

T.C.  
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

SİYAH BANOTU (*Hyoscyamus niger*)'NA AİT KÖK  
KÜLTÜRLERİNDE BRASSİNOSTEROİD (BR) VE METİL  
JASMONAT (MEJA) UYGULAMALARININ TROPAN  
ALKALOİDLERİ İLE FENOLİK BİLEŞİKLERİN BİRİKİMİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ

İlknur ALBAYRAK

Danışman  
Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

ISPARTA - 2019



© 2019 [İlknur ALBAYRAK]

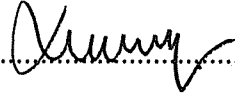
TEZ ONAYI

**SİYAH BANOTU (*Hyoscyamus niger*)'NA AİT KÖK  
KÜLTÜRLERİNDE BRASSİNOSTEROİD (BR) VE METİL  
JASMONAT (MEJA) UYGULAMALARININ TROPAN  
ALKALOİDLERİ İLE FENOLİK BİLEŞİKLERİN BİRİKİMİ  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

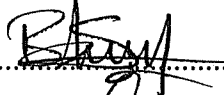
İlknur ALBAYRAK tarafından hazırlanan bu tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

İmza

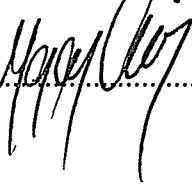
**Başkan** Prof. Dr. Nilgün Göktürk BAYDAR  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

.....  


**Üye** Prof. Dr. Bekir ŞAN  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

.....  


**Üye** Doç. Dr. Yasemin COŞKUN  
Süleyman Demirel Üniversitesi

.....  


Yukarıdaki Jüri kararı Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ....../...../.....  
tarih ve ...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Yusuf UÇAR**  
Enstitü Müdürü

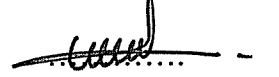
## ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

11/07/2019

İlknur ALBAYRAK



## İÇİNDEKİLER

|   | Sayfa |
|---|-------|
| İÇİNDEKİLER .....   | i     |
| ÖZET.....   | ii    |
| ABSTRACT.....   | iii   |
| TEŞEKKÜR.....   | iv    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....  | v     |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....   | vi    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....  | vii   |
| 1. GİRİŞ .....  | 1     |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ .....  | 3     |
| 2.1. Siyah Banotunun Tarihçesi ve Yayılım Alanları .....  | 3     |
| 2.2. Siyah Banotu Bitkisinin Botanik Özellikleri.....   | 4     |
| 2.3. Siyah Banotu Bitkisinde Bulunan Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları .   | 5     |
| 2.4. Siyah Banotu Bitkisinde <i>In Vitro</i> Sekonder Metabolit Üretiminin Önemi .....                                    | 8     |
| 2.5. Tropan Alkaloidlerince Zengin Bitki Türlerinde Sekonder Metabolit Verimini Artırmak Amacıyla Yapılan Çalışmalar..... | 13    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....   | 25    |
| 3.1. Materyal .....   | 25    |
| 3.2. Yöntem.....  | 25    |
| 3.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve besin ortamlarına aktarılması.....  | 25    |
| 3.2.2 Kök oluşumunun sağlanması .....   | 26    |
| 3.2.3. Köklerin çoğaltılması .....  | 27    |
| 3.2.4. MeJA ve 24-eBL uygulamalarının yapılması .....   | 28    |
| 3.2.5. Köklerde yapılan incelemeler .....   | 29    |
| 3.2.6. Siyah banotu köklerinde metabolit ekstraksiyonunun yapılması.....  | 29    |
| 3.2.7. Tropan alkaloidlerinin HPLC ile belirlenmesi.....  | 30    |
| 3.2.8. Toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi.....   | 30    |
| 3.2.9. Fenolik bileşiklerin HPLC ile belirlenmesi .....   | 31    |
| 3.2.10. İstatistik analizler .....  | 31    |
| 4. BULGULAR.....  | 32    |
| 4.1. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Yaş Kök Ağırlığı Üzerine Etkileri .....   | 32    |
| 4.2. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Kuru Kök Ağırlığı Üzerine Etkileri .....  | 33    |
| 4.3. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Kök Büyüme İndeksi Üzerine Etkileri.....  | 34    |
| 4.4. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Skopolamin Miktarı Üzerine Etkileri.....  | 35    |
| 4.5. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Hiyosiyamin Miktarı Üzerine Etkileri.....   | 36    |
| 4.6. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Toplam Fenolik Madde Miktarı Üzerine Etkileri .....                                   | 37    |
| 4.7. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Fenolik Bileşiklerin Birikimi Üzerine Etkileri.....                                   | 38    |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....  | 42    |
| KAYNAKLAR .....   | 52    |
| ÖZGEÇMİŞ .....  | 69    |

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### SİYAH BANOTU (*Hyoscyamus niger*)'NA AİT KÖK KÜLTÜRLERİNDE BRASSİNOSTEROİD (BR) VE METİL JASMONAT (MEJA) UYGULAMALARININ TROPAN ALKALOİDLERİ İLE FENOLİK BİLEŞİKLERİN BİRİKİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

İlknur ALBAYRAK

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

Bu araştırma siyah banotu bitkisine ait adventif köklere uygulanan 24-epibrasinolid (24-eBL) ile Metil jasmonat (MeJA) uygulamalarının kök gelişimi ile sekonder metabolit birikimi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyondaki 24-eBL (0.5, 1 ve 2 mg/l), hem tek olarak hem de 1 mM MeJA ile yapmış olduğu ikili kombinasyonlar halinde *in vitro* koşullarda elde edilmiş adventif köklere 14 gün süresince uygulanmıştır. Hasat sonrasında uygulamalara göre kökler, yaş kök ağırlığı, kuru kök ağırlığı, kök büyüme indeksi ile tropan alkaloidlerinden hyosiyamin ve skopolamin ile fenolik madde içerikleri bakımından değerlendirilmiştir.

Araştırma sonucunda en yüksek yaş ve kuru kök ağırlığı ile kök büyüme indeksi bakımından 2 mg/l 24-eBL; skopolamin ve kateşin birikimi için 1 mM MeJA + 2 mg/l 24-eBL kombinasyonu; hyosiyamin ve epikateşin birikimi için 1 mM MeJA + 1 mg/l 24-eBL kombinasyonu; toplam fenolik madde, gallik asit, vanilin, sinnamik asit, rosmarinik asit, kafeik asit, klorogenik asit birikimi için de 1 mM MeJA en uygun uygulamalar olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, 24-eBL ve MeJA uygulamalarının siyah banotu kök kültürlerinde tropan alkaloidleri ile fenolik bileşiklerin üretimini artırmaya yönelik olarak başarı ile kullanılabilceği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Hyoscyamus niger*, adventif kök, brassinosteroid, metil jasmonat, tropan alkaloidleri, fenolik bileşikler

2019, 69 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### EFFECTS OF BRASSINOSTEROID (BR) AND METHYL JASMONATE (MEJA) APPLICATION OVER PHENOLIC ACCUMULATION COMPOUNDS BY TROPANE ALKALOIDS IN ROOT CULTURES OF BLACK HENBANE (*Hyoscyamus niger*)

İlknur ALBAYRAK

Isparta University of Applied Sciences  
The Institute of Graduate Education  
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

In this study, it was carried out to determine the effect of 24-epibrassinolide (24-eBL) and methyl jasmonate (MeJA) on the root growth and secondary metabolite accumulation of adventitious roots in black henbane (*Hyoscyamus niger*). For this purpose, different concentrations of 24-eBL (0.5, 1 and 2 mg/l) were applied to adventitious roots obtained from leaf stems alone or the combination of 1 mM MeJA for 14 days. After harvest, adventitious roots were evaluated for fresh root weight, dry root weight, root growth index, contents of tropane alkaloids including hyoscyamine and scopolamine and phenolics compounds.

As a result of this study, 2 mg/l 24 –eBL was the most suitable application providing the highest root growth parameters while 1 mM MeJA + 2 mg/l 24-eBL combination for scopolamine and catechin and 1 mM MeJA + 1 mg/l 24-eBL combination for hyoscyamine and epicatechin were the optimum applications. On the other hand 1 mM MeJA gave the maximum values for total phenolic, gallic acid, vanillin, cinnamic acid, rosmarinic acid, caffeic acid, chlorogenic acid. Consequently, it was determined that 24-eBL and MeJA treatments can be used successfully in order to increase the production of tropane alkaloids and phenolics compounds in adventitious roots of black henbane.

**Keywords:** *Hyoscyamus niger*, adventitious root, brassinosteroid, methyl jasmonate, tropane alkaloids, phenolic compounds

2019, 69 pages

## TEŞEKKÜR

Tez alıőmamın baőından sonuna kadar her aőamasında sabır ve özveri ile bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, danıőmanımın olmasından büyük bir onur duyduğum değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım sırasında HPLC metodu ile sekonder metabolitlerin ölçümü aőamasındaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Tunhan DEMİRCİ'ye, laboratuvar çalıőmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı arkadaşım Zir.Müh. Serdar Özmen ve bölümümüz öğretim elemanlarından Dr. Özlem ARAS AŐCI'ya teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme de sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

**İlknur ALBAYRAK**  
ISPARTA, 2019



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Siyah banotu bitkisi .....   | 4            |
| Şekil 2.2. Bisiklik azabisiklo-oktan iskeleti.....  | 5            |
| Şekil 2.3. L-ornitinden tropan alkaloidlerinin sentezi.....   | 6            |
| Şekil 2.4. BR biyosentez aşamaları.....   | 12           |
| Şekil 3.1. Besin ortamlarına ekilmiş tohumlar (a) ile ekimden 15 gün sonra<br>çimlenmiş bitkicikler (b).....        | 26           |
| Şekil 3.2. Dört haftalık siyah banotu bitkileri.....  | 26           |
| Şekil 3.3. Besin ortamlarına dikilmiş yaprak sapı eksplantları (a) ile<br>bunlardan oluşan adventif kökler (b)..... | 27           |
| Şekil 3.4. Sıvı ortamlarda kültüre alınan adventif kökler (a) ile sıvı<br>ortamda çoğalan adventif kökler (b).....  | 27           |
| Şekil 4.1. 24-eBLve MeJA uygulamalarının yaş kök ağırlığı üzerine<br>etkileri .....                                 | 32           |
| Şekil 4.2. 24-eBLve MeJA uygulamalarının kuru kök ağırlığı üzerine<br>etkileri .....                                | 33           |
| Şekil 4.3. 24-eBLve MeJA uygulamalarının kök büyüme indeksi üzerine<br>etkileri .....                               | 34           |
| Şekil 4.4. 24-eBLve MeJA uygulamalarının skopolamin miktarı üzerine<br>etkileri .....                               | 35           |
| Şekil 4.5. 24-eBLve MeJA uygulamalarının hiyosiyamin üzerine etkileri.....  | 36           |
| Şekil 4.6. 24-eBLve MeJA uygulamalarının toplam fenolik madde miktarı<br>üzerine etkileri.....                      | 37           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| Çizelge 3.1. Araştırmada yapılan uygulamalar .....   | 28           |
| Çizelge 3.2. Tropan alkaloidlerinin HPLC analizlerinde kullanılan bazı parametreler .....          | 30           |
| Çizelge 3.3. Tropan alkaloidlerinin HPLC analizlerinde kullanılan gradient program .....           | 30           |
| Çizelge 3.4. Fenolik bileşiklerin HPLC analizlerinde kullanılan bazı parametreler .....            | 31           |
| Çizelge 3.5. Fenolik bileşiklerin HPLC analizlerinde kullanılan gradient program .....             | 31           |
| Çizelge 4.1. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının fenolik bileşik miktarları üzerine etkisi (µg/g) ..... | 40           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                 |                                       |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| ABA                             | Absisik asit                          |
| ADC                             | Arjinin dekarboksilaz                 |
| AgNO <sub>3</sub>               | Gümüş nitrat                          |
| AlCl <sub>3</sub>               | Aleminyum klorür                      |
| ASA                             | Asetil salisilik asit                 |
| BA                              | Benzil adenin                         |
| BR                              | Brassinosteroid                       |
| CaCl <sub>2</sub>               | Kalsiyum klorür                       |
| F3GT                            | Flavonoid 3-O-glikozil transferaz     |
| GA <sub>3</sub>                 | Giberellik asit                       |
| GOGAT                           | Glutamin oksoglutarat aminotransferaz |
| H6H                             | Hiyosiyamin 6β-hidroksilaz            |
| HgCl <sub>2</sub>               | Civa klorür                           |
| IAA                             | İndol asetik asit                     |
| IBA                             | İndol bütirik asit                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Potasyum fosfat                       |
| M                               | Mol                                   |
| mg                              | Miligram                              |
| MgSO <sub>4</sub>               | Magnezyum sülfat                      |
| ml                              | Mililitre                             |
| mM                              | Milimol                               |
| MS                              | Murashige ve Skoog                    |
| NAA                             | Naftalen asetik asit                  |
| NO <sub>3</sub> -               | Nitrat                                |
| ODC                             | Orjinin dekarboksilaz                 |
| PAL                             | Fenilalanin amonyum-liyaz             |
| PMT                             | Putresin N-metiltransferaz            |
| Ppm                             | Milyonda bir birim                    |
| SA                              | Salisilik asit                        |
| SAM                             | S-adenozil metiyoninin                |
| μl                              | Mikrolitre                            |
| μm                              | Mikromol                              |
| 2,4-D                           | 2,4 diklorofenoksi asetik asit        |
| 24-eBL                          | 24-Epibrassinolid                     |

## 1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca ilaç, baharat, boya, kozmetik, fitoterapi, aromaterapi gibi değişik amaçlarla yaygın bir biçimde kullanılmış olan tıbbi bitkiler, günümüzde de önemlerini ve kullanım alanlarını gelişen bilim ve teknoloji ile birlikte elde edilen kazanımlardan da yararlanılarak, gün geçtikçe artırmaya devam etmektedirler. Sahip olduğu iklim çeşitliliği ve coğrafi konum nedeniyle birçok bitkinin anavatanı ve ilk kültüre alındığı yer olan ülkemiz, bu yönüyle birçok tıbbi bitkiye de ev sahipliği yapmaktadır.

Bu tıbbi bitkilerden biri de patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasına ait siyah banotu (*Hyoscyamus niger*)'dur. Siyah banotu, yüksek farmakolojik aktiviteleri ve daha az yan etkiye sahip olmaları nedeniyle birçok ilacın bileşiminde bulunan tropan alkaloidlerince zengin, ekonomik önemi yüksek (Drager, 2002), tek veya iki yıllık otsu formda bir bitkidir (Çırak vd., 2004). Tropan alkaloidleri yatıştırıcı, sakinleştirici, ağrı kesici, öksürük kesici, spazm çözücü etkilerinden dolayı kulak ve göz iltihabı, romatizma, ülser tedavisi, öksürük, hareket hastalığı, astım, kuduz, ateş, bronşit, renal kolik ve spazm gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Supria, 1998; Pitta Alvarez vd., 2000; Harrison ve Bartels, 2006; Tytgat, 2007). Bu alkaloidlerin kardiyovasküler koruyucu etkilerinin yanı sıra (Vallabi ve Elango, 2016), dünya genelinde 340 milyon kişiyi etkileyen tıbbi ve sosyal bir sorun olan depresyona karşı antidepresan özellikler taşıdıkları da belirlenmiştir (Patil, 2013). Siyah banotonda en fazla bulunan tropan alkaloidleri hiyosiyamin ve skopolamindir. Kompleks kimyasal yapıları, maliyet ve zaman faktörleri nedeniyle bu alkaloidlerin kimyasal sentezinin son derece zor ve neredeyse imkânsız olması, bu bileşiklerin, bitkisel kaynaklardan elde edilme zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır (Oksman ve Hiltunen, 1996; Ghorbanpour vd., 2013a). Siyah banotu daha çok tropan alkaloidleriyle ön plana çıkmakla birlikte, bitkinin ayrıca flavonoidler, lignanlar, kumarinolignanlar, saponinler, gliseridler, glikozitler gibi önemli fenolik bileşik gruplarını da içerdiği ifade edilmektedir (Lunga vd., 2008; Bahmanzadegan vd., 2009). Fenolik bileşikler, doğal antioksidan madde özelliği göstererek, serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları inhibe etmeleri sonucunda kanser, kalp ve akciğer hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici özellikleri bulunan son derece önemli bir diğer metabolit grubunu oluşturmaktadır. Son yıllarda alkaloid ve fenolik bileşikler

gibi değerli metabolitlerin kısa sürede, daha yüksek miktarlarda ve kontrollü koşullarda elde edilmesine yönelik alternatif tekniklerin arayışları sonucunda, doku kültürü teknikleri önemli potansiyele sahip bir teknikler bütünü olarak büyük popülarite kazanmaya başlamıştır (Hong vd., 2012). Nitekim bitki materyallerinin mikroorganizmalar tarafından istilası, standart miktar ve kalitede metabolit elde edilememesi, saf ve standardize bitki materyali kıtlığı, mevsime bağlılık gibi sorunlar, doğadan toplama yoluyla metabolit üretiminin en önemli problemleri olarak ortaya çıkmaktadır (Raman vd., 2004). Bitkilerin doğadan toplanması ile yapılan üretim şeklinin bir diğer dezavantajı da özellikle kök kaynaklı metabolitlere sahip bitkiler için zamanla yok olma tehlikesini de beraberinde getirmesidir. Bütün bu olumsuzlukları ortadan kaldırmada başarı ile kullanılma potansiyeli bulunan *in vitro* sekonder metabolit üretim teknikleri, bu nedenle günümüzde en önemli araştırma konularından biri haline gelmiştir (Jones vd., 2009). *In vitro* sekonder metabolit üretiminde doğada uygulanması mümkün olmayan birçok uygulamanın *in vitro*'da kolaylıkla yapılarak metabolit veriminin çok daha yüksek seviyelere çıkartılması da mümkün olabilmektedir. Besin ortamlarında ve kültürel koşullarda yapılan değişiklikler, büyümeyi düzenleyici madde uygulamaları, biyosentez yolundaki öncül ya da ara maddelerin ortamlara ilave edilmeleri sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla kullanılabilir yöntemler arasında bulunmaktadır. Ayrıca sekonder metabolit sentez yollarındaki enzim ve genleri uyararak sekonder metabolit üretimini artıran elisitör uygulamaları da *in vitro* koşullarda yapılan önemli uygulamalardan bir diğerini oluşturmaktadır (Zhao vd., 2002). *In vitro* sekonder metabolit üretiminde kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin yanısıra kök kültürleri de hızlı büyüme oranları ve stabil metabolit üretkenlikleri nedeniyle, özellikle kök kaynaklı metabolitlerin elde edilmesinde en çok tercih edilen bir diğer kültür çeşidini oluşturmaktadır (Carvalho ve Curtis, 1998). Nitekim kök kültürlerinin tropan alkaloidleri elde edilmesinde kullanılan en başarılı yöntem olduğu tespit edilmiştir (Hashimoto vd., 1986).

Bu tez çalışması, siyah banotu bitkisine ait adventif köklere uygulanan steroid yapıda bir bitki büyüme düzenleyici olan brassinostreoidler (BR) ile elisitör olarak kullanılan metil jasmonat (MeJA)'ın tekli ya da ikili kombinasyonlarının kök gelişimi, köklerde bulunan tropan alkaloidleri ile fenolik bileşiklerin miktarları üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Siyah Banotunun Tarihçesi ve Yayılım Alanları

Siyah banotunun tıbbi bir bitki olarak kullanımını çok uzun bir geçmişe dayanmaktadır (Matsuda vd., 1991). Yüzyıllardan beri bir ilaç olarak kullanılan siyah banotu, geçmişte de hekimler tarafından değişik rahatsızlık durumlarında kullanılmıştır. Antik Yunanlar siyah banotunun kahkahaya sebebiyet veren acı ve üzüntüyü yok eden büyümlü bir bitki olduğuna inanmışlardır. Norveç geleneğinde ise kadınlar halüsinasyon görmek için siyah banotunun belirli kısımlarını karıştırıp merhem olarak ciltlerine uygulamışlardır. Siyah banotu bazı cadılar tarafından da ateşte koşmak ya da uçmak için kullanılmıştır (Paulsen, 2010). Hindistan'da mide ağrısı, ağır öksürük, manik psikoz ve nevraljik ağrıların tedavisi için kullanılmıştır. 17. YY'da ise Amerika Birleşik Devletleri'nde bir tıbbi ve süs bitkisi olarak yetiştirilmiştir (Pokorny ve Mangold, 2010). Günümüzde de sahip olduğu tropan alkaloidleri nedeniyle başta tıp olmak üzere birçok alanda kullanılan ve önemini artırarak koruyan bir bitki olmaya devam etmektedir.

Siyah banotu, Avrupa ve Kuzey Afrika'ya özgü bir bitkidir (Pokorny ve Mangold, 2010). Avrupa, Asya, Kuzey Amerika ve Brezilya'nın hemen hemen tüm bölgelerine dağılışı göstermektedir (Emami, 2007). Yaklaşık 40 kadar cinsi Orta ve Güney Amerika'da yayılışı göstermektedir (Shukla ve Misra, 2001). Avrupa ve Kuzey Afrika üzerinden Asya'ya kadar dağılışı gösteren *Hyoscyamus* cinsinin, benzer özelliklere ve içeriklere sahip yaklaşık 11 türü bulunmaktadır. Kireçli toprakta ve özellikle denize yakın yerlerde bu bitkiye rastlanabilmektedir. İran'ın kuzeyinde, Azerbaycan, Oroomie, Tebriz, Astara, Ardabil, Arak, Tefriş, Rudbar, Gürgan, Horasan'da çokça bulunmaktadır (Emami, 2007). Ülkemizde ise *Hyoscyamus* cinsinin *H. albus* (Beyaz banotu), *H. aureus* (Sarı banotu), *H. leptocalyx* (Mardin banotu), *H. niger* (Siyah banotu), *H. pusillus* (Cüce banotu) ve *H. reticulatus* (Mor banotu) olmak üzere 6 türü bulunmakta olup (Baytop, 1999), Ağrı, Amasya, Ankara, Aydın, Bolu, Çanakkale, Erzurum, Eskişehir, Hakkari, Isparta, İstanbul, Kastamonu, Kırklareli, Kocaeli, Kütahya, Kahramanmaraş, Muğla, Ordu, Sivas, Trabzon, Tunceli, Şanlıurfa ve Aksaray illerinde doğal olarak yetişmektedir (Anonim, 2012).

## 2.2. Siyah Banotu Bitkisinin Botanik Özellikleri

*Solanaceae* familyası genel olarak 94 cins ve 2950 tür içeren oldukça büyük bir bitki ailesidir (Drager, 2004). Familya içerisinde ekonomik, tarımsal ve farmasötik açıdan önemli bitkiler bulunmaktadır (Wink, 2003). Bu bitkilerden biri de siyah banotudur (Baydar, 2013). Bitki halk arasında Deli bat bat, Gavur haşhaşı, Bengildek, Berç, Benk, Dağdağan gibi isimlerle de anılmaktadır (Baytop, 1999).

Siyah banotu, Mayıs–Eylül dönemlerinde sarımsı renkte çiçekler açan, 30-80 cm arasında boylanabilen (Yiğenoğlu, 2007), tek veya iki yıllık otsu formda bir bitkidir (Şekil 2.1), (Çırak vd., 2004). Tek yıllık bitkiler, iki yıllık bitkilere göre daha kısa ve daha zayıf çiçeklere sahiptir. Kokulu çiçekler erselik olup, böceklerle tozlanmaktadır (Melchers, 1939). 80 cm'ye kadar ulaşabilen basit, dik veya dallanmış yapıdaki sapları, yapışkan tüylerle örtülüdür. Oval şekle sahip bitki yapraklarının kenar kısımları oyuntuludur. Boyut olarak kısa çiçek saplarına sahip olan bitkinin, çanak yaprakları tüp şeklinde ve üzerleri damarlıdır. Huni şeklinde olan taç yaprakları ise, beş bölümlü olup çanak yapraklara benzer şekilde üzerleri damarlıdır. Meyve kapsülünün içerisinde grimsi renkte yaklaşık 500 kadar da tohum bulundurduğu bilinmektedir (Chevallier, 1996).

