve fiziksel uyarıcılar kullanılarak şikonin ve türevleri ile çoklu doymamış yağ asiti üretiminin arttırılması hedeflenmiştir. Literatür incelendiğinde prekürsör, elisitör veya fiziksel uygulamalar kullanılarak, farklı Boraginaceae familyası üyelerinde şikonin ve türevlerinin miktarının arttırılması ile yine çoklu doymamış yağ asidi üretiminin arttırımına yönelik çalışmalar literatürde mevcut olmakla birlikte, *in vitro* ortamda *E. italicum* L. bitkisinde söz konusu metabolitlerin üretimlerinin arttırılmasına yönelik çalışmalar literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle, tez çalışması hem bitkisel materyal hem de uygulanan yöntemler ve uygulamalar dolayısıyla zgndr.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME

3.1.1. Bitkisel Materyal

3.1.1.1. *Şikonin ve Yağ Asitleri Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması Kapsamındaki Örnekler*

Ülkemizde yayılış gösteren *Echium* L. cinsine ait türlerin şikonin ve yağ asidi miktarının belirlenmesine yönelik çalışmalar dönemsel olarak gerçekleştirilmiştir. İlk dönemde, Türkiye Florası (Davis, 1965) ve TÜBİVES internet portalından yararlanarak, cinse ait türlerin yayılış gösterdiği alanlar belirlenmiştir. Toplanan örneklerin bilimsel teşhisleri Türkiye Florası ve teşhisli herbaryum materyallerinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Cinse ait türlerin toplanması aşamasında, arazi çalışmaları için Ağustos-Eylül-Ekim dönemleri tercih edilirken, bitkinin olgun, toprak altı ve toprak üstü organlarının tam olarak toplanmasına, günün ilk saatlerindeki toplama sırasında popülasyon özelliğine özen gösterilmiştir.

Şikonin ve türevlerinin analizleri için toplanan örneklere ait detaylı bilgiler Tablo 3.1’de sunulmuştur.

Yağ asitleri analizleri için ise örnekler, farklı coğrafik bölge ve belirli yükseklikler belirlenerek toplanmış olup detaylı bilgiler Tablo 3.2’de sunulmuştur.

Ayrıca, şikonin ve türevleri miktarlarının belirleme çalışmalarına örneklerin kuru kök miktarları, yağ asitleri çeşit ve miktarının belirlenmesi çalışmalarında ise örneklerden elde edilen tohum miktarına göre analizler yapılmıştır.

Tablo 3.1: Şikonin miktarı belirlenmesinde kullanılan *Echium* türlerine ait lokalite bilgisi.

Örnek No	Tür İsmi	GPS Kodu	Yükseklik (Metre)	Konum	Tohum Durumu
Ö1	<i>E. italicum</i>	41°32'29" K 26°49'56" D	79	İstanbul-Edirne Yolu Havsa Mevki	Var
Ö2	<i>E. italicum</i>	41°40'45" K 27°02'48" D	132	Edirne-Kırklareli Yolu İnece Mevki	Var
Ö3	<i>E. italicum</i>	41°24'59" K 27°13'14" D	52	Lüleburgaz Sarıcaali Köyü Taşköprü Mevki	Var
Ö4	<i>E. italicum</i>	41°05'23" K 27°44'45" D	63	Çorlu Yenice Mevki (Tekirdağ)	Yok
Ö5	<i>E. italicum</i>	41°05'23" K 27°44'45" D	63	Çorlu Yenice Mevki (Tekirdağ) (İptal)	Yok
Ö6	<i>E. italicum</i>	40°38'50" K 26°50'33" D	12	Gelibolu-Çanakkale	Var
Ö7	<i>E. plantagenium</i>	40°09'19" K 26°27'26" D	73	Çanakkale Otobüs Terminali	Var
Ö8	<i>E. italicum</i>	38°30'27" K 28°14'21" D	111	Manisa Salihli T Tipi Ceza İnfaz Kurumu	Var
Ö9	<i>E. vulgare</i>	40°36'45" K 35°05'40" D	1080	Çorum-Merzifon Yolu 10. Km	Var
Ö10	<i>E. vulgare</i>	40°43'53" K 39°38'10" D	791	Maçka Sümela Manastırı Yolu (Trabzon)	Yok
Ö11	<i>E. vulgare</i>	41°22'49" K 41°35'40" D	202	Borçka-Hopa Yolu 10. Km (Artvin)	Var
Ö12	<i>E. vulgare</i>	40°43'8" K 39°31'15" D	850	Trabzon Hamsikök 10. Km	Var
Ö13	<i>E. vulgare</i>	41°6'18" K 39°24'47" D	15	Trabzon-Giresun Yolu Çarşıbaşı Mevki	Var
Ö14	<i>E. vulgare</i>	41°9'39" K 37°5'6" D	7	Ordu-Terme Yolu Sakarlı Mevki	Var
Ö15	<i>E. vulgare</i>	41°13'15" K 36°50'57" D	14	Terme-Samsun Yolu Dal Bahçe Mevki	Yok
Ö16	<i>E. vulgare</i>	41°39'4" K 34°54'6" D	1082	Sinop- Boyabat Yolu Ahmet Muhip Dranas Tüneli Mevki	Var
Ö17	<i>E. vulgare</i>	41°34'51" K 34°16'30" D	562	Kastamonu Taşköprü Hanönü Mevki	Var
Ö18	<i>E. vulgare</i>	41°16'1" K 33°22'11" D	792	Kastamonu-Karabük Yolu Gemi Mevki	Var
Ö19	<i>E. vulgare</i>	41°16'1" K 33°22'11" D	792	Kastamonu-Karabük Yolu Gemi Mevki	Var
Ö20	<i>E. vulgare</i>	41°9'31" K 32°27'46" D	213	Karabük-Zonguldak Yolu Şahinkaya Tüneli Yenice Mevki	Yok
Ö21	<i>E. vulgare</i>	40°58'52" K 32°04'01" D	694	Devrek-Mengen Yolu Kıyaslar Mevki (Bolu)	Var
Ö22	<i>E. plantagineum</i>	41°00'42" K 28°56'59" D	17	Ispartakule Mevki-İstanbul	Var
Ö23	<i>E. italicum</i>	41°24'00" K 27°21'00" D	60	Lüleburgaz-Kırklareli	Var
Ö24	<i>E. italicum</i>	38°52'59" K 40°52'34" D	1200	Bingöl Üniversitesi-Bingöl	Var
Ö25	<i>E. italicum</i>	38°57'27" K 40°13'46" D	1800	Kuruca Geçidi-Bingöl	Var

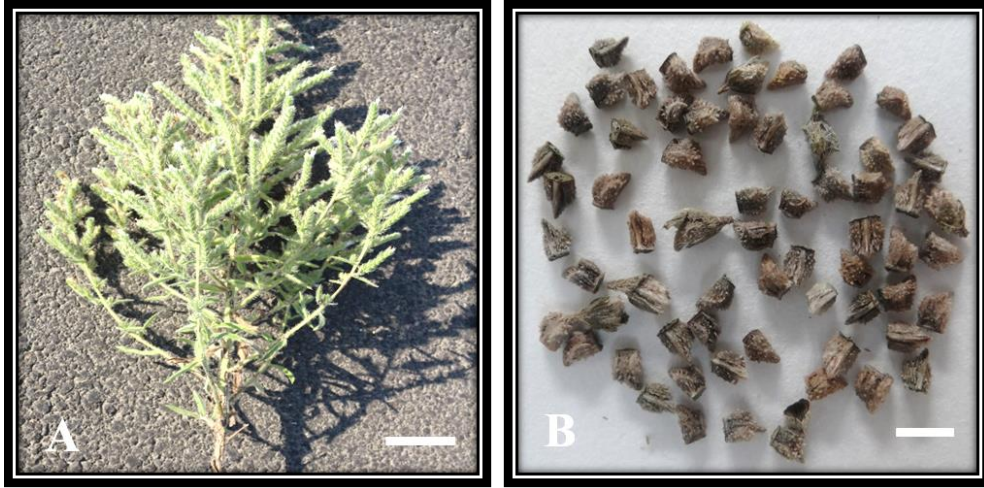
Not: Ö5 örneğinin, vejetatif ve generatif kısımları bulunmadığından örnek iptal edilmiştir.

Tablo 3.2: Yağ asidi çeşitlerinin ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan *E.italicum* örneklerine ait lokalite bilgisi.

Örnek No	Tür İsmi	GPS Kaydı	Yükseklik (Metre)	Konum	Tohum Durumu
Ö1.1	<i>E. italicum</i>	40°27'46" K 26°40'43" D	21	Gelibolu-Çanakkale	Var
Ö2.1	<i>E. italicum</i>	37°07'51" K 28°22'29" D	655	Muğla-Ula Yolu	Var
Ö3.1	<i>E. italicum</i>	36°48'48" K 29°18'48" D	1220	Fethiye-Korkuteli Yolu	Var
Ö4.1	<i>E. italicum</i>	38°01'10" K 30°57'35" D	937	Eğridir-Gelendost Yolu	Var
Ö5.1	<i>E. italicum</i>	39°11'12" K 35°14'22" D	1063	Kayseri-Sorgun Yolu	Var
Ö6.1	<i>E. italicum</i>	41°02'10" K 35°54'29" D	722	Samsun Bolu Yolu	Var
Ö7.1	<i>E. italicum</i>	41°37'46" K 34°36'03" D	377	Boyabat-Hanönü Yolu	Var
Ö8.1	<i>E. italicum</i>	40°51'23" K 32°29'14" D	1256	Gerede-Eskipazar Yolu	Var
Ö9.1	<i>E. italicum</i>	38°52'59" K 40°52'34" D	1200	Bingöl Üniversitesi-Bingöl	Var
Ö10.1	<i>E. italicum</i>	38°52'59" K 40°52'34" D	1511	Bitlis Baykan Yolu	Var
Ö11.1	<i>E. italicum</i>	38°28'57" K 42°10'15" D	1800	Bitlis Tatvan	Var

Tablo 3.1'de sunulan örneklerin tasnifleri yapılarak analiz için yeterli örneklerin kökleri, oda sıcaklığında ışık görmeyen bir ortamda kurutuldu ve analiz yapılncaya kadar saklandı.

Tablo 3.2'de belirtilen örneklerin tasnifleri yapılarak, bitki örneklerinden (Şekil 3.1A) tohumların kolay bir şekilde alınması için kurutuldu. Kurumanın ardından tohumlar bir elek sisteminden geçirilerek bitkiden ayrıldı. Analiz için yeteri miktardaki tohum örnekleri (Şekil 3.1B) cam kavonozlara aktarılarak serin bir yerde analiz yapılncaya kadar saklandı.



Şekil 3.1: A) *E. italicum* bitkisine ait, B) çatlatılmış ve kabuklu tohum, (Bar A; 8 cm, Bar B : 0.6 cm).

3.1.1.2. *In vitro* Çalışmalar Kapsamında Kullanılan Tohum

In vitro çalışmalar kapsamında kullanılan tohumlar, kolay erişilebilirlik açısından, 38°52'59" K 40°52'34"D koordinatlarında yer alan ve 1200m yükseklikteki Bingöl Üniversitesi Kampüsü içerisindeki doğal yaşam ortamından Ekim-Kasım ayı içerisinde toplandı. Bitki örneklerinden tohumların kolay bir şekilde alınması için kurutuldu. Ardından tohumlar bir elek sisteminden geçirilerek bitkiden ayrıldı. Cam kavanozlara bırakılan tohumlar (Şekil 3.2) çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında saklandı.



Şekil 3.2: *In vitro* çalışmalarda kullanılacak *E. italicum* bitkisine ait tohumlar (Bar: 0.5 cm).

3.1.2. Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3.3’de, besi ortamlarının içeriğine ilişkin kimyasallar Tablo 3.4’de cihaz bilgileri Tablo 3.5’de sunuldu.

Tablo 3.3: Laboratuvar çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeleri ve bilgileri.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Alkol	Alkomed	
Ticari çamaşır suyu [NaOCl (ACE)]	P&G	-
Glisin	Merck	1.04201.0100
Nikotik asit	Sigma	N-0765
Tiamin HCl	Sigma	T-3902
Piridoksin HCl	Sigma	P-8666
Myo-inositol	Sigma	I-3011
Agar	Sigma	A7921
Sukroz	Sigma	S5391
2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)	Sigma	S-7299
IAA (Indolasetik asit)	Sigma	I-2886
KIN (Kinetin)	Sigma	K-3378
NAA (Naftalenasetik asit)	Sigma	N-0640
TDZ (Tidiazuron)	Duchefa	T0916.0250
BAP (Benzilaminopürin)	Sigma	B-3408
Na ₂ SO ₄ (Sodyum Sülfat)	Sigma	239313
KCl (Potasyum Klorür)	Sigma	P-5405
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Amonyum Sülfat)	Sigma	A-3920
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (Sodyum Fosfat)	Sigma	S-9638
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (Kalsiyum Nitrat)	Sigma	C-2786
NH ₄ NO ₃ (Amonyum nitrat)	Sigma	A-3795
KNO ₃ (Potasyum nitrat)	Sigma	P-8291
KH ₂ PO ₄ (Potasyum fosfat)	Sigma	P-8416
CaCl ₂ .2H ₂ O (Kalsiyum klorür)	Sigma	C-2536

Tablo 3.3 Devamı: Laboratuvar çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeleri ve bilgileri.

MgSO ₄ .7H ₂ O (Magnezyum sülfat)	Sigma	M-7899
H ₃ BO ₃ (Borik asit)	Sigma	B-9645
KI (Potasyum iyodür)	Riedel-de Haen	03124
MnSO ₄ .4H ₂ O (Mangan sülfat)	Sigma	M-7899
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Çinko sülfat)	Sigma	Z-1001
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Molibdik asit)	Sigma	M-1651
CuSO ₄ .5H ₂ O (Bakır sülfat)	Sigma	C-8027
CoCl ₂ .6H ₂ O (Kobalt klorür)	Sigma	C-2911
FeSO ₄ .7H ₂ O (Demir sülfat)	Sigma	F-8263
Na ₂ EDTA (Sodyum etilendiamintetraasetik asit)	Sigma	4503
HCl	Sigma	320331
NaOH	Sigma	221465
Petri Kabı	ISOLAB	LB.IS.081.02.091
Magenta	Sigma	V8505
NaCl	Sigma	17179
Tripton	Sigma	T7293
Maya Özütü	Sigma	Y1625
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	ATCC	CIP 104786
Asetosiringon	Sigma	D134406
Timentin	Sigma	17778
Gamborg (Gamborg B5) Hazır Besi Ortamı	Duchefa	G0209.0050
Linsmaier & Skoog Hazır Besi Ortamı	Duchefa	L0230.0050
Murashige & Skoog Hazır Besi Ortamı	Duchefa	M0222.0050
White Hazır Besi Ortamı	Duchefa	W0227.0050
LB (Laura Bertani) Besi Ortamı	Sigma	L3022
Yağ Asidi Standart Metil Ester (Supelco)	Sigma	18919
Stearidonik Asit Metil Ester	Santa Cruz Biotech.	SC-361006

Tablo 3.4: Besi Ortamlarının içeriği.

Kimyasallar	LS	Gamborg 0	White	MS	SH
Na ₂ SO ₄	0	0	200 mg	0	0
KCl	0	0	65 mg	0	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	134 mg	0	0	0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0	150 mg	18.98 mg	0	0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0	0	0	0	300 mg
NH ₄ NO ₃	1650 mg	0	0	1650 mg	0
KNO ₃	1900 mg	2500 mg	80 mg	1900 mg	2500 mg
KH ₂ PO ₄ (Monobasic)	170 mg	0	0	170 mg	0
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0	0	221.96 mg	0	0
MgSO ₄ .7H ₂ O	181 mg	250 mg	720 mg	370 mg	400 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 mg	150 mg	0	440 mg	200 mg
K ₂ SO ₄	0	0	0	0	0
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	10 mg	5.04 mg	16.9 mg	10 mg

Tablo 3.4 Devamı: Besi Ortamlarının içeriği.

ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg	2 mg	2.67 mg	8.6 mg	1 mg
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg	0.25 mg	0,001 mg	0.25 mg	0.1 mg
KI	0,83 mg	0.75 mg	0.75 mg	0.83 mg	1 mg
H ₃ BO ₃	6,20 mg	3 mg	1.50 mg	6.20 mg	5 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 mg	0.025 mg	0	0.025 mg	0.1 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 mg	0.025 mg	0.01	0.025 mg	0.2 mg
Demir Kelatör					
FeSO ₄ .7H ₂ O	28 mg	28 mg	2.5 mg	28 mg	20 mg
Na ₂ EDTA	37 mg	37 mg	0	37 mg	15 mg
Vitamin					
Glisin	0	0	3 mg	2 mg	0
Nikotinic Asit	0	1 mg	0.50 mg	0.5 mg	5 mg
Tiamin HCl	0.4 mg	10 mg	0.10 mg	0.1 mg	5 mg
Pridoksin HCl	0	1 mg	0.10 mg	0.5 mg	0.5 mg
Sükroz	30 gr	20 gr	20 gr	30 gr	30 gr
Myo-İnositol	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	1000 mg
Agar	7 gr	7 gr	7 gr	7 gr	7 gr
pH	5.8	5.5	5.8	5.8	5.8

Tablo 3.5: Laboratuvar çalışmalarında kullanılan cihazlar ve bilgileri.

Cihaz Adı	Firma Adı	Model No	Ülke
Otoklav	Hirayama	Hiclave HVE-50	Japonya
Çalkalayıcı	Stuart	SI500	İngiltere
Fırın	Süsler	SMM 6163	Türkiye
Etüv	ThermoScientific	OGH180	ABD
Saf Su Cihazı	Human	Zeneer Power I	Kore
pH Metre	Hanna	HI 110	USA
Buzdolabı	Arçelik	5231 NY	Türkiye
Manyetik Karıştırıcı	Velp	Velp-Are	İtalya
Santrifüj	Eppendorf	5424-R	İngiltere
Laminar Akımlı Kabin (Steril Kabin)	Thermo Sci	HeraGurad	ABD
Hassas Terazı	Sartorius	BSA 224S	Almanya
Termosifon	Arçelik	G7880	Türkiye
Bitki Büyütme Odası	Genpa	-	Türkiye
Mikropipet Seti	Eppendorf	-	İngiltere
Mikro Filtreler (0.2 µm)	Sartorius	Minisart	Almanya
Mikro Filtreler (40-70-100-250-500 µm)	PluriSelect	pluriStrainer	Almanya
Derin Dondurucu (-80 °C)	Forma 8600	Thermo	ABD
Fotoğraf Makinası	Sony	DX-HX200V	Japonya
Cam Boncuklu Sterilizatör	Steri350	Steri	İsviçre
Sıcak Su Banyosu	MP	Julaba	Almanya
Liyofilizatör	RC101-RCT90	Jouan	Almanya
Vorteks	Vortex Mixer	VWR	ABD
Mikrodalga Fırın	MW71E	Samsung	Malezya
Jel Elektrofrezı ve Güç Kaynağı	MS09092879	Cleaver	İngiltere

Tablo 3.5 Devamı: Laboratuvar çalışmalarında kullanılan cihazlar ve bilgileri.

Jel Dokümantasyon Cihazı	Chemidoc XRS ⁺	BioRad	ABD
Nanodrop	BioSpec-nano	Shimadzu	Japonya
Rotavapor	R-300	Heidolph	Almanya
Soxhlet Cihazı	B-811	Buchi	Almanya
Termal Döngü Cihazı	PTC-200	MJ Research	Amerika
Spektrofotometre	UV-1800	Shimadzu	Japonya
Real Time Hücre Analizörü	xCELLigence	ACEA Biosciences	ABD

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Besi Ortamları, BBD ve Elisitörlerin Hazırlanması, Malzemelerin Sterilizasyonu, İnkübasyon Koşulları ve Deneysel Verilerinin Hesaplanması

Bitki doku kültürü çalışmaları kapsamında kullanılan besiy ortamlarının içeriği Tablo 3.4' de sunulmuş olup, çalışmalar kapsamında kullanılan besiy ortamları hazır besiy ortamı şeklinde temin edilmiştir. Kullanılan besiy ortamları için tabloda belirtilen değerleri karşılayan ve ürün kataloğunda belirlenen miktar tartıldı (ürün kataloğunda 1 lt besiy ortamına karşılık gelen miktar verilmiş olup farklı hacimlerde besiy ortamı hazırlanması gerek duyulduğunda, ilgili değer orantılanarak hesaplandı). Hazırlanan besiy ortamına gerekli miktarda karbon kaynağı (sükroz) ilave edilip, besiy ortamlarının farklı amaçlarla kullanılmasına yönelik ihtiyaç duyulan BBD'ler (Bazı BBD'ler ve elisitörler kimyasal yapıları gereği sıcaktan etkilenmeleri dolayısıyla otoklav sonrası ilave edilmesine dikkat edilmiştir) ilave edilerek, bileşenler saf su içerisinde çözüldü. Besiy ortamının pH'sı 1N HCl ve/veya 1N NaOH ile 5.8'e ayarlandı. Ayrıca, yarı katı besiy ortamı hazırlanmak istendiğinde, pH ayarlanması sonrası litre başına 6.4 gr agar ilave edildi. Besiy ortamı ardından 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 20 dakika otoklav edilerek steril edildi. Yarı katı olarak kullanılacak besiy ortamı için, otoklav sonrası, gerekli BBD ve/veya elisitörlerin eklenebilmesi ve Petri/magentalara paylaşılması için besiy ortamı steril kabin içerisinde soğutulmuş olarak kültür kaplarına paylaştırıldı. Kültür kaplarında polimerize olan besiy ortamları uygun şekilde sarılarak kullanıncaya kadar serin ve karanlık bir ortamda saklandı. Sıvı besiy ortamları ise buldukları şişe içerisinde, steril kabin içerisinde soğutuldu, ardından şişenin etrafı sarılarak etiketlendi ve kullanıncaya kadar buzdolabında saklandı.

BBD'ler ve elisitörlerin stoklarının hazırlanması;

KIN (1mg/ml): Belirli miktar KIN tartılarak erlen içerisinde alındı ardından 1N NaOH'dan birkaç ml ilave edilerek final hacim dH₂O eklenerek 1mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Ardından ependorf tüplere alınarak -20 °C saklandı (Otoklav öncesi besi ortamına ilave edildi).

IAA (1mg/ml): Belirli miktar IAA tartılarak erlen içerisinde alındı akabinde 1N NaOH'dan birkaç ml ilave edilerek final hacim dH₂O eklenerek 1mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Ardından ependorf tüplere alınarak -20 °C saklandı (Otoklav öncesi besi ortamına ilave edildi).

NAA (1mg/ml): Belirli miktar NAA tartılarak erlen içerisinde alındı akabinde 1N NaOH'dan birkaç ml ilave edilerek final hacim dH₂O eklenerek 1mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Ardından ependorf tüplere alınarak -20 °C saklandı (Otoklav öncesi besi ortamına ilave edildi).

2,4-D (1mg/ml): Belirli miktar 2,4-D tartılarak erlen içerisinde alındı akabinde 1N EtOH'dan birkaç ml ilave edilerek final hacim dH₂O eklenerek 1mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Ardından ependorf tüplere alınarak -20 °C saklandı (Otoklav öncesi besi ortamına ilave edildi).

MeJA (1mg/ml): Stoğundan, ara stoğu oluşturacak miktar kadar hacim çekildi akabinde 1N EtOH'dan birkaç ml ilave edilerek final hacim dH₂O eklenerek 1mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Hazırlanan ara stok filtreden geçirilerek steril edildi ve steril ependorf tüplere alınarak -20 °C saklandı (Otoklav sonrası besi ortamına ilave edildi).

ABA (1mg/ml): Belirli miktar ABA tartılarak erlen içerisinde alındı akabinde 1N EtOH'dan birkaç ml ilave edilerek final hacim dH₂O eklenerek 1mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Hazırlanan stok filtreden geçirilerek steril edildi ve steril ependorf tüplere alınarak -20 °C saklandı (Otoklav sonrası besi ortamına ilave edildi).

AgNO₃ (1mg/ml): Belirli miktar AgNO₃ tartılarak erlen içerisinde alındı ve dH₂O eklenerek çözüldü. Final hacim dH₂O eklenerek 1mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Hazırlanan stok filtreden geçirilerek steril edildi ve steril ependorf tüplere alınarak -20 °C saklandı (Otoklav sonrası besi ortamına ilave edildi).

SC Maya Özütü (100 mg/ml): Belirli miktar ticari kuru instant maya tartılarak vidalı şişe içerisinde içerisine alındı ve dH₂O eklenerek çözüldü. Final hacim dH₂O eklenerek 100mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı. Hazırlanan stok otoklav edildi. Otoklav sonrası şişenin etrafı sarıldı ve kullanıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

DMSO: Çalışmada istenen miktar kadar DMSO besi ortamına otoklav sonrası ilave edildi.

Çalışma kapsamında, başta bitki doku kültüründe kullanılan malzemeler ile diğer iş paketlerinde kullanılan malzemelerin sterilizasyon işlemlerinde; Cam, dH₂O, alüminyum folyo, besi ortamları ve kültür kapları (Magenta GA7) gibi malzemelerin sterilizasyonu otoklavda 121 °C’de 1.2 atm basınç altında 20 dakika süresince uygulanan programda gerçekleştirildi. Doku kültürü çalışmaları kapsamında kullanılan pens, bistüri, kaşık gibi malzemelerin sterilizasyonunda, steril kabin içerisinde konumlandırılan cam boncuklu sterilizatörde gerçekleştirildi. Alt kültür işlemlerinde kesme ayırma işlemlerinin yapıldığı filtre kağıtlarının sterilizasyonu ise 2 kat parşömen kağıdına sarıldıktan sonra 180 °C’de 3 saat etüvde gerçekleştirildi.

Çimlendirme (Magenta GA7 kullanıldı) ve kallus oluşturma ve geliştirme (steril 9 cm. çapında Petri kapları kullanıldı) çalışmalarında, kültür kaplarındaki kültürlerin olası kontaminasyon vb. sorunlarla karşılaşılması için iki tur streç filmle kapatılma sağlandı. Saçak kök ve süspansiyon kültürlerinde erlenlerdeki kültürlerin olası kontaminasyon vb. sorunlarla karşılaşılması için 2 kat steril alüminyum folyo ile kapatıldı ve üzeri iki tur streç filmle sağlamlaştırıldı. Antikanser çalışmalarında ise, genellikle tek kullanımlık malzemeler kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi.

Bitki doku kültürü çalışmalarında; Yarı katı besi ortamı Petri ve Magenta GA7 kaplarına yaklaşık sırasıyla 25-30 ml besi ortamı dökülerek çalışma hacmi oluşturuldu. Süspansiyon ve saçak kök kültürü çalışmalarında ise çalışmaların tamamı 250 ml erlenlerde gerçekleştirildi. Süspansiyon kültürlerininin başlangıcında 100 ml taze besi ortamı, alt kültür çalışmalarında ise 50 ml bir önceki çalışmadan gelen kültür ile üzerine 50 ml taze besi ortamı ilave edilerek 100 ml’lik kültür çalışma hacmi oluşturuldu. Saçak kök çalışmalarında ise 100 ml taze besi ortamı çalışma hacmi olarak oluşturuldu.

Çalışma kapsamında, BBO’da, ışık miktarı 3000 lüx, inkübasyon sıcaklığı 25±2 °C, normal fotoperiyot (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) olarak uygulandı. Tohumların çimlendirilmesi aşamasında veya kallus oluşturma çalışmalarında gerektiğinde karanlık ortam kültür kaplarının ışık geçirgenliği sağlamayan kutularda gerçekleştirildi. Süspansiyon ve saçak kök kültürü çalışmalarında çalkalayıcılar BBO’da yer alan metal platformlara yerleştirilmiş olup, kültür

kapları (erlenler) için gerekli görüldüğünde karanlık ortam, erlenlerin etrafı tamamen alüminyum folyo ile sarılarak sağlandı.

Kallus, süspansiyon ve saçak köklerin kullanılmasıyla gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında sonuçların değerlendirilmesinde; morfolojik çalışmalarla birlikte örneklerin yaş ve kuru ağırlıkları hesaplandı. Morfolojik ve sayısal değerlendirmeler her kültür çalışması için aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Kallus kültürlerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonrası, morfolojik gözlemler kallusların renk (pigmentli, pigmentsiz ve diğer renk tonları), fiziksel (dağılgan-sert) durumu izlenerek gerçekleştirildi. Yaş ağırlıklar morfolojik değerlendirmeler sonrası kallusların tartılması ile, kuru ağırlıklar ise yaklaşık bir gün ışık almayan ortamda ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra tartılması ile hesaplandı.

Süspansiyon kültürlerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonrası, morfolojik tespitler süspansiyonların renk (pigmentli, pigmentsiz ve diğer renk tonları) ve fiziksel yapıları (kümeleşme durumu) gözlenerek gerçekleştirildi. Yaş ve kuru ağırlıkların tespitinde ise, inkübasyon süresi sonunda çalışmaya katılan her gruptaki erlenlerden yaklaşık 1 ml süspansiyon kültürü 1.5 ml ependorf alınarak 5000 rpm de 6 dakika santrüfj edildi, ardından tüpte pelete dokunmadan maksimum hacimde süpernatant pipet yardımıyla çekilerek atıldı. Pelet, kalan minimum miktarda süpernatantla çözüldü ve ağırlığı kaydedilmiş filtre kağıdı üzerine yayıldı ve ışık görmeyen ortamda oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika bekletildi. Beklemenin ardından filtre kağıtlarının tartımı yapılarak yaş ağırlıklar, sonrasında ışık görmeyen ortamda ve oda sıcaklığında filtre kağıtlarının kurutulmasıyla kuru ağırlıkları hesaplandı.

Saçak köklerde gerçekleştirilen çalışmalar sonrası, morfolojik gözlemler saçak köklerin fiziksel (parçalanma ve parçalanmama) ve besi ortamındaki renk (pigmentasyon) durumları izlenerek gerçekleştirildi. Yaş ve kuru ağırlıklar hesaplanırken, morfolojik gözlemler sonrasında erlenler içerisindeki besi ortamı döküldü, ardından oluşan saçak köklerin üzerindeki fazla miktardaki besi ortamı kurutularak yaş ağırlık; yaş ağırlığı tespit edilen saçak kökler ışık görmeyen ortamda oda sıcaklığında kurutularak kuru ağırlıkları hesaplandı.

3.2.2. Tohumların Sterilizasyonu ve Çimlendirme Çalışmaları

Tohumların çimlendirilmesi çalışmalarında, Kılınc ve arkadaşlarının 2015; Tilkat ve arkadaşlarının 2018 yılında rapor ettiği, yüzey sterilizasyonu protokolü kullanıldı (Şekil 3.3A-F). Protokole göre, tohumlar %20 lik ticari NaOCl [(ACE, Procter & Gamble), (Şekil 3.3C) ile 20 dakika çalkalayıcıda (Şekil 3.3D) çalkalandıktan sonra her biri 5'er dakika olmak üzere 3 defa steril distile su ile NaOCl' nin etkisi giderilmeye çalışıldı (Şekil 3.3E). Akabinde laminar akımlı kabin içinde filtre kağıdı üzerine alınan tohumlar ıslaklıkları giderilmeye kadar kurutuldu (Şekil 3.3F). Islaklığı giden tohumlar pens yardımıyla Zare ve arkadaşlarının 2011 yılında rapor ettiği çalışmaya göre, bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besisi ortamına (Murashige ve Skoog, 1962) ekildi (Şekil 3.3G,H). Besi ortamına ekilen tohumlar inkübasyon için bitki büyütme odasına transfer edildi. Çalışmada; A) Tohumların dışındaki sert kabuğu bir kırıcı yardımıyla çatlatılmış ve kabuğundan arındırılmış (perikarp ve testasından arındırılmış) tohumlar kullanılarak, B) Normal fotoperiyot (aydınlık) ve karanlık ortamda çimlendirme çalışmaları gerçekleştirildi. Her çalışmada ortalama 50 tohum kullanıldı.



Şekil 3.3: Tohumların çimlendirilmesi. A) Kabuklu, kabuğu çatlatılmış ve B) kabuksuz tohumlar, C) Tohumların 20 dk, %20 NaOCl çözeltisinde çalkalanması D) Çalkalama işlemlerinin çalkalayıcıda yapılması, E) Tohumların 3 defa 5'er dakika steril distile suda yıkanması, F) yüzey sterilizasyonu yapılan tohumların ekilmeden önce laminar akımlı kabinde steril filtre kağıtları üzerinde kurutulması, G) kabuklu, kabuğu çatlatılmış, H) kabuksuz tohumların BBD içermeyen MS ortamına transfer edilmesi. (Barlar; A) 0.6 cm, B) 0.6cm, C) 1cm, D) 5cm, E) 1cm, F) 0.9cm, G) 0.9cm, H) 0.9cm).

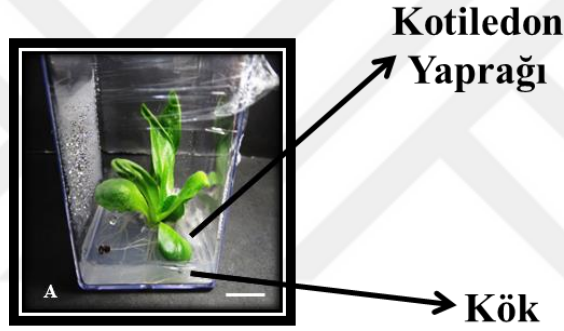
3.2.3. Çimlenen Tohumlardan Elde Edilen Aksenik Materyallerden Kallus Kültürlerinin Elde Edilmesi Çalışmaları

3.2.3.1. Kallus Kültürü Oluşturma Çalışması

Tez çalışması kapsamında, şikonin ve türevleri ile yağ asitlerinin üretilmesi ve üretiminin artırılması amacıyla kullanılan süspansiyon kültürleri, çimlendirilen tohumlardan elde edilen

kotiledon yaprağı ve kök eksplantlarından oluşturulan kallus kültürleriyle gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında daha önce literatürde rapor edilen çalışmalardan elde edilen bilgiler modifiye edilerek (Zare ve diğ., 2011) farklı besi ortamlarının ve BBD kombinasyonlarının kallus oluşturmaya etkisi araştırıldı.

Normal fotoperiyotlu BBO'da, BBD içermeyen MS besi ortamında çimlendirilen tohumlardan elde edilen kökler ve kotiledon yaprakları (Şekil 3.4) eşit büyüklükte alınarak Tablo 3.6'da sunulan besi ortamlarına ekildi ve BBO'da normal fotoperiyotta (Şekil 3.5, Şekil 3.7, Şekil 3.9, Şekil 3.11, Şekil 3.13, Şekil 3.15) ve karanlık ortamda (Şekil 3.6, Şekil 3.8, Şekil 3.10, Şekil 3.12, Şekil 3.14, Şekil 3.16) yaklaşık 1 ay inkübe edildikten sonra kallus morfolojileri ve kallus oluşum yüzdeleri hesaplandı.

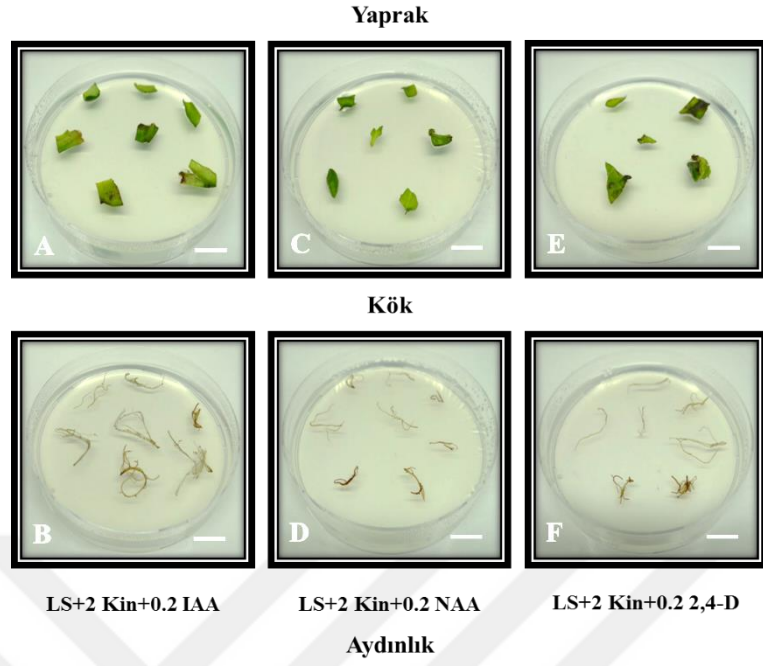


Şekil 3.4: *E. italicum* bitkisine ait tohumların *in vitro* ortamda çimlendirilmesi sonrası oluşan kotiledon yaprağı ve kök.

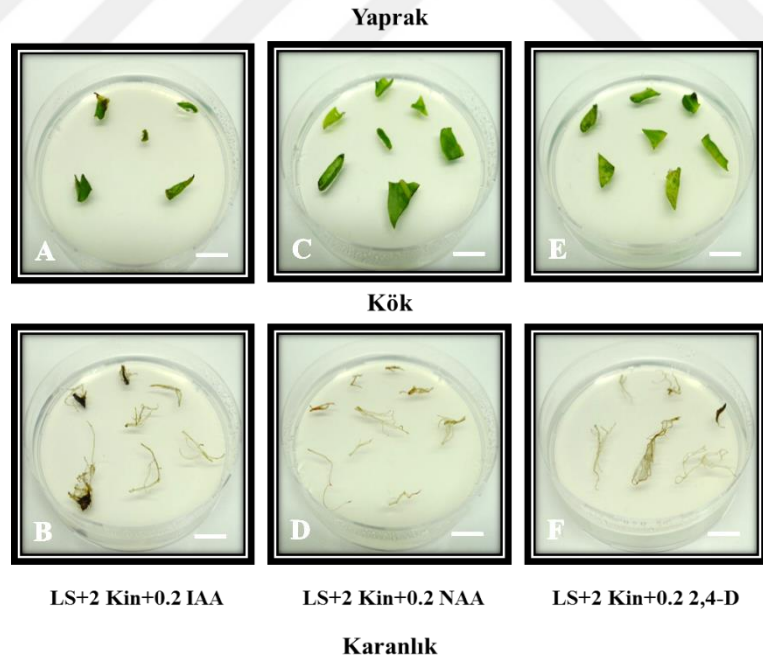
Tablo 3.6: Kallus üretimi için kullanılan besi ortamı tipleri.

Besi Ortamı Tipi	Hormon Kombinasyonu (mg/l)		
LS	2 Kin+0.2 IAA	2 Kin+0.2 NAA	2 Kin+0.2 2,4-D
½ LS	2 Kin+0.2 IAA	2 Kin+0.2 NAA	2 Kin+0.2 2,4-D
Gamborg 0	2 Kin+0.2 IAA	2 Kin+0.2 NAA	2 Kin+0.2 2,4-D
White	2 Kin+0.2 IAA	2 Kin+0.2 NAA	2 Kin+0.2 2,4-D
MS	2 Kin+0.2 IAA	2 Kin+0.2 NAA	2 Kin+0.2 2,4-D
SH	2 Kin+0.2 IAA	2 Kin+0.2 NAA	2 Kin+0.2 2,4-D

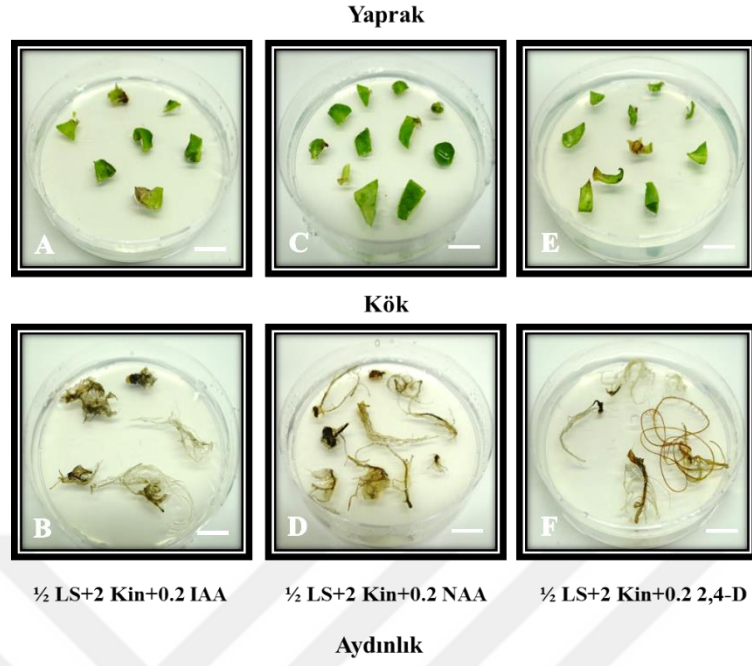
Her denemede ortalama 20 eksplant kullanıldı ve 3 defa tekrarlandı.



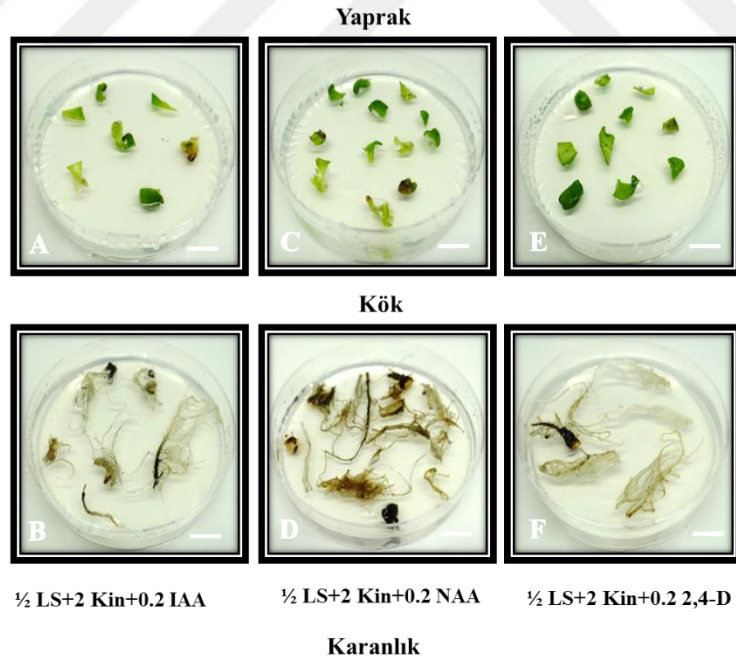
Şekil 3.5: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli LS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



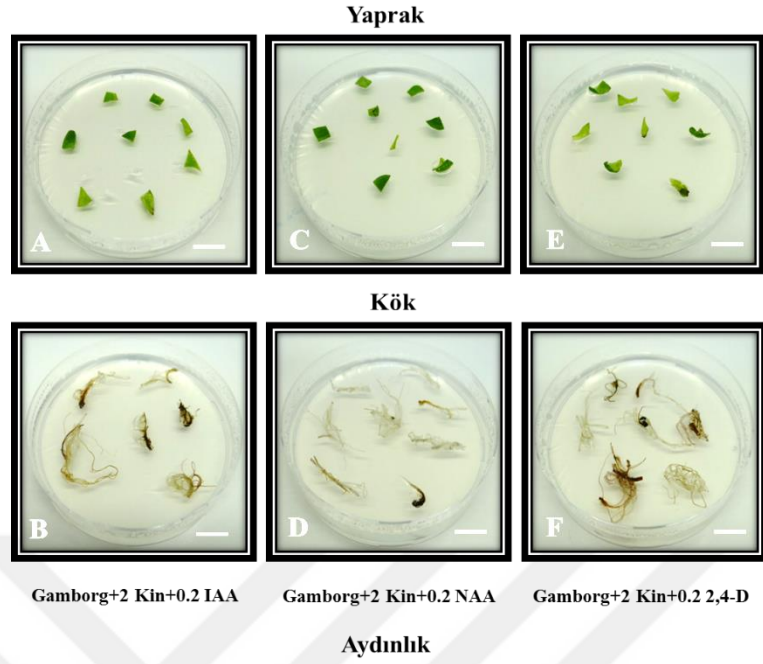
Şekil 3.6: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli LS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



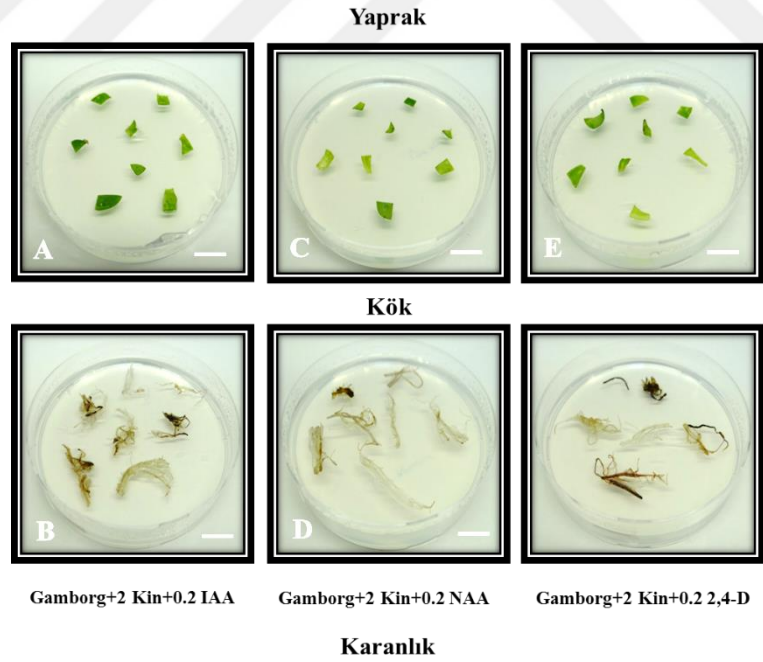
Şekil 3.7: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli ½ LS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



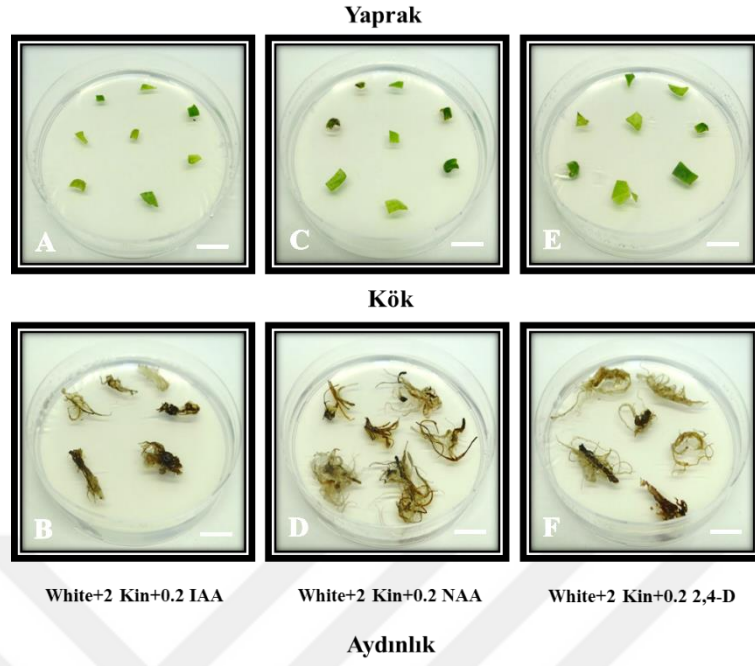
Şekil 3.8: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli ½ LS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



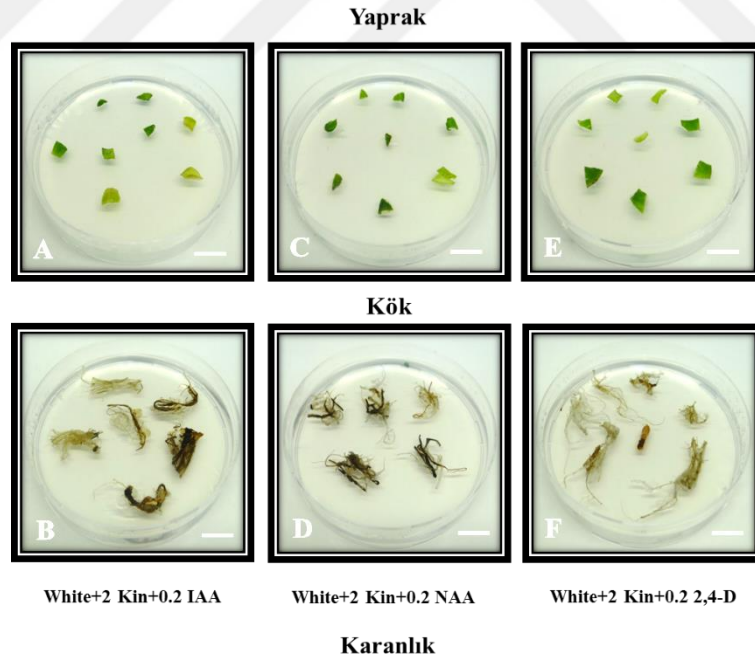
Şekil 3.9: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli Gamborg besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



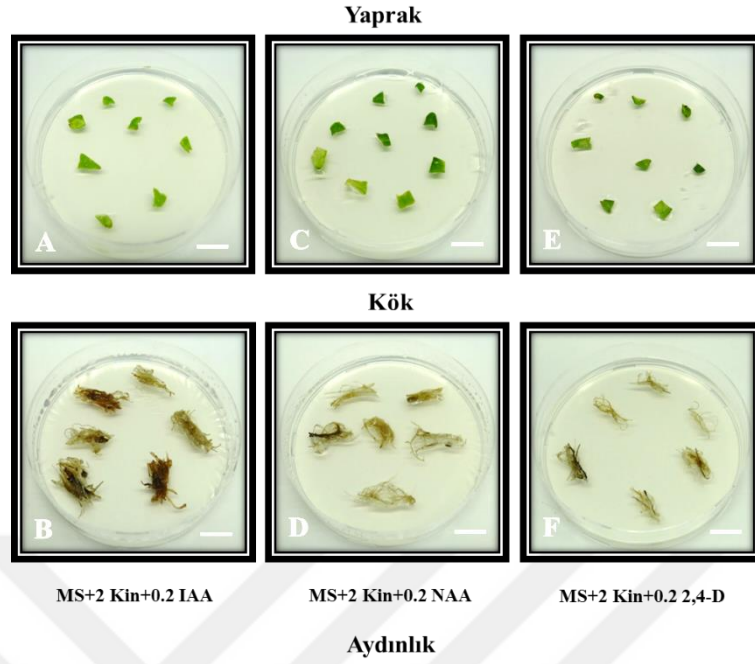
Şekil 3.10: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli Gamborg besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



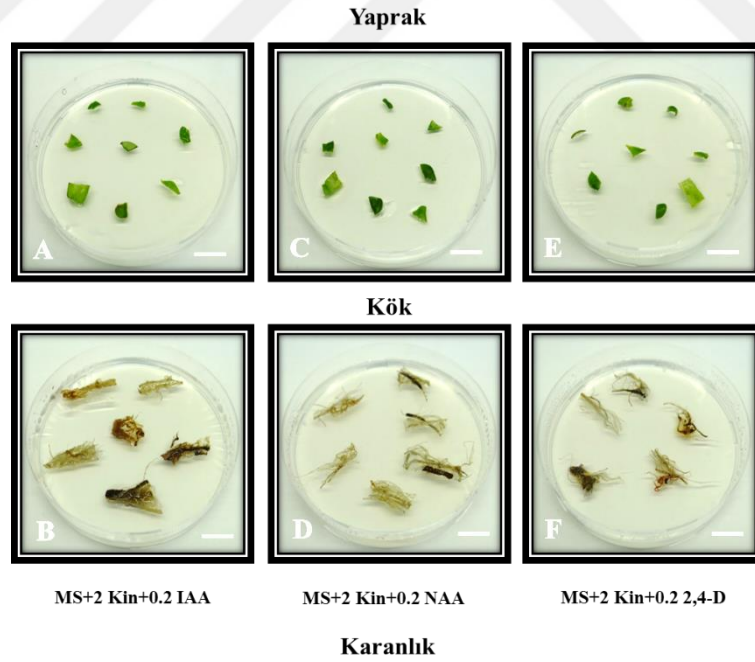
Şekil 3.11: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli White besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



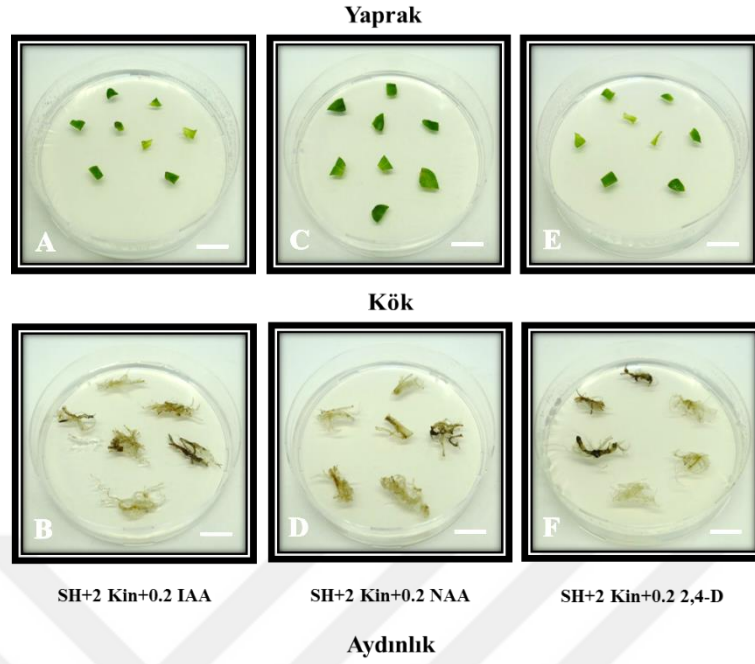
Şekil 3.12: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli White besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



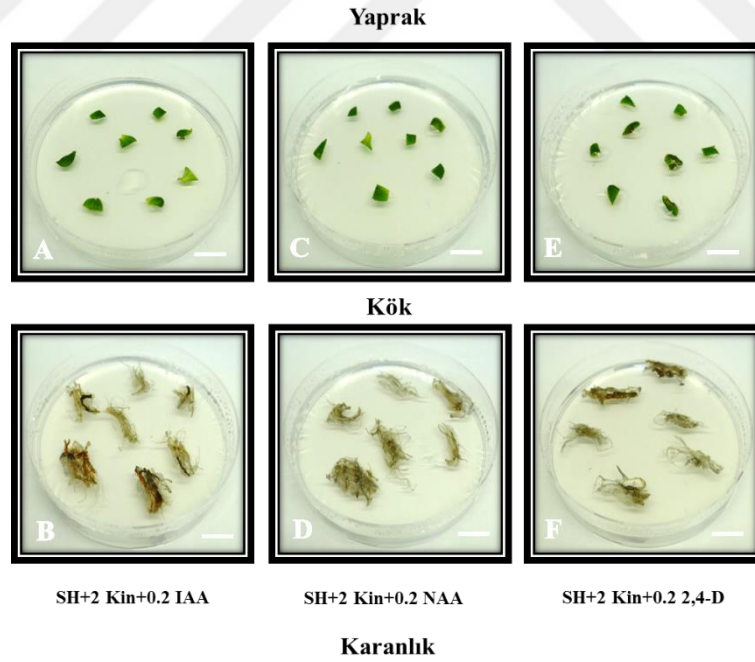
Şekil 3.13: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli MS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



Şekil 3.14: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli MS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).



Şekil 3.15: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli SH besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).

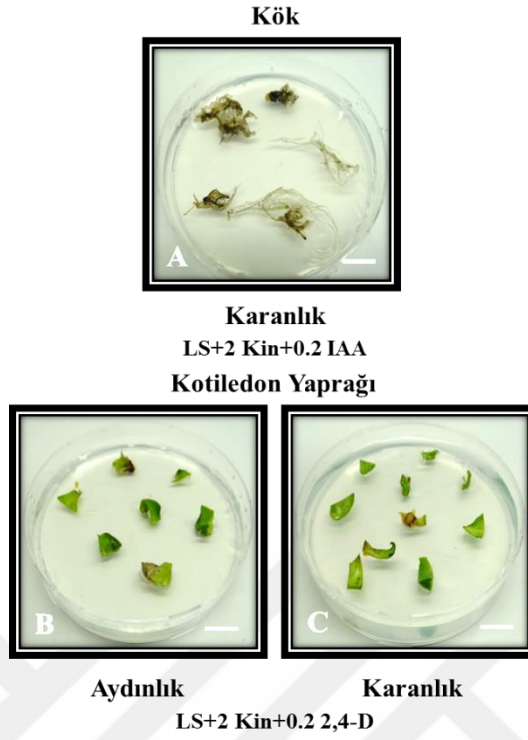


Şekil 3.16: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprakları ve köklerin, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli SH besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus üretimine etkisi. (Bar: 1cm).

3.2.3.2. Stok Kallus Kültürü Eldesi ve Kallus Gelişiminin Karakterizasyonu Çalışması

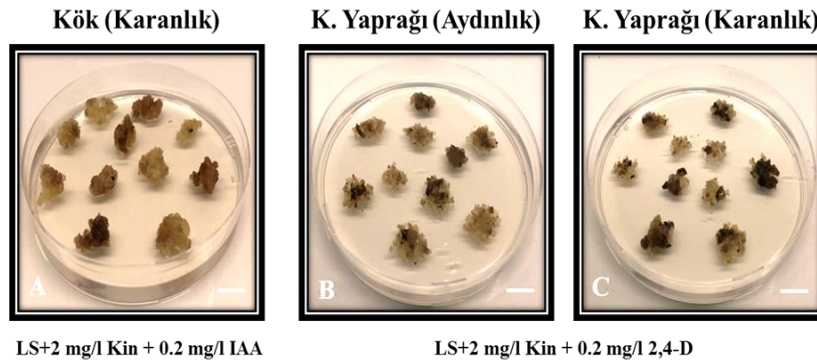
Elde edilen kallusların 2 mg/l Kin ile 0.2 mg/l farklı oksin (IAA-NAA-2,4-D) kombinasyonu destekli farklı besi ortamlarında [LS (Linsmaier ve Skoog, 1965), ½LS, Gamborg (Gamborg v diğ. 1968) , White (White, 1943), MS ve SH (Schenk ve Hildebrandt, 1972)] ve karanlık ile normal fotoperiyot koşullarında inkübasyonu sonrası gelişimlerinin izlendiği çalışmada elde edilen veriler irdelendiğinde, süspansiyon çalışmalarında kullanılabilecek nitelikte olan kalluslar için en uygun ışık yoğunluğu ve besi ortamı; kök kaynaklı kalluslar için karanlık ortamdaki 2 mg/l Kin ile 0.2 mg/l IAA destekli LS besi ortamı, kotiledon yaprağı kaynaklı kallusları için ise normal fotoperiyot ve karanlık koşullarda 2 mg/l Kin ile 0.2 mg/l 2,4-D destekli LS besi ortamı olarak belirlendi.

Kallus oluşturma ve geliştirme besi ortamının belirlenmesi akabinde en uygun koşullarda kallusların gelişmesinin irdelenmesinin yanında en uygun ışık yoğunluğunun belirlenmesi ve sonrasında stok kallus kültürü elde edilmesi için kallus kültürlerinin gelişimi izlendi. Çalışma kapsamında oluşturulan kallus kültürlerinden elde edilen kalluslar ağırlıkları alınarak belirlenen besi ortamlarına ekildi (Şekil 3.15), ardından BBO'da [kotiledon yaprağı (normal fotoperiyot ve karanlık) ve kökler (karanlık) kalluslar] yaklaşık 1 ay inkübe edildikten sonra yaş ve kuru ağırlıkları hesaplandı.



Şekil 3.17: Kallus oluşturulması için uygun besi ortamlarına ekilen A. Kök ve B ve C. kotiledon yaprakları (Barlar: 1.3 cm).

Elde edilen stok kallus kültürleri kullanılarak kallusların gelişimi ve karakterizasyonu çalışmaları yapıldı. Benzer şekilde kotiledon yaprağı kaynaklı kalluslar normal fotoperiyot ve karanlık ortamda LS+2 mg/l Kin+ 0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında, kök kaynaklı kalluslar ise karanlık ortamda LS+2 mg/l Kin+ 0.2 mg/l IAA besi ortamında inkübe edildi (Şekil 3.16).



Şekil 3.18: Kotiledon yaprakları ve kök kaynaklı kallus kültürlerinde kallus gelişimi ve karakterizasyonu için besi ortamına ekilen kalluslar (Barlar: 1.3 cm).