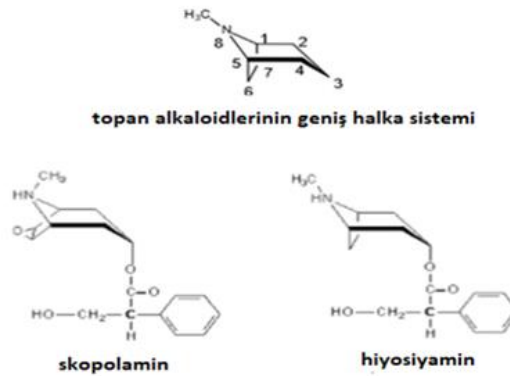


Şekil 2.1. Siyah banotu bitkisi

### 2.3. Siyah Banotu Bitkisinde Bulunan Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları

Siyah banotunun tıbbi bir bitki olarak değer taşımasının en önemli nedeni, başta skopolamin ve hiyosiyamin olmak üzere içermiş olduğu tropan alkaloidlerinden kaynaklanmaktadır. Bu alkaloidler sırasıyla ornitin ve fenilalaninden kaynaklanan tropan türevlerinin ve tropik asidin esterleridir. Tropan alkaloidleri siyah banotunda kök, tohum ve yapraklarda bulunmaktadır. Yapraklarda alkaloid miktarı %0.04-0.14 arasında değişmektedir (Baydar, 2013). Tohumlarında ise bu oran %0.5-0.6 arasında değişmekte olup, aynı zamanda tohumlar %20 oranında sabit yağ da içermektedir (Morishita, 1991). Alkaloidler önce bitkinin toprak altı organlarında sentezlenmekte, ardından üst kısımlara taşınmaktadır (Hashimoto vd., 1991).

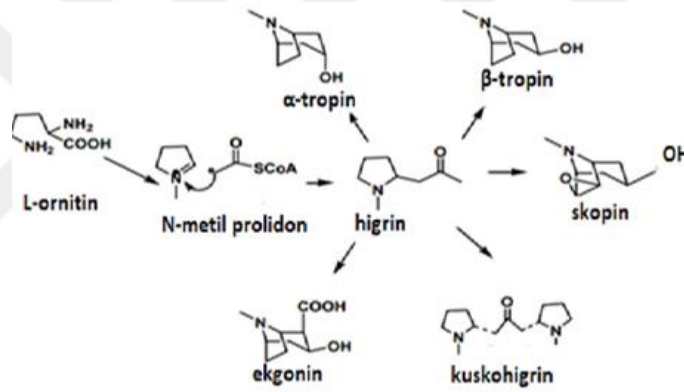
Tropan alkaloidleri, 8-azabisiklo [3.2.1] oktan çekirdek içeren bir sekonder metabolit grubudur. *Solanaceae* familyasında bulunan tropan alkaloidlerinin birçoğu asetik asit, propanoik asit, izobütirik asit, izovalerik asit, 2-metilbütirik asit, tiglik asit, hidroksi-fenilpropiyonik asit, tropik asit ve atropik asit gibi asitlerin çeşitli hidroksipropanlarla (α-tropanol, tropan-diol veya α-tropan-triol) esterleştirilmesinden meydana gelmektedir. Tropan alkaloidlerin alkaloid kısmı, bir piperidin ile tek bir azot atomunu ve iki karbon atomunu paylaşan bir piperidin halkası ile karakterize edilen iki halkalı bir yapıdır. Bu yapı tropan alkaloidlerin ortak yapısal elemanı olup, Şekil 2.2’de gösterilen bisiklik azabisiklo-oktan iskeletidir (Lounasmaa ve Tamminen, 1993).



Şekil 2.2. Bisiklik azabisiklo-oktan iskeleti (Lounasmaa ve Tamminen, 1993)



Tropan alkaloidlerinin biyosentezi poliamin putresin oluşturmak için orjinin dekarboksilaz (ODC) ya da arjinin dekarboksilaz (ADC) tarafından ornitin ve/veya arjininin dekarboksilasyonu ile başlar. ODC ve ADC'nin faaliyetleri fizyolojik ve gelişimsel koşullara bağlı olup, ayrı ayrı düzenlenmiştir. ODC aktivitesi esas olarak aktif olarak büyüyen dokularda hücre bölünmesini düzenlerken, ADC aktivitesi ise sekonder metabolik işlemler, hücre uzantısı ve stres tepkileriyle ilişkilidir. Putresin N-metiltransferaz (PMT), tropan alkaloidlerinin biyosentezinde putresinin S-adenozil metiyoninin (SAM) bağımlı N-metilasyonu tarafından ilk kararlı adımı katalize eder. Temel yapı olarak tropan çekirdeği içeren bütün sekonder metabolitlerde, L-ornitin aminoasiti biyosentez kökeni ortaktır. Bu bileşik Şekil 2.3'de gösterildiği üzere çeşitli biyosentezlerden sonra, higrine dönüşürek tropan alkaloidlerinin sentezini oluşturur (Simone, 2008).



Şekil 2.3. L-ornitinden tropan alkaloidlerinin sentezi (Simone, 2008)

Siyah banotu bitkisinin de bulunan tropan alkaloidleri, yüksek farmakolojik aktiviteleri ve daha az yan etkiye sahip olmaları nedeniyle birçok ilacın bileşiminde bulunmaktadır (Drager, 2002). Bu ikincil metabolitler antikolinergik, antispazmodik, hipnotik ve sedatif etkilerinden dolayı tıp alanında önemli bir yere sahiptirler (Supria, 1998; Pitta Alvarez vd., 2000; Harrison ve Bartels, 2006; Tytgat vd., 2007).

Daha çok skopolamin olarak bilinen hiyosin, ilk olarak 1881'de *Scopola carniolica*'dan izole edilmiş ve daha sonra siyah banotunda da tanımlanmıştır. Bitkiler aleminde *Datura* türlerinde sıkça bu alkaloid rastlanmaktadır. Skopolamin, hiyosiyaminin epoksiti olup, 6P-hidroksihiyosiyamin üzerinden hiyosiyaminden

biyosentezlenmektedir (Hashimoto ve Yamada, 1987a). Skopolamin esas olarak glukuronidasyon ve ester fonksiyonu hidroliziyle metabolize olmaktadır. Skopolamin, tıbbi ürünlerde belirli bir endikasyon aralığında kullanılmaktadır. Özellikle spazmolitik etkisinden dolayı hareket hastalığının önlenmesinde ve intestinal bozuklukların tedavisinde skopolaminin n-bütilskopokolamin bromür türevi kullanılmaktadır. Ayrıca preanestetik ilaçlarda sıkça kullanılan bir bileşen olduğundan, bu bağlamda skopolaminin tükürük ve bronşiyal sekresyonlarda azaltıcı ve bazı sakinleştirici etkileri de bulunmaktadır (Grynkiewicz ve Gadzikowska, 2008). Ayrıca depresif semptomlar üzerine yapılan bir çalışmada konvansiyonel farmakoteraplere göre daha güçlü ve hızlı antidepresan etkiler gösterdiği de tespit edilmiştir (Drevets vd., 2013).

Siyah banotunda bulunan bir diğer tropan alkaloidi olan hiyosiyamin ise atropinin levo-izomeri olup, atropinle benzer özellikte etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Ebadi, 2007). Hiyosiyaminin başlıca etkisi, merkezi sinir sistemi üzerinde görülmektedir. Bu etkisi ile parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca hiyosiyamin gastrointestinal (mide-bağırsak) bozukluk durumunda iyileştirici özellik göstermektedir (Pitta Alvarez vd., 2000). Bahsedilen bu iki tropan alkaloidinin dünya üzerindeki kullanımları göz önüne alındığında, skopolamin hiyosiyamine göre 10 kat daha fazla talep görmektedir (Sevon vd., 2001).

Siyah banotunda ana metabolit alkaloidler olsa da bu bitkinin ayrıca flavonoidler, lignanlar, kumarinolignanlar, saponinler, gliseridler, glikozitler ve fenolik bileşikler gibi farklı sekonder metabolitleri de içerdikleri ifade edilmektedir (Lunga vd., 2008; Bahmanzadegan vd., 2009). Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak ifade edilen fenolik bileşikler, bitkilerde diğer bileşiklere oranla oldukça yüksek miktarlarda bulunmaktadır (Kafkas, 2006). Bitkisel kökenli materyallerde bulunan fenolik bileşiklerin “fenolik asitler” ve “flavonoidler” olmak üzere iki grubu bulunmaktadır (Cemeroğlu vd., 2004). Günümüzde çok sayıda fenolik madde belirlenmiş olup, bunların büyük bir çoğunluğunu flavonoidler oluşturmaktadır (Çam ve Hışıl, 2003). Flavonoidler bitkilerde glikozit ya da aglikon şeklinde bulunurken bazı durumlarda da her iki formda da bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin bitki ve insan yaşamında değişik ve çok sayıda fonksiyonları bulunmaktadır. Bunlar arasında doğal antioksidan özelliği göstermeleri, bitkiler açısından tehlikeli olan serbest radikallerin neden olduğu

reaksiyonları inhibe etmeleri sonucunda kanser, kalp ve akciğer hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların meydana gelmesine engel olmaları, böcek ve hayvan saldırılarına karşı bitkiyi korumaları, bitkilere enerji sağlayarak gelişimlerini teşvik etmeleri, bakteri ve fungus gibi bitki patojenlerine karşı bitkinin savunma mekanizması aktifleştirilmesi ve biyotik ve abiyotik streslere karşı dayanımda görev almaları sayılabilmektedir. Ayrıca bitkilerin kendine özgü aroma ve kokularının oluşmasında da etkili olmaktadır (Oğuz, 2008; Mammadov, 2014). Siyah banotu bitkisinde bulunan alkaloidlerin ve fenolik bileşiklerin bu önemli özelliklerinden dolayı yüksek kalite ve miktarda üretilmeleri büyük önem taşımaktadır.

#### **2.4. Siyah Banotu Bitkisinde *In Vitro* Sekonder Metabolit Üretiminin Önemi**

Bitkiler tarafından çeşitli fizyolojik mekanizmalar sonucunda sentezlenen, fotosentez ya da solunum gibi bitki açısından hayati önem taşıyan olayların gerçekleşmesi için mutlak gerekli olmayan sekonder metabolitler (Bourgaud vd., 2001), bitkilerin çevresel koşullara uyum sağlaması, ekosistemle ilişkilerini düzenlemesi, streslere karşı dayanım kazanılması gibi bitkinin savunma ve korunma mekanizmasında görev almaktadırlar (Mulabagal ve Tsay, 2004). Siyah banotu bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında başta skopolamin ve hiyosiymin olmak üzere bulunan tropan alkaloidlerinin farmakolojik özellikleri bu metabolitlerin yüksek miktarda elde edilmesi gereğini ortaya çıkarmaktadır (Drager, 2002). Fakat bu alkaloidlerin bitki bünyesindeki miktarlarının son derece düşük olması, bunların ekonomik önemlerinin daha çok artmasına neden olmuştur. Karmaşık kimyasal yapıları nedeniyle sentetik olarak elde edilmelerinin zor ve ekonomik anlamda neredeyse imkansız olması, bu bileşiklerin, bitkilerden kısa sürede ve çok miktarda üretilmesi gereğini ortaya çıkarmaktadır. Doğadan bitkilerin toplanarak farklı yöntemlerle bu metabolitlerin elde edildiği geleneksel üretim sisteminde, bitkilerden mikroorganizmalar ya da olumsuz çevre koşulları nedeniyle standart miktar ve kalitede metabolit elde edilememesi, saf ve standardize bitki materyali kıtlığı, mevsime bağlılık, coğrafi kısıtlamalar gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır (Raman vd., 2004). Bitkilerin doğadan toplanması ile yapılan üretim şeklinin bir diğer dezavantajı da özellikle kök kaynaklı metabolitlere sahip bitkilerin zamanla yok olma tehlikesi ile karşı karşıya gelmesidir. Bu nedenle geleneksel yöntemlere alternatif üretim şekillerinin araştırılması sonucunda kontrollü koşullarda standart miktar ve kalitede metabolit veriminin elde edilmesini sağlayan

doku kültürü teknikleri büyük popülarite kazanmaya başlamıştır (Jones vd., 2009). Sekonder metabolitlerin bitki hücre ve doku kültürleri ile elde edilmesi geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında, mevsime bağlı olmaksızın yapılabilmesi, kültür şartlarının istenilen şekilde ayarlanabilir olması, çok küçük doku parçalarının kullanılabilmesi, standart verim ve kalitede ürün alınabilmesi gibi çok yönlü avantajları bulunmaktadır. Ayrıca doğada yetişen bitkilere yapılması mümkün olmayan, ancak metabolit verimini artıran uygulamaların yapılabilmesi de *in vitro* sekonder metabolit üretiminin bir diğer olumlu yönünü oluşturmaktadır. Besin ortamlarında ve kültürel koşullarda yapılan değişiklikler, büyümeyi düzenleyici madde uygulamaları, biyosentez yolundaki öncül ya da ara maddeler ile sinyal molekülleri olarak görev yapan elisitörlerin ortamlara ilave edilmesi bu uygulamalara örnek olarak verilebilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Elisitörler, bitki hücre kültürlerinde, sekonder metabolit sentez yollarını etkileyerek metabolit üretimini artırmak ve aynı zamanda daha yoğun konsantrasyonlarda üretimi daha kısa sürede sağlamak amacıyla kullanılan bitkide çeşitli uyarımlar sağlayan bileşenlerdir (Erkoyuncu vd., 2015). Elisitörler, sinyal transdüksiyon basamaklarını aktif hale getirerek, ikincil bileşiklerin biyosenteziyle ilişkili genleri aktif hale getirmekte ve genlerin ifadesi sonucunda sekonder metabolit sentezi artmaktadır (Zhao vd., 2002). Elisitörler, bitkinin doğal savunma mekanizmasını harekete geçirerek antimikrobiyal özellikteki bazı bileşiklerin ve etki-tepi etkileşimi sonucunda oluşan fitoaleksinlerin birikimini teşvik etmektedirler. Fitoaleksin sentezin başlamasında enzimler görev almakta ve bu enzimlerin harekete geçmesini ise elisitörler sağlamaktadır. Fitoaleksin sentezi ve birikiminin başlamasını sağlayan elisitörler biyotik ve abiyotik olmak üzere 2 grup altında toplanmaktadır. Bitkilerde fitoaleksin sentezine neden olan biyotik elisitörler grubuna; polisakkaritler, proteinler, glikoproteinler, bakteri, mantar, maya ve bitkisel kaynaklı hücre duvarı parçalanma ürünleri; abiyotik elisitörlere ise UV, kuraklık, tuz, ağır metal iyonları, jasmonik asit, MeJA, salisilik asit, hidrojen peroksit gibi olumsuz çevre koşulları ve bazı maddeler örnek olarak verilebilir (Sökmen ve Gürel, 2001; Matkowski, 2008).

Bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolitlerin indüksiyonu için etkili bir elisitör olduğu bilinen MeJA, jasmonik asidin metil esteri olup, kokulu uçucu formda bir bileşiktir. MeJA'nın uçucu niteliği, bitki hücresel tepkilerinde, bitki-otobur

etkileşimlerinde ve bitki-bitki etkileşimlerinde rol alma yeteneğinin keşfine yol açmıştır (Cheong ve Choi, 2003). Ayrıca MeJA, çeşitli gelişimsel süreçlere aracılık edebilen biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma sistemine sahip canlı bir hücrenel düzenleyici olarak da tanımlanmaktadır.

Uçucu yapısı ve biyolojik zarlardan yayılma yeteneği göz önüne alındığında MeJA, antioksidan sistemler de dahil olmak üzere bitki savunma cevaplarını düzenleyen, bitki içi iletişime aracılık edebilen önemli bir bitki hormonu olarak kabul edilmektedir (Reyes Diaz vd., 2016). MeJA, sadece belirli sekonder metabolitlere özgü olmayıp, içinde flavonoidler, guaianolidler, antrakınonlar ve alkaloid sınıfına giren çok geniş yelpazedeki birçok metabolitler üzerinde de etkili olmaktadır (Mirjalili ve Linden, 1996).

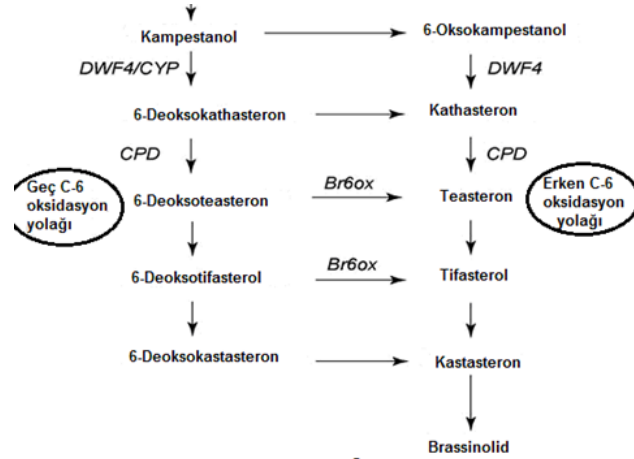
Jasmonatlar, tohum çimlenmesi, kök gelişimi, verimlilik, meyve olgunlaşması ve yaşlanma gibi gelişimsel süreçleri düzenlemelerinin yanı sıra patojen saldırıları, tuzluluk, kuraklık, düşük sıcaklık gibi değişik çevresel streslere karşı bitki savunma mekanizmasında görev almaktadırlar (Creelman vd., 1997). Bitkiler herhangi bir stres faktörüne maruz kaldığında, sinyal molekülü olarak kabul edilen jasmonatlar, sekonder metabolit, savunma proteinleri, hücre duvarı oluşumunu düzenleyen genler gibi farklı genleri etkileyerek (Cheong vd., 2003), bitkinin savunma sistemini harekete geçirirler. Özellikle *in vitro* sekonder metabolit üretiminde dışsal MeJA uygulamaları ile dokularda MeJA miktarı artırılmakta, böylece artan MeJA da bitkinin savunma sisteminin önemli bir parçası olan ve tıp, gıda, ziraat, kozmetik gibi çok farklı alanlarda büyük kullanım olanakları sunan sekonder metabolitlerin üretimini artırmaktadır (Fernandez Marin vd., 2014; Cocetta vd., 2015). Nitekim dışsal MeJA uygulamalarının, farklı bitki türlerinde tropan alkaloidleri (Saenz Carbonell ve Loyola Vargas, 1996), benzofenantridinler (Gundlach vd., 1993), vinka alkaloidleri (Aerts vd., 1996), antrakınon (Özdamar Biçer vd., 2017), fenolik bileşikler (Çetin ve Göktürk Baydar, 2016; Demirci, 2017) gibi çok farklı metabolitin sentezini artırdığı belirlenmiştir.

Son yıllarda sekonder metabolit üretiminde kullanılan bir diğer bitkisel hormon da brassinosteroidlerdir. İlk kez Grove vd. (1979), tarafından kolza (*Brassica rapa*) bitkisinin polenlerinde keşfedilen brassinosteroid (BR)'ler, steroid yapıdaki yeni nesil

bitki hormonu olarak kabul edilmektedir (Bajguz ve Tretyn, 2003; Michelini vd., 2004). Yüksek yapılı 27, ilkel yapılı 3 bitki familyasında bulunan BR'lerin (Bajguz ve Tretyn, 2003), yaklaşık olarak 60 çeşit analogunun bulunduğu; ancak bunlar arasında en yaygın olanların 24-epibrassinolid (24-eBL) ve 28 homobrassinolid (28-hBL) olduğu belirlenmiştir (Vardhini ve Anjum, 2015).

Kolestanın hidroksile edilmiş türevleri olan BR'lerin yapısal çeşitlilikleri, C17 yan zincirine ek olarak A ve B halkası üzerine farklı grupların gelmesinden ileri gelmektedir. BR'ler, yan zincir uzunluğuna göre, C27, C28 ve C29 şeklinde farklı sınıflara ayrılmaktadırlar. Yapısında C27, C28 ve C29 steroidlerini taşıyan BR'ler, birbirine benzer yan zincir yapılarına sahip olup, genel olarak 5  $\alpha$ -kolestan iskeletini taşımaktadır (Sakurai, 1999). C27 BR'leri, C24 pozisyonunda alkil grubu bulundurmayıp kolesterolden üretilmektedir. C28 BR'leri, C24 pozisyonunda bir metilen,  $\alpha$ -metil veya  $\beta$ -C28 BR'leri, C24 pozisyonunda bir metilen,  $\alpha$ -metil veya metil gruplarına sahip olup 24- metilenekolesterol, kampesterol ya da 24-epikampesterolden türemlenebilmektedir. C29 BR'leri, C24'de etil veya  $\alpha$ -etil grubuna sahiptir ve isofukosterol veya sitosterolden türemlenmektedir. Ayrıca, C24'de bir metilen ve C25'de ilave bir metil grubu içeren C29 BR'leri, 25-metil-24-metilenekolesterolden türemlenmektedir (Yokota, 1997). C28 BR'lerin ara bileşikleri, bitkilerde en yaygın bulunan formlardır (Sakurai, 1999). Bitkilerin tüm kısımlarında biyosentezi yapılabilen BR'ler, polen, çiçek tomurcukları, meyveler, tohumlar, vasküler kambium, yapraklar, sürgünler ve kökler gibi farklı bitki kısımlarında bulunmaktadır (Bajguz ve Tretyn, 2003).

BR'ler öncül olarak kampesterol (CR) içeren bitki sterollerini kullanarak sentezlenmektedir (Fujioka ve Yokota, 2003) (Şekil 2.4). Brassinolid, BR'in en etken formu olup sentezi kampesterolden birden fazla yol ile gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmalar, kampesterolden kastasterona erken ve geç C-6 oksidasyon yolağı olmak üzere 2 tane ilişkili paralel yolak olduğunu ortaya koymuştur. Son adımlarda, kastasteron B halkasının laktonlaşmasıyla brassinolide dönüştürülmektedir. BR biyosentezindeki oksidasyon adımlarındaki bileşikler sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri aracılığıyla sentezlenmektedir. C-22, C-23 hidroksilasyon ve C-6 oksidasyon reaksiyonları BR biyosentezinde temel düzenleyici görevindedirler (Divi ve Krishna, 2009).



Şekil 2.4. BR biyosentez aşamaları (Divi ve Krishna, 2009)

Bitkilerde organa özel düzenlemede, BR biyosentez genlerinin ifadesi göz önünde alındığında *BR6ox* ve *DWF4* genlerinin ifadelerinin maksimum seviyede sürgün uçları ile meyvede oluşu, genç ve gelişmekte olan organlarda BR'nin aşırı bir şekilde sentez edildiğini göstermektedir (Bajguz, 2007; Divi ve Krishna, 2009). Bunların yanısıra BR biyosentezinin hücre içi yerleşimi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bitkilerde pek çok steroid tanımlanmasına karşın, sadece BR'lerin bitkiler aleminde geniş bir dağılıma ve dışsal olarak uygulandıkları zaman büyümeyi teşvik edici aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Mandava, 1988). Bitki fizyolojisinde BR'lerin oynadığı önemli roller arasında hücre uzaması ve farklılaşması, polen tüpünün gelişimi, nükleik asit ve protein sentezini aktive etmeleri, bitkilerin antioksidatif savunma sisteminin aktivasyonu ve fotosentezin düzenlenmesi ile membran polarizasyonu yer almaktadır (Sasse, 2003; Yu vd., 2004; Xia vd., 2006; Saini vd., 2015). Bunların yanı sıra BR'ler tohum çimlenmesi, senesens, absisyon ve olgunlaşma gibi gelişimsel olaylarda da görev almaktadırlar (Mandava, 1988; Clause ve Sasse, 1988). Yapılan çalışmalarda BR'lerin dikotlarda epikotillerin, hipokotillerin ve pedinküllerin; monokotlarda ise koleoptillerin ve mezokotillerin uzamasını artırdığı bildirilmiştir (Mandava, 1988; Clouse, 1996).

Bitki gelişimine ek olarak BR'ler biyotik ve abiyotik stres altındaki bitkilerin antioksidatif savunma sistemini aktif hale getirerek, hayatsal faaliyetlerin sürdürülmesinde önemli rol almaktadırlar (Krishna, 2003; Bajguz, 2009; Sharma vd., 2015; Shahzad vd., 2018). Bu işlevi BR'lerin, bitki savunmasında rol oynayan genlerin

ekspresyonunu etkileyerek gerçekleştirdikleri bilinmektedir (Bari ve Jones, 2009). Aynı zamanda BR'lerin biz insanlar için doğal antibiyotik niteliğindeki antioksidan özellik gösteren sekonder metabolitlerin bitkilerdeki sentezini artırıcı yönde etkilerinde olduğu yapılan çalışmalarca tespit edilmiştir. Sınırlı sayıdaki bu çalışmalardan birinde Farooq vd. (2009), kuraklık stresi uygulamış oldukları çeltik bitkisine uygulamış oldukları 24-eBL ve 28-hBL'nin bitkilerde yaprakta su tutma kapasitesi ve CO<sub>2</sub> kullanımı ile antioksidan özellikteki çözünebilir fenolik bileşikler ve antosiyanin içeriğinin de arttığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte kuraklık stresi altındaki çeltik bitkisinde dışsal 24-eBL uygulamasının, antosiyanin miktarını (Frarooq vd., 2010), tuz stresi altındaki nane bitkilerinde ise uçucu yağ ve fenolik bileşik miktarlarını artırdığı (Çoban ve Göktürk Baydar, 2016) rapor edilmiştir.

Ayrıca BR'ler kanser hücreleri üzerinde seçici ve elemine edici özellik göstermelerinden dolayı herhangi bir yan etki riski göstermeksizin, birçok kanser hastalığının tedavisinde başarıyla kullanılabilen böylece tıpta ve eczacılık alanında önemli bir yer almaktadırlar. BR'lerin tarımsal üretimde de etkili bir şekilde kullanıldıkları ve problem olarak görülen pestisitlerin kalıntılarını azaltıcı ya da yok edici özellik taşıdıkları bilinmektedir (Khripach vd., 2000). Böylece üretimde verim ve kalitenin azalması sonucu ciddi sorunlara neden olan hastalık ve zararlılara karşı kimi zaman kaçınılmaz olan pestisit uygulamasının en büyük problemi olan kalıntı sorunu da bu şekilde hafifletilmiş olmaktadır. Özetleyecek olursak BR'ler toksik özellik göstermeyen pestisit kalıntılarını azaltan çevre dostu gelecek için umut vaadedilen bileşiklerdir.

## **2.5. Tropan Alkaloidlerince Zengin Bitki Türlerinde Sekonder Metabolit Verimini Artırmak Amacıyla Yapılan Çalışmalar**

Tropan alkaloidlerinin sentezini artırmak amacıyla *in vitro* koşullarda ve farklı bitkilerde yapılmış olan dışsal uygulamalara ilişkin araştırmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Siyah banotunda ise tropan alkaloidlerinin miktarını artırmaya yönelik uygulamaların yapıldığı *in vitro* çalışmaların son derece kısıtlı olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan birinde Hashimoto ve Yamada (1987b) *in vitro* koşullarda tropan



alkaloid oluşumunu artırmak amacıyla, siyah banotu süspansiyon kültürlerini kullanmışlardır. Araştırmada White besin ortamının hücre büyümesini inhibe ederken, hiyosiyamin içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçların White ortamındaki düşük konsantrasyonlardaki azot ve fosfattan kaynaklandığı belirtilmiştir. Fosfat konsantrasyonu 0.2 mM'ye azaltılan ve oksin kullanılmayan modifiye LS ortamında %0.05 oranında hiyosimamin elde edilmiştir. Öncül maddelerin alkaloid oluşumu üzerindeki etkilerinin de incelendiği araştırmada, N-metilputresin, tropin, fenilalanin ve tropik asit kullanılmıştır. Ancak bu öncüllerin teşvik edici etkisinin kullanılan öncül maddeye, konsantrasyona ve uygulamanın yapıldığı döneme göre önemli ölçüde değiştiği tespit edilmiştir. Araştırmada büyüme düzenleyicilerden naftalin asetik asit (NAA)'in ise hücre büyümesini desteklerken, hiyosiyamin oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir.

*Datura stramonium* bitkisine ait hücre süspansiyon kültürlerinde tropan alkaloidlerinin üretimi araştırılmıştır (Ballica vd., 1993). Bu amaçla elisitör ve çeşitli öncül maddeleri kullanılmıştır. Biyotik bir uyarıcı olan *Phytophthora megasperma* uygulaması sonucunda tropan alkaloid miktarının kontrol bitkilerine kıyasla 5 kat arttığı tespit edilmiştir. Diğer yandan fenilalanin ve ornitinin kültür ortamına ilavesinin kontrole göre alkaloid miktarını 5 kat, tropik asit miktarlarını ise 7 kat arttırdığı sonucuna varılmıştır.

*Hyoscyamus muticus*'un transforme edilmiş kök kültürleri büyüme düzenleyici içermeyen ortamlarda yetiştirildiğinde, genellikle yüksek miktarlarda hiyosiyamin ürettiğinin belirlendiği araştırmada (Vanhala vd., 1998), ortamlara ilave edilen büyüme düzenleyicilerinin büyüme, kök fenotipi ve tropan alkaloid birikimi üzerine etkileri de incelenmiştir. Saçak kök kültürlerinin, 0.01 ile 5 µmol/l konsantrasyon aralığında dışsal oksin uygulamalarını tolere ettiğinin belirlendiği araştırmada, kök büyümesinin indol asetik asit (IAA) ve naftalen asetik asit (NAA)'den önemli ölçüde etkilenmediği; ancak alkaloid birikimini, oksin içermeyen ortamlardaki köklere kıyasla iki katına çıkarttığı tespit edilmiştir. Optimum IAA konsantrasyonlarında (0.1-1.0 µmol/l) maksimum hiyosiyamin miktarı 117 mg/l ve skopolamin içeriği de 0.2 mg/l olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlardan köklerde içsel oksin içeriğinin maksimum tropan alkaloid birikimi için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır. Sitokinin uygulamalarının ise kök fenotipi ve büyüme hızı ile alkaloid birikimini etkilemediği;

absisik asit (ABA) ve gibberellik asit (GA<sub>3</sub>) uygulamalarının hiyosiyamin birikimini şiddetle inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ancak bu durumun ABA ve GA<sub>3</sub> uygulamaları ile ortaya çıkan kök morfolojisindeki değişikliklerle ilişkili olmadığı belirtilmiştir.

Zebatekis vd. (1999), *Datura stramonium* bitkisine ait kök kültürlerinde tropan alkaloidlerinin birikimi üzerine MeJA, maya ekstraktı elisitörleri ile oligogalakturonidlerin etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda 0.1 µM MeJA uygulamasının, kontrol grubu köklerinde 12.16 µmol/g olarak tespit edilen hiyosiyamin miktarını 22.14 µmol/g'a, 2.45 µmol/g olan skopolamin miktarını 6.14 µmol/g'a, 1.19 µmol/g olan littorin miktarını ise 3.70 µmol/g'a çıkartarak alkaloidlerin birikimi üzerine en etkili uygulama olduğu belirlenmiştir.

*Datura inoxia* bitkisine ait saçak kök kültürlerinde hiyosiyamin alkaloidinin birikimi üzerine L-ornitin, L-arjinin, L-fenilalanin, DL-β-fenilasetik asit ve tropinon öncül maddeleri ile tween 20 uygulamalarının etkilerini inceleyen Boitel Conti vd. (2000), B5 temel besin ortamını kullanmışlardır. Araştırmada Tween 20 kullanılmadığında 0.5 mM konsantrasyonunda besin ortamına eklenen öncül maddelerin hiyosiyamin üretimini uyarmada etkisiz olduğu belirlenmiştir. Ancak ortama Tween 20 ile birlikte ilave edilen L-fenilalaninin alkaloid birikimini hem köklerde hem de ortamda artırdığı tespit edilmiştir.

*Brugmansia candida* bitkisine ait saçak kök kültürlerinde alkaloid üretimini artırmak amacıyla çeşitli biyotik ve abiyotik elisitörlerin etkisini inceleyen Pitta Alvarez vd. (2000), salisilik asit (SA), gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>), maya ekstraktı, kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>), kadmiyum klorür (CdCl<sub>2</sub>) uygulamalarında bulunmuşlardır. Bu uygulamalardan SA'nın skopolamin ve hiyosiyamin birikimini sırasıyla 2 ile 12 kat arasında artırdığının belirlendiği araştırmada, AgNO<sub>3</sub>'ün skopolamin miktarını 5, hiyosiyamin miktarını ise 8 kat artırdığı tespit edilmiştir. AgNO<sub>3</sub> ve SA'nın etilen üzerindeki inhibe edici etkilerinin bu tepkilerden kısmen sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Maya ekstraktı, her iki alkaloidin hücre içi içeriğini yaklaşık 3 kat, özellikle de skopolamin üretimini 7 kat arttırmıştır. CaCl<sub>2</sub>, alkaloid birikimi üzerinde çok az etkiye neden olurken, CdCl<sub>2</sub> ise skopolamin ve hiyosiyamin üretimini sırasıyla 3 ve 24 kat artırdığı ancak büyümeyi önemli ölçüde engellediği saptanmıştır. Araştırma sonucunda *Brugmansia candida* saçak köklerinin, alkaloid üretiminin

artırılması bakımından biyotik ve abiyotik elisitörlere karşı hassas olduğu tespit edilmiştir.

Yine *Brugmansia candida* bitkisine ait saçak kök kültürlerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, tropan alkaloidlerinin birikimi ve salınımı üzerine 2.5 ve 25 µg/ml jasmonik asit ile 25 ve 250 mM konsantrasyonlarındaki alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) elisitör olarak kullanılmıştır. Araştırmada 19 günlük saçak kök kültürlerine önce 24 ve 48 saat boyunca jasmonik asit uygulaması yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 24 saat boyunca 25 µg/ml jasmonik asit uygulamasının hiyosiyamin salınımını yaklaşık olarak %1200 arttırdığı; diğer yandan 48 saat boyunca 2.5 µg/ml konsantrasyonunda uygulanan jasmonik asitin ise skopolamin birikiminde %30'luk bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir. Diğer bir elisitör olan AlCl<sub>3</sub>'ün 25 mM ve 250 mM konsantrasyonlarında yapılan uygulamalarında ise *Brugmansia candida* bitki köklerindeki hiyosiyamin ve skopolamin birikimi sırasıyla % 43 ve % 83 oranında artarken; 48 saat boyunca 250 mM konsantrasyonunda uygulanan AlCl<sub>3</sub> uygulamasının ise ortamdaki skopolamin üretimini yaklaşık olarak %150 arttırdığı gözlemlenmiştir (Spollansky vd., 2000).

*Agrobacterium rhizogenes* aracılığı ile kök oluşumu uyarılan *Atropa belladonna* bitkisinde SA uygulamasının tropan alkaloidlerinin miktarı üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada (Lee vd., 2001), temel besin ortamı olarak ½ MS besin ortamı kullanılmıştır. 18 günlük kök kültürlerinin bulunduğu ortama 0.2 mM ve 2 mM konsantrasyonlarında ilave edilen SA uygulaması sonrasında kültürler 1., 3. ve 7. günlerinde hasat edilmişlerdir. 0.2 mM SA uygulamasının köklerdeki toplam tropan alkaloidlerinin içeriğinde kontrol grubundaki köklere kıyasla herhangi bir değişime neden olmadığı saptanmıştır. Diğer yandan 2 mM SA uygulaması sonucunda 1., 3. ve 7. günlerinde yapılan analiz sonucunda, köklerdeki alkaloid içeriğinin SA uygulanmamış kontrol köklerine kıyasla sırasıyla %35, %80 ve %90 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

*Solanaceae* familyasına ait diğer bir bitki olan *Scopolia parviflora*'nın adventif kök kültürlerinde biyotik uyarıcıların hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerinin oluşumu üzerine etkilerini araştıran Jung vd. (2003) bitkiyi 2 tane gram pozitif ve 1 tane gram negatif bakteri suşu ile 3 gün boyunca kültüre almışlardır. Elisitasyon uygulamalarının

12., 24. ve 48. saatlerinde alkaloid analizlerinin yapıldığı çalışmada, 12 saat boyunca gram pozitif suşların uygulanması ile maksimum skopolamin üretiminin gerçekleştiği özellikle *S. aureus* ile muamelenin aynı zaman periyodundaki kontrol köklerine kıyasla skopolamin üretiminde 2.8 kat artışa yol açtığı belirlenmiştir. Diğer incelenen bir alkaloid olan hiyosiyaminin ise *S. aureus* ve *P. aeruginosa* biyotik uyarıcılarının etkisiyle kontrol köklerindeki miktarına kıyasla azaldığı ve uygulamadan 48 saat sonra ise hiç tespit edilemediği saptanmıştır.

Hank vd. (2003), yapmış oldukları çalışmada %3 sükröz içeren ½ MS ortamı üzerinde yetiştirdikleri *Atropa belladonna in vitro* kültürlerini *Agrobacterium rhizogenes* R1601 hattı ile enfekte ederek 2 ay içerisinde oluşturulan saçak kökleri B5 besin ortamında alt kültüre almışlardır. Saçak köklerin büyümesi ve köklerde bulunan tropan alkaloidlerinin birikimi üzerine magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>)'ın etkilerinin incelendiği araştırmada, 0, 125, 250, 500, 1000 mg/l konsantrasyonlarda MgSO<sub>4</sub> uygulaması yapılmıştır. Yapılan uygulamalar sonucunda köklerdeki en fazla hiyosiyamin içeriği, 125 mg/L MgSO<sub>4</sub> içeren ortamda %0.8-0.9 iken maksimum skopolamin içeriği ise 1000 mg/l ve 125 mg/l MgSO<sub>4</sub> uygulamasında tespit edilerek sırasıyla %0.016-0.018 olarak belirlenmiştir. Diğer yandan en yüksek saçak kök oluşumu K9 klonunda 500 mg/l MgSO<sub>4</sub> ilave edilmiş ortamda (yaş ağırlık: 4.18 g, kuru ağırlık: 0.23 g) ve K8 klonunda da 125 mg/l MgSO<sub>4</sub> ilave edilmiş ortamda (yaş ağırlık: 13.63 g, kuru ağırlık: 0.73 g) elde edilmiştir.

*Scopolia parviflora* bitkisine ait adventif köklerde hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerinin üretimini artırmak amacıyla SA ve MeJA'nın etkilerini araştıran Kang vd. (2004), B5 besin ortamında kültüre aldığı adventif köklere 0.01, 0.1, 1.0 ve 2.0 mM konsantrasyonlarında MeJA ve SA uygulamaları yaparak; 0.5., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde hasat etmişlerdir. HPLC ile yapılan analizler sonucunda 1.0 mM MeJA uygulamasının en yüksek skopolamin (703.4 µM) ve hiyosiyamin (1690.2 µM) birikimini sağladığını tespit etmişlerdir. 72 saatlik 2.0 mM MeJA uygulaması ile kültür ortamına salınan hiyosiyamin içeriğinin kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında %700'e ulaştığı belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan diğer bir elisitör olan SA'in 1.0 mM konsantrasyonunda 24 saat boyunca uygulanmasının köklerdeki skopolamin içeriğini maksimum değerlere ulaştırdığı, ardından hızla düşürdüğü belirlenirken 0.01 mM SA'in ise skopolamin üretimini kontrol bitkilerine kıyasla %40 oranında arttırdığı

tespit edilmiştir. Ayrıca 12 saatlik SA uygulamasında skopolaminin kültür ortamına salınımının başladığı ve 48 saat sonunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat arttırdığı görülmüştür. Sonuç olarak MeJA ve SA'in putresin N-metiltransferaz (PMT) ve hiyosiyamin 6 $\beta$ -hidroksilaz (H6H) anahtar enzimlerinin sentezini doğrudan veya dolaylı olarak düzenlediği ve buna bağlı tropan alkaloidlerinin üretimi ile kültür ortamına salınımını uyardığı sonucuna varılmıştır.

Zayed ve Wink (2004), yapmış oldukları çalışmada *Agrobacterium rhizogenes* transferi yapmış oldukları *Solanaceae* familyasına ait *Brugmansia suaveolens* bitki köklerindeki alkaloid miktarını arttırmak amacıyla 10, 50, 100 ve 200  $\mu$ M konsantrasyonlarında MeJA, kuersetin ve SA uygulaması yapmışlardır. Tropan alkaloidlerinin miktar ve profilinin GLC-MS ile analiz edildiği araştırmada 18 farklı alkaloid rastlanmıştır. Araştırmacılar kültürlerin 200  $\mu$ M MeJA ile muamelesi durumunda alkaloid birikiminin stres uygulaması yapılmamış kontrol grubu bitkilerine göre 25 kat artarak 1 mg/g ağırlığa ulaştığını, kuersetin uygulamaları ile alkaloid üretiminin 24 saat içinde 10 kat artarak taze ağırlık cinsinden 0.4 mg/g'a yükselttiği belirlenmiştir. Alkaloidlerin verimi üzerine olumsuz etki gösteren 100  $\mu$ M SA uygulamasının ise alkaloidlerin taze ağırlığını 1  $\mu$ g/g'a düşürdüğü tespit edilmiştir.

*Datura metel* L. bitkisinde farklı elisitörlerin tropan alkaloidlerinin birikimi üzerine etkilerini araştıran Ajungla vd. (2009), 1.2  $\mu$ M IAA ilave edilmiş B5 besin ortamını kullanarak yaprak eksplantlarından kök kültürleri oluşturmuşlardır. 6 hafta boyunca kültürlerle biyotik elisitör olarak *Aspergillus niger*, *Alternetia sp.*, *Fusarium monoliferme* ile maya ekstraktı ve abiyotik elisitör olarak da SA, AlCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, sodyum klorür (NaCl), sodyum sülfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) uygulaması yapmışlardır. Araştırma sonucunda kontrol bitkilerindeki 1.39 mg/g hiyosiyamin ve 0.069 mg/g skopolamin miktarlarının, 500  $\mu$ M SA uygulaması ile sırasıyla 4.35 mg/g ve 0.28 mg/g ile en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Biyotik uyarıcılar arasında ise en yüksek alkaloid miktarı 0.75 g/l maya ekstraktı uygulaması ile elde edildiği ve bu uygulama ile hiyosiyaminin miktarının 3.17 mg/g, skopolaminin miktarının ise 0.16 mg/g olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir.

*Hyoscyamus muticus* bitkisine ait kallus kültürlerinde hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerinin birikimini artırmak amacıyla farklı karbon kaynakları olarak glikoz (10, 100, 200 mM) ile sakkaroz (43, 86, 172 mM), öncül madde olarak tropik asit (0.25, 0.5 mM) ve elisitör olarak da maya ekstraktı (0.5, 1, 2 g/l) kullanılmıştır. Araştırma sonucunda en yüksek alkaloid içeriğinin 43 mM sakkaroz, 0.5 mM tropik asit ve 2 g/l maya ekstraktından elde edildiği tespit edilmiştir (İbrahim vd., 2009).

Pavlov vd. (2009), diploid ve tetraploid *Datura stramonium* L. saçak kök kültürlerinde nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), potasyum fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ve sakkarozun hiyosiyamin biyosentezi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 31 ve 47 mM arasında, sakkaroz 20 ile 40 g/l arasında diploid bitkiler için uygulanırken, 31 ve 47 mM arasında NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0.50 ve 1.25 mM arasında KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 50-70 g/l sakkaroz tetraploid bitkilerin saçak kök kültürlerinde uygulanmıştır. En yüksek hiyosiyamin içeriği diploid bitkilerin saçak köklerinde 1.10 g/l KNO<sub>3</sub>, 0.17 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 40 g/l sakkaroz içeren ortamlardan elde edilirken, tetraploid bitkilerin saçak kök kültürlerinde ise 1.10 g/l KNO<sub>3</sub>, 0.17 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 50 g/l sakkaroz içeren ortamlarda tespit edilmiştir.

*Brugmansia candida* saçak köklerinde skopolamin ve anizodamin miktarını artırmak için 1.5 l hacmindeki biyoreaktörleri kullanan Cardillo vd. (2010), biyoreaktörlerde kültüre alınan kök kültürlerinin erlenmeyerler içinde yapılan kültürlere kıyasla biyokütle ve alkaloid birikiminin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmada ayrıca anizodaminin baskın alkaloid olduğu ve biyoreaktör sisteminde anizodamin miktarının 10.05 mg/g'ye ulaştığı tespit edilmiştir.

*Datura metel* L. bitkisine ait hücre süspansiyon kültürlerinde çeşitli uyarıcıların hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerinin birikimi üzerine etkileri Zimare ve Malpathak (2011) tarafından araştırılmıştır. Araştırmacılar bu amaçla SA'yı 0.1, 0.25 ve 0.5 mM, maya ekstraktını 100, 200 ve 400 mg/l konsantrasyonlarında 24, 36 ve 48 saat boyunca uygulamışlardır. Yapılan analizler sonucunda en yüksek hiyosiyamin ve skopolamin içeriğinin 0.25 mM SA ile 36 saat boyunca muamele edilen kültürlerde görüldüğü belirlenmiş ve bu değerler sırasıyla 0.254 mg/g ve 8.588 mg/g olarak bulunmuştur. Maya ekstraktının 36 saat süreyle 200 mg/l oranında uygulamasının alkaloidlerin miktarı üzerine SA'ya benzer bir etki gösterdiği, bu uygulamada

hiyosiyamin ve skopolamin miktarlarının sırasıyla 0.224 mg/g ve 8.490 mg/g olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir.

*Hyoscyamus muticus* türünde yapılan bir diğer çalışmada, kültür ortamı ve farklı sakkaroz konsantrasyonlarının saçak kök oluşumu ve tropan alkaloidlerinin birikimi üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmada besin ortamı olarak aynı büyüme düzenleyicilerini içeren MS ile B5 besin ortamlarına 20, 30, 40, 50 ve 60 g/l olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda sakkaroz ilavesi yapılmıştır. Diploid bitkiler için en yüksek saçak kök oluşumu 30 g/l sakkaroz ilave edilmiş B5 ortamında 19.40 g/l ve MS ortamında 17.32 g/l olarak bulunurken; tetraploid klonda ise en yüksek saçak kök oluşumu 40 g/l sakkaroz ilave edilmiş B5 besin ortamında 18.77 g/l ve 50 g/l sakkaroz ilave edilmiş MS besin ortamında 17.26 g/l olarak ölçülmüştür. Alkaloid miktarlarına bakıldığında ise maksimum alkaloid veriminin, 60 g/l sakkaroz ilave edilmiş MS besin ortamında ve 40 g/l sakkaroz ilave edilmiş B5 ortamında ve tetraploid klonlarda belirlenmiş olup, skopolamin 13.87 mg/l ve hiyosiyamin 107.7 mg/l olarak tespit edilmiştir (Deghan vd., 2012).

Siyah banotu bitkisinde farklı elisitörlerin hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerinin miktarlarına olan etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada (Aljibouri vd., 2012), eksplant olarak yapraklardan elde edilen kalluslar kullanılmıştır. Sakkaroz, sodyum klorür, prolin ve BA uygulamalarının yapıldığı çalışmada, tropan alkaloidlerinin miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Araştırma sonucunda kontrol grubu kalluslarda 81.25 ppm olan hiyosiyamin miktarının, 50 ve 100 mg/l prolin uygulaması ile sırasıyla 128.40 ppm ve 90.42 ppm ile maksimum değerlere ulaştığı tespit edilmiştir. Diğer yandan kontrol bitkilerinde 56.93 ppm olan skopolamin miktarının, 50 g/l sakkaroz uygulamasında 130.39 ppm'e 200 mg/l NaCl uygulaması ile 151.97 ppm'e, 50 mg/l prolin uygulaması ile 174.00 ppm'e ve 100 mg/l prolin uygulaması ile de 141.84 ppm'e ulaştığı belirlenmiştir.

Hong vd. (2012), siyah banotu bitkisine ait kök kültürlerinde tropan alkaloidleri olan skopolamin ve hiyosiyamin üretimi üzerine kazein hidrolizat, maya ekstratı, d-sorbitol ve kitosan uygulamalarının etkilerini incelemişlerdir. 3 haftalık kök kültürlerinden elde edilen kök parçalarına kazein hidrolizatı 5.0 g/l olacak şekilde uygulanmış ve kontrol grubu bitkilerindeki 16.36 mg/g olan hiyosiyamin miktarı, 11.07 mg/g ve

35.06 mg/g olan skopolamin miktarını ise 25.08 mg/g olarak değiştirmiştir. Diğer bir elisitör olan d-sorbitolün 5.0 g/l uygulaması ise kontrol grubundaki 16.42 mg/g olan hiyosiyamin miktarını 20.04 mg/g 'a ve 16.38 mg/g olan skopolamin miktarını ise 22.75 mg/g'a çıkardığı belirlenmiştir. Kitosanın alkaloid üretimini baskıladığı, 0.5 g/l konsantrasyonunda uygulanan maya ekstratının ise kontrol grubundaki 10.36 mg/g olan hiyosiyamin miktarını 13.26 mg/g' a ve 18.98 mg/g olan skopolamin miktarını 30.40 mg/g'a yükselttiği saptanmıştır.