3.2.4. Oluşturulan Kök ve Kotiledon Yaprığı Kaynaklı Kalluslardan Süspansiyon Kültürlerinin Elde Edilmesi Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında, şikonin ve türevleri ile yağ asitlerinin *in vitro* kültürlerde üretilmesi ve bazı fiziksel ve kimyasal elisitasyon uygulamalarıyla miktarının artırılmasında süspansiyon kültürleri kullanıldı. Süspansiyon kültürlerinin oluşturulması için uygun nitelikte (kolay dağılıbilir) kallusların kullanılması önemlidir. Bu amaçla, şikonin ve türevlerinin üretilmesinde 2 mg/l Kin ve 0.2 mg/l IAA destekli LS besi ortamında üretilen kök kaynaklı pigmentli dağılıbilir kalluslar, yağ asitleri için ise 2 mg/l Kin ve 0.2 mg/l 2,4-D destekli LS besi ortamında üretilen kotiledon yaprağı kaynaklı dağılıbilir kalluslar kullanıldı.

3.2.4.1. Süspansiyon Kültürü Oluşturma Çalışması

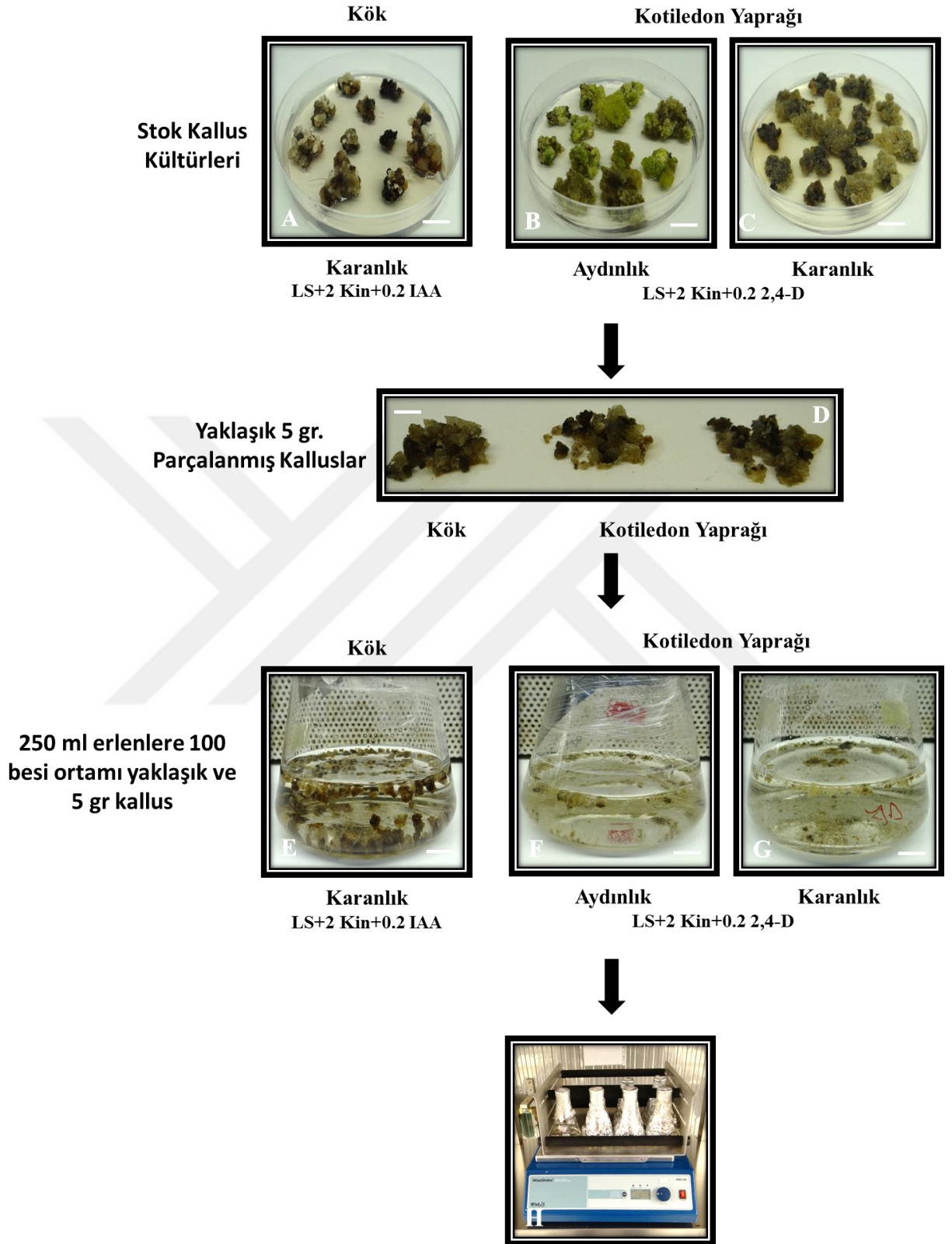
Literatürde şikonin ve türevlerinin süspansiyon kültürlerinden üretilmesinde ışığın etkisi olumsuz olarak tespit edildiğinden daha önce de ifade edildiği üzere kök kaynaklı kallusların oluşturulmasında ve çoğaltımında kültürler tamamen karanlık koşullarda inkübe edildiği gibi süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve stok süspansiyon kültürü elde edilmesinde de kültürler tamamen karanlık koşullarda inkübe edildi.

Yayınlanmış literatür kapsamında, yağ asitlerinin süspansiyon kültürlerinde üretilmesinde ışığın olumlu ya da olumsuz yönde herhangi bir etkisi olmadığından kotiledon yaprağı kaynaklı kallusların oluşturulmasında ve çoğaltılmasında kültürler hem normal fotoperiyot hem de karanlık ortamda inkübe edilirken, süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve stok süspansiyon kültürü elde edilmesinde de kültürler normal fotoperiyot ve karanlık ortamda inkübe edildi. Ancak, kotiledon yaprakları kaynaklı kallusların normal fotoperiyotta inkübasyonu, sert ve dağılgan olmayan kalluslar meydana getirdiğinden, kotiledon yaprakları kaynaklı kalluslardan süspansiyon kültürü çalışmalarında karanlıkta inkübe edilen kotiledon yaprağı kallus kültürleri kullanıldı ve süspansiyon kültürleri oluşturulması ve stok süspansiyon kültürü elde edilmesinde kültürler hem karanlık hem de normal fotoperiyotta inkübe edildi.

Süspansiyon kültürleri oluşturma çalışmalarında, 3.2.4. başlığı altında ifade edildiği gibi şikonin ve türevlerinin üretilmesinde 2 mg/l Kin ve 0.2 mg/l IAA destekli LS besi ortamında üretilen ve çoğaltılan kök kaynaklı pigmentli dağılıbilir kalluslar, yağ asitleri için ise 2 mg/l Kin ve 0.2 mg/l 2,4-D destekli LS besi ortamında karanlık ortamda inkübasyon sonucu üretilen ve çoğaltılan kotiledon yaprağı kaynaklı dağılıbilir kalluslar kullanıldı. Süspansiyon kültürleri

oluşturma çalışmasında, dağılgan nitelikte kalluslardan her 250 ml erlene yaklaşık 5 gr kadar alınarak üzerine aynı besi ortamının 100 ml sıvı hali eklendi. Kallusların besi ortamının eklendiği erlenler gerekli kapatılma işlemleri gerçekleştirilerek, BBO'da 100 rpm dönme hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde inkübe edilerek süspansiyon kültürleri başlatıldı (şekil 3.17).





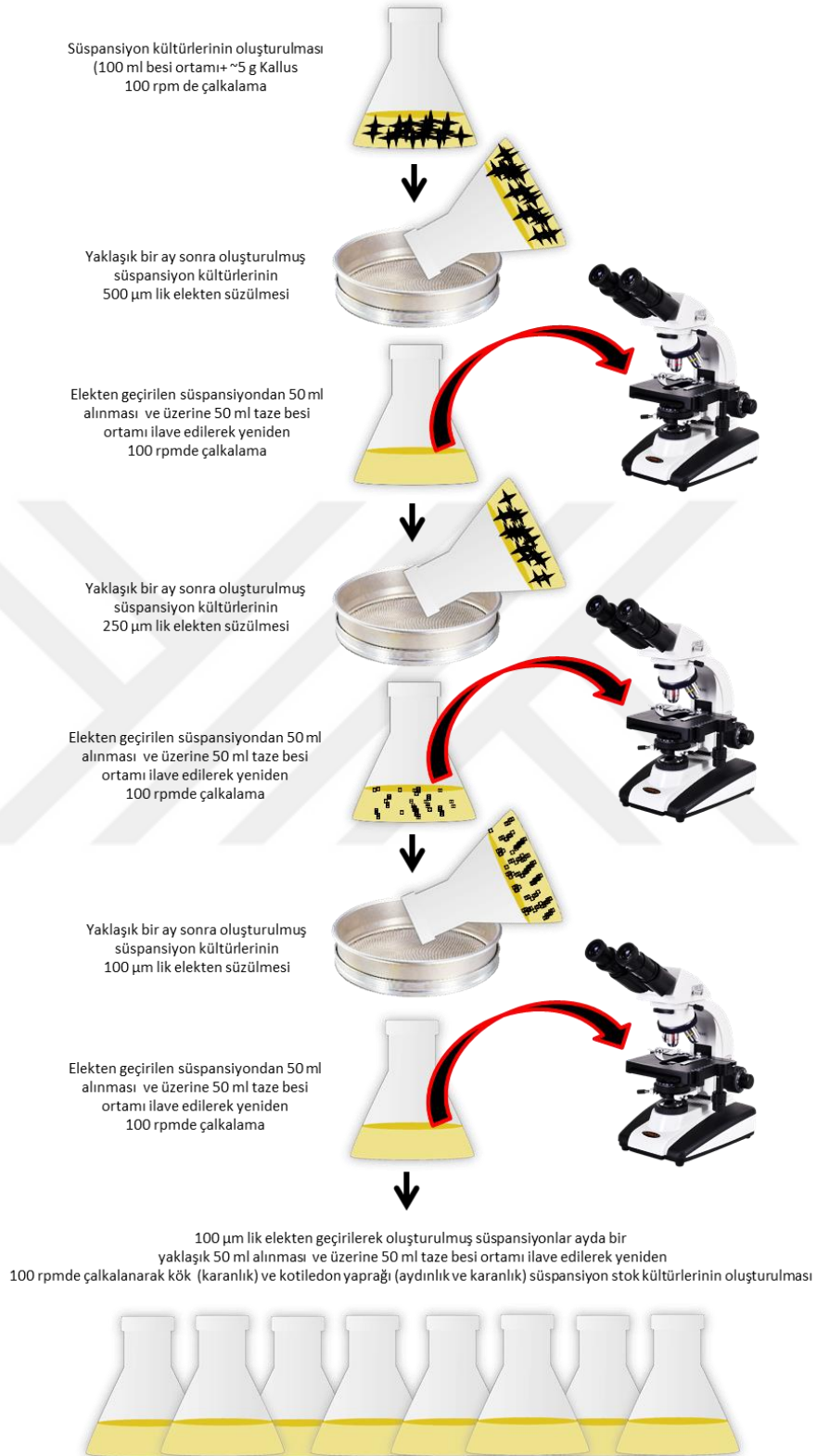
Şekil 3.19: Kotiledon yaprakları ve kök kallus hatlarından süspansiyon kültürlerinin başlatılması. A) ve E) Kök, B), C), F) ve G.) Kotiledon Yaprakları (Barlar; A), B) ve C) Bar: 1.4 cm, D) Bar: 1.1 cm, E), F) ve G) Bar: 1.5 cm).

3.2.4.2. *Stok Süspansiyon Kültür Hatları Oluşturma Çalışması*

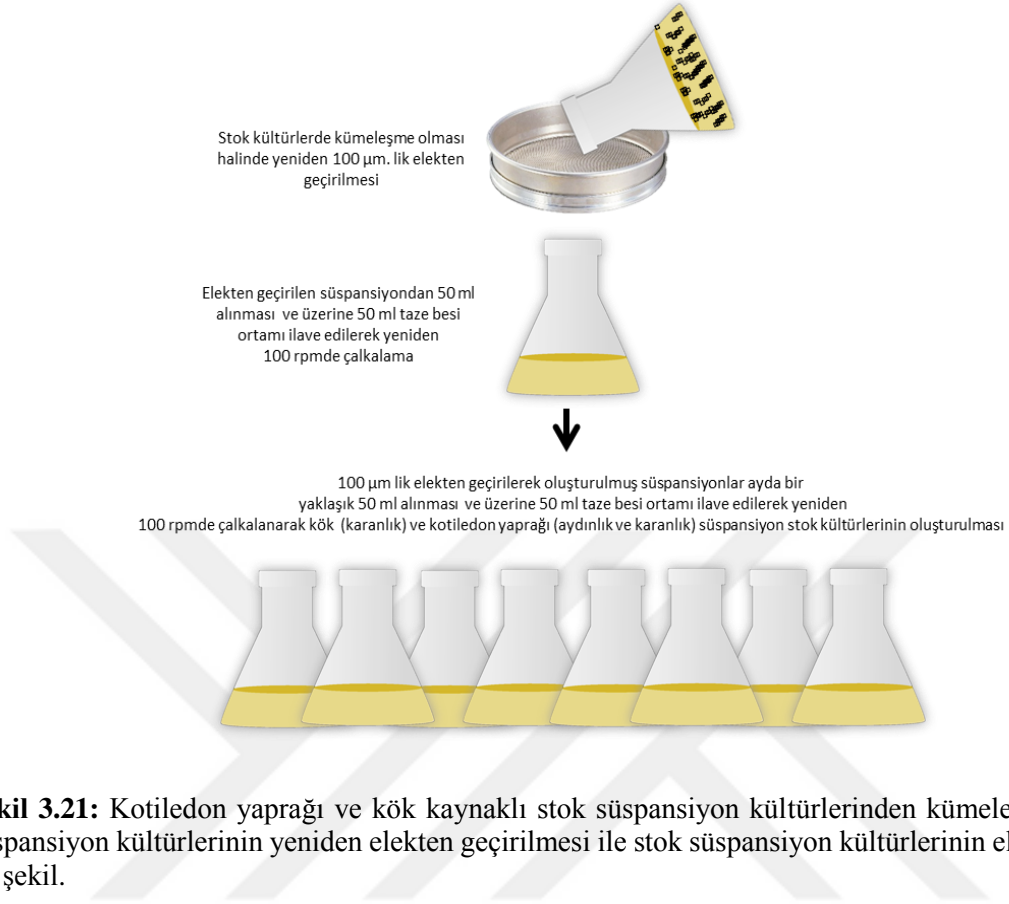
3.2.4.1. başlığı altında ifade edildiği üzere hem kotiledon yaprağı (normal fotoperiyot ve karanlık ortamda inkübasyon) hem de kök (karanlık ortamda inkübasyon) süspansiyon kültürleri başlatıldı ve akabinde elde edilen süspansiyon kültürlerinden stok süspansiyon kültürü elde edilmesi çalışmalarına geçildi. Çalışma kapsamında ilk birkaç alt kültürleme aşaması sürecinde, hücrelerin iyi dağılması için inkübasyon süresi sonunda her ay sırasıyla steril edilmiş 500µm lik, 250 µm lik ve son olarak da 100 µm lik çapa sahip steril çelik eleklerden süzülerek hücrelerin ayrılması sağlandı. Bu çalışmalarda kullanılan besi ortamları, süspansiyon oluşturma çalışmalarında kullanılan besi ortamları ile benzer olacak şekilde ayarlandı. Ayrıca ilgili çalışmaya ait işlemler Şekil 3.20’de sunuldu.

Şekil 3.18’de verildiği üzere, süspansiyon kültürünün başlatıldığı hatlar yaklaşık 1 ay sonra çalkalayıcıdan alınarak 500µm lik elekten geçirildi. Elekten geçirilen süspansiyonlardan 250 ml lik erlenlere 50 ml alınıp üzerine 50 ml taze besi ortamı ilave edilerek kapatıldı ve yeniden yaklaşık bir ay BBO’da 100 rpm ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek süspansiyon kültürleri elde edildi. 500µm lik elekten geçirilen süspansiyon hatları yaklaşık 1 ay sonra çalkalayıcıdan alınarak bu defa 250µm lik elekten geçirildi. Elekten geçirilen süspansiyon kültürlerinden 250 ml lik erlenlere 50 ml alınıp üzerine 50 ml taze besi ortamı ilave edilerek kapatıldı ve yeniden yaklaşık bir ay BBO’da 100 rpm ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek süspansiyon kültürleri elde edildi. 250µm lik elekten geçirilen süspansiyon hatları yaklaşık 1 ay sonra çalkalayıcıdan alınarak bu defa 100µm lik steril elekten geçirildi. Elekten geçirilen süspansiyon kültürlerinden 250 ml lik erlenlere 50 ml alınıp üzerine 50 ml taze besi ortamı ilave edilerek kapatıldı ve yeniden yaklaşık bir ay 25±2 °C BBO’da 100 rpm ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek süspansiyon kültürleri elde edildi. Ayrıca süspansiyon kültürü çalışmalarında her elekten geçirme süreci sonrasında hücrelerin görüntülenmesi Olympus CX41 mikroskopla yapılarak, hücrelerin varlığı, konumu ve düzenleri tespit edildi.

100µm lik elekten geçirildikten sonra oluşturulan süspansiyon kültürleri, her ay 250 ml erlenlere 50 ml kültür 50 ml besi ortamı olacak şekilde alt kültürlenip BBO’da 100 rpm ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde yaklaşık 1 ay inkübe edilerek stok kültürler elde edildi. Seri alt kültürleme sonrası süspansiyonların durumları gözlemlendi, gerektiğinde (kümeleşme var ise) 100µm lik elekten geçirilme işlemleri tekrarlanarak aynı şekilde stok kültür elde etme çalışmalarına devam edildi (Şekil 3.21).



Şekil 3.20: Kotiledon yaprağı ve kök kökenli kalluslardan başlatılan süspansiyon kültürlerinden stok süspansiyon kültürlerin elde edilmesine ait şekil.



Şekil 3.21: Kotiledon yaprağı ve kök kaynaklı stok süspansiyon kültürlerinden kümeleşme gözlenen süspansiyon kültürlerinin yeniden elekten geçirilmesi ile stok süspansiyon kültürlerinin elde edilmesine ait şekil.

3.2.4.3. Süspansiyon Kültürlerinde Optimizasyon Çalışması

Her iki eksplant kaynağı için stok süspansiyon kültürlerinin elde edilmesiyle birlikte, şikonin ve türevleri ile yağ asitlerinin üretilmesi ve miktarını artırılmasına yönelik çalışmalarda, en uygun büyüme koşullarının belirlenmesinde önemli etkenlerden birisi de çalkalama hızıdır. Bu nedenle hem kök hem de kotiledon yaprağı kaynaklı stok süspansiyon kültürlerinden, her bir çalkalama hızı için 5 adet 250 ml erlene alt kültür zamanı gelen süspansiyon hatlarından 50 ml üzerine 50 ml taze besi ortamı ilave edilerek, 90-100-110 rpm farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde BBO'da inkübe edildi. Farklı çalkalama hızları deneme çalışmalarında kotiledon yaprağı süspansiyon kültürleri normal fotoperiyot ve karanlık, kök süspansiyon kültürleri ise karanlık ortamda inkübe edilerek en uygun çalkalama hızı yaş ve kuru ağırlıklar hesaplanarak tespit edilmeye çalışıldı.

3.2.4.4. Süspansiyon Kültürlerinde Büyümenin Karakterizasyonu Çalışması

En uygun, büyüme ortamı ve büyüme koşullarının belirlenmesinin ardından, süspansiyon kültüründe metabolit üretimi ve arttırımı için en uygun elisitasyon zamanının belirlenmesi amacıyla, hem kök süspansiyonları hem de kotiledon yaprağı süspansiyonları için büyüme eğrisi oluşturulması çalışmalarına geçildi.

Çalışmada, kültürün başlangıcı olarak kabul edilen 0. günden itibaren her 7 günde bir 28. güne kadar her deneme için 5 erlen olacak şekilde 250 ml erlene alt kültür zamanı gelen süspansiyon hatlarından 50 ml üzerine 50 ml taze besi ortamı ilave edilerek kültürler hazırlandı. Kotiledon yaprağı süspansiyon hatları karanlık ortamda BBO'da 100 rpm ayarlı çalkalayıcı üzerinde, kök süspansiyon hatları ise yine karanlık ortamda BBO'da 110 rpm ayarlı çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Büyüme eğrisi hesaplanmasında, her zaman diliminde BBO'dan alınan süspansiyon kültürlerinde morfolojik gözlemlerin yanında, örnek alınarak yaş ve kuru ağırlıkları hesaplandı.

3.2.5. Çimlenen Tohumlardan Elde Edilen Köklerden Saçak Kök Kültürlerinin Elde Edilmesi Çalışmaları

3.2.5.1. Tohum Kökenli Köklerden Saçak Kök Kültürlerinin Oluşturma Çalışması

Tez çalışması kapsamında şikonin ve türevlerinin üretilmesi ve sonrasında bazı fiziksel ve kimyasal elisitasyon uygulamalarıyla miktarının arttırılmasında farklı bir kültür tipi olarak saçak kök oluşturma çalışması gerçekleştirildi.

Çimlenmiş tohumlardan elde edilen köklerden saçak kök oluşturma çalışmasında, Chaudhury ve Pal' in 2010 rapor ettikleri çalışma modifiye edilerek gerçekleştirildi. *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 ticari olarak satın alındı. LB [%1 tripton, %0,5 maya özütü, %0,5 NaCl, pH 7,0, (Bertani, 1951)] besi ortamında 28 °C'da inkübe edilerek 24 saatlik taze kültürleri hazırlandı. Bu taze kültürden tek koloni elde etmek amacıyla streak plate yöntemi ile yarı katı LB besi ortamına ekim yapıldı. 24 saat 28 °C' ta inkübe edilen Petri plaklarından alınan tek koloni 5 ml LB sıvı besi ortamında OD 600 oluncaya kadar 28 °C' ta inkübe edildi. Bakteri hücreleri 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Supernatant döküldü ve pelet 100 µM asetosiringon içeren ancak vitamin, sukroz ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen 20 ml sıvı Gamborg 0 besi ortamında süspanse edildi. *In vitro* koşullarda çimlendirilen *E.*

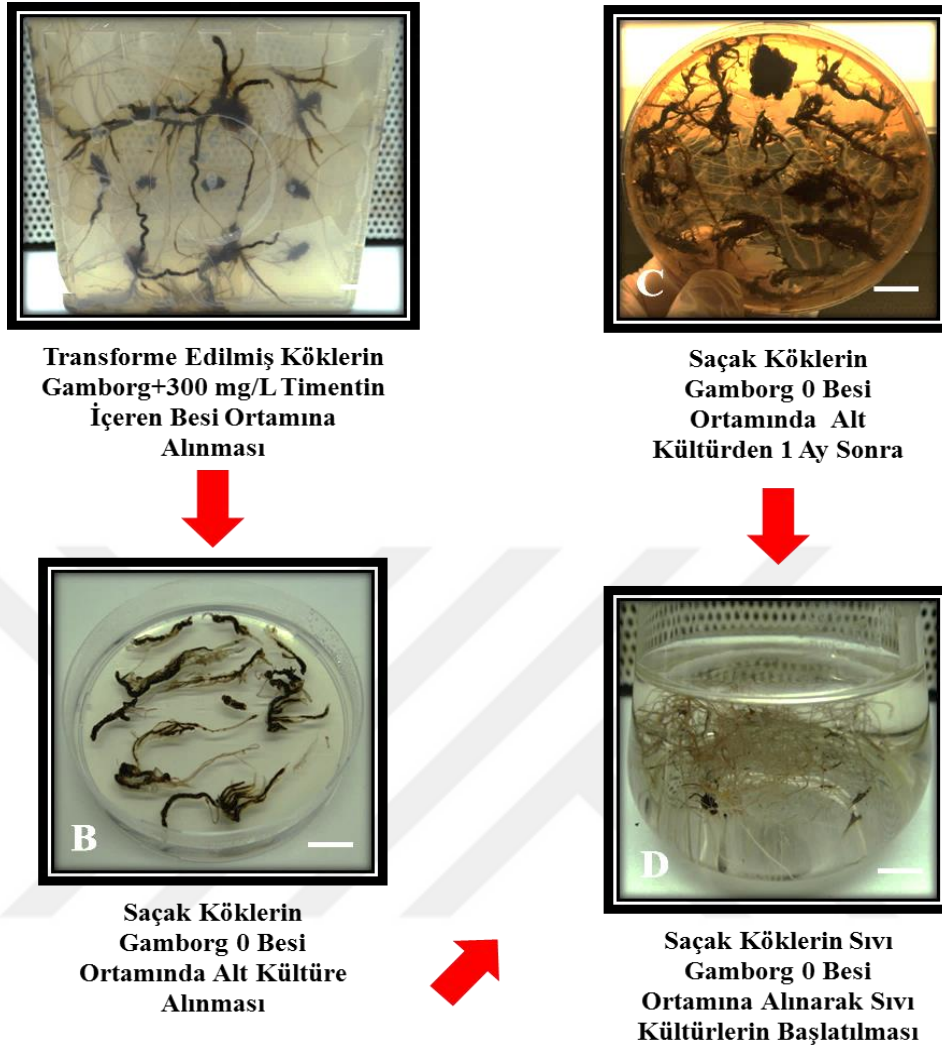
italicum L. tohumlarından oluşan bitkiciklerin kökleri bu süspansiyonun içine aseptik koşullarda aktarıldı ve süspansiyon 100 rpm'de 15-20 dakika çalkalayıcıda çalkalandı. Çalkalanan eksplantlar süspansiyondan çıkartıldı ve steril kabin içinde bitki dokusuna bulaşan fazla bakteriden kurtulmak için steril filtre kağıtlarında bekletildi. Ardından enfekte olan kökler BDD içermeyen Gamborg besi ortamına aktarılarak karanlık ortamda BBO'da inkübe edildi. Saçak kök oluşumları gözlemlendiğinde (yaklaşık 1 Hafta) köklerden *A. rhizogenes* eliminasyonu için belirli bir alt kültür süresince kökler, 300 mg/ml Timentin içeren BDD içermeyen Gamborg besi ortamına aktarılarak karanlık ortamda BBO'da inkübe edildi.

3.2.5.2. Stok Saçak Kök Kültürü Hatları Oluşturma Çalışması

3.2.5.1. başlığında ifade edildiği üzere elde edilen saçak kökleri, alt kültür süreci içerisinde 300 mg/l Timentin içeren BDD içermeyen Gamborg besi ortamına aktarılarak karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süreci sonunda, *A. rhizogenes*'in kültür ortamından tamamen elemine edilene kadar saçak kökleri 300 mg/l Timentin içeren BDD içermeyen Gamborg besi ortamında ayda bir periyotta karanlık ortamda BBO'da inkübasyona devam edildi. *A. rhizogenes*'in kültür ortamından tamamen elemine edilmesinden sonra saçak kökleri yaklaşık ayda bir periyotta timentin içermeyen Gamborg 0 besi ortamında ve karanlık ortamda BBO'da inkübe edilerek stok saçak kök kültürleri elde edildi.

3.2.5.3. Stok Saçak Kök Kültürlerinden Sıvı Ortamda Stok Saçak Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Optimizasyon Çalışması

Şikonin ve türevlerinin üretilmesi ve bazı fiziksel ve kimyasal elisitasyon yöntemleriyle miktarlarının arttırılması çalışmaları sürecinde kullanılmak üzere yarı katı besi ortamlarında çoğaltılan saçak kökleri sıvı ortamda üretilmesi aşamasına geçildi. Çalışmada, yaklaşık 0.5 gr yarı katı besi ortamından alınan saçak kökleri, 250 ml erlenlere aktarılarak üzerine 100 ml sıvı Gamborg 0 besi ortamı ilave edilip, ardından gerekli kapatılma işlemleri gerçekleştirilerek, BBO'da 100 rpm dönme hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde inkübe edilerek sıvı ortamda saçak kök kültürleri başlatıldı (Şekil 3.20).



Şekil 3.22: Sıvı ortamda saçak kök kültürü oluşturma. A) Saçak kökler, B) Saçak köklerin alt kültürünün yapılması, C) Stok saçak kök kültürlerinin elde edilmesi, D) Sıvı saçak kök kültürlerinin oluşturulması (Bar: 0.9 cm).

Her 1 aylık inkübasyon süreci sonunda, sıvı besi ortamda çoğalan saçak kök kültürlerinden belli miktar alınarak benzer şekilde 250 ml erlenlere transfer edildi ve üzerine 100 ml sıvı Gamborg 0 besi ortamı ilave edilip, ardından gerekli kapatılma işlemleri gerçekleştirilerek, BBO'da 100 rpm dönme hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde inkübe edilerek sıvı ortamda stok saçak kök kültürleri elde edildi.

Süspansiyon kültürlerinde gerçekleştirilen çalkalama hızlarına yönelik optimizasyon çalışmalarına benzer çalışma sıvı ortamda saçak kök kültürleri oluşturma çalışmalarında da gerçekleştirildi. Çalışmada sıvı ortamdaki saçak kök kültürlerinden alınan yaklaşık 0.5 gr saçak

kökler 250 ml erlenlere aktarılarak üzerine 100 ml sıvı Gamborg 0 besi ortamı ilave edilip, ardından gerekli kapatılma işlemleri gerçekleştirilerek, BBO'da 90-100-110 rpm dönme hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde inkübe edilerek farklı çalkalama hızlarının saçak kök oluşumuna etkisi tespit edilmeye çalışıldı. Uygulama sonrasında, çalışmaya ait her bir erlen çalkayıcı üzerinden alınarak, morfolojik gözlemler kaydedilerek, yaş ve kuru ağırlıkları hesaplandı.

3.2.5.4. Sıvı Ortamda Saçak Kök Kültürlerinde Büyüme Eğrisi Elde Edilmesi Çalışması

Sıvı ortamda gerçekleştirilen saçak kök kültürleri oluşturma, stok saçak kök kültürleri çalışmaları ve ardından gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonrasında, süspansiyon kültürlerinde gerçekleştirildiği gibi metabolit üretimi ve arttırımı için en uygun elisitasyon zamanının belirlenmesi amacıyla sıvı ortamda saçak kök üretim çalışmalarında büyüme eğrisi çalışması gerçekleştirildi. Çalışmada, her 10 gün için 5'er erlen olmak üzere sıvı ortamdaki saçak kök kültürlerinden alınan yaklaşık 0.5 gr saçak kökler 250 ml erlenlere aktarılarak üzerine 100 ml sıvı Gamborg 0 besi ortamı ilave edilip, ardından gerekli kapatılma işlemleri gerçekleştirilerek, optimizasyon çalışmaları kapsamında en uygun çalkalama hızı olarak tespit edilen 100 rpm dönme hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde BBO'da inkübe edildi. Her 10 günde bir çalışma kapsamında hazırlanan erlenler BBO'dan alınıp 30. güne kadar saçak köklerin büyümesi gözlenerek en uygun elisitasyon uygulama zamanı tespit edilmeye çalışıldı. Büyüme eğrisi hesaplanmasında, belirlenen her zaman dilimi için, çalışmaya ait her bir erlen grubu çalkayıcı üzerinden alınarak, morfolojik gözlemler kaydedildi ve akabinde yaş ve kuru ağırlıkları hesaplandı.

3.2.6. Kök ve Kotiledon Yaprığı Süspansiyon Kültürleri ile Sıvı Ortamdaki Saçak Kök Kültürlerinden Metabolit Üretimi ve Arttırımı İçin Elisitasyon Uygulama Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında, en uygun *in vitro* üretim prosesinin belirlendiği, kotiledon yaprağı ve kök süspansiyon kültürleri ile sıvı ortamdaki saçak kök kültürlerinde bir sonraki aşama, üretilen stok kültürlerde metabolit üretiminin (şikonin ve türevleri ile yağ asitleri) arttırılması amacıyla çeşitli fiziksel ve kimyasal elisitasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında süspansiyon ve saçak kök kültürlerine uygulanan elisitasyon tipi ve miktarı/süresi Tablo 3.7'de sunuldu.

Tablo 3.7’de yer alan kimyasal elisitörler Başlık 3.1.2’de ifade edilen şekilde hazırlanarak; stok süspansiyon kültürlerinden, 250 ml erlene 50 ml süspansiyon kültürü üzerine 50 ml uygun besi ortamı (Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürleri için; 2 mg/l Kin ve 0.2 mg/l 2,4-D destekli LS, Kök süspansiyon kültürleri için; Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürleri için; 2 mg/l Kin ve 0.2 mg/l IAA destekli LS) ilave edilerek, sıvı ortam saçak kök kültürleri için; 250 ml erlene yaklaşık 0.5 gr saçak kök alınarak üzerine BBD içermeyen Gamborg besi ortamı ilave edildi. Hazırlanan kültürler daha sonra gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları kapsamında (Kotiledon yaprağı süspansiyon ve sıvı ortam saçak kök kültürleri 100 rpm, kök süspansiyon kültürleri 110 rpm hızında) tespit edilen hızlara ayarlı çalkalayıcılar üzerinde karanlık ortamda BBO’da inkübe edildi. Akabinde büyüme eğrisi çalışmalarında tespit edilen büyüme fazı sonunda Tablo 3.7’de sunulan elisitasyonlar ilgili zaman dilimlerinde uygulandı.

Tablo 3.7: *In vitro* kültürlerine uygulanan elisitasyon tip, miktar ve zaman tablosu.

Kültür Tipi	Kotiledon Yaprakçı Süspansiyon				Saçak Kök Kültürü				Kök Süspansiyon				
	Uygulama Zamanı (Saat)				Uygulama Zamanı (Saat)				Uygulama Zamanı (Saat)				
	0	12	24	48	0	12	24	48	0	12	24	48	
Kontrol	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	
Soğuk (+4°C)		X	X	X		X	X	X					
ABA (0.1 mg/l)		X	X	X		X	X	X					
ABA (0.5 mg/l)		X	X	X		X	X	X					
DMSO (%0.1)		X	X	X		X	X	X					
DMSO (%0.2)		X	X	X		X	X	X					
MeJA (5 µM)		X	X	X		X	X	X				X	
MeJA (10 µM)		X	X	X		X	X	X				X	
Maya Özütü (100 mg)												X	
Maya Özütü (200 mg)												X	
AgNO ₃ (4 mg)												X	
AgNO ₃ (8 mg)												X	

Tablo 3.7’ de ifade edilen çalışmalar sonrasında uygulama kapsamında yapılan her çalışma grubu için erlenlerdeki kültürlerle yönelik morfolojik ve sayısal gözlem gerçekleştirildi.

Elisitasyon uygulaması sonrası, süspansiyon kültürlerinde morfolojik gözlem sonrasında yaş ve kuru ağırlık hesaplandı. Morfolojik ve sayısal gözlem sonrasında geriye kalan örnekler, kaba filtre kağıtlarından geçirilerek besi ortamı uzaklaştırıldı ardından, oda sıcaklığında karanlık ortamda kurutularak metabolit tipi ve miktarı analizleri için saklandı.

Elisitasyon uygulaması sonrası sıvı ortamdaki saçak kök kültürlerinde morfolojik gözlem sonrasında yağ ve kuru ağırlık hesaplandı. Kuru ağırlıkları tespit edilen saçak kökler metabolit tipi ve miktarı analizleri için saklandı.

3.2.7. *In vivo* Bitki Kısımlarından ve *In vitro* Kültür Uygulamalarında Şikonin ve Türevlerinin ile Yağ Asidi Tipi ve Miktarlarının Belirlenmesi Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında, Tablo 3.1 (Kök) ve Tablo 3.2 (Tohum) kapsamındaki yer alan örneklerden analiz için yeterliliği göz önünde bulundurularak, şikonin ve türevleri ile yağ asidi tipi ve miktarları tespit edildi.

3.2.7.1. *In vivo* ve *In Vitro* Kök Örneklerinden (Kök Süspansiyon ve Saçak Kök Kültürleri) Şikonin ve Türevlerinin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması

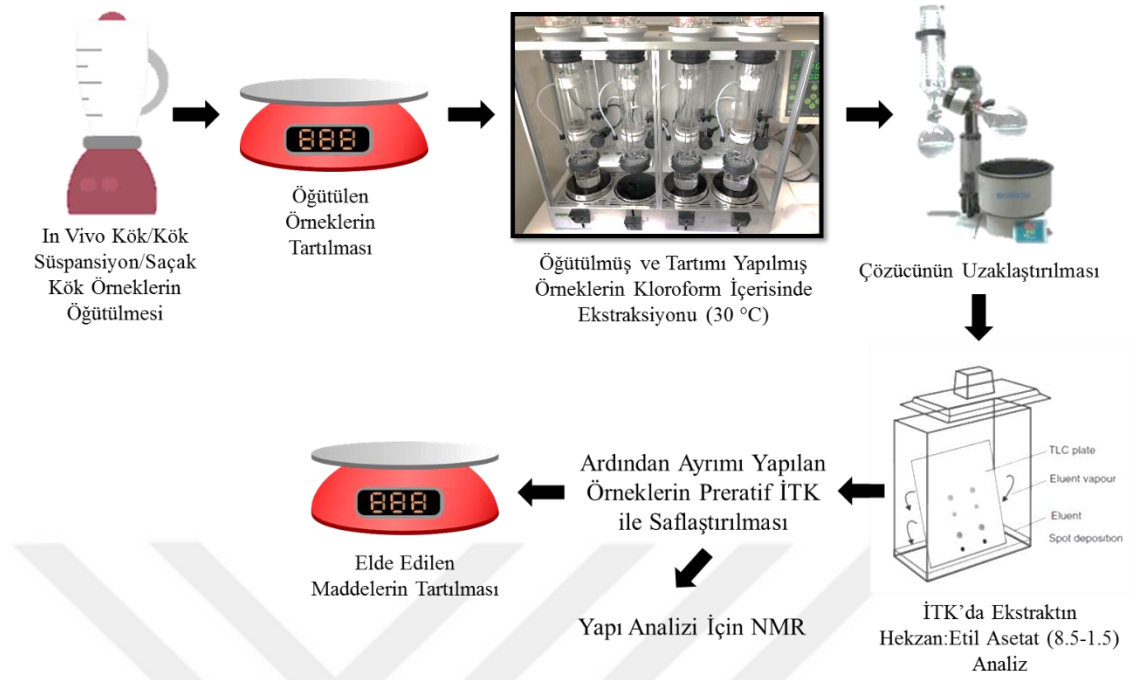
Tablo 3.1’de yer alan ve tür tespiti yapılmış olan *Echium* cinsine ait türlerden analiz için yeteri kadar kök elde edilen örnekler (Tablo 3.8) ile, Başlık 3.2.6 kapsamındaki çalışmalardan (Kök Süspansiyon ve Sıvı Ortam Saçak Kök Kültürü Elisitasyon Çalışmaları) elde edilen örneklerden şikonin ve türevlerinin tespiti ve miktarlarının belirlenmesi için; analizi yapılacak yeteri kadar örnek (~1 gr) tartıldı, tartım sonrası örnekler sırayla kloroformda ekstrakte edildi. Evaporatör kullanımı yapılarak kloroform uzaklaştırıldı. Kloroform uçurulduktan ekstrakt diklorometanda bırakıldı. Ardından Hekzan:Etil Asetat (8.5:1.5) çözücü sisteminde İTK ile analiz yapıldı. Gerekli madde miktarına ulaşılmasının ardından Hekzan:Etil Asetat (8.5:1.5) sistemiyle preparatif İTK kullanılarak maddeler saflaştırıldı ve tartımları yapılarak oranlar hesaplandı. Örneklerden madde miktarı tespiti yapılırken, analize alınan örnek miktarına göre elde edilen miktarlar arasında oranlama yapıldı.

Prepartif İTK sonrasında saflaştırılan maddelerin tanımlaması standartlara göre yapılırken, gerçek yapılarının tanımlanması için yüksek oranda materyel üretilerek (saçak kök) NMR da yapı analizi gerçekleştirildi.

Ayrıca, gerçekleştirilen çalışmaya ait şekil Şekil 3.23’ de sunuldu.

Tablo 3.8: Doğal ortamda yetişen *Echium* cinslerinden elde edilen kuru kök miktarları ve lokalite bilgileri.

Örnek No	Tür İsmi	GPS Kodu	Yükseklik (Metre)	Konum	Kuru Kök Miktarı (gr)
Ö2	<i>E. italicum</i>	41°40'45" K 27°02'48" D	132	Edirne-Kırklareli Yolu İnece Mevki	2.97
Ö3	<i>E. italicum</i>	41°24'59" K 27°13'14" D	52	Lüleburgaz Sarıcaali Köyü Taşköprü Mevki	3.34
Ö4	<i>E. italicum</i>	41°05'23" K 27°44'45" D	63	Çorlu Yenice Mevki (Tekirdağ)	2.24
Ö6	<i>E. italicum</i>	40°38'50" K 26°50'33" D	12	Gelibolu-Çanakale	3.30
Ö7	<i>E. plantagenium</i>	40°09'19" K 26°27'26" D	73	Çanakale Otobüs Terminali	10.11
Ö9	<i>E. vulgare</i>	40°36'45" K 35°05'40" D	1080	Çorum-Merzifon Yolu 10. Km	3.22
Ö10	<i>E. vulgare</i>	40°43'53" K 39°38'10" D	791	Maçka Sümela Manastırı Yolu (Trabzon)	0.96
Ö11	<i>E. vulgare</i>	41°22'49" K 41°35'40" D	202	Borçka-Hopa Yolu 10. Km (Artvin)	3.63
Ö12	<i>E. vulgare</i>	40°43'8" K 39°31'15" D	850	Trabzon Hamsikök 10. Km	5.37
Ö13	<i>E. vulgare</i>	41°6'18" K 39°24'47" D	15	Trabzon-Giresun Yolu Çarşıbaşı Mevki	2.45
Ö14	<i>E. vulgare</i>	41°9'39" K 37°5'6" D	7	Ordu-Terme Yolu Sakarlı Mevki	4.91
Ö15	<i>E. vulgare</i>	41°13'15" K 36°50'57" D	14	Terme-Samsun Yolu Dal Bahçe Mevki	5.98
Ö18	<i>E. vulgare</i>	41°16'1" K 33°22'11" D	792	Kastamonu-Karabük Yolu Gemi Mevki	7.06
Ö19	<i>E. vulgare</i>	41°16'1" K 33°22'11" D	792	Kastamonu-Karabük Yolu Gemi Mevki	2.74
Ö20	<i>E. vulgare</i>	41°9'31" K 32°27'46" D	213	Karabük-Zonguldak Yolu Şahinkaya Tüneli Yenice Mevki	3.73
Ö24	<i>E. italicum</i>	38°52'59" K 40°52'34" D	1200	Bingöl Üniversitesi-Bingöl	14.6



Şekil 3.23: Örneklerden şikonin ve türevlerinin tespitine ve miktar tayinine yönelik şekil.

3.2.7.2. Tohum ve In Vitro Kotiledon Yaprığı Süspansiyon Kültürlerinde Toplam yağ ve Yağ Asidi Miktarlarının Tespiti Çalışmaları

Tablo 3.2’de yer alan örnekler üzerinden doğu batı kuzey güney ile farklı yüksekliklerden toplanan tohum (3 gr) (Tablo 3.9) ve kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine yönelik çalışmalarda kullanılan örnekler (1 gr), öğütücüden geçirilerek tartıldı (W1). Soxhlet ekstraksiyon sisteminde yer alan numune kaplarının darası (W2) alındı. Ardından, soxhlet sisteminde yer alan kartuşlara alınan örnekler, toplama kaplarına 100 ml hekzan bırakılarak sistem 4 saat ekstraksiyon, 30 dakika yıkama ve 45 dakika kurutmaya programlanarak çalıştırıldı. Ekstraksiyon sonrasında toplama kabında elde edilen yağdan hekzan kalıntısı olmaması için çeker ocakta bekletildi. Hekzanın uçtuğundan emin olduktan sonra toplama kabı yeniden tartılarak (W3) oluşan yağ miktarı ve yağ yüzdeleri $\% \text{Oil} = [(W3 - W2)/W1] \times 100$ eşitliği kullanılarak hesaplandı.

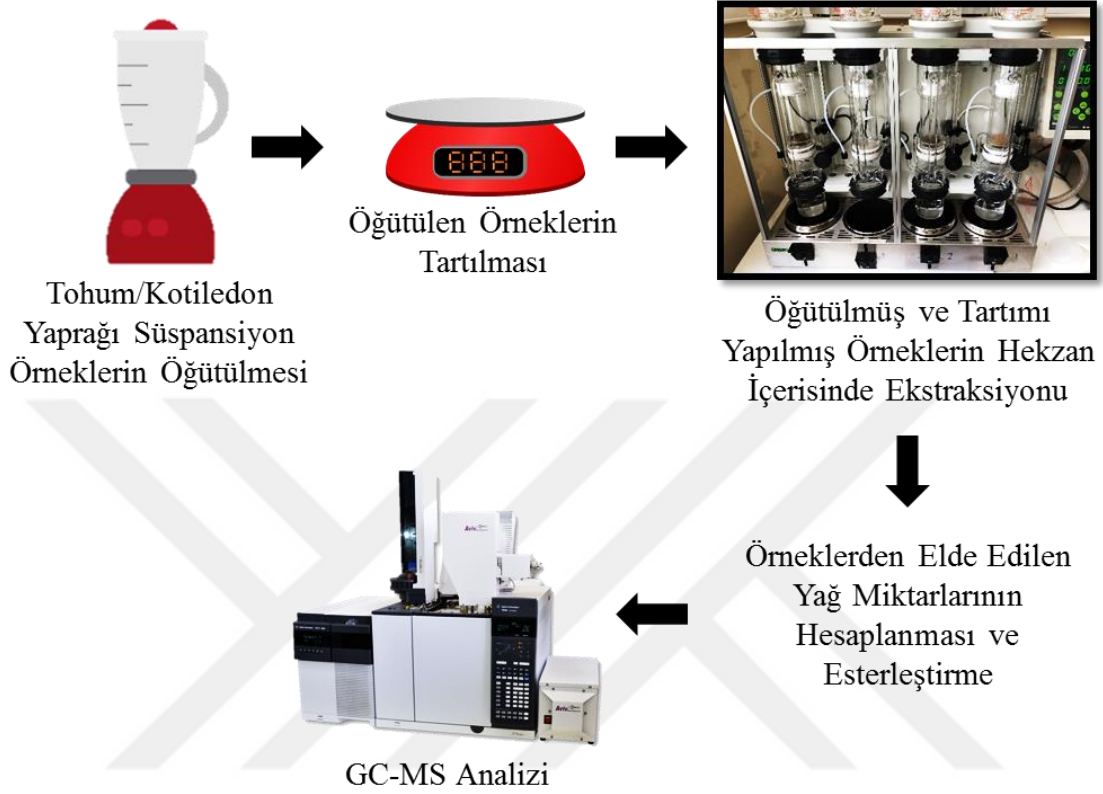
Örneklerden elde edilen yağların analizi için metil esterleri oluşturuldu. 100 mg'lık örnek 20 mL'lik bir deney tüpünde tartıldı. Örnek 10 ml'lik hekzanda çözüldü. Metanol içerisine 100 µL'lik 2N potasyum hidroksit (100 mL'de 11.2 g) eklendi. 30 sn süreyle vortekslendi ve

santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alındı. Standartlar için hazır metil ester formları satın alındı. Yağ asitleri metil esterleri standardı olarak Supelco 18919 (Standart C4-C24 yağ asitlerini içerir ve %2- %4 nispi konsantrasyona sahiptir) kullanıldı. Bu karışım 100 mg'lık saf karışım halinde elde edildi. Kullanımdan önce örneğin tamamı 10 ml' lik heksanda seyreltilmiştir. Standart 3 farklı konsantrasyonda cihazda analiz edilerek standartize edilmiştir. Ardından GC-MS sisteminde analiz edilmiştir.

Tablo 3.9: Doğal ortamda yetişen *Echium italicum* türlerinden elde edilen tohumlar ve lokalite bilgileri.

Örnek No	Aksesyon	Tür İsmi	GPS Kaydı	Yükseklik (Metre)	Konum
Ö1.1	A1	<i>E. italicum</i>	40°27'46" K 26°40'43" D	21	Gelibolu-Çanakkale
Ö2.1	C2(a)	<i>E. italicum</i>	37°07'51" K 28°22'29" D	655	Muğla-Ula Yolu
Ö3.1	C2(b)	<i>E. italicum</i>	36°48'48" K 29°18'48" D	1220	Fethiye-Korkuteli Yolu
Ö4.1	B3	<i>E. italicum</i>	38°01'10" K 30°57'35" D	937	Eğridir-Gelendost Yolu
Ö6.1	A6	<i>E. italicum</i>	41°02'10" K 35°54'29" D	722	Samsun Bolu Yolu
Ö7.1	A5	<i>E. italicum</i>	41°37'46" K 34°36'03" D	377	Boyabat-Hanönü Yolu
Ö9.1	B8	<i>E. italicum</i>	38°52'59" K 40°52'34" D	1200	Bingöl Üniversitesi-Bingöl
Ö10.1	B9 (a)	<i>E. italicum</i>	38°52'59" K 40°52'34" D	1511	Bitlis Baykan Yolu
Ö11.1	B9 (b)	<i>E. italicum</i>	38°28'57" K 42°10'15" D	1800	Bitlis Tatvan Yolu

Örneklere yağ asidi elde edilmesine yönelik şekil Şekil 3.24’de ile GC-MS koşulları Tablo 3.10’da sunuldu.



Şekil 3.24: Örneklerden yağ eldesine, tiplerinin ve miktarlarının belirlenmesine yönelik diagram.

Tablo 3.10: GC-MS cihazı bilgileri ve deney koşulları

Kromatografik Sistem	Agilent 6890 GC
Inlet	Split
Detektör	5973 MSD
Autosampler	Agilent 7683
Liner	Split liner (p/n 5183-4647)
Kolon	60 m x 0.25 mm ID, 0.15 µm DB-23 (J&W 122-2361)
Deney Koşulları	
İnlet Sıcaklığı	250°C
Enjeksiyon Hacmi	1 µL
Split Oranı	1/50
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Basınç	230 kPa devamlı basınç (50°C'de 33 cm/s)
Fırın Sıcaklığı	50°C, 1 dk, 25°C/dk ila 175°C, 4°C/dk ila 230°C, 5 dk.
Detektör Sıcaklığı	280°C
Detektör Gazları	Helyum takviye gaz 30 mL/dk.

3.2.8. *In Vitro* Kùltürlerden Elde Edilen Ekstraktlardan Antikanser Aktivite Belirlenmesi Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında sıvı ortamda saçak kök kùltürlerine uygulanan fiziksel ve kimyasal elisitasyon sonrasında, kontrol gruplarına göre 10 μ M MeJA nın 24 saat uygulamasının gerçekteştirildiği örneklerde yüksek miktarda şikonin türevlerinin (En Yüksek Artış Türev 3: İzovaleril/2 Metilbütüiril şikonin) olduğu tespit edildi. Preperatif İTK sonrası elde edilen Türev-3 doz ve zamana bağlı proliferasyon analizleri meme kanseri hücrelerinde değerlendirildi. Türev-3'ün kanser hücrelerinde etkisinin tespiti için, metastatik olmayan Luminal tip meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ve kemoterapiye dirençli, metastatik karakterli bazal tip MDA-MB-231 hücre hatları kullanıldı. Proliferasyon analizleri gerçekte zamanlı impedansa dayalı ölçüm yapan Xcelligence cihazında (Real Time Cell Analyzer-ACEA) 80 saat süreli olarak ve her 15 dakikada bir hücre indeksinin ölçümü kayıt edilerek, hücrelerin analizi gerçekteştirildi. Madde uygulanmasından 24 saat önce MCF-7 hücreleri 10×10^3 hücre/kuyu ve MDA-MB-231 7500 hücre/kuyu olarak ekildi. Hücrelerin yapışmasını takiben 24. saatte Türev-3 kuyulara sadece besiyeri içeren kontrol, besiyeri ve en yüksek konsantrasyona sahip Türev-3 içerdeği konsantrasyonda (1/5000) DMSO içeren kontrol besiyeri ve 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 μ M final konsantrasyonlarda Türev-3 içeren besiyerleri hücrelere eklendi. Türev-3 uygulamasına bağlı hücre proliferasyonundaki değişim kontrol grubuna göre belirlendi.

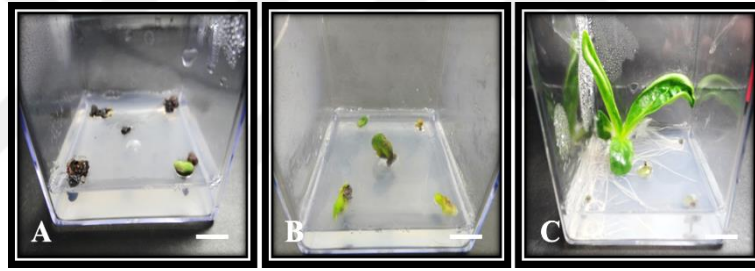
3.2.9. İstatistiksel Analizler

Tez kapsamında gerçekteştirilen çalışmalar, tesadüf blokları deneme desenine göre yapıldı. Elde edilen sonuçlardaki değerkenlikleri tespit etmek için analizler SPSS 19.0 paket programı kullanılarak gerçekteştirildi. İlgili iş paketi kapsamındaki çalışmalarda elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için veriler ANOVA programına yüklendi. Gerçekteştirilen çalışmalar arasındaki farklar $P < 0.05$ seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, oransal veriler ise, Ki kare (χ^2) testi ile hesaplandı.

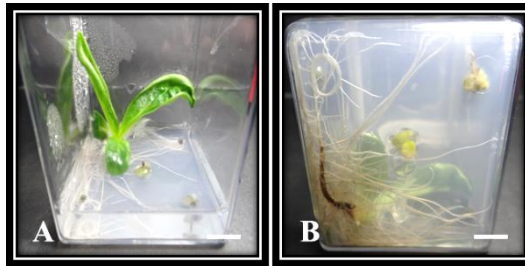
4. BULGULAR

4.1. TOHURLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU ve ÇİMLENDİRİLMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Tohumların yüzey sterilizasyonunda Kılınç ve arkadaşlarının 2015 yılında rapor ettikleri çalışmada başarılı bir şekilde sonuç veren protokol kullanıldı. 3.2.2. başlığı altında ifade edilen sterilizasyon protokolü dış sert kabuğu (perkarp ve testa) bulunan, dış sert kabuğu çatlatılmış ve dış sert kabuktan arındırılmış tohumlara uygulandı. Tohumlar çimlenme için herhangi bir BBD içermeyen MS besisi ortamına ekilerek, BBO'da inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca tohumların gelişimi izlendi. Yaklaşık bir ay sonra tohumların çimlenmesi ile ilgili morfolojik gözlemler alınarak Şekil 4.1'de, sayısal veriler alınarak istatistiksel olarak hesaplandı ve Tablo 4.1'de sunuldu.



Şekil 4.1: BBD içermeyen MS besisi ortamına aktarılan A) kabuklu, B) kabuğu çatlatılmış ve C) kabuksuz tohumların inkübasyonu sonrası çimlenen tohumların görüntüleri (Bar: 1cm).



Şekil 4.2: A) Çimlenmiş tohumlar ve B) çimlenmiş tohumlara (2.5 haftalık) ait köklerin görüntüleri. (Bar: 1cm).

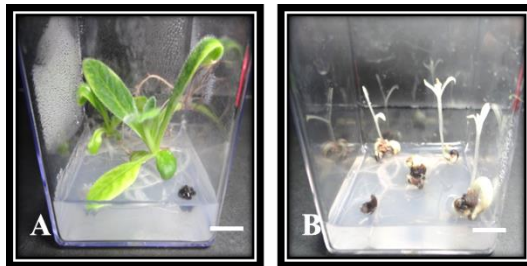
Tablo 4.1: Farklı tipte ekilen tohumların çimlenmeye etkisi.

Ekilen Tohum Tipi	Enfeksiyon Yüzdeleri (%)	Çimlenme Yüzdeleri (%)
Kabuklu	15.00 a	10.00 c
Kabuğu Çatlatılmış	10.00 b	25.00 b
Kabuksuz	5.00 c	95.00 a

*Her bir denemede 50 adet tohum kullanılmış ve 3 defa tekrar edilmiştir.

Tablo 4.1 irdelendiğinde, uygulanan sterilizasyon metodunun her üç tohum tipi için de uygun olduğu tespit edilirken, kabuksuz tohumda diğer tohum tiplerine göre en az oranda (%5) enfeksiyon hesaplandı. Çimlenme yüzdeleri değerlendirildiğinde, sert kabuğundan arındırılmış olan tohumların çimlenme oranı (%95) diğer tohum tiplerine göre belirgin düzeyde yüksek olarak hesaplandı. Bununla birlikte, kabuksuz tohumlarda çimlenmenin, tohumların besi ortamına ekimi itibariyle yaklaşık 1 hafta içinde başladığı tespit edildi. Morfolojik olarak irdelendiğinde ise, kabuklu ve kabuğu çatlatılmış olan tohumda her ne kadar çimlenme gözlenirse de, gelişimin yavaş olduğu kabuksuz tohumlarda ise çimlenme güçlü olurken çimlenen tohumlardan yüksek oranda kök oluştuğu tespit edildi.

Farklı uygulama tiplerinin çimlenme üzerine olan etkisi gözlemlenirken, ışığın çimlenme üzerine etkisi araştırıldı. Kabuğu kırılmış olan tohumların, Kılınç ve arkadaşlarının 2015’de ve Tilkat ve arkadaşlarının 2018’de tohum sterilizasyonunda kullandıkları metotla yüzey sterilizasyonu gerçekleştirildi. Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar BBD içermeyen MS besi ortamına ekilerek, BBO’da inkübe edildi. Yaklaşık bir ay sonra tohumların çimlenmesi ile ilgili morfolojik gözlemlere dayanarak (Şekil 4.3’de), sayısal veriler alınıp istatistiksel olarak hesaplandı ve Tablo 4.2’de sunuldu.



Şekil 4.3: A) Normal fotoperiyot ve B) karanlık ortamda inkübe edilen tohumların çimlenmesine ait görüntüler (Bar: 1cm).

Tablo 4.2: Işığın çimlenmeye etkisi.

Çimlenme Ortamı	Enfeksiyon Yüzdesi (%)	Çimlenme Yüzdesi (%)
Normal Fotoperiyot	5.00 a	95.00 a
Karanlık	5.00 a	90.00 a

*Her bir uygulamada 50 adet tohum kullanıldı ve 3 defa tekrar edildi.

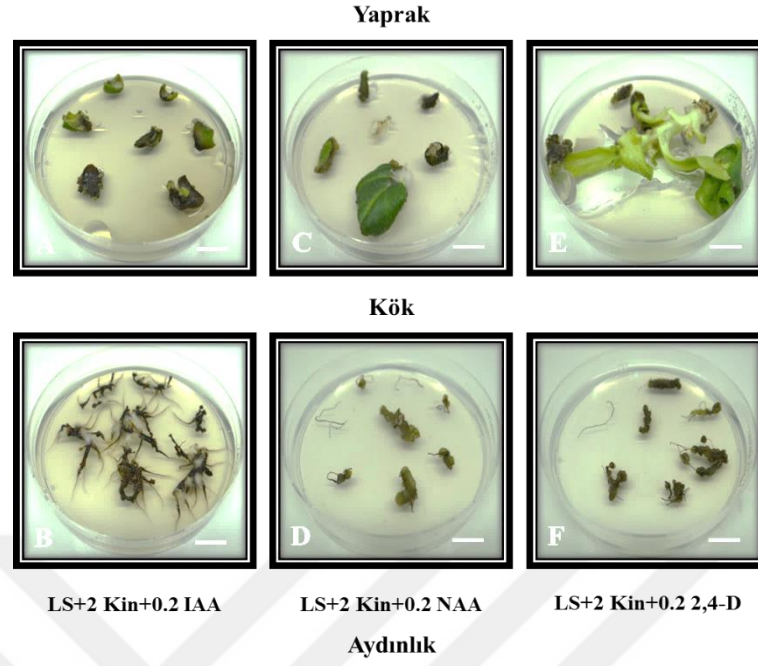
Tablo 4.2. irdelendiğinde, hem karanlıkta hem de normal fotoperiyotta çimlendirilen tohumlarda enfeksiyon yüzdesi (%5) benzerlik gösterirken, çimlenme oranında ise karanlıkta %90, normal fotoperiyotta ise %95 olarak hesaplanırken, çimlenme yüzdelerinde istatistiksel bir fark gözlenmedi. Morfolojik olarak irdelendiğinde, karanlıkta ve normal fotoperiyotlu ortamda her ne kadar çimlendirme yüzdelerinde istatistiksel olarak benzerlik vardır. Karanlıkta çimlenen tohumlardan elde edilen bitkilerde kotiledon yaprağı rejenerasyonu gözlenmezken, aynı zamanda etiyole bitkiler elde edildi. Yağ asidi üretimi çalışmalarında, kotiledon yaprağından elde edilecek kalluslar kullanılacağından, tohumların çimlendirme çalışmalarının normal fotoperiyotta gerçekleştirilmesine karar verildi.