Siyah banotu bitkisi kök kültürlerinde tropan alkaloidlerinin üretimi ve riboflavin atılımı üzerine kalsiyum, magnezyum ve demir iyonlarının etkilerini araştıran Pudersell vd. (2012), bitkiyi MS besin ortamında kültüre almışlardır. Yapılan analizler sonucunda artan magnezyum ve kalsiyum iyon konsantrasyonlarının kültür ortamında skopolamin üretimini arttırdığı belirlenirken, buna karşın magnezyumun hiyosiyamin üretkenliği üzerinde negatif bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Yine siyah banotunda yapılan bir diğer çalışmada materyal olarak *in vitro* bitkicikler kullanılmış olup; bu bitkiciklere, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens* bakteri suşları inoküle edilmiştir. Bu bitkiciklere aynı zamanda %30, %60 ve %90 olacak şekilde 3 farklı dozda su stresi uygulayarak, bitkiciklerde antioksidant enzim aktivitesi ve metabolit birikimlerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens* suşları ile inokülasyonun su stresinin büyüme üzerine meydana getirdiği olumsuz etkileri azalttığı belirlenirken; kök ve yaprakta ölçülen süperoksit dismütaz ve peroksidaz aktivitelerinin 3 farklı su stresi altına her iki bakteri suşu uygulanan bitkilerde arttığı belirlenmiştir. Alkaloidlerin miktarının da incelenmiş olduğu çalışmada, toplam hiyosiyamin ve skopolamin miktarının en fazla %30'luk su stresi uygulanmış ve *Pseudomonas putida* suşu ile muamele edilmiş bitkiciklerden elde edildiği ve kontrol grubunda 16.960 mg olan toplam alkaloid miktarının bu koşullarda 25.711 mg'a çıktığı tespit edilmiştir (Ghorbanpour vd., 2013a).

Besin ortamına ilave edilen büyüme düzenleyici maddelerin siyah banotu bitkisinde hiyosiyamin ve skopolamin birikimi üzerine etkilerinin incelendiği bir araştırmada (Ghorbanpour vd., 2013b), sürgün ucu kültürlerine 0.5, 1 ve 2 mg/l konsantrasyonlarında oksin (IAA, 2,4 diklorofenoksi asetik asit IBA, NAA) ve



sitokinin (kinetin, BA) uygulamaları yapılmıştır. Alkaloid analizinin GS-MS yöntemiyle yapılmış olduğu araştırmada, 0.5 mg/l NAA ve 1 mg/l BA konsantrasyonlarının köklerde en yüksek hiyosiyamin (%0.2 KA) ve skopolamin (% 0.76 KA) miktarının elde edilmesini sağlayan uygulamalar olduğu belirlenirken; sürgünlerde ise 1 mg/l BA ve 0.5 mg/l IBA konsantrasyonlarında en yüksek hiyosiyamin (%0.394 KA) ve skopolamin (% 0.234 KA) miktarının elde edildiğini tespit edilmiştir. Ayrıca maksimum toplam alkaloid veriminin de 0.5 mg/l NAA ile 1 mg/l BA içeren besin ortamında 0.269 mg/l ile elde edildiği saptanmıştır.

Jaremicz vd. (2014), siyah banotu saçak kök kültürlerini kabarcıklı sütun biyoreaktörü ve hibrid (kabarcık sütun/sprey) biyoreaktörü olmak üzere 2 farklı biyoreaktör sisteminde kültüre alarak alkaloid üretimi açısından değerlendirmişlerdir. Hibrit biyoreaktörde 0.67 mg/g ile en yüksek anizodamin miktarı elde edilirken, en yüksek skopolamin (5.3 mg/g), hiyosiyamin (1.6 mg/g kuru ağırlık) ve kuskohidrin (26.5 mg/g) kabarcıklı sütun biyoreaktöründen elde edilmiştir. Her iki biyoreaktör sisteminde de benzer skopolamin (1 ve 0.98 mg/gün) ve kuskohidrin (5 ve 5.4 mg/gün) miktarları elde edilirken, anizodamin birikiminin hibrid biyoreaktörde 3.5 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elisitör olarak kullanılan MeJA hibrit biyoreaktörde kültüre alınan köklerde skopolamin üretimini %146 arttırırken; dimetil sülfoksit ise skopolamin miktarını 4, hiyosiyamin miktarını 5, anizodamin miktarını 25 ve kuskohidrin miktarını 28 kat arttırdığı saptanmıştır.

Khater ve Elasthokhy (2015), yapmış oldukları çalışmada *Hyoscyamus aureus* bitkisinde farklı büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumu ve alkaloid birikimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlardan alınan yaprak eksplantlarını içinde farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, NAA ve IAA içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda maksimum kallus ağırlığı 2 mg/l NAA ilave edilmiş MS besin ortamında 1.817 g olarak belirlenirken 1 mg/l 2,4-D içeren besin ortamında ise 1.141 g olarak bulunmuştur. Kalluslardaki alkaloid miktarlarına bakıldığında ise artan 2,4-D konsantrasyonlarında alkaloid miktarının azaldığı; NAA ve IAA'ın artan konsantrasyonlarında artış gösterdiği tespit edilmiştir.

*Agrobacterium rhizogenes* tarafından saçak kök oluşumu uyarılan *Datura metel* bitkisinde atropin miktarının artırılması amacıyla 18 günlük kültürlere biyotik (*Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*) ve abiyotik ( $AgNO_3$  ve nanosilver) elisitör uygulaması yapılmıştır. Araştırma sonucunda 12., 24. ve 48. saatlerinde kontrol bitkilerinde sırasıyla elde edilen atropin miktarları %0.116, %0.119 ve %0.107 olarak bulunurken,  $AgNO_3$  uygulamasıyla bu değerlerin %0.032, %0.042 ve %0.053'e düşüğü tespit edilmiştir. Bununla birlikte, nanosilver ile indüklenen atropin içeriği 12, 24 ve 48 saatlik uygulama sonrası kontrol grubuna kıyasla 1.147, 1.117 ve 2.42 kat artmıştır. Biyotik elisitörlerden *B. cereus* uygulanan saçak köklerdeki atropin seviyesi, kontrol grubuna göre uygulamadan 24 ve 48 saat sonra sırasıyla %0.017 ve %0.037 oranında azalma göstermiştir. Son olarak ise *S. aureus* ile uygulamanın 12., 24. ve 48. saatleri sonunda atropin seviyesinin sırasıyla %0.095, %0.038 ve %0.056 değerleri ile önemli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir (Shakeran vd., 2015).

*Datura stramonium* bitkisinde SA ve asetil salisilik asit (ASA) elisitörlerinin bitkideki hiyosiyamin alkaloidinin miktarı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, MS besin ortamında yetiştirilen 20 günlük bitkilere  $10^{-4}$  M SA ve ASA uygulanmıştır. Yapılan uygulamalar sonucunda diploid kontrol bitkilerindeki 4.406 mg/g hiyosiyamin miktarının, SA uygulaması ile 7.697 mg/g'a, ASA uygulaması ile de 6.330 mg/g'a yükseldiği saptanmıştır. Tetraploid bitkilerde ise herhangi bir elisitör uygulaması yapılmadığında 9.075 mg/g olarak tespit edilen hiyosiyaminin, SA uygulaması ile 12.315 mg/g'a, ASA uygulaması ile 11.309 mg/g'a ulaştığı tespit edilmiştir (Belabbasi vd., 2016).

*Hyoscyamus muticus* bitkisine ait kallus kültürlerinde kallus oluşumu ve hiyosiyamin alkaloidinin birikimi üzerine biyotik elisitör, öncül madde ve nanomateryal bir bileşik olan lithovitin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yapraklardan elde edilen kalluslara 4 hafta boyunca 0.25, 0.5, 0.75 ve 1 g/l maya ekstraktı, 0.2, 0.5, 0.75 ve 1 g/l lithovit ile 10, 50, 100 ve 200 g/l fenilalenin uygulaması yapılmıştır. Ortama ilave edilen 200 mg/l fenilalenin öncülü kontrol kalluslarında 1.60 mg/g olarak ölçülen hiyosiyamin içeriğini 3.01 mg/g'a çıkartarak en yüksek alkaloid içeriğinin elde edildiği uygulama olarak saptanmıştır. Diğer yandan en yüksek kallus taze ağırlığı 0.75 g/l maya ekstraktı, en yüksek kallus kuru ağırlığının da 0.25 g/l lithovit uygulamalarından elde edildiği tespit edilmiştir (Bosila vd., 2016).

*Hyoscyamus recilatus* bitkisinin *Agrobacterium rhizogenes* ile uyarılan saçak köklerinde kolkisin ve UV-B uygulamalarının alkaloid miktarına olan etkilerini inceleyen Zeynali vd. (2016), %0, 0.1, 0.3 ve 0.5 ağırlık/hacim kolkisin ile 0, 3, 6 ve 9 dakika boyunca da UV-B uygulamasına tabi tutmuşlardır. Kontrol köklerindeki % 0.18 olan hiyosiyamin içeriği, kolkisin uygulamaları sonucunda maksimum değere ulaşarak %0.58 olarak tespit edilmiştir. Bitkinin bir diğer önemli alkaloidi olan skopolamin ise kontrol köklerinde %0.37 iken UV-B uygulaması sonucunda %0.68'e çıkarak maksimum değere ulaşmıştır.

Yine *Hyoscyamus recilatus*'ta yapılan bir diğer çalışmada, *Agrobacterium rhizogenes* ile uyarılan saçak köklere alkaloid birikimini artırmak amacıyla demir oksit partikülleri uygulanmıştır. Bu amaçla 0, 450, 900, 1800 ve 3600 mg/l demir oksit partiküllerini uygulayarak 3 farklı zaman aralığında (24, 48 ve 72. saatler) alkaloid miktarlarını incelemişlerdir. Sonuç olarak maksimum hiyosiyamin üretimi 24 saat boyunca 900 mg/l demir oksit partiküllerine maruz bırakılan bitkilerde gözlenirken; kontrol kültürlerinde %8.69 olan hiyosiyamin içeriği bu uygulama sonucunda % 43.8'e çıkarak yaklaşık 5 kat arttığı tespit edilmiştir. Diğer bir alkaloid olan skopolaminin kültürlerdeki maksimum birikimi ise 48 saat boyunca 450 mg/l ile demir oksit partikülleri uygulamasında oluşmuş ve %20.3'lük bir artış gösterdiği saptanmıştır (Moharrami vd., 2017).

Yapılan ayrıntılı literatür taramaları sonucunda *Hyoscyamus* cinsine giren hiçbir türde sekonder metabolit üretimi üzerine BR uygulamalarının etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunamamıştır. Sunulan bu tezde bir BR analogu olan 24-eBL'nin hem tek olarak hem de siyah banotunda tropan biyosentezini artırdığı belirlenen MeJA (Zhang vd., 2007; Jaremicz vd., 2014) ile yapmış olduğu ikili kombinasyonlarının tropan alkaloidleri ile fenolik madde birikimi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

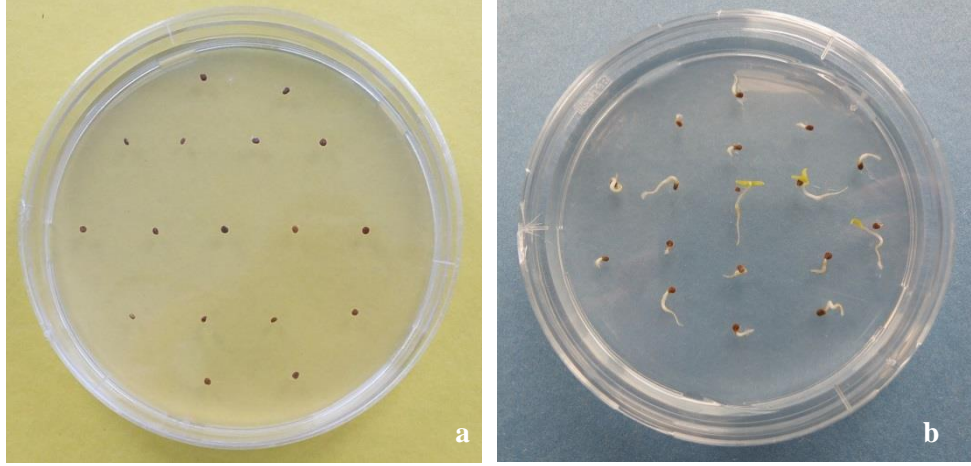
Bu tez çalışmasında bitkisel materyal olarak İstanbul Zeytinburnu Belediyesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bahçesi Müdürlüğü'nden temin edilen siyah banotu (*Hyoscyamus niger*)'na ait *in vitro* koşullarda yaprak saplarından elde edilen adventif kökler kullanılmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve besin ortamlarına aktarılması

Siyah banotu tohumlarının çimlenme oranlarının düşük olması nedeniyle, dormansiyi kırmak ve çimlenme oranını artırmak için tohumlar besin ortamlarına aktarılmadan önce 48 saat süreyle 250 mg/l GA<sub>3</sub> çözeltisinde bekletilmişlerdir (Ghorbanpour vd., 2013a). Sterilizasyon işlemi Aljibouri vd. (2012)'nin kullandıkları yönteme göre yapılmıştır. Buna göre GA<sub>3</sub> çözeltisinden alınan tohumlar, steril saf su ile 4 kez durulandıktan sonra 10 saniye süreyle %70'lik etanol içinde bekletilmişlerdir. Daha sonra içerisinde birkaç damla Tween-20 bulunan %0.1 civa klorür (HgCl<sub>2</sub>) çözeltisi ile 10 dakika boyunca sterilize edilmiş ve sonrasında her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su ile yıkanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Tohumlar sterilizasyondan sonra 30 g/l sakkaroz ve 6 g/l agar içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında, 25°C sıcaklık ve karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır (Aljibouri vd., 2012) (Şekil 3.1a). Besin ortamına aktarılmalarından 15 gün sonra çimlenen bitkicikler (Şekil 3.1b), sıcaklığı 25°C, ışıklanma periyodu 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olarak ayarlanmış koşullara taşınarak 15 gün süreyle kültüre alınmışlardır.



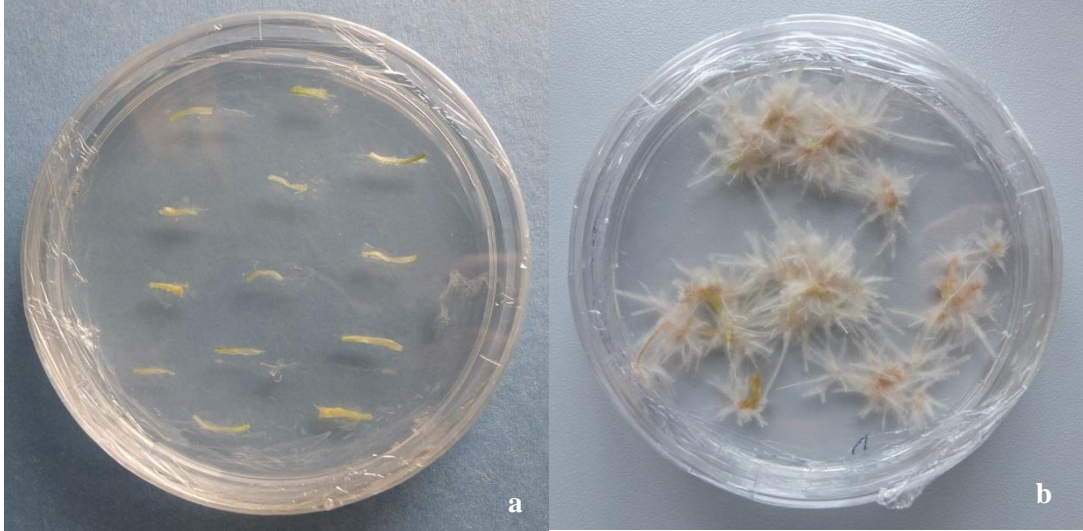
Şekil 3.1. Besin ortamlarına ekilmiş tohumlar (a) ile ekimden 15 gün sonra çimlenmiş bitkicikler (b)

### 3.2.2 Kök oluşumunun sağlanması

Kök oluşturmak amacıyla dört haftalık *in vitro* bitkilerden (Şekil 3.2) alınan 0.5-1 cm uzunluğundaki yaprak sapı eksplantları, içinde büyüme düzenleyici madde olarak 2 mg/l IBA'nın bulunduğu 30 g/l sakkaroz ve 6 g/l agar ilave edilmiş MS ortamında, sıcaklığı 25 °C olan iklim odasında ve karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır (Hong vd., 2012) (Şekil 3.3a). Yaklaşık 3 hafta sonra bu ortamlarda adventif kökler elde edilmiştir (Şekil 3.3b).



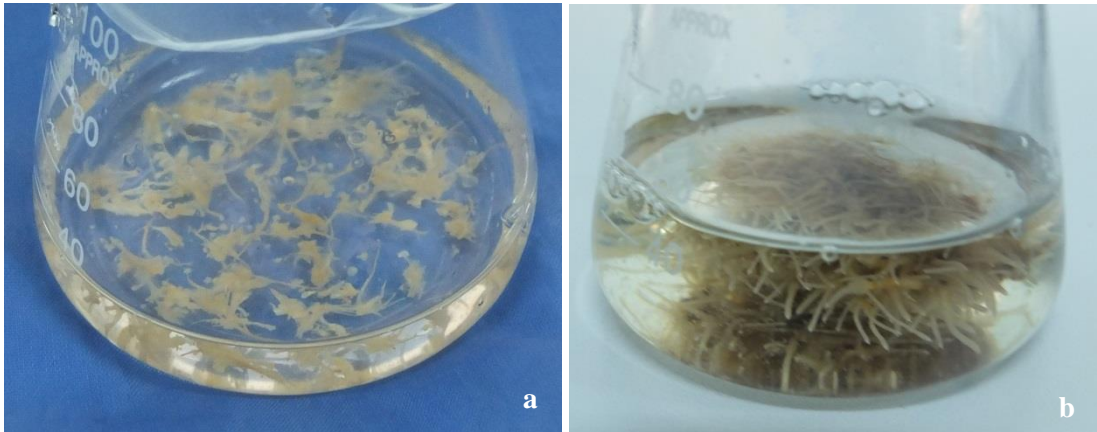
Şekil 3.2. Dört haftalık siyah banotu bitkileri



Şekil 3.3. Besin ortamlarına dikilmiş yaprak sapı eksplantları (a) ile bunlardan oluşan adventif kökler (b)

### 3.2.3. Köklerin çoğaltılması

Yaprak sapı eksplantlarından oluşan adventif kökler, 0.5-1 cm uzunluğunda parçalara ayrılarak içinde agar bulunmayan aynı bileşime sahip içinde 25 ml sıvı MS besin ortamı bulunan 100 ml'lik erlenlere aktarılmışlardır (Şekil 3.4a). Sıcaklığı  $25^{\circ}\text{C}\pm 1$  olarak ayarlanmış karanlık koşulların sağlandığı iklim odalarında 90 rpm çalkalama hızında kültüre alınan adventif kökler, 10 gün aralıklarla yeterli miktarda kök elde edilinceye kadar alt kültüre alınmışlardır (Şekil 3.4b).



Şekil 3.4. Sıvı ortamlarda kültüre alınan adventif kökler (a) ile sıvı ortamda çoğalan adventif kökler (b)

### 3.2.4. MeJA ve 24-eBL uygulamalarının yapılması

Sıvı ortamlarda çoğaltılan adventif kökler, daha sonra MeJA ve 24-eBL uygulamaları yapılmak üzere steril kabin içerisinde 0.5-1 cm uzunluğunda parçalara ayrılmışlardır. Daha sonra analitik terazide yaklaşık 1.5 g ağırlığında tartılarak, 2 mg/l IBA ve 30 g/l sakkaroz içeren 30 ml'lik sıvı MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. Kültürler, sıcaklığı 25°C±1 olarak ayarlanmış karanlık koşulların sağlandığı inkübatörde 90 rpm çalkalama hızında 1 hafta süreyle kültüre alınmışlardır. Bu süre sonunda, 24-eBL farklı konsantrasyonlarda hem tek hem de siyah banotu kök kültürlerinde başarılı sonuç verdiği tespit edilen 1 mM konsantrasyondaki MeJA (Jaremicz vd., 2014) ile ikili kombinasyonlar halinde ortamlara ilave edilmişlerdir (Çizelge 3.1). Hazırlanan 24-eBL ve MeJA belirtilen konsantrasyonlarda ortamlara ilave edilmeden önce stok çözeltileri filtre sterilizasyona tabi tutulmuştur. Kontrol grubuna ise 24-eBL ve MeJA için kullanılan hacim kadar steril saf su ilave edilmiştir. Kültürler 25°C ve karanlık koşullarda 90 rpm hızında çalkalanarak 2 hafta boyunca kültüre alınmışlardır. Daha sonra hasat edilen kökler, steril saf su ile yıkanıp kurutma kâğıdı ile suları alındıktan sonra analizlerde kullanılmışlardır. Araştırma 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 4 erlen olacak şekilde kurulmuştur.

Çizelge 3.1. Araştırmada yapılacak uygulamalar

| Uygulama | MeJA (mM) | 24-eBL (mg/l) |
|----------|-----------|---------------|
| 1        | 0.0       | 0.0           |
| 2        | 0.0       | 0.5           |
| 3        | 0.0       | 1.0           |
| 4        | 0.0       | 2.0           |
| 5        | 1.0       | 0.0           |
| 6        | 1.0       | 0.5           |
| 7        | 1.0       | 1.0           |
| 8        | 1.0       | 2.0           |

### **3.2.5. Köklerde yapılan incelemeler**

#### **3.2.5.1. Yaş kök ağırlığının belirlenmesi**

Hasattan sonra köklerin uygulama ve tekerrürler bazında analitik terazide tartılmasıyla g olarak bulunmuştur.

#### **3.2.5.2. Kuru kök ağırlığının belirlenmesi**

Köklerin 40°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmalarının ardından analitik terazide tartılmaları ile g olarak belirlenmiştir.

#### **3.2.5.3. Kök büyüme indeksinin belirlenmesi**

Köklerin büyüme indeksleri aşağıda verilen eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır:  
Kök büyüme indeksi=(hasattan sonraki yaş kök ağırlığı-inoküle edilen yaş kök ağırlığı)/inoküle edilen yaş kök ağırlığı

### **3.2.6. Siyah banotu köklerinde metabolit ekstraksiyonunun yapılması**

Uygulamalarının ardından köklerde alkaloid ekstraksiyonu Jakobová vd. (2012)’nin kullandıkları yöntemine göre yapılmıştır. Buna göre 40°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuş kökler, havan ve kolu kullanılarak toz haline getirilmişlerdir. Toz haline getirilen 200 mg örnek üzerine 10 ml metanol:saf su (3:2) karışımı eklenerek 30 dakika boyunca ultrasonik su banyosunda tutulmuştur. Daha sonra 15 dakika boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edilen örneklerin süpernetant kısımları ayrı bir tüpte toplanmıştır. Bu şekilde ekstraksiyon işlemi üç kez tekrarlanmış ve bir araya getirilen süpernetant kısımları rotary evaporatörde uçurularak kuru ekstraktlar elde edilmiştir. Daha sonra üzerine 1.5 ml metanol ilave edilerek çözdürülen ekstraktlar, 0.45 µm’lik filtrelerden geçirildikten sonra analizlerde kullanılmışlardır. Fenolik madde analizleri için ekstraksiyon 200 mg kökün, 3 kez %0.1 HCl içeren 10 ml metanol içinde 30 dakika ultrasonik su banyosunda tutulması ve santrifüj edilmesi ile elde edilen süpernetant kısımlarının rotary evaporatörde uçurularak, kalıntınının 1.5 ml metanolde çözdürülmesi ile yapılmıştır. Ancak yapılan ön denemeler sonucunda bu şekilde



yapılan ekstraksiyonlarda hem tespit edilen fenolik bileşik sayısı hem de pik alanlarının, tropan alkaloidleri için yapılan ekstraktlarla kıyaslandığında daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle fenolik bileşik analizleri de tropan alkaloidleri için yapılan ekstraksiyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.7. Tropan alkaloidlerinin HPLC ile belirlenmesi

Ekstraktlarda tropan alkaloidlerinden hiyosiyamin ve skopolamin miktarlarının belirlenmesi Shimadzu marka HPLC ile yapılmış olup, HPLC cihazına ilişkin parametrelerle kullanılan gradient program Çizelge 3.2 ve 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tropan alkaloidlerinin HPLC analizlerinde kullanılan bazı parametreler

| Parametreler    |   |
|-----------------|---|
| Dedektör        | SPD-M20 A DAD                                 |
| Pompa           | LC-20 AD                                      |
| Gaz arındırıcı  | DGU-20A                                       |
| Kolon fırını    | CTO-10 AS vp                                  |
| Kolon           | Agilent-C18 (250 mm x 4.6 mm) 5 µm            |
| Mobil faz       | A: Asetik asit-Ultra saf su (2:98) B: Metanol |
| Akış hızı       | 0.8 ml/dak                                    |
| Kolon sıcaklığı | 40 °C   |

Çizelge 3.3. Tropan alkaloidlerinin HPLC analizlerinde kullanılan gradient program

| Zaman<br>(dakika) | Mobil faz A<br>(%) | Mobil faz B<br>(%) |
|-------------------|--------------------|--------------------|
| 0                 | 100                | 0                  |
| 12                | 88                 | 12                 |
| 13                | 80                 | 20                 |
| 33                | 72                 | 28                 |
| 48                | 70                 | 30                 |

Örneklerde hiyosiyamin ve skopolamin miktarları bu bileşiklerin standartlarından elde edilen pik alanlarına göre mg/g KA olarak belirlenmiştir.

### 3.2.8. Toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi

Örneklerdeki toplam fenolik madde miktarları Folin Ciocalteu yöntemi ile Singleton ve Rossi (1965)’e göre yapılmıştır. Spektrofotometrede okumalar 765 nm’de yapılmış olup, standart olarak gallik asitin kullanıldığı körveden yararlanılarak örneklerdeki fenolik madde miktarları gallik asit (GA) cinsinden mg/g olarak tespit edilmiştir.

### 3.2.9. Fenolik bileşiklerin HPLC ile belirlenmesi

Köklerde fenolik bileşiklerin HPLC ile belirlenmesinde Göktürk Baydar vd. (2011)'nin yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Shimadzu marka HPLC ile yapılan fenolik bileşik analizlerinde kullanılan HPLC cihazına ilişkin parametrelerle gradient program Çizelge 3.4 ve 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Fenolik bileşiklerin HPLC analizlerinde kullanılan bazı parametreler

| Parametreler    |   |
|-----------------|---|
| Dedektör        | SPD-M20 A DAD                                       |
| Pompa           | LC-20 AD  |
| Gaz arındırıcı  | DGU-20A   |
| Kolon fırını    | CTO-10 AS vp  |
| Kolon           | Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm) |
| Mobil faz       | A: Asetik asit-Ultra saf su (2:98) B: Metanol       |
| Akış hızı       | 0.8 ml/dak  |
| Kolon sıcaklığı | 40 °C   |

Çizelge 3.5. Fenolik bileşiklerin HPLC analizlerinde kullanılan gradient program

| Zaman (dakika) | Mobil faz A (%) | Mobil faz B (%) |
|----------------|-----------------|-----------------|
| 0 (başlangıç)  | 100             | 0               |
| 12             | 88              | 12              |
| 13             | 80              | 20              |
| 33             | 72              | 28              |
| 48             | 70              | 30              |
| 53             | 62              | 38              |
| 68             | 60              | 40              |
| 70             | 60              | 40              |
| 90             | 50              | 50              |
| 105            | 40              | 60              |
| 107            | 0               | 100             |
| 112            | 0               | 100             |
| 117            | 100             | 0               |
| 120 (bitiş)    |                 |                 |

Örneklerde fenolik bileşiklerden gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, vanilin, *p*-kumarik, *o*-kumarik, ferulik asit, rutin, sinnamik asit ve kuersetin miktarları, bu bileşiklerin standartlarından elde edilen pik alanlarına göre µg/g KA olarak belirlenmiştir.

### 3.2.10. İstatistik analizler

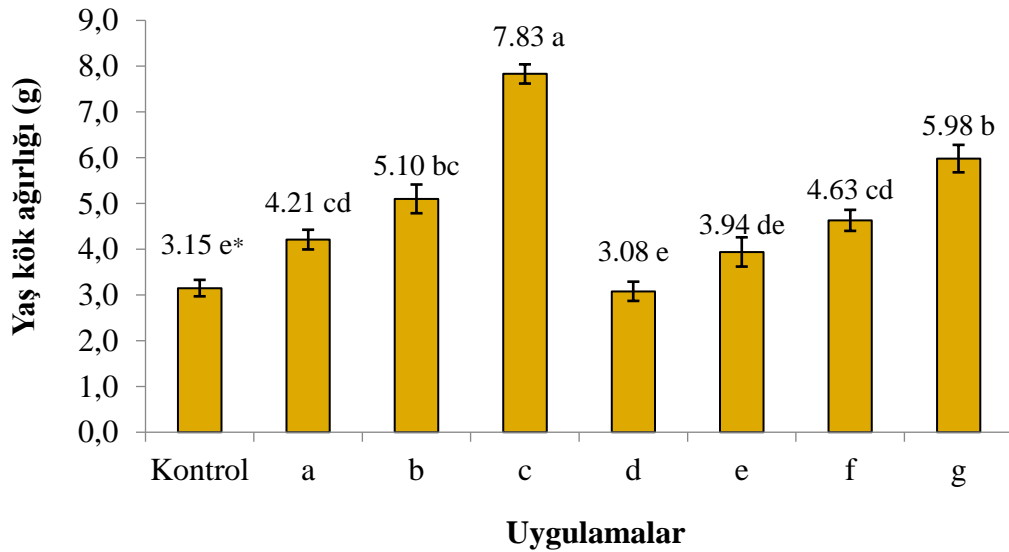
Araştırma sonucunda elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak yapılmış olup, uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

Siyah banotu bitkisine ait yaprak saplarından elde edilen adventif köklere farklı konsantrasyonlarda uygulanan 24-eBL'nin, MeJA ile yapmış olduğu tekli ya da ikili kombinasyonlarının kök büyümesi ile tropan alkaloidleri ve fenolik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkilerinin incelendiği araştırmada elde edilen sonuçlar aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

### 4.1. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Yaş Kök Ağırlığı Üzerine Etkileri

Araştırmada kök büyüme kriterleri içinde incelenen ilk kriter yaş kök ağırlığı olup, bu kriter bakımından yapılan istatistiksel analizler sonucunda, 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre yaş kök ağırlığının önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Elde edilen bulgular Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının yaş kök ağırlığı üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

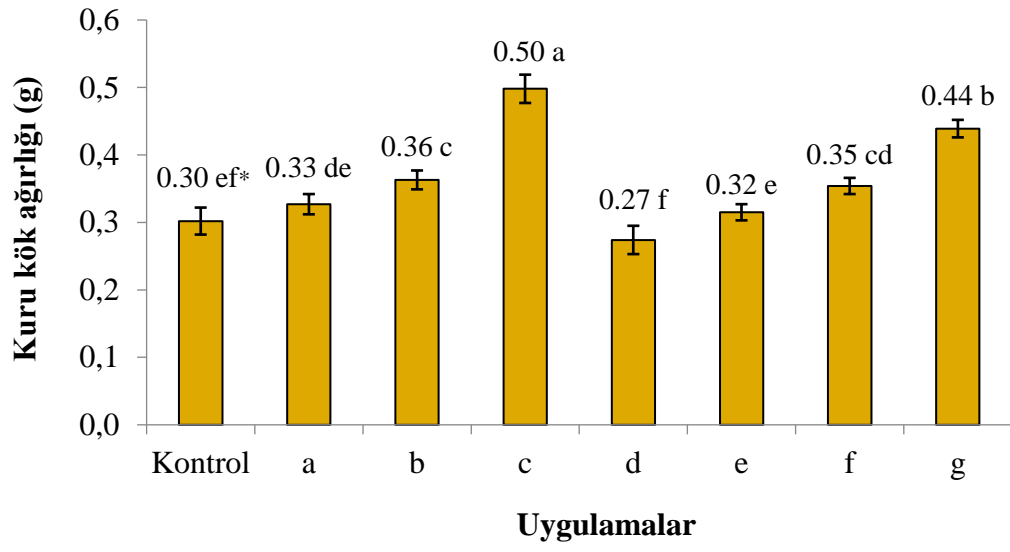
\*Farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır ( $p<0.05$ ).

Araştırmada en yüksek yaş kök ağırlığı 7.83 g ile 2 mg/l 24-eBL'nin kullanıldığı uygulamada tespit edilmiştir. Bu uygulamayı 2 mg/l 24-eBL + 1 mM MeJA kombinasyonu ile sadece 1 mg/l 24-eBL uygulamasının takip ettiği ve bu

uygulamalarda yaş kök ağırlığının sırasıyla 5.98 g ve 5.10 g olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. En düşük yaş kök ağırlıkları ise 3.08 ile 1 mM MeJA uygulaması ve 3.15 g ile de kontrol grubunda saptanmıştır. Şekil 4.1 incelendiğinde, yaş kök ağırlığı üzerinde 24-eBL'nin olumlu bir etkisinin bulunduğu ve bu olumlu etkinin konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. MeJA'nın ise yaş kök ağırlığı bakımından kontrol grubuna göre önemli bir farklılık yaratmadığı, ancak 24-eBL'nin 1 ve 2 mg/l konsantrasyonları ile yaptıkları kombinasyonlarda yaş kök ağırlığının kontrole göre önemli derecede arttığı belirlenmiştir.

#### 4.2. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Kuru Kök Ağırlığı Üzerine Etkileri

Kuru kök ağırlığı bakımından yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kuru kök ağırlığının yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre önemli derecede değiştiği saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Elde edilen veriler Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının kuru kök ağırlığı üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

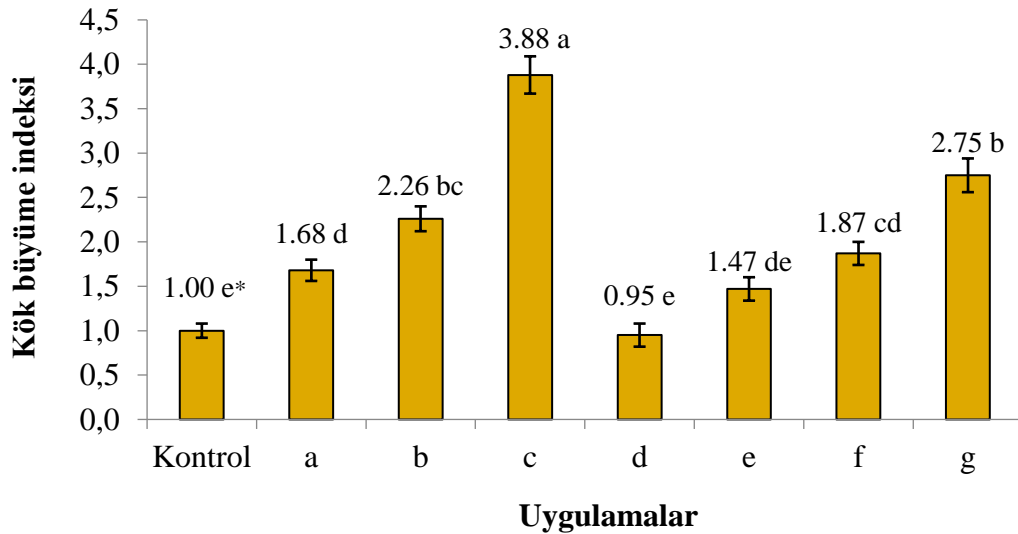
\*Farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır ( $p < 0.05$ ).

Şekil 4.2 incelendiğinde, en yüksek kuru kök ağırlığı 0.50 g ile 2 mg/l 24-eBL uygulaması yapılmış köklerden elde edilmiştir. Bunu 2 mg/l 24-eBL ile 1 mM

MeJA'nin birlikte uygulandıkları kökler izlemiş ve bu köklerde kuru kök ağırlığı 0.44 g olarak belirlenmiştir. En düşük kuru kök ağırlıklarının ise 0.27 g ve 0.30 g ile sırasıyla 1 mM MeJA uygulaması yapılmış köklerle kontrol grubu köklerinden elde edildiği tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca kuru kök ağırlığının 24-eBL konsantrasyonunun artışına paralel olarak arttığı, MeJA'nın ise tek olarak kullanıldığında kuru kök ağırlığı üzerinde kontrolle kıyaslandığında önemli bir farklılık yaratmadığı belirlenmiştir.

#### 4.3. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Kök Büyüme İndeksi Üzerine Etkileri

Yapılan uygulamaların bir diğer kök büyüme kriteri olan kök büyüme indeksi üzerine etkilerinin de incelendiği bu araştırmada, kök büyüme indeksinin yapılan uygulamalara göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiş olup ( $p<0.05$ ), elde edilen bulgular Şekil 4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.3. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının kök büyüme indeksi üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

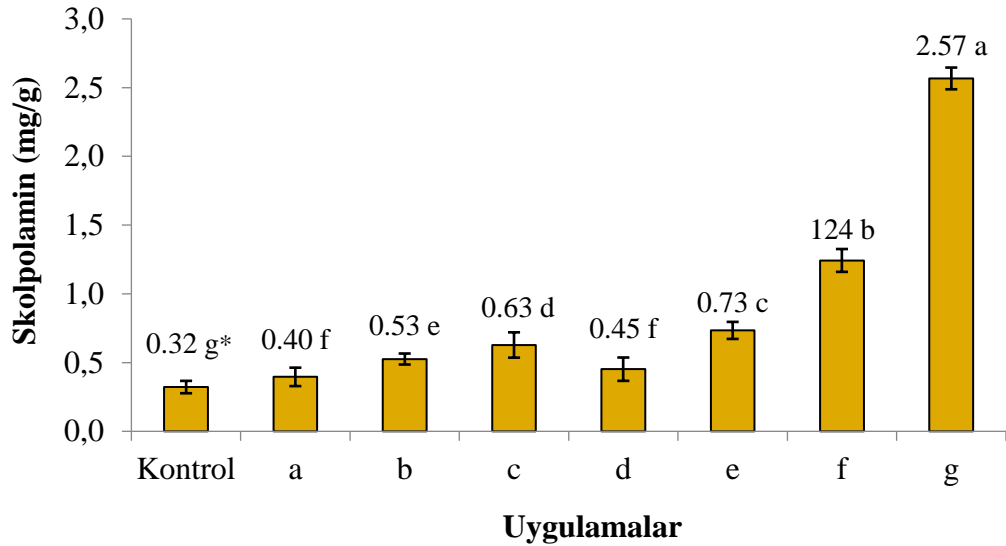
\*Farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır ( $p<0.05$ ).

En yüksek kök büyüme indeksinin, yaş ve kuru kök ağırlıklarında da olduğu gibi 3.88 ile 2 mg/l konsantrasyonunda uygulanan 24-eBL uygulamasından elde edildiği belirlenmiştir. En düşük değerler ise 0.95 ve 0.10 ile sırasıyla 1 mM MeJA uygulaması ile kontrol grubu köklerden elde edilmiştir. Kontrol grubu köklere kıyasla artan 24-

eBL konsantrasyonlarında kök büyümesinin arttığı belirlenirken, sadece 1 mM MeJA uygulamasının hiçbir uygulama yapılmayan kontrollere göre kök büyümesi üzerinde önemli bir etki göstermediği tespit edilmiştir. 24-eBLve MeJA'nın birlikte yapıldığı uygulamalarda ise kök büyüme indeksinin özellikle artan 24-eBL'nin etkisi ile arttığı, ancak 24-eBL + MeJA kombinasyonlarında kök gelişiminin, sadece 24-eBL uygulananlara göre daha düşük seviyelerde kaldığı saptanmıştır.

#### 4.4. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Skopolamin Miktarı Üzerine Etkileri

Siyah banotu bitkisine ait kültürlerde yapılan 24-eBLve MeJA uygulamalarının skopolamin miktarı üzerine etkilerinin de incelendiği bu araştırmada elde edilen veriler Şekil 4.4'de sunulmuştur.



Şekil 4.4. 24-eBLve MeJA uygulamalarının skopolamin miktarı üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

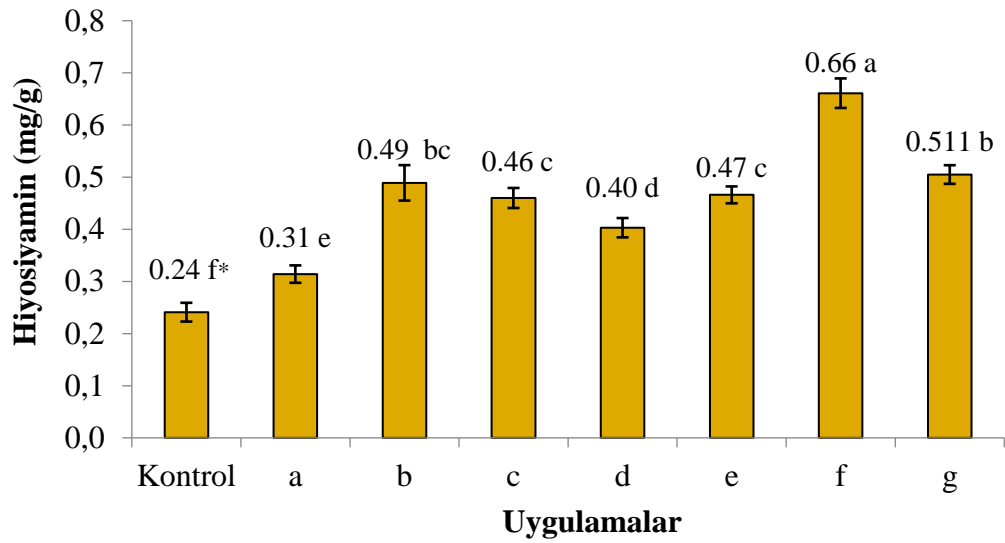
\*Farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır ( $p<0.05$ ).

İstatistiksel analizler sonucunda köklerdeki skopolamin birikiminin, yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Buna göre yapılan bütün uygulamaların kontrol grubuna göre skopolamin miktarını artırdığı belirlenmiştir. En düşük skopolamin birikiminin gerçekleştiği kontrol grubu köklerde 0.32 mg/g olan skopolamin miktarının, 0.5, 1 ve 2 mg/l konsantrasyonunda yapılan 24-eBL uygulanmaları ile sırasıyla 0.40, 0.53 ve 0.63 mg/g'a yükseldiği

saptanmıştır. Sadece 1 mM MeJA uygulanan köklerdeki skopolamin miktarının ise 0.45 mg/g olduğu görülmüştür. Araştırmada elde edilen bir diğer sonuç da 1 mM MeJA ile birlikte uygulanan 24-eBL'nin konsantrasyonu artıkça skopolamin üretiminin de arttığının belirlenmesidir. Özellikle 1 mM MeJA ile birlikte uygulanan 2 mg/l 24-eBL'nin 2.57 mg/g değerle kontrole göre skopolamin birikimini 8 kattan daha fazla artırdığı tespit edilmiştir.

#### 4.5. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Hiyosiyamin Miktarı Üzerine Etkileri

Siyah banotu bitkisinde bulunan önemli tropan alkaloidlerinden biri de hiyosiyamin olup, yapılan istatistiksel analizler sonucunda köklerdeki hiyosiyamin birikiminin yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Araştırmada elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'de sunulmuştur.



Şekil 4.5. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının hiyosiyamin üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

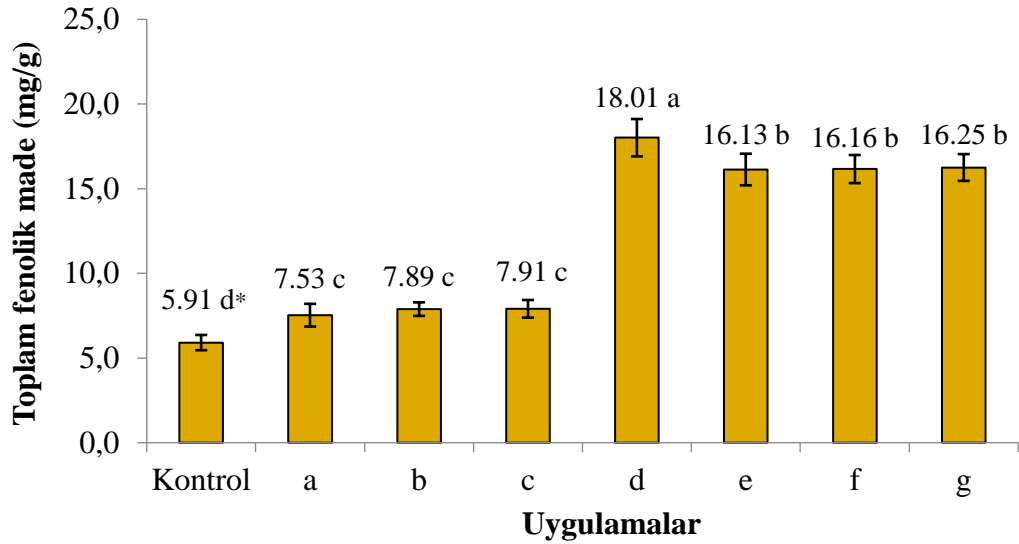
\*Farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır ( $p < 0.05$ ).

Şekil 4.5'de de görüldüğü gibi, hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu adventif köklerde hiyosiyamin miktarı 0.24 mg/g ile en düşük seviyede bulunurken, bütün 24-eBL ve MeJA uygulamalarının hiyosiyamin miktarını kontrole göre önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Buna göre 1 mM MeJA uygulamasının hiyosiyamin miktarını 0.40 mg/g'a, 0.5 mg/l 24-eBL'nin 0.31 mg/g'a, 1 mg/l 24-eBL'nin 0.499

mg/g'a ve 2 mg/g 24-eBL'nin ise 0.46 mg/g'a çıkardığı belirlenmiştir. Yalnızca 1 ve 2 mg/g 24-eBL uygulaması ile 1mM MeJA'nın 2 mg/l 24-eBL ile birlikte kullanıldığı uygulamalar hiyosiyamin miktarını kontrole göre arttırmasına karşın, 0.46-0.499 mg/g arasında değişen değerleri ile bu üç uygulama arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir. En yüksek hiyosiyamin miktarı ise 1mM MeJA'nın 1 mg/l 24-eBL ile birlikte kullanıldığı köklerden elde edilmiş olup, bu uygulamanın hiyosiyamin miktarını 0.66 mg/g'a çıkartarak kontrole göre 2.75 katı bir artış sağladığı belirlenmiştir.

#### 4.6. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Toplam Fenolik Madde Miktarı Üzerine Etkileri

Toplam fenolik madde miktarı üzerine 24-eBLve MeJA uygulamalarının etkilerinin de incelendiği araştırmada, yapılan istatistiksel analiz sonucunda toplam fenolik madde miktarının yapılan uygulamalara göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiş olup ( $p<0.05$ ), elde edilen bulgular Şekil 4.6'de sunulmuştur.



Şekil 4.6. 24-eBLve MeJA uygulamalarının toplam fenolik madde miktarı üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

\*Farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır ( $p<0.05$ ).