4.2. ÇİMLENDİRİLEN TOHUMLARDAN ELDE EDİLEN KÖK VE KOTİLEDON YAPRAĞI EKSPANTLARINDAN KALLUS OLUŞTURULMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

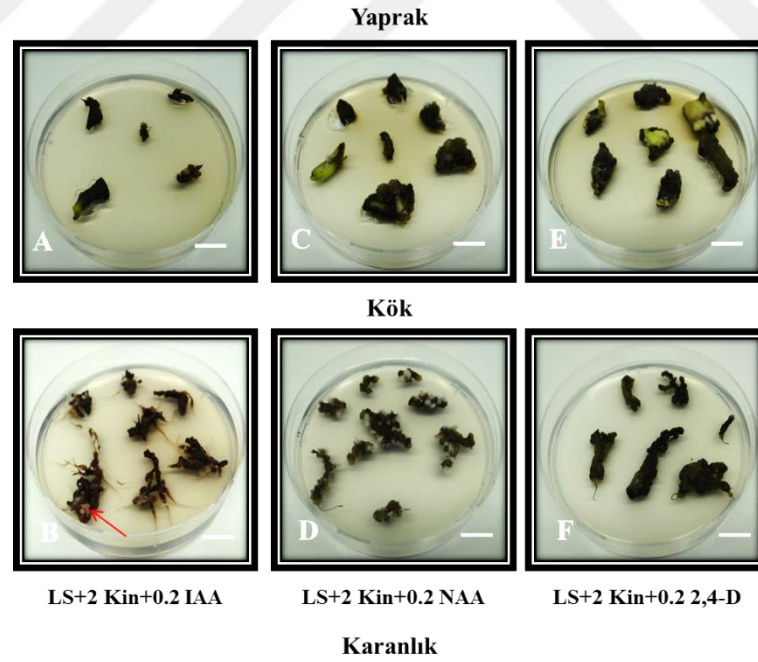
4.2.1. Kök ve Kotiledon Yaprağı Eksplantlarının BBD Destekli Farklı Besi Ortamlarında ve Normal Fotoperiyot ile Karanlık Koşullarda İnkübasyonu Sonrası Kallus Oluşturma Çalışmaları

Uygun besi ortamı ve koşullarda çimlendirilen tohumlardan elde edilen kök ve kotiledon yaprağı eksplantları Tablo 3.6.' ifade edilen besi ortamlarına transfere edilerek, karanlık ve normal fotoperiyoda ayarlanmış BBO'da inkübe edildi.

Köklerin ve kotiledon yapraklarının BBO'da yaklaşık bir ay sonraki inkübasyonu ardından, kallus oluşumu ile ilgili morfolojik gözlemler alınarak, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.1, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15,'de, sayısal veriler alınarak istatistiksel olarak hesaplandı ve Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8, Tablo 4.9, Tablo 4.10, Tablo 4.11, Tablo 4.12, Tablo 4.13 ve Tablo 4.14'de sunuldu.



Şekil 4.4: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli LS besi ortamında ve normal fotoperiyod koşullarında kallus oluşumu. (Bar: 1cm).



Şekil 4.5: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli LS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu. Kırmızı ok pigmentli kallus (Bar: 1cm).

Tablo 4.3: LS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.

Besim Ortamı Tipi (mg/l)	Kallus (%)							
	Normal Fotoperiyot				Karanlık			
	Pigmentsiz		Pigmentli		Pigmentsiz		Pigmentli	
	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı
LS+2 Kin+0.2 IAA	55c	40c	-	-	30c	100a	70a	-
LS+2 Kin+0.2 NAA	75b	80b	-	-	70b	70b	10b	-
LS+2 Kin+0.2 2,4-D	85a	100a	-	-	90a	100a	10b	-

Her denemede ortalama 20 eksplant kullanıldı.

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 ile Tablo 4.3'ü irdelendiğinde, farklı BBD kombinasyonu (2,4-D hariç) destekli LS besi ortamında normal fotoperiyotta inkübe edilen eksplantlardan elde edilen kalluslar genel olarak sert, karanlık ortamda inkübe edilen eksplantlardan ise az sert iyi kırılğan tipte kallus oluşumu gözlemlendi. Genel olarak 2,4-D destekli LS besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen eksplantlardan ise yumuşak tipte kallus oluşumu gözlemlendi. Pigmentli kallus oluşumu IAA, NAA ve 2,4-D destekli LS besi ortamında ve karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında gözlenirken, farklı BBD kombinasyonları destekli LS besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlıkta inkübe edilen hem kök hem de kotiledon yaprağı eksplantlarında ise pigmentsiz kallus oluşumu gözlemlendi. Bununla birlikte, LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında ve normal fotoperiyotlu ortamda inkübe edilen kotiledon yapraklarından bitki rejenerasyonu meydana geldiği gözlemlendi. Ayrıca, LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında ve normal fotoperiyotta, LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA ve LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamlarında ve karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında tüysü kök oluşumu gözlemlendi. Kallus oluşumuna yönelik elde edilen sayısal veriler istatistiki olarak değerlendirildiğinde;

Normal fotoperiyot ortamında;

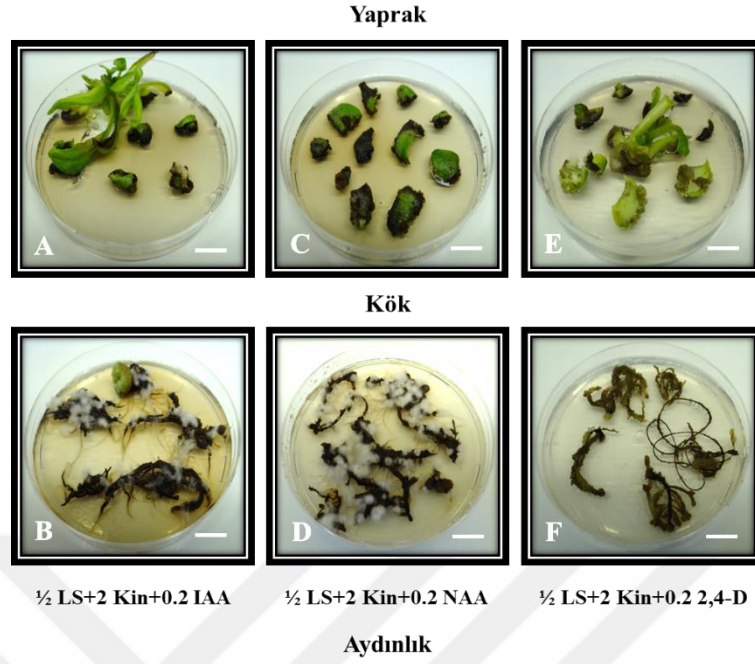
Hem kök hem de kotiledon yaprağı eksplantlarından pigmentli kallus üretimi gözlenmedi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%55-%40), LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%75-%80), LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%85-%100) olarak hesaplandı. BBD destekli LS besi ortamlarında inkübe edilen kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarından kallus oluşumları arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

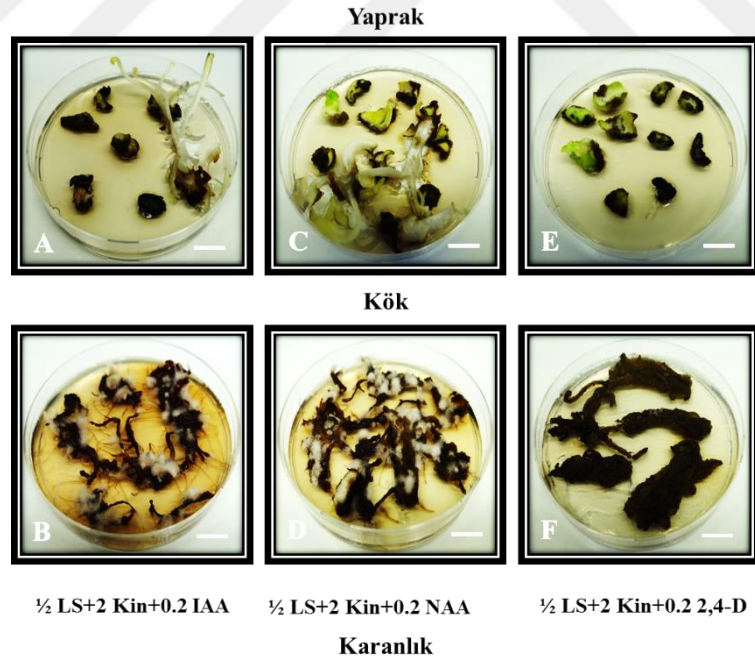
Karanlık ortamda:

Pigmentli kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%70-%0), LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%12-%0), LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%10-%0) hesaplandı. Kök eksplantlarının NAA ve 2,4-D destekli LS besi ortamlarında inkübasyon sonrası kallus oluşumu ile IAA destekli LS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA destekli besi ortamında (%30-%100), LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA destekli besi ortamında (%70-%70), LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D destekli besi ortamında (%90-%100) olarak hesaplandı. Kök eksplantlarının BBD destekli LS besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının IAA ve 2,4-D destekli LS besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile NAA destekli LS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.



Şekil 4.6: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli $\frac{1}{2}$ LS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu. (Bar: 1cm).



Şekil 4.7: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli $\frac{1}{2}$ LS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).

Tablo 4.4: ½ LS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.

Besin Ortamı Tipi (mg/l)	Kallus (%)							
	Normal Fotoperiyot				Karanlık			
	Pigmentsiz		Pigmentli		Pigmentsiz		Pigmentli	
	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı
½ LS+2 Kin+0.2 IAA	65b	75a	-	-	100a	25c	50a	15b
½ LS+2 Kin+0.2 NAA	100a	65b	-	-	100a	50b	25b	25a
½ LS+2 Kin+0.2 2,4-D	100a	65b	-	-	100a	90a	-	-

Her denemede ortama 20 eksplant kullanıldı.

Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 ile Tablo 4.4'ü irdelendiğinde, farklı BBD kombinasyonları (2,4-D hariç) ½ LS besi ortamında normal fotoperiyotta inkübe edilen eksplantlardan elde edilen kalluslar genel olarak sert, karanlık ortamda inkübe edilen eksplantlardan ise orta sert tipte ve az kırılabilir kallus oluşumu gözlemlendi. 2,4-D destekli ½ LS besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen eksplantlardan ise yumuşak tipte kallus oluşumu gözlemlendi. Pigmentli kallus oluşumu IAA ve NAA destekli ½ LS besi ortamında ve karanlık ortamda inkübe edilen kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarında gözlenirken, farklı BBD kombinasyonları destekli ½ LS besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlıkta inkübe edilen hem kök hemde kotiledon yaprağı eksplantlarında ise pigmentsiz kallus oluşumu gözlemlendi. Bununla birlikte, IAA ve 2,4-D destekli ½ LS besi ortamında ve normal fotoperiyotlu ortamda ile IAA ve NAA destekli ½ LS besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen kotiledon yapraklarından bitki rejenerasyonu meydana geldiği gözlemlendi. Ayrıca, IAA ve NAA destekli ½ LS besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında tüysü kök oluşumu gözlemlendi. Kallus oluşumuna yönelik elde edilen sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

Normal fotoperiyot ortamında;

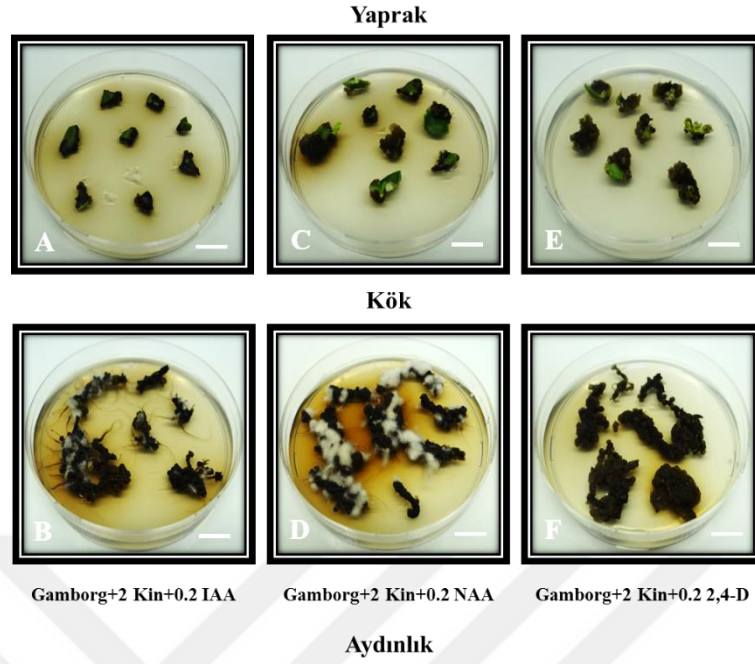
Hem kök hemde kotiledon yaprağı eksplantlarından pigmentli kallus üretimi gözlemlenmedi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%65-%75), ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%100-%65), ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%100-%65) olarak hesaplandı. Kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarının NAA ve 2,4-D destekli ½ LS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile IAA destekli ½ LS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

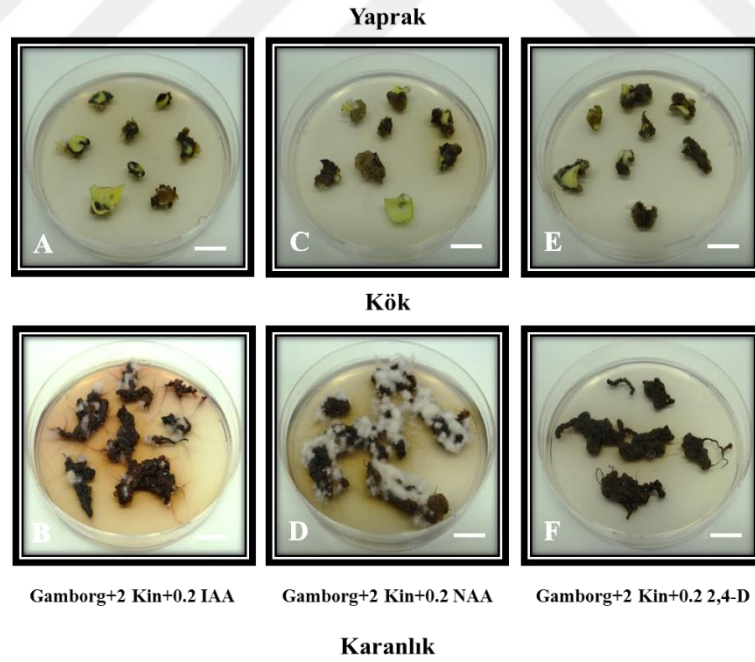
Karanlık ortamda:

Pigmentli kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%50-%15), ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%25-%25), ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%0-%0) hesaplandı. Kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarının IAA ve NAA destekli besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA destekli besi ortamında (%0-%25), ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA destekli besi ortamında (%100-%50), ½ LS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D destekli besi ortamında (%100-%90) olarak hesaplandı. Kök eksplantlarının BBD destekli besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmezken, kotiledon yapraklarının BBD destekli besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.



Şekil 4.8: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli Gamborg besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu (Bar: 1cm).



Şekil 4.9: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli Gamborg besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).

Tablo 4.5: Gamborg besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.

Besin Ortamı Tipi (mg/l)	Kallus (%)							
	Normal Fotoperiyot				Karanlık			
	Pigmentsiz		Pigmentli		Pigmentsiz		Pigmentli	
	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı
Gamborg+2 Kin+0.2 IAA	50b	50b	-	-	25b	25b	65a	25a
Gamborg +2 Kin+0.2 NAA	50b	50b	-	-	25b	25b	25b	15b
Gamborg +2 Kin+0.2 2,4-D	100a	90a	-	-	100a	75a	-	-

Her denemede ortama 20 eksplant kullanıldı.

Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 ile Tablo 4.5 irdelendiğinde, farklı BBD kombinasyonları destekli (2,4-D hariç) destekli Gamborg besi ortamında normal fotoperiyotta inkübe edilen eksplantlardan elde edilen kalluslar genel olarak orta sert, karanlık ortamda inkübe edilen eksplantlardan ise orta sert tipte ve az kırılabilir kallus oluşumu gözlemlendi. 2,4-D destekli Gamborg besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen eksplantlardan ise yumuşak ancak yapışkan tipte kallus oluşumu gözlemlendi. Pigmentli kallus oluşumu IAA ve NAA destekli Gamborg besi ortamında ve karanlık ortamda inkübe edilen kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarında gözlenirken, farklı BBD kombinasyonları destekli Gamborg besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlıkta inkübe edilen hem kök hemde kotiledon yaprağı eksplantlarında ise pigmentless kallus oluşumu gözlemlendi. Bununla birlikte, IAA ve NAA destekli Gamborg besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında tüysü kök oluşumu gözlemlendi. Kallus oluşumuna yönelik elde edilen sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

Normal fotoperiyot ortamında:

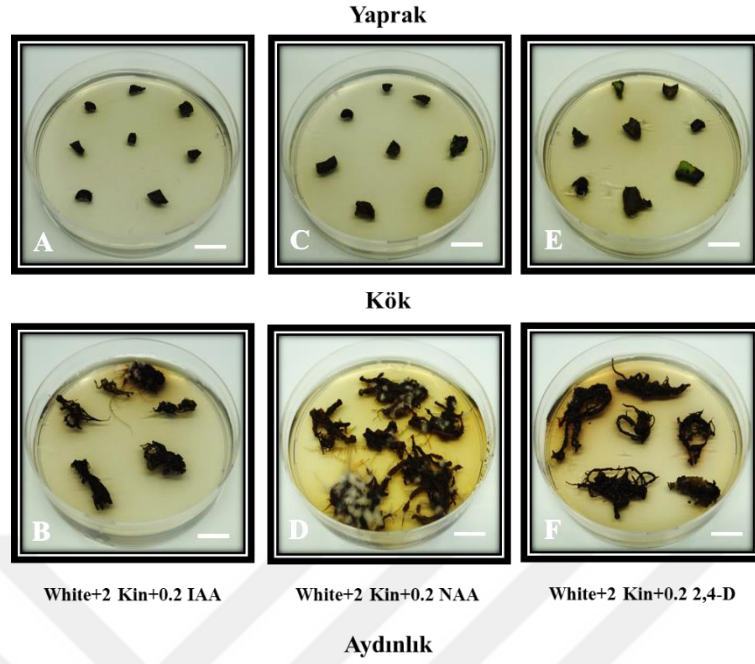
Hem kök hemde kotiledon yaprağı eksplantlarından pigmentli kallus üretimi gözlemlenmedi.

Pigmentless kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; Gamborg+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%50-%50), Gamborg+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%50-%50), Gamborg+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%100-%90) olarak hesaplandı. Kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarının NAA ve IAA destekli Gamborg besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile 2,4-D destekli Gamborg besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi.

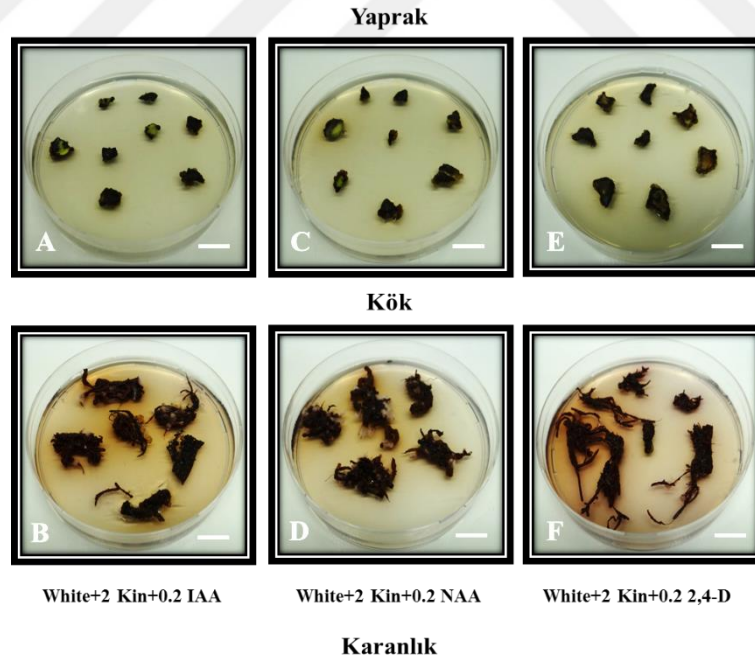
Karanlık ortamda:

Pigmentli kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; Gamborg+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%65-%25), Gamborg+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%25-%15), Gamborg +2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%0-%0) hesaplandı. Kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarının IAA ve NAA destekli Gamborg besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; Gamborg+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA destekli besi ortamında (%25-%25), Gamborg+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA destekli besi ortamında (%25-%25), Gamborg+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D destekli besi ortamında (%100-%75) olarak hesaplandı. Kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarının IAA ile NAA destekli Gamborg besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile 2,4-D destekli Gamborg besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.



Şekil 4.10: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli White besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu (Bar: 1cm).



Şekil 4.11: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokin ve oksin kombinasyonu destekli White besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).

Tablo 4.6: White besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.

Besim Ortamı Tipi (mg/l)	Kallus (%)							
	Aydınlık				Karanlık			
	Pigmentsiz		Pigmentli		Pigmentsiz		Pigmentli	
	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı
White+2 Kin+0.2 IAA	50c	25b	25a	-	50b	25b	60a	15a
White +2 Kin+0.2 NAA	65b	50a	15b	-	75a	25b	50b	15a
White +2 Kin+0.2 2,4-D	75a	50a	-	-	50b	50a	50b	15a

Her denemede ortama 20 eksplant kullanıldı.

Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 ile Tablo 4.6 irdelendiğinde, farklı BBD kombinasyonları destekli (2,4-D hariç) destekli White besi ortamında normal fotoperiyotta inkübe edilen eksplantlardan elde edilen kalluslar genel olarak orta sert az kırılğan, karanlık ortamda inkübe edilen eksplantlardan ise orta sert tipte ve az kırılğan kallus oluşumu gözlemlendi. 2,4-D destekli White besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen eksplantlardan ise yumuşak ancak yapışkan tipte kallus oluşumu gözlemlendi. Pigmentli kallus oluşumu IAA ve NAA destekli White besi ortamında normal fotoperiyot ile karanlık ortamda inkübe edilen kök, karanlık ortamda inkübe edilen kotiledon yaprağı ve 2,4-D destekli White besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen kök ve kotiledon kotiledon yaprağında gözlenirken, farklı BBD kombinasyonları destekli White besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlıkta inkübe edilen hem kök hemde kotiledon yaprağı eksplantlarında ise pigmentsiz kallus oluşumu gözlemlendi. Bununla birlikte, IAA ve NAA destekli White besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında tüysü kök oluşumu gözlemlendi. Kallus oluşumuna yönelik elde edilen sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

Normal fotoperiyot ortamında:

Pigmentli kallus üretimi, kök eksplantlarının IAA ve NAA destekli White besi ortamında inkübasyonu sonrası sırasıyla %25 ve %15 olarak hesaplanırken, kallus oluşumları arasında IAA ve NAA destekli White besi ortamları arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

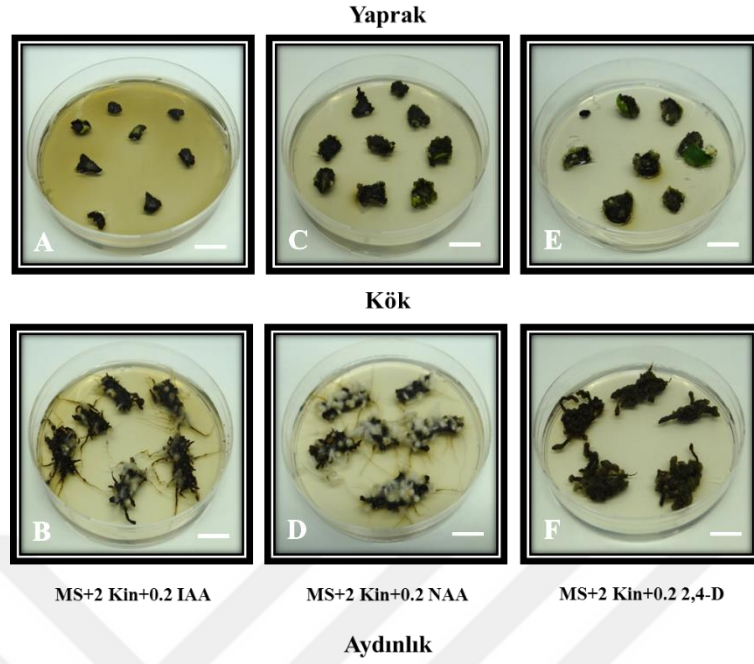
Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; White+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%50-%25), White+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%65-%50), White+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%75-%50) olarak hesaplandı. Kök eksplantlarının BBD destekli White besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının NAA ve 2,4-D destekli White besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile IAA destekli White

besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

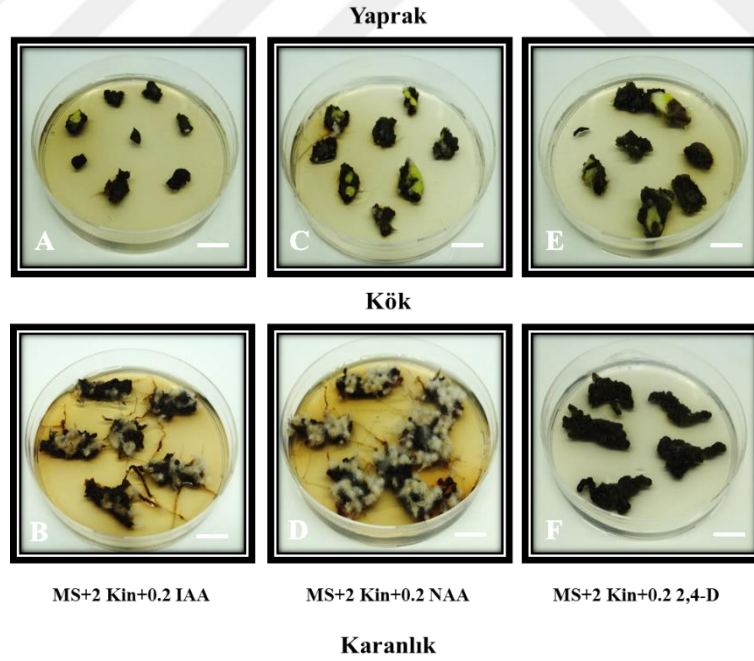
Karanlık ortamda:

Pigmentli kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; White+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%60-%15), White+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%50-%15), White+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%50-%15) hesaplandı. Kök eksplantlarının NAA ve 2,4-D destekli White besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile IAA destekli White besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının BBD destekli White besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; White+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA destekli besi ortamında (%50-%25), White+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA destekli besi ortamında (%75-%25), White+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D destekli besi ortamında (%50-%50) olarak hesaplandı. Kök eksplantlarının IAA ve 2,4-D destekli White besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile NAA destekli White besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının IAA ve NAA destekli White besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile 2,4-D destekli White besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.



Şekil 4.12: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli MS besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu (Bar: 1cm).



Şekil 4.13: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli MS besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).

Tablo 4.7: MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.

Besi Ortamı Tipi (mg/l)	Kallus (%)							
	Aydınlık				Karanlık			
	Pigmentsiz		Pigmentli		Pigmentsiz		Pigmentli	
	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı
MS+2 Kin+0.2 IAA	100a	50c	-	-	50b	75a	50a	25a
MS+2 Kin+0.2 NAA	100a	75b	-	-	50b	100b	50a	5b
MS+2 Kin+0.2 2,4-D	100a	90a	-	-	100a	100b	-	-

Her denemede ortama 20 eksplant kullanıldı.

Şekil 4.10 ve Şekil 4.11 ile Tablo 4.7 irdelendiğinde, farklı BBD kombinasyonları destekli (2,4-D hariç) MS besi ortamında normal fotoperiyotta inkübe edilen eksplantlardan elde edilen kalluslar genel olarak orta sert az kırılğan, karanlık ortamda inkübe edilen eksplantlardan ise sert tipte ve kırılğan olmayan kallus oluşumu gözlemlendi. 2,4-D destekli MS besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen eksplantlardan ise yumuşak ancak yapışkan tipte kallus oluşumu gözlemlendi. Pigmentli kallus oluşumu IAA ve NAA destekli MS besi ortamında karanlık ortamda inkübe edilen kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarında gözlenirken, farklı BBD kombinasyonları destekli MS besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlıkta inkübe edilen hem kök hemde kotiledon yaprağı eksplantlarında ise pigmentsiz kallus oluşumu gözlemlendi. Bununla birlikte, IAA ve NAA destekli MS besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında tüysü kök oluşumu gözlemlendi. Kallus oluşumuna yönelik elde edilen sayısal veriler istatistiki olarak değerlendirildiğinde;

Normal fotoperiyot ortamında;

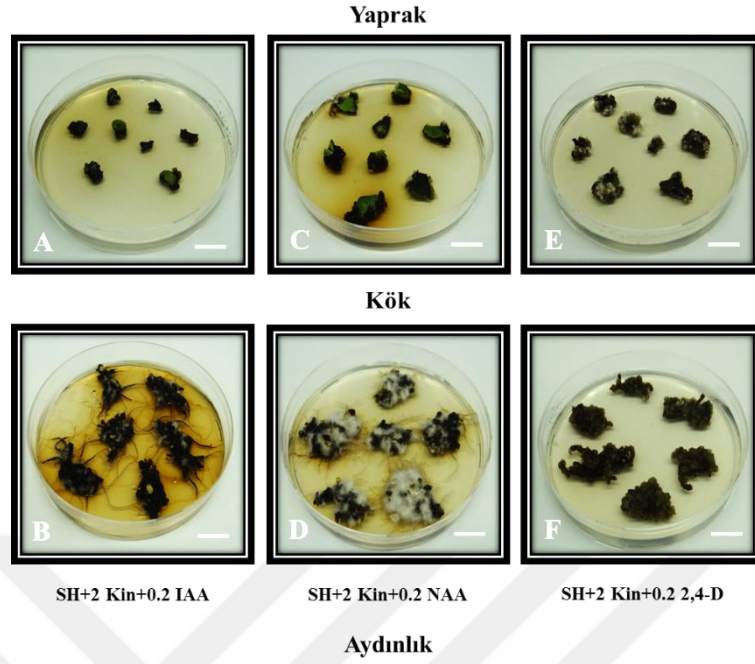
Hem kök hem de kotiledon yaprağı eksplantlarından pigmentli kallus üretimi gözlenmedi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%100-%50), MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%100-%75), MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%100-%90) olarak hesaplandı. Kök eksplantlarının farklı BBD destekli MS besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının IAA ve NAA destekli MS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile 2,4-D destekli MS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

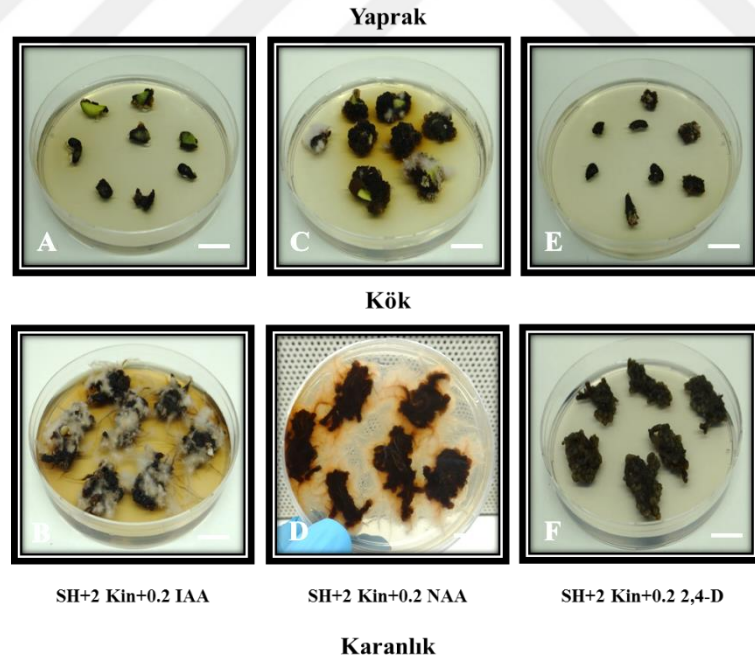
Karanlık ortamda:

Pigmentli kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%50-%25), MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%50-%5), MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%0-%0) hesaplandı. Kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarının IAA ve NAA destekli MS besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA destekli besi ortamında (%50-%75), MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA destekli besi ortamında (%50-%100), MS+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D destekli besi ortamında (%100-%100) olarak hesaplandı. Kök eksplantlarının IAA ve NAA destekli MS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile 2,4-D destekli MS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının NAA ve 2,4-D destekli MS besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile IAA destekli MS besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.



Şekil 4.14: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli SH besi ortamında ve normal fotoperiyot koşullarında kallus oluşumu (Bar: 1cm).



Şekil 4.15: Çimlenen tohumlardan alınan kotiledon yaprağı ve köklerden, farklı sitokinin ve oksin kombinasyonu destekli SH besi ortamında ve karanlık koşullarda kallus oluşumu (Bar: 1cm).

Tablo 4.8: SH besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus miktarı ve tipleri.

Besi Ortamı Tipi (mg/l)	Kallus (%)							
	Aydınlık				Karanlık			
	Pigmentsiz		Pigmentli		Pigmentsiz		Pigmentli	
	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı	Kök	K. Yaprığı
SH+2 Kin+0.2 IAA	100a	25c	25a	-	50c	75b	60a	25a
SH+2 Kin+0.2 NAA	75b	50b	-	-	75b	100a	50b	25a
SH+2 Kin+0.2 2,4-D	100a	100a	-	-	100a	100a	15c	-

Her denemede ortama 20 eksplant kullanıldı.

Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 ile Tablo 4.8 irdelendiğinde, farklı BBD kombinasyonları destekli (2,4-D hariç) destekli SH besi ortamında normal fotoperiyotta inkübe edilen eksplantlardan elde edilen kalluslar genel olarak orta sert az kırılğan, karanlık ortamda inkübe edilen eksplantlardan ise orta sert tipte ve kırılğan olmayan kallus oluşumu gözlemlendi. 2,4-D destekli SH besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen eksplantlardan ise orta yumuşak ancak yapışkan tipte kallus oluşumu gözlemlendi. Pigmentli kallus oluşumu, IAA destekli SH besi ortamında normal fotoperiyotta inkübe edilen kök eksplantlarında, IAA ve NAA destekli SH besi ortamında karanlık ortamda inkübe edilen kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarında ve 2,4-D destekli SH besi ortamında inkübe edilen kök eksplantlarında gözlenirken, farklı BBD kombinasyonları destekli SH besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlıkta inkübe edilen hem kök hemde kotiledon yaprağı eksplantlarında ise pigmentsiz kallus oluşumu gözlemlendi. Bununla birlikte, IAA ve NAA destekli SH besi ortamında ve normal fotoperiyot ile karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında tüysü kök oluşumu gözlemlendi. Kallus oluşumuna yönelik elde edilen sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

Normal fotoperiyot ortamında:

Pigmentli kallus üretimi, sadece kök eksplantlarının SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%25) inkübasyonu sonrası gözlemlendi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%100-%25), SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%75-%50), SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%100-%100) olarak hesaplandı. Kök eksplantlarının IAA ve 2,4-D destekli SH besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile NAA besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının farklı BBD kombinasyonları

destekli SH besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

Karanlık ortamda:

Pigmentli kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında (%60-%25), SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA besi ortamında (%50-%25), SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında (%15-%0) hesaplandı. Kök eksplantlarının, farklı BBD kombinasyonları destekli SH besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının IAA ve NAA destekli SH besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

Pigmentsiz kallus üretimi, kök ve kotiledon yapraklarında sırasıyla; SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l IAA destekli besi ortamında (%50-%75), SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l NAA destekli besi ortamında (%75-%100), SH+2mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D destekli besi ortamında (%100-%100) olarak hesaplandı. Kök eksplantlarının farklı BBD kombinasyonları destekli SH besi ortamlarında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, kotiledon yaprağı eksplantlarının NAA ve 2,4-D destekli SH besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu ile IAA destekli SH besi ortamında inkübasyonu sonrası kallus oluşumu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

Sonuç olarak, kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarından farklı BBD kombinasyonları destekli besi ortamlarında kallus oluşumu ile ilgili çalışmalarda, kallus oluşumu denenen tüm besi ortamlarında gözlenmekle birlikte, şikonin üretimi için gerekli olan kırmızı pigmentli kallus oluşumu daha çok karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında, normal fotoperiyot ortamında inkübe edilen kök eksplantlarında ve karanlık ortamda inkübe edilen kotiledon yapraklarında gözlemlendi. Yine pigmentli kallus oluşumu çoktan aza IAA, NAA ve 2,4-D besi ortamı destekli besi ortamlarında ve daha çok kök kalluslarında gözlemlendi. IAA ve NAA destekli LS, ½LS, Gamborg, White, MS ve SH besi ortamlarında ve karanlıkta inkübe edilen kök eksplantlarında pigmentli kallus oluşumu görülsede, en yüksek oranda ve kullanılabilir nitelikte kallus oluşumu IAA destekli LS besi ortamında ve karanlıkta inkübe edilen kök eksplantlarında gözlemlendi.

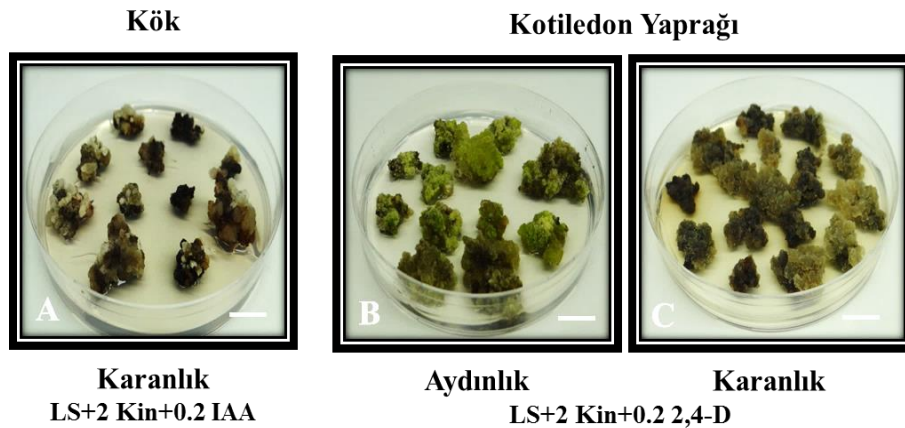
Yağ asidi üretimi için süspansiyon kültürlerinde kullanılacak olan kallus eldesi için ise kotiledon yaprakları tercih edilirken, IAA ve NAA destekli LS, ½LS, Gamborg, White, MS ve SH besi ortamlarına göre 2,4-D destekli LS, ½LS, Gamborg, White, MS ve SH besi ortamlarında kallus oluşumu hem daha yüksek hemde uygun nitelikte olduğu gözlemlendi.

Farklı ışık koşullarında (normal fotoperiyot ve karanlık) inkübe edilen eksplantlardan kallus oluşumunda ise normal fotoperiyotta inkübe edilen eksplantlardan kallus oluşumları karanlık ortamda inkübe edilen eksplantlardan oluşan kalluslara göre daha sert ve az kırılğan olarak gözlemlendi.

IAA, NAA, 2,4-D destekli LS ve ½LS besi ortamlarında ve normal fotoperiyot koşullarında inkübe edilen kotiledon yaprağı eksplantlarından kallus oluşumu çalışmalarında ayrıca bitkisel rejenerasyon da gözlemlendi.

4.2.2. Kök ve Kotiledon Yaprağından Elde Edilen Kallus Kültürlerinden Stok Kallus Kültürleri Oluşturma Çalışmaları

4.2.1. başlığı altında sunulan çalışmalar değerlendirildiğinde, çalışma sonucu elde edilen kalluslar, en iyi kallus oluşturma besi ortamı olan; pigmentli kök kalluslar için LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında karanlıkta, kotiledon yaprağı kallusları için ise LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D destekli besi ortamında aydınlıkta ve karanlıkta BBO'da inkübe edilerek stok kallus kültürleri elde edildi. (Şekil 4.16.).

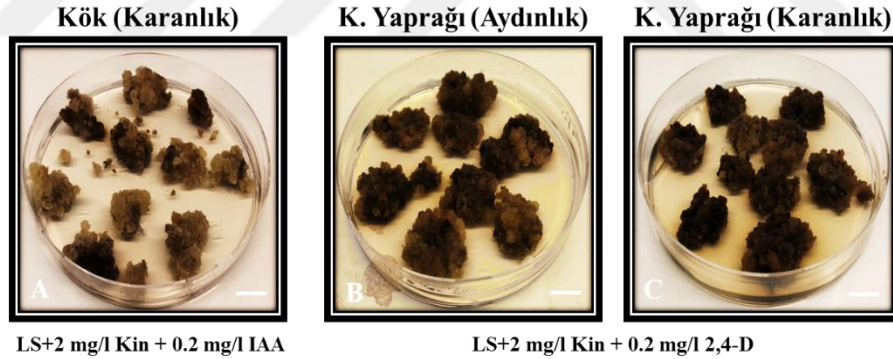


Şekil 4.16: Kök ve kotiledon yaprakları kallus hatlarından stok kallus kültürlerinin elde edilmesi (Barlar: 1.4 cm).

Şekil 4.16 irdelendiğinde; kök kalluslarının LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında ve karanlıkta inkübe edildiğinde oluşan kalluslar pigmentli az yumuşak ve kırılğan nitelikte meydana gelirken, kotiledon yaprağı kalluslarının LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında ve normal fotoperiyotta ile karanlıkta inkübe edildiğinde, aydınlıkta inkübe edilen kalluslardan gelişen kalluslar sert ve kırılğan olmayan ancak karanlıkta inkübe edilen kalluslardan gelişen kallusların ise yumuşak ve kırılğan nitelikte geliştiği gözlemlendi.

4.2.3. Kök ve Kotiledon Yapracağı Stok Kallus Kültürlerinin Gelişiminin Karakterizasyonu Çalışmaları

4.2.2. başlığında ifade edildiği üzere elde edilen kalluslar, pigmentli her bir kök kallusu tartılarak LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA besi ortamında karanlıkta, her bir kotiledon yaprağı kallusu tartılarak LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D besi ortamında normal fotoperiyotta ve karanlık ortamda BBO'da inkübasyonu sonrası, gelişiminin karakterizasyonu için; morfolojik gözlemler alınarak Şekil 4.17'de, sayısal veriler alınarak istatistiksel olarak hesaplandı ve Tablo 4.9 ve Tablo 4.10 sunuldu.



Şekil 4.17: Kök ve kotiledon yapraklarından elde edilen kallusların gelişiminin karakterizasyonu (Barlar: 1.3 cm).

Tablo 4.9: Kök kalluslarının gelişiminin karakterizasyonu.

Eksplant Tipi	Rejenerasyon (%)	Ortalama Yaş Ağırlık (mg)	Ortalama Kuru Ağırlık (mg) *
Kök (Kültür Başlangıcı)	100a	261.66±10.53b	28.50±1.15b
Kök (Kültür Süreci)	100a	760.28±84.03a	83.63±9.24a

Her denemede ortama 20 eksplant kullanıldı.

*Gerçekleştirilen çalışmada eksplantların bir kısmı deney başlangıcında kurutmaya alınmış, geri kalanı kallus gelişiminin izlenmesi için besi ortamında inkübe edilmiştir.

Tablo 4.10: Kotiledon yaprağı kalluslarının gelişiminin karakterizasyonu.

Eksplant Tipi	Rejenerasyon (%)	Ortalama Yaş Ağırlık (mg)	Ortalama Kuru Ağırlık (mg) *
K. Yaprığı Aydınlik (Kültür Başlangıcı)	100a	116.20±7.32c	12.65±0.81c
K. Yaprığı Aydınlik (Kültür Süreci)	100a	761.00±82.71a	83.71±9.09a
K. Yaprığı Karanlık (Kültür Başlangıcı)	100a	115.20±10.50c	12.15±1.15c
K. Yaprığı Karanlık (Kültür Süreci)	100a	577.90±55.19b	61.36±6.07b

Her denemede ortama 20 eksplant kullanıldı.

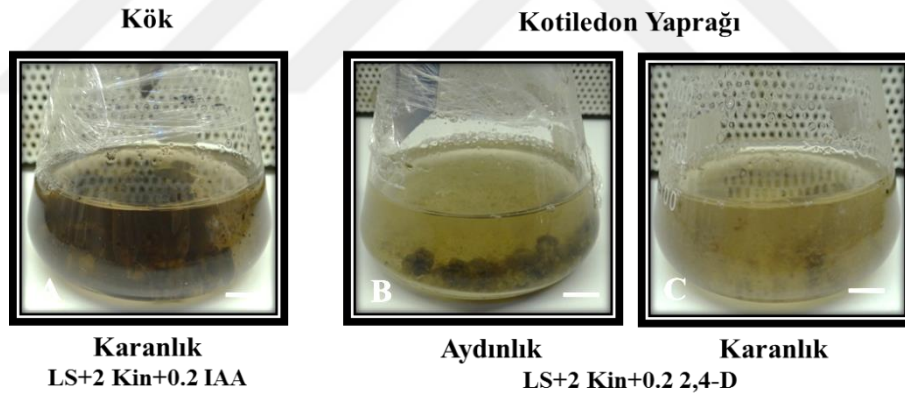
*Gerçekleştirilen çalışmada eksplantların bir kısmı deney başlangıcında kurutmaya alınmış, geri kalanı kallus gelişiminin izlenmesi için besi ortamında inkübe edildi.

Şekil 4.17, Tablo 4.9 ve Tablo 4.10 irdelendiğinde, kök kalluslarının gelişimi morfolojik olarak irdelendiğinde inkübasyon sonrası pigmentli ve kırılğan yumuşak ve dağılıbilir kallus elde edilirken, kotiledon yaprağı kalluslarının gelişimi morfolojik olarak irdelendiğinde inkübasyon sonrası normal fotoperiyotta gelişen kalluslar sert ve kırılğan olmayan, karanlıkta gelişen kalluslardan ise yumuşak ve kırılğan kalluslar elde edildiği gözlemlendi. Sayısal veriler değerlendirildiğinde; kök kalluslarının inkübasyonu öncesi ortalama yaş ağırlıkları 261.66±10.53 mg, ortalama kuru ağırlıkları ise 28.78±1.15 mg olarak hesaplanırken, inkübasyon sonrası yaş ağırlıkları 760.28±84.03 mg, ortalama kuru ağırlıkları ise 83.63±9.24 mg olarak hesaplandı. Kotiledon yapraklarının normal fotoperiyotta ortamda inkübasyonu öncesi ortalama yaş ağırlıkları 120.20±7.32 mg, ortalama kuru ağırlıkları ise 13.22±0.81 mg olarak hesaplanırken, inkübasyon sonrası yaş ağırlıkları 761.00±82.71 mg ortalama kuru ağırlıkları 83.71±9.09 mg olarak hesaplandı. Kotiledon yapraklarının karanlık ortamda inkübasyonu öncesi ortalama yaş ağırlıkları 115.20±10.50 mg, ortalama kuru ağırlıkları ise 12.67±1.15 mg olarak hesaplanırken, inkübasyon sonrası yaş ağırlıkları 577.90±55.19 mg ortalama kuru ağırlıkları 61.36±6.07 mg olarak hesaplandı. Kotiledon yapraklarının normal fotoperiyot ve karanlıkta inkübasyonu sonrası gelişimleri arasında istatistiksel olarak fark hesaplandı. Her ne kadar normal fotoperiyotta inkübe edilen kallusların gelişimi karanlıkta inkübe edilen kallusların gelişimine göre ağırlık bakımından daha iyi olsada, süspansiyon kültürleri için kullanılabilir nitelikteki kalluslar karanlık ortamda inkübe edilen kalluslarda meydana geldiği gözlemlendiğinden, stok kültür oluşturma çalışmalarında, kök kalluslarında olduğu gibi kotiledon yaprakları kalluslarında da karanlık ortamda inkübasyon tercih edildi.

4.3. KÖK ve KOTİLEDON YAPRAĞI KALLUSLARINDAN SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

4.3.1. Kök ve Kotiledon Yaprığı Kalluslarından Süspansiyon Kültürü Oluşturma Çalışmaları

3.2.5.1. başlığı altında Şekil 3.17’de sunulduğu üzere, şikonin ve yağ asitleri üretilmesi ve miktarının artırılması çalışması kapsamında süspansiyon kültürleri oluşturuldu. Pigmentli kök ve kotiledon yaprağı stok kallus hatlarının çoğaltımının yapıldığı besi ortamları olan LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA ve LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D’ün sıvı tipleri kullanılarak süspansiyon kültürleri başlatıldı. Hem kök hemde kotiledon yapraklarına ait dağılgan özellikteki kalluslar, 100 ml LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA ve LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D içeren 250 ml erlenlere yaklaşık 5’er gram eklenerek 100 mm ayarlı çalkayıcılar üzerinde kökler karanlık, kotiledon yaprakları ise hem normal fotoperiyot hemde karanlık ortamda BBO’da yaklaşık bir ay inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oluşan kültürler Şekil 4.18’de sunuldu.



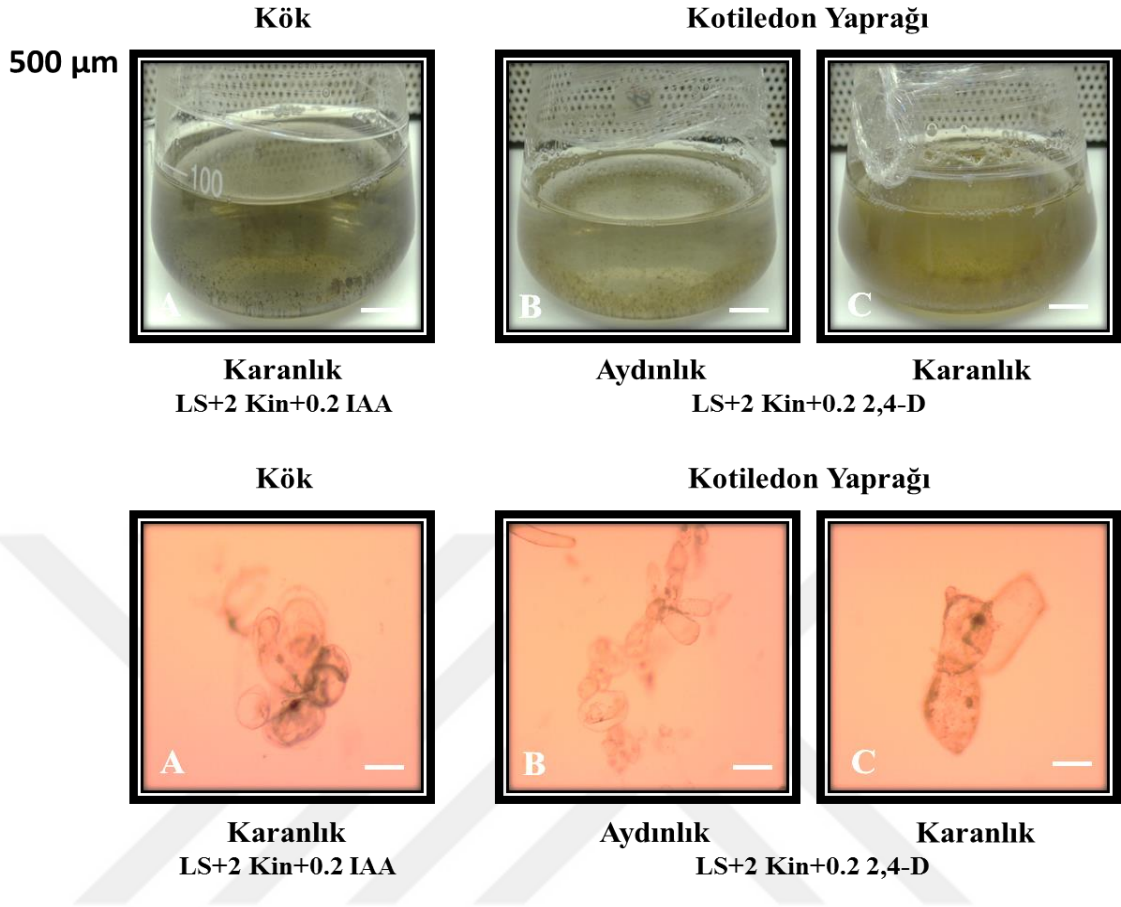
Şekil 4.18: Kök ve kotiledon yaprakları stok kallus hatlarından süspansiyon kültürlerinin başlatılması (Barlar: 1.2 cm).

Şekil 4.18 irdelendiğinde inkübasyon sonrasında kallusların sıvı besi ortamlarında dağıldığı, kök süspansiyon kültürlerinde pigmentasyon, kotiledon yaprakları süspansiyon hatlarının normal fotoperiyotlu ortama göre karanlık ortamda daha iyi bir şekilde süspansiyon olduğu gözlemlendi.

4.3.2. Kök ve Kotiledon Yapradı Süspansiyon Kültürlerinden Stok Süspansiyon Kültürü Oluşturma alışmaları

4.3.1. başlığı altında ifade edildiği üzere, süspansiyon kültürleri oluşturma aşamasından sonra stok süspansiyon kültürleri oluşturma çalışmalarına aşamasına geçildi.

Stok süspansiyon kültürlerinin oluşturma çalışmalarındaki en önemli basamak hücrelerin birbirinden ayrılması ve süspansiyon kültürlerinin homojen bir hal almasını sağlanmasıdır. Pigmentli kök ve kotiledon yaprağı kallus hatlarından süspansiyon kültürlerinin başlatılması sonrası BBO'da yaklaşık bir aylık inkübasyon aşaması sonrası oluşturulan kültürler, 500 µm.'lik porlara sahip steril metal elekten geçirildi. Elekten geçirilen kültürlerden bir miktar örnek alınarak mikroskopta gözlendi ve Şekil 4.19'da, elde edilen kültürlerden alınan 50 ml kültür üzerine 50 ml taze besi ortamı (Kök için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA, kotiledon yaprakları için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D) eklenerek kültürler hazırlandı ve Şekil 4.19'da sunuldu. Hazırlanan kültürler 100 rpm ayarlı alkayacılar üzerinde kökler karanlık, kotiledon yaprakları ise hem normal fotoperiyot hemde karanlık ortamda BBO'da yaklaşık bir ay yeniden inkübasyonu sağlandı.

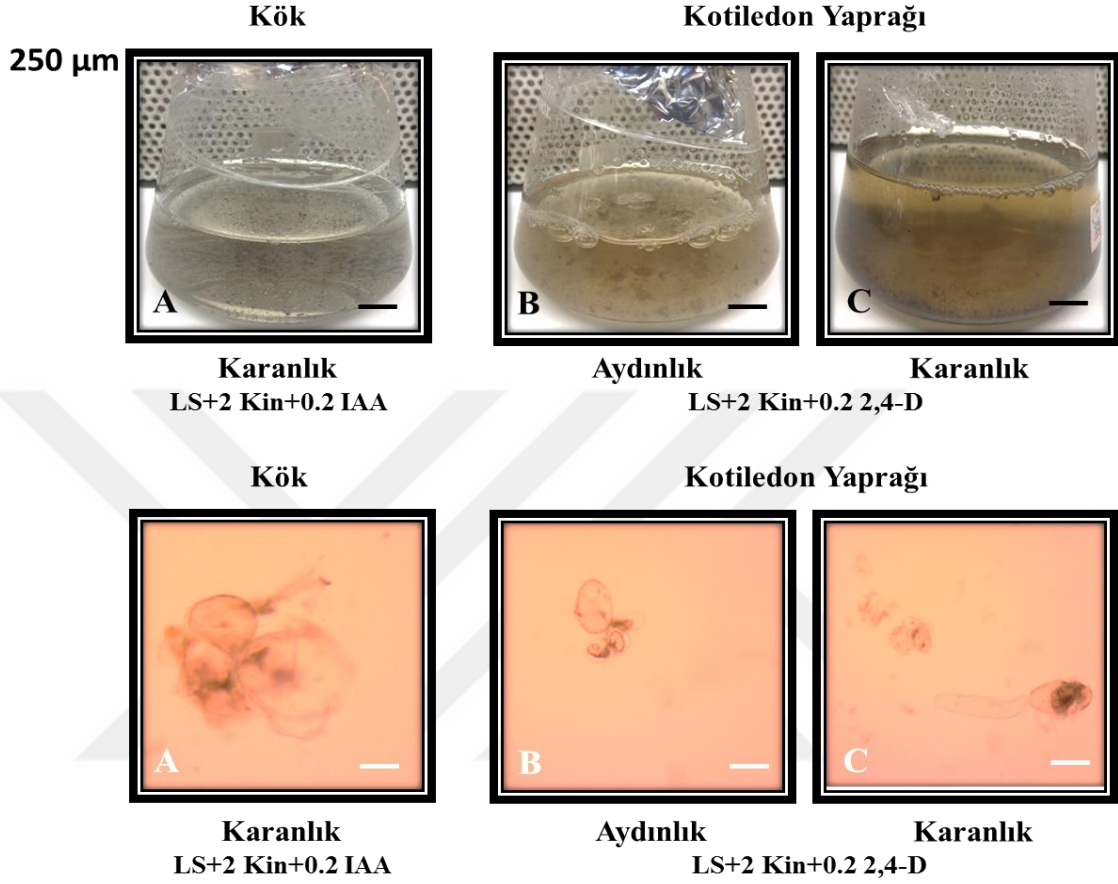


Şekil 4.19: Kök ve kotiledon yaprakları stok kallus hatlarından oluşturulan süspansiyon kültürlerinin 500 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası elde edilen kültürlerden yeniden süspansiyon kültürlerinin oluşturulması (Barlar: 1.2 cm). Kök ve kotiledon yaprakları stok kallus hatlarından stok kallus hatlarından oluşturulan süspansiyon kültürlerinin 500 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası mikroskop görüntüleri (Barlar: 50 µm).

Şekil 4.19 irdelendiğinde 500 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirilen süspansiyon kültürlerinde hücrelerin kümeleşme gösterdiği ancak, elekten geçirme sonrası dağılma göstermeyen küme kallus hatlarının uzaklaştırıldığı gözlemlendi.

500 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirilen kök ve süspansiyon kültürlerinden başlatılan kültürlerin BBO'da yaklaşık bir aylık inkübasyonu sonrası oluşturulan kültürler 250 µm.'lik porlara sahip steril metal elekten geçirildi. Elekten geçirilen kültürlerden bir miktar örnek alınarak mikroskopta gözlemlendi ve Şekil 4.20'de, elde edilen kültürlerden alınan 50 ml kültür üzerine 50ml taze besi ortamı (Kök için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA, kotiledon yaprakları için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D) eklenerek kültürler hazırlandı ve Şekil 4.20'de sunuldu. Hazırlanan kültürler 100 rpm ayarlı çalkayıcılar üzerinde kökler karanlık, kotiledon

yaprakları ise hem normal fotoperiyot hemde karanlık ortamda BBO' da yaklaşık bir ay yeniden inkübasyonu sağlandı.