Araştırmada kontrol grubu köklerdeki toplam fenolik madde miktarı 5.91 mg/g olarak tespit edilirken, yapılan bütün uygulamaların kontrole göre toplam fenolik madde



miktarını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Araştırmada sadece 0.5, 1 ve 2 mg/l 24-eBL uygulamasının yapıldığı köklerdeki fenolik madde miktarlarının kontrole göre yüksek olmasına karşın, bu üç uygulama arasında istatistiksel bir farkın bulunmadığı görülmüştür. En yüksek toplam fenolik madde miktarının 18.01 mg/g ile sadece 1 mM MeJA uygulamasının yapıldığı köklerden elde edildiği tespit edilmiştir. Bu uygulamayı 24-eBL ve MeJA'nın birlikte kullanıldığı uygulamaların 16.13-16.25 mg/g arasında değişen birbirine yakın değerlerle izledikleri saptanmıştır. Araştırma sonuçları incelendiğinde gerek MeJA'nın gerekse 24-eBL uygulamalarının kontrole göre toplam fenolik madde miktarını artırdıkları, ancak MeJA uygulamasının toplam fenolik madde birikiminde 24-eBL'ye göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.7. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Fenolik Bileşiklerin Birikimi Üzerine Etkileri**

Araştırmada 24-eBL ve MeJA uygulamalarının adventif kök kültürlerindeki fenolik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkileri de incelenmiş olup, bu kapsamda gallik asit, kateşin, epikateşin, vanilin, sinnamik asit, rozmarinik asit, kafeik asit, *o*-kumarik asit, *p*-kumarik asit ve klorojenik asit miktarlarının birikimi HPLC ile belirlenmiştir. İncelenen bu bileşikler içinde *o*-kumarik asit ve *p*-kumarik asit köklerde tespit edilemezken; diğer bileşiklerin birikiminin yapılan uygulamalara göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Fenolik bileşiklerden elde edilen bulgular Tablo 4.1'de sunulmuştur. Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden gallik asit miktarının 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre önemli derecede değiştiğinin belirlendiği araştırmada, bütün 24-eBL ve MeJA uygulamalarının köklerdeki gallik asit miktarını kontrole göre artırdığı tespit edilmiştir. En düşük gallik asit miktarı 22.53  $\mu\text{g/g}$  ile kontrol grubu köklerde tespit edilirken, en yüksek değerlerin ise 56.06 ile 60.04  $\mu\text{g/g}$  arasında değişen değerlerle yalnızca 1mM MeJA ile MeJA'nın 0.5 ve 1 mg/l 24-eBL ile yaptığı kombinasyonlardan elde edildiği belirlenmiştir. Araştırmada hem 24-eBL'nin hem de MeJA'nın gallik asit miktarını artırdıkları, ancak MeJA'nın bu birikimde daha etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Siyah banotu adventif köklerinde kateşin miktarının uygulamalara göre değişimi incelendiğinde, en yüksek kateşin miktarlarının 1mM MeJA + 2 mg/l 24-eBL kombinasyonu (508.99  $\mu\text{g/g}$ ) ile 1 mM MeJA + 1 mg/l 24-eBL kombinasyonundan

(417.41 µg/g) elde edildiği tespit edilmiştir. Araştırmada en düşük kateşin miktarı ise 180.51 µg/g ile kontrol bitkilerinden elde edilmiştir. En düşük ve en yüksek değerlerin elde edildiği bu uygulamalar dışında, köklere uygulanan diğer uygulamalar arasında önemli bir farklılık olmadığı ve bu uygulamalarda kateşin miktarının 304.37 ile 353.23 µg/g arasında değiştiği saptanmıştır (Tablo 4.1).

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik de epikateşindir. En yüksek epikateşin miktarı 93.04 µg/g ile 1 mM MeJA ile 1 mg/l 24-eBL'nin birlikte kullanıldığı köklerde tespit edilirken, bu uygulamayı 73.28 µg/g ile 1mM MeJA + 2 mg/l 24-eBL uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir. Epikateşin birikimi ile ilgili sonuçlar genel olarak incelendiğinde, MeJA uygulamalarının epikateşin miktarını artırmada 24-eBL'ye göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Nitekim sadece 24-eBL'nin uygulandığı köklerde epikateşin miktarı ile kontrol grubu köklerden elde edilen epikateşin miktarı arasında önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir.

Köklerdeki vanilin miktarı bakımından yapılan incelemeler sonucunda, yapılan tüm MeJA ve 24-eBL uygulamalarının köklerdeki vanilin miktarını kontrole kıyasla artırmış olduğu belirlenmiştir. Hiçbir uygulama yapılmayan kontrol köklerinde 7.31 µg/g ile tespit edilen vanillin miktarı, araştırmada elde edilen en düşük değer olarak saptanmıştır. Yapılan tüm uygulamalar arasında 1mM konsantrasyonunda yapılan MeJA uygulamasının 34.92 µg/g ile en yüksek vanilin miktarının elde edildiği uygulama olduğu belirlenmiştir.

Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden biri de sinnamik asit olup, Tablo 4.1'deki verilerin incelenmesinden de görüldüğü gibi, en yüksek sinnamik asit miktarları 1 mM MeJA uygulamasının yapıldığı kökler ile MeJA'nın 0.5 mg/l ve 1 mg/l 24-eBL ile yaptığı kombinasyonlardan elde edilmiştir. Bu uygulamalarda sinnamik asit miktarının 25.07 ile 29.24 µg/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Araştırmada en düşük sinnamik asit miktarı ise kontrol kökleri ile 0.5 ve 2 mg/l 24-eBL'nin uygulandığı köklerde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının fenolik bileşik miktarları üzerine etkisi (µg/g)

| Uygulamalar                 | Fenolik bileşikler |           |            |         |              |                 |             |              |                 |
|-----------------------------|--------------------|-----------|------------|---------|--------------|-----------------|-------------|--------------|-----------------|
|                             | Gallik asit        | Kateşin   | Epikateşin | Vanilin | Sinamik asit | Rosmarinik asit | Kafeik asit | Ferulik asit | Klorojenik asit |
| Kontrol                     | 22.53 d*           | 180.51 d  | 19.69 d    | 7.31 e  | 2.56 d       | 13.94 d         | 0.00 f      | 3.56 c       | 1089.63 d       |
| 0.5 mg/l 24-eBL             | 28.74 c            | 304.37 c  | 25.36 cd   | 18.50 c | 2.68 d       | 14.15 d         | 0.00 f      | 5.36 b       | 2167.96 c       |
| 1 mg/l 24-eBL               | 31.20 c            | 326.15 bc | 27.75 cd   | 24.71 b | 7.98 c       | 31.72 bc        | 1.31 c      | 9.61 a       | 3284.10 b       |
| 2 mg/l 24-eBL               | 48.00 b            | 388.45 bc | 17.92 d    | 25.16 b | 2.79 d       | 26.55 c         | 1.34 c      | 5.60 b       | 2412.85 c       |
| 1 mM MeJA                   | 56.06 a            | 353.23 bc | 31.46 c    | 34.92 a | 25.07 a      | 63.02 a         | 1.92 a      | 0.81 d       | 4384.66 a       |
| 0.5 mg/l 24-eBL + 1 mM MeJA | 56.79 a            | 361.53 bc | 33.06 c    | 25.87 b | 26.52 a      | 29.05 c         | 1.06 d      | 0.86 d       | 3056.03 b       |
| 1 mg/l 24-eBL + 1 mM MeJA   | 60.04 a            | 417.41 ab | 93.04 a    | 26.14 b | 29.24 a      | 38.30 b         | 1.67 b      | 1.18 d       | 3300.61 b       |
| 2 mg/l 24-eBL + 1 mM MeJA   | 30.92 c            | 508.99 a  | 73.28 b    | 13.97 d | 16.47 b      | 31.48 bc        | 0.66 e      | 1.07 d       | 3944.47 a       |

\*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır ( $p<0.05$ ).

Araştırmada siyah banotu bitkisine ait adventif köklere yapılan uygulamaların rosmarinik asit miktarı üzerine etkileri Tablo 4.1’de sunulmuştur. Buna göre en düşük rosmarinik asit miktarı kontrol grubu ile 0.5 mg/l 24-eBL uygulanan köklerde tespit edilmiş olup, bunlarda rosmarinik asit miktarı sırasıyla 13.94 ve 14.15 µg/g olarak gerçekleşmiştir. Araştırmada gallik asit, vanilin ve sinnamik asitte olduğu gibi en yüksek rosmarinik asit birikimi 1mM MeJA uygulamasında saptanmış olup, bu ortamda kültüre alınan köklerde 63.02 µg/g rosmarinik asit birikimi tespit edilmiştir. Tablo 4.1’in incelenmesinden de anlaşıldığı üzere, MeJA’nın rosmarinik asit birikimi üzerinde olumlu etkilerinin bulunduğu ve en uygun 24-eBL konsantrasyonunun ise 1 mg/l olduğu saptanmıştır.

Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden biri de kafeik asit olup, kontrol kökleri ile 0.5 mg/l konsantrasyonunda 24-eBL uygulaması yapılan köklerde kafeik asit tespit edilememiştir. En yüksek kafeik asit miktarı 1.92 µg/g ile 1mM MeJA uygulanan köklerde belirlenirken, bu uygulamayı 1.67 µg/g ile 1 mM MeJA’nın 1mg/l 24-eBL ile birlikte kullanıldığı uygulamanın takip ettiği saptanmıştır.

Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden ferulik asit birikiminin diğer incelenen fenolik bileşiklerden farklı olarak MeJA uygulaması ile azaldığı tespit edilmiştir. Nitekim MeJA içeren ortamlarda ferulik asit miktarı 0.81 ile 1.18 µg/g arasında değişen değerlerle kontrole göre daha düşük seviyelerde bulunmuştur. 24-eBL’nin tek olarak uygulandığı ortamlarda ise ferulik asit miktarının kontrole ve MeJA içeren ortamlara göre ferulik asit miktarını artırdığı ve en yüksek birikimin de 9.61 µg/g ile 1 mg/l 24-eBL içeren uygulamadan elde edildiği tespit edilmiştir.

Araştırmada son olarak incelenen fenolik bileşik de klorojenik asit olup, incelenen bütün fenolik bileşikler içinde miktarı en yüksek bileşik olarak dikkat çekmiştir. Yapılan bütün uygulamaların kontrole göre klorojenik asit miktarını artırdığının saptandığı araştırmada, en yüksek klorojenik asit miktarları 4384.66 ve 3944.47 µg/g ile sırasıyla 1mM MeJA ve 1 mM MeJA’nın 2mg/l 24-eBL ile birlikte uygulandığı köklerde tespit edilmiştir. Araştırmada en düşük klorojenik asit miktarı ise 1089.63 µg/g ile kontrol köklerinde saptanmıştır.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Siyah banotu bitkisine ait *in vitro* koşullarda elde edilen adventif köklere yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarının kök büyümesi ve sekonder metabolit birikimi üzerine olan etkilerinin incelendiği bu araştırmada, farklı konsantrasyonlardaki 24-eBL'nin tekli ve MeJA ile yaptığı ikili kombinasyonları ile oluşturulmuş besin ortamlarında kültüre alınan köklerde kök büyüme kriterleri ile alkaloid ve fenolik bileşiklerin birikimleri tespit edilmiştir.

Fenolik bileşikler ve alkaloidler bitkilerde bulunan en önemli sekonder metabolit grupları arasında yer almaktadır (Kafkas, 2006; Mammadov, 2014). Ancak *in vivo* koşullarda yetişen bitkilerde üretilen bu metabolitlerin miktar ve kalitesi, iklim ve toprak koşulları ile hastalık ve zararlı popülasyonlarında görülen farklılıklar nedeniyle yıldan yıla büyük değişkenlik göstermektedir. *In vitro* sekonder metabolit üretim teknikleri ile değerli bileşiklerin üretimi sürekli ve kararlı bir hale getirilebilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Ayrıca *in vitro* koşullar altında kültür ortamına yapılan öncül madde uygulaması, ortamdaki büyüme düzenleyici maddelerinde yapılan değişiklikler, elisitör uygulamaları gibi birçok uygulama ile sekonder metabolitlerin biyosentez basamakları etkilenerek metabolit üretimi artırılabilir (Zhao vd., 2002). Bu araştırmada da siyah banotu adventif köklerinde alkaloid ve fenolik grubu bileşiklerin üretimini artırmak amacıyla yeni nesil steroid yapısındaki bitki hormonu olarak kabul edilen BR (24-eBL formunda) ile bitkinin savunma sisteminin önemli bir parçasını oluşturan ve sekonder metabolitlerin sentezinde sinyal molekülü olarak görev yapan MeJA kullanılmıştır.

Tropan alkaloidlerince zengin siyah banotu bitkisi, sahip olduğu bu metabolitler nedeniyle başta tıp olmak üzere birçok alanda önemi kavranan ve bu metabolitler için aranan bir kaynak bitki durumundadır (Zolala vd., 2007). Siyah banotundaki bu değerli sekonder metabolitlerin istenilen kalite ve miktarda üretimine yönelik olarak kallus ve hücre süspansiyon kültürleri, protoplast kültürü, somatik hibridizasyon ve kök kültürü gibi farklı *in vitro* teknikler kullanılmıştır (Oksman Caldentey ve Strauss, 1986; Koul vd., 1986). Bunlar arasından kök kültürleri hızlı çoğalma kapasitesi ve stabil metabolit üretkenlikleri nedeniyle en çok tercih edilen *in vitro* kültür çeşidi olarak kabul edilmektedir (Hashimoto vd., 1986; Carvalho ve Curtis, 1998). Bu nedenle

araştırmada bitkisel materyal olarak siyah banotu tohumlarının imlendirilmesiyle oluşturulan adventif kökler kullanılmıştır.

Araştırmada 24-eBL ve MeJA uygulamalarının siyah banotu bitkisine ait kök kültürlerinde hem kök büyümesi hem de sekonder metabolit üretimini önemli derecede etkilediği belirlenmiştir. Buna göre adventif köklere farklı konsantrasyonlarda yapılan 24-eBL ile MeJA uygulamalarının kök büyümesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesine yönelik olarak köklerde hasat sonrası yaş ve kuru kök ağırlıkları ile kök büyüme indeksi değerleri incelenmiştir. Araştırmada siyah banotu kök kültürlerinde kullanılan 1mM MeJA'nın kök gelişimi üzerinde olumlu bir etkide bulunmadığı, yapılan uygulamalar arasında bütün kök gelişme kriterleri bakımından kontrolle birlikte en düşük değerlerin elde edildiği uygulama olduğu tespit edilmiştir. MeJA ile yapılan 24-eBL uygulamalarında kök gelişim kriterleri tek olarak 24-eBL'nin uygulandığı köklere göre daha düşük olmuştur. MeJA'nın bitki hücrelerinde mitotik dngyi inhibe ederek G1 fazından S-fazına geçişi engellemesi sonucunda aktif olarak bölünen hücre sayısını azaltarak büyümeyi engellediği tespit edilmiştir (Patil vd., 2013). Elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak Zebatakis vd. (1999) de boru ieği (*Datura stromonium*) bitkisine ait kök kültürlerine uygulanan MeJA'nın kuru kök ağırlığını azalttığını bildirmişlerdir. Yine yapılan başka bir çalışma da *Stemona sp.* bitkisi kök kültürlerinde kullanılan 1 mM MeJA'nın kök büyümesini baskıladığı ve düşük miktarda kök elde edilmesine neden olduğu belirlenmiştir (Chaichana ve Dheeranupattana, 2012). Benzer şekilde Sirvent ve Gibson (2002), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*)'da MeJA uygulaması sonucunda bitki kök ağırlığının azaldığını ifade etmişlerdir. MeJA'nın büyüme üzerindeki engelleyici etkisi Noir vd. (2006) tarafından, MeJA'nın mitoz bölünmeyi olumsuz yönde etkilemesi ile mitotik hücre döngüsünden endoreduplikasyon döngüsüne geçişin gecikmesi sonucunda oluştuğu şeklinde ifade edilmiştir. Kang vd. (2004) ise *Scopolia parviflora* köklerine 72 saat süresince 0.01 ve 0.1 mM konsantrasyonunda uyguladıkları MeJA'nın, kültürün büyümesinde önemli bir etki yaratmadığını ortaya koymuşlardır. Bir diğer çalışmada ise *Anisodus acutangulus* bitkisi kök kültürlerinde kullanılan 100  $\mu$ M MeJA'nın uygulamanın 24 ile 48. saatleri arasında taze ve kuru kök ağırlığında kontrollere göre artış sağladığı saptanmıştır (Kai vd., 2012). Bu sonuçlardan da anlaşılmaktadır ki MeJA'nın kök gelişimi üzerine olan etkisi genotipe, MeJA dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak değişmektedir.

Araştırmada 24-eBL uygulamalarının kök gelişimi üzerindeki etkileri incelendiğinde, kullanılan konsantrasyona göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. 24-eBL ve MeJA'nın birlikte kullanıldığı ortamlarda ise, 24-eBL etkisiyle kültürlerde kontrole göre daha fazla miktarda kök elde edildiği belirlenmiştir. Sadece 24-eBL uygulaması yapılan köklerde 0.5, 1 ve 2 mg/l seviyelerindeki 24-eBL'nin incelenen bütün kök gelişme kriterlerini kontrole göre artırdığı, özellikle 2 mg/l konsantrasyonunda uygulanan 24-eBL'nin en yüksek değerlerin elde edildiği uygulama olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular Verma vd. (2011)'nin *in vitro* koşullarda yerfıstığına uygulanan 24-eBL'nin kök ağırlığını artırdığını bildirdikleri çalışmaları ile örtüşmektedir. Benzer şekilde Hu vd. (2016)'nin 20 günlük *in vitro* patates kültürlerine, Vardhini vd. (2011)'nin de turpa uyguladıkları 24-eBL'nin kuru ve yaş kök ağırlığını kontrole göre artırdığını ifade ettikleri araştırmalar da bu çalışmadan elde edilen sonuçları desteklemektedir. Bu araştırmalara ek olarak, domates (Vardhini ve Rao, 2001), maş fasulyesi (Ali vd., 2008), hint koleusu (Swamy ve Rao, 2011), patlıcan (Wu vd., 2011), arpa (Maraklı vd., 2014), çilek (Karlıdağ vd., 2011) ve nane (Çoban ve Göktürk Baydar, 2017) bitkilerinde yapılan BR uygulamalarının, uygun dönem ve konsantrasyonda uygulandığında kök gelişimini artırıcı yönde etki gösterdiği tespit edilmiştir. BR'lerin kök büyümesine katkı sağlamaları, BR'lerin hem hücre bölünmesini hem de hücre uzamasını etkilemeleri ve hücre duvarının esnekliğini arttıran proteinlerle ilişkili genleri aktive etmeleri ile ilişkilendirilmektedir (Oh ve Clouse, 1998; Kartal vd., 2009; Yang vd., 2011). Bunların yanı sıra elde edilen bulgulardan farklı olarak, domates, soya fasulyesi ve fare kulağı teresi bitkilerinde BR uygulamalarının kök gelişimi inhibe ettiğini bildirilmektedir (Guan ve Roddick, 1988; Terakoda vd., 2005; González García, 2011). Araştırmacılar bu durumun kullanılan BR konsantrasyonlarından kaynaklanmış olabileceğini ifade etmişlerdir. Nitekim BR'lerin kök büyümesi ve gelişimini konsantrasyona bağlı olarak kontrol ettikleri, düşük BR konsantrasyonlarının kök büyümesini teşvik ederken, çok yüksek BR konsantrasyonlarının ise kök büyümesini inhibe edebileceği bildirilmiştir (Roddick vd., 1993; Clouse vd., 1996; Müssig vd., 2003).

24-eBL ve MeJA uygulamalarının siyah banotundaki tropan alkaloidlerinden hiyosiyamin ve skopolamin birikimi üzerine etkilerinin de incelendiği araştırmada, bütün uygulamaların kontrol grubu ile kıyaslandığında bu metabolitlerin miktarını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. En yüksek hiyosiyamin miktarı 1mM MeJA

ve 1 mg/l 24-eBL'nin birlikte kullanıldığı köklerde tespit edilirken, en yüksek skopolomin miktarı ise 1mM MeJA ile 2 mg/l 24-eBL'nin birlikte kullanıldığı kültür ortamında tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda hem MeJA'nın hem de 24-eBL'nin köklerdeki hiyosiyamin ve skopolomin birikimi üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu, ayrıca bu iki uygulamanın kombinasyon halinde kullanıldığı durumlarda birbirleri üzerine sinerjistik etki göstererek etkinliklerinin arttığı belirlenmiştir.

Sekonder metabolitlerin senteziyle ilişkili enzimlerin uyarılmasında görevli bir sinyal molekülü olan MeJA, bitki savunma mekanizmasındaki genlerin ifadesini doğrudan ya da dolaylı olarak düzenleyen anahtar bir bileşendir. Jasmonatlar bitki hücre kültürlerinde kimyasal sinyal bileşikleri olarak gen transkripsiyonunu ve sonuçta sekonder metabolitlerin sentezini tetiklemektedirler (Stöckigt vd., 1995). Bu yönüyle MeJA'nın, alkaloidler terpenoidler, flavonoidler, fenolik bileşikler ve fitoaleksinler gibi birçok sekonder metabolitin oluşumunda sinyal ya da sinyal artırıcı olarak uyarıma neden olduğu bildirilmektedir (Gundlach vd., 1992; Mueller vd., 1993; Mirjalili ve Linden, 1996; Brader vd., 2001).

Sunulan bu çalışmada MeJA'nın, hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerini artırıcı yönde etki gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde Jaremicz (2014), siyah banotu kök kültürlerine uygulanan 1mM MeJA'nın skopolomin üretimini kontrole göre teşvik ettiğini bildirmiştir. Zebatekis vd. (1999) de, boru çiçeği bitkisine ait kök kültürlerine uyguladıkları 0.1 µM MeJA'nın hiyosiyamin ve skopolamin birikimini kontrole göre önemli ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar artan tropan alkaloid sentezini, tropin biyosentezinin diferansiyel artışına bağlı olarak gerçekleştiği şeklinde açıklamışlardır. Benzer bir sonuç Saenz Carbonell ve Loyola Vargas, (1987) tarafından bildirilmiş olup, buna göre boru çiçeği bitkisine uygulanan MeJA'nın hiyosiyamin miktarını kontrole göre önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Bir diğer araştırmada ise *Agrobacterium rhizogenes* ile saçak kök oluşumu sağlanan trompet çiçeği (*Brugmansia suaveolens*)'ne uygulanan MeJA'nın 24 saat içinde alkaloid birikimini kontrol grubu bitkilerine göre önemli derecede artırarak 1 mg/g'a ulaştırdığı saptanmıştır. Yine aynı araştırmada MeJA'nın, salisik asit ve kuersetine göre alkaloid üretimini daha fazla teşvik ettiği saptanmıştır (Zayed ve Wink, 2004). Benzer şekilde melek borusu (*Brugmansia candida*) bitkisine farklı konsantrasyonlarında uygulanan jasmonik asitin, konsantrasyon artışına paralel



olarak hiyosiyamin birikimini artırdığı belirlenmiştir (Spollansky vd., 2000). MeJA uygulamalarının alkaloid miktarını artırması, Kang vd. (2004) tarafından MeJA'nın putresin-N-metil transferaz (PMT) ve hiyosiyamin-6 $\beta$ -hidroksilaz (H6H) anahtar enzimlerinin sentezini doğrudan veya dolaylı olarak düzenlemesinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı şeklinde açıklanmıştır. Robins vd. (1991) de arginin dekarboksilaz ve putresin metil transferazın, tropan alkaloid biyosentezinde önemli düzenleyici enzimler olduğunu belirtmişlerdir. Bunlar dışında MeJA uygulaması yapılan çeşitli bitkilerde indol alkaloidleri (El Sayed ve Velpoote, 2005) benzofenantridin alkaloidleri (Gundlach vd., 1993), vinka alkaloidleri (Aerts vd., 1996) ve protoberberin alkaloidleri (Kumar vd., 2017) üretiminin arttığı da tespit edilmiştir.

Yapılan bu araştırmada, 24-eBL'nin de hiyosiyamin ve skopolomin alkaloidlerini artırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Siyah banotu bitkisinde ne dış koşullarda ne de *in vitro* koşullarda BR'lerin alkaloid miktarı üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan kapsamlı literatür taramaları sonucunda, BR uygulamalarının alkaloid üretimine olan etkisinin incelendiği araştırma sayısının da son derece az olduğu görülmüştür. Sınırlı sayıdaki bu çalışmaların birinde, Muthulakshmi ve Pandiyarajan, (2015) pervane çiçeği (*Catharanthus roseus*) bitkisindeki vinkristin alkaloidinin, bitkiye 20 ppm BR uygulaması yapılması sonucunda kontrole kıyasla önemli miktarda arttığını belirtmişlerdir. Pervane çiçeğine BR uygulamasının yapıldığı bir başka çalışmada ise 10<sup>-7</sup> M BR'nin yaprak ve köklerdeki alkaloid miktarında kontrole göre sırasıyla %49.4 ve %60.7 oranında bir artış sağladığı görülmüştür (Alam vd., 2016). BR'lerin metabolit birikimini arttırmasını Naeem vd. (2012), BR'lerin sekonder metabolit üretiminden sorumlu genetik potansiyeli uyarmasından kaynaklandığı şeklinde açıklamışlardır.