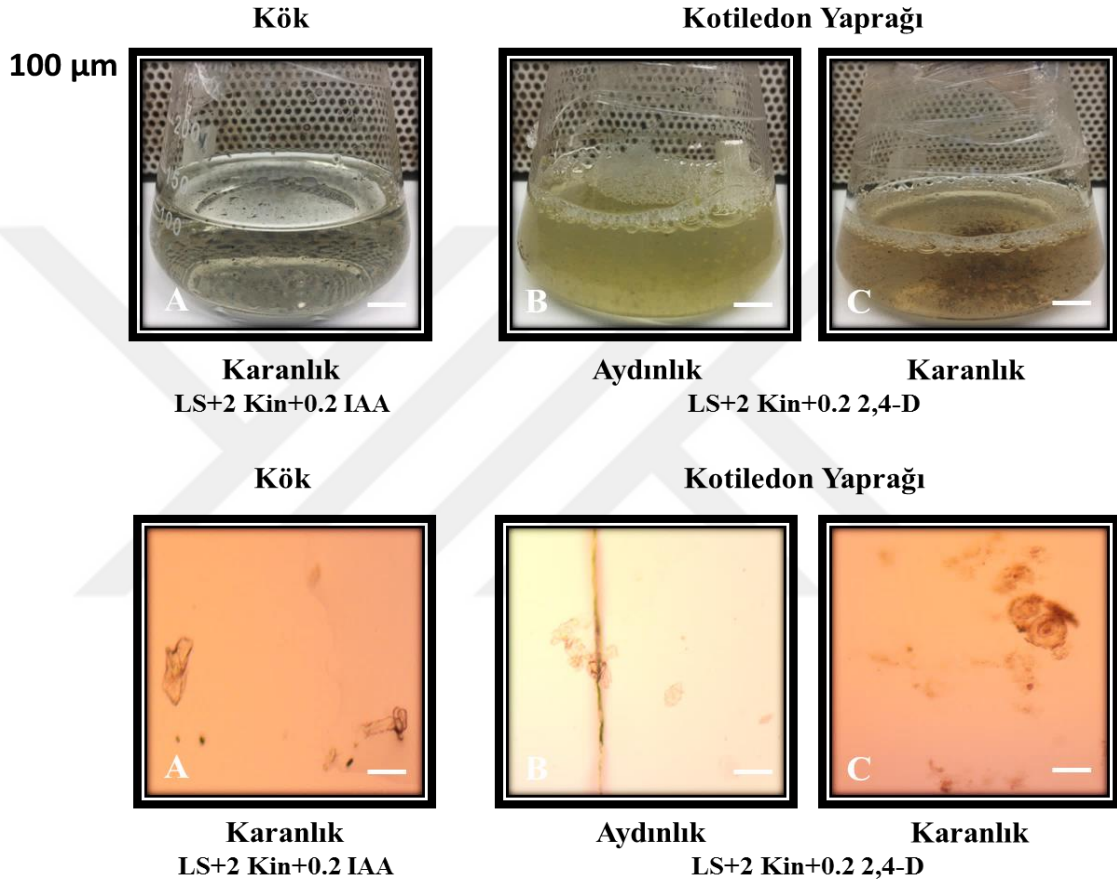


Şekil 4.20: Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin 250 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası elde edilen kültürlerden yeniden süspansiyon kültürlerinin oluşturulması (Barlar: 1.2 cm). Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin 250 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası mikroskop görüntüleri (Barlar: 50 µm).

Şekil 4.20 irdelendiğinde 500 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirilen süspansiyon kültürlerine göre 250 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirilen süspansiyon kültürlerinde hücrelerin kümeleşmelerin azaldığı, elekten geçirme sonrası dağılma göstermeyen küme kallus hatlarının uzaklaştırıldığı gözlemlendi.

250 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirilen kök ve süspansiyon kültürlerinden başlatılan kültürlerin BBO'da yaklaşık bir aylık inkübasyonu sonrası oluşturulan kültürler 100 µm.'lik porlara sahip steril metal elekten geçirildi. Elekten geçirilen kültürlerden bir miktar örnek alınarak mikroskopta gözlemlendi ve Şekil 4.21'da, elde edilen kültürlerden alınan 50 ml

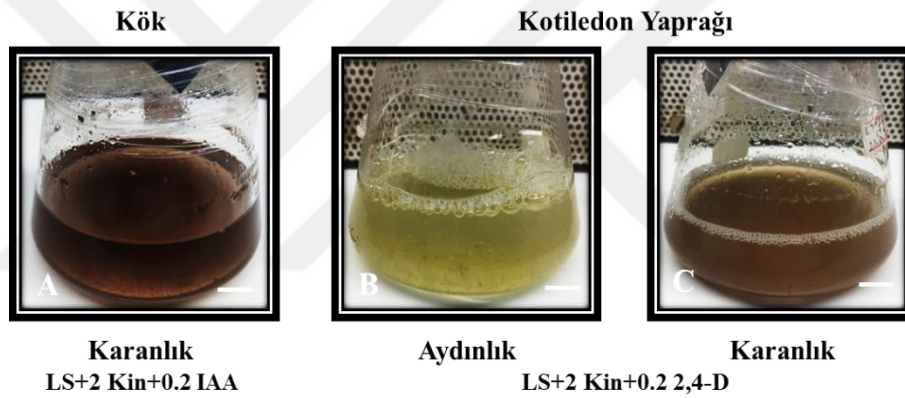
kültür üzerine 50 ml taze besi ortamı (Kök için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA, kotiledon yaprakları için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D) eklenerek kültürler hazırlandı ve Şekil 4.21’de sunuldu. Hazırlanan kültürler 100 rpm ayarlı çalkayıcılar üzerinde kökler karanlık, kotiledon yapraklarının ise hem normal fotoperiyot hem de karanlık ortamda BBO’ da yaklaşık bir ay yeniden inkübasyonu sağlandı.



Şekil 4.21: Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin 100 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası elde edilen kültürlerden yeniden süspansiyon kültürlerinin oluşturulması (Barlar: 1.2 cm). Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin 100 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirimi sonrası mikroskop görüntüleri (Barlar: 50 µm).

Şekil 4.21 irdelendiğinde 250 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirilen süspansiyon kültürlerine göre 100 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirilen süspansiyon kültürlerinde hücrelerin kümeleşmelerin ortadan kalktığını, elekten geçirme sonrası dağılma göstermeyen küme kallus hatlarının tamamen uzaklaştırıldığı gözlemlendi.

100 µm lik porlara sahip steril metal elekten geçirilen kök ve süspansiyon kültürlerinden başlatılan kültürlerin BBO'da yaklaşık bir aylık inkübasyonu sonrası oluşturulan kültürler periyodik olarak yaklaşık ayda bir alt kültüre edildi. Ancak periyodik alt kültürlenme çalışmaları süresince alt kültür aşamalarında kümeleşme gözlemlendiğinde kültürler yeniden 100 µm.'lik porlara sahip steril metal elekten geçirilerek stok süspansiyon kültürleri elde edildi. Periyodik alt kültürlenmelerde veya elekten geçirilmesine gerek duyulan kültürler işlemlerin ardından 50 ml kültür üzerine 50 ml taze besi ortamı (Kök için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA, kotiledon yaprakları için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D) eklenerek kültürler hazırlandı ve 100 rpm ayarlı çalkayıcılar üzerinde kökler karanlık, kotiledon yaprakları ise hem normal fotoperiyot hemde karanlık ortamda BBO'da inkübasyonu sağlanarak stok süspansiyon kültürleri elde edildi (Şekil 4.22).

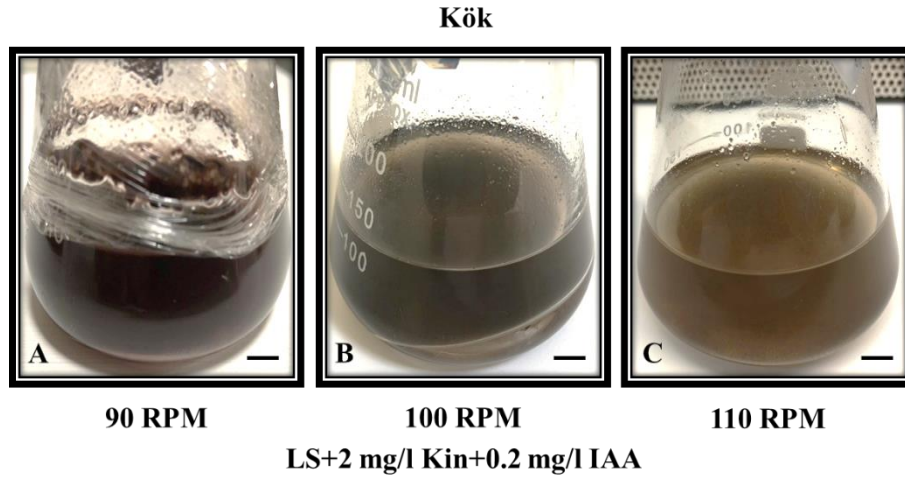


Şekil 4.22: Kök ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin periyodik alt kültürlenmeleri sonrası oluşturulan stok süspansiyon kültür hatları (Barlar: 1.2 cm).

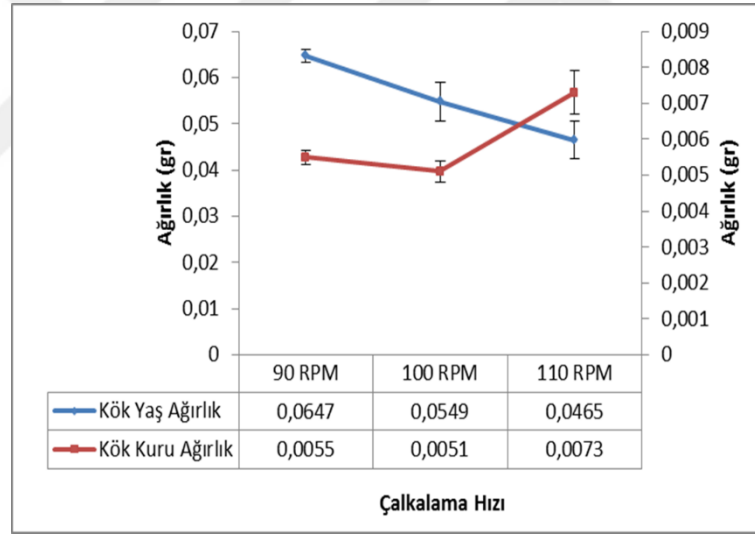
Şekil 4.22 irdelendiğinde, değişik por büyüklüklerine sahip eleklerden geçirilmiş olan süspansiyon kültürlerinin, homojen bir hal aldığı gözlemlendi. Optimizasyon çalışmaları ve büyüme eğrisi çalışmaları için stok kültürlerin oluşturulması çalışmalarına devam edildi.

4.3.3. Kök ve Kotiledon Yaprığı Süspansiyon Kültürlerinde Optimizasyon Çalışmaları

4.3.2. başlığı altında ifade edilen stok süspansiyon kültürü oluşturma çalışması sonrası, kök ve kotiledon yaprağı süspansiyon hatlarının farklı çalkalama hızlarına ayarlanan (90-100-110 rpm) çalkalayıcılar üzerinde inkübasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında stok süspansiyon kültürlerinin alt kültürlenme zamanı sürecinde, kök ve kotiledon yaprağı (normal fotoperiyot ve karanlık ortamda inkübe edilen) süspansiyon hatlarına ait 50 ml kültür ve 50 ml taze besi ortamı (LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA, LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D) 250 ml Erlenlere alınarak, BBO'da 90-100-110 rpm hızlarına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde yaklaşık 1 ay inkübe edildi. Inkübasyon sonrası morfolojik gözlemlere ait sonuçlar (Şekil 4.23, Şekil 4.25, Şekil 4.27), sayısal değerlere ait grafikler (Şekil 4.24, Şekil 4.26, 4.28) ve istatistiki değerlendirmeler, kök, normal fotoperiyotta ve karanlık ortamda inkübe edilen kotiledon yaprağı süspansiyon hatları için sırasıyla Tablo 4.11, Tablo 4.12, Tablo 4.13)'de sunuldu.



Şekil 4.23: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kök süspansiyonları (Barlar: 1.2 cm).



Şekil 4.24: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kök süspansiyonlarının büyümelerine ait grafik.

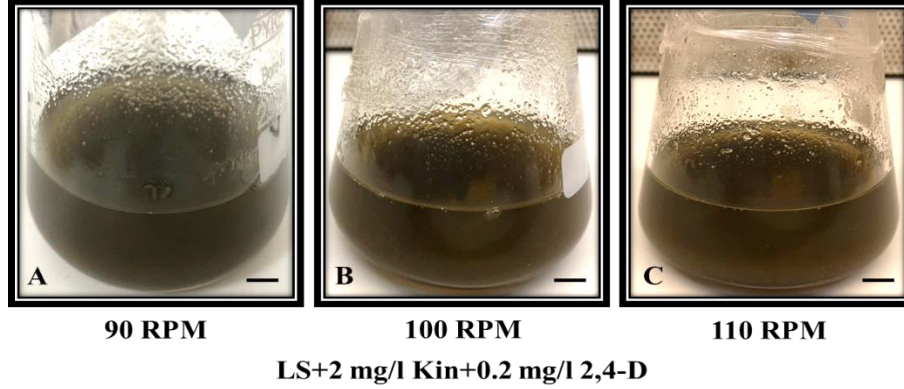
Tablo 4.11: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kök süspansiyonlarının büyümelerine ait sonuçlar.

Çalkalama Hızı (RPM)	Yaş Ağırlık (gr) Ort+SH	Kuru Ağırlık (gr) Ort+SH
90	0,0647±0.0014a	0,0055±0.0002c
100	0,0549±0.0042b	0,0051±0.0003b
110	0,0465±0.0040c	0,0073±0.0006a

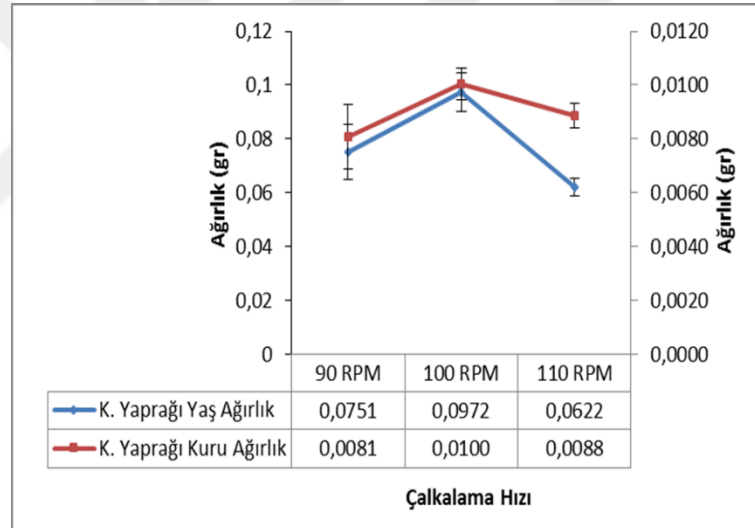
Her denemede ortama 10 erlen kültür kullanıldı.

Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Tablo 4.11'e göre; Morfolojik veriler irdelendiğinde, düşük çalkalama hızlarında erlen kenarlarına hücre kümelerinin yığıldığı gözlemlendi. Bununla birlikte pigmentasyonun bazı erlenlerde çalkalama hızı arttıkça artırdığı gözlemlendi. Sayısal veriler değerlendirildiğinde, yaklaşık bir aylık inkübasyonun sonunda 90 rpm hızla çalkalama da ortalama yaş ağırlık $0,0647 \pm 0.0014$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0055 \pm 0.0002$ gr olarak, 100 rpm hızla çalkamada ortalama yaş ağırlık $0,0549 \pm 0.0042$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0051 \pm 0.0003$ gr olarak, 110 rpm ortalama yaş ağırlık $0,0465 \pm 0.0040$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0073 \pm 0.0006$ gr olarak hesaplandı. İstatistiksel olarak irdelendiğinde, yaş ağırlıklar bakımından farklı çalkalama hızlarında inkübe edilen kök süspansiyonları arasında fark hesaplanırken, kuru ağırlıklar bakımından 90 rpm ile 100 rpm çalkalama hızlarında inkübe edilen kök süspansiyonlarına göre 110 rpm çalkama hızında inkübe edilen kök süspansiyonları arasında fark hesaplandı. Her ne kadar 110 rpm'e göre 90 rpm ve 100 rpm çalkalama hızlarında inkübe edilen erlenlerde yaş ağırlık yüksek olarak hesaplanırsa da, 110 rpm çalkalama hızlarında inkübe edilen erlenlerde en yüksek kuru ağırlık hesaplandı. Sonuç olarak büyüme eğrisi çalışmalarında çalkalama hızı olarak 110 rpm kullanılmasına karar verildi.

Kotiledon Yaprağı (Aydınlık)



Şekil 4.25: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve normal fotoperiyot ortamında yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonları (Barlar: 1.2 cm).



Şekil 4.26: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve normal fotoperiyot ortamında yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonlarının büyümelerine ait grafik.

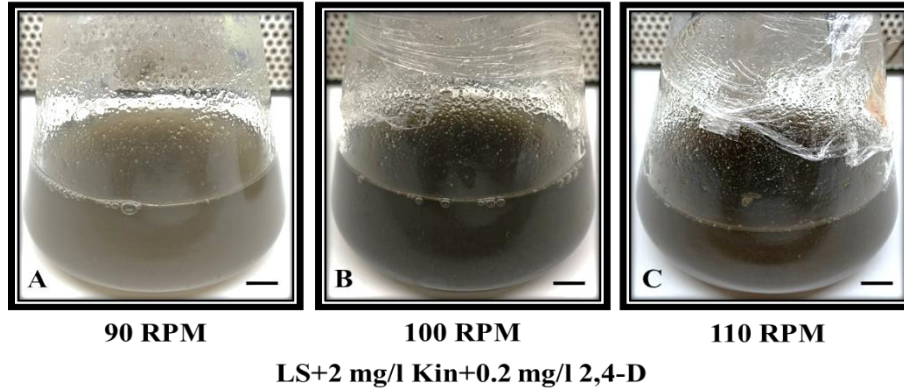
Tablo 4.12: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve normal fotoperiyot ortamında yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonlarının büyümelerine ait sonuçlar.

Çalkalama Hızı (RPM)	Yaş Ağırlık (gr) Ort+SH	Kuru Ağırlık (gr) Ort+SH
90	0,0751±0.0101b	0,0081±0.0012b
100	0,0972±0.0072a	0,0100±0.0006a
110	0,0622±0.0033b	0,0088±0.0005b

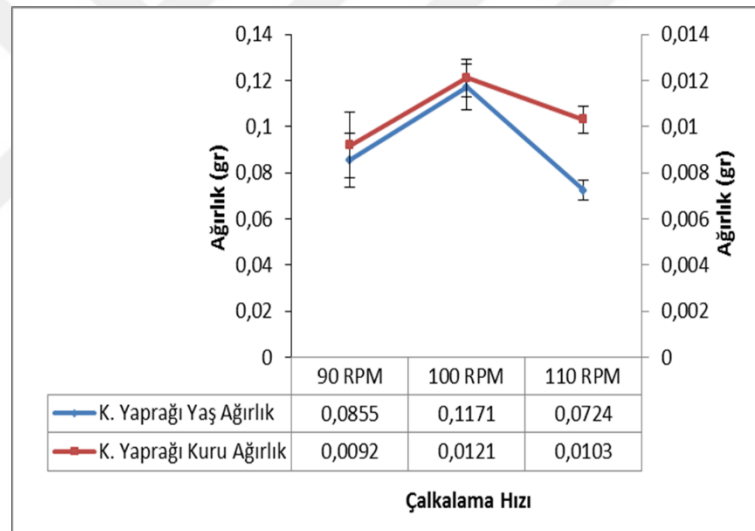
Her denemede ortalama 10 erlen kültür kullanıldı.

Şekil 4.25, Şekil 4.26 ve Tablo 4.12'e göre; Morfolojik veriler irdelendiğinde, koyu pigmentasyonun bazı erlenlerde çalkalama hızı artıkça artırdığı gözlemlendi. Bununla birlikte bazı erlenlerde açık renkli hücre kümeleşmesi gözlemlendi. Sayısal veriler değerlendirildiğinde, yaklaşık bir aylık inkübasyonun sonunda 90 rpm hızla çalkalama da ortalama yaş ağırlık $0,0751 \pm 0.0101$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0081 \pm 0.0012$ gr olarak, 100 rpm hızla çalkalama da ortalama yaş ağırlık $0,0972 \pm 0.0072$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0100 \pm 0.0006$ gr olarak, 110 rpm ortalama yaş ağırlık $0,0622 \pm 0.0033$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0088 \pm 0.0005$ gr olarak hesaplandı. Yaş ve kuru ağırlıklar bakımından farklı 90 rpm ile 110 rpm çalkalama hızlarında inkübe edilen kotiledon yaprağı süspansiyonlarına göre 100 rpm çalkalama hızlarında inkübe edilen kotiledon yaprağı süspansiyonları arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. 90 rpm ve 110 rpm çalkalama hızlarında inkübasyona göre 100 rpm çalkalama hızında, daha yüksek yaş ve kuru ağırlık hesaplandı.

Kotiledon Yaprağı (Karanlık)



Şekil 4.27: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonları (Barlar: 1.2 cm).



Şekil 4.28: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonlarının büyümelerine ait grafik.

Tablo 4.13: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası kotiledon yaprağı süspansiyonlarının büyümelerine ait sonuçlar.

Çalkalama Hızı (RPM)	Yaş Ağırlık (gr) Ort+SH	Kuru Ağırlık (gr) Ort+SH
90	0,0855±0.0116b	0,0092±0.0014b
100	0,1171±0.0098a	0,0121±0.0008a
110	0,0724±0.0043b	0,0103±0.0006b

Her denemede ortalama 10 erlen kültür kullanıldı.

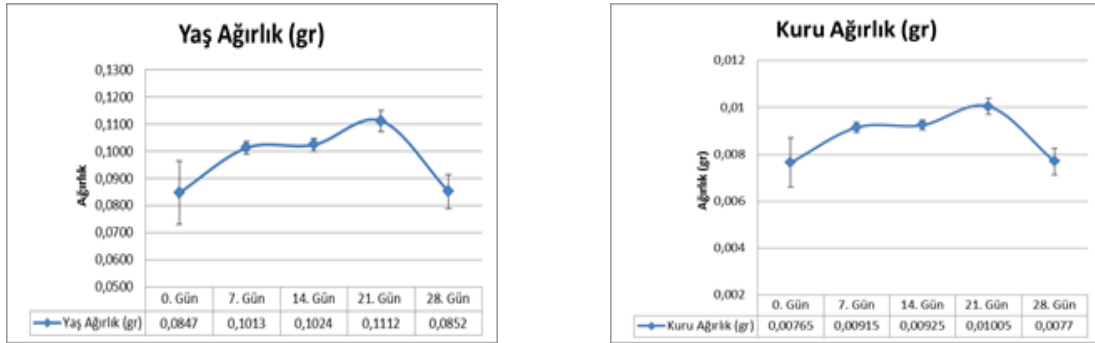
Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Tablo 4.13'e göre; Morfolojik veriler irdelendiğinde, koyu pigmentasyonun bazı erlenlerde çalkalama hızı artıkça artırdığı gözlemlendi. Bununla birlikte normal fotoperiyot ortamında göre erlenlerde herhangi bir kümeleşme gözlenmedi. Sayısal veriler değerlendirildiğinde, yaklaşık bir aylık inkübasyonun sonunda 90 rpm hızla çalkalama da ortalama yaş ağırlık $0,0855 \pm 0.0116$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0092 \pm 0.0014$ gr olarak, 100 rpm hızla çalkamada ortalama yaş ağırlık $0,1171 \pm 0.0098$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0121 \pm 0.0008$ gr olarak, 110 rpm ortalama yaş ağırlık $0,0724 \pm 0.0043$ gr, ortalama kuru ağırlık $0,0103 \pm 0.0006$ gr olarak hesaplandı. Yaş ve kuru ağırlıklar bakımından farklı 90 rpm ile 110 rpm çalkalama hızlarında inkübe edilen kotiledon yaprağı süspansiyonlarına göre 100 rpm çalkalama hızlarında inkübe edilen kotiledon yaprağı süspansiyonları arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. 90 rpm ve 110 rpm çalkalama hızlarında inkübasyona göre 100 rpm çalkalama hızında, daha yüksek yaş ve kuru ağırlık hesaplandı.

Sonuç olarak, normal fotoperiyotta inkübe edilen süspansiyonlarda kümeleşme gözlenmesi, bununla birlikte maksimum yaş ve kuru ağırlığın karanlıkta inkübe edilen süspansiyonlara göre düşük olması nedeniyle, büyüme eğrisi çalışmalarında karanlık ortamda inkübasyon ve 100 rpm çalkalama hızı kullanılmasına karar verildi.

4.3.4. Kök ve Kotiledon Yapağı Süspansiyon Kültürlerinde Büyümenin Karakterizasyonu Çalışmaları

4.3. başlığı altında ifade edildiği üzere, uygun nitelikteki kalluslardan süspansiyon kültürlerinin oluşturulmuş olması devamında, yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, kök ve kotiledon yapraklarının en uygun çoğaltma metodunun belirlenmesi sonrasında elisitasyon uygulaması için önemli bir aşama olan büyüme eğrisinin belirlenmesi çalışmalarına geçildi.

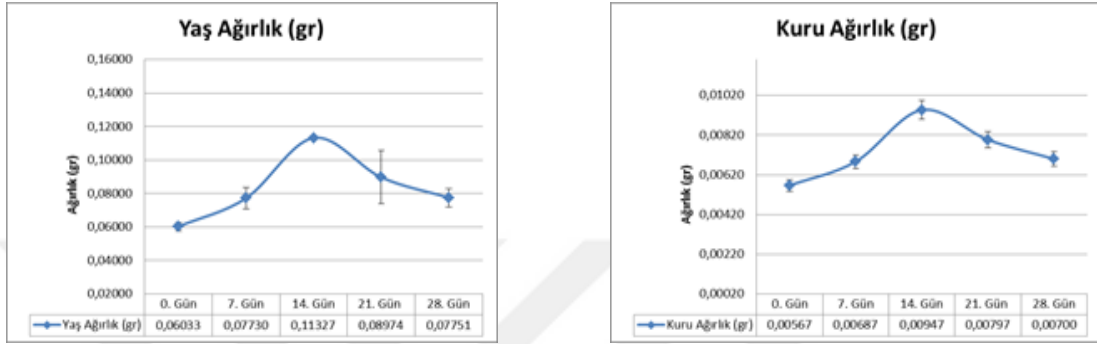
Kök ve kotiledon yapağı stok süspansiyon kültür hatlarına ait kültürlerin alt kültürleme sürecinde, her bir ölçüm günü için 5 erlen oluşturuldu. 250 ml lik bir erlene 50 ml kültür 50 ml taze besi ortamı (Kök süspansiyonları için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA, kotiledon yapağı süspansiyonları için; LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D) ilave edilerek hazırlanan kök ve kotiledon yaprakları süspansiyonları ait kültürler BBO'da sırasıyla 110 rpm ve 100 rpm çalkalama hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde yaklaşık bir ay inkübe edildi. İnkübasyona başlanan gün (0. Gün) ve akabinde her yedi günde 28. güne kadar, inkübasyonu tamamlanan erlenler BBO'da bulunan çalkayıcılar üzerinde alınarak hem kök hem de kotiledon yapağı süspansiyonlarına ait yaş ve kuru ağırlıklar hesaplandı ve büyüme eğrileri oluşturuldu. Oluşturulan eğriler sırasıyla Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da sunuldu.



Şekil 4.29: Kök süspansiyonuna ait büyüme eğrileri.

Şekil 4.29 irdelendiğinde, inkübasyonun ilk günü hesaplanan ortalama yaş ağırlık 0.0847 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0077 gr olarak, inkübasyonun 7. günü ortalama yaş ağırlık 0.1013 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0092 gr olarak, inkübasyonun 14. günü ortalama yaş ağırlık 0.1024 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0093 gr olarak, inkübasyonun 21. günü ortalama yaş ağırlık 0.1112 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0105 gr olarak ve inkübasyonun 28. günü ortalama yaş ağırlık 0.0852

gr, ortalama kuru ağırlık 0.0077 gr olarak hesaplandı. İnkübasyonun başlangıcından itibaren 21. güne kadar inkübasyonda ortalama yaş ve kuru ağırlıklarda artış hesaplanırken, 21. günden sonra inkübasyonda ise ortalama yaş ve kuru ağırlıklarda azalmalar hesaplandı. Sonuç olarak kök süspansiyon hatlarında şikonin miktarının arttırılmasına yönelik elisitasyon uygulaması çalışmaları için elisitasyon uygulama zamanı olarak inkübasyonun 20. günü olarak tespit edildi.



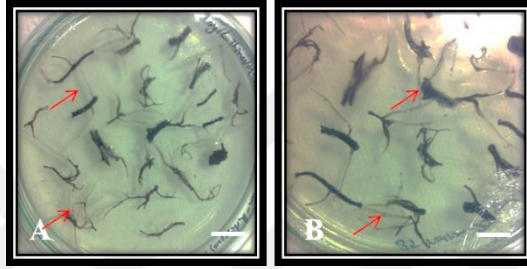
Şekil 4.30: Kotiledon yaprağı süspansiyonuna ait büyüme eğrileri.

Şekil 4.30 irdelendiğinde, inkübasyonun ilk günü hesaplanan ortalama yaş ağırlık 0.0603 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0057 gr olarak, inkübasyonun 7. günü ortalama yaş ağırlık 0.0773 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0069 gr olarak, inkübasyonun 14. günü ortalama yaş ağırlık 0.1133 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0095 gr olarak, inkübasyonun 21. günü ortalama yaş ağırlık 0.0897 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0080 gr olarak ve inkübasyonun 28. günü ortalama yaş ağırlık 0.0775 gr, ortalama kuru ağırlık 0.0070 gr olarak hesaplandı. İnkübasyonun başlangıcından itibaren 14. güne kadar inkübasyonda ortalama yaş ve kuru ağırlıklarda artış hesaplanırken, 14. günden sonra inkübasyonda ise ortalama yaş ve kuru ağırlıklarda azalmalar hesaplandı. Sonuç olarak kotiledon yaprağı süspansiyon hatlarında yağ asidi miktarının arttırılmasına yönelik gerçekleştirilecek elisitasyon uygulaması çalışmaları için elisitasyon uygulama zamanı olarak inkübasyonun 14. günü olarak tespit edildi.

4.4. ÇİMLENEN TOHURLARDAN ELDE EDİLEN KÖKLERDEN SAÇAK KÖK KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

4.4.1. Tohum Kaynaklı Köklerden Saçak Kök Kültürü Oluşturma Çalışmaları

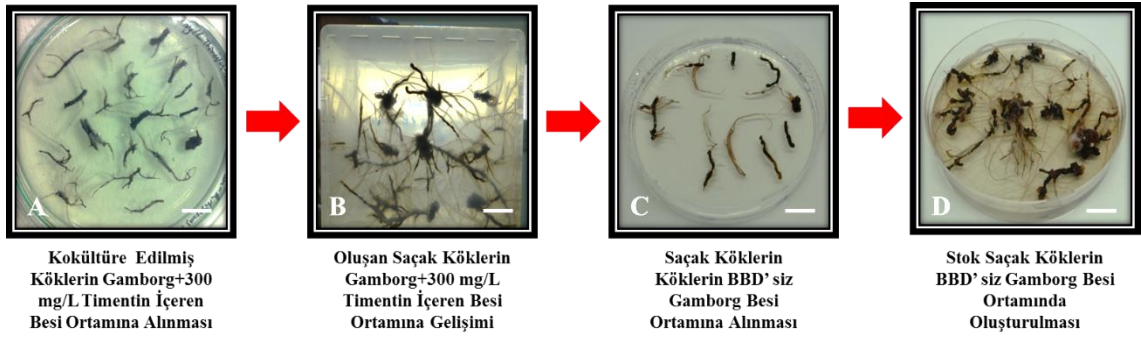
Çimlenen tohumlardan elde edilen kökler, 3.2.5.1. başlığında ifade edildiği üzere modifiye edilerek uygulanan metot kapsamında saçak kökler elde edildi. *A. tumefaciens* ile tohum kaynaklı köklerin birlikte kültüre edilmesinden sonra inkübe edildiği besi ortamında, yaklaşık 1 hafta içinde saçak kökler gözlemlendi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31: Saçak kök oluşturulması (Barlar: 0.8 cm).

4.4.2. Oluşturulan Saçak Kök Kültürlerinden Stok Saçak Kök Kültürü Oluşturma Çalışmaları

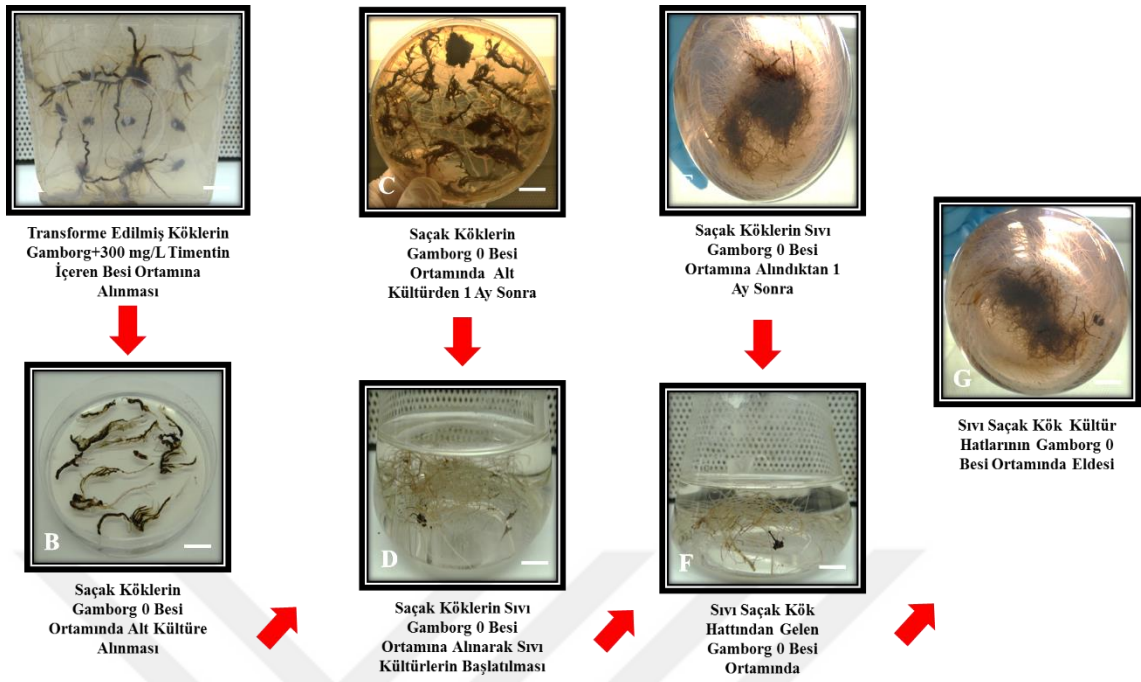
3.2.5.1. başlığı altında gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında elde edilen saçak kökler (Şekil 4.31), 3.2.5.2. başlığı altında ifade edildiği üzere *A. tumefaciens*'in ortamdaki eliminasyonu için Timentin içeren besi ortamlarında inkübasyonu ardından, *A. tumefaciens*'in tamamen elimine olması sonrası, oluşan saçak kökler BBD içermeyen Gamborg besi ortamında karanlık ortamda BBO'da birer aylık periyotlar halinde inkübe edilerek stok saçak kök kültürleri elde edildi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32: Saçak kök kültürlerinden stok saçak kök kültürleri oluşturulması. A) *A. tumefaciens* enfeksiyonu sonrası saçak köklerin oluşumu, B) Saçak köklerin gelişimi, C) Saçak köklerin alt kültüre edilmesi, D) Saçak köklerden stok saçak kök kültürlerinin elde edilmesi (Barlar: 1.1 cm).

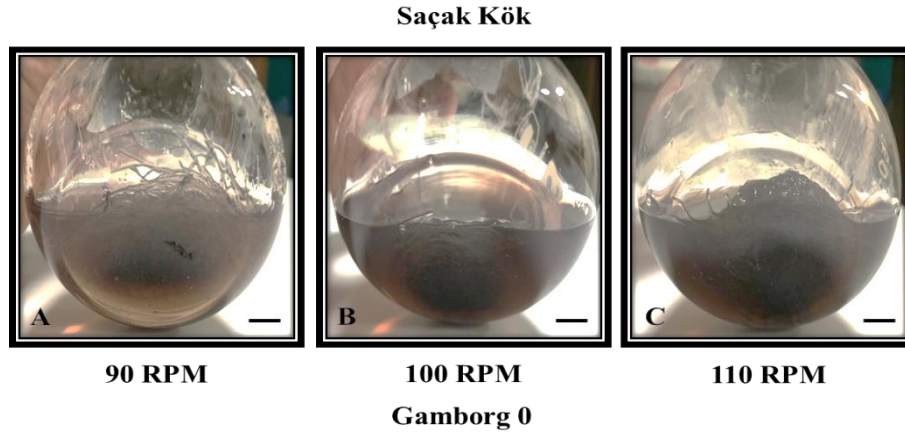
4.4.3. Stok Saçak Kök Kültürlerinden Sıvı Ortamda Stok Saçak Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Optimizasyon Çalışmaları

4.4.2 başlığı altında ifade edildiği üzere yarı katı besi ortamda elde edilen stok saçak kök kültürlerinden, şikonin ve türevlerinin üretilmesi ve bazı fiziksel ve kimyasal uyarıcılarla miktarlarının artırılması çalışması kapsamında saçak kökler sıvı Gamborg 0 besi ortamında kültürlendi. Çalışma 3.2.5.3 başlığı altında ifade edilen ve Şekil 3.20' de sunulan metot ile saçak köklerin sıvı Gamborg 0 besi ortamında ve 100 rpm ayarlı çalkalayıcılar üzerinde karanlık ortamda BBO'da inkübasyonu gerçekleştirilerek sıvı ortamda stok saçak kök kültürleri elde edildi (Şekil 4.33).

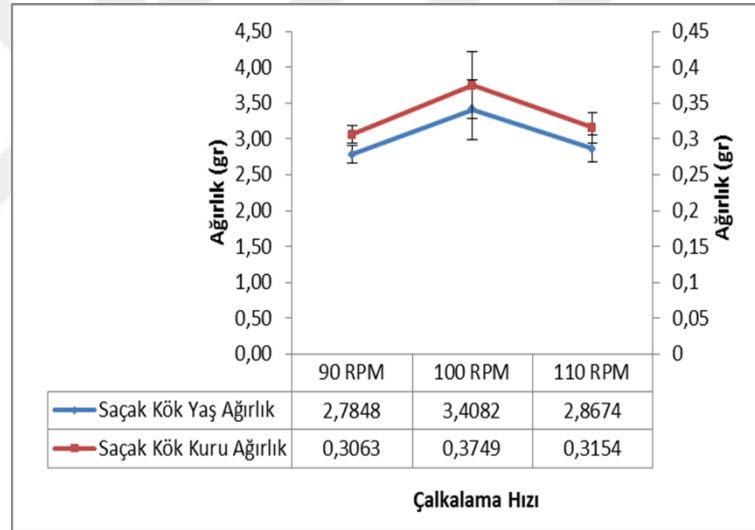


Şekil 4.33: Sıvı Gamborg 0 besi ortamında stok saçak kök kültürlerinin oluşturulması. A) Yarı katı Gamborg 0 besi ortamında saçak kökleri, B) Yarı katı besi ortamında saçak köklerin alt kültür edilmesi, C) Yarı katı ortamda stok saçak kök kültürlerinin elde edilmesi, D) Yarı katı besi ortamındaki saçak köklerin sıvı Gamborg 0 besi ortamına alınması, E) Sıvı besi ortamında saçak köklerin büyümesi, F) Sıvı ortamda gelişen saçak köklerin alt kültür edilmesi, G) Sıvı ortamda stok saçak kök kültürlerinin elde edilmesi (Barlar: 1.3 cm).

Sıvı besi ortamında ortamda stok saçak kök kültürlerinin elde edilmesinin ardından, saçak köklerin sıvı ortamdaki büyümelerinin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi. Sıvı Gamborg 0 besi ortamında elde edilen saçak köklerin, alt kültürlenme sürecinde, 3.2.5.3. başlığı altında ifade edildiği üzere eşit miktarda alınan saçak kökleri 250 ml erlen içerisine alınarak üzerine 100 ml sıvı Gamborg 0 besi ortamı aktarılıp gerekli kapatılma işlemleri gerçekleştirilerek 90-100 ve 110 rpm hızlarına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde (her çalkalama hızı için ayrı grup erlenler hazırlandı) karanlık ortamda BBO'da inkübe edildi. İnkübasyon sonrası morfolojik gözlemlere ait sonuçlar (Şekil 4.34), sayısal değerlere ait grafikler (Şekil 4.35) ve istatistikî değerlendirmeler (Tablo 4.14)'de sunuldu.



Şekil 4.34: Sıvı Gamborg 0 besi ortamında farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası saçak kökler (Barlar: 1.2 cm).



Şekil 4.35: Sıvı Gamborg 0 besi ortamında farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası saçak köklerin büyümelerine ait grafik.

Tablo 4.14: Farklı çalkalama hızlarına sahip çalkalayıcılar üzerinde ve karanlık ortamda yaklaşık bir ay inkübasyonu sonrası saçak köklerin büyümelerine ait sonuçlar.

Çalkalama Hızı (RPM)	Yaş Ağırlık (gr) Ort+SH	Kuru Ağırlık (gr) Ort+SH
90	2.7848±0.1176b	0.3063±0.0129b
100	3.4082±0.4238a	0.3749±0.0466a
110	2.8674±0.1924ab	0.3154±0.0212ab

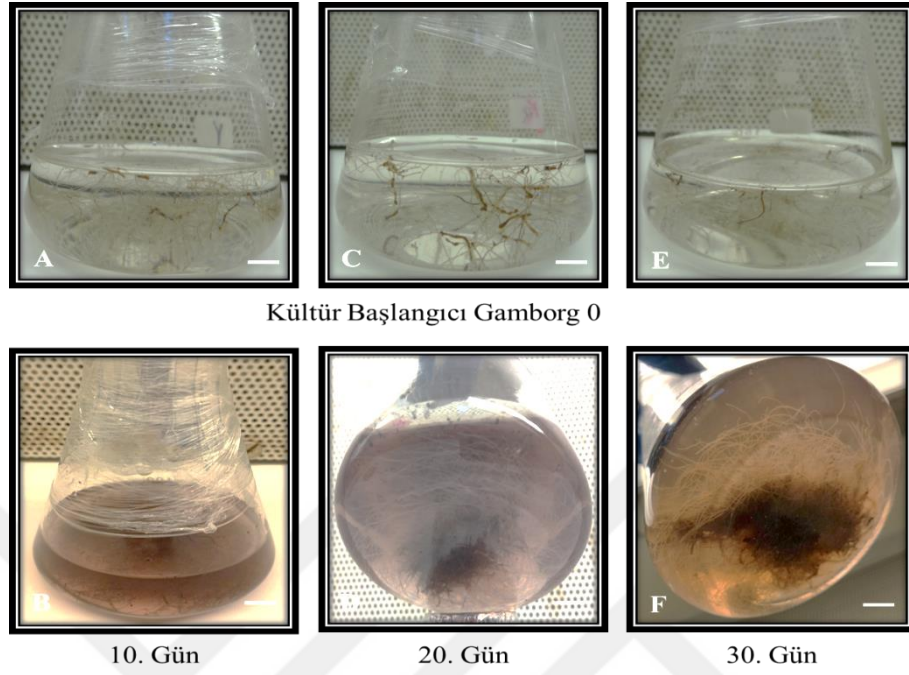
Her denemede ortalama 10 erlen kültür kullanıldı.

Şekil 4.34, Şekil 4.35 ve Tablo 4.14'e göre; Morfolojik veriler irdelendiğinde, koyu pigmentasyonun bazı erlenlerde çalkalama hızına paralel olarak artış gösterdiği, bununla birlikte yüksek çalkalama hızının (110 rpm) saçak köklerde kırılmalar meydana getirdiği gözlemlendi. Sayısal veriler değerlendirildiğinde, yaklaşık bir aylık inkübasyonun sonunda 90 rpm hızla çalkalamada ortalama yaş ağırlık 2.7848 ± 0.1176 gr, ortalama kuru ağırlık 0.3063 ± 0.0129 gr olarak, 100 rpm hızla çalkamada ortalama yaş ağırlık 3.4082 ± 0.4238 gr, ortalama kuru ağırlık 0.3749 ± 0.0466 gr olarak, 110 rpm ortalama yaş ağırlık 2.8674 ± 0.1924 gr, ortalama kuru ağırlık 0.3154 ± 0.0212 gr olarak hesaplandı. Yaş ve kuru ağırlıklar bakımından 100 rpm çalkalama hızında inkübe edilen saçak köklere göre 110 rpm çalkalama hızında inkübe edilen saçak kökleri arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, 90 rpm çalkalama hızında inkübe edilen saçak kökleri arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. Saçak köklerin 90 ve 110 rpm çalkalama hızlarında inkübasyonuna göre 100 rpm çalkalama hızında inkübasyonunda daha yüksek yaş ve kuru ağırlık hesaplandı.

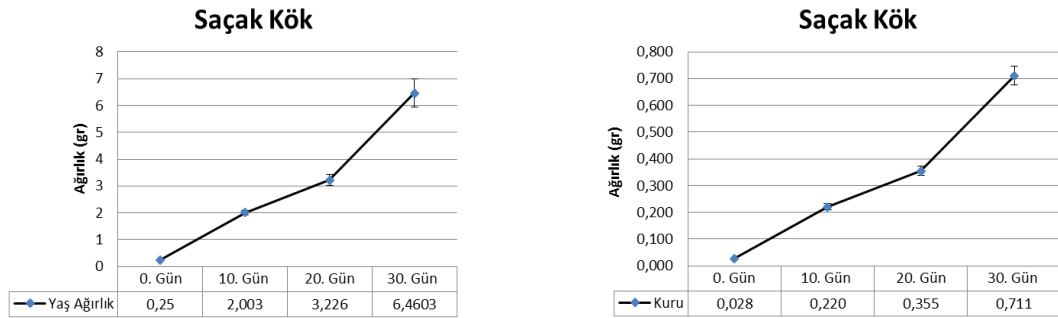
Sonuç olarak, 110 rpm hızında çalkalanan saçak köklerde kırılmalar, bununla birlikte 90 ve 110 rpm çalkama hızlarında inkübe edilen saçak köklerde hesaplanan yaş ve kuru ağırlığın 100 rpm çalkalama hızında inkübe edilen saçak köklerde hesaplanan yaş ve kuru ağırlıktan düşük olması sebebiyle, büyüme eğrisi çalışmalarında 100 rpm çalkalama hızı kullanılmasına karar verildi.

4.4.4. Sıvı Gamborg 0 Besi Ortamındaki Saçak Kök Kültürlerinde Büyümenin Karakterizasyonu Çalışmaları

3.2.5.1., 3.2.5.2., 3.2.5.3. başlıkları kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonucunda 4.4.1, 4.4.2 ve 4.4.3 başlığı altında elde edilen veriler kullanılarak, şikonin ve türevlerinin üretilmesi ve miktarının artırılmasında uygulanacak olan fiziksel ve kimyasal uyarıcıların uygulama zamanının belirlenmesi amacıyla, 3.2.5.4. başlığı altında ifade edilen metod kapsamında, sıvı Gamborg 0 besi ortamında elde edilen stok saçak kök kültürlerinin alt kültürleme sürecinde, ölçümü yapılacak her gün için 5 erlen hazırlandı. 250 ml lik erlen içerisine yaklaşık 0.25 gr saçak kök alınarak üzerine 100 ml sıvı Gamborg 0 besi ortamı eklendi ve gerekli kapatılma işlemi yapılarak 100 rpm hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde karanlık ortamda BBO'da yaklaşık bir ay inkübe edildi. İnkübasyona başlanan gün (0. gün) ve akabinde her on günde 30. güne kadar, inkübasyonu tamamlanan erlenler, BBO'da bulunan çalkalayıcılar üzerinden alınarak (Şekil 4.36) saçak köklere ait yaş ve kuru ağırlıklar hesaplanarak büyüme eğrileri oluşturuldu Şekil 4.37'de sunuldu.



Şekil 4.36: Sıvı Gamborg 0 besi ortamında saçak köklerin farklı günlerde gelişimleri (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.37: Saçak kök kültürlerine ait büyüme eğrileri.

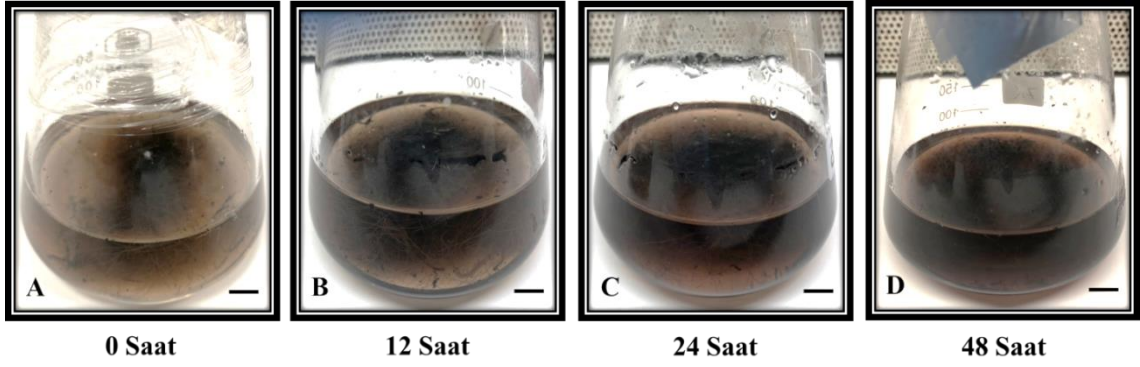
Şekil 4.36 ve Şekil 4.37 değerlendirildiğinde, inkübasyon süresi arttıkça besi ortamındaki pigmentasyona ait koyuluk arttığı gözlemlendi (20. günden itibaren). Bununla birlikte, inkübasyonun ilk gününde hesaplanan ortalama yaş ağırlık 0.25gr, ortalama kuru ağırlık 0.28 gr olarak, inkübasyonun 10. günü ortalama yaş ağırlık 2.0030gr, ortalama kuru ağırlık 0.2200gr olarak, inkübasyonun 20. günü ortalama yaş ağırlık 3.2260 gr, ortalama kuru ağırlık 0.3550 gr

olarak, inkübasyonun 30. günü ortalama yaş ağırlık 6.4603gr, ortalama kuru ağırlık 0.7110gr olarak hesaplandı. İnkübasyonun başlangıcından itibaren 20. güne kadar inkübasyonda ortalama yaş ve kuru ağırlıklarda lineer artış hesaplanırken, 20. günden sonra inkübasyonda ise ortalama yaş ve kuru ağırlıklarda logaritmik artış hesaplandı. Ancak, her ne kadar 20. günden itibaren logaritmik bir büyüme olsa da, besi ortamında pigemntasyonda koyulaşma artmaktadır. Sonuç olarak şikonin miktarının arttırılmasına yönelik elisitasyon uygulaması çalışmaları için elisitasyon uygulama zamanı olarak inkübasyonun 20. günü olarak tespit edildi.

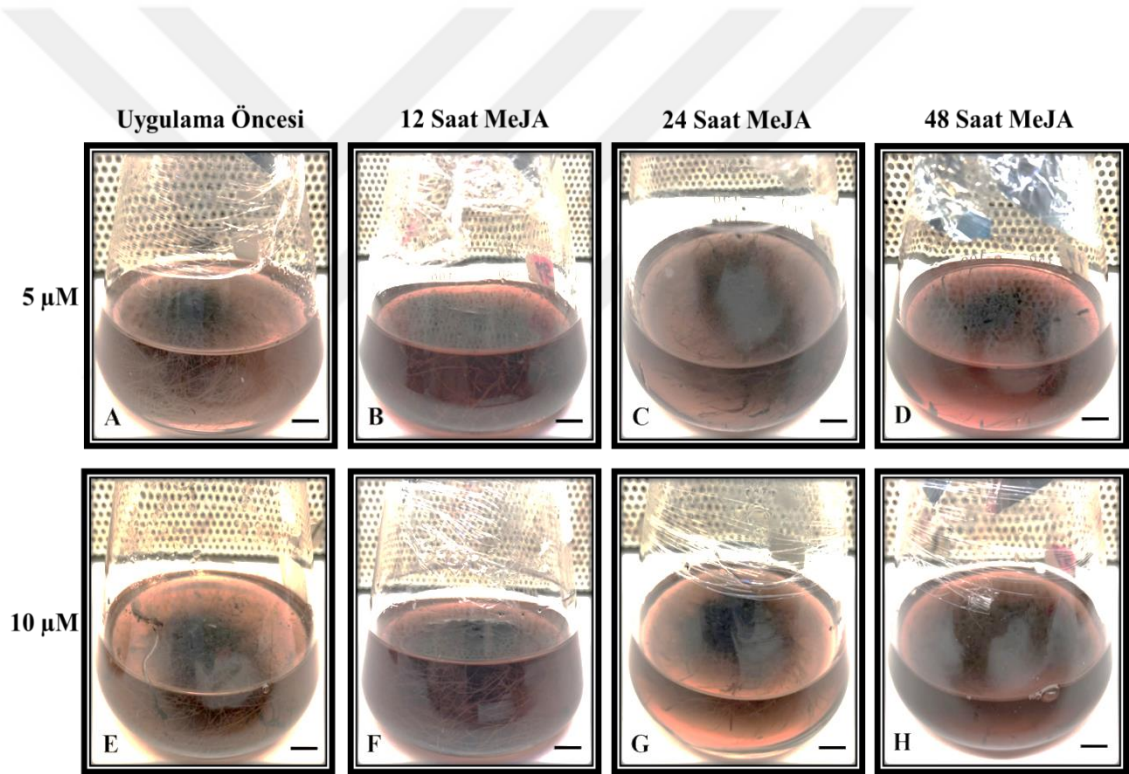
4.5. KÖK VE KOTİLEDON YAPRAĞI SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ İLE SIVI ORTAMDAKİ SAÇAK KÖK KÜLTÜRLERİNDE METABOLİT ÜRETİMİ ve ARTTIRIMI İÇİN ELİSİTASYON UYGULAMALARINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

4.5.1. Sıvı Saçak Kök Kültürlerinde Şikonin Tipi ve Miktarının Elisitasyon Uygulamaları ile Arttırılması Çalışması

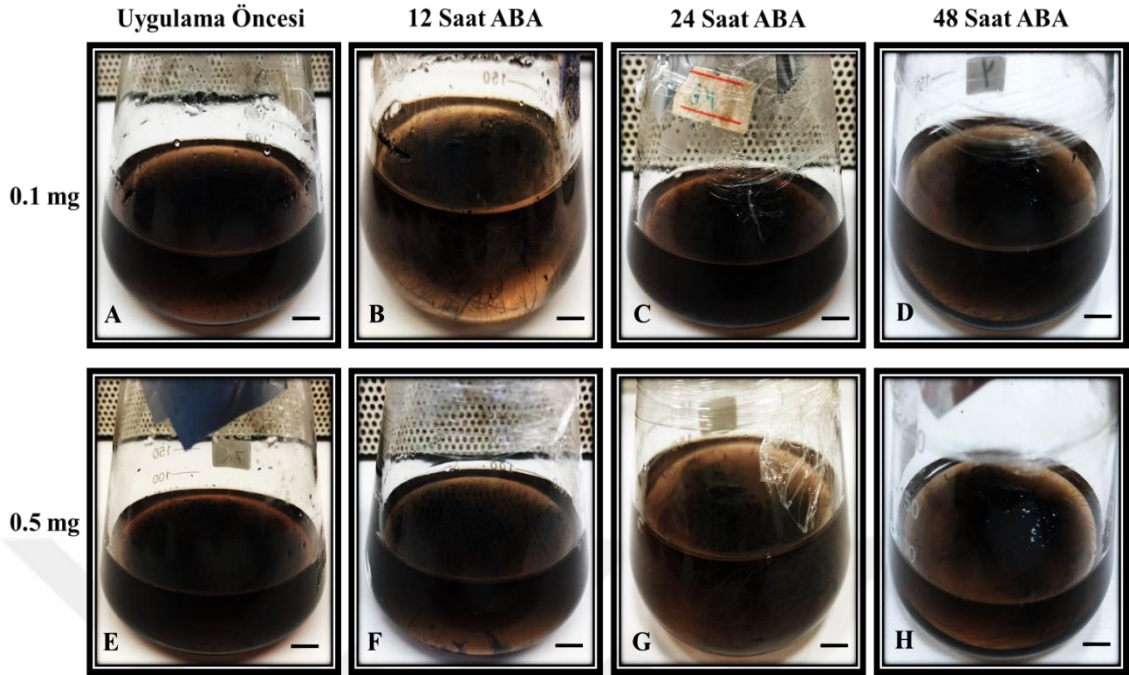
3.2.6 başlığı altında Tablo 3.7’de ifade edilen elisitasyon tipleri, miktarları ve süreleri, sıvı saçak kök kültürlerine uygulanarak şikonin tipi ve miktarının arttırılması hedeflenmiştir. Çalışmada, alt kültür süreci içindeki sıvı saçak kök kültürü hatları, her bir çalışma için ortalama 10 erlen olacak şekilde 250 ml erlene 0.5 gr saçak kök, 100 ml taze besi ortamı (Gamborg 0) ilave edilip alt kültür işlemi tamamlandıktan sonra, gerekli kapatma işlemlerinin ardından 100 rpm hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde elisitasyon uygulama zamanına kadar (20. gün) karanlık ortamda ve BBO’da inkübe edildi. İnkübasyonun 20. gününde çalkalayıcılar üzerinden alınan erlenlere Tablo 3.7’de sunulan tabloda ifade edildiği gibi elisitasyonlar uygulandı. Kontrol gruplarında; erlenlerin ağızları açılmadan BBO’daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyona devam edildi, MeJA, ABA, DMSO gruplarında; erlenlere steril ortam koşullarında kimyasallar ilave edilerek yeniden kapatıldı ve BBO’daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyon yeniden bırakıldı, +4 °C gruplarında; erlenlerin ağızları açılmadan, buzdolabı içerisine alınan çalkalayıcılar üzerine bırakılarak inkübasyona devam edildi. Elisitasyon süreçleri için belirlenen zaman dilimleri sonunda, morfolojik gözlemler Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekli 4.40, Şekil 4.41 ve Şekil 4.42’de yaş ve kuru ağırlıkları hesaplanarak Tablo 4.15’de sunuldu. Kuru ağırlıkları hesaplanan saçak kökler şikonin tipi ve miktarları belirleme çalışmaları için saklandı.



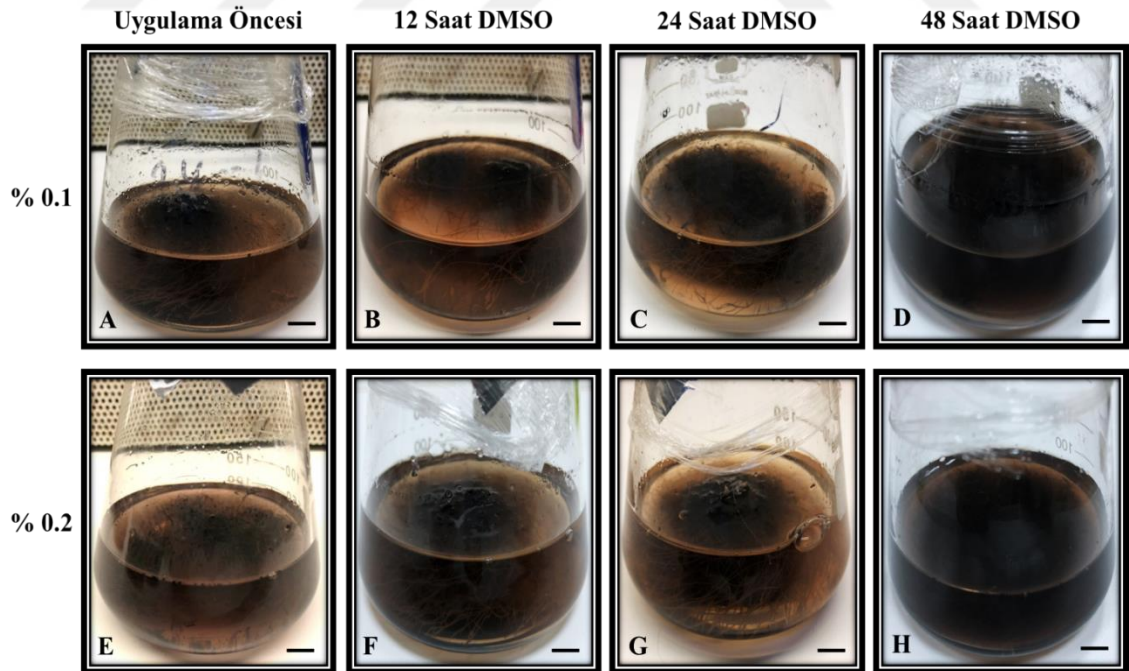
Şekil 4.38: Sıvı saçak kök kültürlerinde elisitasyon uygulamasına ait kontroller (Barlar: 1.4 cm).



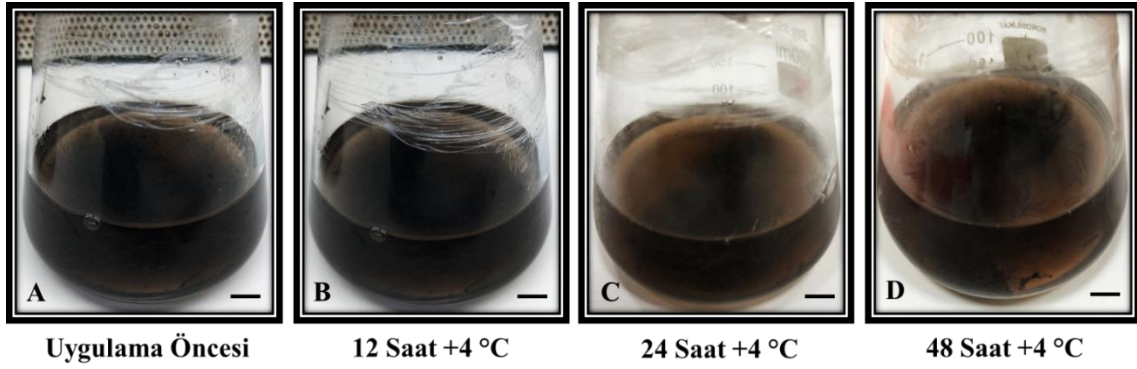
Şekil 4.39: Sıvı saçak kök kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde MeJA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.40: Sıvı saçak kök kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde ABA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.41: Sıvı saçak kök kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde DMSO uygulaması (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.42: Sıvı saçak kök kültürlerine farklı sürelerde soğuk uygulaması (Barlar: 1.4 cm).

Tablo 4.15: Sıvı saçak kök kültürlerine elisitasyon uygulaması sonrası saçak köklere ait yaş ve kuru ağırlıklar.

Elisitasyon Uygulama Tipi ve Miktarı	Ortalama Yaş Ağırlık (mg)				Ortalama Kuru Ağırlık (mg)			
	Uygulama Süresi (Saat)							
	0	12	24	48	0	12	24	48
Kontrol	2.48±0.22	3.20±0.21ab	3.20±0.26c	3.26±0.29abc	0.27±0.03	0.35±0.02ab	0.35±0.03c	0.35±0.03abc
MeJA (5 µM)		3.79±0.36a	4.31±0.46ab	3.65±0.21ab	0.41±0.04a		0.47±0.05ab	0.40±0.02ab
MeJA (10 µM)		3.62±0.32ab	2.88±0.27c	2.59±0.10cd	0.40±0.03ab		0.32±0.03c	0.29±0.01cd
ABA (0.1 mg)		2.62±0.39b	3.84±0.24bc	3.14±0.24abc	0.29±0.04b		0.42±0.03bc	0.35±0.03abc
ABA (0.5 mg)		2.84±0.32ab	2.86±0.17c	3.00±0.26bc	0.31±0.04ab		0.32±0.02c	0.33±0.03bc
DMSO (% 0.1)		3.26±0.47ab	4.89±0.58a	3.25±0.32abc	0.36±0.05ab		0.54±0.06a	0.36±0.04abc
DMSO (% 0.2)		2.93±0.15ab	3.78±0.26bc	3.79±0.33a	0.32±0.02ab		0.42±0.02bc	0.42±0.04a
Soğuk (+4 °C)		3.11±0.43ab	2.76±0.20c	2.22±0.02d	0.35±0.05ab		0.30±0.02c	0.25±0.01d

Her denemede ortama 10 erlen kültür kullanıldı.

Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.41 ve Şekil 4.42 irdelendiğinde; ABA, DMSO ve soğuk denemelerine göre MeJA'nın denenen iki farklı konsantrasyonunda besi ortamlarında belirgin kırmızılıklar devam etmektedir. MeJA dışındaki diğer denemelerde besi ortamları koyu kırmızı bir renk aldığı gözlemlendi. Tablo 4.15 irdelendiğinde, saçak kök kitlesi bakımından MeJA ve DMSO'daki düşük konsantrasyon denemelerinin diğer ortamlardaki denemelere göre özellikle 24 saat uygulamalarında daha fazla miktarda olduğu gözlemlendi [5 µM MeJA 24 Saat (Yaş Ağırlık: 4.31±0.46 gr; Kuru Ağırlık: 0.47±0.05 gr); %0.1 DMSO 24 Saat (Yaş Ağırlık: 4.89±0.58 gr; Kuru Ağırlık: 0.54±0.06 gr)]. Bununla birlikte, kontrol ile denemelerde hesaplanan yaş ve kuru ağırlıklar arasında sayısal ve istatistiksel olarak paralellik tespit edildi. Genellikle büyüme fazının sonu olarak tespit edilen 20. gün gerçekleştirilen denemeler de doğrulanmış oldu. Çünkü 24. saatten 48. saate doğru büyüme, 12. saatten 24. saate kadar ki büyümeye oranla genelde ya çok zayıf ya da büyümede gerilemeler olduğu tespit edildi. En yüksek yaş ve kuru ağırlık 24 saat %0.1 DMSO (Yaş Ağırlık: 4.89±0.58 gr; Kuru Ağırlık: 0.54±0.06 gr) uygulamasında hesaplanırken, en düşük yaş ve kuru ağırlık 48 saat +4 °C (Yaş Ağırlık: 2.22±0.02 gr; Kuru Ağırlık: 0.25±0.01 gr) uygulamasında hesaplandı. Beklendiği gibi,

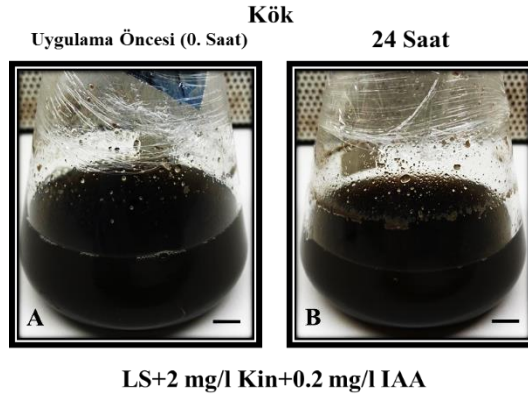
bitkinin asıl büyüme sıcaklığı ortalama 25 °C olduğu bilindiğinden, soğuk uygulama süresi arttıkça saçak kök gelişiminde gerileme olduğu hesaplandı. MeJA, ABA ve DMSO düşük doz uygulamalarında gelişimi olumlu etkilerken, yüksek doz ve uzun süre uygulamalarda ise gelişimi olumsuz yönde etkilediği hesaplandı. 12 Saat uygulamalarında, hem yaş hem kuru ağırlıklar bakımından MeJA (5 µM) ile Kontrol, MeJA (10 µM), ABA (0.5 mg), DMSO (% 0.1), DMSO (% 0.2) ve Soğuk (+4 °C) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, MeJA (5 µM) ile ABA (0.1 mg) arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. 24 saat uygulamalarında, hem yaş hem kuru ağırlıklar bakımından DMSO (% 0.1) ile MeJA (5 µM) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, Kontrol, DMSO (% 0.1) ile ABA (0.1 mg), ABA (0.5 mg), DMSO (% 0.2) ve Soğuk (+4 °C) arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. 48 Saat uygulamalarında, hem yaş hem kuru ağırlıklar bakımından DMSO (% 0.2) ile Kontrol, MeJA (5 µM), ABA (0.1 mg) ve DMSO (% 0.1) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, DMSO (% 0.2) ile ABA (0.5 mg) ve Soğuk (+4 °C) arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

4.5.2. Kök Süspansiyon Kültürlerinde Şikonin Tipi ve Miktarının Elisitasyon Uygulamaları ile Arttırılması Çalışması

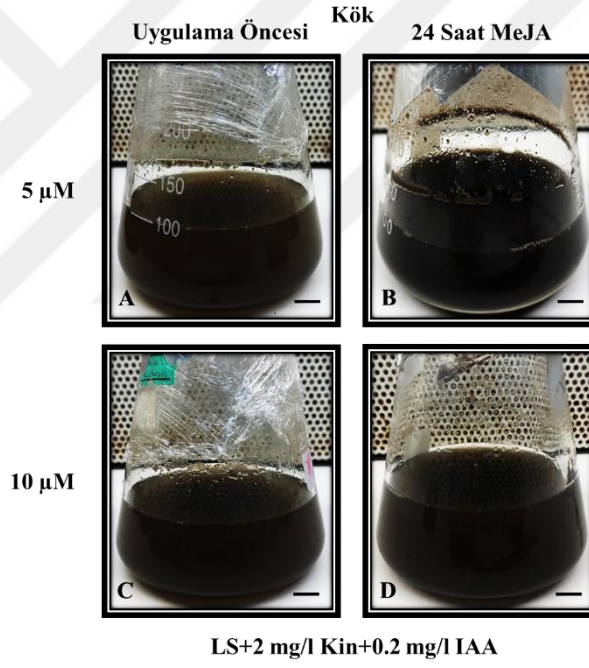
Saçak kök kültürlerine elisitasyon uygulaması sonrası elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kök süspansiyon hatları için farklı elisitasyon tipleri, miktarları ile tek bir süre uygulamasıyla (Başlık 3.2.6, Tablo 3.7) şikonin ve türevlerinin miktarlarının arttırılması hedeflenmiştir. Çalışmada, uygun nitelikteki (tamamen süspansiyon halindeki, kümeleşme meydana gelmeyen alt kültür sürecindeki) alt kültür süreci içindeki kök süspansiyon hatları, her bir çalışma için ortalama 10 Erlen olacak şekilde 250 ml Erlene 50 ml kültür 50 ml taze besi ortamı (LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA) ilave edilip alt kültür işlemi tamamlandıktan sonra, gerekli kapatma işlemlerinin ardından 100 rpm hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde elisitasyon uygulama zamanına kadar (21. gün) karanlık ortamda ve BBO'da inkübe edildi. İnkübasyonun 21. gününde çalkalayıcılar üzerinden alınan erlenlere Tablo 3.7'de sunulan tabloda ifade edildiği gibi elisitasyonlar uygulandı. Kontrol gruplarında; Erlenlerin ağızları açılmadan BBO'daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyona devam edildi, MeJA, Maya Özü (SC), AgNO₃ gruplarında; Erlenlere steril ortam koşullarında kimyasallar ilave edilerek yeniden kapatıldı ve BBO'daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyon yeniden bırakıldı. Elisitasyon süreçleri için belirlenen zaman dilimi sonunda inkübasyonlar sonlandırılarak, morfolojik gözlemler Şekil

4.43, Şekil 4.44, Şekli 4.45 ve Şekil 4.46’de yaş ve kuru ağırlıkları hesaplanarak Tablo 4.16’de sunuldu. Her bir deney grubu için geriye kalan kültür kaba filtre kağıdından geçirelerek oda sıcaklığında kurutuldu ve şikonin tipi ve miktarları belirleme çalışmaları için saklandı.

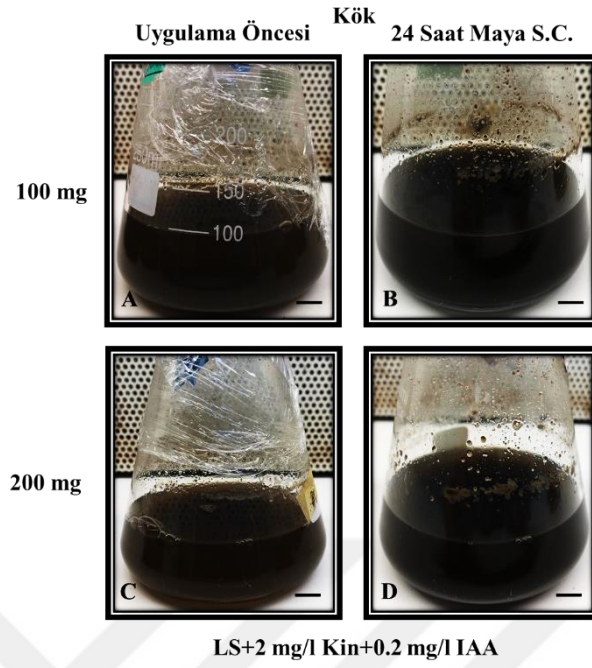




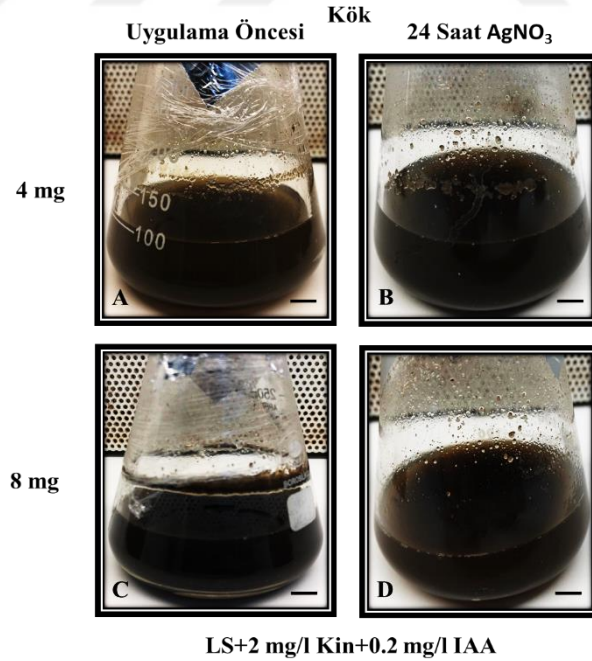
Şekil 4.43: Kök süspansiyon kültürlerinde elisitasyon uygulamasına ait kontroller (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.44: Kök süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonda MeJA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.45: Kök süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonda Maya Özütü (SC) uygulaması (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.46: Kök süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonda AgNO₃ uygulaması (Barlar: 1.4 cm).

Tablo 4.16: Kök süspansiyon kültürlerine elisitasyon uygulaması sonrası yaş ve kuru ağırlıklar.

Elisitasyon Uygulama Tipi ve Miktarı	Ortalama Yaş Ağırlık (gr)		Ortalama Kuru Ağırlık (gr)	
	Uygulama Süresi (Saat)			
	0	24	0	24
Kontrol	0.0411±0.0015	0.0497±0.0023b	0.0051±0.0004	0.0050±0.0005b
MeJA (5 µM)		0.0836±0.0024a		0.0068±0.0003a
MeJA (10 µM)		0.0798±0.0042a		0.0065±0.0005a
Maya Özütü (100mg/l)		0.0502±0.0033b		0.0054±0.0008b
Maya Özütü (200mg/l)		0.0567±0.0050b		0.0056±0.0006b
AgNO₃ (4 mg/l)		0.0577±0.0034b		0.0052±0.0003b
AgNO₃ (8 mg/l)		0.0544±0.0020b		0.0059±0.0006b

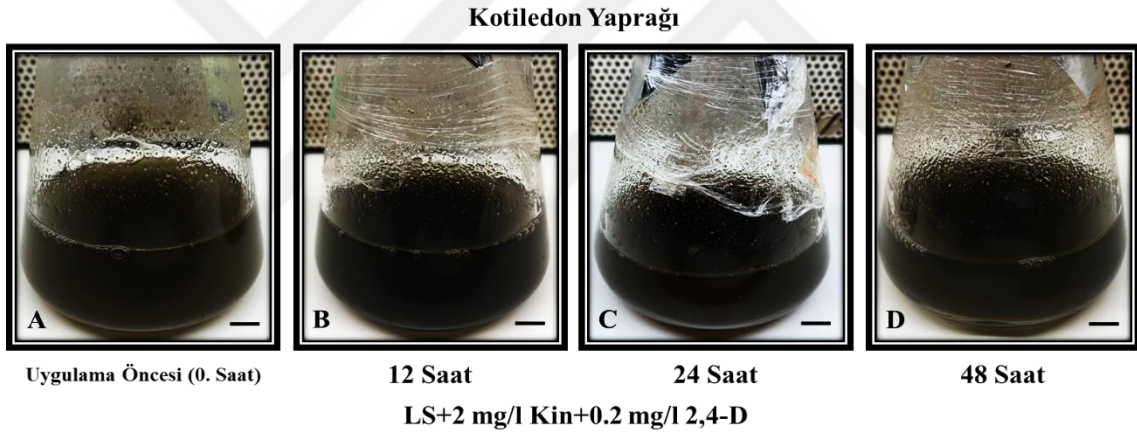
Her denemede ortama 10 erlen kültür kullanıldı.

Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.45 ve Şekil 4.46 irdelendiğinde; MeJA, Maya Özütü (SC) ve AgNO₃'ün denenen iki farklı konsantrasyonunda besi ortamlarında belirgin koyulaşmalar olduğu gözlemlendi. Ayrıca MeJA denemelerinde ise kırmızı pigmentasyon varlığı gözlemlendi. Tablo 4.16 irdelendiğinde kontrol ile denemelerdeki hesaplamalarda yaş ve kuru ağırlıklar arasında sayısal ve istatistiksel olarak paralellik tespit edildi. Saçak kök denemelerinde şikonin tip ve miktarının en fazla elde edildiği 24. Saat, kök süspansiyonu çalışmalarında tek uygulama zamanı olarak denemeler gerçekleştirildi. Kontrole göre gerçekleştirilen tüm denemelerde yaş ve kuru ağırlık miktarlarında artışlar tespit edildi. En yüksek yaş ve kuru ağırlık 24 saat 5µM MeJA (Yaş Ağırlık: 0.0836±0.0024 gr; Kuru Ağırlık: 0.0068±0.0003 gr) uygulamasında hesaplanırken, en düşük yaş ve kuru ağırlık kontrol (Yaş Ağırlık: 0.0497±0.0023 gr; Kuru Ağırlık: 0.0050±0.0005 gr)'de hesaplandı. Hem yaş hem kuru ağırlıklar bakımından MeJA (5 µM) ile MeJA (10 µM) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, MeJA (5 µM) ile Kontrol, Maya Özütü (SC) (100 mg/l), Maya Özütü (SC) (200 mg/l), AgNO₃ (4 mg/l) ve AgNO₃ (8 mg/l) arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

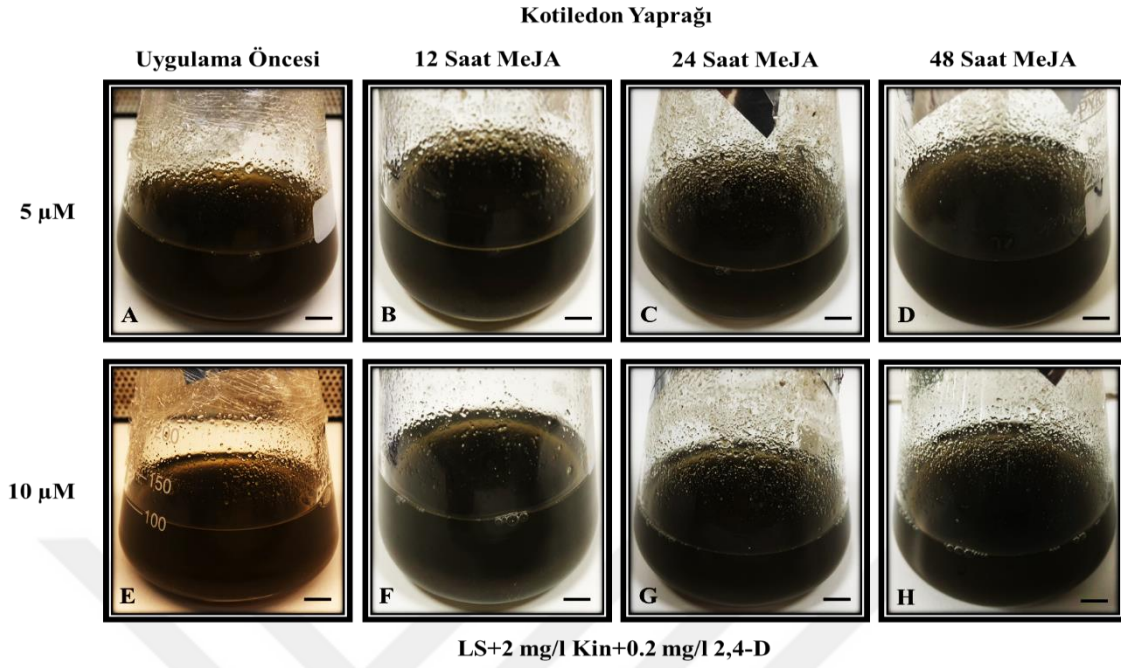
4.5.3. Kotiledon Yaprağı Süspansiyon Kültürlerinde Yağ Asidi Miktarlarının Elisitasyon Uygulamaları ile Arttırılması Çalışması

3.2.6 başlığı altında Tablo 3.7'de ifade edilen elisitasyon tipleri, miktarları ve süreleri, kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine uygulanarak yağ asidi miktarının arttırılması hedeflenmiştir. Çalışmada, uygun nitelikte (tamamen süspanse halindeki, kümeleşme meydana gelmeyen alt kültür sürecindeki) alt kültür süreci içindeki kotiledon yaprağı süspansiyon hatları, her bir çalışma için ortalama 10 erlen olacak şekilde 250 ml erlene 50 ml kültür 50 ml taze besi ortamı (LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D) ilave edilip alt kültür işlemi tamamlandıktan sonra, gerekli kapatma işlemlerinin ardından 100 rpm hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde elisitasyon

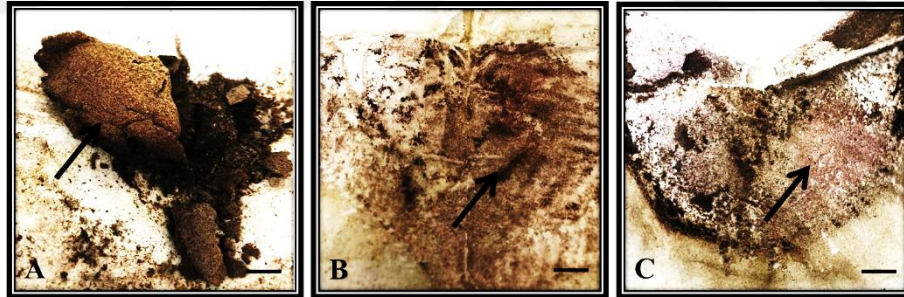
uygulama zamanına kadar (14. gün) karanlık ortamda ve BBO'da inkübe edildi. İnkübasyonun 14. gününde çalkalayıcılar üzerinden alınan erlenlere Tablo 3.7'de sunulan tabloda ifade edildiği gibi elisitasyonlar uygulandı. Kontrol gruplarında; erlenlerin ağızları açılmadan BBO'daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyona devam edildi, MeJA, ABA, DMSO gruplarında; erlenlere steril ortam koşullarında kimyasallar ilave edilerek yeniden kapatıldı ve BBO'daki çalkalayıcılar üzerinde yeniden inkübasyon bırakıldı, +4 °C gruplarında; erlenlerin ağızları açılmadan, buzdolabı içerisine alınan çalkalayıcılar üzerine bırakılarak inkübasyona devam edildi. Elisitasyon süreçleri için belirlenen zaman dilimleri sonunda, morfolojik gözlemler Şekil 4.47, Şekil 4.48, Şekli 4.49, Şekil 4.50, Şekil 4.51 ve Şekil 4.52'de yağ ve kuru ağırlıkları hesaplanarak Tablo 4.17'de sunuldu. Her bir deney grubu için geriye kalan kültür kaba filtreden geçirelerek oda sıcaklığında kurutuldu ve yağ asidi tipi ve miktarları belirleme çalışmaları için saklandı.



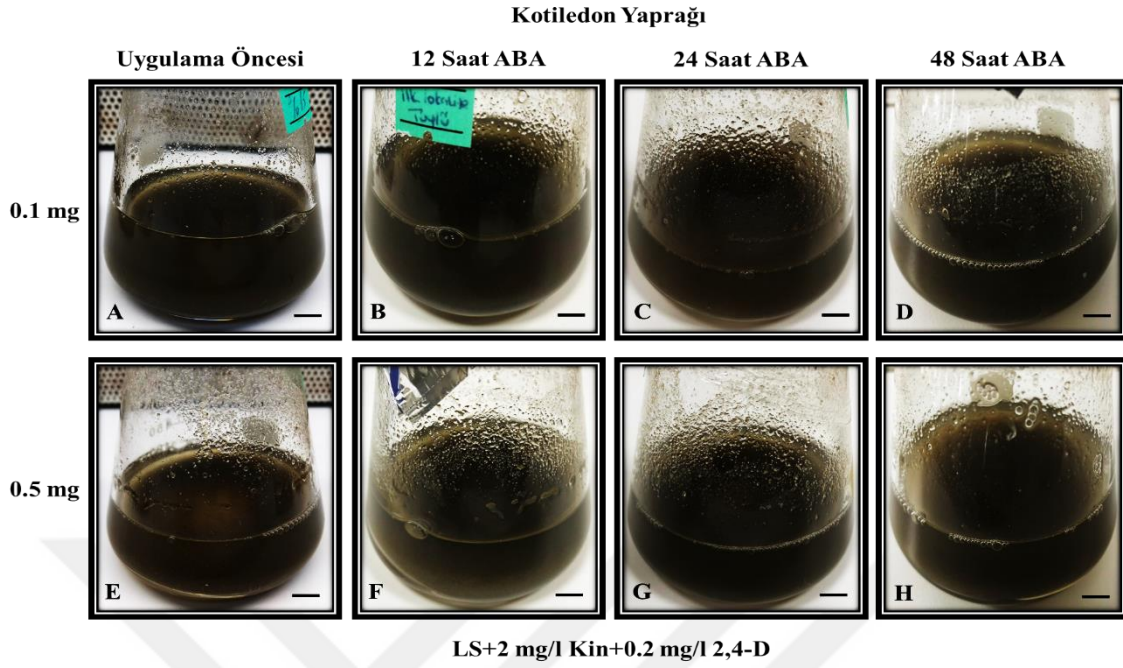
Şekil 4.47: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinde elisitasyon uygulamasına ait kontroller (Barlar: 1.4 cm).



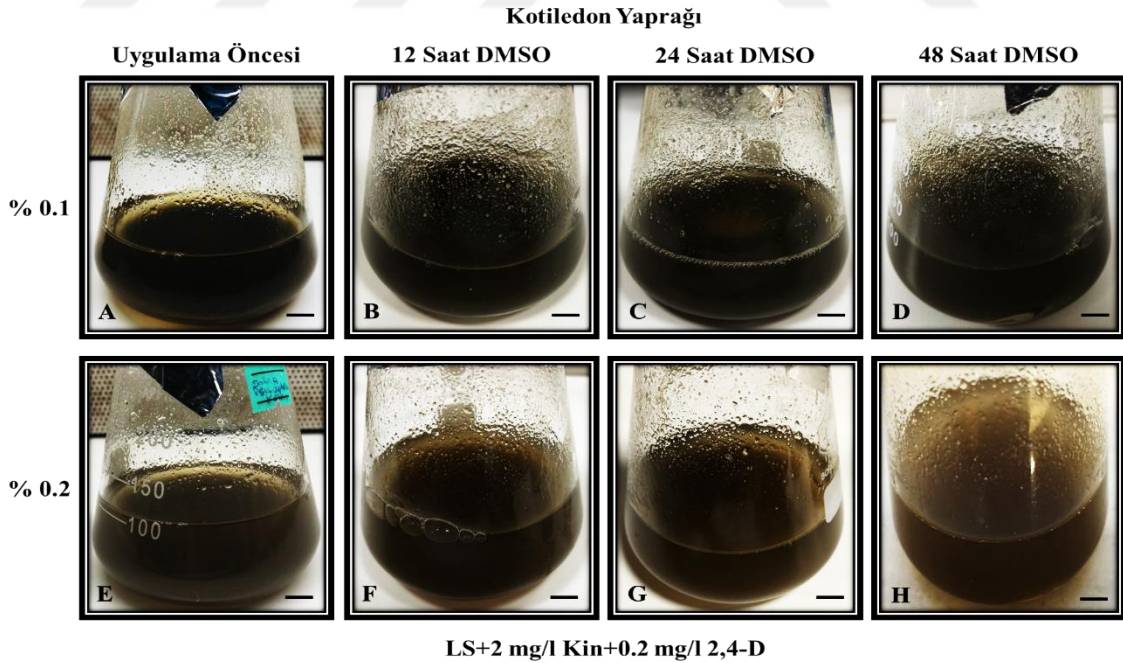
Şekil 4.48: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde MeJA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.49: Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine 10 μ M (24 Saat) MeJA uygulaması sonrası kaba filtreden geçirilen A) kuru örnek, B ve C) kuru örneğin filtre kağıdı üzerinde bıraktığı pigmentler, oklar kırmızı pigmentleri göstermektedir (Barlar 1.5 cm).

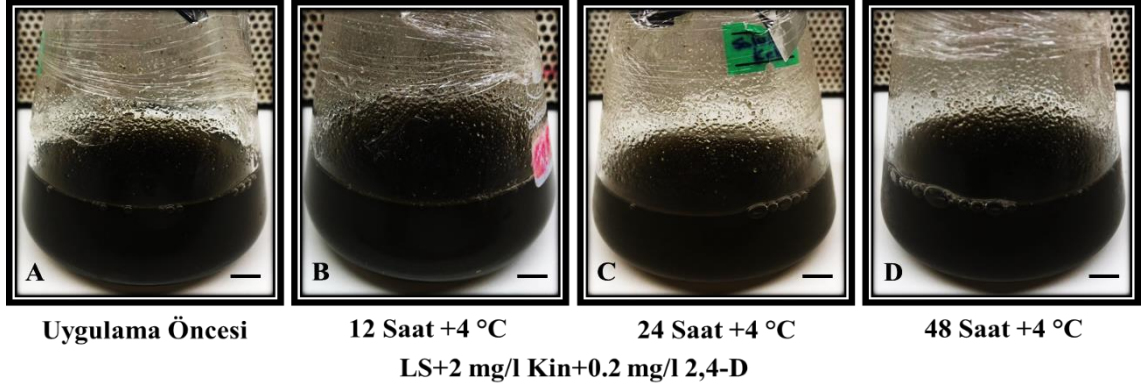


Şekil 4.50: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde ABA uygulaması (Barlar: 1.4 cm).



Şekil 4.51: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyon ve sürelerde DMSO uygulaması (Barlar: 1.4 cm).

Kotiledon Yaprağı



Şekil 4.52: Kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerine farklı sürelerde soğuk uygulaması (Barlar: 1.4 cm).

Tablo 4.17: Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine elisitasyon uygulaması sonrası yaş ve kuru ağırlıklar.

Elsitasyon Uygulama Tipi ve Miktarı	Ortalama Yaş Ağırlık (gr)				Ortalama Kuru Ağırlık (gr)			
	Uygulama Süresi (Saat)							
	0	12	24	48	0	12	24	48
Kontrol	0.0648±0.0146	0.07617±0.0031d	0.0724±0.0024c	0.0723±0.0022d	0.0043±0.0005	0.0046±0.0001c	0.0055±0.0001c	0.0061±0.0004c
MeJA (5 µM)		0.1421±0.0057bc	0.1532±0.0125ab	0.1549±0.0062bc	0.0095±0.0016b		0.0110±0.0002b	0.0132±0.0010ab
MeJA (10 µM)		0.1816±0.0133a	0.1877±0.0173a	0.1943±0.0202ab	0.0103±0.0011b		0.0108±0.0007b	0.0129±0.0006ab
ABA (0.1 mg)		0.1834±0.0160a	0.1811±0.0246a	0.2113±0.0225a	0.0104±0.0004b		0.0111±0.0007b	0.0131±0.0008ab
ABA (0.5 mg)		0.1179±0.0069c	0.1137±0.0055b	0.1371±0.0036c	0.0095±0.0009b		0.0104±0.0003b	0.0137±0.0002ab
DMSO (% 0.1)		0.1191±0.0236c	0.1266±0.0142b	0.1478±0.0122c	0.0109±0.0002b		0.0115±0.0017b	0.0133±0.0005ab
DMSO (% 0.2)		0.1586±0.0063ab	0.1778±0.0087a	0.1222±0.0169c	0.0146±0.0020a		0.0189±0.0027a	0.0100±0.0015b
Soğuk (+4 °C)		0.0342±0.0016e	0.0371±0.0029d	0.0392±0.0026e	0.0101±0.0004b		0.0116±0.0003b	0.0145±0.0027a

Her denemede ortama 10 erlen kültür kullanıldı.

Şekil 4.47, Şekil 4.48, Şekil 4.49, Şekil 4.50, Şekil 4.51 ve Şekil 4.52 irdelendiğinde; ABA, DMSO ve soğuk denemelerine göre MeJA'nın denenen iki farklı konsantrasyonun da besi ortamlarında belirgin koyu kahverengi renk tonu gözlemlendi. En önemli morfolojik gözlem, elde edilen süspansiyon kültürlerinin kaba filtre kağıdından geçirilmesi sonrası MeJA uygulamalarında kırmızı pigmentasyon gözlemlendi (Şekil 4.49). Tablo 4.17 irdelendiğinde hesaplanan yaş ve kuru ağırlıklar bakımından saçak kök ve süspansiyon kültürlerinde olduğu üzere paralellik tespit edilmedi. Yaş ağırlık bakımından genel bir değerlendirme yapıldığında; yaş ağırlık bakımından MeJA, ABA ve DMSO'nun düşük ve yüksek konsantrasyonları ile artan süre uygulamalarına göre kontrol ve +4 °C uygulamalarında artan süreye bağlı olarak daha fazla miktarda olduğu gözlenirken, kuru ağırlıklar bakımından yaş ağırlığın en düşük hesaplandığı +4 °C denemelerinde, kuru ağırlığın kontrol ve diğer uygulamalara göre daha fazla arttığı gözlemlendi. En yüksek yaş ağırlık 48 saat 0.1 mg ABA (0.2113±0.0225 gr), en yüksek kuru ağırlık

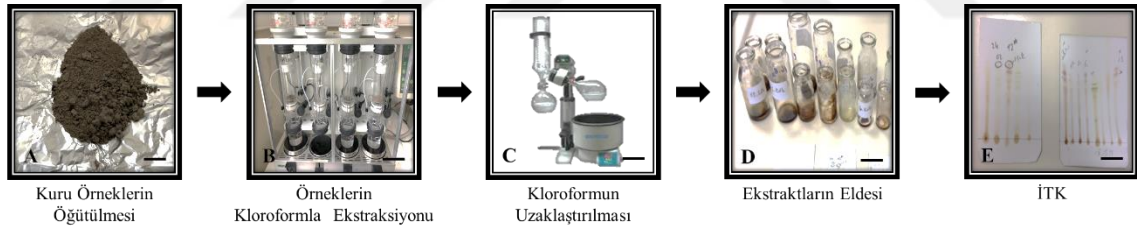
48 saat +4 °C (0.0145 ± 0.0027 gr) uygulamalarında hesaplanırken, en düşük yaş ağırlık 48 saat +4 °C (0.0342 ± 0.0016 gr), en düşük kuru ağırlık 0. saat kontrol (0.0043 ± 0.0005 gr) uygulamalarında hesaplandı. Yaş ağırlıklar bakımından 12 Saat uygulamalarında, ABA (0.1 mg) ile MeJA (10 μ M), DMSO (% 0.2) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, ABA (0.1 mg) ile Kontrol, MeJA (5 μ M), ABA (0.5 mg), DMSO (% 0.1) ve Soğuk (+4 °C) arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. Kuru ağırlıklar bakımından 12 Saat uygulamalarında, DMSO (% 0.2) ile Kontrol, MeJA (5 μ M), MeJA (10 μ M), ABA (0.1 mg), ABA (0.5 mg), DMSO (% 0.1) ve Soğuk (+4 °C) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmedi. Yaş ağırlıklar bakımından 24 Saat uygulamalarında, MeJA (10 μ M) ile MeJA (5 μ M), ABA (0.1 mg), DMSO (% 0.2) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, MeJA (10 μ M) ile Kontrol, ABA (0.5 mg), DMSO (% 0.1) ve Soğuk (+4 °C) arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. Kuru ağırlıklar bakımından 24 Saat uygulamalarında, DMSO (% 0.2) ile Kontrol, MeJA (5 μ M), MeJA (10 μ M), ABA (0.1 mg), ABA (0.5 mg), DMSO (% 0.1) ve Soğuk (+4 °C) arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. Yaş ağırlıklar bakımından 48 Saat uygulamalarında, MeJA (10 μ M) ile ABA (0.1 mg) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, MeJA (10 μ M) ile Kontrol, MeJA (5 μ M), ABA (0.5 mg), DMSO (% 0.1), DMSO (% 0.2) ve Soğuk (+4 °C) arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi. Kuru ağırlıklar bakımından 48 Saat uygulamalarında, Soğuk (+4 °C) ile MeJA (5 μ M), MeJA (10 μ M), ABA (0.1 mg), ABA (0.5 mg), DMSO (% 0.1) ve DMSO (% 0.2) arasında istatistiksel olarak fark tespit edilirken, soğuk (+4 °C) ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark tespit edildi.

4.6. *In Vivo* KÖK ve *In Vitro* KÖK SÜSPANSİYONU VE SAÇAK KÖK KÜLTÜRÜ UYGULAMALARINDA ŞİKONİN ve TÜREVLERİNİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ İLE TOHUM ve *In Vitro* KOTİLEDON YAPRAĞI SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜ UYGULAMALARINDA YAĞ ASİDİ TİPİ ve MİKTARLARININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR

In vivo kök ve *In vitro* kültürlerde (kök süspansiyon ve sıvı saçak kök kültürlerine elisitasyon uygulamaları) şikonin ve türevlerinin miktarlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar Başlık 4.6.1 ve 4.6.2’de, tohum ve *in vitro* kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerinde (elisitasyon uygulamaları) yağ asidi tipi ve miktarlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar Başlık 4.6.3 ve 4.6.4’de sunuldu.

4.6.1. *In Vivo* Köklerden Şikonin ve Türevlerinin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması

Tablo 3.8’de sunulan *in vivo* materyale ait örnekler Başlık 3.2.7.1 kapsamında ifade edilen yöntemle ekstrakte edilen örneklerden İTK yapıldı (Şekil 4.53). Elde edilen ekstraktlar yine 3.2.7.1 başlığı kapsamında şikonin miktarı tespit edilerek Tablo 4.18’de sunuldu.



Şekil 4.53: *In vivo* köklerin ekstraksiyonu ve İTK'larına ait görüntüler.

Tablo 4.18: *In vivo* köklerden elde edilen şikonin miktarı.

Örnek No	Tür İsmi	GPS Kodu	Yükseklik (Metre)	Konum	Elde Edilen Şikonin Miktarı (mg)
Ö2	<i>E. italicum</i>	41°40'45" K 27°02'48" D	132	Edirne-Kırklareli Yolu İnece Mevki	1 mg>
Ö3	<i>E. italicum</i>	41°24'59" K 27°13'14" D	52	Lüleburgaz Sarıcaali Köyü Taşköprü Mevki	1 mg>
Ö4	<i>E. italicum</i>	41°05'23" K 27°44'45" D	63	Çorlu Yenice Mevki (Tekirdağ)	1 mg>
Ö6	<i>E. italicum</i>	40°38'50" K 26°50'33" D	12	Gelibolu-Çanakkale	3 mg
Ö7	<i>E. plantagenium</i>	40°09'19" K 26°27'26" D	73	Çanakkale Otobüs Terminali	1 mg>
Ö9	<i>E. vulgare</i>	40°36'45" K 35°05'40" D	1080	Çorum-Merzifon Yolu 10. Km	1 mg>
Ö10	<i>E. vulgare</i>	40°43'53" K 39°38'10" D	791	Maçka Sümela Manastırı Yolu (Trabzon)	1 mg>
Ö11	<i>E. vulgare</i>	41°22'49" K 41°35'40" D	202	Borçka-Hopa Yolu 10. Km (Artvin)	1 mg>
Ö12	<i>E. vulgare</i>	40°43'8" K 39°31'15" D	850	Trabzon Hamsikök 10. Km	1 mg>
Ö13	<i>E. vulgare</i>	41°6'18" K 39°24'47" D	15	Trabzon-Giresun Yolu Çarşıbaşı Mevki	1 mg>
Ö14	<i>E. vulgare</i>	41°9'39" K 37°5'6" D	7	Ordu-Terme Yolu Sakarlı Mevki	1 mg>
Ö15	<i>E. vulgare</i>	41°13'15" K 36°50'57" D	14	Terme-Samsun Yolu Dal Bahçe Mevki	1 mg>
Ö18	<i>E. vulgare</i>	41°16'1" K 33°22'11" D	792	Kastamonu-Karabük Yolu Gemi Mevki	1 mg>
Ö19	<i>E. vulgare</i>	41°16'1" K 33°22'11" D	792	Kastamonu-Karabük Yolu Gemi Mevki	1 mg>
Ö20	<i>E. vulgare</i>	41°9'31" K 32°27'46" D	213	Karabük-Zonguldak Yolu Şahinkaya Tüneli Yenice Mevki	1 mg>
Ö24	<i>E. italicum</i>	38°52'59" K 40°52'34" D	1200	Bingöl Üniversitesi-Bingöl	1 mg>

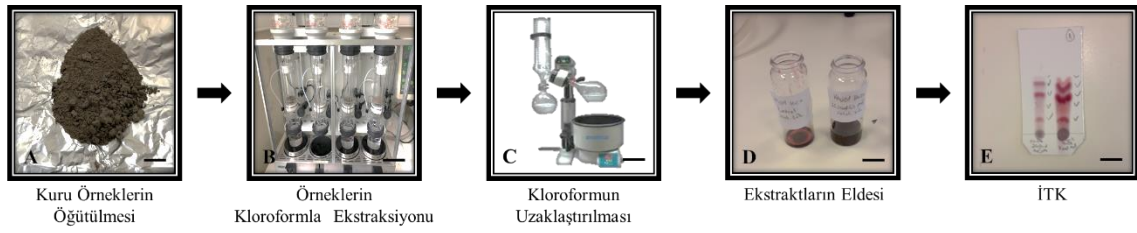
Tablo 4.18 irdelendiğinde, preparatif İTK ile saflaştırma için gereken madde miktarı elde edilemediğinden total şikonin miktarı hesaplanmaya çalışıldı. Ö6 dışında (3 mg şikonin) diğer köklerin ekstraktlarından elde edilen şikonin miktarı 1 mg altında kaldığı hesaplandı.

4.6.2. *In Vitro* Kültür Uygulamalarından Elde Edilen Örneklerden Şikonin ve Türevlerinin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması

Kök süspansiyon ve sıvı saçak kök kültürlerine Tablo 3.7’de ifade edilen elisitasyon tipleri 3.2.6 başlığı altında ifade edildiği gibi gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler Başlık 4.6.2.1 ve 4.6.2.2’ de sunuldu.

4.6.2.1 *Sıvı Ortam Saçak Kök Kültürlerine Elisitasyon Uygulamaları Sonrası Şikonin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması*

3.2.6 başlığı altında Tablo 3.7’de ifade edilen elisitasyon tipleri, miktarları ve süreleri, sıvı saçak kök kültürlerine uygulanarak şikonin tipi ve miktarının artırılması hedeflenmiştir. Çalışmada, alt kültür süreci içindeki sıvı saçak kök kültürü hatları, her bir çalışma için ortalama 10 erlen olacak şekilde 250 ml erlene 0.5 gr saçak kök, 100 ml taze besi ortamı (Gamborg 0) ilave edilip alt kültür işlemi tamamlandıktan sonra, gerekli kapatma işlemlerinin ardından 100 rpm hıza ayarlı çalkalayıcılar üzerinde elisitasyon uygulama zamanına kadar (20. gün) karanlık ortamda ve BBO’da inkübe edildi. İnkübasyonun 20. gününde çalkalayıcılar üzerinden alınan erlenlere Tablo 3.7’de sunulan tabloda ifade edildiği gibi elisitasyonlar uygulandı. Kontrol gruplarında; erlenlerin ağızları açılmadan BBO’daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyona devam edildi, MeJA, ABA, DMSO gruplarında; erlenlere steril ortam koşullarında kimyasallar ilave edilerek yeniden kapatıldı ve BBO’daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyon yeniden bırakıldı, +4 °C gruplarında; erlenlerin ağızları açılmadan, buzdolabı içerisine alınan çalkalayıcılar üzerine bırakılarak inkübasyona devam edildi. Elisitasyon süreçleri için belirlenen zaman dilimleri sonunda 4.5.1. başlığı altında ifade edildiği üzere büyüme üzerine morfolojik ve sayısal veriler irdelendi. Elde edilen kökler 3.2.7.1 başlığı altında ifade edildiği üzere ekstraktlar hazırlanarak önce İTK (Şekil 4.54) ardından preperatif İTK yapılarak elde edilen şikonin türevlerinin miktarları tespit edilerek Tablo 4.19’da sunuldu. Bununla birlikte daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen saçak kökler aynı şekilde analiz için hazırlanarak, yapı tayinleri için NMR’a analizine gönderildi. Elde edilen veriler EKLER başlığında sunuldu.



Şekil 4.54: Sıvı ortamda kültüre edilen saçak köklere uygulanan elisitasyon sonrası saçak köklerin ekstraksiyonu ve İTK'larına ait görüntüler.

Tablo 4.19: Saçak kök ekstraktlarından tespit edilen şikonin tipi ve miktarları.

Elisitör Tipi/ Uygulama Zamanı (Saat)	Kuru Kök Miktarı (gr)	Deoksi Şikonin (mg)	Asetil Şikonin (mg)	2-Metilbütiril/İzovaleril Şikonin (mg)
Kontrol				
0 Saat	1.32	1.20/0.91	2.10/1.59	0.90/0.68
12 Saat	1.20	1.20/1.00	4.30/3.58	0.50/0.42
24 Saat	1.13	1.40/1.24	4.00/3.54	0.10/0.09
48 Saat	1.30	2.10/1.62	3.10/2.38	0.40/0.30
5 µM MeJA				
12 Saat	1.33	1.00/0.75	5.50/4.14	6.20/4.66
24 Saat	1.46	1.10/0.69	2.50/1.71	5.60/3.84
48 Saat	1.53	1.00/0.65	2.60/1.70	1.10/0.72
10 µM. MeJA				
12 Saat	1.18	1.20/1.02	3.40/2.88	7.90/6.69
24 Saat	0.80	1.90/2.38	5.40/6.75	6.30/7.88
48 Saat	0.99	1.00/1.01	4.60/4.65	3.80/3.84
0.1 mg/l ABA				
12 Saat	1.41	1.80/1.28	2.60/1.84	3.40/2.41
24 Saat	1.27	0.40/0.31	2.50/1.97	4.40/3.46
48 Saat	1.45	0.40/0.28	1.90/1.31	4.50/3.10
0.5 mg/l ABA				
12 Saat	1.12	1.10/0.98	2.70/2.41	4.80/4.29
24 Saat	1.11	0.50/0.45	4.50/4.05	2.00/1.80
48 Saat	1.43	0.40/0.28	3.00/2.10	4.40/3.08
% 1 DMSO				
12 Saat	1.44	2.40/1.67	2.30/1.60	0.70/0.49
24 Saat	1.69	2.70/1.60	1.30/0.77	0.50/0.31
48 Saat	1.33	2.30/1.73	2.70/2.33	0.60/0.45
% 2 DMSO				
12 Saat	1.44	2.90/2.01	1.70/1.18	0.50/0.35
24 Saat	1.57	2.60/1.66	2.90/1.85	0.70/0.45
48 Saat	1.40	3.50/2.50	3.80/2.71	0.80/0.57
+4 °C				
12 Saat	1.31	1.30/0.99	2.50/1.91	1.40/1.07
24 Saat	1.26	2.00/1.59	2.60/2.06	1.20/0.95
48 Saat	1.08	1.70/1.57	2.00/1.85	0.90/0.83

*/Değer Elde Edilen Şikonin Türevlerinin 1 gr Kuru Kök Miktarına oranlanmış sonucudur.

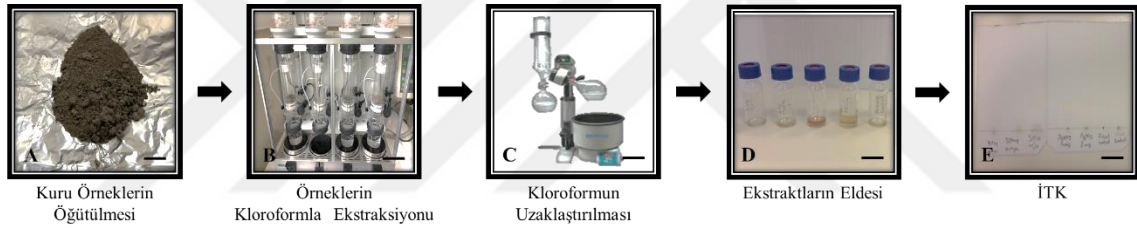
Sıvı ortamda saçak kök kültürlerine uygulanan elisitasyon ardından ekstraksiyon işlemleri sonrası yapılan İTK ve preparatif İTK verilerinin sunulduğu Tablo 4.19 irdelendiğinde, saçak köklerden en yüksek miktarda elde edilen şikonin türevleri Deoksi Şikonin, Asetil Şikonin, 2-Metilbütiril/İzovaleril Şikonin olarak tespit edildi. Morfolojik gözlem sonuçlarının sunulduğu 4.5.1 başlığında da ifade edildiği üzere MeJA uygulamalarında diğer uygulamalara göre daha açık kırmızı pigmentli besi ortamı olduğu gözlenirken, analitik sonuçlarda genelde şikonin türevlerinin en yüksek miktarda MeJA uygulamalarında tespit edildiği gözlemlendi. Çalışma sonrası şikonin türevlerinin ve miktarlarının belirlendiği çalışmada hem gerçek hem de orantısal (1 gr) kuru madde üzerinden hesaplamalar yapıldı. Şikonin türevleri içerisinde en yüksek artışlar aynı saat dilimindeki kontrolüne göre; Deoksi Şikonin 48 Saat % 0.2 DMSO (~2 kat), Asetil Şikonin 24 Saat 10 µM MeJA (~2 kat), 2-Metilbütiril/İzovaleril Şikonin 24 Saat 10 µM MeJA (~87 kat) uygulamalarında tespit edildi. En yüksek Deoksi Şikonin miktarı 48 Saat % 0.2 DMSO (2.50 mg), 24 Saat 10 µM MeJA (2.38 mg) uygulamalarında tespit edilirken, en düşük Deoksi Şikonin miktarı 24, 48 Saat 1 mg/l ABA ve 48 Saat 0.5 mg/l ABA (0.31, 0.28 ve 0.28 mg) uygulamalarında tespit edildi. En yüksek Asetil Şikonin miktarı 24 ve 48 Saat 10 µM MeJA (6.75 ve 4.65 mg) uygulamalarında tespit edilirken, en düşük Asetil Şikonin miktarı 24 Saat % 0.1 DMSO'da (0.77 mg) tespit edildi. En yüksek 2-Metilbütiril/İzovaleril Şikonin miktarı 12 ve 24 Saat 10 µM MeJA (6.99 ve 7.88 mg) uygulamalarında tespit edilirken, en düşük 2-Metilbütiril/İzovaleril Şikonin miktarı 24 ve 48 Saat Kontrol (0.09 ve 0.30 mg) uygulamalarında tespit edildi.

4.6.2.2 Kök Süspansiyon Kültürlerine Elisitasyon Uygulamaları Sonrası Şikonin Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması

Saçak kök kültürlerine elisitasyon uygulaması sonrası elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kök süspansiyon hatları için farklı elisitasyon tipleri, miktarları ve süreleri uygulamasıyla (Başlık 3.2.6, Tablo 3.7) şikonin miktarlarının artırılması hedeflenmiştir. Çalışmada, uygun nitelikte (tamamen süspansiyon halde, kümeleşme meydana gelmeyen) ve alt kültür süreci içindeki kök süspansiyon hatları, her bir çalışma için ortalama 10 erlen olacak şekilde 250 ml erlene 50 ml kültür 50 ml taze besi ortamı (LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l IAA) ilave edilip alt kültür işlemi tamamlandıktan sonra, gerekli kapatma işlemlerinin ardından 100 rpm hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde elisitasyon uygulama zamanına kadar (21. gün) karanlık ortamda ve BBO'da inkübe edildi. İnkübasyonun 21. gününde çalkalayıcılar üzerinden alınan

erlenlere Tablo 3.7’de sunulan tabloda ifade edildiği gibi elisitasyonlar uygulandı. Kontrol gruplarında; Erlenlerin ağızları açılmadan BBO’daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyona devam edildi, MeJA, Maya Özütü (SC), AgNO₃ gruplarında; Erlenlere steril ortam koşullarında kimyasallar ilave edilerek yeniden kapatıldı ve BBO’daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyon yeniden bırakıldı. Elisitasyon süreçleri için belirlenen zaman dilimleri sonunda 4.5.2 başlığı altında ifade edildiği üzere büyüme üzerine morfolojik ve sayısal veriler irdelendi. Her bir deney grubu için geriye kalan kültür kaba filtre kağıdından geçirelerek oda sıcaklığında kurutuldu ve şikonin tipi ve miktarları belirleme çalışmaları gerçekleştirildi.

Ancak, kök süspansiyonlarında elisitasyon çalışmaları sonrası elde edilen kuru maddelerden 3.2.7.1 başlığı altında ifade edildiği üzere ekstraktlar hazırlanarak önce İTK yapıldı ancak İTK sonrası preparatif İTK yapılması için gerekli madde miktarının preparatif İTK yapılabilecek nicelikte olmadığı tespit edildi (Şekil 4. 55).



Şekil 4.55: Kök süspansiyon kültürlerine uygulanan elisitasyon sonrası örneklerin ekstraksiyonu ve İTK'larına ait görüntüler.

4.6.3. Tohumların Yağ Asidi İçerik ve Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması

Tablo 3.9’da sunulan tohumlar Başlık 3.2.7.2 kapsamında ifade edilen yöntemle ekstrakte edildi (Şekil 4.56). Elde edilen ekstraktlar yine 3.2.7.2 başlığı kapsamında yağ asidi tipi ve miktarları tespit edilerek Tablo 4.20’de sunuldu. Ayrıca, çalışmalara ait kromatogramlar EKLER başlığı altında sunuldu.



Şekil 4.56: Tohumların ekstraksiyon sonrası yağ eldesi ve örneklerin esterleştirilmesine ait görüntüler.

Tablo 4.20: Tohum ekstraktlarından tespit edilen yağ asidi tipi ve miktarları.

Örnek	Gelibolu Çanakkale	Boşabat Hanönü	Muğla Ula Yolu	Samsun Bolu Yolu	Eğirdir Gelendost Yolu	Bingöl Üniversitesi	Fethiye Korkuteli Yolu	Bitlis Baykan Yolu	Bitlis Tatvan Yolu
	A1	A5	C2(a)	A6	B3	B8	C2(b)	B9(a)	B9(b)
Yükseklik (m)	21	377	655	722	937	1200	1220	1511	1800
Yağ Asitleri	Yüzde (%)								
C6:0 Caproic acid	0.02	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C8:0 Caprylic acid	0.01	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C10:0 Capric acid	0.03	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
C12:0 Lauric acid	0.04	0.01	TE	TE	TE	TE	TE	TE	0.02
C14:0 Myristic acid	0.21	0.06	TE	TE	0.04	0.07	TE	0.07	0.07
C15:0 Pentadecanoic	0.03	0.01	TE	TE	TE	TE	TE	0.02	0.01
C16:0 Palmitic acid	8.90	8.02	12.86	8.8	6.90	7.82	8.38	8.8	8.65
C16:1 Palmitoleic acid	0.08	0.06	TE	TE	0.06	0.07	TE	0.31	0.14
C17:0 Heptadecanoic acid	0.12	0.09	TE	0.11	0.10	0.11	TE	0.09	0.09
C18:0 Stearic acid	3.30	2.48	3.86	3.41	3.14	2.37	3.45	2.65	3.03
*C18:1 Oleic acid	18.25	14.30	16	15.3	13.37	13.54	17.60	17.23	19.47
C18:2n6 Linoleic acid	10.65	11.40	15.49	12	11.14	16.03	13.3	13.07	16.63
C20:0 Arachidic acid	0.13	0.08	TE	0.1	0.08	0.08	0.19	0.13	0.10
C18:3n6 γ -linolenic acid	6.64	7.45	5.75	6.59	6.70	10.28	6.00	8.19	8.58
C20:1 cis-Eicosenoic acid	0.73	0.63	TE	0.5	0.56	0.59	0.48	0.49	0.57
*C18:3n3 α -Linolenic acid	37.46	40.11	34.87	38.47	43.91	35.37	39.01	34.95	31.71
C18:4n3 Stearidonic acid	11.77	13.72	8.8	13.61	12.70	12.00	10.98	12.86	9.34
C22:0 Behenic acid	0.07	0.04	TE	TE	0.05	0.05	TE	TE	0.07
C22:1n9 Erucic acid	0.16	0.14	TE	TE	0.10	0.14	TE	TE	0.12
C20:3n3 Eicosatrienoic acid	0.04	0.03	TE	TE	0.03	0.02	TE	TE	TE
C24:1 Nervonic acid	0.12	0.14	TE	TE	0.08	0.10	TE	TE	0.11
Saturated FA	12.86	10.79	16.72	12.42	10.31	10.50	12.02	11.86	12.04
Unsaturated FA	85.90	87.92	80.91	87.1	88.65	88.14	87.4	87.1	86.67
Mono-unsaturated	19.34	15.27	16.00	16.43	14.17	14.44	18.08	18.03	20.41
Poly-unsaturated	66.56	72.65	64.91	70.67	74.48	73.70	69.32	69.07	66.26
Unsaturated/Saturated	6.68	8.14	4.84	7.01	8.59	8.39	7.27	7.34	7.19
Poly-/Mono-unsaturated	3.44	4.75	4.05	4.30	5.25	5.10	3.83	3.84	3.24
Toplam Yağ (%)	11.24	14.96	14.60	15.55	12.75	15.70	19.05	13.40	11.72

T.E. Tespit Edilemedi

Farklı yüksekliklerden ve bölgelerden toplanan *E. italicum* bitkisinden elde edilen tohumların, ekstraksiyonu sonrası yağ asitlerinin tipi ve miktarlarının sunulduğu Tablo 4.20 irdelendiğinde, en yüksek total yağ C2(b) (%19.05), en düşük total yağ A1 (%11.24)'de tespit edildi. Majör

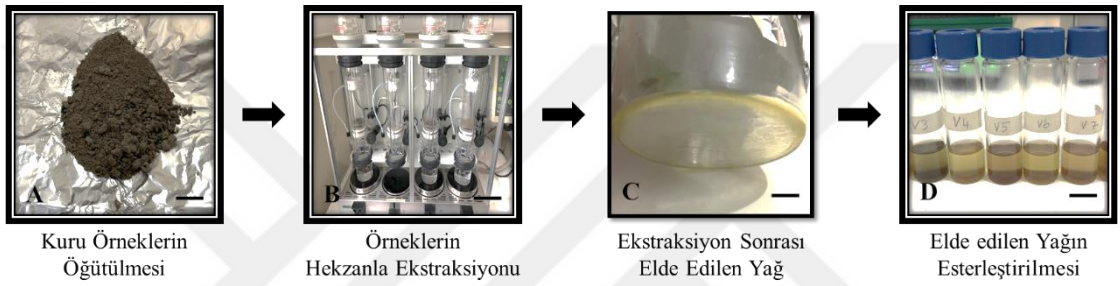
yağ asitleri olarak; C16:0 Palmitik Asit, C18:0 Stearik Asit, C18:1 Oleik Asit, C18:2n6 Linoleik Asit, C18:3n6 γ - Linolenik Asit, C18:3n3 α -Linolenik Asit ve C18:4n3 Stearidonik Asit olarak tespit edildi. Majör yağ asitlerinde, tohumların içeriğinde en yüksek yağ asidi C18:3n3 α -Linolenik Asit olurken (B3: %43.91), en düşük yağ asidi C18:0 Stearik Asit (B8: %2.37) olarak tespit edildi. Majör yağ asitleri arasında en yüksek ve en düşük; [C16:0 Palmitik Asit C2(a) (%12.86), A5 (%8.02); C18:0 Stearik Asit C2(a) (%3.86), B8 (%2.37); C18:1 Oleik Asit B9(b) (%19.47), B3 (%13.37); C18:2n6 Linoleik Asit B9(b) (%16.63), A1 (%10.65); C18:3n6 γ - Linolenik Asit B8 (%10.28), C2(a) (%5.75); C18:3n3 α -Linolenik Asit B3 (%43.91), C2(a) (%34.87) ve C18:4n3 Stearidonik Asit [A5 (%13.72), C2(a) (%8.8)] olarak tespit edildi. Yağ asitlerinin genel ortalamaları bakımından değerlendirildiğinde en yüksek ve en düşük; [Saturated YA C2(a) (%16.72), B3 (%10.31); Unsaturated YA B3 (%88.65), C2(a) (%80.91); Mono-unsaturated YA B9(b) (%20.41), B3 (%14.17); Poly-unsaturated YA B3 (%74.48), C2(a) (%64.91); Unsaturated YA/Saturated YA B3 (8.59), C2(a) (4.84) ve Poly-unsaturated YA/Mono-unsaturated YA B3 (5.25), B9(b) (3.24) olarak tespit edildi. Sonuç olarak, yağ asidi içeriği bakımından en zengin B3 ve C2(a) tohum örnekleri tespit edildi.