Adventif köklerde alkaloid üretiminin yanı sıra MeJA uygulamalarının bitkinin toplam fenolik madde miktarı üzerine de olumlu etkilerde bulunduğu belirlenmiştir. Araştırmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde, Kim vd. (2007), marul bitkisine 0.5 mM MeJA uygulaması sonucu toplam fenolik madde miktarının %35 oranında arttığını belirtmişlerdir. Ho vd. (2018) de *Polygonum multiflorum* bitkisi kök kültürlerinde kullandıkları 50  $\mu$ M MeJA'nın bitkideki toplam fenolik madde içeriğini kontrole kıyasla 2.5 katın üzerinde artırdığını tespit etmişlerdir. Bir başka çalışma da ise *Thevetia peruviana* hücre süspansiyon kültüründe kullanılan 3  $\mu$ M MeJA'nın

kontrole kıyasla 1.49 kat daha fazla fenolik madde birikimini sağladığı görülmüştür (Mendoza vd., 2018). Bunlara ek olarak MeJA uygulaması yapılan sarı kantaron, pervane çiçeği, yaban mersini, kök boya ve üzüm gibi farklı bitkilerde uygulama sonucu fenolik madde miktarının arttığı tespit edilmiştir (Cocetta vd., 2015; Wang vd., 2015; Liu vd., 2016; Özdamar Bıçer vd., 2017; Belhadj vd., 2018). Kim vd. (2007) MeJA uygulamalarının fenolik madde miktarını yükseltici etkisini, fenilalenin amonyum liyaz (PAL) enziminin bitkide fenilpropanoid yolunu aktif hale getirmesine bağlı olarak gerçekleştirdiği şeklinde açıklamışlardır.

Sunulan bu araştırmada, alkaloidlerin yanı sıra adventif köklere uygulanan 24-eBL'nin fenolik bileşiklerin miktarını da artırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular, ekinezya bitkisine ait saçak kök kültürlerinde 24-eBL'nin toplam fenolik miktarını kontrole göre önemli derecede artırdığının belirlendiği araştırma ile de uyum içerisindedir (Demirci, 2017). Xi vd, (2013) BR'lerin fenolik bileşikler üzerindeki arttırıcı etkisini flavonoid 3-O-glikozil transferaz (F3GT) ve fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzimlerinin sentezinden sorumlu genlerin ifadesininin BR'ler tarafından arttırılması ile ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca BR'lerin çeltik (Farooq vd., 2009), domates (Aghdam vd., 2012), hindiba (Serna vd., 2013), çay (Li vd., 2016), çilek (Ayub vd., 2017), nane (Çoban ve Göktürk Baydar, 2017), üzüm (Babalık vd., 2019) ve lavanta (Aras Aşçı vd., 2018) bitkilerinde de fenolik madde üretimini artırdığı tespit edilmiştir.

Siyah banotu bitkisinde fenolik bileşiklerden klorojenik asit, vanilin, ferullik asit ve sinnamik asitin bulunduğu belirlenmiştir (Ma vd., 2002; Begum, 2010; Jassbi vd., 2014; Elsharkawy vd., 2018). Ancak literatür taramaları sırasında siyah banotu bitkisine ait kök kültürlerinde 24-eBL ve MeJA'nın bu bitkide bulunan fenolik bileşiklerin üretimine olan etkilerini belirlemeye ilişkin herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu yüzden araştırmamız da 24-eBL ve MeJA uygulamalarının bitkideki klorojenik asit, vanilin, ferullik asit ve sinnamik asitin yanı sıra kateşin, epikateşin, gallik asit, rozmarinik asit ve kafeik asitin sentezi üzerine olan etkileri de belirlenmiştir.

Araştırmada, 24-eBL ile MeJA uygulamalarının gallik asit birikimi üzerine etkileri incelendiğinde, yapılan bütün uygulamalarının köklerdeki gallik asit miktarını kontrole göre artırdığı, 1mM MeJA ile MeJA'nın 0.5 ve 1 mg/l 24-eBL ile oluşturulan

kombinasyonlarda kontrole kıyasla sırasıyla 2.49, 2.52 ve 2.66 kat daha fazla gallik asit üretiminin sağlandığı tespit edilmiştir. Giri vd. (2012), *in vitro* koşullarda orkide bitkisi kallus kültürlerine uyguladıkları MeJA'nın konsantrasyonuna göre gallik asit miktarının değiştiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, 10 µM MeJA uygulamasıyla gallik asidin kontrol kültürlerine kıyasla 2.18 kat arttığını, ancak artan MeJA konsantrasyonlarına bağlı olarak gallik asit miktarının azaldığını ve 200 µM ve üzerindeki MeJA konsantrasyonlarında ise bu bileşiğe rastlanmadığını bildirmişlerdir. Bu sonuçtan da anlaşıldığı üzere MeJA'nın gallik asit birikimi üzerine etkisi genotipe ve kullanılan konsantrasyona bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

MeJA ve 24-eBL uygulamalarının siyah banotu bitkisinde kateşin miktarı üzerine etkilerinin de incelendiği araştırmada, yapılan bütün uygulamaların kontrole kıyasla kateşin miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Buna göre artan 24-eBL konsantrasyonlarına paralel olarak köklerde kateşin miktarlarının da arttığı belirlenmiştir. Köklerde kateşin üretimi üzerine en etkili uygulamanın 1mM MeJA'nın 2 mg/l 24-eBL ile birlikte kullanıldığı uygulamanın olduğu ve bu uygulama ile kontrole göre 2.82 kat daha fazla kateşin elde edildiği saptanmıştır. Diğer yandan MeJA'nın tek başına kullanıldığı ortamlarda kateşin miktarını hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol köklerine kıyasla 1.96 kat artırdığı, aynı zamanda 24-eBL ile birlikte kullanılması halinde de 24-eBL'nin etkisini artırdığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde Li vd. (2016) yaptıkları araştırmada, çay bitkisine 0.1 ppm dozunda yapılan 24-eBL uygulaması sonucunda kateşin miktarında kontrole göre %15 oranında artış tespit etmişlerdir. Araştırmacılar BR'lerin kateşinlerin biyosentezinde yer alan fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve glutamin oksoglutarat aminotransferaz (GOGAT) enzimlerinin aktivitesini artırması sonucu kateşin sentezinin artmış olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik de epikateşin olup, epikateşin üzerinde özellikle MeJA+24-eBL uygulamalarının, sadece 24-eBL kullanılan uygulamaların göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. En yüksek epikateşin miktarının elde edildiği 1mM MeJA + 1.0 mg/l 24-eBL uygulamasının, köklerdeki epikateşin birikimini kontrole göre 4.73 kat artırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, Xu vd. (2015)'nin asma bitkisine 0.40 mg/l konsantrasyonunda uyguladıkları 24-eBL'nin epikateşin miktarını kontrole göre %26 oranında artırdığı çalışmalarını ile uyum

içerisindedir. Zeneli vd. (2006)'nin Avrupa ladini bitkisinde MeJA uygulamasının kontrole kıyasla epikateşin miktarını artırdığını tespit ettikleri çalışma da bulgularımızı desteklemektedir.

Araştırmada 24-eBL ve MeJA uygulamalarının vanilin birikimi üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Köklere uygulanan bütün 24-eBL ve MeJA uygulamalarının kontrole kıyasla vanilin miktarını önemli derecede artırdığı; ancak kontrole göre 4.78 kat daha fazla vanilin üretiminin sağlandığı 1 mM MeJA uygulamasının diğer uygulamalara göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. 24-eBL'nin etkisine bakıldığında ise kültür ortamında eklenen 24-eBL'nin artan konsantrasyonlarına paralel olarak köklerdeki vanilin miktarını artırdığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Suresh ve Ravishankar, (2005) da acı kırmızı biber bitkisi kök kültürlerine uygulamış oldukları 10 µM MeJA'nın vanilin miktarını kontrole kıyasla 1.93 kat arttırmış olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik de sinamik asit olup, köklerde biriken sinamik asit miktarı üzerine MeJA'nın 24-eBL'ye göre daha etkili bir uygulama olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan MeJA'nın köklerdeki sinamik asit birikimi üzerindeki arttırıcı etkisinin, 24-eBL ile birlikte kullanıldığı ortamlarda daha da arttığı ve bu uygulamalardan biri olan 1 mg/l 24-eBL ile birlikte kullanılan MeJA'nın kontrole kıyasla 11.42 kat daha fazla sinamik asit üretimini sağladığı saptanmıştır. 24-eBL'nin tek olarak kullanılmasının, sinamik asit miktarını arttırmada MeJA ile yaptıkları kombinasyonlara göre etkisiz kaldığı da araştırmada elde edilen bir diğer dikkat çekici sonuç olmuştur. Aghdam vd. (2012), 3 µM BR uygulaması yaptıkları domates bitkisindeki sinamik asit miktarının kontrole göre %38 oranında arttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlardan da anlaşıldığı üzere BR'lerin sinamik asit birikimi üzerine olan etkisi genotipe, MeJA konsantrasyonuna ve çalışmanın *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda yapılmasına göre değişebilmektedir.

Siyah banotu bitkisine ait adventif köklerde incelenen bir diğer fenolik bileşik olan rosmarinik asit miktarının yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Araştırma sonucunda 0.5 mg/l 24-eBL uygulaması yapılan kökler ile hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol kökleri arasında rosmarinik asit miktarı bakımından bir farklılığa rastlanmamıştır. 24-eBL uygulamaları içinde 1 mg/l 24-eBL uygulamasının en yüksek rosmarinik asit üretimini sağlayarak, kontrol

grubuna göre 2.28 kat daha fazla birikimin gerçekleşmesini sağladığı saptanmıştır. MeJA'nın 24-eBL'ye göre daha etkili olduğu, özellikle tek başına kullanıldığı kültür ortamında rosmarinik asit miktarını 4.52 kat arttırarak uygulamalar arasında en yüksek seviyeye çıkardığı tespit edilmiştir. Krzyzanowska vd. (2011)'nin nanede, Kim vd. (2006)'nin de fesleğende MeJA uygulanması ile kontrole göre rosmarinik asit miktarının önemli ölçüde arttığını bildirdikleri çalışmalar ile bu araştırmada elde edilen sonuçlar uyum içerisindedir. Benzer şekilde *Lithospermum erythrorhizon* hücre süspansiyon kültürlerine uygulanan MeJA'nın, kültürlerdeki rosmarinik asit miktarını kontrol grubuna göre önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (Ogata vd., 2004).

Araştırmada adventif köklerde en az bulunan fenolik bileşik kafeik asit olurken, kontrol kökleri ile 0.5 mg/l konsantrasyonunda 24-eBL uygulamasının yapıldığı köklerde kafeik asit tespit edilememiştir. Benzer şekilde Demirci (2017), 24-eBL uygulaması yaptığı ekinezya bitkisine ait saçak köklerde kafeik asit tespit edilemediğini bildirmiştir. Köklerdeki kafeik asit sentezini uyarım bakımından MeJA'nın 24-eBL'ye göre daha etkili olduğu tespit edilmiş olup, tek başına kullanıldığı kültür ortamlarında MeJA'nın kafeik asit miktarını kontrol bitkilerinininkine oranla 1.92 katına çıkardığı saptanmıştır. MeJA 24-eBL ile birlikte kullanıldığında ise kafeik asit üretimi üzerindeki etkisinin tek başına kullanıldığı ortamlara göre azaldığı görülmüştür.

Araştırmada incelenen bir diğer kafeik asit türevi de ferulik asit olup yapılan uygulamaların sonuçları değerlendirildiğinde, 24-eBL uygulamalarının MeJA uygulamalarına göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna göre 24-eBL uygulamaları içinde en yüksek ferulik asit miktarının elde edildiği 1mg/l 24-eBL uygulaması ile kontrole göre 2.67 kat daha fazla ferulik asit elde edildiği tespit edilmiştir. MeJA'nın etkisine bakıldığında ise tek başına kullanıldığı kültür ortamlarındaki ferullik asit miktarının kontrolün ve diğer uygulamaların altında kaldığı saptanmıştır. Napoleão vd. (2017), ise 100 µM MeJA uygulaması yaptıkları yalancı parlak brom (*Brachypodium distachyon*) bitkisindeki ferulik asit miktarının kontrole göre 1.3 kat daha fazla olduğunu saptamışlardır. Elde edilen bu farklı sonuçlar, ferulik asit birikiminin, kullanılan bitki tür ve çeşidine, MeJA konsantrasyonuna ve çalışmanın *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda yapılmasına göre değişebileceğini göstermektedir.

Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden klorojenik asit üretiminde MeJA'nın uyarıcı etkisinin 24-eBL'ye göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. En yüksek klorojenik asit birikiminin elde edildiği uygulamalardan birisi olan 1 mM MeJA uygulaması ile kontrole göre 4.02 kat daha fazla klorojenik asit elde edilirken, 1 mM MeJA'nın 2 mg/l 24-eBL ile birlikte kullanıldığı köklerde ise bu oran 3.16 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, Demirci (2017)'nin *Agrobacterium rhizogenes* ile saçak kök oluşumu uyarılan ekinezya bitkisine uygulamış olduğu 0.5 mg/l konsantrasyonundaki 24-eBL'nin klorojenik asit miktarını kontrole kıyasla 4.08 kat artırdığını bildirdikleri çalışma ile paralellik göstermektedir. Benzer şekilde Skrzypczak Pietraszek vd. (2014), İran menekşesi sürgün kültürlerinde kullandıkları 100 µM MeJA'nın klorojenik asit içeriğini kontrole kıyasla 6 kat artırdığını ifade etmişlerdir. Sunulan bu araştırmadan farklı olarak Kim vd. (2007), ise 0.5 mM konsantrasyonunda MeJA uygulaması yaptıkları marul bitkisinde, kontrol bitkilerine kıyasla klorojenik asit miktarında düşüşler meydana geldiğini tespit etmişlerdir. MeJA uygulaması sonucunda bitkilerin klorojenik asit miktarındaki azalmayı Matsuda vd. (2005), fenolik bileşik oluşum basamaklarında klorojenik asitin bir ara madde olarak kullanılmasıyla ilişkilendirmişlerdir.

Sonuç olarak araştırmada kök gelişimi üzerine 24-eBL uygulamalarının olumlu etkilerde bulunduğu, MeJA ile birlikte kullanıldığı ortamlarda ise 24-eBL'nin kök gelişimi üzerine olan olumlu etkileri nedeniyle kontrole göre daha yüksek değerlerin elde edildiği tespit edilmiştir. Tropan alkaloidleri ile fenolik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkileri incelendiğinde ise 24-eBL ve MeJA uygulamalarının bu bileşiklerin birikimini önemli derecede artırdıkları tespit edilmiştir. En yüksek yaş ve kuru kök ağırlığı ile kök büyüme indeksi bakımından 2 mg/l 24-eBL; skopolamin ve kateşin birikimi için 1 mM MeJA + 2 mg/l 24-eBL kombinasyonu; hyosiyamin ve epikateşin birikimi için 1 mM MeJA + 1 mg/l 24-eBL kombinasyonu; toplam fenolik madde, gallik asit, vanilin, sinnamik asit, rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit birikimi için de 1 mM MeJA en uygun uygulamalar olarak tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aerts, R. J., Schäfer, A., Hesse, M., Baumann, T.W. & Slusarenko, A. (1996). Signalling molecules and the synthesis of alkaloids in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry*, 42(2), 417-422. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00919-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00919-1)
- Aghdam, M. S., Asghari, M., Farmani, B., Mohayjeji, M. & Moradbeygi, H. (2012). Impact of postharvest brassinosteroids treatment on *PAL* activity in tomato fruit in response to chilling stress. *Scientia Horticulturae*, 144, 116-120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.008>
- Ajungla, L., Patil, P.P., Barmukh, R.B. & Nikam, T.D. (2009). Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 317-322
- Alam, M.M., Hayat, S., Ali, B. & Ahmad, A. (2007). Effect of 28-homobrassinolide treatment on nickel toxicity in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, 45(1), 139-142. <https://doi.org/10.1007/s11099-007-0022-4>
- Alam, M.M., Naeem, M., Khan, M.M.A., 2016. Exploiting the Epibrassinolide as a Plant Growth Promoter for Augmenting the Growth, Physiological Activities and Alkaloids Production in *Catharanthus roseus* L. *Journal of Medicinal Plant*, 4, 88-93.
- Ali, B., Hasan, S. A., Hayat, S., Hayat, Q., Yadav, S., Fariduddin, Q. & Ahmad, A. (2008). A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Environmental and Experimental Botany*, 62(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.07.014>
- Alizadeh, A., Moshiri, M., Alizadeh, J. & Balali-Mood, M. (2014). Black henbane and its toxicity—a descriptive review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(5), 297.
- Aljibouri, A. M. J., Al-samarraei, K. W., Abd, A. S., Mageed, D. M. & Ali, A. J. A. (2012). Alkaloids production from callus of *Hyoscyamus niger* l. *in vitro*. *Journal of Life Sciences*, 6(8), 874.
- Anonim, (2012). [http://www.naturatours.ch/bilder/hyoscyamus\\_niger.jpg](http://www.naturatours.ch/bilder/hyoscyamus_niger.jpg). (Son erişim tarihi: 27.05.2019.
- Aras Aşçı, Ö., Deveci, H., Erdeger, A., Özdemir, K.N., Demirci, T. & Göktürk Baydar, N. (2019). Brassinosteroids promote growth and secondary metabolite production in lavandin (*Lavandula intermedia* emeric ex loisel.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(1) 254-263. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i10.1448-1454.2072>

- Ayub, R.A., Reis, L., Lopes, P.Z., Bosetto, L. & (2018). Ethylene and Brassinosteroid Effect on Strawberry Ripening After Field Spray. *Revista Brasileira De Fruticultura*, 40(3). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452018544>
- Babalık, Z., Demirci, T., Aşçı, Ö. A. & Baydar, N. G. (2019). Brassinosteroids modify yield, quality, and antioxidant components in grapes (*Vitis vinifera* cv. alphonse lavallée). *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09970-5>
- Bahmanzadegan, A., Sefidkon, F., Sonboli, A. & (2009). Determination of Hyoscyamine and Scopolamine in Four *Hyoscyamus* Species from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8(1), 65-70. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2010.790>
- Bajguz, A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(2), 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.01.002>
- Bajguz, A. & Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
- Bajguz, A. & Tretyn, A. (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 62(7), 1027-1046. <https://doi.org/10.1002/chin.200322270>
- Ballica, R., Ryu, D. D. & Kado, C. I. (1993). Tropane alkaloid production in *Datura stramonium* suspension cultures: elicitor and precursor effects. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(11), 1075-1081. <https://doi.org/10.1002/bit.260411110>
- Bari, R., Jones, J.D. & (2009). Role of Plant Hormones in Plant Defence Responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473-488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Baydar, H. (2013). Tıbbi, Aromatik ve Keyif Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın Evi*, (pp.20-50).
- Baydar, N.G., Babalık, Z., Türk, F. H., Çetin, E.S. & (2011). Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Wines and Extracts of Some Grape Varieties Grown in Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*, 17(1), 67-76.
- Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkilerle Tedavi. *Nobel Tıp Kitabevleri*.
- Begum, A.S. (2010). *Hyoscyamus niger* Linn. seeds: a review. *Research Journal of Seed Science*, 3(4), 210-217. <https://doi.org/10.3923/rjss.2010.210.217>
- Belabbassi, O., Khelifi-Slaoui, M., Zaoui, D., Benyammi, R., Khalfallah, N., Malik, S. & Khelifi, L. (2016). Synergistic effects of polyploidization and elicitation on biomass and hyoscyamine content in hairy roots of *Datura stramonium*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 20(3), 408-416.



- Özdamar Biçer, P., Demirci, T., Aras Aşçı, Ö. & Göktürk Baydar, N. (2017). Effects of methyl jasmonate and caffeic acid applications on secondary metabolite production in madder (*Rubia tinctorum*) root cultures. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), 508-512. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.76>
- Boitel Conti, M., Laberche, J. C., Lanoue, A., Ducrocq, C. & Sangwan-Norreel, B. S. (2000). Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60(2), 131-137. <https://doi.org/10.1023/A:1006426314274>
- Bosila, H., Hamza, M. A. & El-Ateeq, A. A. (2016). Enhancement of callus growth and hyoscyamine alkaloid production in *Hyoscyamus muticus* by nanotechnology, biotic elicitor and precursor. *International Journal of Chemistry and Technology*, 9(7), 135-142.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Brader, G., Tas, E. & Palva, E. T. (2001). Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in arabidopsis by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Carotovora*. *Plant physiology*, 126(2), 849-860. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.849>
- Cardillo, A. B., Otálvaro, A. Á. M., Busto, V. D., Talou, J. R., Velásquez, L. M. E. & Giulietti, A.M. (2010). Scopolamine, anisodamine and hyoscyamine production by *Brugmansia candida* hairy root cultures in bioreactors. *Process Biochemistry*, 45(9), 1577-1581. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.002>
- Carvalho, E. B. & Curtis, W R. (1998). Characterization of fluid-flow resistance in root cultures with a convective flow tubular bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(3), 375-384. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981105\)60:3<375:AID-BIT15>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<375:AID-BIT15>3.0.CO;2-L)
- Cemeroğlu, B. (2004). *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, Hacettepe Basımevi.
- Chaichana, N. & Dheeranupattana, S. (2012). Effects of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on Alkaloid Production from *in vitro* Culture of *Stemona* sp. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(3), 146.
- Cheong, J. J. & Do Choi, Y. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, 19(7), 409-413. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00138-0)
- Chevallier, A. (1996). In: *The Encyclopedia of Medicinal Plants*, Dorling Kindersley.