4.6.4. Kotiledon Yaprığı Süspansiyon Kültürlerine Elisitasyon Uygulamaları Sonrası Yağ Asidi İçerik ve Miktarlarının Belirlenmesi Çalışması

3.2.6 başlığı altında Tablo 3.7’de ifade edilen elisitasyon tipleri, miktarları ve süreleri, kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine uygulanarak yağ asidi miktarının artırılması hedeflenmiştir. Çalışmada, uygun nitelikte (tamamen süspansiyon haldeki, kümeleşme meydana gelmeyen) ve alt kültür süreci içindeki kotiledon yaprağı süspansiyon hatları, her bir çalışma için ortalama 10 erlen olacak şekilde 250 ml erlene 50 ml kültür 50 ml taze besi ortamı (LS+2 mg/l Kin+0.2 mg/l 2,4-D) ilave edilip alt kültür işlemi tamamlandıktan sonra, gerekli kapatma işlemlerinin ardından 100 rpm hızına ayarlı çalkalayıcılar üzerinde elisitasyon uygulama zamanına kadar (14. gün) karanlık ortamda ve BBO’da inkübe edildi. İnkübasyonun 14. gününde çalkalayıcılar üzerinden alınan erlenlere Tablo 3.7’de sunulan tabloda ifade edildiği gibi elisitasyonlar uygulandı. Kontrol gruplarında; erlenlerin ağızları açılmadan BBO’daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyona devam edildi, MeJA, ABA, DMSO gruplarında; erlenlere steril ortam koşullarında kimyasallar ilave edilerek yeniden kapatıldı ve BBO’daki çalkalayıcılar üzerinde inkübasyon yeniden bırakıldı, +4 °C gruplarında; erlenlerin ağızları açılmadan, buzdolabı içerisine alınan çalkalayıcılar üzerine bırakılarak inkübasyona devam edildi. Elisitasyon süreçleri için

belirlenen zaman dilimleri sonunda 4.5.3 başlığı altında ifade edildiği üzere büyüme üzerine morfolojik ve sayısal veriler irdelendi. Her bir deney grubu için geriye kalan kültür kaba filtre kağıdından geçirelerek oda sıcaklığında kurutuldu ve yağ asidi tipi ve miktarları belirleme çalışmaları gerçekleştirildi.

Elde edilen kuru örnekler Başlık 3.2.7.2 kapsamında ifade edilen yöntemle ekstrakte edildi (Şekil 4.57). Elde edilen ekstraktlar yine 3.2.7.2 başlığı kapsamında ifade edilen yöntemle yağ asidi tipi ve miktarları tespit edilerek Tablo 4.21’de sunuldu. Ayrıca, çalışmalara ait kromatogramlar EKLER başlığı altında sunuldu.



Şekil 4.57: Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine uygulanan elisitasyon sonrası örneklerin ekstraksiyonu sonrası yağ eldesi ve örneklerin esterleştirilmesine ait görüntüler.

Tablo 4.21: Kotiledon yaprağı süspansiyonları ait ekstraktlarında tespit edilen yağ asidi tipi ve miktarları.

Örnek	*C16:0 Palmitic Acid	C16:1 Palmitoleic Acid	C18:0 Stearic Acid	*C18:1 cis Oleic Acid	*C18:2n6 Linoleic Acid	C18:3n6 γ -linolenic Acid	C18:3n3 α -Linolenic Acid	C18:4n3 Stearidonic Acid	Saturated FA	Unsaturated FA	Mono-unsaturated	Poly-unsaturated	Unsaturated/Saturated	Poly-/Mono-unsaturated	Total Yağ (%)
Yağ Asidi (%)															
S1	23.93	1.26	3.17	24.91	25.00	6.83	11.42	2.74	27.10	72.16	26.17	45.99	2.66	1.76	6.62
S2	23.88	1.36	3.25	25.11	25.89	6.73	11.25	2.53	27.13	72.87	26.47	46.40	2.69	1.75	6.86
S3	23.96	1.51	3.14	25.91	26.89	8.31	8.20	2.08	27.10	72.90	27.42	45.48	2.69	1.66	4.55
S4	23.90	1.44	3.79	27.01	25.94	8.63	7.30	1.99	27.69	72.31	28.45	43.86	2.61	1.54	3.54
S5	25.20	1.48	3.26	27.17	27.10	6.65	7.55	1.59	28.46	71.54	28.65	42.89	2.51	1.50	3.64
S6	25.76	1.45	3.75	25.84	27.55	6.55	7.52	1.58	29.51	70.49	27.29	43.20	2.39	1.58	3.71
S7	25.24	1.42	3.59	31.13	23.14	7.78	6.02	1.68	28.83	71.17	32.55	38.62	2.47	1.19	3.65
S8	27.18	1.16	2.87	31.62	22.42	7.04	6.03	1.68	30.05	69.95	32.78	37.17	2.33	1.13	1.94
S9	30.90	1.35	3.29	30.62	21.04	5.52	5.36	1.37	34.19	65.26	31.97	33.29	1.91	1.04	3.07
S10	31.29	3.70	T.E.	24.97	24.35	5.95	6.52	1.62	31.29	67.11	28.67	38.44	2.14	1.34	3.03
S11	30.42	1.06	3.07	29.91	22.25	5.55	6.01	1.19	33.49	65.97	30.97	35.00	1.97	1.13	3.53
S12	30.46	1.21	3.62	27.42	23.68	6.44	5.62	1.55	34.08	65.92	28.63	37.29	1.93	1.30	9.30
S13	36.10	T.E.	T.E.	24.10	25.31	6.89	T.E.	T.E.	36.10	56.30	24.10	32.20	1.56	1.34	7.66
S14	27.14	T.E.	3.52	22.13	18.70	5.28	4.92	0.65	30.66	51.68	22.13	29.55	1.69	1.34	3.63
S15	31.40	T.E.	3.41	26.12	22.38	5.33	5.42	1.44	34.81	60.69	26.12	34.57	1.74	1.32	4.32
S16	32.41	1.08	3.47	22.43	26.95	5.46	6.20	1.67	35.88	63.79	23.51	40.28	1.78	1.71	3.37
S17	21.04	0.68	2.71	20.32	19.65	6.03	5.46	1.00	23.75	53.14	21.00	32.14	2.24	1.53	3.44
S18	29.20	1.20	2.96	28.41	24.07	7.15	5.48	1.53	32.16	67.84	29.61	38.23	2.11	1.29	3.08
S19	29.43	1.28	3.22	26.65	24.65	7.60	5.43	1.72	32.65	67.33	27.93	39.40	2.06	1.41	2.92
S20	27.09	1.03	3.08	31.36	21.32	7.08	4.60	1.52	30.17	66.91	32.39	34.52	2.22	1.07	4.09
S21	25.11	1.31	2.65	31.63	22.90	7.42	5.67	1.74	27.76	70.67	32.94	37.73	2.55	1.15	3.77
S22	26.49	1.33	2.75	30.21	23.98	7.94	5.39	1.91	29.24	70.76	31.54	39.22	2.42	1.24	3.34
S23	24.96	1.04	2.80	29.78	24.02	8.13	6.41	1.93	27.76	71.31	30.82	40.49	2.57	1.31	4.88
S24	24.81	0.99	3.33	31.18	23.76	7.20	6.67	2.07	28.14	71.87	32.17	39.70	2.55	1.23	3.63
S25	25.08	1.05	3.15	30.89	23.57	7.85	6.34	2.06	28.23	71.76	31.94	39.82	2.54	1.25	3.24

TE: Tespit Edilemedi

S1:0. Saat Kontrol-S2: 12. Saat Kontrol-S3: 24. Saat Kontrol-S4: 48. Saat Kontrol

S5:4°C 12 Saat-S6: 4°C 24 Saat-S7: 4°C 48 Saat

S8:5 μ m. MeJA 12. Saat-S9:5 μ m. MeJA 24. Saat-S10:5 μ m. MeJA 48. SaatS11:10 μ m. MeJA 12. Saat-S12:10 μ m. MeJA 24. Saat-S13:10 μ m. MeJA 48. Saat

S14:0.1 mg ABA 12. Saat-S15:0.1 mg ABA 24. Saat-S16:0.1 mg ABA 48. Saat

S17:0.5 mg ABA 12. Saat-S18:0.5 mg ABA 24. Saat-S19:0.5 mg ABA 48. Saat

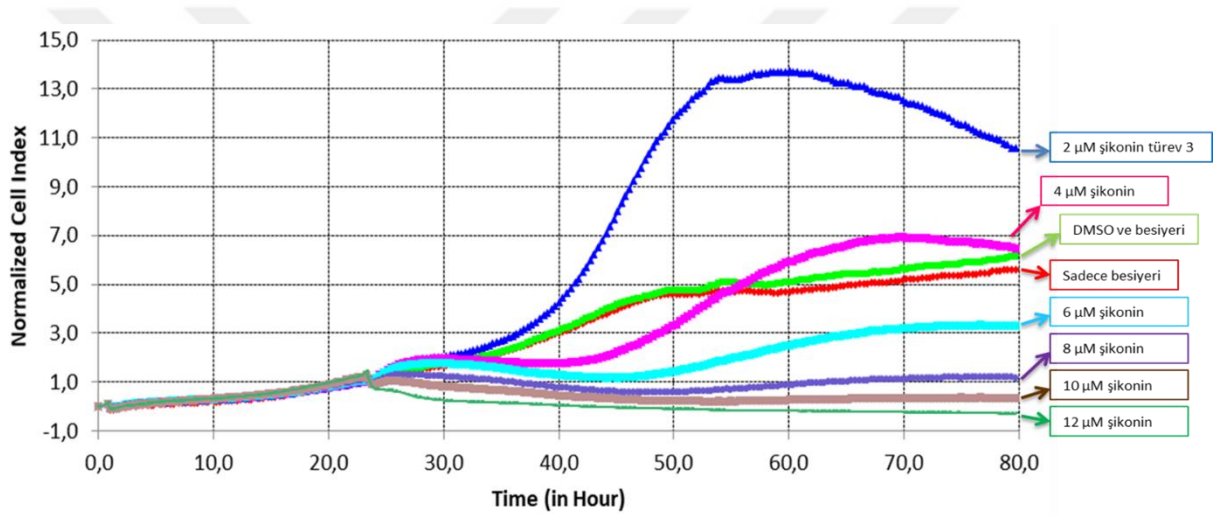
S20:% 1 DMSO 12. Saat-S21: % 1 DMSO 24. Saat-S22: % 1 DMSO 48. Saat

S23: % 1 DMSO 12. Saat-S24: % 1 DMSO 24. Saat-S25: % 1 DMSO 48. Saat

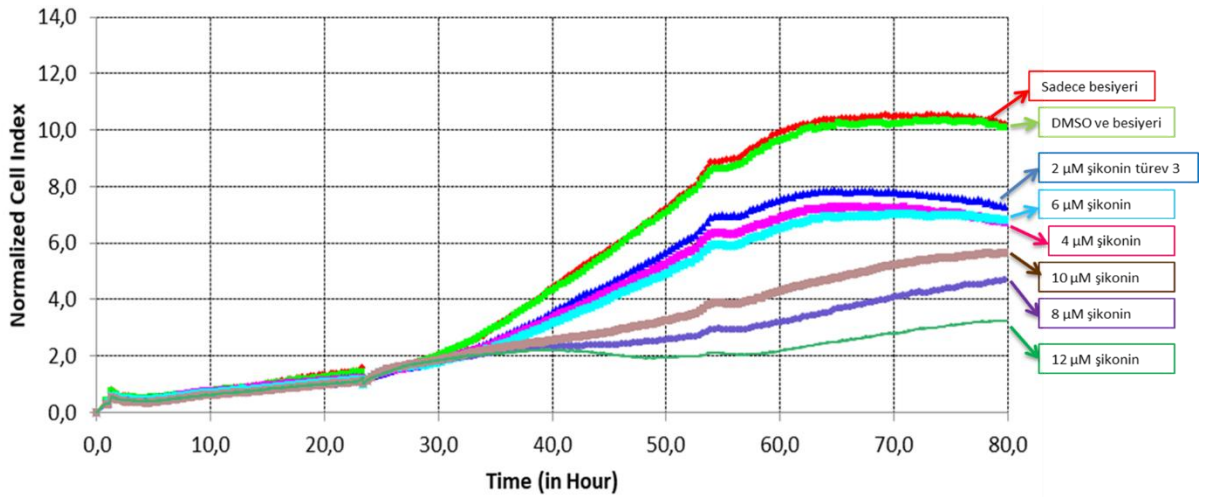
Kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine farklı elisitör uygulaması akabindeki ekstraksiyonu sonrası yağ asitlerinin tipi ve miktarlarının sunulduğu Tablo 4.21 irdelendiğinde, en yüksek total yağ S12 (%9.30), en düşük total yağ S8 (%1.94)'de tespit edildi. Majör yağ asitleri olarak; C16:0 Palmitik Asit, C16:1 Palmitoleik Asit, C18:0 Stearik Asit, C18:1 Oleik Asit, C18:2n6 Linoleik Asit, C18:3n6 γ - Linolenik Asit, C18:3n3 α -Linolenik Asit ve C18:4n3 Stearidonik Asit olarak tespit edildi. Majör yağ asitlerinden tohumların içeriğinde en yüksek orandaki yağ asidi C16:1 Palmitoleik Asit olurken (S16: %32.41), en düşük orandaki yağ asidi C18:4n3 Stearidonik Asit (S14: %0.65) olarak tespit edildi. Majör yağ asitleri arasında en yüksek ve en düşük; [C16:0 Palmitik Asit; S16 (%32.41), S17 (%21.04); C16:1 Palmitioleik Asit; S10 (%3.70), S17 (%0.68); C18:0 Stearik Asit; S4 (%3.79), S21 (%2.65); C18:1 Oleik Asit; S21 (%31.63), S14 (%22.13); C18:2n6 Linoleik Asit; S6 (%27.55), S14 (%18.70); C18:3n6 γ -Linolenik Asit; S4 (%8.63), S14 (%5.28); C18:3n3 α -Linolenik Asit; S1 (%11.42), S20 (%4.60) ve C18:4n3 Stearidonik Asit; S1 (%2.74), S14 (%0.65) olarak tespit edildi. Yağ asitlerinin genel ortalamaları bakımından değerlendirildiğinde en yüksek ve en düşük; [Saturated YA; S16 (%35.88), S17 (%23.75); Unsaturated YA; S3 (%72.90), S14 (%51.68); Mono-unsaturated YA; S21 (%32.94), S17 (%21.00); Poly-unsaturated YA; S2 (%46.40), S14 (%29.55); Unsaturated YA/Saturated YA; S2,S3 (2.69), S13 (1.56); Poly-unsaturated YA/Mono-unsaturated; YA S1 (1.76), S9 (1.09)] olarak tespit edildi.

4.7. *In vitro* KÜLTÜRLERDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARDAN ANTİKANSER AKTİVİTENİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Sıvı saçak kök kültürlerine elisitör uygulanması ardından şikonin tipi ve miktarlarının belirlenmesi çalışmasında kontrole göre en belirgin şikonin miktarının artırımına neden olan elisitasyon uygulaması olan 24 Saat 10 μM MeJA uygulamasından elde edilen köklerden saflaştırılmış Türev 3'ün Luminal tip meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ve kemoterapiye dirençli, metastatik karakterli bazal tip hücre hattı MDA-MB-231 hücre hatlarına 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 μM konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen proliferasyon sonuçları sırasıyla iki hücre hattı için Şekil 4.58 ve Şekil 4.59'da sunuldu.



Şekil 4.58: MCF-7 hücrelerine şikonin ekstraktı uygulaması sonrası proliferasyon grafiği. Kırmızı çizgi: sadece besiyeri. Açık yeşil çizgi: DMSO ve besiyeri. Lacivert çizgi: 2 μM Türev-3 şikonin ekstraktı. Pembe çizgi: 4 μM Türev-3 şikonin ekstraktı. Turkuvaz çizgi: 6 μM Türev-3 şikonin ekstraktı. Mor çizgi: 8 μM Türev-3 şikonin ekstraktı. Kahverengi çizgi: 10 μM Türev-3 şikonin ekstraktı. Koyu yeşil çizgi: 12 μM Türev-3 şikonin ekstraktı uygulanan hücrelerin proliferasyonunu göstermektedir.



Şekil 4.59: MDA-MB-231 hücrelerine şikonin ekstraktı uygulaması sonrası proliferasyon grafiği. Kırmızı çizgi: sadece besiyeri. Açık yeşil çizgi: DMSO ve besiyeri. Lacivert çizgi: 2 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Pembe çizgi: 4 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Turkuvaz çizgi: 6 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Mor çizgi: 8 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Kahverengi çizgi: 10 µM Türev-3 şikonin ekstraktı. Koyu yeşil çizgi: 12 µM Türev-3 şikonin ekstraktı uygulanan hücrelerin proliferasyonunu göstermektedir.

Şekil 4.58 ve Şekil 4.59 irdelendiğinde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmanın sonucunda şikonin ekstraktlarının MCF-7 hücrelerinin yanında MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonun baskılanmasında da etkili olduğu tespit edildi.

MCF-7 hücrelerinde 4, 6, 8, 10, 12 µM konsantrasyonlarında Türev-3 şikonin ekstraktının proliferasyonu baskılandığı, fakat 2 µM Türev-3 şikonin ekstraktı konsantrasyonunun proliferasyonu arttırıcı etkisi tespit edildi. Türev-3 şikonin ekstraktının konsantrasyon ve sürenin artmasına bağlı olarak hücrelerde anti-proliferatif etki gösterdiği tespit edildi. Zamana bağlı olarak 4 µM konsantrasyonda Türev-3 şikonin ekstraktının hücrelerde proliferasyonu arttırdığı ve yaklaşık olarak madde eklenmesinden 30 saat sonra 4 µM ile muamele edilen hücrelerin kontrol hücre sayısına yaklaştıkları gözlemlendi. En dikkat çeken ise 6, 8, 10, 12 µM konsantrasyonlarda Türev-3 şikonin ekstraktı ile muamele edilen hücrelerde etkili ve doza bağlı olarak uyumlu anti proliferatif etki gözlemlendi (Şekil 4.58).

Kemoterapiye dirençli ve metastatik kapasitesinin yüksek olması nedeniyle MDA-MB-231 hücre hatları yeni terapötik ilaç geliştirme çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Türev-3 şikonin ekstraktlarıyla muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyon analizinde, hücrelerin proliferasyonunun doza bağlı olarak baskılandığı tespit edildi (Şekil 4.59). Türev-3 şikonin ekstraktları uygulanan farklı moleküler alt-gruptaki meme kanser hücre hatlarının her ikisinde de 8 μM , 10 μM ve 12 μM konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde baskıladığı tespit edildi.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. TOHUMLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU ve ÇİMLENDİRİLMESİNE YÖNELİK TARTIŞMA

E. italicum L. türüne ait tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda; kabuk özellikleri bakımından *in vitro* çimlendirme çalışmalarında en yüksek çimlenme oranı kabuksuz tohumlarda gözlemlendi, literatürdeki çalışmalar irdelendiğinde, *in vitro* ortamda tohumların çimlendirme çalışmalarında da daha çok sert kabuğundan arındırılmış tohumlar kullanılmıştır [Kayısı (Yıldırım ve diğ., 2007), Badem (Işıksalan ve diğ., 2008), Kayısı, Şeftali, Yabani Kiraz (Şan ve diğ., 2014), Sakız ağacı (Kılınç ve diğ., 2015; Tilkat ve diğ., 2018)]. Tohumların yüzey sterilizasyonu çalışmalarında yüzey sterilantı olarak daha çok NaOCl kullanılmış olup, NaOCl'den farklı olarak literatürde birçok kimyasal maddenin yüzey sterilizasyonunda tek ya da kombine şeklinde kullanıldığı rapor edilmiştir; EtOH, Gama Işığı, HgCl₂, H₂O₂, Klor Gazı, NaOCl, Tween 20 (Cuero ve diğ., 1986; Manjkhola ve diğ., 2005; Zare ve diğ., 2010; Barampuram ve diğ., 2014; Kılınç ve diğ., 2015), tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada yüzey sterilantı olarak NaOCl kullanılmış ve başarılı sonuçlar gözlenmiştir. Literatürde NaOCl'nin yüzey sterilizasyonu için kullanıldığı ve başarılı sonuçlar alındığı çalışmalar [örneğin, Fesleğen (Bais ve diğ., 2002), Keten (Yıldız ve Er, 2002), Ansellia (Vasudevan ve Staden, 2010), Sakız Ağacı (Yıldırım, 2012; Kılınç ve diğ., 2015)] mevcuttur. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar, BBD içermeyen MS besi ortamında karanlık ve normal fotoperiyotta çimlendirilmiş, karanlık ortamda inkübe edilen tohumların çimlenme oranı sayısal olarak normal fotoperiyotta inkübe edilen tohumlara oranla yüksek olsa da istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark hesaplanmadı, ayrıca karanlık ortamda çimlenen tohumlarda kotiledon yaprağı oluşumu gözlenmedi. Literatür irdelendiğinde, Bais ve arkadaşlarının 2002'de fesleğende ve Pradhan ve Pant'ın 2009'da *Dendrobium densiflorum* tohumları BBD içermeyen MS besi ortamında daha yüksek oranda çimlendirme oranı elde edildiği rapor edilmiştir. Kurt ve Erdağ'ın 2009 yılında rapor ettikleri çalışmada *Centaurea zeybekii* tohumlarının farklı ışık yoğunluklarında (karanlık ve normal fotoperiyot) ortamda çimlendirilmesi çalışmasında, sayısal olarak karanlıkta çimlenme oranı yüksek olsa da istatistiksel olarak her iki ortamda çimlendirme oranından bir fark gözlenmemiştir. Edalifart ve arkadaşlarının 2014 yılında rapor ettikleri çalışmada *Withania coagulans*'ın 12 farklı ekotipinin karanlık ve normal fotoperiyot koşullarındaki çimlenmeleri irdelendiğinde, tüm ekotiplerde

karanlık ortam en iyi çimlenme koşulu olarak gözlenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda ışık bazı türlerde dormansiyi devam ettirirken bazı durumlarda ise dormansiyi kırmaktadır. Bazı çalışmalarda ise çimlenme çalışmalarında ışığın olumsuz etkisi sık görülen bir durum olmadığı rapor edilmiştir (Kulkarni ve diğ., 2006). Bununla birlikte, ışık bazı reaksiyonları uyarıcı etkisiyle çimlenmeyi etkileyebilmektedir (GA₃ sentezi) (Karakurt vd, 2010).

5.2. KÖK ve KOTİLEDON YAPRAĞI EKSPANTLARINDAN KALLUS OLUŞUMU ve GELİŞİMİNE YÖNELİK TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında *in vitro* çimlendirilen tohumlardan elde edilen bitkiciklerden alınan kökler ve kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında gerekli olan kallus oluşturma için kullanılmıştır. Oluşturulan kök kallusları şikonin ve türevleri için, kotiledon yaprakları kallusları ise yağ asitleri üretimi için süspansiyon kültürü oluşturmada kullanılmıştır.

Literatür irdelendiğinde, şikonin ve türevlerinin yoğun bir şekilde Boraginaceae familyasına ait türlerin köklerinde [Macrotomia usamensis (Rornanova ve Bankovskii, 1965), *E. lycopsis* L. (Shcherbanovskii ve Luks, 1974), *A. densiflora* (Nordm.) Ledeb. (Bozan ve diğ., 1997; 1999; Yüzbaşıoğlu Baran ve diğ., 2018), *L erythrorhizon* (Cho ve diğ., 1999; Hu ve diğ., 2006; Ito ve diğ., 2011; Liao ve diğ., 2015), *A. hispidissima* (Shukla ve diğ., 2001), *O. argentatum* (Özgen ve diğ., 2004), *A. euchroma* (Hu ve diğ., 2006; Zhou ve diğ., 2011; Zan ve diğ., 2017), *O. paniculatum* Bur. et Franch., *O. exsertum* Hemsl., *O. confertum* W.W. Smith, *O. hookerii* Clarke var. longiflorum Duthie, *O. hookerii* Clarke, *O. waltonii* Duthic (Hu ve diğ., 2006), *O. echioide* (Sagratini ve diğ., 2008), *Bothriospermum secundum* Maxim (Liu ve diğ., 2009), *E. italicum* (Albreht ve diğ., 2009), *E. fruticosum* (Sherif ve diğ., 2009), *A. decumbens* (Al-Mussawi, 2010), *O. confertum* W. W. Smith (Zhou ve diğ., 2011), *O. nigricaula* (Özgen ve diğ., 2011), *E. pycnanthum* Pomel (Chaouche ve diğ., 2012), 11 Alkanna Türü (Tappeiner ve diğ., 2014), *E. vulgare* ve *E. russicum* (Dresler vd. 2015; Olennikov ve diğ., 2017), *A. guttata* (Liao ve diğ., 2015), *A. euchroma* (Liao ve diğ., 2015; Zan ve diğ., 2017), *E. plantagineum* (Skoneczny ve diğ., 2017), *O. visianii* (Sut ve diğ., 2017)] bulunduğu tespit edilmiştir.

Bununla birlikte, kallus oluşturma çalışmalarında ise daha çok kök materyal kullanılmıştır *A. euchroma* (Hao ve diğ., 2014; Arghavani ve diğ., 2015; Hao ve diğ., 2015), *L. erythrorhizon* (Yoshikawa ve diğ., 1986; Bulgakov ve diğ., 2001); *E. italicum* (Zare ve diğ., 2010). Kallus oluşturma çalışmalarında kök eksplantları sitokin ile oksin (2 mg/l Kin+0.2 IAA/NAA/2,4-

D) kombinasyonu destekli farklı besi ortamları (LS, ½LS, Gamborg, White, MS, SH) kullanılarak karanlıkta ve normal fotoperiyotta inkübe edilmiş ve en yüksek pigmentli kallus oluşumu karanlık ortamda inkübe edilen kök eksplantlarında LS+2 mg/l Kin+0.2 IAA besi ortamında elde edilmiştir (%70). Literatür irdelendiğinde, *in vitro* ortamda şikonin ve türevlerinin üretildiği çalışmalarda, kök eksplantları karanlık ortamda inkübe edilmiş olup, aydınlık ortamda pigment oluşumu inhibe olmaktadır (Pal ve diğ., 2018). *L. erythrorhizon*'de gerçekleştirilen bir çalışmada özellikle karanlıkta uyarılabilir bir gen olan *LEDI* karakterize edilmiş olup, şikonin biyosentezinde *LEDI-2* regülatör bir gen olduğu tespit edilmiştir (Yazaki ve diğ., 2001). Işıklı ortamda vakuol içinde 4-hidroksibenzoik asidin glukozit formu biriktirilir, karanlığa transfer edildiğinde geranil transferazın indüksiyonuyla şikonin biyosentezinin başladığı tespit edilmiştir (Yazaki ve diğ., 2001; Pal ve diğ., 2018).

Tez çalışması kapsamında, şikonin ve türevlerinin üretimi için en uygun besi ortamı ve BBD kombinasyonu daha önce de ifade edildiği üzere LS+2 mg/l Kin+0.2 IAA olarak tespit edildi. Literatürde besi ortamı içeriğine bağlı olarak nitrojen içeriğinin fazlalığının şikonin üretimini olumsuz etkilediği rapor edilirken, bazı çalışmalarda ise nitrojen içeriği fazla ve az olan farklı besi ortamlarının şikonin üretimi için kullanıldığı bildirilmiştir [*L. erythrorhizon* LS (Fujita et al. (1981b), *A. euchroma* White (Malik ve diğ., 2008), *O. bulbotrichom* MS (Bagheri ve diğ., 2018), *E. italicum* Gamborg (Zare ve diğ., 2010), LS (Zare ve diğ., 2011), *O. paniculatum* M9 (Liu ve diğ., 2006)]. Bu durumun, bitkilerin yetiştiği bölgelerdeki farklılıklardan kaynaklandığı ve genotipik bir etki olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, BBD kombinasyonu açısından, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarla literatürde rapor edilen çalışmalarla paralellik göstermektedir; *L. erythrorhizon* hücre kültürlerinde 2,4-D destekli besi ortamında şikonin biyosentezinin inhibe olduğu rapor edilmiştir (Yamamoto et al., 2002). Farklı bir çalışmada, *A. hispidissima*'da 2,4-D destekli besi ortamında hem karanlık hem de normal fotoperiyotlu ortamda oluşan kalluslarda herhangi bir pigment oluşumu gözlenmezken, IAA destekli besi ortamında ve karanlık ortamda inkübasyon pigmentli kallus oluşumu gözlenmiştir. (Pal ve Chaudhry, 2010). Bununla birlikte, BBD etkisi bakımından, IAA'nın şikonin üretimini artırdığı 2,4-D'nin ise şikonin üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir. (Malik ve diğ., 2014; Pal ve diğ., 2018). Pigmentli kallus (şikonin ve türevlerini barındıran) oluşumu üzerine 2,4-D negatif etkisi [2,4-D etilen sinyal yolağında doğrudan yer alan *HMA5*, *EIN3* ve *ORCA3* genlerinin ifadelerini önemli ölçüde azaltmaktadır. Ayrıca 2,4-D, *LOX* ve *GA2ox* adlı Jasmonik asit ve Giberellik Asit (EIN3 hedeflenerek etilen sinyal yolağını regüle eder) biyosentezini uyararak 2 dolaylı genin

ifadesinide baskılamaktadır. Dolayısıyla, 2,4-D'nin etilen sinyal yolağındaki blokajı şikonin ve türevlerinin biyosentezini sağlayan fenilpropanoidle ilişkili genlerin ifadelerinin baskılanmasına neden olmaktadır (Liao ve diğ., 2018)], IAA'nın pozitif etkisine irdelendiğinde, MeJA ile IAA bir biri ile ilişkili metabolitler olup, özellikle MeJA şikonin biyosentezinde önemli bir enzim olan PHB-geraniltransferaz enziminin aktivitesini artırmaktadır. Bununla birlikte, farklı bir çalışmada *LeMDR* geninin biyosentezinde şikonin miktarıyla doğru orantılı bir şekilde ilişki tespit edilirken, IAA ve MeJA ilavesi *LeMDR* biyosentezini artırmaktadır (Ding ve diğ., 2004; Zhu ve diğ., 2017).

Daha önce de ifade edildiği gibi yağ asitlerin in *in vitro* koşullarda üretimi çalışmalarına, şikonin üretimi çalışmalarına kıyasla sınırlı sayıda rastlanılmaktadır. Bitkilerde yağ asitlerinin en yüksek oranlarda ihtiva edildiği yer tohumdur (Özcan, 2008; Karaman ve diğ., 2011; Özcan; 2014; Elagbar ve diğ., 2016). Tohum dokularında ise testa, kotiledon ve embriyoda rastlanır (Yu ve diğ., 2016). Tez çalışması kapsamında, yağ asitlerinin üretimi için çimlenen tohumlardan elde edilen kotiledon yaprağı kullanılmış olup (tohumda en yüksek biyomasa sahip), kotiledon yaprakları kök eksplantlarında olduğu gibi farklı besi ortamı ve BBD kombinasyonlarından oluşan besi ortamları, karanlık ve normal fotoperiyot ortamında inkübe edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada, süspansiyon kültürleri için en uygun kallus karanlık ortamda ve LS+2 mg/l+0.2 mg/l 2,4-D inkübe edilen besi ortamında elde edildi (%100). Literatürde, 2,4-D ve sitokin destekli besi ortamlarının kullanılarak kallus eldesi çalışmalarına sık rastlanmaktadır (Malik ve diğ., 2003; Kermanee, 2004; Castellar ve diğ., 2011; Nartop ve diğ., 2015; Surmuş-Asan ve diğ., 2017; Tilkat ve diğ., 2018). Kallus oluşumunda sitokinin (Kinetin) ve oksin kombinasyonuna bağlı olarak, sitokinin hücre bölünmesi ve kallogenezi uyarmakta, bununla birlikte oksinin asidifikasyonunu artırması ve lignifikasyonun artması hücre duvarının sertliğinin azalmasına sebep olmaktadır. Ayrıca ışıksız ortamda fotosentez olmadığından kalluslarda yeşil renk yerine sarımsı renk elde edilmektedir (Ikeuchi ve diğ., 2013; Khan ve diğ., 2015; Kumlay ve Ercişli, 2015).

5.3. KÖK ve KOTİLEDON YAPRAĞI KALLUSLARINDAN SÜSPANSİYON VE SIVI ORTAMDA SAÇAK KÜLTÜRÜ OLUŞUMU ve GELİŞİMİNE YÖNELİK TARTIŞMA

Kök (Pigmentli) ve kotiledon yaprağı (Dağılgan) kalluslarından en iyi kallus oluşturmak amacıyla besi ortamları sıvı olarak kullanılarak süspansiyon kültürleri elde edildi. Tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen köklerden ise, *A. rhizogenes* kullanılarak Chaudhury ve Pal' ın

2010 rapor ettikleri çalışma modifiye edilerek saçak kök oluşturulması sağlandı. Elde edilen saçak kökleri sıvı besi ortamına aktarılarak sıvı ortamda saçak kök kültürleri elde edildi. Oluşturulan süspansiyon kültürleri ve sıvı saçak kök kültürlerinde optimizasyon olarak çalkalama hızları incelenmiş olup (90-100-110 rpm), kök süspansiyon kültürleri için 110 rpm, kotiledon yaprağı süspansiyon kültürleri için ise 100 rpm ve sıvı ortam saçak kök kültürleri için 100 rpm olarak belirlenmiştir. Literatürde, süspansiyon hatlarının ve sıvı saçak kök kültürlerinde çalkalama hızlarıyla ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda, yüksek ve düşük çalkalama hızları ile fazla miktarda besi ortamı barındıran süspansiyon kültürlerinde hücrelerin çoğalma kabiliyetlerinin azaldığı bu durumun metabolit birikiminin de etkilediği ile ilgili çalışmalara rastlanmaktadır (Kanokwaree ve Doran, 1997; Rajasekhar ve diğ., 1971; Devi ve diğ., 2006; İbrahim ve diğ., 2009; Loc ve An, 2010; Tilkat ve diğ., 2018).

Süspansiyon kültürlerinde gerçekleştirilen diğer bir çalışma olan büyüme eğrisi oluşturma çalışmaları ise, metabolit artırımı için elisitasyonun uygulanacağı zamanı verecektir. Elisitörün uygulama zamanı, önemli bir faktör olup, farklı büyüme fazındaki veya hücre döngüsündeki hücrelerin mRNA ve protein seviyeleri farklı olduğu gibi, hücrelerin farklı büyüme fazında da elisitöre cevapları farklı olmaktadır (Zhao ve diğ., 2001; Chong ve diğ., 2005; Narayani ve Srivastava, 2017). Sonuç olarak, farklı büyüme fazındaki elisitör uygulamaları büyüme ile ilgili cevaplarda ve sekonder metabolit biyosentezinde çeşitli sonuçlar oluşturabilir (Chong ve diğ., 2005; Narayani ve Srivastava, 2017). Örneğin; *Taxus chinensis* süspansiyon kültürlerine fungal elisitörün, büyümenin yavaşlama fazında uygulanarak takzol miktarını artırdığı, *Plumbago rosea* süspansiyon kültürlerine duraklama fazında mikrobiyal elisitör uygulamasının plumbagin miktarını artırdığı, *Pueraria tuberos* hücre süspansiyon kültürlerinde geç duraklama fazında, maya ekstraktı uygulamasının izoflavonoid üretiminde avantaj sağladığı rapor edilmiştir (Wang ve diğ., 2001; Komaraiah ve diğ., 2002; Goyal ve Ramawat 2008). Bununla birlikte, kök (Şikonin ve türevleri) ve kotiledon yaprağı (Yağ asitleri) süspansiyon hatları ile sıvı ortam saçak kök (Şikonin ve türevleri) hatları kullanılarak metabolit (Şikonin ve türevleri ve yağ asitleri) üretiminin yapıldığı çalışmalara literatürde rastlanmaktadır [**Kök süspansiyon**; *A. euchroma* (Fu ve Lu, 1998; Malik ve diğ., 2008), *E. italicum* (Zare ve diğ., 2010; 2011), *L. erythrorhizon* (Mizukami ve diğ., 1977; Deno ve diğ., 1987; Gaisser and Heide, 1996; Chung ve diğ., 2006), *O. echioides* (Lattoo, 2005), *O. paniculatum* (Ning ve diğ., 1998; Ding ve diğ., 2004), **Saçak kök**; *A. euchroma* (Zhang ve diğ., 2013; Wang ve diğ., 2018), *A. hispidissima* (Chaudhury ve Pal, 2010; Singh ve Sharma, 2016), *L. erythrorhizon* (Shimomura ve diğ., 1991; Brigham ve

diğ., 1999; Yazaki ve diğ., 2001; Köhle ve diğ., 2002; Zhao ve diğ., 2015; Fang ve diğ., 2016a,b; Zhu ve diğ., 2017), **Yağ asitleri**; *T. cacao* (Parra ve diğ., 2017), *E. acanthocarpum* saçak kök (Sanchez ve diğ., 2011; Zarate ve diğ., 2016)].

5.4. KÖK ve KOTİLEDON YAPRAĞI SÜSPANSİYON ve SIVI SAÇAK KÖK KÜLTÜRLERİNE METABOLİT ARTTIRIMI İÇİN ELİSİTASYON UYGULAMASINA YÖNELİK TARTIŞMA

Kök ve kotiledon yaprağı süspansiyon kültürleri ile sıvı ortam saçak kök kültürlerine Tablo 3.7’de sunulan elisitasyon tipleri büyüme eğrilerine göre elde edilen zaman diliminin sonunda (büyüme fazının sonunda) 12-24 ve 48 saat boyunca uygulanarak morfolojik ve sayısal veriler irdelendiğinde;

Sıvı ortam saçak kök kültürlerine uygulanan farklı tip ve zamanlarda elisitasyon uygulamalarında;

ABA, DMSO ve soğuk denemelerine göre MeJA’nın denenen iki farklı konsantrasyonunda (5-10 μ M) besi ortamlarında belirgin kırmızılıklar devam etmektedir. MeJA dışındaki diğer denemelerde besi ortamları koyu kırmızı bir renk aldığı gözlenmiştir. Saçak kök kitlesi bakımından MeJA ve DMSO’nun düşük konsantrasyonda denenmesi, diğer ortamlardaki denemelere göre özellikle 24 saat uygulamalarında daha fazla miktarda şikonin türevlerinin üretilmesine neden olmuştur [5 μ M MeJA 24 Saat (Yaş Ağırlık: 4.31 \pm 0.46 gr; Kuru Ağırlık: 0.47 \pm 0.05 gr); %0.1 DMSO 24 Saat (Yaş Ağırlık: 4.89 \pm 0.58 gr; Kuru Ağırlık: 0.54 \pm 0.06 gr)]. Bununla birlikte, kontrol dahil denemelerde yaş ve kuru ağırlıklar arası sayısal ve istatistiksel olarak paralellik tespit edildi. Elisitasyon uygulamasında 24. saatten 48. saate doğru büyüme, 12. saatten 24. saate kadar ki büyümeye oranla genelde ya çok zayıf ya da büyümede gerilemeler olduğu tespit edildi. En yüksek yaş ve kuru ağırlık 24 saat %1 DMSO (Yaş Ağırlık: 4.89 \pm 0.58 gr; Kuru Ağırlık: 0.54 \pm 0.06 gr) uygulamasında hesaplanırken, en düşük yaş ve kuru ağırlık 48 saat +4 °C (Yaş Ağırlık: 2.22 \pm 0.02 gr; Kuru Ağırlık: 0.25 \pm 0.01 gr) uygulamasında gözlemlendi. Bitkinin asıl büyüme sıcaklığı ortalama 25 °C olduğu bilindiğinden soğuk uygulama süresi arttıkça bitki metabolizması yavaşladığından, saçak kök gelişiminde gerileme olduğu hesaplandı. MeJA, ABA ve DMSO düşük doz uygulamalarında gelişimi olumlu etkilerken, yüksek doz ve uzun süre uygulamalarda ise gelişimi olumsuz yönde etkilediği hesaplandı. Saçak kök kültürlerine metabolit üretimi için uygulanan elisitasyon uygulamalarına yönelik

literatür irdelendiğinde; *Panax ginseng*'de saçak köklerin soğukta inkübasyonu saçak kök gelişimi, Susam saçak kökleri 30 °C'de inkübasyona karşılık 26°C inkübasyonda saçak kök gelişimini inhibe olmuştur (Yu ve diğ., 2015; Jin ve diğ., 2015). *Salvia miltiorrhiza* saçak köklerine MeJA uygulaması büyümede artış sağlamıştır (Wang vd, 2016). *Salvia sclarea* saçak kök kültürlerinde yüksek konsantrasyonlarda 62.5, 125, 250, 625 ve 1250 µM MeJA uygulamalarında en yüksek saçak kök miktarı 125 µM MeJA konsantrasyonunda gözlenmiştir (Kuzma ve diğ., 2009). *Rubia tinctorum* saçak kök kültürlerine 100 µM MeJA için uygulama süresi arttıkça saçak kök miktarında artış gözlenirken. *Rubia tinctorum* saçak kök kültürlerine düşük miktarda DMSO'nun farklı zaman uygulamalarında saçak kök miktarında artış gözlenmiştir (Perassolo ve diğ., 2017). *Cichorium intybus* L. saçak kök kültürlerine uygulanan % 0.1-0.6 arasında DMSO uygulamasında yüksek konsantrasyonlara göre düşük konsantrasyonlarda saçak kök miktarı yüksek olduğu gözlenmiştir (Bais ve diğ., 2001).

Kök süspansiyon kültürlerinde, saçak kök denemelerinde şikonin tip ve miktarının en fazla elde edildiği 24. Saat, kök süspansiyonu çalışmalarında tek uygulama zamanı olarak denemeler gerçekleştirildi. Kontrole göre gerçekleştirilen tüm denemelerde yaş ve kuru ağırlık miktarlarında artışlar tespit edildi. Literatürde, süspansiyon kültürlerine farklı elisitasyon uygulamalarında; *Mentha piperita* hücre süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda MeJA uygulaması gerçekleştirilmiş, 0-50-100-200 µM MeJA'nın 72 saate kadar uygulamalarında, kuru ağırlıkları azaltırken, *Taxus* hücre kültürlerine, kültürün 7. Gününde 150 µM MeJA uygulaması yapılması ardından 17. Güne kadar hücre kültürü miktarında artış sağlanırken, 17. günden itibaren hücre kültürü miktarında azalma meydana gelmiştir (Krzyzanowska ve diğ., 2012; Patil ve diğ., 2014). *Abrus precatorius* Linn. hücre kültürlerine 1, 10, 50, 100 mg/l maya özütü uygulamalarında 100 mg/l uygulamaya kadar hücre miktarında artış gözlenmiştir (Karwasara ve diğ., 2010). *Ophiorrhiza mungos* Linn. süspansiyon kültürlerine, 2-7.5 µM 15 gün AgNO₃ uygulamasında düşük ve yüksek konsantrasyonlarda 5. ve 10. günlerde kontrole göre yüksek hücre miktarı elde edildiği gözlendi (Deepthi ve Satheeshkumar, 2016).

Yağ asitlerinin üretimi için oluşturulan kotiledon yaprağı süspansiyon hatlarında gerçekleştirilen çalışmalarda, ABA, DMSO ve soğuk denemelerine göre MeJA'nın denenen iki farklı konsantrasyonunda besi ortamlarında belirgin koyu kahverengi renk tonu gözlendi. En önemli morfolojik gözlem, elde edilen süspansiyon kültürlerinin kaba filtre kağıdından

geçirilmesi sonrası kurutma aşamasında gözlemlendi. Bu gözleme göre genel olarak literatürde şikoninin bitkide en fazla kök kısmında rastlandığı, kültür ortamlarında ise 2,4-D uygulamaları sonucu şikonin miktarını düşürdüğü rapor edilirken, MeJA uygulamalarında kırmızı pigmentasyon gözlemlendi. Yaş ve kuru ağırlıklar bakımından saçak kök ve süspansiyon kültürlerinde olduğu üzere paralellik tespit edilmedi. Yağ ağırlık bakımından genel bir değerlendirme yapıldığında; yaş ağırlık Kontrol ve +4 °C uygulamalarına göre MeJA, ABA ve DMSO'nun düşük ve yüksek konsantrasyonlarıyla ve artan süreye göre artış gösterirken, kuru ağırlıklar bakımından yaş ağırlığının en düşük hesaplandığı +4 °C denemelerinde, kontrol ve diğer uygulamalara göre daha fazla arttığı gözlemlendi. Bu sonuç, özellikle ılıman iklim kuşağında yaşayan bitkiler için zarar verici bir abiyotik elisitör olan soğuk koşullara maruz kalan bitkilerin bir çeşit adaptasyon geçirerek sonbahar dönemi boyunca metabolizmalarını artırıp bir dizi kriyokoruyucu bazı bileşenleri [şeker alkollerini (sorbitol, mannitol, rubitol), çözünebilir şeker (sakkaroz, rafinoz), düşük molekül ağırlıklı azot bileşiklerini (prolin, glisin, betain)] ve fenolik madde üretimini (sentez edilen bu fenolikler hücre duvarına ya süberin ya da lignin olarak katılır) arttırarak soğuk koşullara tolerans sağlamaları ile ilişkili olabilir (Perez-Ilzarbe ve diğ., 2004; Griffith ve Yaish, 2004; Janska ve diğ., 2010; Akula ve Ravishankar, 2011).

5.5. *In Vivo* ve *In Vitro* KÜLTÜR UYGULAMALARINDAN ELDE EDİLEN ÖRNEKLERİN METABOLİT MİKTARININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK TARTIŞMA

In vivo köklerden yeteri kadar kuru madde elde edilemediğinden, total şikonin ve türevleri için miktar hesaplaması yapılmış olup, 12m yükseklikte 40°38'50" K 26°50'33" D koordinatlarındaki *E. italicum* bitkisine ait *in vivo* köklerde en fazla total şikonin ve türevleri içeriği (3mg Total Şikonin/3.30 gr kuru kök) tespit edilmiştir. Literatürde, doğal ortamdan toplanan bitkilerdeki şikonin miktarına ait çalışmalara rastlanmaktadır; [*Macrotomia usamensis* (Romanova ve Bankovskii, 1965), *Echium lycopsis* L. (Shcherbanovskii ve Luks, 1974), *Arnebia densiflora* (Bozan ve diğ., 1999; Yüzbaşıoğlu Baran ve diğ., 2018), *L. canescens*. (Michx.) Lehm. Kanada (Pietrosuik ve Wiedenfeld, 2005), *E. vulgare*, *E. russicum* (Polonya) (Dresler vd. 2015), *L. erythrorhizon*, *A. euchroma*, *A. guttata* (Liao ve diğ., 2015), *E. plantagineum*, *E. vulgare* (Avustralya) (Skoneczny ve diğ., 2017), *E. russicum* (Rusya) (Olennikov ve diğ., 2017)].

E. italicum türünden elde edilen tohumların yağ içeriklerinde en yüksek total yağ C2(b) (%19.05), en düşük total yağ A1 (%11.24) lokasyonundan toplanan örneklerde tespit edildi. Majör yağ asitleri; C16:0 Palmitik Asit, C18:0 Stearik Asit, C18:1 Oleik Asit, C18:2n6 Linoleik Asit, C18:3n6 γ - Linolenik Asit, C18:3n3 α -Linolenik Asit ve C18:4n3 Stearidonik Asit olarak gözlemlendi. Majör yağ asitlerinden tohumların içeriğinde en yüksek yağ asidi C18:3n3 α -Linolenik Asit olurken (B3: %43.91), en düşük yağ asidi C18:0 Stearik Asit (B8: %2.37) olarak tespit edildi. Majör yağ asitleri arasında en yüksek ve en düşük; C16:0 Palmitik Asit [C2(a) (%12.86), A5 (%8.02)], C18:0 Stearik Asit [C2(a) (%3.86), B8 (%2.37)], C18:1 Oleik Asit [B9(b) (%19.47), B3 (%13.37)], C18:2n6 Linoleik Asit [B9(b) (%16.63), A1 (%10.65)], C18:3n6 γ - Linolenik Asit [B8 (%10.28), C2(a) (%5.75)], C18:3n3 α -Linolenik Asit [B3 (%43.91), C2(a) (%34.87)] ve C18:4n3 Stearidonik Asit [A5 (%13.72), C2(a) (%8.8)] olarak tespit edildi. Literatürde farklı bölgelerden toplanan tohumların yağ asitleri irdelendiğinde, Boraginecea familyası üyelerinde majör yağ asidinin ALA olduğu çalışmalar mevcuttur (Guil-Guerrero ve diğ., 2000b; Özcan, 2008; Abbaszadeh ve diğ., 2011; Yunusova vd. 2012; Guil-Guerrero ve diğ., 2013a; Guil-Guerrero vd. 2017; Dresler ve diğ., 2017). *E. italicum* türüne ilişkin yapılan bir çalışmada, popülasyonlar arasında yağ asitleri konsantrasyonlarının belirgin oranlarda intraspesifik varyasyonlar gösterdiği bildirilmiştir (Özcan, 2013).

Sıvı saçak kök kültürlerine uygulanan elisitasyon sonrası, kuru maddelerin şikonin türevlerinin belirlenmesi kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, saçak köklerden en yüksek miktarda elde edilen şikonin türevleri Deoksi Şikonin, Asetil Şikonin, 2-Metilbütilil/İzovaleril Şikonin olarak tespit edildi. Morfolojik gözlem sonuçlarının sunulduğu 4.5.1 başlığında da ifade edildiği üzere MeJA uygulamalarında diğer uygulamalara göre daha açık kırmızı pigmentli besi ortamı oluştuğu tespit edilirken, analitik sonuçlarda genelde şikonin türevlerinin en yüksek miktarda MeJA uygulamalarında tespit edildiği gözlemlendi. Çalışma sonrası şikonin türevlerinin ve miktarlarının belirlendiği çalışmada hem gerçek hem de orantısal (1 gr) kuru madde üzerinden hesaplamalar yapıldı. Şikonin türevleri içerisinde en yüksek artışlar aynı saat dilimindeki kontrolüne göre; Deoksi Şikonin 48 Saat % 0.2 DMSO (~2 kat), Asetil Şikonin 24 Saat 10 μ M MeJA (~2 kat), 2-Metilbütilil/İzovaleril Şikonin 24 Saat 10 μ M MeJA (~87 kat) uygulamalarında tespit edildi. En yüksek Deoksi Şikonin miktarı 48 Saat % 0.2 DMSO (2.50 mg), 24 Saat 10 μ M MeJA (2.38 mg) uygulamalarında tespit edilirken, en düşük Deoksi Şikonin miktarı 24, 48 Saat 1 mg/l ABA ve 48 Saat 0.5 mg/l ABA (0.31, 0.28 ve 0.28 mg) uygulamalarında tespit edildi. En yüksek Asetil Şikonin miktarı 24 ve 48 Saat 10 μ M MeJA

(6.75 ve 4.65 mg) uygulamalarında tespit edilirken, en düşük Asetil Şikonin miktarı 24 Saat % 0.1 DMSO'da (0.77 mg) tespit edildi. En yüksek 2-Metilbütiril/İzovaleril Şikonin miktarı 12 ve 24 Saat 10 µM MeJA (6.99 ve 7.88 mg) uygulamalarında tespit edilirken, en düşük 2-Metilbütiril/İzovaleril Şikonin miktarı 24 ve 48 Saat Kontrol (0.09 ve 0.30 mg) uygulamalarında tespit edildi. Sıvı saçak kök kültürlerine uygulanan elisitasyon sonrası şikonin üretimi için en uygun uygulama 24 Saat 10 µM MeJA olup literatürde, MeJA uygulamasıyla şikonin üretimine yönelik birçok çalışma [*A. euchroma* (Urmantseva vd, 1999; Wang ve diğ., 2014; Arghavani ve diğ., 2015); *L. erythrorhizon* (Gaisser ve Heide, 1996; Mizukami ve diğ., 1992, 1993; Yazaki ve diğ., 1997b), *O. paniculatum* (Ding ve diğ., 2004)] rapor edilmiştir. Bu durumun gerçekleşmesinin sebebi MeJA'nın özellikle şikonin biyosentez yolağındaki PAL ve PHB-geraniltransferaz enziminin aktivitesini artırması olarak ifade edilmiştir (Ding ve diğ., 2014).

Kök süspansiyonlarına elisitasyon uygulaması sonrası saflaştırma için gerekli madde miktarına erişim sağlanamadığından şikonin üretimi için miktar belirleme çalışmaları gerçekleştirilememiştir.

In vitro kotiledon yaprağı süspansiyon hatlarına elisitasyon uygulaması sonrası yağ asidi miktarı en yüksek total yağ S12 (%9.30), en düşük total yağ S8 (%1.94)'de tespit edildi. Majör yağ asitleri olarak; C16:0 Palmitik Asit, C16:1 Palmitoleik Asit, C18:0 Stearik Asit, C18:1 Oleik Asit, C18:2n6 Linoleik Asit, C18:3n6 γ- Linolenik Asit, C18:3n3 α-Linolenik Asit ve C18:4n3 Stearidonik Asit olarak tespit edildi. Majör yağ asitlerinden tohumların içeriğinde en yüksek yağ asidi C16:1 Palmitoleik Asit olurken (S16: %32.41), en düşük yağ asidi C18:4n3 Stearidonik Asit (S14: %0.65) olarak tespit edildi. Majör yağ asitleri arasında en yüksek ve en düşük; C16:0 Palmitik Asit [S16 (%32.41), S17 (%21.04)], C16:1 Palmitoleik Asit [S10 (%3.70), S17 (%0.68)], C18:0 Stearik Asit [S4 (%3.79), S21 (%2.65)], C18:1 Oleik Asit [S21 (%31.63), S14 (%22.13)], C18:2n6 Linoleik Asit [S6 (%27.55), S14 (%18.70)], C18:3n6 γ-Linolenik Asit [S4 (%8.63), S14 (%5.28)], C18:3n3 α-Linolenik Asit [S1 (%11.42), S20 (%4.60)] ve C18:4n3 Stearidonik Asit [S1 (%2.74), S14 (%0.65)] olarak tespit edildi. *In vitro* ortamda yağ asitlerinin üretimiyle ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır; Stearns ve Morton'un 1975 yılında rapor ettiği çalışmada, soya süspansiyon kültürlerine sitokin ve gibberellik asit kombinasyonu uygulamasında LA üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Lopez ve diğ., 1999 yılında rapor ettiği çalışmada, Maydanoz'un farklı *in vitro* kültürlerinde ileri zaman

dilimlerinde alınan örneklerde bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Ahmad ve diğ., 2014 yılında rapor ettikleri çalışmada; *Brassica napus*'dan elde edilen BnDGAT2 geninin *Chlamydomonas reinhardtii*'ye aktarılmasıyla çoklu doymamış yağ asitlerinin üretimi artırdığı rapor edilmiştir. Da Silva Assis Machado ve diğ., tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada, *Cereus peruvianus*'un uzun süreli kallus kültürlerinde LA üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Flores ve Castillo'un 2016 yılında rapor ettiği çalışmada, siyah frenk üzümü (*Ribes sp.*) *in vivo* kültürlerine farklı oranlarda MeJA içeren solüsyon uygulamasında sfü tohumlarında GLA üretiminin arttığı gözlenmiştir. Mahalakshmi ve diğ., tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada, *Jatropha curcas* kallus kültürlerinde salisilik asit uygulaması sonrası yağ asidi üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Parra vd. tarafından 2017 yılında yayınlanan bir çalışmada, *Theobroma cacao* L. süspansiyon kültürlerine biotin uygulaması sonrası bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin üretiminin arttığı ifade edilmiştir. Wang vd.'nin 2018 yılında rapor ettiği çalışmada, *Arachis hypogaea* L. transgenik hatlarında, kontrole göre bazı çoklu doymamış yağ asitlerinin üretiminin arttığı belirlenmiştir.

5.6. ANTİKANSER ÇALIŞMALARA YÖNELİK TARTIŞMA

MCF-7 hücrelerinde 4, 6, 8, 10, 12 μM konsantrasyonların da Türev-3 şikonin ekstraktı proliferasyonun baskılandığı fakat 2 μM Türev-3 şikonin ekstraktı konsantrasyonun proliferasyonu artırıcı etkisi tespit edildi. Türev-3 şikonin ekstraktının konsantrasyon ve sürenin artmasına bağlı olarak hücrelerde anti-proliferatif etki gösterdiği tespit edildi. Zamana bağlı olarak 4 μM konsantrasyonda Türev-3 şikonin ekstraktı hücrelerde proliferasyonu arttırdığı ve yaklaşık olarak madde eklenmesinden 30 saat sonra 4 μM ile muamele edilen hücrelerin kontrol hücre sayısına yaklaştıkları gözlemlendi. En dikkat çeken ise 6, 8, 10, 12 μM konsantrasyonlar da Türev-3 şikonin ekstraktı ile muamele edilen hücrelerde etkili ve doza bağlı olarak uyumlu anti proliferatif etki gözlemlendi. Kemoterapiye dirençli ve metastatik kapasitesinin yüksek olması nedeniyle MDA-MB-231 hücre hatları yeni terapötik ilaç geliştirme çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Türev-3 şikonin ekstraktlarıyla muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyon analizinde hücrelerin proliferasyonunun doza bağlı olarak baskılandığı tespit edildi (Şekil 4.59). Türev-3 şikonin ekstraktları uygulanan farklı moleküler alt-gruptaki meme kanser hücre hatlarının her ikisinde de 8 μM , 10 μM ve 12 μM konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde baskıladığı tespit edildi. Literatürde şikonin ve türevlerinin bir çok hastalığı karşı ve kanser

hücre hattına karşı antiproliferatif etki oluşturduğu rapor edilmiştir (Malik ve diğ., 2014). Kanser hücrelerine karşı şikoninin, p53'ün (tümör süpresör protein) ekspresyonunu proapoptotik proteinlerle birlikte düzenlediği bildirilirken, kanser hücreleriyle mücadelesini birçok mekanizmayla (topoizomeraz-I inhibisyonu, protein tirozin kinaz inhibisyonu ve kaspaz aktivasyonu vb.) sağlamaktadır. (Hsu ve diğ., 2004; Wu ve diğ., 2004, Mao ve diğ., 2008; Jang ve diğ., 2014). Aynı zamanda, şikoninin hücre gelişime ve farklı kanser hücre hatları üzerine yan etkisi tespit edilmemiştir (Yao ve Zhao, 2010). Şikoninin (şikonin ve türevlerinin) MCF ve MDA-MB-231 kanser hücre hatları üzerine düşük miktarda uygulanmasıyla oluşan antiproliferatif etkinin araştırıldığı çalışmalara literatürde sıkça rastlanmaktadır (Wu ve diğ., 2013; Qui ve diğ., 2017; Lin ve diğ., 2018). Meme kanserlerinde östrojenin önemli bir karsinojenik faktör olduğu kabul edilirken, özellikle şikoninin yukarıda belirtilen mekanizmaları hareketlendirerek antiöstrojenik etki göstermek suretiyle meme kanseri hücrelerini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Yao ve Zhao, 2010).

Sonuç olarak, tez kapsamında gerçekleştirilen denemelerimizde;

- Boraginaceae familyasına ait *E. italicum* L. tohumlarının BBD içermeyen MS besi ortamında çimlendirilmesiyle elde edilen bitkiciklerden alınan kök ve kotiledon yaprağı eksplantlarından, şikonin ve türevleri ile yağ asitlerinin üretimi için kallus oluşturulmaya çalışıldı. Kallus oluşturma çalışmalarında, istenen özellikte ve tipte kallus oluşumları ile gelişimleri için kök eksplantları 2 mg/l Kinetin ve 0.2 mg/l IAA destekli LS besi ortamı, kotiledon yaprağı eksplantları için 2 mg/l Kinetin ve 0.2 mg/l 2,4-D destekli LS besi ortamı olarak belirlenmiştir.
- Geliştirilen kalluslardan süspansiyon kültürü oluşturma ve geliştirme çalışmaları kapsamında kök süspansiyonları için optimum çalkalama hızı 110 rpm, kotiledon yaprakları için ise 100 rpm olarak belirlenmiştir. Şikonin ve türevlerinin üretilmesi çalışmaları için diğer bir kültür tipi olarak oluşturulan saçak kökler ise, çimlendirilen bitkiciklerden elde edilen kökler *A. tumefaciens* ile enfeksiyonu sonrası oluşturulurken, saçak köklerin sıvı besi ortamında gerçekleştirilen optimizasyon kapsamında optimum çalkalama hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir.
- Oluşturulan *in vitro* kültürler kullanılarak metabolit üretimi ve üretimlerinin artırılması için kullanılan fiziksel ve kimyasal elisitasyonlarının uygulanması için optimum zamanının belirlenmesi çalışmalarında; kök süspansiyon kültürlerinde büyüme fazının

sonu olan 21. gün, kotiledon yaprakları süspansiyon kültürlerinde büyüme fazının sonu olan 14. gün olarak, sıvı ortamda üretilen saçak kökleri için ise (besi ortamında koyu pigmentasyonun gözlemlendiği) 20. günün sonu olarak belirlenmiştir.

- *In vitro* kültürlerde metabolit üretiminin artırılması için uygulanan farklı elisitasyon çalışmalarında ise, şikonin ve türevlerinin üretiminin artırılmasında; sıvı ortamda saçak kök kültürlerine uygulanan farklı tipte ve zamanlardaki elisitasyon uygulamalarında, şikonin ve türevlerinin artırılmasında en başarılı uygulama 24 saat 10 µM MeJA olarak belirlenirken, kök süspansiyon kültürlerinde ise yeteri kadar kuru madde elde edilemediğinden dolayı saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilememiş, dolayısıyla şikonin ve türevlerine yönelik miktar tespiti yapılamamıştır. Kök süspansiyonları çalışmalarında ise metabolit miktarı tespitinde gerekli biyomasın elde edilebilmesi için yüksek hacimde kültür oluşturulması önemlidir.
- Yağ asitlerinin üretimin artırılmasında, kotiledon yaprağı süspansiyon kültürlerine uygulanan farklı tipte ve zamanlardaki elisitasyon uygulamalarında, saçak köklerde olduğu gibi ortak bir uygulama tespit edilemezken en ümit vadeden sonuçlar soğuk ve DMSO uygulamalarında tespit edilmiştir.
- *In vitro* kültürlerden elde edilen maddelerin antikanser aktivite çalışmalarında ise, kemoterapik ilaçlara dirençli metastatik meme kanseri hücre hatlarına Türev-3'ün, düşük konsantrasyonlarda antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir.
- Tez çalışması kapsamında *E. italicum* L. türünün *in vitro* kültürlerine metabolit üretimi ve artırılmasına yönelik uygulanan metot ve yöntemler, başta Boraginaceae familyası olmak üzere diğer bitki gruplarında da tespit edilebilecek biyoaktif metabolitlerin beslenme, sağlık ve endüstriyel alanlarda standardize edilmiş koşullarda yüksek verimle üretimi için referans veriler olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abbaszadeh, S., Tayebbeh, R., Massoud, T., Faezeh, F. and Yasaman, S., 2011, Characterization of fatty acids in different organs of some Iranian *Echium* plants, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (19), 4814-4821.
- Abyari, M., Nasr, N., Soorni, J. and Sadhu, D. 2016, Enhanced accumulation of scopoletin in cell suspension culture of *Spilanthes acmella* Murr. using precursor feeding, *Biological and Applied Sciences*, 59, e16150533.
- Açıkgöz, M.A., Yarılgaç, T. and Kara, Ş.M., 2017, Enhancement of phytochemical compounds using biotic and abiotic elicitors in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.), *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52 (4), 140-145.
- Ahmad, I., Sharma, A.K., Daniell, H. and Kumar, S., 2014, Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of brassica diacylglycerol acyltransferase 2, *Plant Biotechnology Journal*, 13 (4), 540-550.
- Akoh C.C. and Min D.B., 2018, *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, 3th ed.
- Akula, R. and Ravishankar, G.A., 2011, Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Plant Signaling and Behavior*, 6 (11), 1720-1731.
- Albrecht, A., Vovk, I., Simonovska, B. and Srbinoska, M., 2009, Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of *Echium italicum* L, *Journal of Chromatography A*, 1216 (15), 3156-62.
- Al-Mussawi, A.A., 2010, Isolation and identification of shikonin from *Arnebia decumbens* L. and its antibacterial activity, *Journal of Applied Sciences Research*, 6 (9), 1452-1456.
- Amoah, S.K., Sandjo, L.P., Kratz, J.M., Biavatti, M.W., 2016, Rosmarinic acid – pharmaceutical and clinical aspects, *Planta Medica*, 82 388–406.
- Arehzoo, Z., Christina, S., Florian, G., Parvaneh, A., Javad, A., Seyed, H.M. and Christoph, W., 2015, Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel, *Industrial Crops and Products*, 67 97–102.
- Arghavani, P., Haghbeen, K. and Mousavi, A., 2015, Enhancement of shikalkin production in *Arnebia euchroma* callus by a fungal elicitor, *Rhizoctonia solani*, *Iran Journal of Biotechnology*, 13 (4), e1058.
- Arm, JP., Boyce, JA., Wang, L., Chhay, H., Zahid, M. and Patil, V., 2013, Impact of botanical oils on polyunsaturated fatty acid metabolism and Leukotriene's generation in mild asthmatics, *Lipids Health Disease*, 2 (12), 141-145.
- Asadi-Samani, M., Bahmani, M. and Rafieian-Kopaei, M., 2014, The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: A review, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, S22-S28.

- Assimopoulou, A.N., Tappeiner, J., Ganzera, M., Vasiliou, A., Stuppner, H. and Papageorgiou, V.P., 2011, Determination of alkannin/shikonin derivatives in endemic Greek *Alkanna* species, *Planta Medicine*, 77.
- Awad, V., Kuvalekar, A. and Harsulkar, A., 2014, Microbial elicitation in root cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. for elevated glycyrrhizic acid production, *Industrial Crops and Products*, 54, 13–16.
- Aymelek, N., 2015, *Echium L. (Boraginaceae) Türleri Üzerinde Anatomik Araştırmalar*, Yüksek Lisans, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bae, K.H., Ko, M.S., Lee, M.H., Kim, N.Y., Song, J.M. and Song, G., 2013. Effects of NaOCl treatment on *in vitro* germination of seeds of a rare endemic plant, *Oreorchis coreana* Finet, *Journal of Plant Biotechnology*, 40, 43–48.
- Bagheri, F., Tahvilian R., Karimi, N., Chalabi, M. and Azami, M., 2018, Shikonin production by callus culture of *Onosma bulbotrichom* as active pharmaceutical ingredient, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17 (2), 495-504.
- Bais, H.P., Sudha, G., Suresh, B. and Ravishankar, G.A., 2001, Permeabilization and in situ adsorption studies during growth and coumarin production in hairy root cultures of *Cichorium intybus* L., *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 564-571.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P., Vivanco, J.M., 2002, Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (11), 983-995.
- Barampuram, S., Allen, G., Krasnyanski, S., 2014, Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118 (1), 179-185.
- Bérdy, J., 2005, Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58 (1), 1-26.
- Bernard, Y.K.B., Christie, A.M.P., Jacqueline, V.S., Ka-Yiu, S., 2009, The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots, *Biotechnology Progress*, 25, 8615.
- Bertani, G., 1951, Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 62, 293-300.
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R. and Tanmoy, B. 2015, Plant Tissue Culture, *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 31, 107.
- Bilka, F., Balážová, A., Bilková, A. and Holková, I., 2013, Effect of abiotic elicitation on the sanguinarine production and polyphenol oxidase activity in the suspension culture of *Eschscholtzia californica* CHAM, *Ceská Slovenská Farmacie*, 62 (4), 169-173.
- Blasbalg, T.L., Hibbeln, J.R., Ramsden, C.E., Majchrzak, S.F. and Rawlings, R.R., 2011, Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century, *American Journal of Clinical Nutrition*, 93 (5), 950-962.

- Blondeau, N., 2016. The nutraceutical potential of omega-3 alpha-linolenic acid in reducing the consequences of stroke, *Biochimie*, 120, 49-55.
- Boehm, R., Sommer, S., Li, S.M. and Heide, L., 2000, Genetic engineering on shikonin biosynthesis: expression of the bacterial *ubiA* gene in *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Cell Physiology*, 41:911–919.
- Bown, D., 1995, *Encyclopedia of Herbs and their Uses*, The Royal Horticultural Society, Dorling Kindersley Ltd., London. 233 pp.
- Bozan, B., Baser, K.H.C. and Kara, S., 1999, Quantitative determination of naphthoquinones of *Arnebia densiflora* by TLC-densitometry, *Fitoterapia*, 70 (4), 402-406.
- Bozan, B., Başer, K.H.C. and Kara, S., 1997, Quantitative determination of naphthaquinones of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by an improved high-performance liquid chromatographic method, *Journal of Chromatography A*, 782 (1), 133-136.
- Brigham, L.A., Michaels, P.J. and Flores, H.E., 1999, Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Physiology*, 119, 417-428.
- Bruneton, J., 1999, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, Lavoisier Technique & Documentation*, Paris.
- Bulgakov, V.P., Kozyrenko, M.M. and Fedoreyev, S.A. 2001, Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon*, *Fitoterapia*, 72, 394–340.
- Bychkova, T.P., Nanenina, E.B., Berzin, V.B. and Miroshnikov, A.L. 1993, Influence of jasmonic acid and 12-oxophytodienoic acid on the biosynthesis of shikonin in a cell culture of *Arnebia euchroma*, *Bioorganicheskaya Khimiya*, 19, 1008–1012.
- Castellar, A., Gagliardi, R.F., Mansuri, E., 2011, *In vitro* propagation and establishment of callus and cell suspension cultures of *Petiveria alliacea* L., valuable medicinal plant, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (7), 1113-1120.
- Chang-Jun, L. and Song-Sheng, H. 1998, Effects of fungal encitors on the cell growth and the shikonin biosynthesis in *Arnebia euchroma* cells in suspension culture, *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 24 (1), 6-10.
- Chaouche, T., Haddouchi, F. and Bekkara, F.A., 2012, Identification of shikonin from the roots of *Echium pycnanthum* Pomel., *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (3), 1-3.
- Chaudhury A. ve Pal M. 2010. Induction of shikonin production in hairy root cultures of *Arnebia hispidissima* via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation, *Journal Crop Science and Biotechnology*, 13 (2), 99-106.
- Cho, M.H., Paik, Y.S. and Hahn, T.R., 1999, Propionylshikonin from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*, *Archives of Pharmacal Research*, 22 (4), 414-416.

- Chong, T.M., Abdullah, M.A. and Lai, O.M., 2005, Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture, *Process Biochemistry*, 40:3397–3405.
- Chun, J.H., Adhikari, P.B., Park, S.B., Han, J.Y. and Choi, Y.E. 2015, Production of the dammarene sapogenin (protopanaxadiol) in transgenic tobacco plants and cultured cells by heterologous expression of PgDDS and CYP716A47. *Plant Cell Reports*, 34, 1551–1560.
- Chung, B.Y., Lee, Y.B. and Baek, M.H. 2006, Effects of low-dose gamma irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* S. Radiat, *Physical Chemistry*, 75, 1018–1023.
- Cisowski, W., Zielińska, M., Stasiak, Stołyhwo A., Migas, P. and Kamieniec, A., 2001. Gas-liquid chromatographic analysis of fatty acids obtained from the seeds of some boraginaceae plants, *Acta Chromatographica*, 11, 215-223.
- Clough, P.M., 2001, *Specialty vegetable oils containing gamma-linolenic acid and stearidonic acid*, In: Structured and Modified Lipids, Gunstone, F.D., Marcel Dekker Inc. (eds.), New York, pp. 75-117.
- Coupland, K., 2008, Stearidonic acid: A plant produced omega-3 PUFA and a potential alternative for marine oil fatty acids, *Lipid Technology*, 22 (7), 152-154.
- Cuero R.G., Smith, J.E. and Lacey, J., 1986, The influence of gamma irradiation and sodium hypochlorite sterilization on maize seed microflora and germination, *Food Microbiology*, 3 (2), 107-113.
- Çakıloğlu, U., Türkoğlu, İ., ve Kürşat, M., 2007, Harput (Elazığ) ve Çevresinin Etnobotanik Özellikleri, *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, Elazığ.
- Da Silva Assis Machado, F.A.P., Capelasso, M., de Oliveira, A.J.B., Gonçalves, R.A.C, Zamuner, M.L.M., Mangolin, C.A. and de Fatima P.S. Machado, M., 2006, Fatty acids production from plants and callus cultures of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae), *Journal of Plant Sciences*, 1, 368-373.
- Da, S.T., Mendes, A., Mendes, R.L., Calado, V., Alves, S.S., Vasconcelos, J.M., Reis, A., 2006, Effect of n-dodecane on *Cryptocodinium cohnii* fermentations and DHA production, *Journal of Indian Microbiology Biotechnology*, 33, 408–416.
- Davis, P.H., 1965, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 6. Edinburgh University Press, UK.
- Davis, P.H., 1978, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 6, Edinburgh University Press, UK.
- Deepthi, S. and Satheeshkumar, K., Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124 (3), 483-493.

- Demain, A.L. and Fang, A., 2000, The natural functions of secondary metabolites, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 69: 1-39.
- Deno, H., Suga, C., Morimoto, T. and Fujita, Y., 1987, Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*: VI. Production of shikonin derivatives by a two-layer culture containing an organic solvent, *Plant Cell Reports*, 6, 197–209.
- Devi, C.S., Muruges, S. and Srinivasan, M.V., 2006, Gynemic acid production in suspension cell culture, of *Gymnema sylvestre*, *Journal of Applied Science*, 6 (10), 2263-2268.
- Ding, J., Shi S., Jiang B. H., Yang Y. H., Huang J., Shen H. G., Xia K., Zhang J. And Jiang X. 2004, Effects of methyl jasmonate with indole-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* Cells, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40 (6), 581-585.
- Doğru-Koca, A., Özcan, T. and Yıldırım, Ş., 2016, Chemotaxonomic perspectives of the *Paracaryum* (Cynoglosseae, Boraginaceae) taxa based on fruit fatty acid composition, *Phytochemistry*, 131, 100-106.
- Dresler, S., Badnarek, W., Nowak, B.H. and Wojcik, M., 2017, Morphometric and phytochemical profile of seeds of metallicolous and nonmetallicolous *Echium vulgare* populations, *Biochemical Systematics and Ecology*, 70, 304-310.
- Dresler, S., Kubrak, T., Bogucka-Kocka, A. and Szymczak, G., 2015, Determination of shikonin and rosmarinic acid in *Echium vulgare* L. and *Echium russicum* J.F. Gmel. by Capillary Electrophoresis, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 38 (6), 698-701.
- Dyal, S.D. and Narine, S.S., 2005, Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids, *Food Research International*, 38 (4), 445-467.
- Edalatifard, L., Sanavy S. A. M. M. and Askari, H., 2014, The optimum condition under light and media for seed germination of *Withania coagulans*, *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3 (7), 722-728.
- Edmondson, J.R., 1978. *Echium*. In: Flora of Turkey and East Aegean Islands Vol 6., Davis, P.H., (ed), University Press, Edinburgh, 319–325.
- Elagbar, Z.A., Naik, R.R., Shakya, A.K. and Bardaweel, S.K., 2016, Fatty acids analysis, antioxidant and biological activity of fixed oil of *Annona muricata* L. seeds, *Journal of Chemistry*, Doi10.1155/2016/6948098.
- Erdemoğlu, N., Kusmenoğlu, S. and Vural, M., 2004, γ -Linolenic acid content and fatty acid composition of Boraginaceae seed oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 160-164.
- Fadhali, M. and Hamzah, M., 2017, Enhancement of artemisinin content in *Artemisia annua* By increasing gene expression with abscisic acid (ABA) and salinity stress treatment, *Proceeding of Science and Technology*, 1 (1), 10-17.

- Fang, R., Wu, F., Zou, A., Zhu, Y., Zhao, H., Zhao, H., Liao, Y., Tang, R.J., Yang, T., Pang, Y., Wang, X., Yang, R., Qi, J., Lu, G. and Yang, Y., 2016a, Transgenic analysis reveals LeACS-1 as a positive regulator of ethylene-induced shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* hairy roots, *Plant Molecular Biology*, 90, 345–358.
- Fang, R., Zou, A., Zhao, H., Wu, F., Zhu, Y., Zhao, H., Liao, Y., Tang, R.J., Yang, T., Pang, Y., Yang, R., Wang, X., Qi, J., Lu, G. and Yang, Y., 2016b, Transgenic studies reveal the positive role of LeEIL-1 in regulating shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* hairy roots, *BMC Plant Biology*, 16, 121.
- Fathy, H.M., Aboushoer, M.I., Baraka, A., Abdel-Kader, M.S. and Omar, A.A., 2009, A new naphthoquinone with anti-inflammatory activity from an Egyptian collection of *Echiochilon fruticosum*, *Natural Product Sciences*, 15 (1), 22-26.
- Filová, A. 2014, Production of secondary metabolites in plant tissue cultures, *Research Journal of Agricultural Science*, 46 (1), 236-245.
- Flores, G. and Ruiz del Castillo, M.L., 2016, Enhancement of nutritionally significant constituents of black currant seeds by chemical elicitor application, *Food Chemistry*, 194, 1260–1265.
- Francisco, M.R., Saldanha, T. and Fraga, M.E., 2017, Fungi as an alternative to produce essential fatty acids, *Scientifica*, 45 (2), 123-129.
- Fu, X. and Lu, D., 1998, Enhancement of shikonin production in cell suspension culture of *Arnebia euchroma* employing two-liquid phase system, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 6 (1), 86-90.
- Fu, X. and Lu, D., 1998, Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and in situ extraction in suspension cultures of *Arnebia euchroma*, *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 243–246.
- Fujita, N. and Yoshida, Y., 1937, Ueber die anatomie von *Radix lithospermi*, *Yakugaku Zasshi*, 57:368–391.
- Fujita, Y., Hara, Y., Ogino, T. and Suga, C., 1981a, Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. I. Effects of nitrogen source on the production of shikonin derivatives, *Plant Cell Reports*, 1, 59–60.
- Fujita, Y., Hara, Y., Suga, C. and Morimoto, T., 1981b, Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* II. A new medium for the production of shikonin derivatives, *Plant Cell Reports*, 1, 61-63.
- Fukui, H., Tani, M. and Tabata, M., 1990, Induction of shikonin biosynthesis by endogenous polysaccharides in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures, *Plant Cell Reports*, 9:73–76.
- Fukui, H., Tsukada, M., Mizukami, H. and Tabata, M., 1983, Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinone derivatives in *Echium lycopsis* callus cultures, *Phytochemistry*, 22, 453–456.

- Gaisser, S. and Heide, L., 1996, Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*, *Phytochemistry*, 41, 1065–72.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K., 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Experimental Cell Research*, 50, 151–158.
- Ge, F., Yuan, X. and Wang, X., 2006, Cell growth and shikonin production of *Arnebia euchroma* in a periodically submerged airlift bioreactor, *Biotechnology Letter*, 28, 525–529.
- Giri, A. and Narasu, M.L., 2000, Transgenic hairy roots, recent trends and applications, *Biotechnology Advances*, 18, 1–22.
- Goyal, S. and Ramawat, K.G., 2008, Increased isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* by elicitors, *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 378–382.
- Griffith, M. and Yaish M.W.F., 2004, Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities, *Trends Plant Science*, 9, 399-405.
- Guil-Guerrero, J.L., Garcia-Maroto, F. and Giménez-Giménez, A., 2001a, Fatty acid profiles from forty-nine plant species that are potential new sources of γ -linolenic acid, *Journal of American Oil and Chemical Society*, 78, 677-684.
- Guil-Guerrero, J.L., Campra-Madrid, P. and El-Hassan, B., 2000a, γ –Linolenic acid purification from seed oil sources by argentated silica gel chromatography column, *Process Biochemical*, 36 (4), 341-354.
- Guil-Guerrero, J.L., Gomez-Mercado, F., Rodriguez-Garcia, I., Campra Madrid, P. and Garcia-Maroto, F., 2001b, Occurrence and characterization of oils rich in γ -linolenic acid (III): the taxonomical value of the fatty acids in *Echium* (Boraginaceae), *Phytochemistry*, 58 (1), 117-120.
- Guil-Guerrero, J.L., López-Martínez, J.C. and Campra-Madrid, P., 2008, Gamma-linolenic extraction from seed by SCF and several solvent systems, *International Journal of Food and Science Technology*, 43, 1176-1180.
- Guil-Guerrero, J.L., López-Martínez, J.C., Gómez-Mercado, F. and Campra-Madrid, P., 2006, Gamma-linolenic and stearodinic acids from Moroccan Boraginaceae, *European Journal of Lipid Science Technology*, 108, 43-47.
- Guil-Guerrero, J.L., Mercado F.G., Bueno, R.P.R., Cervera, M.A.R. and Elena, V.V. 2014, Restricted-range Boraginaceae species constitute pote, *Journal of Oil and Fat Industries Journal of American Oil Chemistry Society*, 91, 301–308.
- Guil-Guerrero, J.L., Mercado F.G., Bueno, R.P.R., Cervera, M.A.R., Fernandez, M.J.G., Urrestarazu, M. and Cervera, M.A.R., 2017, Sardinian Boraginaceae are new potential sources of gamma-linolenic acid, *Food Chemistry*, 218, 435–439.
- Guil-Guerrero, J.L., Mercado F.G., Bueno, R.P.R., Cervera, M.A.R., Fernandez, M.J.G., Urrestarazu, M., Becker, S.J. and de Belair, G., 2018, Fatty acid profiles and sn-2 fatty

- acid distribution of γ -linolenic acid-rich *Borago* species, *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 74–80.
- Guil-Guerrero, J.L., Rincón-Cervera, M.A., Rincon-Cervera, M.A., Gomez-Mercado, F., Ramos-Bueno, R.P. and Venegas-Venegas, C.E., 2013a, New seed oils of Boraginaceae rich in stearidonic and gamma-linolenic acids from the Maghreb region, *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 20–23.
- Guil-Guerrero, J.L., Rincón-Cervera, M.A., Venegas-Venegas, C.E., Ramos-Bueno, R.P. and Suárez-Medina, M.D. 2013b, Highly bioavailable α -linolenic acid from the subcutaneous fat of the palaeolithic relict “Galician horse”, *International Food Research Journal*, 20, 3249–3258.
- Guil-Guerrero, J.L., Garcia-Maroto, F., Campra-Madrid, P. and Gómez-Mercado, F., 2000b., Occurrence and characterization of oils rich in gamma-linolenic acid Part II: fatty acids and squalene from Macaronesian *Echium* Leaves, *Phytochemistry*, 54 (5), 525-529.
- Gunstone, F.D., 1992, γ -Linolenic acid –occurrence and physical and chemical properties, *Progressive Lipid Research*, 31, 145-161.
- Gupta, K., Garg, S., Singh, J. and Kumar, M., 2014, Enhanced production of naphthoquinone metabolite (shikonin) from cell suspension culture of *Arnebia* sp. and its up-scaling through bioreactor, *3Biotech*, 4, 263–273.
- Güner, A ve Ekim, T., 2014, *Resimli Türkiye Florası cilt 1 Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi yayınları Flora dizisi*, 2. Flora Araştırmaları Derneği ve Türkiye İş Bankası Kültür yayınları, İstanbul.
- Güven, A. ve Gürsul, I., 2014, Bitki doku kültürlerinde ikincil metabolit sentezi, *Gıda*, 39 (5), 299- 306.
- Hagh, Z.G., Jokar, S., Bodaghi H. and Modarres, M., 2018, Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the production of rosmarinic acid and caffeic acid in callus culture of *Salvia lerrifolia* Benth, *Iranian Journal of Plant Biology*, 10 (1), 1-15.
- Hao, H., Lei, C. and Shen, Y., 2014, Effects of exogenous methyl jasmonate on the biosynthesis of shikonin derivatives in callus tissues of *Arnebia euchroma*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 2198–2210.
- Hao, H., Pu, G.P., Lei, C.Y., Ye, H.C. and Wang, H., 2015, Effects of ammonium ion on cell growth and biosynthesis of shikonin derivatives in callus tissues of *Arnebia euchroma*, *Biologia*, 70 (8), 1053–1062.
- Hendawy, S.F. and El-Gengaihi, S., 2010, Comparative responses of *Borago officinalis* and *Echium vulgare* to different nitrogen and phosphorus sources, *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 16 (1), 12-23,
- Hildebrand, D., 2011, *Production of unusual fatty acids in plants*, Chapter in *Plant Lipid biochemistry in online book*, The AOCS Lipid Library.

- Hilger, H. H. and Böhle R.U. (2000). Pontechium: A new genus distinct from *Echium* and *Lobostemon* (Boraginaceae), *Intertional Association for Plant Taxonomy*, 49 (4), 737-746.
- Horrobin, D.F., 1992, Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid, *Progressive Lipid Research*, 31 (2), 163-194.
- Hosseini, A., Mirzaee, F., Davoodi, A., Jouybari, H.B. and Azadbakht, M., 2018, The traditional medicine aspects, biological activity and phytochemistry of *Arnebia* spp., *Medicinski Glasnik*, 15 (1), 1-9.
- Hou, Y.Z., Chen, K.K., Deng, X.L., Fu, Z.L., Chen, D.F., and Wang, Q., 2017, Anti-complementary constituents of *Anchusa italica*, *Natural Product Research*, 31 (21), 2572-2574.
- Hsu, P.C., Huang, Y.T., Tsai, M.L., Wang, Y.J., Lin, J.K. and Pan, M.H., 2004, Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of the Bcl-2 family, p27, and p53, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6330–6337.
- Hu, Y., Jiang, Z., Leung, S.Y.K. and Zhao, Z., 2006, Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in Boraginaceous herbs by high-performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 577 (1), 26-31.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A., 2013, Plant callus: Mechanisms of induction and repression, *Plant Cell*, 25 (9), 3159-3173.
- Işıkalan, Ç., Adıyaman Akbaş, F., Namlı, S., Tilkat, E. and Başaran, D., 2008, *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil), *African Journal of Biotechnology*, 7 (12), 1875-1880.
- Ito, Y., Onobori, K., Yamazaki, T. and Kawamura, Y., 2011, Tigloylshikonin, a new minor shikonin derivative, from the roots and the commercial root extract of *Lithospermum erythrorhizon*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 117-119.
- İbrahim, A., Khalifa, S., Khafagi, I., Youssef, D., Khan, I. And Mesbah, M., 2009, Enhancement of oleandrin production in suspension cultures of *Nerium oleander* by combined optimization of medium composition and substrate feeding, *Plant Biosystem*, 143 (1), 97-103.
- Jaisi, A. and Panichayupakaranant, P., 2016, Enhanced plumbagin production in *Plumbago indica* root cultures by l-alanine feeding and in situ adsorption. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 38 (2), 351–355.
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M. and Sekar, T., 2010, Secondary metabolite production in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Bangladesh Journal of Science and Industrial Research*, 45 (3), 243-248.

- Jang, S.Y., Lee, J.K., Jang, E.H., Jeong, S.Y. and Kim, J.H., 2014, Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation, *Oncology Reports*, 31(6),2827-2833.
- Janska, A., Marsik, P., Zelenkova, S. and Ovesna, J., 2010, Cold stress and acclimation- what is important for metabolic adjustment?, *Plant Biology*, 12, 395-405,
- Jin, U.H., Chun, J.A., Han, M.O., Lee, J.W., Yi, Y.B., Lee, S.W. and Chung, C.H., 2005, Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase, *Process Biochemistry*, 40 (12), 3754-3762.
- Jusoh. M., Loh, S.H., Chuah, T.S., Aziz, A. and Cha, T.S., 2015, Elucidating the role of jasmonic acid in oil accumulation, fatty acid composition and gene expression in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) during early stationary growth phase, *Algal Research*, 9, 14–20.
- Kajani, A.A., Moghim, S. and Mofid, M.R., 2012, Enhanced taxane production and secretion from *Taxus baccata* cell culture by adding dimethylsulfoxide, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59 (3), 223-227.
- Kanokwaree, K. and Doran, P.M., 1997, The extent to which external oxygen transfer limits growth in shake flask culture of hairy roots, *Biotechnology and Bioengineering*, 55 (3), 520-526.
- Karakurt, H., Aslantaş, R. ve Eşitken, A., 2010, Tohum çimlenmesi ve bitki büyümesi üzerinde etkili olan çevresel faktörler ve bazı ön uygulamalar, *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 24 (2), 115-128.
- Karaman, Ş., Gülseven, M., Çömlekçiöğlü, N., and İlçim, A., 2016, Fatty acid composition of *Matthiola longipetala* ssp. *Bicornis*, *International Journal of Agriculture and Biology*, 13 (4), 581-585.
- Karwasara, V.S., Jain, R., Tomar, P. and Dixit V. K., 2010, Elicitation as yield enhancement strategy for glycyrrhizin production by cell cultures of *Abrus precatorius* Linn., *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 46 (4), 354-362.
- Kermanee, P., 2004, Plant Regeneration from Cell suspension culture of rice varieties khao dawk mali 105 and suphanburi, *Kasetsart Journal of Natural Science*, 38, 90-96.
- Khaleghnezhad V., Yousefi A.R., Tavakoli, A. and Farajmand B., 2019, Interactive effects of abscisic acid and temperature on rosmarinic acid, total phenolic compounds, anthocyanin, carotenoid and flavonoid content of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.), *Scientia Horticulturae*, 250, 302-309.
- Khan, N., Ahmed, M., Hafiz, I., Abbasi, N., Ejaz, S. and Anjum, M., 2015, Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes, *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 49 (1), 37-45.

- Kheiri, A., Amini, S., Javidan, A.N., Saghafi, M.M. and Khorasani, G., 2017, The effects of *Alkanna tinctoria* Tausch on split-thickness skin graft donor site management: a randomized, blinded placebo-controlled trial, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 253-258.
- Khojasteh, A., Mirjalili, M.H., Hidalgo, D., Corchete, P. and Palazon, J., 2014, New trends in biotechnological production of rosmarinic acid, *Biotechnology Letters*, 36, 2393–2406.
- Kılınc, F.M., Süzerer, V., Özden Çiftçi, Y., Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu Altinkut, A., Tilkat, E., Koc, I., Akdemir, Ö.F. and Metin Karakaş, Ö., 2015, Clonal micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and assessment of genetic stability using IRAP markers, *Plant Growth Regulation*, 75, 75-88.
- Kim, D.J. and Chang, H.N. 1990, Effect of growth hormone modifications on shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures with in situ extraction, *Biotechnology Letter*, 12, 289–94.
- Kim, E.J., Jung, W., Lim, S., Kim, S., Choi, .H.G. and Ha, S.J., 2018, Lipid production by arctic microalga *Chlamydomonas* sp. KNF0008 at low temperatures, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, doi.org/10.1007/s12010-018-2921-1.
- Komaraiah, P., Naga Amrutha, R. and Kavi Kishor, P.B. 2002, Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of *Plumbago rosea* L., *Enzyme Microbial Technology*, 31, 634–639.
- Köhle, A., Sommer, S. and Yazaki, K., 2002, High level expression of chorismate pyruvate-lyase (ubiC) and HMG-CoA reductase in hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Cell Physiology*, 43, 894–902.
- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszevska, T., Stochmal, A., and Oleszek, W., 2012, The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha × piperita* cell suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108 (1), 73-81.
- Kulkarni, M.G., Sparg, S.G. and Staden, J.V., 2006, Dark conditioning, cold stratification and a smoke-derived compound enhance the germination of *Eucomis autumnalis* subsp. *autumnalis* seeds, *South African Journal of Botany*, 72 (1), 157-162.
- Kumar, N., Kumar R. and Kishore, K., 2013, *Onosma* L.: A review of phytochemistry and ethnopharmacology, *Pharmacognosy Review*, 7, 140-151.
- Kumar, P., Saini, M., Bhushan, S., Warghat, A. R., Pal, T., Malhotra, N. and Sood, A. 2014, Effect of salicylic acid on the activity of PAL and PHB Geranyltransferase and shikonin derivatives production in cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst—A medicinally important plant species, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173, 248-258.
- Kumlay, A.M. and Ercişli, S., 2015, Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29 (6),1075-1084,

- Kurt, S. and Erdağ, B., 2009, *In vitro* germination and axillary shoot propagation of *Centaurea zeybekii*, *Biologia*, 64 (1), 97-101.
- Kuzma, L., Bruchazer, E. and Wysokinska, H., 2009, Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 47 (6-7), 406-410.
- Lankinen, M.A., Fauland, A., Shimizu, B., Ågren, J., Wheelock, C.J., Laakso, M., Ursula, S. and Pihlajamäki, J., 2019. Inflammatory response to dietary linoleic acid depends on FADS1 genotype, *The American Journal of Clinical Nutrition*, DOI: 10.1093/ajcn/nqy287.
- Lattoo, S., 2005, *In vitro* approaches for the production of shikonin from *Onosma echioides* var. *Hispidum*, PhD thesis. Jammu, University of Jammu.
- Lee, S. Lee, S., Yoon, Y.J. and Lee, J., 2013, Enhancement of long-chain fatty acid production in *Escherichia coli* by coexpressing genes, including fabF, *Involved in the Elongation Cycle of Fatty Acid Biosynthesis*, 169 (2), 462-476.
- Liang, Z., Ma, Y., Xu, T., Cui, B., Liu, Y., Guo, Z., Yang, D., 2013, Effects of abscisic acid, gibberellin, ethylene and their interactions on production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* bunge hairy roots, *PLoS ONE*, 8 (9), e72806.
- Liao, M. Li, A., Chen, C., Ouyang, H., Zhang, Y., Xu, Y., Feng, Y. and Jian, H., 2015, Systematic identification of shikonins and shikonofurans in medicinal *Zicao* species using ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight tandem mass spectrometry combined with a data mining strategy, *Journal of Chromatography A*, 1425, 158-172.
- Liao, Y., Tang, C., Fang, R., Zhu, Y., Wu, F., Zhao, P., Huang, S., Wang, X., Pang, Y., Yang, R., Lu, G., Qi, J and Yang, Y., 2018, Transcriptome analysis reveals that blocking the ethylene signal transduction pathway is a key point for 2,4-D inhibited shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae), *Pakistan Journal of Botany*, 50 (4), 1451-1458.
- Lihong, Y., Mingli, Z. and Pingkai, O., 1994, Effect of surfactant Tween 20 on shikonin production by *Lithospermum erythrorhizon* Cells Culture[J], *Journal of Nanjing Technical University*, 16 (3),16-19.
- Lin, K.H., Huang, M.Y., Cheng, W.C., Wang, S.C., Fang, S.H., Tu, H.P., Su, C.C., Hung, Y.L.1, Liu, P.L., Chen, C.S., Wang, Y.T. and Li, C.Y., 2018, RNA-seq transcriptome analysis of breast cancer cell lines under shikonin treatment, *Science Report*, 8 (1), 2672.
- Lin, L. and Wu, J., 2002, Enhancement of shikonin production in single and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound, *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 81–88.
- Linsmaier, E.M. and Skoog F., 1965, Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, *Physiology Plantarum*, 18, 100-127.

- Liu, C. Z., Qi, J. L. and Chen, L., 2006, Effect of light on gene expression and shikonin formation in cultured *Onosma paniculatum* cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84, 39–46.
- Liu, X., Jing, Y.P and Shi, Y.P, 2009, Bothriodumin, a shikonin derivative from *Bothriospermum secundum* Maxim., *Pharmazie*, 64, 619–621.
- Liu, Y.H., Liang, Z.S. and Chen, B., 2010, Elicitation of alkaloids in *in vitro* PLB (protocorm-like body) cultures of *Pinellia ternata*, *Enzyme Microbial Technology*, 46, 28-31.
- Loc, N.H., and An, N.T.T., 2010, Asiaticoside production from centella (*Centella asiatica* L. Urban) cell culture, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, 1065-1070.
- Lopez, M.G., Sanchez-Mendoza, I.R. and Ochoa-Alejo, N., 1999, Comparative study of volatile components and fatty acids of plants and *in vitro* cultures of parsley (*Petroselinum crispum* (Mill) Nymex Hill), *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 3292-3296.
- Lu, X., Tang, K. and Li, P., 2016, Plant metabolic engineering strategies for the production of pharmaceutical terpenoids, *Frontiers in Plant Science*, 7, 1647-1653.
- Mahalakshmi, R., Eganathan, P. and Parida, A.K., 2013, Salicylic acid elicitation on production of secondary metabolite by cell cultures of *Jatropha curcas* L., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (4), 655-659.
- Malik, S., Bhushan, S. and Verma, S.C., 2008, Production of naphthoquinone pigments in cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston: influence of pH on growth kinetics and acetylshikonin, *Medical and Aromatic Plant Science Biotechnology*, 2, 43–49.
- Malik, S., Bhushan, S., Sharma, M. and Ahuja, P.S. 2011, Physico-chemical factors influencing the shikonin derivatives production in cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, a medicinally important plant species, *Cell Biology International*, 35, 152–157.
- Malik, S., Bhushan, S., Sharma, M. and Ahuja, P.S., 2014, Biotechnological approaches to the production of shikonins: a critical review with recent updates, *Critical Review Biotechnology*, 36 (2), 327-340 .
- Malik, S.I., Rashid, H., Yasmin, T. and Minhas, M., 2004, Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus Induction from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds, *International Journal of Agriculture and Biology*, 6 (1), 156-159.
- Manero, F.J., Algar, E., Martin Gomez, M.S., Saco Sierra, M.D. and Solano, B.R., 2012, Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizospherebacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. *Pharmaceutical Biology*, 50, 1201–1209.
- Manjkhola, S., Dhar, U. and Joshi, M., 2005, Organogenesis, embryogenesis, and synthetic seed production in *Arnebia euchroma* a critically endangered medicinal plant of the Himalaya, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41, 244–248.

- Mannan, A., Liu, C., Arsenault, P.R., Towler, M.J., Vail, D.R., Lorence, A. and Weathers, P.J., 2010, DMSO triggers the generation of ROS leading to an increase in artemisinin and dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* shoot cultures, *Plant Cell Reports*, 29, 143–152
- Mao, X., Yu, C.R., Li, W.H. and Li, W.X., 2008, Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNK-mediated process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells, *Cell Research*, 18, 879–888.
- Martinez, V.M.V., Estradas Sato, S.E., Arellano Garcia, J.J., Rivera Leyva, J.C., Castillo Espena, P., Flores, A.F., Cardoso Taketa, A.T. and Perea Arango, I., 2018, Methyl jasmonate and salicylic acid enhanced the production of ursolic acid and oleanolic acid in callus cultures of *Lepechinia caulescens*, *Pharmacognosy Magazines*, 13 (4), 886-891.
- Mc Murry, J.E., 2015, *Organic chemistry with biological applications*, In: Secondary Metabolites: An Introduction to Natural Products Chemistry, Stamford, USA: Cengage Learning Ltd., 1016-1046.
- Mizukami, H., Konoshima, M. and Tabata, M. 1977, Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus cultures, *Phytochemistry*, 16, 1183-1186.
- Mizukami, H., Ogawa, T., Ohashi, H. and Ellis, B.E., 1992, Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract, *Plant Cell Report*, 11, 480–483.
- Mizukami, H., Tabira, Y., Ohashi, H. and Ellis, B.E., 1993, Methyl jasmonate induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 12, 706–709.
- Mohammed Al-oubaidi, H.K. and Mohammed-Ameen, A.S., 2014, The effect of (AgNO₃) NPs on increasing of secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. *in vitro*, *International Journal of Pharmacy and Therapeutics*, 5 (4), 267-272.
- Morteza, E., Akbari, G.A., Moaveni, P., Alahdadi, I., Bihamta, M.R., Hasanloo, T. and Joorabloo, A., 2015, Compositions of the seed oil of the *Borago officinalis* from Iran, *Natural Product Research*, 29 (7), 663-666.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiology Plantarum*, 15, 473-479.
- Naik, P.M. and Al-Khayri, J.M., 2016, *Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants*, In: Abiotic and Biotic Stress in Plants—Recent Advances and Future Perspectives, Shanker, A.K., and Shanker, C. (eds). Intech, London-UK.
- Namdeo, A.G., 2007, Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review, *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1), 69-79.

- Narayani, M. and Srivastava, S., 2017, Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production, *Phytochemistry Review*, 16, 1227:1252.
- Nartop, P., Gürel, A., Akgün, İ.H., Bedir, E., 2015, Astragalaside IV and cycloastragenol production in *in vitro* produced *Astragalus trojanus* Stev., *Indian Journal of Biotechnology*, 14, 540-546.
- Nik Norulaini, N.A.R., Thamare, K.M., Zarina, Z. and Tengku Norsalwani, T.L., 2018, Effect of mevalonic acid (MVA) and linalool as a precursor in enhancement of limonene in *Citrus grandis* osbeck albedo tissue culture, *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 41 (1), 101-114.
- Ning, W., Wang, J.X., Liu, Y.M., Li, N. and Cao, R.Q., 1998, The effects of Ca²⁺ during the elicitation of shikonin derivatives in *Onosma paniculatum* cells, *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 34, 261–265.
- Ning, W., Zhao, Q., Xia, Z. and Cao, R., 1994, Effects of fungal elicitor on shikonin derivatives formation in *Onosma paniculatum* cell cultures, *Acta Phytophysiol Sinica*, 20, 325–331.
- Olennikov, D., Daironas, Z.V. and Zilfirakov, I.N., 2017, Shikonin and rosmarinic-acid derivatives from *Echium russicum* Roots, *Chemistry of Natural Compounds*, 53 (5), 1-3.
- Ootsuka, Y., Yakazu, M. and Shimizu, T., 1972, *Kanpou Shinryou Iten*. Nanzandou, Tokyo. (Japonca)
- Oral, Ç.D. ve Aslan, M., 2007, *Konya ilinde kullanılan halk ilaçları üzerine etnobotanik araştırmalar*, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fitoterapi Programı Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Özcan, T., 2008, Analysis of the total oil and fatty acid composition of seeds of some Boraginaceae taxa from Turkey, *Plant Systematics Evolution*, 274, 143–153
- Özcan, T., 2013, Molecular (RAPDs and fatty acid) and micromorphological variations of *Echium italicum* L. populations from Turkey, *Plant Systematics and Evolution*, 299 (3), 631-641.
- Özcan, T., 2014, Fatty acid composition of seed oils in some sand dune vegetation species from Turkey, *Chemistry of Natural Compounds*, 50 (5), 699-703.
- Özgen, U., Coşkun, M., Kazaz, C. and Seçen H., 2004. Naphthoquinones from the roots of *Onosma argentatum* Hub.-Mor. (Boraginaceae), *Turkish Journal of Chemistry*, 28, 451-454.
- Özgen, U., Demirkaya Miloglu, F. and Bulut, G., 2011, Quantitative determination of shikonin derivatives with UV-Vis spectrophotometric methods in the roots of *Onosma nigricaula*, *Reviews in Analytical Chemistry*, 30 (2), 1-10.
- Pal, M., Kumar, V., Yadav, R., Gulati, D. and Yadav, R.C., 2018, Potential and prospects of shikonin production enhancement in medicinal plants, *Proceedings of the National*

Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences,
<https://doi.org/10.1007/s40011-017-0931-3>.

- Pandiangan, D., Tilaar, W., Nainggolan, N. and Wahyudi, L., 2013, Relations between catharanthine content enhancement with other associated secondary metabolites in *Catharanthus roseus* cell culture that treated tryptophan, *International Journal of Scientific Research*, 4 (1), 2208–2212.
- Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N. and Ballis, A.C., 2008, Alkannins and shikonins: a new class of wound healing agents. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 3248–3267.
- Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Samanidou, V.F. and Papadoyannis, I., 2006, Recent advances in chemistry, biology and biotechnology of alkannins and shikonins, *Current Organic Chemistry*, 10, 2123–2142.
- Parra, O., Gallego, A.M., Urrea, A., Rojas, L.F., Correa, C. and Atehortúa, L., 2017, Biochemical precursor effects on the fatty acid production in cell suspension cultures of *Theobroma cacao* L., *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 59-66.
- Patil, R.A., Lenka, S.K., Normanly, J., Walker, E.L. and Roberts, S.C., 2014, Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells, *Plant Cell Reports*, 33 (9), 1479-1492. ,
- Perassolo, M., Cardillo, A.B., Mugas, M.L., Montoya, S.C.N, Giuliotti, A.M. and Talou, J.R., 2017, Enhancement of anthraquinone production and release by combination of culture medium selection and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum*, *Industrial Crops and Products*, 105, 124-132.
- Perez-Illzarbe, J., Hernandez, T., Estrella, I. and Vendrell, M., 1997, Cold storage of apples (cv. Granny Smith) and changes in phenolic compounds, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung NLM*, 204, 52-55.
- Petersen, M., 2013, Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Review*, 12, 207–227.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hucherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C. and Wolters, S., 2009, Evolution of rosmarinic acid biosynthesis, *Phytochemistry*, 70, 1663–1679.
- Pezeshki, S. and Petersen, M., 2018, *Rosmarinic acid and related metabolites*, In: *Biotechnology of Natural Products*, Schwab, W., Lange, B. and Wüst, M., (eds), Springer, Cham.
- Pietrosuik, A. and Wiedenfeld, H., 2005, Shikonin derivatives from *Lithospermum canescens*, *Journal of Pharmaceutical Biology*, 43 (2), 189-191.
- Pradhan, S. and Pant, B., 2009, *In vitro* seed germination in *Cymbidium elegans* Lindl. and *Dendrobium densiflorum* Lindl. Ex Wall. (Orchidaceae), *Journal of Plant Science*, 6, 100-102.

- Pratibha, G., Satyawati, S. and Sanjay, S., 2015, Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176 (3), 863-74.
- Qui, H.Y., Zhu, X., Luo, Y.L., Tang, C.Y. and Qi, J.L., 2017, Identification of new shikonin derivatives as antitumor agents targeting STAT3 SH2 domain, *Nature Scientific Report* 7, 2863.
- Raghavendra, S., Satish, D., Masuthi, D.K., Padmanabha, K., Biradar, I.B. and Hadimani, H.P., 2017, Efficient elicitor and precursor induced resveratrol production in suspension cultures of *Arachis hypogea*, *International Journal of Chemical Studies*, 5 (5), 621-626.
- Rahimi, S. and Hasanloo, T., 2016, The effect of temperature and pH on biomass and bioactive compounds production in *Silybum marianum* hairy root cultures, *Research Journal of Pharmacognosy*, 3 (2), 53-59.
- Rahpeyma, S.A., Moieni, A. and Javaran, M.J., 2015, Paclitaxel production is enhanced in suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells by using a combination of sugar, precursor, and elicitor, *Engineering Life Science*, 15, 234–242.
- Rajasekhar, E.W., Edwards, M., Wilson, S.B., Street, H.E. 1971, *Studies on the growth in culture*.
- Ren, L.J., Sun, X.M., Ji, X.J., Chen, S.L., Guo, D.S., Huang, H., 2017. Enhancement of docosahexaenoic acid synthesis by manipulation of antioxidant capacity and prevention of oxidative damage in *Schizochytrium* sp., *Bioresource Technology*, 223, 141-148.
- Ronda, S.R. and Lele S., 2008, Culture Conditions stimulating high γ -Linolenic Acid accumulation by *Spirulina platensis*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 693-697.
- Rornanova, A.S. and Bankovskii, A.I., 1965, Isolation of shikonin from *Macrotomia ugamensis* M. Pop., *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 1 (3), 226-227.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., M. de Diego, S., Sanz, M.T. and Carballido, J.R., 2010, Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (1), 1-12.
- Sagratini, G., Cristalli, G., Giardinà, D., Gioventù, G., Maggi, F., Ricciutelli, M. and Vittori, S., 2008, Alkannin/shikonin mixture from roots of *Onosma echioides* (L.) L.: Extraction method study and quantification, *Journal of Separation Science*, 31 (6-7), 945-952.
- Sanchez, E.C., Rodríguez, C., Guerra, R.D., Ravelo, A.G. and Zárata, R., 2011, *Echium acanthocarpum* hairy root cultures, a suitable system for polyunsaturated fatty acid studies and production, *BMC Biotechnology*, 11, 42-52.
- Santana, O., Reina, M., Fraga, B.M., Sanz, J. and Gonzalez-Coloma, A., 2012, Antifeedant activity of fatty acid esters and phytosterols from *Echium wildpretii*, *Chemistry and Biodiversity*, 9, 567-576.

- Scarpati, M.L. and Oriente, G., 1958, Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus* off.), *Rice Science*, 28, 2329–2333.
- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A., 1972, Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50, 199–204.
- Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Asghari, G. and Ghanadian, M., 2015, Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*, *Turkish Journal of Biology*, 39, 111-118.
- Sharma, K. and Schenk, P.M., 2015, Rapid induction of omega-3 fatty acids (EPA) in *Nannochloropsis* sp. by UV-C radiation, *Biotechnology and Bioengineering*, 112(6), 1243-1249.
- Sharma, P., Yadav, S., Srivastava, A. and Shrivastava, N., 2013, Methyl jasmonate mediates upregulation of bacoside A production in shoot cultures of *Bacopa monnieri*, *Biotechnology Letters*, 35, 1121–1125.
- Shcherbanovskii, L. R. and Luks, Y.A., 1974., Shikonin from *Echium lycopsis*, *Chemistry of Natural Compounds*, 10 (4), 517-517.
- Sherif, H.F., Aboushoer, M., Baraka, A., Abdel-Kader, M. and Omar, A.A., 2009, A New Naphthoquinone with Anti-inflammatory Activity from An Egyptian Collection of *Echiochilon fruticosum*, *Natural Product Sciences*, 15 (1), 22-26.
- Shimomura, K., Sudo, H., Saga, H. and Kamada, H., 1991, Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Cell Reports*, 10, 282–285.
- Shokri, E., Nematzadeh, G., Zolala, J., Nasiri, N., Kazemi-Tabar, S.K., Hosseinpour-Azad, N., 2012, Delta-6 desaturase makes a different fatty acid profile of seed oil in Iranian borage (*Echium amoenum* Fisch. and Mey.), *Acta Physiology Plant*, 34, 2413–2418.
- Shukla, Y.N., Srivastava, A., Singh, S.C. and Kumar, S., 2001, New naphthoquinones from *Arnebia hispidissima* Roots, *Planta Medicine*, 67 (6), 575-577.
- Sidwa-Gorycka, M., Krolicka, A. and Kozyra, M., 2003, Establishment of a co-culture of *Ammi majus* L. and *Ruta graveolens* L. for the synthesis of furanocoumarins, *Plant Science*, 165, 1315–1319.
- Sim, S.J. and Chang, H.N., 1993, Increased shikonin production by hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* in two phase bubble column reactor, *Biotechnolgy Letter*, 15, 145-150.
- Singh, B. and Sharma, R.A., 2016, Yield enhancement of phytochemicals by *Azotobacter chroococcum* biotization in hairy roots of *Arnebia hispidissima*, *Industrial Crops Production*, 81, 169–175.
- Singh, R.S., Gara, R.K., Bhardwaj, P.K., Kaachra, A., Malik, S., Kumar, R., Sharma, M., Ahuja, P.S. and Kumar, S., 2010, Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, p-hydroxybenzoate-mgeranyltransferase and genes of phenylpropanoid pathway exhibits

- positive correlation with shikonins content in arnebia [*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston], *BMC Molecular Biology*, 11, 88-98.
- Skoneczny, D., Weston, P.A., Zhu, X., Gurr, G.M., Callaway, R.M., Barrow, R.A. and Weston, L.A., 2017, Metabolic profiling and identification of shikonins in root periderm of two invasive *Echium* spp. weeds in Australia, *Molecules*, 22, 330-340.
- Sommer, S., Kohle, A. and Yazaki, K., 1999, Genetic engineering of shikonin biosynthesis hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* transformed with the bacterial ubiC gene, *Plant Molecular Biology*, 39, 683–693.
- Sonja, G.S., Oliver, T., Stéphane, M., Alain, D., Eric, L., Claude, J., and Daniel, H. 2015, Polysaccharide elicitors enhance phenylpropanoid and naphthodianthrone production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122 (3), 649-663.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001, *İkincil metabolit üretimi*, In: Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları II, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds). Konya, Turkey.
- Spencer, A., Hamill, J.D. and Rhodes, M.J.C. 1990, Production of terpenes by differentiated shoot cultures of *Mentha citrata* transformed with *Agrobacterium tumefaciens* T37, *Plant Cell Reports*, 8 (10), 601-604.
- Srinivasan, V. and Ryu, D.D.Y., 1992, Enzyme activity and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 69–74.
- Srivastava, S., Conlan, X.A., Cahill, D.M. and Adholeya, A., 2016, Rhizophagus irregularis as an elicitor of rosmarinic acid and antioxidant production by transformed roots of *Ocimum basilicum* in an *in vitro* co-culture system, *Mycorrhiza*, 26, 919–930.
- Stearns, E.M and Morton, W.T., 1975, Effects of growth regulators on fatty acids of soybean suspension cultures, *Phytochemistry*, 14 (3), 619:622.
- Stolyhwo, A. and Mol, J., 2007, Changes in the content of gamma-linolenic C18:3 (n-6) and stearidonic C18:4 (n-3) acids in developing seeds of viper's bugloss *Echium vulgare* L., *Acta Biochimica Polonica*, 54, 741–746.
- Sun, S., Wang, Y., Chen, X., Gong, X., Wang, N., Ma, L., Qiu, Y., Wang, F. and Feng, S., 2017, Effects of methyl jasmonate and abscisic acid on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. niedzwetzkyana), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130 (2), 227-237.
- Sun, X.M., Geng, L.J., Ren, L.J., Ji, X.J., Hao, N., Chen, K.Q. and Huang, H., 2018, Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae, *Bioresource Technology*, 250, 868-876.
- Surmuş-Asan, H., Özen, H.Ç., Onay, A. 2017, *Hypericum retusum* Aucher'in hücre süspanسیون kültürlerinin optimizasyonu ve fenolik bileşen içeriğinin incelenmesi, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 7 (2), 97-105.

- Sut, S., Pavela, R., Kolarčik, V., Cappellacci, L., Petrelli, R., Maggi, F., Dall'Acqua, S. and Benelli, G., 2017, Identification of *Onosma visianii* roots extract and purified shikonin derivatives as potential acaricidal agents against *Tetranychus urticae*, *Molecules*, 22 (6), 1002.
- Sykłowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M.R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., Łojkowska, E. and Chinou, I., 2012, Effect of L-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, *In Vitro Cell Developmental Biology-Plant*, 48, 555–564.
- Sykłowska-Baranek, K., Pilarek, M., Cichosz, M. and Pietrosiuk, A., 2014, Liquid perfluorodecalin application for in situ extraction and enhanced naphthoquinones production in *Arnebia euchroma* cell suspension cultures, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2618–2627.
- Taban, K., Eruygur, N. and Üstün, O., 2018, Biological activity studies on the aqueous methanol extract of *Anchusa undulata* L. subsp. *hybrida* (Ten.) Coutinho. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22 (3), 357-364.
- Tabata, M., Mizukami, H. and Hiraoka, N., 1974, Pigment formation in callus culture of *Lithospermum erythrorhizon*, *Phytochemistry*, 13, 927–932.
- Taha, H.S., Abdel-Kawy, A.M, Abd-El-Kareem F.M. and El-Shabrawi, H.M., 2010, Implement of DMSO for enhancement and production of phenolic and peroxides compounds in suspension cultures of Egyptian date palm (Zaghloul and Samany) cultivars, *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 1 (1), 1-10.
- Tahoori, F., Majd, A., Nejadstarrari, T., Ofoghi H. and Iranbakhsh, A., 2019, Qualitative and quantitative study of quercetin and glycyrrhizin in *in vitro* culture of Liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) and elicitation with AgNO₃, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47 (1), 143-151.
- Tang, X., Zhang, H., Chen, H. Chen, Y.Q., Chen, W. and Song, Y., 2014. Effects of 20 standard amino acids on the growth, total fatty acids production, and γ -Linolenic acid yield in *Mucor circinelloides*, *Current Microbiology*, 69 (6), 899-908.
- Tani, M., Fukui, H., Shimomura, M. and Tabata, M., 1992, Structure of endogenous oligogalacturonides inducing shikonin biosynthesis in *Lithospermum* cell cultures, *Phytochemistry*, 31 (8), 2719-2723.
- Tani, M., Takeda, K., Yazaki, k. and Tabata, M., 1993, Effects of oligogalacturonides on biosynthesis of shikonin in *Lithospermum* cell cultures, *Phytochemistry*, 34 (5), 1285-1290.
- Tappeiner, J., Vasiliou, A., Ganzera, M., Fessas, D., Stuppner, H., Papageorgiou, V.P. and Assimopoulou, A.N., 2014, Quantitative determination of alkannins and shikonins in endemic Mediterranean *Alkanna* species, *Biomedical Chromatography*, 28, 923-933.

- Ten Hoopen, H.J.G., Vinke, J.L. and Moreno P.R.H., 2002, Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharantus roseus* suspension cultures, *Enzyme Microbial Technology*, 30, 56–65.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S.S. and Vijayakumar, R., 2018, *An Introductory Chapter: Secondary Metabolites*, In: *Secondary Metabolites - Sources and Applications*, Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S.S. and Vijayakumar, R. (eds.), InTech, London, UK.
- Thorpe, T.A., 2007, History of plant tissue culture, *Molecular Biotechnology*, 37 (2)169-80.
- Tilkat, E., Ertaş, A., Surmus-Asan, H., Yılmaz, M.A., Onay, A., Süzerer, V., 2018, *Pistacia lentiscus L.'un in vitro sürgün, kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde antikanser aktivite gösteren kimyasal bileşenlerin üretilmesi*, TÜBİTAK 114Z842 Numaralı Proje Sonuç Raporu, 241s.
- Tilkat, E., Süzerer, V., Tilkat Ayaz, E. ve Özden Çiftçi, Y., 2019, *İkincil bitki metabolitlerinin üretimi ve metabolit mühendisliği*, In: *Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Yaklaşımlar*, Özden Çiftçi, Y. ve Aktinkut Uncuoğlu, A. (Eds.), Palme, Ankara, Türkiye.
- Tiwari, R and Rana, C.S., 2015, Plant secondary metabolites: A review, *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3 (5), 661-670.
- Tumova L. and Polivkova D., 2006, Effect of AgNO₃ on the production of flavonoids by the culture of *Ononis arvensis L in vitro*, *Ceská Slovenská Farmacie*, 55, 186-188.
- TÜBİVES, 2019. *Echium*, <http://www.tubives.com/index.php?sayfa=dizin&cins=Echium>, [Ziyaret tarihi: 4 Nisan 2019]
- Urmantseva, V.V., Karyagina, T.B. and Chertkova, R.V., 1999, Induction of phenylalanine ammonia-lyase by methyl jasmonate in cultured cells of *Arnebia euchroma*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 46, 749-759.
- Vasudevan, R. and Staden, J.V., 2010, *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl., *Scientia Horticulturae*, 123 (4), 496-504.
- Velasco, L. and Goffman, F.D., 1999, Chemotaxonomic significance of fatty acids and tocopherols in Boraginaceae. *Phytochemistry*, 52 (3), 423-426.
- Vergara Martínez, V.M., Estrada-Soto, S.E., Arellano-García, J.J., Rivera-Leyva, J.C., Castillo-España, P., Flores, A.F., Cardoso-Taketa, A.T., and Perea-Arango, I., 2018, Methyl jasmonate and salicylic acid enhanced the production of ursolic and oleanolic acid in callus cultures of *Lepechinia caulescens*, *Pharmacognosy Magazine*, 13 (4), 886-889.
- Vildová, A., Hendrychová, H., Kubeš, J. and Tůmová, L., 2014, Influence of AgNO₃ treatment on the flavonolignan production in cell suspension culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *International Scholarly and Scientific Research and Innovation*, 8 (8), 959-962.
- Wang, C., Qing, X., Yu, M., Sun, Q., Liu, F., Qi, B. and Li, X., 2018, Production of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.)

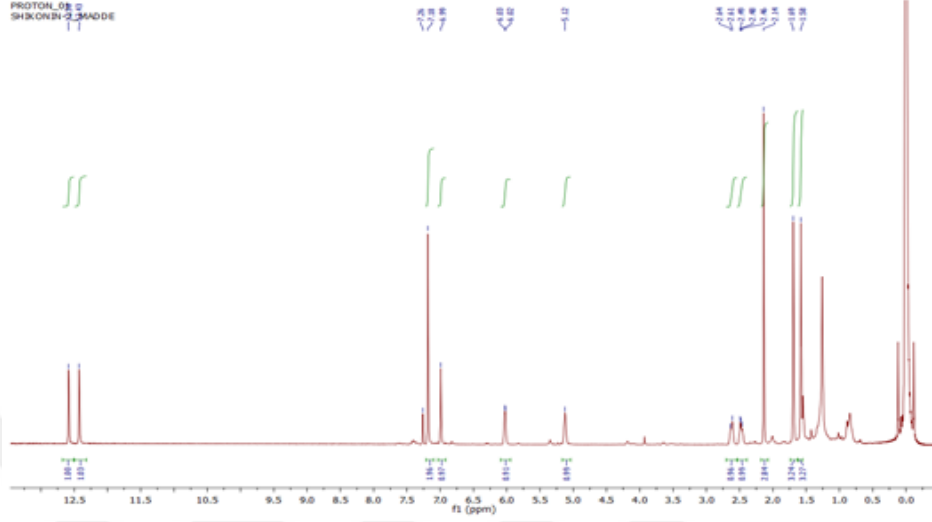
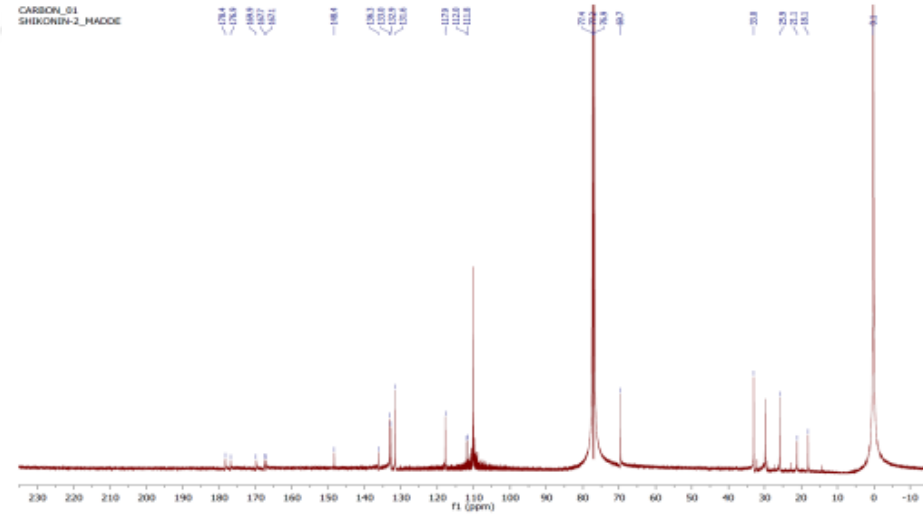
- through the alternative $\Delta 8$ -desaturase pathway, *Molecular Biology Reports*, doi.org/10.1007/s11033-018-4476-1.
- Wang, C., Wu, J. and Mei, X., 2001, Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:404–410.
- Wang, C.H., Zheng, L.P., Tian, H. and Wang, J.W., 2016, Synergistic effects of ultraviolet-B and methyl jasmonate on tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 93-100.
- Wang, L.J., Ma, L., Xi, H.F., Duan, W., Wang, J.F. and Li, S.H., 2013, Individual and combined effects of CaCl_2 and UV-C on the biosynthesis of resveratrols in grape leaves and berry skins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7135–7141.
- Wang, S., Guo, L.P., Xie, T., Yang, J., Tang, J.F., Li, X., Wang, X. and Huang, L.Q., 2014, Different secondary metabolic responses to MeJA treatment in shikonin-proficient and shikonin-deficient cell lines from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 119, 587–598.
- Wang, S., Wang, R., Liu, T., Lv, C., Liang, J., Kang, C., Zhou, L., Guo, J., Cui, G., Zhang, Y., Werck-Reichhart, D., Guo, L. and Huang, L., 2018, CYP76B74 catalyzes the 3"-hydroxylation of geranylhydroquinone in shikonin biosynthesis, *Plant Physiology*, DOI: https://doi.org/10.1104/pp.18.01056.
- Welch, A.A., Shakya-Shrestha, S., Lentjes, M.A., Wareham, N.J. and Khaw, K.T. 2010, Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the product-precursor ratio [corrected] of α -linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort, *American Journal of Clinical Nutrition*, 92 (5),1040-1051.
- White, P.R., 1943, Nutrient deficiency studies and improved inorganic nutrients for cultivation of excised tomato roots, *Growth*, 7, 53- 65.
- Wickens, G.E., 1978, *Symphytum L.* In: Flora of Turkey and The East Aegean Island Vol.6, Davis P.H. (ed), Edinburgh University Press, 378-386.
- Wu, H., Xie, J., Pan, Q., Wang, B., Hu, D. and Hu, X., 2013, Anticancer agent shikonin is an incompetent inducer of cancer drug resistance, *Plos ONE*, 8 (1), e52706.
- Wu, S.J., Qi, J.L. and Zhang, W.J. 2009, Nitric oxide regulates shikonin formation in suspension-cultured *Onosma paniculatum* cells, *Plant Cell Physiology*, 50, 118–128.
- Wu, Z., Wu, L., Li, L., Tashiro, S., Onodera, S. and Ikejima, T., 2004, p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by shikonin via a caspase-9-dependent mechanism in human malignant melanoma A375-S2 cells, *Journal of Pharmacology Science*, 94, 166–176.
- Xu, A., Zhan, J.C., Huang, W.D., 2015, Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet sauvignon, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122, 197–211.

- Yamamoto, H., Zhao, P., Yazaki, K. and Inoue, K., 2002, Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 1086–1090.
- Yang, Y. H., Zhang, H. and Cao, R.Q. 1999, Effect of brassinolide on growth and shikonin formation in cultured *Onosma paniculatum* cells, *Journal of Plant Growth Regulation*, 18, 89–92.
- Yao, Y. and Zhou, Q., 2010, A novel antiestrogen agent shikonin inhibits estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells, *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(1), 223-240.
- Yazaki, K., 2017, *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures: Present and future aspects, *Plant Biotechnology*, 34, 131–142.
- Yazaki, K., Fukui, H., Kikuma, M. and Tabata, M., 1987, Regulation of shikonin production by glutamine in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures, *Plant Cell Reports*, 6 (2), 131-134.
- Yazaki, K., Matsuoka, H., Shimomura, K., Bechthold, A. and Sato, F., 2001, A novel dark-inducible protein, LeDI-2, and its involvement in root-specific secondary metabolism in *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Physiology*, 125, 1831:1841.
- Yazaki, K., Takeda, K. and Tabata, M., 1997, Effects of methyl jasmonate on shikonin and dihydroechinofuran production in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures, *Plant Cell Physiology*, 38, 776–782.
- Yıldırım, H., Tilkat, E., Onay, A. and Özen, H.Ç., 2007, *In vitro* embryo culture of apricot, *Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloğlu, *International Journal of Science and Technology*, 2 (2), 99-104.
- Yıldırım, K.F. ve Özkum, D., 2010, Kuzey Kıbrıs'ın faydalı bitkilerinin ve kullanım alanlarının araştırılması, Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans Tezi, Kıbrıs.
- Yıldız, M. and Er, C., 2002, The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*), *Naturwissenschaften*, 89 (6), 259-261.
- Yoshikawa, N., Fukui, H. and Tabata, M., 1986, Effect of gibberellin A on shikonin production in *Lithospermum* callus cultures, *Phytochemistry*, 25, 621–622.
- Yu, K.W., Murthy, H.N., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2005, Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. *Biochemical Engineering Journal*, 23 (1), 53-56.
- Yu, Q., Liu, Z., Xub, H., Zhang, B., Zhang M. and Li, M., 2015, TiO₂ nanoparticles promote the production of unsaturated fatty acids (UFAs) fighting against oxidative stress in *Pichia pastoris*, *Royal Society of Chemistry*, 5, 41033-41040.

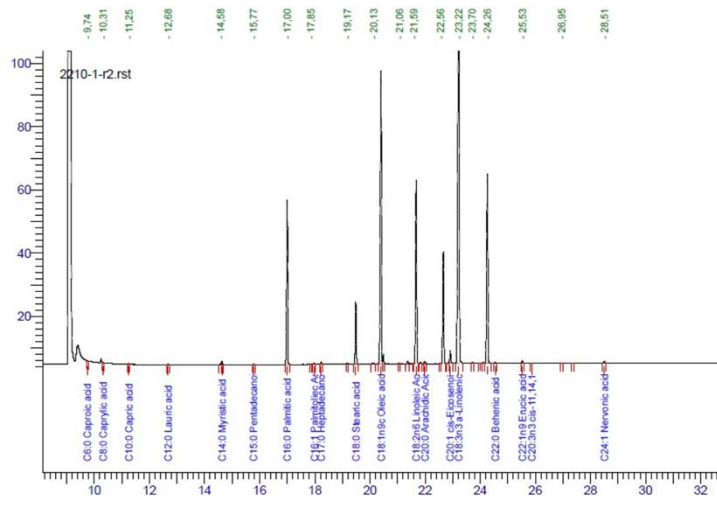
- Yu, S., Du, S., Yuan, J., and Hu, Y., Fatty acid profile in the seeds and seed tissues of *Paeonia* L. species as new oil plant resources, *Nature Scientific Report*, 6, 26944.
- Yunusova, S.G., Khatmulina, L.I., Fedorov, N.I., Ermolaeva, N.A., Galkin, E.G. and Yunusova, M.S., 2012, Polyunsaturated fatty acids from several plant species of the family Boraginaceae, *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 361–366.
- Yüzbaşıoğlu Baran, M., Guvenalp, Z., Saracoglu, I., Kazaz, C., Salih, B., Demirezer, L.O. and Kuruuzum-Uz, A., 2018, Cytotoxic naphthoquinones from *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb and determining new apoptosis inducers, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2018.1525714.
- Zan, K., Zheng, H.Y., Liu, J., Guo, L.N., Zheng, J. and Ma, S.C., 2017. Simultaneous determination of eight hydroxyl naphthoquinones in different parts of *Arnebiae euchroma* by HPLC, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 42 (13), 2532-2537.
- Zarate, R., Sánchez, E.C., Vazdekis, N.E.J, Rodríguez, C., Guerra, R.D. and Ravelo, A.G., 2016, Healthy omega-3 enhancement in *Echium acanthocarpum* transformed hairy roots by overexpression of a 6-desaturase gene from *Primula vialli*, *SCIREA Journal of Biology*, 1 (1), 1-41.
- Zare, K., Nazemiyeh, H., Movafeghi, A., Khosrowshahli, M., Motallebi-Azar, A., Dadpour, M. and Omid, Y., 2010, Bioprocess engineering of *Echium italicum* L.: induction of shikonin and alkannin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 157–164.
- Zare, Kh., Khosrowshahli, M., Nazemiyeh, H., Movafeghi, A., Motallebi Azar, A. ve Omid, Y., 2011, Callus cultur of *Echium italicum* L. towards production of a shikonin derivative, *Natural Product Research*, 25 (16), 1480-1487.
- Zhang, P., Boudyguina, E., Wilson, M. D., Gebre, A. K. and Parks, J. S., 2008, *Echium* oil reduces plasma lipids and hepatic lipogenic gene expression in Apob100-only LDL receptor knockout mice, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19 (10), 655–663.
- Zhang, P., Wang, F., and Zhu, C., 2013, Influence of fungal elicitor and macroporous resin on shikonin accumulation in hairy roots of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, *Chinese Journal of Biotechnology*, 29, 214–223.
- Zhao, H., Chang, Q.S., Zhang, D.X., Fang, R.J., Zhao, H., Wu, F.Y., Wang, X.M., Lu, G.H., Qi, J.L. and Yang, Y.H., 2015, Overexpression of LeMYB1 enhances shikonin formation by up-regulating key shikonin biosynthesis-related genes in *Lithospermum erythrorhizon*, *Biologia Plantarum*, 59 (3), 429-435.
- Zhao, J., Zhu, W.H. and Hu, Q., 2001, Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture, *Enzyme Microbial Technology*, 28, 666–672.
- Zhou, W., Jiang, H.D.G.L, Peng, Y. and Li S.S., 2011, Comparative study on enantiomeric excess of main alkannin/shikonin derivatives isolated from the roots of three endemic Boraginaceae plants in China, *Biomedical Chromatography*, 25, 1067-1075.

- Zhu, X., Skoneczny, D., Weidenhamer, J.D., Mwendwa, J.M., Weston, P.A., Gurr, G.M., Callaway, R.M. and Weston, L.A., 2016, Identification and localization of bioactive naphthoquinones in the roots and rhizosphere of Paterson's curse (*Echium plantagineum*), a noxious invader, *Journal of Experimental Botany*, 67 (12), 3777-3788.
- Zhu, Y., Lu, G.H., Bian, Z.W., Wu, F.Y., Pang, Y.J., Wang, X.M., Yang, R.W., Tang, C.Y., Qi, J.L. and Yang, Y.H., 2017, Involvement of LeMDR, an ATP-binding cassette protein gene, in shikonin transport and biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon*, *BMC Plant Biology*, 17, 198-208.

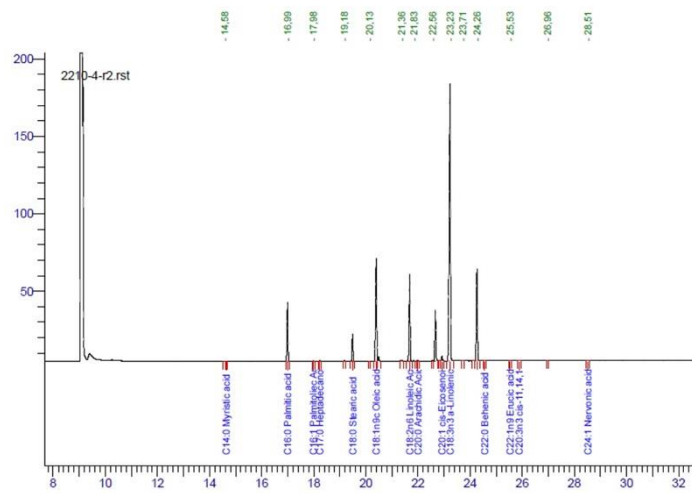


EKLER**EK 1. 1 Numaralı şikonin türevine (Deoksi Şikonin) ait 1H NMR spektrumu (CDCl₃, 400 MHz).****EK 2. 1 Numaralı şikonin türevine (Deoksi Şikonin) ait 13C NMR spektrumu (CDCl₃, 100 MHz).**

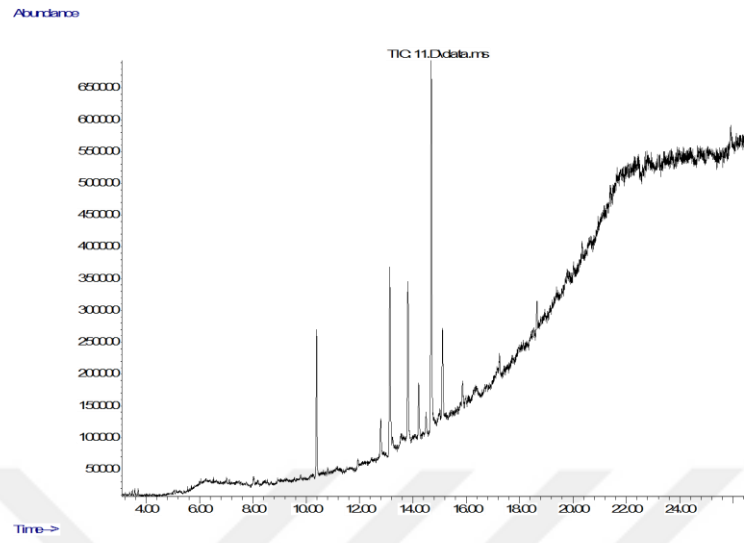
EK 7. A1 numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.



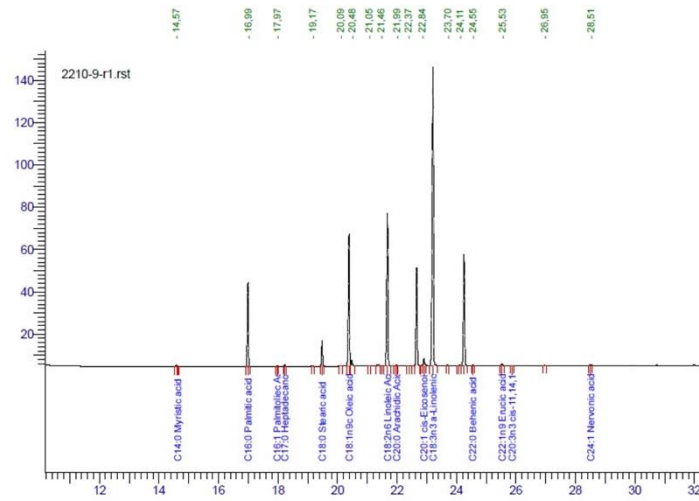
EK 8. A5 numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.



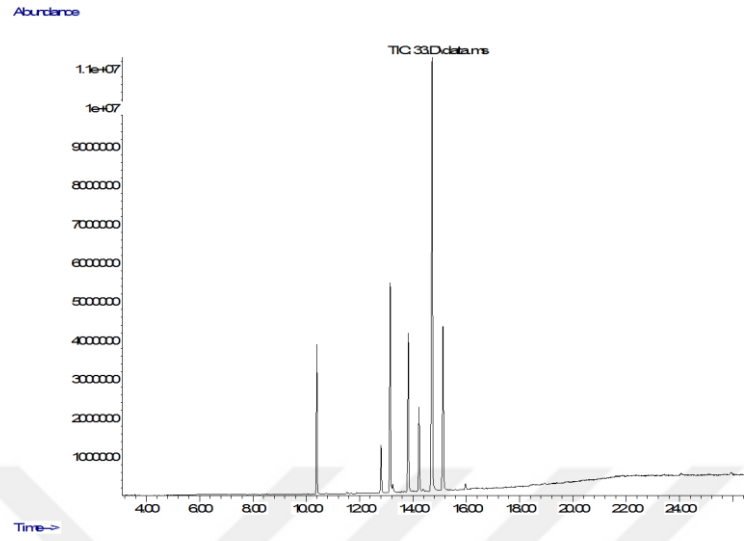
EK 9. C2(a) numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.



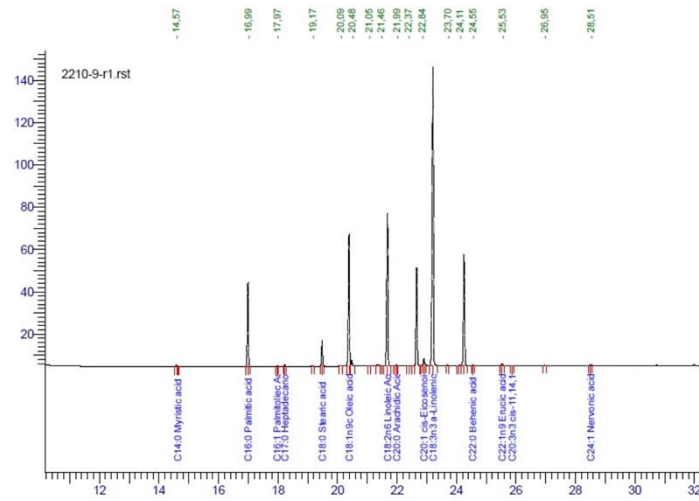
EK 10. B3 numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.

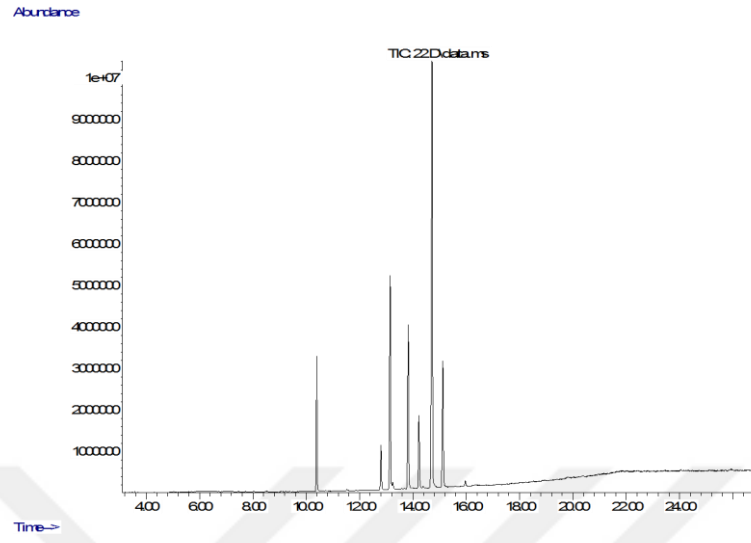
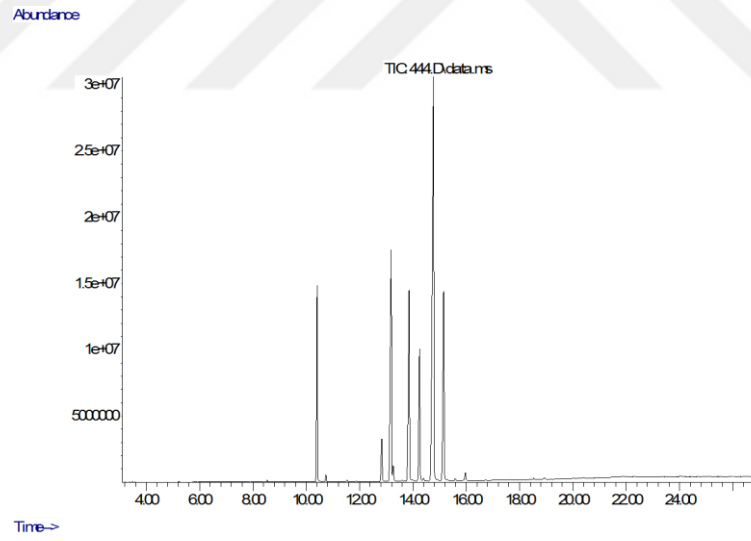


EK 11. A6 numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.

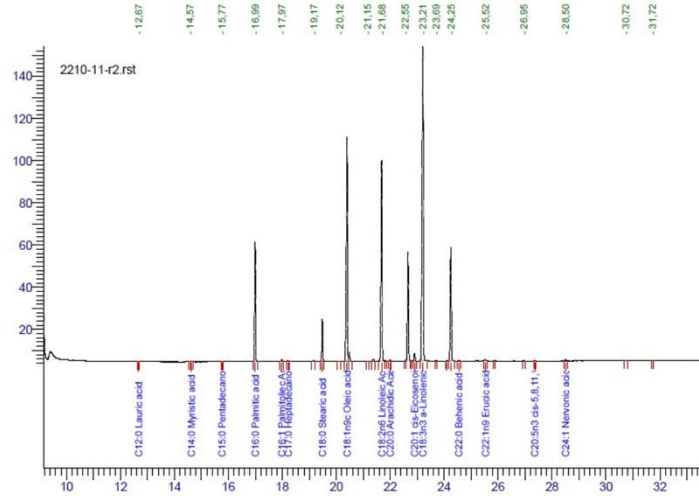


EK 12. B8 numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.

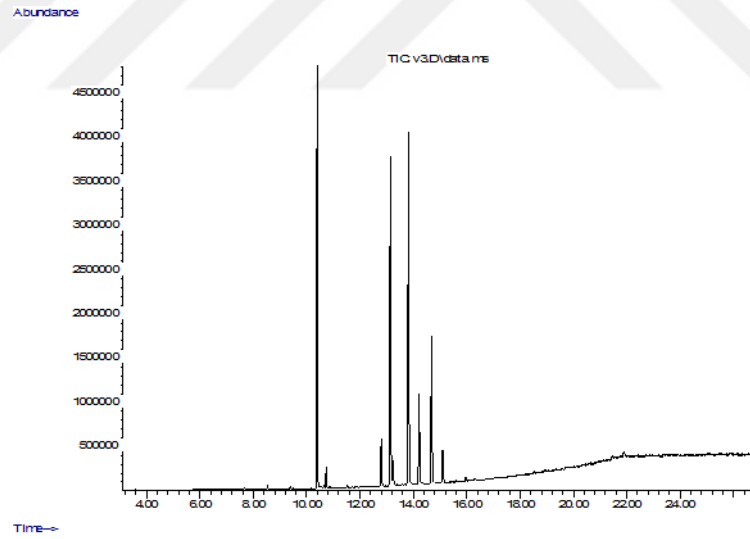


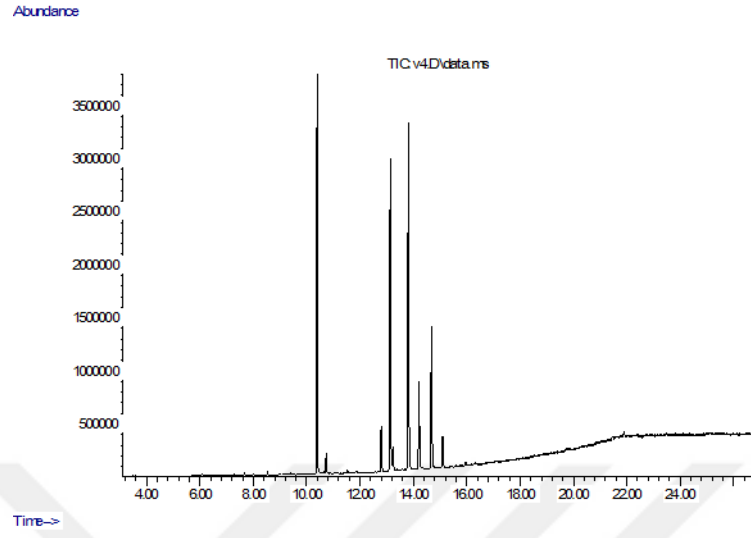
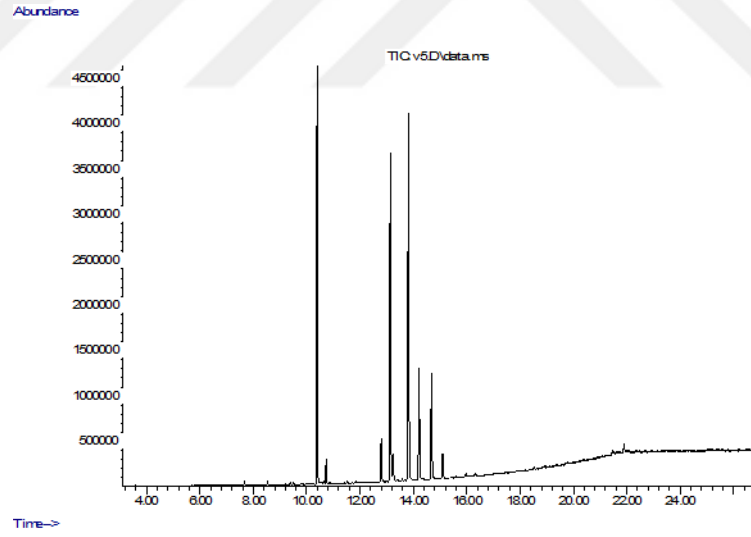
EK 13. C2(b) numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.**EK 14. B9(a) numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.**

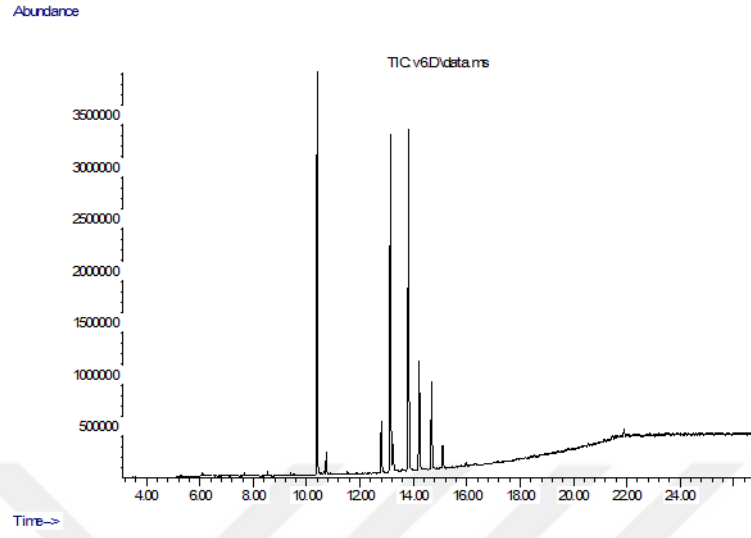
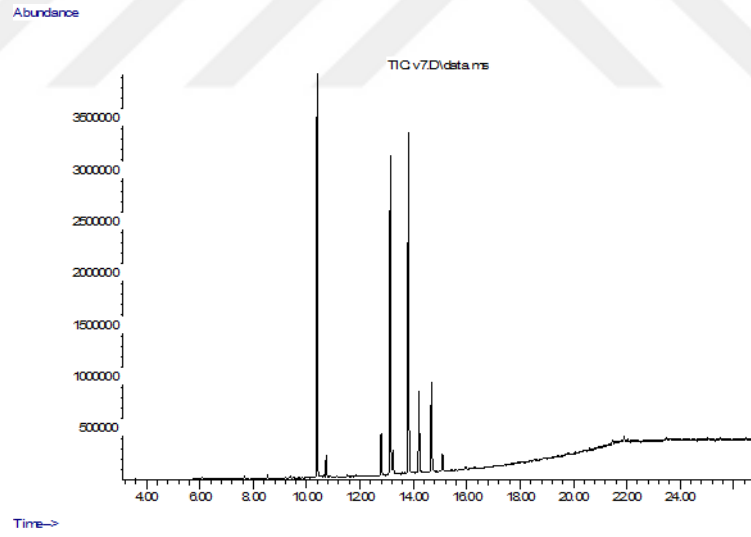
EK 15. B9(b) numaralı tohuma ait GC-MS kromatogramı.

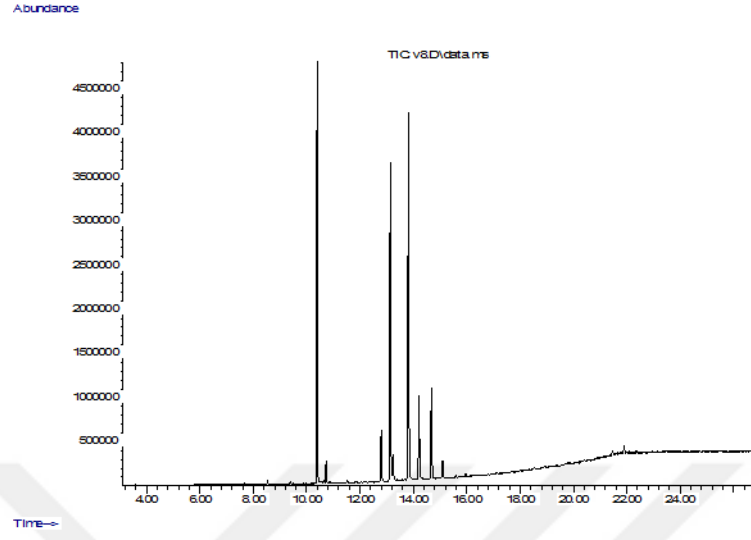
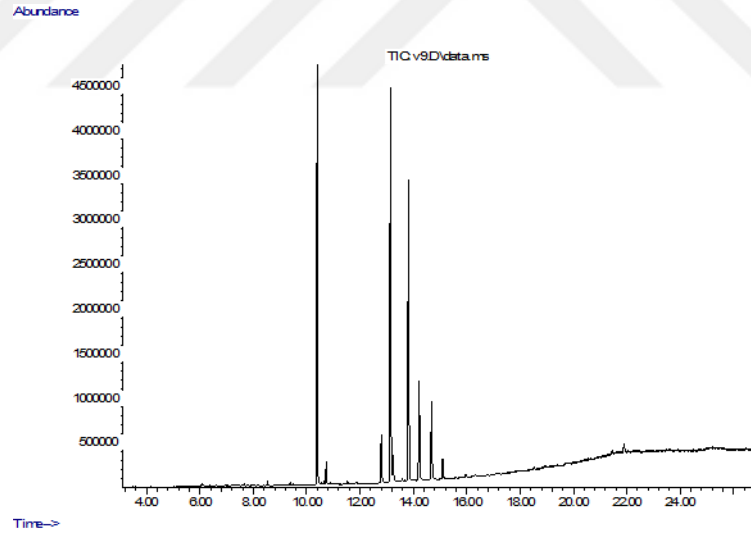


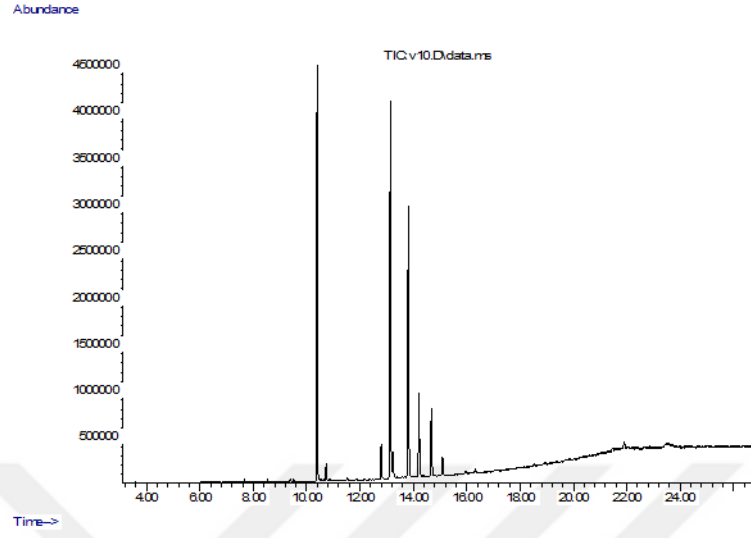
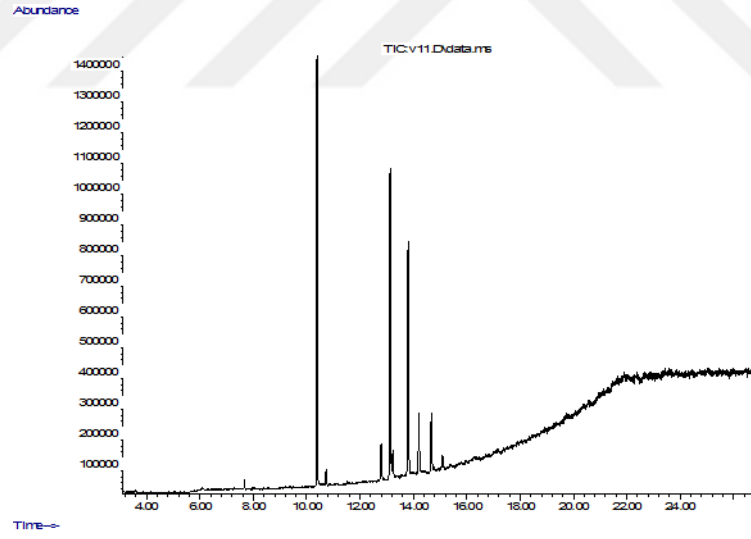
EK 16. S1 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.

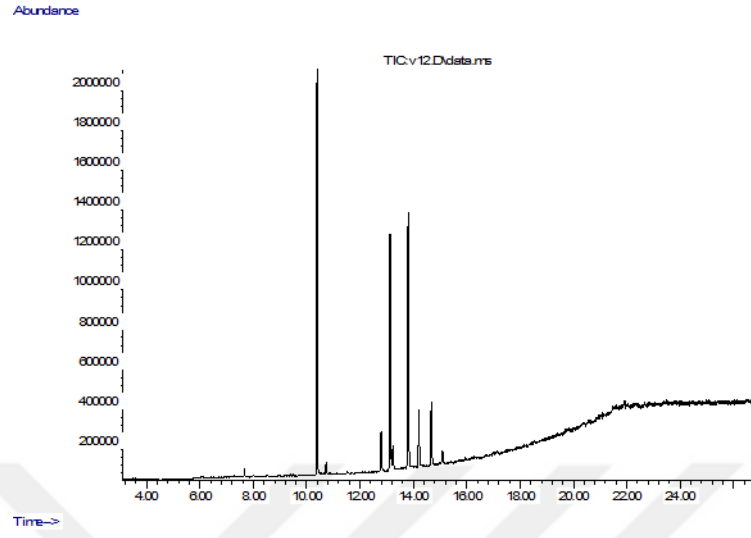
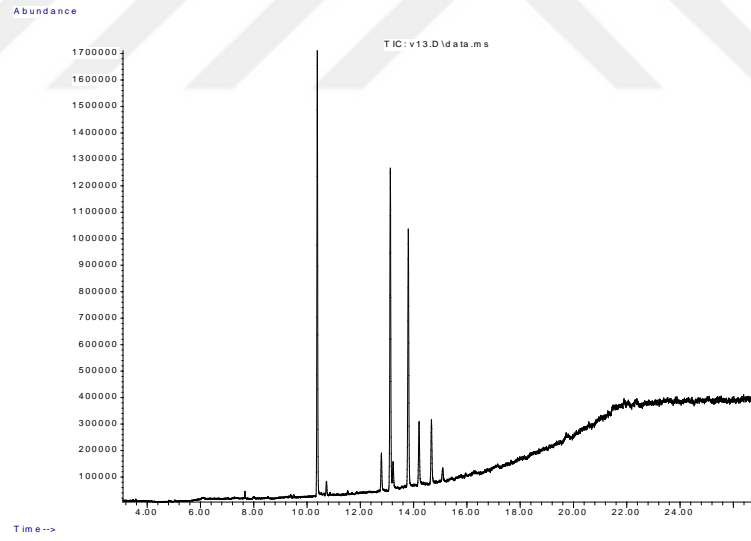


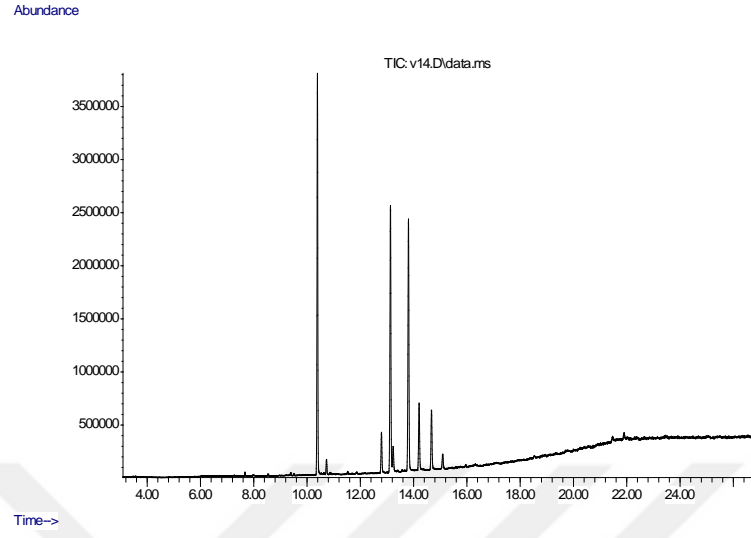
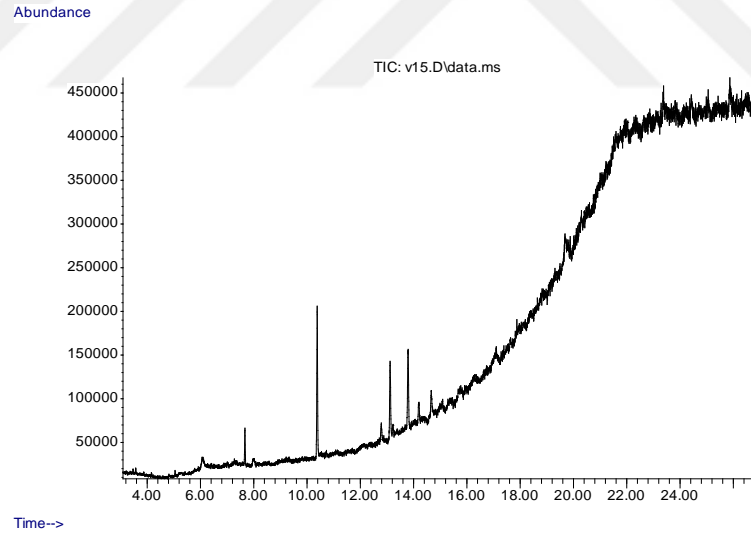
EK 17. S2 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 18. S3 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

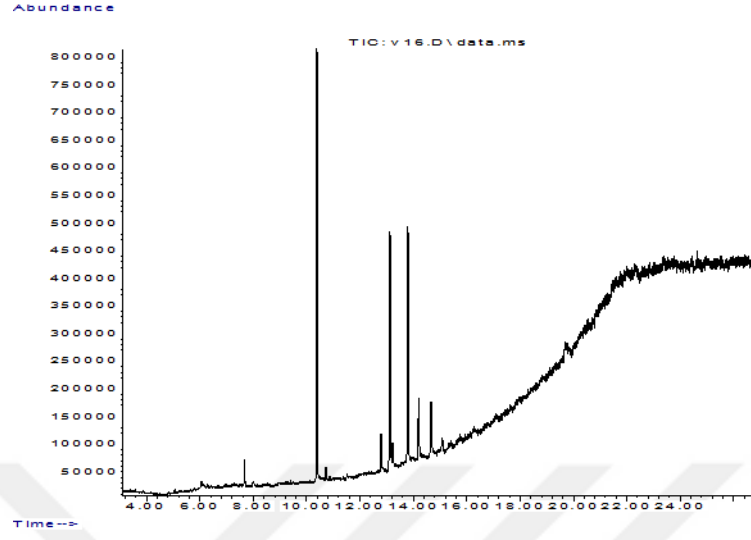
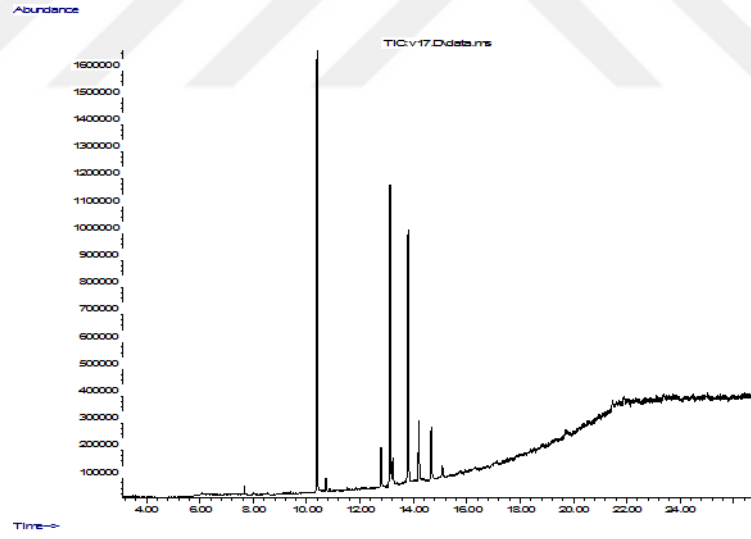
EK 19. S4 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 20. S5 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

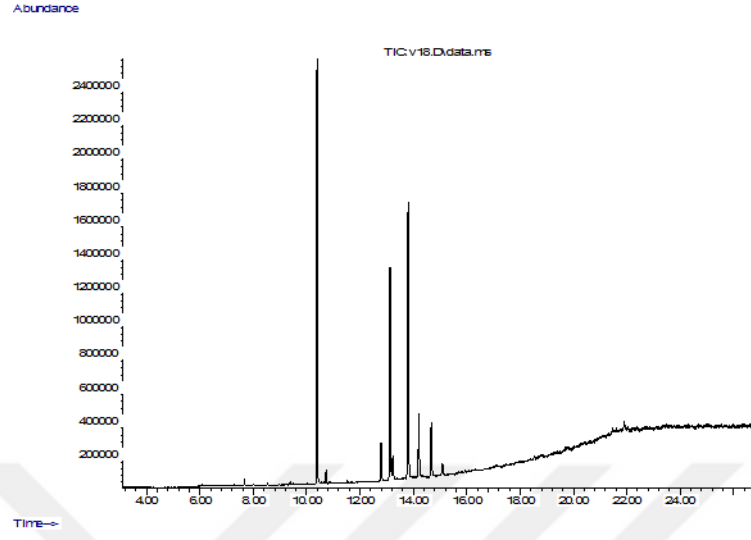
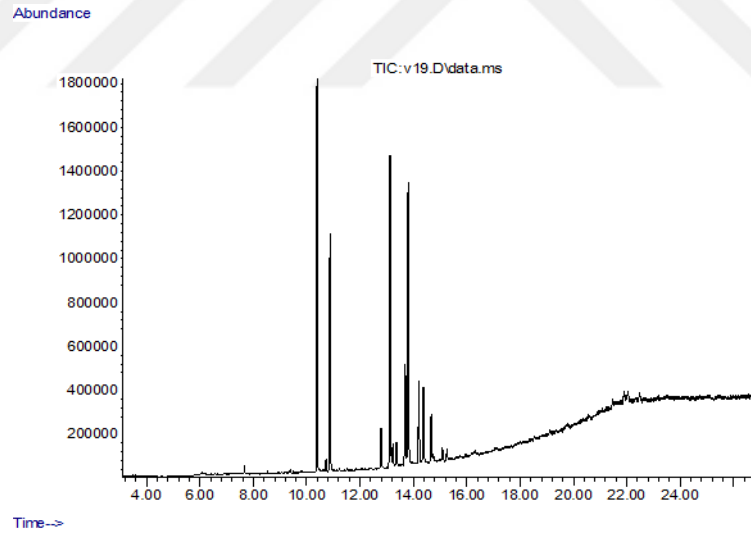
EK 21. S6 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 22. S7 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

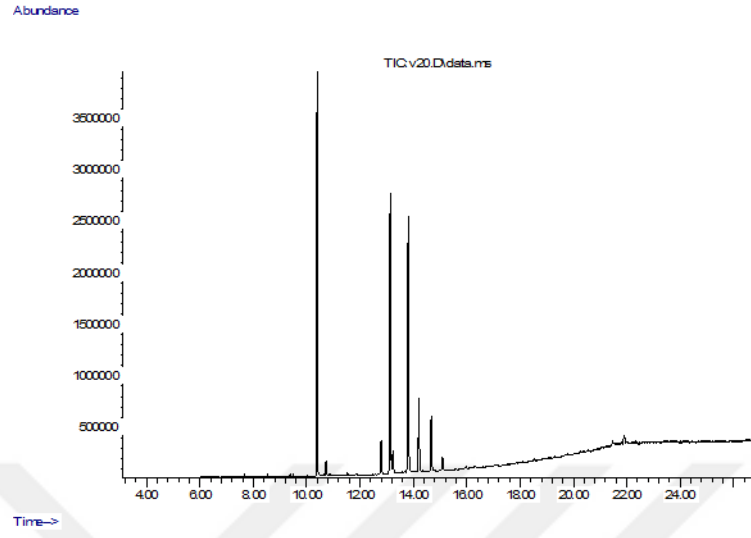
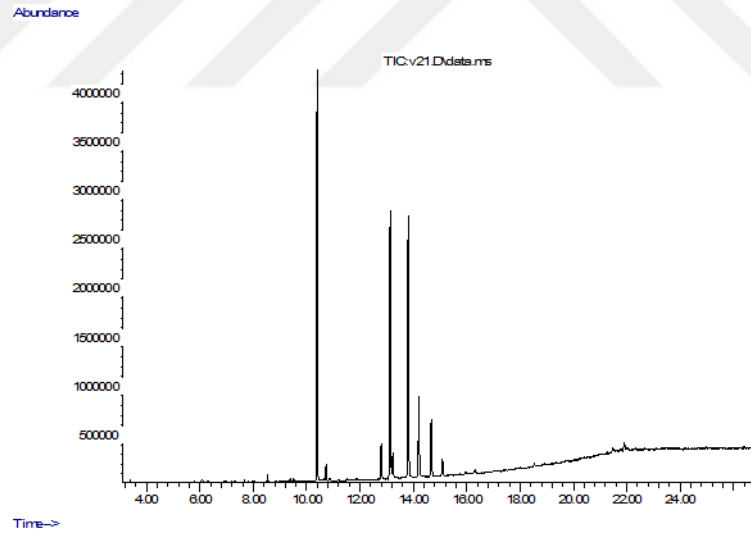
EK 23. S8 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 24. S9 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

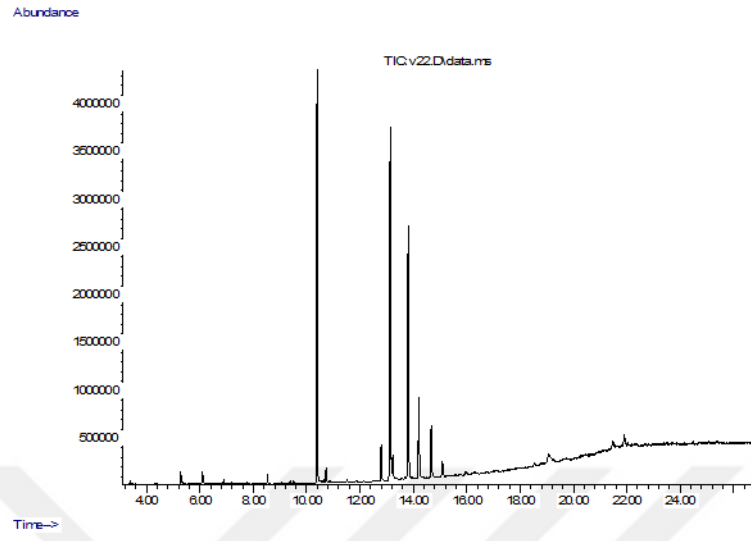
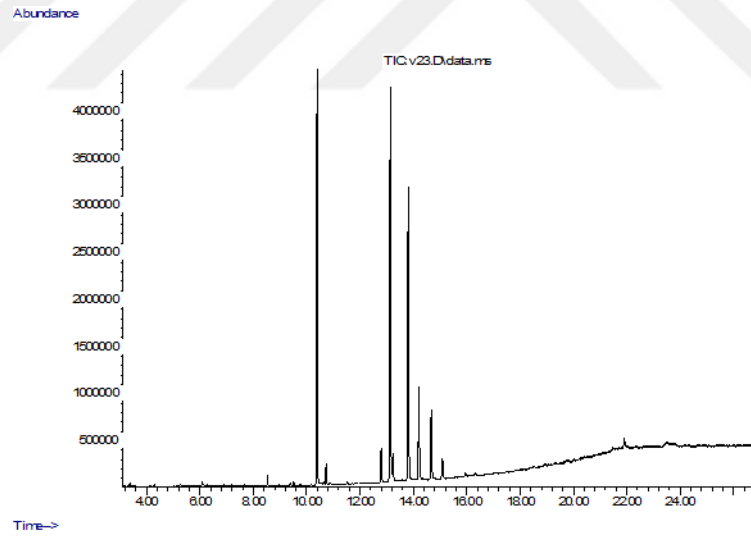
EK 25. S10 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 26. S11 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

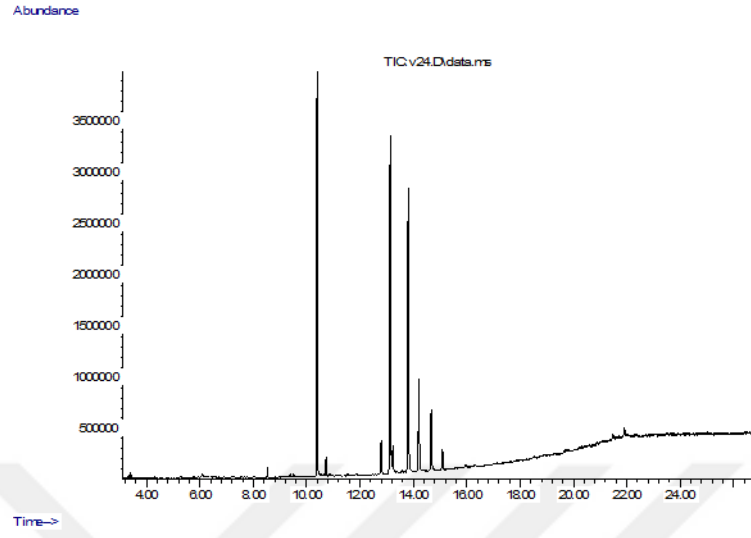
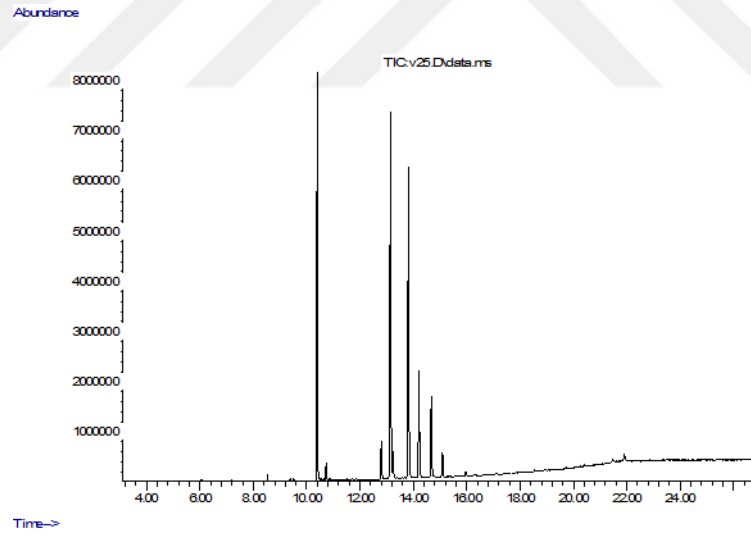
EK 27. S12 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 28. S13 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

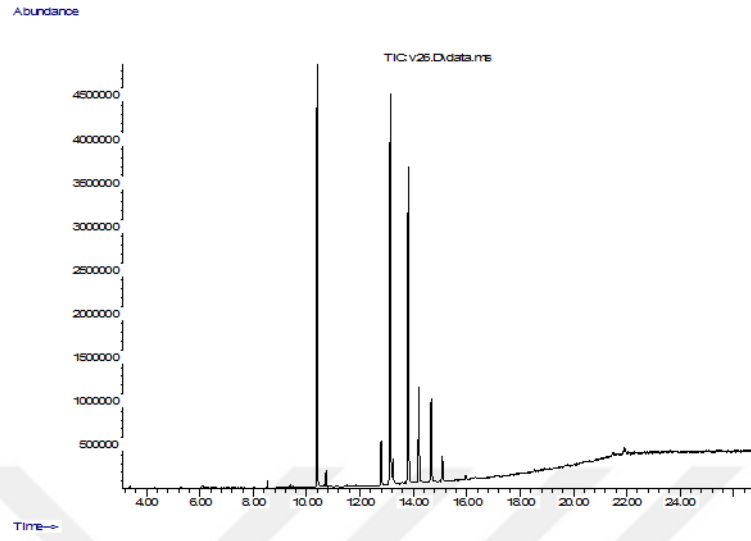
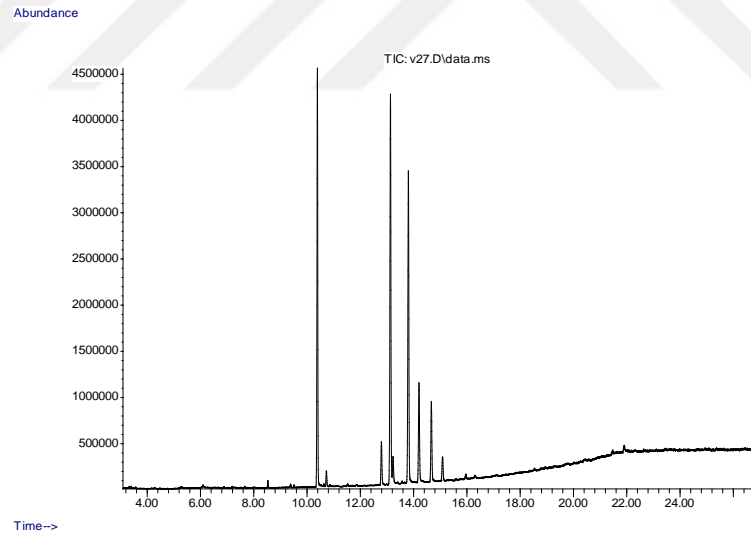
EK 29. S14 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 30. S15 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

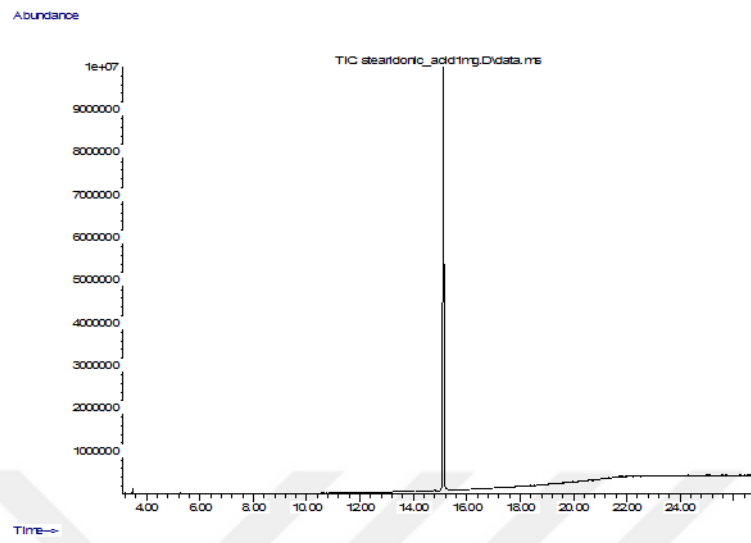
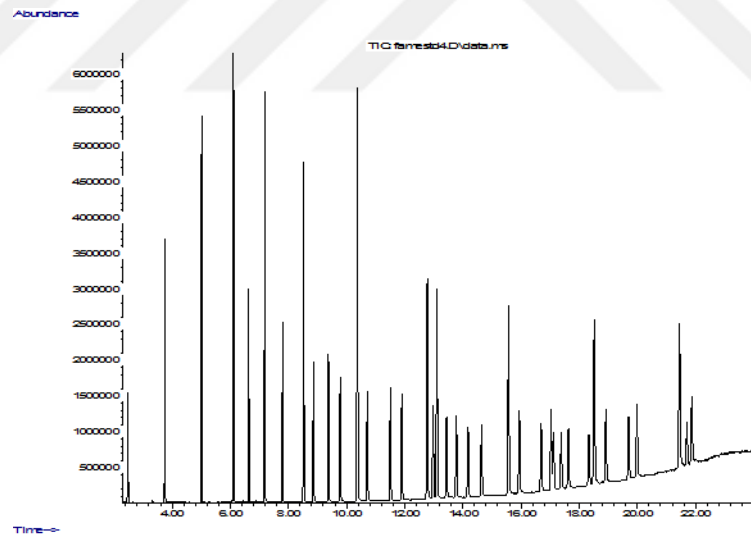
EK 31. S16 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 32. S17 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

EK 33. S18 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 34. S19 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

EK 35. S20 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 36. S21 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

EK 37. S22 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 38. S23 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

EK 39. S24 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**EK 40. S25 numaralı örneğe ait GC-MS kromatogramı.**

EK 41. Stearidonik asit standart GC-MS kromatogram.**EK 42. FAME mix standart GC-MS kromatogram.**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Veysel SÜZERER
Doğum Yeri	Gaziantep
Doğum Tarihi	26.10.1985
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	+905324131887
E-Posta Adresi	beyso1985@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Dicle Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	12.06.2009

Yüksek Lisans	
Üniversite	Gebze Teknik Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Botanik Programı

Makale ve Bildiriler	
<p>1. Süzerer, V. Akbal, T., Atilla, D., Yüksel, F., Gül Şeker, M., Tilkat, E., Onay, A., Özcan, T. and Özden Çiftçi, Y., 2017, Determination of Shikonin Contents and Establishment of Callus Culture from Turkish <i>Echium</i> spp, <i>International Green Biotechnology Congress Abstract Book</i>, September 2017, İstanbul Turkey, pp 103-103 (Poster Sunum).</p> <p>2. Süzerer, V. and Özcan, T., 2018, Difference of Some Seed Oil Components at Different Geographical Distribution in <i>Echium italicum</i> L., <i>In Vitro Cellular and Developmental Biology</i>, June 2018 St. Louis Missouri USA . Springer, pp 44-45 (Sözlü Sunum ve İnteraktif Poster Sunum).</p> <p>3. Süzerer, V., Tepe, M., Atilla, D., Tilkat, E., Özcan, T. And Özden Çiftçi, Y., 2019, Effects of Chemical Stimulations on Shikonin and Derivatives in <i>In Vitro</i> Turkish</p>	

Echium italicum L. Hairy Root Culture, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, June 2019 Tampa Florida USA, pp 40-41 (Poster Sunum ve Sözlü Sunum)