- Clouse, S. D. & Sasse, J. M. (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 427-451. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.427>
- Clouse, S. D. (1996). Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *The Plant Journal*, 10(1), 1-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010001.x>
- Clouse, S. D., Langford, M. & McMorris, T.C. (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology*, 111(3), 671-678. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.3.671>
- Cocetta, G., Rossoni, M., Gardana, C., Mignani, I., Ferrante, A. & Spinardi, A. (2015). Methyl jasmonate affects phenolic metabolism and gene expression in blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *Physiologia Plantarum*, 153(2), 269-283. <https://doi.org/10.1111/ppl.12243>
- Creelman, R. A. & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review Of Plant Biology*, 48(1), 355-381. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355>
- Çam, M. & Hışıl, Y. (2003). *Gıdalaradaki Flavonoidler ve Önemleri*. Gıda Mühendisliği Kongresi, 2-4 Ekim, Ankara, 67-82.
- Çetin, E.S. & Baydar, N.G. (2016). Elicitor applications to cell suspension culture for production of phenolic compounds in grapevine. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 22(1), 42-53.
- Çırak, C., Kevseroglu, K. & Sağlam, B. (2004). Physical and physiological dormancy in black henbane (*Hyoscyamus niger* L.) seeds. *Journal of Plant Biology*, 47, 391- 395. <https://doi.org/10.1007/BF03030556>
- Çoban, Ö. & Baydar, N.G. (2017). Brassinosteroid modifies growth and essential oil production in peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 43-49. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9614-1>
- De Simone, R., Margarucci, L. & De Feo, V. (2008). Tropane alkaloids: an overview. *Pharmacologyonline*, 1, 70-89.
- Dehghan, E., Häkkinen, S. T., Oksman-Caldentey, K. M. & Ahmadi, F.S. (2012). Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 110(1), 35-44. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0127-8>
- Demirci, T. (2017). *Echinacea purpurea* (L.) Moench'da *Agrobacterium rhizogenes* Kullanımı ve Bazı Dışsal Uygulamalarla Sekonder Metabolit Üretimini Artırılması. (Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)

- Divi, U.K. & Krishna, P. (2009). Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnology*, 26(3-4), 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.07.006>
- Drager, B. (2006). Biotechnology of *Solanaceae* alkaloids: a model or an industrial perspective. *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications*, 237-265. <https://doi.org/10.1002/9783527619771.ch11>
- Drager, B. (2006). Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry*, 67(4), 327-337. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.12.001>
- Drevets, W. C., Zarate Jr, C. A. & Furey, M. L. (2013). Antidepressant effects of the muscarinic cholinergic receptor antagonist scopolamine: a review. *Biological Psychiatry*, 73(12), 1156-1163. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.09.031>
- El Sayed, M. & Verpoorte, R. (2005). Methyljasmonate accelerates catabolism of monoterpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* during leaf processing. *Fitoterapia*, 76(1), 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.10.019>
- Elsharkawy, E. R., Ed Dra, A., Abdallah, E. M. & Ali, A. M. (2018). Antioxidant, antimicrobial and antifeedant activity of phenolic compounds accumulated in *Hyoscyamus muticus* L. *African Journal of Biotechnology*, 17(10), 311-321. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16316>
- Emami, S.A., 2007. Toxic plants, In: *Excellence Center of Toxicology and Food Chemistry*. (pp 839-841).
- Erkoyuncu, M. & Yorgancılar, M. (2015). Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ile Sekonder Metabolitlerin Üretimi. *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 2(1), 66-76.
- Farooq, M., Wahid, A. & Basra, S.M.A. (2009). Improving Water Relations and Gas Exchange with Brassinosteroids in Rice Under Drought Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(4), 262-269. <https://doi.org/10.1111/j.1439037X.2009.00368.x>
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. & Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Agriculture*, 29(1), 185-212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D.J., Cheema, S.A. & Aziz, T. (2010). Comparative time course action of the foliar applied glycinebetaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196, 336-345. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00422.x>

- Fernandez Marin, M.I., Puertas, B., Guerrero, R.F., Garcia Parrilla, M.C. & Cantos Villar, E. (2014). Preharvest methyl jasmonate and postharvest uv-c treatments: increasing stilbenes in wine. *Journal of Food Science*, 79(3), 310-317. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12368>
- Fujioka, S. & Yokota, T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 137-164. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134921>
- Ghorbanpour, M., Hatami, M. & Khavazi, K. (2013a). Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*, 37(3), 350-360. <https://doi.org/10.3906/biy-1209-12>
- Ghorbanpour, M., Omid, M., Etminan, A., Hatami, M. & Shooshtari, L. (2013b). *In vitro* hyoscyamine and scopolamine production of black henbane (*Hyoscyamus niger*) from shoot tip culture under various plant growth regulators and culture media. *Trakia Journal of Sciences*, 2, 125-134.
- Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I.D., Nandi, S.K., Rawal, R.S. & Pande, V. (2012). *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *habenaria edgeworthii*: a rare himalayan medicinal orchid. *Industrial Crops and Products*, 39, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.024>
- González García, M. P., Vilarrasa Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora García, S., Russinova, E. & Caño Delgado, A.I. (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *arabidopsis* roots. *Development*, 138(5), 849-859. <https://doi.org/10.1242/dev.057331>
- Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen Jr, J. D. & Cook Jr, J. C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, 281(5728), 216. <https://doi.org/10.1038/281216a0>
- Gryniewicz, G. & Gadzikowska, M. (2008). Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacological Reports*, 60(4), 439. <https://doi.org/10.1002/chin.200940262>
- Guan, M. & Roddick, J.G. (1988). Epibrassinolide-inhibition of development of excised, adventitious and intact roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*): comparison with the effects of steroidal estrogens. *Physiologia Plantarum*, 74(4), 720-726. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb02043.x>
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. & Zenk, M.H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 2389-2393. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2389>

- Hank, H. László I., Bálványos I., Tóth E., Kursinszki L., Kovács G. & Szők, É. (2003). Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of hairy root cultures. *Acta Horticulturae*, 597, 271-274. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.597.39>
- Harrison, A.P. & Bartels, E.M. (2006). A modern appraisal of ancient etruscan herbal practices. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1, 26-29. <https://doi.org/10.3844/ajptsp.2006.26.29>
- Hashimoto, T. & Yamada Y. (1987a). Purification and characterization of hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase from root cultures of *Hyoscyamus niger* L. *The FEBS Press Journal*, 164(2), 277-285. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11055.x>
- Hashimoto, T. & Yamada, Y. (1987b). Effects of culture conditions on tropane alkaloid formation in *Hyoscyamus niger* suspension cultures. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(10), 2769-2774. <https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868463>
- Hashimoto, T., Yukimune, Y. & Yamada, Y. (1986). Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *Journal of Plant Physiology*, 124(1-2), 61-75. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80178-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80178-X)
- Hashimoto, T., Yun, D. J. & Yamada, Y. (1993). Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochemistry*, 32(3), 713-718. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95159-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95159-8)
- Ho, T.T., Lee, J.D., Ahn, M.S., Kim, S.W. & Park, S.Y. (2018). Enhanced production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* and its metabolite discrimination using hplc and ft-ir methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9563-9575. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9359-9>
- Hu, Y., Xia, S., Su, Y., Wang, H., Luo, W., Su, S., Xiao, L., 2016. Brassinolide increases potato root growth *in vitro* in a dose-dependent way and alleviates salinity stress. *Biomed Research International*, 2016, 11. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8231873>
- İbrahim, A.I., Abd El Kawi M., Nower A., Abdel Motaal A. & Abd El Aal A. (2009). Alkaloid production and organogenesis from callus of *Hyoscyamus muticus* L. *In vitro*. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(1), 82-92.
- Jakabová, S., Vincze, L., Farkas, Á., Kilár, F., Boros, B. & Felinger, A. (2012). Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography–mass spectrometry in plant organs of *datura* species. *Journal Of Chromatography*, 1232, 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.036>

- Jaremicz, Z., Luczkiewicz, M., Kokotkiewicz, A., Krolicka, A. & Sowinski, P. (2014). Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors. *Biotechnology letters*, 36(4), 843-853. doi:10.1007/s10529-013-1426-9
- Jassbi, A.R., Miri, R., Masroorbabanari, M., Asadollahi, M., Attarroshan, M. & Baldwin, I.T. (2014). Hplc-dad-esıms analyses of *Hyoscyamus niger* and *H.reticulatus* for their antioxidant constituents. *Austin Chromatography*, 1(5), 1022.
- Jones, A.M.P., Saxena, P.K. & Murch, S.J. (2009). Elicitation of secondary metabolism in *Echinacea purpurea* l. by gibberellic acid and triazoles, *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 205-210. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800104>
- Jung, H.Y., Kang, S.M., Kang, Y.M., Kanga M.J., Yun D.J., Bahk J.D., Yang J.K. & Choi, M.S. (2003). Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 987-990.
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S. & Cabaroğlu, T. (2006). Bazı Üzümsü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri. II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, 14-16 Eylül, Tokat, 309-312.
- Kai, G., Yang, S., Zhang, Y., Luo, X., Fu, X., Zhang, A. & Xiao, J. (2012). Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 1721-1729. <https://doi.10.1007/s11033-011-0912-1>
- Kang, S.M., Jung, H.Y., Kanga, Y.M., Yun, D.J., Bahk, J.D., Yang, J.K. & Choi, M.S. 2004. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of *pmt* and *h6h* in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science*, 166, 745-751. <https://doi.10.1016/j.plantsci.2003.11.022>
- Karlıdag, H., Yildirim, E. & Turan, M. (2011). Role of 24-epibrassinolide in mitigating the adverse effects of salt stress on stomatal conductance, membrane permeability, and leaf water content, ionic composition in salt stressed strawberry (*fragaria* × *ananassa*). *Scientia Horticulturae*, 130, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.025>
- Kartal, G., Temel, A., Arıcan, E. & Gozukırmızı, N. (2009). Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division. *Plant Growth Regulation*, 58(3), 261-267. <https://doi.10.1007/s10725-009-9374-z>
- Khater, M.A. & Elashtokhy, M.M.A. (2015). Effect of growth regulators on *in vitro* production of *Hyoscyamus aureus* L. and tropane alkaloids. *International Journal of ChemTech Research*, 8(11), 113-119.

- Khripach, V., Zhabinskii, V. & De Groot, A. (2000). Twenty years of brassinosteroids:steroidal plant hormones warrant better crops for the xx1 century. *Annals of Botany*, 86(3), 441-447. <https://doi.10.1006/anbo.2000.1227>
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X. & Rajapakse, N.C. (2006). Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* l.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2327-2332. <https://doi.10.1021/jf051979g>
- Kim, H.J., Fonseca, J.M., Choi, J.H. & Kubota, C. (2007). Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10366-10372. <https://doi.10.1021/jf071927m>
- Koul, S., Auja, A. & Grewal, S. (1986). Growth and alkaloid production in suspension cultures of *Hyoscyamus muticus* as influenced by various cultural parameters. *Planta Medica*, 47(1), 11–16. doi:10.1055/s-2007-969939
- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszevska, T., Stochmal, A. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.025>
- Kumar, P., Srivastava, V., Chaturvedi, R., Sundar, D. & Bisaria, V.S. (2017). Elicitor enhanced production of protoberberine alkaloids from *in vitro* cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia* (willd.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130(2), 417-426. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1237-0>
- Lee, K.T., Hirano, H., Yamakawa, T., Kodama, T., Igarashi, Y. & Shimomura, K. (2001). Reresponses of transformed root culture of *Atropa belladonna* to salicylic acid stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(6), 586-589. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80178-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80178-X)
- Li, L. & Van Staden, J. (1998). Effect of plant growth regulators on the antioxidative system in callus of two maize cultivars subjected to water stres. *Plant growth regulators*, 24, 55-66. <https://doi.10.1023/A:1005954532397>
- Li, X., Ahammed, G.J., Li, Z.X., Zhang, L., Wei, J.P., Shen, C. & Han, W.Y. (2016). Brassinosteroids improve quality of summer tea (*Camellia sinensis* L.) by balancing biosynthesis of polyphenols and amino acids. *Frontiers in Plant Science*, 30(7), 1304. <https://doi.10.3389/fpls.2016.01304>
- Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., Zhang, Z. H., Zu, Y.G., Efferth, T. & Tang, Z.H. (2016). The combined effects of ethylene and meja on metabolic profiling of phenolic compounds in *Catharanthus roseus* revealed by a metabolomics analysis. *Frontiers in Physiology*, 7, 217. <https://doi.10.3389/fphys.2016.00217>

- Lounasmaa, M., & Tamminen, T. (1993). The tropane alkaloids. In *the Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. (pp. 1-114)
- Lunga, I.P., Kintia, S.S., Bassarella, S. & Pizzat, C. 2008. Steroidal saponins from the seeds of *Hyoscyamus niger*. *Chemistry Journal of Moldova*, 3, 89–93. [https://doi.org/10.19261/cjm.2008.03\(1\).10](https://doi.org/10.19261/cjm.2008.03(1).10)
- Ebadi, M. (2007). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. 2nd Ed., CRC Press.
- Ma, C.Y., Liu, W.K. & Che, C.T. (2002). Lignanamides and nonalkaloidal components of *Hyoscyamus niger* seeds. *Journal of Natural Products*, 65(2), 206-209. <https://doi.org/10.1021/np010073b>
- Mammadov, R. (2014). *Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler*. Nobel Yayınları
- Mandava, N.B. (1988). Plant growth-promoting brassinosteroids. annual review of *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 23-52. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.000323>
- Marakli, S., Temel, A. & Gozukirmizi, N. (2014). Salt stress and homobrassinosteroid interactions during germination in barley roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(2), 446-452. doi: <https://doi.org/10.15835/nbha4229461>
- Matkowski, A. (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants: a review. *Biotechnology Advances*, 26, 548-560. doi: [10.1016/j.biotechadv.2008.07.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001)
- Matsuda, F., Morino, K., Ano, R., Kuzawa, M., Wakasa, K. & Miyagawa, H. (2005). Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue. *Plant and Cell Physiology*, 46(3), 454-466. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci042>
- Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T. & Yamada, T. (1991). Cultured Roots of *Hyoscyamus niger*. *Journal of Biology Chemistry*, 25(15), 460-464.
- Matsuya, Y., Masuda, S., Ohsawa, N., Adam, S., Tschamber, T., Eustache, J., Kamoshita, K., Sukenaga, Y. & Nemoto H. (2005). Synthesis and antitumor activity of the estrane analogue of *osw-1*. *European Journal of Organic Chemistry*, 5, 803-808. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200400632>
- Melchers, G. (1939). The flowering hormones. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 57, 29-48.
- Mendoza, D., Cuaspu, O., Arias, J. P., Ruiz, O. & Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, 19, 273. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00273>



- Michelini, F.M., Ramírez, J. A., Berra, A., Galagovsky, L. R. & Alché, L.E. (2004). *In vitro* and *in vivo* antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues. *Steroids*, *69* (11-12), 713-720. <https://doi.10.1016/j.steroids.2004.04.011>
- Mirjalili, N. & Linden, J.C. (1996). Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models. *Biotechnology Progress*, *12*(1), 110-118. <https://doi.10.1021/bp9500831>
- Moharrami, F., Hosseini B., Sharafi A. & Farjaminezhad, A. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *in vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, *53*(2), 104-11. <https://doi.10.1007/s11627-017-9802-0>
- Morishita, D.W. (1991). *Black henbane: importance distribution, and control*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *2*, 14.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E. & Zenk, M.H. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*, 7490-7494. <https://doi.10.1073/pnas.90.16.7490>
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco tissue* cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 472-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Muthulakshmi, S. & Pandiyarajan, V. (2015) Influence of brassinosteroids (brs) on the vincristine content of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *European Journal of Experimental Biology*, *5*(10), 54-56.
- Müssig, C., Shin, G.H. & Altmann, T. (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *133*(3), 1261-1271. <https://doi.10.1104/pp.103.028662>
- Naeem, M., Idrees, M., Alam, M.M., Aftab, T. & Khan, M.M.A. (2012). Brassinosteroid-mediated enrichment in yield attributes, active constituents and essential oil production in *Mentha arvensis* L. *Russian Agricultural Sciences*, *38*(2), 106-113. <https://doi.10.3103/S1068367412020176>
- Napoleao, T.A., Soares, G., Vital, C.E., Bastos, C., Castro, R., Loureiro, M.E. & Giordano, A. (2017). Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *brachypodium distachyon*. *Plant Science*, *263*, 46-54. <https://doi.10.1016/j.plantsci.2017.06.014>.

- Noir, S., Bömer, M., Takahashi, N., Ishida, T., Tsui, T. L., Balbi, V. & Devoto, A. (2013). Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. *Plant Physiology*, *161*(4), 1930-1951. <https://doi.org/10.1104/pp.113.214908>
- Ogata, A., Tsuruga, A., Matsuno, M. & Mizukami, H. (2004). Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Thospermum rrythrorhizon* cell suspension cultures: activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome p450-catalyzed hydroxylations. *Plant Biotechnology*, *21*(5), 393-396. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.393>
- Oğuz, A. (2008). Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri. (Yüksek Lisans Tezi Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Oh, M.H. & Clouse, S.D. (1998). Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports*, *17*(12), 921-924. <https://doi.org/10.1007/s002990050510>
- Oksman Caldentey, K.M. & Hiltunen, R. (1996). Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crops Research*, *45*(1-3), 57-69. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(95\)00059-3](https://doi.org/10.1016/0378-4290(95)00059-3)
- Oksman Caldentey, K. M. & Strauss, A. (1986). Somaclonal variation of scopolamine content in protoplast-derived cell culture clones of *Hyoscyamus muticus*. *Planta Medica*, *52*(1), 6-12. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969053>
- Patil, A.D., Patil, A. Y., & Raje, A. A. (2013). Antidepressant like property of *Hyoscyamus niger* linn. in mouse model of depression. *innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy*, *1*, 60-69.
- Paulsen, B. S., (2010). Highlights through the history of plant medicine. *Bioactive Compounds in Plants-Benefits And Risks For Man And Animals*, (pp.18-29)
- Pavlov, A.I., Georgiev, V.G., Marchev A. S. & Berkov, S H., (2009). Nutrient medium optimization for hyoscyamine production in diploid and tetraploid *Datura stramonium* l. hairy root cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(12), 2239. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0131-2>
- Pitta Alvarez, I., Spollansky, T.C. & Giulietti, A.M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, *26*(2-4), 252- 258. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00137-4)
- Pokorny, M. & Mangold, J., (2010). *Montguide: black henbane: identification, biology and integrated management*. The US Department of Agriculture (USDA) Msuamsue, 5-17.
- Pudersell, K., Vardja, T., Vardja, R., Matto, V., Arak, E. & Raal, A. (2012). Inorganic ions in the medium modify tropane alkaloids and riboflavin output in

- Hyoscyamus niger* root cultures. *Pharmacognosy Magazine*, 8(29), 73. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.93330>
- Rao, S. R. & Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)
- Raman, P., Patino, L.C. & Nair, M.G. (2004). Evaluation of metal and microbial contamination in botanical supplements. *Journal Of Agricultural and Food chemistry*, 52(26), 7822-7827. <https://doi.org/10.1021/jf049150+>
- Reyes Díaz, M., Lobos, T., Cardemil, L., Nunes Nesi, A., Retamales, J., Jaakola, L. & Ribera Fonseca, A. (2016). Methyl jasmonate: an alternative for improving the quality and health properties of fresh fruits. *Molecules*, 21(6), 567. <https://doi.org/10.3390/molecules21060567>
- Robins, R. J., Parr, A.J. & Walton, N.J. (1991). Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures: 2. On the relative contributions of L-arginine and L-ornithine to the formation of the tropane ring. *Planta*, 183(2) 196-201. <https://doi.org/10.1007/BF00197788>
- Roddick, J.G., Rijnenberg, A.L. & Ikekawa, N. (1993). Developmental effects of 24-epibrassinolide in excised roots of tomato grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 87(4), 453-458. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb02493.x>
- Sáenz Carbonell, L. & Loyola Vargas, V.M. (1997). *Datura stramonium* hairy roots tropane alkaloid content as a response to changes in Gamborg's B5 medium. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 61(3), 321-337. <https://doi.org/10.1007/BF027878057>
- Saini, S., Sharma, I. & Pati, P.K. (2015). Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks. *Frontiers in Plant Science*, 6, 950. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00950>
- Sasse, J.M. (2003). Physiological actions of brassinosteroids: an update. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(4), 276-288. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0062-3>
- Serna, M., Hernández, F., Coll, F., Coll, Y. & Amorós, A. (2013). Effects of brassinosteroid analogues on total phenols, antioxidant activity, sugars, organic acids and yield of field grown endive (*Cichorium endivia* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1765-1771. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5968>
- Sevon, N., Biondi, S., Bagni, N. & Oksman Caldentey, K.M. (2001). Transgenic *Hyoscyamus muticus* (Egyptian henbane). In *Transgenic Crops III* 171-200. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-10603-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-662-10603-7_13)

- Shahzad, B., Tanveer, M., Che, Z., Rehman, A., Cheema, S. A., Sharma, A. & Zhaorong, D. (2018). Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 935-944. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.066>
- Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Asghari, G. & 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(1), 111-118. <https://doi.10.3906/biy-1405-25>
- Shukla, P. & S.P., Misra, (2001). An Introduction to Taxonomy of Angiosperms. New Delhi, (pp.447-450).
- Singleton, V. L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sirvent, T. & Gibson, D. (2002). Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(6), 311-320. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0410>
- Skrzypczak Pietraszek, E., Słota, J. & Pietraszek, J. (2014). The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. *Acta Biochimica Polonica*, 61(1), 47-53. [https://doi.org/10.18388/abp.2014\\_1922](https://doi.org/10.18388/abp.2014_1922)
- Sökmen, A. & Gürel, E. (2002). *Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Konya, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Spollansky, T.C., Pitta Alvarez, S.I. & Giulietti, A.M. (2000). Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1), 31-32. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582000000100006>
- Stöckigt, J., Obitz, P., Falkenhagen, H., Lutterbach, R. & Endress, S. (1995). Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/BF00052163>
- Supria, K.B., Szoke, E., Toth, K., Laszlo, I. & Kursinszki, L. (1998). Investigation of tropane alkaloids in genetically transformed *Atropa belladonna* L. cultures. *Chromatographia*. 60, 555-559. <https://doi.org/10.1365/s10337-004-0240-x>
- Suresh, B. & Ravishankar, G.A. (2005). Methyl jasmonate modulated biotransformation of phenylpropanoids to vanillin related metabolites using *Capsicum frutescens* root cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(2), 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.01.006>

- Swamy, K.N. & Rao, S.S R. (2011). Effect of brassinosteroids on the performance of coleus (*Coleus forskohlii*). *Journal f Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 17(1), 12-20. <https://doi.org/10.1080/10496475.2011.556985>
- Terakado, J., Yoneyama, T. & Fujihara, S. (2006). Shoot-applied polyamines suppress nodule formation in soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology*, 163(5), 497-505. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.05.007>
- Tytgat, G. N. (2007). Hyoscine Butylbromide. *Drugs*, 67(9), 1343-1357. DOI <https://doi.org/10.2165/00003495-200767090-00007>
- Vallabi, D.E. & Elango, V. (2016). Preliminary studies on cardio protective effect of *Hyoscyamus niger* Linn in male albino rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(7), 860-864.
- Vanhala, L., Eeva, M., Lapinjoki, S., Hiltunen, R. & Oksman-Caldentey, K M. (1998). Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Plant Physiology*, 153(3-4), 475-481. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80177-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80177-6)
- Mulabagal, V. & Tsay, H.S. (2004). Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering Research*, 2(1), 29-48.
- Vardhini, B.V. & Anjum, N.A. (2015). Brassinosteroids make plant life easier under abiotic stresses mainly by modulating major components of antioxidant defense system. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 67. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00067>
- Vardhini, B. V., Anuradha, S. & Rao, S.S.R. (2006). Brassinosteroids-New class of plant hormone with potential to improve crop productivity. *Indian Journal of Plant Physiology*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00067>
- Vardhini, B. V., Sujatha, E. & Rao, S.S.R. (2011). Studies on the effect of brassinosteroids on the qualitative changes in the storage roots of radish. *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 5(1), 27-30.
- Vardhini, B. V. & Rao, S.S. R. 2001. Effect of brassinosteroids on growth and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under field conditions. *he Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America*, 24, 101-106.
- Verma, A., Malik, C.P. & Gupta, V.K. (2011). *In vitro* effects of brassinosteroids on the growth and antioxidant enzyme activities in groundnut. *ISRN Agronomy*, 2012. <https://doi.10.5402/2012/356485>

- Wang, J., Qian, J., Yao, L. & Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40643-014-0033-5>
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- Wu, X.X., Ding, H. D., Zhu, Z.W., Yang, S.J. & Zha, D.S. (2012). Effects of 24-epibrassinolide on photosynthesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings under salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 11(35), 8665-8671. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3416>
- Xi, Z. M., Zhang, Z. W., Huo, S. S., Luan, L.Y., Gao, X., Ma, L.N. & Fang, Y.L. (2013). Regulating the secondary metabolism in grape berry using exogenous 24-epibrassinolide for enhanced phenolics content and antioxidant capacity. *Food chemistry*, 141(3), 3056-3065. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.137>
- Xia, X. J., Huang, Y. Y., Wang, L., Huang, L.F., Yu, Y.L., Zhou, Y. H. & Yu, J. Q. (2006). Pesticides-induced depression of photosynthesis was alleviated by 24-epibrassinolide pretreatment in *Cucumis sativus* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(1), 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.005>
- Xu, F., Gao, X., Xi, Z.M., Zhang, H., Peng, X. Q., Wang, Z. Z. & Meng, Y. (2015). Application of exogenous 24-epibrassinolide enhances proanthocyanidin biosynthesis in *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon'berry skin. *Plant growth regulation*, 75(3), 741-750. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9976-y>
- Yang, C. J., Zhang, C., Lu, Y. N., Jin, J. Q. & Wang, X.L. (2011). The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development. *Molecular Plant*, 4(4), 588-600. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr020>
- Yiğenoğlu, A. (2007). *Eser Element Tayini ile Banotu Bitkisinin Yetiştirildiği Bölgenin Tahmini*. (Yüksek Lisans Tezi Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Yokota, T. (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends In Plant Science*, 2(4), 137-143. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01017-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01017-0)
- Yu, J. Q., Huang, L.F., Hu, W.H., Zhou, Y.H., Mao, W.H., Ye, S. F. & Nogués, S. (2004). A role for brassinosteroids in the regulation of photosynthesis in *Cucumis sativus*. *Journal Of Experimental Botany*, 55(399), 1135-1143. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh124>

- Zayed, R. & Wink, M. (2004). Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(11-12), 863-867. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-11-1216>
- Zabetakis, I., Edwards, R. & O'Hagan, D. (1999). Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 50(1), 53-56. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00490-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00490-7)
- Zeneli, G., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T. Gershenzon, J. (2006). Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiology*, 26(8), 977-988. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.8.977>
- Zeynali, Z., Hosseini, B. & Rezaei, E. (2016). Effect of elicitation on antioxidant activity and production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus reticulatus* hairy root cultures. *Research Journal of Pharmacognosy*, 3(3), 43-53
- Zhao, G.Q., Ma, B.L. & Ren, C.Z. (2007). Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, and ion content of naked oat in response to salinity. *Crop science*, 47(1), 123-131. <https://doi.10.2135/cropsci2006.06.0371>
- Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R.J., Decker, A.D., Tax, F E., Li, J. (2002). Two putative *BIN2* substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant physiology*, 130(3), 1221-1229. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.102.010918>
- Zimare, S.B. & Malpathak, N.P. (2011). Production of hyoscyamine and scopolamine using stress in *Datura metel* L. *BioTechnology: An Indian Journal*, 5, 316-322.
- Zolala, J., Farsi, M., Gordan, H. R. & Mahmoodnia, M. (2007). Producing a high scopolamine hairy root clone in *Hyoscyamus muticus* through transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 9, 327-339.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : İlknur ALBAYRAK

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1992

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ilknuralbayrakk@outlook.com

### **Eğitim Durumu**

Lise : Turgutlu Lisesi, 2010

Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü