

**T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİYAH BANOTU (*Hyoscyamus niger*)'NA AİT HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE İMMOBİLİZASYON TEKNİĞİ VE DIŞSAL
UYGULAMALARLA TROPAN ALKALOİDLERİ İLE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN ÜRETİMİNİN ARTIRILMASI**

Serdar ÖZMEN

**Danışman
Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR**

ISPARTA – 2019



© 2019 [Serdar ÖZMEN]

TEZ ONAYI

**SİYAH BANOTU (*Hyoscyamus niger*)'NA AİT HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE İMMOBİLİZASYON TEKNİĞİ VE DIŞSAL
UYGULAMALARLA TROPAN ALKALOİDLERİ İLE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN ÜRETİMİNİN ARTIRILMASI**

Serdar ÖZMEN tarafından hazırlanan bu tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** 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. Rağbet Ezgi DURAN
	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, tezime 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.

16/07/2019

Serdar ÖZMEN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Siyah Banotu (<i>Hyoscyamus niger</i> L.)'nun Yayılışı ve Botanik Özellikleri.....	4
2.2. Siyah Banotu Bitkisinde Bulunan Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları .	6
2.3. Siyah Banotu Bitkisinde <i>In Vitro</i> Sekonder Metabolit Üretiminin Önemi.....	8
2.4. Bitki Hücrelerinin İmmobilizasyonu	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Tohumlara GA ₃ uygulamasının yapılması	24
3.2.2. Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirilmesi.....	24
3.2.3. Kallus kültürlerinin elde edilmesi ve çoğaltılması.....	25
3.2.4. İmmobilizasyon işleminin yapılması	26
3.2.5. İmmobilize edilmiş hücrelere MeJA ve 24-eBL uygulamalarının yapılması ..	27
3.2.6. Hücre büyümesine ilişkin yapılan incelemeler	27
3.2.6.1. Yaş hücre ağırlığının belirlenmesi	27
3.2.6.2. Kuru hücre ağırlıklarının belirlenmesi.....	28
3.2.6.3. Hücre büyüme indeksinin belirlenmesi.....	28
3.2.7. Siyah banotu hücrelerinde metabolit ekstraksiyonlarının yapılması	28
3.2.8. Tropan alkaloidlerinin belirlenmesi	29
3.2.9. Toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi.....	29
3.2.10. Fenolik bileşenlerin HPLC ile belirlenmesi.....	29
3.2.11. İstatistik analizler	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Yaş Hücre Ağırlığı Üzerine Etkileri.....	31
4.2. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Kuru Hücre Ağırlığı Üzerine Etkileri	32
4.3. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Hücre Büyüme İndeksi Üzerine Etkileri	33
4.4. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Skopolamin Miktarı Üzerine Etkileri.....	34
4.5. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Hiyosiyamin Miktarı Üzerine Etkileri.....	35
4.6. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Toplam Fenolik Madde Miktarı Üzerine Etkileri.....	36
4.7. 24-eBL ve MeJA Uygulamalarının Fenolik Bileşiklerin Birikimi Üzerine Etkileri.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	70

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SİYAH BANOTU (*Hyoscyamus niger*)'NA AİT HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE İMMOBİLİZASYON TEKNİĞİ VE DIŞSAL UYGULAMALARLA TROPAN ALKALOİDLERİ İLE FENOLİK BİLEŞİKLERİN ÜRETİMİNİN ARTIRILMASI

Serdar ÖZMEN

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

Bu araştırma siyah banotu (*Hyoscyamus niger*) bitkisine ait immobilize edilmiş hücrelere uygulanan 24-epibrassinolid (24-eBL) ile metil jasmonat (MeJA)'ın hücre gelişimi ile sekonder metabolit birikimi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki 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 kalsiyum aljinat ile immobilize edilmiş hücrelere 30 gün boyunca uygulanmıştır. Hasat sonrasında uygulamalara göre immobilize hücreler, yaş hücre ağırlığı, kuru hücre ağırlığı, hücre büyüme indeksi ile tropan alkaloidlerinden hiyosiyamin ve skopolamin ile fenolik madde içerikleri bakımından değerlendirilmiştir.

Araştırma sonucunda en yüksek yaş ve kuru hücre ağırlığı ile hücre büyüme indeksi için 2 mg/l 24-eBL; skopolamin ve hiyosiyamin için 0.5 mg/l 24-eBL; fenolik bileşikler için de 1mM MeJA'nın 24-eBL ile yapmış olduğu ikili kombinasyonların en etkili uygulamalar olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak 24-eBL ve MeJA uygulamalarının siyah banotuma ait immobilize hücre kültürlerinde tropan alkaloidleri ile fenolik bileşiklerin üretimini artırmaya yönelik olarak başarı ile kullanılabilceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenolik bileşikler, *Hyoscyamus niger*, İmmobilizasyon, Metil jasmonat, Tropan alkaloidleri, 24-epibrassinolid

2019, 70 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

IMMOBILIZATION TECHNIQUE IN THE CELL CULTURES OF BLACK HENBANE (*Hyoscyamus niger*) AND INCREASING THE PRODUCTION OF PHENOLIC COMPOUNDS WITH TROPAN ALKALOIDS WITH EXTERNAL APPLICATIONS

Serdar ÖZMEN

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

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

This study was carried out to determine the effects of 24-epibrassinolide (24-EBL) and methyl jasmonate (MeJA) applications on the cell growth and secondary metabolite accumulation of immobilized cells in black henbane (*Hyoscyamus niger*). For this purpose, different concentrations of 24-eBL (0.5, 1 and 2 mg/l) were applied to immobilized cells covered calcium alginate beads alone or the combination of 1 mM MeJA for 30 days. After harvest, immobilized cells were evaluated for fresh cell weight, dry cell weight, cell 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 cell growth parameters while 0.5 mg/l of 24-eBL for scopolamine and hyoscyamine. On the other hand, 1 mM MeJA with 24-eBL gave the maximum values for phenolics. 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 immobilized cells of black henbane.

Key Words: *Hyoscyamus niger*, Immobilization, Methyl jasmonate, Phenolic compounds, Tropane alkaloids, 24-epibrassinolide

2019, 70 pages

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma konusunu belirleyen, fikirlerini, her tŸrlŸ ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. NilgŸn GÖKTŸRK BAYDAR'a sonsuz teŐekkŸrlerimi sunarım.

ÇalıŐmalarım sırasında HPLC metodu ile sekonder metabolitlerin ŐlŸmŸ aŐamasındaki yardımlarından dolayı Dr. Őęr. Őyesi Tunhan DEMİRCİ'ye, laboratuvar alıŐmamalarım sırasındaki yardımlarından dolayı arkadaŐım Zir. MŸh. İlknur ALBAYRAK'a ve bŸlŸmŸmŸz Őęretim elemanlarından Dr. Őzlem ARAS AŐCI'ya teŐekkŸr ederim.

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

Serdar ÖZMEN
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Siyah banotu bitkisi	5
Şekil 2.2. Tropan alkaloidlerinin biyosentezi	7
Şekil 2.3. Hücrelerin aljinat ile tutuklanması.....	12
Şekil 3.1. Besin ortamlarına ekilmiş tohumlar (a) ile ekimden 15 gün sonra çimlenmiş bitkicikler (b)	25
Şekil 3.2. Dört haftalık siyah banotu bitkileri	25
Şekil 3.3. Besin ortamlarına dikilmiş yaprak sapı eksplantları (a) ile bunlardan oluşan adventif kökler (b).....	26
Şekil 3.4. Jel boncuklarının oluşturulması (a) CaCl ₂ çözeltisinde sertleştirilen jel boncukları (b)	26
Şekil 4.1. 24-eBLve MeJA uygulamalarının yaş hücre ağırlığı üzerine etkileri	31
Şekil 4.2. 24-eBLve MeJA uygulamalarının kuru hücre ağırlığı üzerine etkileri	32
Şekil 4.3. 24-eBLve MeJA uygulamalarının hücre büyüme indeksi üzerine etkileri	33
Şekil 4.4. 24-eBLve MeJA uygulamalarının skopolamin miktarı üzerine etkileri	34
Şekil 4.5. 24-eBLve MeJA uygulamalarının hiyosiyamin üzerine etkileri.....	35
Şekil 4.6. 24-eBLve MeJA uygulamalarının toplam fenolik madde miktarı üzerine etkileri	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Araştırmada yapılan uygulamalar	27
Çizelge 3.2. Tropan alkaloidlerinin HPLC ile belirlenmesinde kullanılan parametre ve gradient programı	29
Çizelge 3.3. Fenolik bileşiklerin HPLC analizlerinde kullanılacak parametre ve gradient programı	30
Çizelge 4.1. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının fenolil bileşik üzerine etkisi	39



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASA	Asetil salisilik asit
ABA	Absisik asit
AgNO ₃	Gümüş nitrat
AlCl ₃	Alüminyum klorür
BA	Benzil adenin
BR	Brassinosteroid
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
GA ₃	Giberellik asit
<i>h6h</i>	Hiyosiyamin 6β-hidroksilaz
HgCl ₂	Cıva klorür
IAA	İndol asetik asit
IBA	İndol bütirik asit
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
M	Mol
MeJA	Metil jasmonat
Mg	Miligram
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
ml	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimol
MS	Murashige ve Skoog
NAA	Naftalen asetik asit
NO ₃ ⁻	Nitrat
ODC	Ornitin dekarboksilaz
PAL	Fenilalanin amonyum-liyaz
PMT	Putresin N-metiltransfaz
ppm	Milyonda bir birim
SA	Salisilik asit
SAM	S-adenozil metiyonin
2,4-D	2,4 diklorofenoksi asetik asit
24-eBL	24-Epibrassinolid
µm	Mikromol

1. GİRİŞ

Siyah banotu (*Hyoscyamus niger* L.), patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasına ait hiyosiyamin ve skopolamin başta olmak üzere tropan alkaloidlerince zengin tıbbi bir bitkidir (Cüneyt vd., 2004). Tropan alkaloidleri içinde yer alan hiyosiyamin ve skopolamin midriatik, antikolinergik, antispazmodik, analjezik ve sedatif etkileri nedeniyle tıbbi ilaçların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Supria vd., 1998; Tytgat, 2007). Bitkinin köklerinde sentezlenen bu metabolitlerin bitki bünyesindeki miktarları son derece düşük olup, bu nedenle oldukça pahalı ve ekonomik önemi yüksek metabolitlerdir. Farmakolojik etkilerinin yüksek, yan etkilerinin düşük olması nedeniyle tıbbi ilaçların yapımında tercih edilen bu alkaloidleri (Drager, 2002) elde etmek için siyah banotu, yabancı olarak doğadan toplandığı gibi, Kuzey Afrika ve Orta Avrupa ülkelerinde kültürü de yapılmaktadır (Baydar, 2013).

Ticari olarak önemli olan bu sekonder metabolitlerin üretimi bitki genetik özellikleri tarafından kontrol edilmesine rağmen, biyotik ve abiyotik faktörler, beslenme gibi farklı etkenler de tropan alkaloidlerinin üretimini artırma ya da inhibe etme yönünde etkide bulunabilmektedir (De-Baricevic vd., 1999; Ghorbanpour vd., 2013). Kimyasal yapılarının karmaşıklığı ve biyosentez yolunun uzun olmasından dolayı, tropan alkaloidlerinin sentetik üretimi, bitki organlarından ekstraksiyonlarına göre daha pahalı olmaktadır (Huang vd., 2005). Bu nedenle, artan ihtiyaçların karşılanması için tropan alkaloidlerinin üretiminde alternatif yöntemlerin geliştirilmesi büyük önem taşımakta olup (Kai vd., 2007), *in vitro* sekonder metabolit üretim teknikleri de özellikle son yıllarda bu konuda üzerinde en çok durulan tekniklerin başında gelmektedir. *In vitro* sekonder metabolit üretiminde, fizyolojik süreçleri uyararak bu metabolitlerin birikimini artıran dışsal uygulamalar, sekonder metabolitlerin *in vitro* üretiminin geliştirilmesine yönelik önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir (Ajungla vd., 2009, Spollansky vd., 2000; Namdeo, 2007; Vanhala, 1998). Bu amaçla besin ortamlarının bileşiminde ve kültür şartlarında yapılan değişiklikler, öncül madde kullanımı, abiyotik ve biyotik stres uygulamaları *in vitro* koşullarda metabolit verimini artırmada kullanılabilir dışsal uygulamalar arasında sayılabilmektedir. Nitekim farklı bitkilerde alkaloid birikimini artırmak amacıyla büyüme düzenleyici madde kullanımı, besin ortamında yapılan

değişiklikler, biyotik ve abiyotik elisitörlerin başarı ile kullanılabilceği daha önce yapılan bazı çalışmalarla da tespit edilmiştir (Belabbasi vd., 2016; Hashimoto ve Yamada, 1987a; Shakeran vd., 2015; Zabetakis vd., 1999; Zeynali vd., 2016).

In vitro sekonder metabolit üretiminde metabolit verimini artırmak amacıyla kullanılabilcek bir diğcr uygulama da bitki hücrelerinin uygun bir matriste sabitlendiği immobilizasyon tekniğidir (Pras ve Woerdenbag, 1999). Alkaloidlerin üretiminde ilk immobilizasyon çalışması Bredelius vd. (1979), tarafından noni (*Morinda citrifolia*), yüksük otu (*Digitalis purpurea*) ve pervane çiçeği (*Catharanthus roseus*) bitkilerine ait hücre kültürlerinde gerçekleştirilmiştir. Serbest haldeki bitki hücreleri çoğunlukla sekonder metabolitleri, büyümelerinin durduğu noktada, büyüme döngüsünün durağan fazında biriktirmektedirler. Bitki hücrelerinin immobilize edilmesi, sekonder metabolitlerin üretimini artırmak için büyümenin sabit kalacağı koşulları yaratmak için kullanılan bir tekniktir (Pras ve Woerdenbag, 1999).

Tropan alkaloidlerini içeren birçok farklı bitki türünde hücre süspansiyon kültürleri yaygın olarak kullanılırken (Ballica vd., 1993; Zimare ve Malpathak, 2011; Bosila vd., 2016), ayrıntılı literatür çalışmaları sonucunda, siyah banotunda hücre süspansiyon kültürleri ile ilgili çalışmaların yok denecek kadar az (Yamada ve Hashimoto, 1982; Aljibouri vd., 2012), immobilizasyon tekniğinin ise daha önce bu türde hiç kullanılmadığı görülmektedir. Buradan da anlaşılmaktadır ki hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak, son derece önemli farmakolojik etkileri olan siyah banotunda bulunan tropan alkaloidlerinin miktarını artırmak için birçok çalışma yapılması gerekmektedir. Kaldı ki siyah banotunda tropan alkaloidleri yanında farklı fenolik bileşiklerin de bulunduğu bildirilmektedir (Lunga vd., 2008). Buna karşın siyah banotunda fenolik bileşiklerin miktarını belirlemeye ve bunları artırmaya yönelik hiçbir çalışmanın da yapılmadığı görülmektedir. Oysa fenolik bileşikler de özellikle sağlık üzerine olan önemli etkileri ile son derece değerli bir diğcr metabolit grubunu oluşturmaktadır (Basu ve Bhuyan, 2017).

Bu tez çalışması, siyah banotu bitkisine ait immobilize edilmiş hücre kültürlerinde MeJA ve 24-eBL'den oluşan dışsal uygulamaların tropan alkaloidleri ile fenolik bileşiklerin sentezi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Siyah Banotu (*Hyoscyamus niger* L.)'nun Yayılışı ve Botanik Özellikleri

Solanaceae familyası genel olarak 94 cins ve 2950 türü içermektedir (Drager, 2004). Bu aile içerisinde ekonomik, tarımsal ve farmasötik açıdan son derece önemli cinsler bulunmakta olup (Wink, 2003), *Hyoscyamus* cinsi de bunlardan biridir. Türkiye florasında *H. albus* L. (beyaz banotu), *H. aureus* L. (sarı banotu), *H. leptocalyx* Staff. (Mardin banotu), *H. Niger* L. (siyah banotu), *H. Pusillus* L. (cüce banotu) ve *H. reticulatus* L. (mor banotu) oluşan altı türle temsil edilmektedir (Baytop, 1978; Baytop, 1999; Güner vd., 2000).

Siyah banotu Avrupa ve Kuzey Afrika kökenli bir bitki türü olup (Pokorny ve Mangold, 2010), Avrupa, Asya, Kuzey Amerika ve Brezilya bölgeleri dahil kuzey yarımkürenin neredeyse tüm bölgelerinde görülmektedir (Emami, 2007). Ülkemizde ise 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). Bitki, halk arasında deli bat bat, gavur haşhaşı, bengildek, berç, benk, dağdağan gibi isimlerle de anılmaktadır (Baytop, 1999).

Siyah banotu Linnaeus tarafından 1753'de sınıflandırılmıştır (Hocking, 1947). *Hyoscyamus* cins adı hyos (domuz) ve cyamus (fasulye) kökünden türetilmiş bir kelime olup, domuz fasulyesi anlamına gelmektedir (Mitich, 1992; Volak ve Stodola, 1992). Bunun yanında Anglo-Sakson kaynaklarda siyah banotu "tavuk katili" (Volak ve Stodola, 1992) olarak tercüme edilmiş ve günümüzde ingilizcede hen (tavuk) ve bana (katil) kelimelerinin birleştirilmesi ile elde edilen henbane olarak kullanılmaktadır. Bu ismi almasının nedeni olarak da tavukların bu bitkinin tohumlarını yediklerinde felç olarak ölmeleri gösterilmiştir (Haas, 1995). Siyah banotu preparatlarının terapötik, toksik ve halüsinojenik etkileri antik çağlardan beri insanoğlu tarafından bilinmektedir (Hocking 1947; Kreitmair 1947; Ahmed ve Fahmy 1949; Fahmy 1963; Grieve 1977). Siyah banotundan elde edilen özütlerin psikojenik etkileri nedeniyle genellikle dini törenlerde veya cadılar tarafından kullanıldığı ve sonrasında da ilacın tıbbi kullanımının ön plana çıktığı ifade

edilmektedir (Hocking, 1947). Geleneksel ilaçlarla ilgilenen insanların çoğunun (% 85) siyah banotunu kullandıkları düşünülmektedir (Cüneyt vd., 2004). Dioscorides'in (MS 1. yüzyıl) de siyah banotunu ağrı kesici ve uykusuzluk problemlerini gidermek için kullandığı bildirilmektedir (Hocking, 1947)

Siyah banotu diploid kromozom sayısına ($2n = 34$) sahip (Sangeeta ve Lavania, 1987), 30-80 cm arasında boylanabilen, tek veya iki yıllık otsu formda bir bitkidir (Şekil 2. 1) (Cüneyt vd., 2004). Mor damarlara sahip sarımsı renkte çiçekleri kokulu ve hermafrodittir. Mayıs–Eylül dönemlerinde açan çiçekler, böceklerle tozlanmaktadır. 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. 80 cm'ye kadar ulaşabilen basit, dik veya dallanmış yapıdaki sapları yapışkan tüylerle örtülüdür. Oval şekle sahip bitki yapraklarının kenar kısımları oyuntuludur. Olgunlaştığında bir kapak ile açılan tohum kapsülünde grimsi renkte yaklaşık 500 kadar tohum bulundurmaktadır (Chevallier, 1996). Bir bitki yılda yaklaşık olarak 10.000 tohum üretebilmektedir (Begum vd., 2010; Graham ve Johnson, 2010).



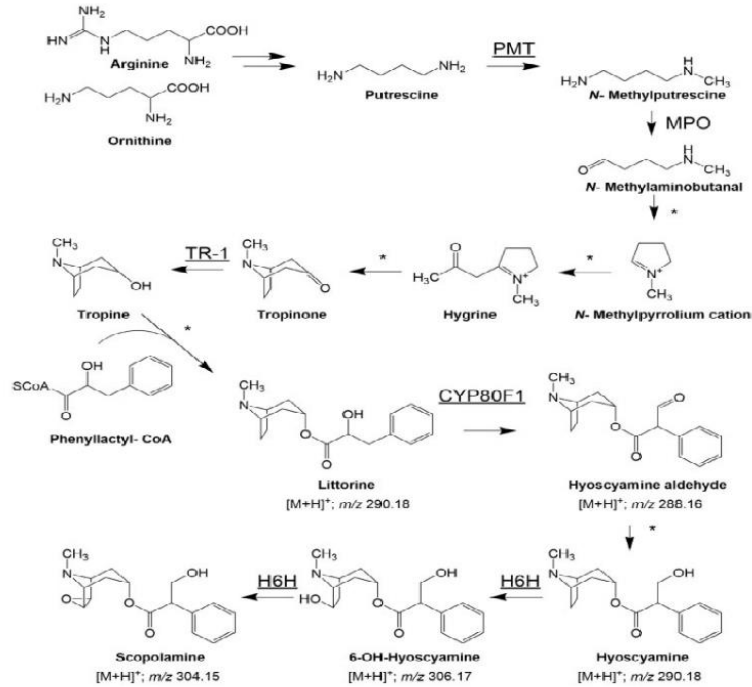
Şekil 2.1. Siyah banotu bitkisi

2.2. Siyah Banotu Bitkisinde Bulunan Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları

Siyah banotu tıbbi bir bitki olarak çok uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Kök, yaprak ve tohum gibi neredeyse bütün organları hiyosiyamin ve skopolamin gibi tropan alkaloidleri içermektedir (Çırak vd., 2004). Bu metabolitler köklerde sentezlenmekte ve daha sonra bitkinin toprak üstü organlarına taşınmaktadır (Oksman-Caldentey vd., 1987). Yaprakları %0.04-0.14 arasında alkaloid bulundurmaktadır (Baydar, 2013). Tohumlarında ise bu oran %0.5-0.6 arasında değişmekle birlikte, aynı zamanda tohumlar %20 oranında sabit yağ da içermektedir (Morishita, 1991). Siyah banotunun kimyasal bileşenleri arasında alkaloidlerin yanı sıra saponinler, lignanlar, kumarinolignanlar, flavonoidler ve fenoloik bileşikler de bulunmaktadır (Lunga vd., 2008; Bahmanzadegan vd., 2010).

Tropan alkaloid biyosentez yolu genetik düzeyde tam olarak açıklanamamasına rağmen, bu biyosentetik yolda çok sayıda enzim izole edilmiş ve klonlanmıştır (Oksman-Caldentey ve Arroo, 2000). Buna göre *L*-arginin, üreaz enzimi argininaz tarafından proteojenik olmayan amino asit *L*-ornitine dönüştürülmektedir. Daha sonra ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi diamin putresinini vermek üzere ornitini dekarboksilatlamaktadır. Bir sonraki adım, *N*-metilputresini oluşturan, putresin *N*-metiltransferaz (PMT; EC2.1.1.53) tarafından katalize edilen putresinin *S*-adenosil-metiyonine (SAM) bağımlı metilasyonudur. Bu enzim, putresini poliamin havuzundan uzaklaştırmakta ve metillenmiş bileşiği alkaloid üretimine doğru yönlendirmektedir. *N*-metilputresin daha sonra *N*-metilputresin oksidaz (MPO; EC 1.4.3.6) enzimi ile *N*-metilaminobutanale dönüştürülür. Tropan alkaloidleri ile nikotin biyosentezinde (Courdavault, 2010) bir dallanma noktası olan *N*-metilpiroliyum katyonu, bu aldehitin kendiliğinden siklizasyonu ile oluşur. Her ne kadar enzimatik aktiviteler tarif edilmese de, hiygrinin *N*-metilpirrolium katyonu ve asetoasetik asidin yoğunlaşması ile oluştuğu iddia edilmektedir. Higrin siklizasyonu, tropinon redüktaz I (TR-I; EC 1.1.1.206) ile 3 α -tropanol (tropin) veya tropinon redüktaz II (TR-II; EC 1.1.1.236) ile 3 β -tropanol (psödötropin) oluşumunu gerçekleştirmektedir (Nakajima ve Hashimoto 1999). Psödötropin, kalistegin biyosentezinde ilk spesifik ara maddedir (Drager, 2006). Bununla birlikte, tropin, littorin oluşturmak için fenillaktil-CoA ile yoğunlaşmaktadır. Littorin, bir sitokrom

P450 littorin mutaz/monooksijenaz (CYP80F1; EC 1.14.14.1) yoluyla hiyosiyamin aldehite göre yeniden düzenlenir ve bir alkol dehidrojenaz (Li vd., 2006) tarafından hiyosiyamine indirgeniği söylenir. Tropan alkaloid biyosentezi sırasında, son iki reaksiyon basamağı, güçlü hidroksilaz ve zayıf epoksidaz aktivitesine sahip bir hiyosiyamin 6β hidroksilaz (H6H; EC 1.14.11.11) tarafından katalize edilmektedir (Hashimoto vd., 1993). Psödotropin, kalistegin biyosentezinde ilk spesifik ara maddedir (Drager, 2006). Önce 6β-Hidroksi hiyosiyamin üretilir, daha sonra bu enzim aracılığıyla hiyosiyamin epoksitlemesiyle nihai ürün olan skopolamine dönüşüm gerçekleştirilir (Averesch ve Kayser, 2014).



Şekil 2.2. Tropan alkaloidlerinin biyosentezi

Siyah banotu bitkisini herbalistler gut hastalığı, baş, diş ve eklem ağrılarını tedavi etmek için farklı formülasyonlarda kullanmışlardır. Siyah banotu ülser, boğmaca, astım, uykusuzluk, romatizma ve çeşitli solunum yolu hastalıklarının tedavisinin bir parçası olmuştur (Sharma vd., 2000; Lal vd., 2005). Türkiye'de de siyah banotu tohumları halk arasında tıbbi amaçlarda kullanılmaktadır. Tohumların suda kaynatılmasıyla elde edilen buharının konjonktivit tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Tuzlacı ve Aymaz, 2001). Siyah banotu bitkisindeki alkaloidler 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 kullanılmaktadırlar (Supria, 1998; Pitta-Alvarez vd., 2000; Ramoutsaki vd., 2002; Harrison ve Bartels, 2006; Tytgat, 2007). Bu alkaloidlerin kardiyovasküler koruyucu etkilerinin yanısıra (Vallabi ve Elango, 2016), depresyona karşı antidepresan özellikler taşıdığı da belirlenmiştir (Patil vd., 2013). Siyah banotu özellikle solunum bozuklukları için kullanılan “Parasika Yavani” olarak bilinen ayurveda ilaçlarından birisidir. Ayurveda tıpta uykusuzluk, psikiyatrik bozukluklar, epilepsi, şişkinlik, ağrı ve nefes darlığı tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle antikolinerjik etkiye sahip hiyosiyamin ile antispazmodik etkiye sahip skopolamin ilaçlarının üretiminde yoğun olarak kullanılmaktadır (Alaghemand vd., 2013). Hiyosiyaminin 6,7-epoksiti olan skopolamin, sinir sistemi üzerindeki daha az yan etkisi ile bu iki tropan alkaloidinin en önemlisidir. Skopolaminin dünya çapındaki talebi hiyosiyamin ve rasemik formu olan atropinden 10 kat daha yüksektir (Hashimoto vd., 1993). Bütün bunların yanı sıra siyah banotu içermiş olduğu bu alkaloidlerden dolayı son derece zehirli bir bitki olup, siyah banotunun bilinçsiz tüketimi ölümcül sonuçlara da neden olabilmektedir (Haas, 1995).

2.3. Siyah Banotu Bitkisinde *In Vitro* Sekonder Metabolit Üretiminin Önemi

Solanaceae familyası tropan alkaloidlerince zengin bitki türlerini içermektedir. Bu bitki türlerinden biri de siyah banotudur. Bu bitkide bulunan hiyosiyamin ve skopolamin tıp alanında önemli işlevleri olan, buna karşılık bitkilerdeki miktarlarının düşük olması nedeniyle de son derece pahalı olan alkaloidlerdir. Bu alkaloidlerin sentetik üretimi, karmaşık kimyasal yapıları ve uzun biyosentez yolları nedeniyle bitkilerden elde edilmesine oranla daha pahalı olmaktadır. Bu nedenle ihtiyaç endüstriyel olarak *Atropa*, *Duboisia*, *Datura*, *Scopolia* ve *Hyoscyamus* cinsine ait çeşitli *Solanaceae* bitkilerinden elde edilmektedir (Ghorbanpour vd., 2015). Bitkisel ilaçların tüketimi artmaya devam ederken, aktif bileşikleri sağlamak için yabancı bitkilere bağımlılık daha ciddi bir boyuta gelmektedir (Hong vd., 2012). Bitkinin köklerinde sentezlenen bu metabolitlerin, bitkilerdeki miktarı ticari üretim için çok düşüktür. Bu nedenle ticari kullanım için alkaloid üretim oranlarının artırılması büyük önem taşımaktadır (Yamada vd., 1982). Kompleks kimyasal yapıları, maliyet ve zaman faktörleri nedeniyle, bu alkaloidlerin kimyasal sentezinin neredeyse

imkansız olması, bu bileşiklerin, bitkisel kaynaklardan elde edilme zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır (Oksman-Caldentey ve Hiltunen, 1996; Ghorbanpour vd., 2013a). Ancak doğadan toplama yoluyla yapılan üretimin en önemli dezavantajı, özellikle kök kaynaklı metabolitlere sahip bitkilerde çok daha yoğun yaşandığı üzere, bitkilerin zaman içinde yok olma tehlikesi ile yüz yüze kalmasıdır. Ayrıca mevsime bağlılık, coğrafi zorluklar, bitkilerin hastalık ve zararlılar tarafından istilası, metabolit verim ve kalitesinde yıllara göre ortaya çıkan değişiklikler ile saf ve standardize bitki materyali kıtlığı doğadan toplama yoluyla metabolit üretiminin diğer önemli dezavantajları arasında yer almaktadır (Raman vd., 2004). Son yıllarda bu dezavantajları ortadan kaldırarak kontrollü koşullar altında yılın her döneminde, standart verim ve kalitede metabolit üretmeye olanak sağlayan alternatif tekniklerin arayışı sonucunda, doku kültürü teknikleri büyük bir popülerite kazanmaya başlamıştır (Hong vd., 2012). *In vitro* koşullarda sekonder metabolit üretiminin bir diğer önemli avantajı da doğada uygulanması mümkün olmayan birçok uygulamanın *in vitro*'da kolaylıkla yapılarak metabolit veriminin çok daha yüksek seviyelere çıkarılabilmesidir. Besin ortamlarında ve kültürel koşullarda yapılan değişiklikler, büyümeyi düzenleyici madde uygulamaları, elisitör uygulamaları, biyosentez yolundaki öncül ya da ara maddelerin ortamlara ilave edilmeleri sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla kullanılabilecek yöntemlerdir (Zhao vd., 2002).

Jasmonik asidin metil esteri olan MeJA ile bir brassinosteroid olan 24-eBL'de *in vitro* sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla yapılabilecek uygulamalar arasında yer almaktadır. Bitkilerde birçok sekonder metabolitin biyosentezi genellikle bir savunma tepkisi sonucunda başlamaktadır. Bir sinyal molekülü olarak hareket eden MeJA, düşük molekül ağırlıklı savunma bileşiklerinin oluşumunu teşvik eden biyokimyasal reaksiyonların uyarılmasında rol oynar (Ozawa vd., 2000). Bu nedenle MeJA'nın dışsal uygulamalar sonucu kültürlerde artan konsantrasyonu, glukosinolatlar, terpenoidler, fenilpropanoidler, valepotriatlar, saponinler ve alkaloidler gibi çeşitli sekonder metabolitlerin biyosentezini uyarmaktadır (De Costa vd., 2013; Russowski vd., 2013).

Brassinosteroidler (BR'ler) de bitkilerde bir çok önemli yaşamsal olayları düzenleyen polihidroksillenmiş steroid yapıda bitki hormonlarıdır (Hayat vd., 2007). BR'lerin hücre çoğalması ve genişlemesini, yaşlanmayı, yaprak gelişimini, vasküler

farklılaşmayı ve erkek kısırlılığını destekledikleri ifade edilmektedir (Arora vd., 2010). BR'lerin, çeşitli metabolik süreçleri düzenleyerek ve genlerin ifadelerini etkileyerek kontrollü gelişimsel ilerlemeye ve dolayısıyla morfogenezine aracılık ettiğini tespit edilmiştir (Fariduddin vd., 2014; Zhang vd., 2016). Ek olarak, BR uygulamalarının klorofil, CO₂ asimilasyonunu, karboksilasyon verimliliğini ve prolin sentezini etkileyerek fotosentezi iyileştirdiği ve ayrıca antioksidan savunma sisteminin düzenlenmesi yoluyla oksidatif hasarı önlediği, böylece verimi artırdığı bildirilmiştir (Hayat vd., 2010). Stresli koşullar altında, BR'lerin, taşıma proteinlerinin aktivitesini artırarak, stres toleransını geliştirerek mineral elementlerin alımını arttırdığı da bildirilmiştir (Ali vd., 2006).

BR'lerin bitki büyüme ve gelişimi ile strese karşı dayanıklılığı sağlamalarının yanı sıra sekonder metabolit üretimini artırdıkları da belirlenmiştir. Nitekim hem stres uygulanmış bitkilerde (Farooq vd., 2009; Çoban ve Baydar, 2017) hem de strese maruz bırakılmamış bitkilerde (Aşçı vd., 2019; Babalık vd., 2019) uygun konsantrasyon ve dönemde uygulandıklarında sekonder metabolit içeriğini kontrol bitkileri ile kıyaslandığında önemli derecede artırdıkları tespit edilmiştir. BR'lerin farklı bitkilerde farklı sekonder metabolitlerin üretimini *in vitro* koşullarda da artırdıkları tespit edilmiştir (Gumerova vd., 2015; Jalalpour vd., 2014; Jaremicz vd., 2014; Demirci, 2017; Biçer vd., 2017; Demirci vd., 2017).

2.4. Bitki Hücrelerinin İmmobilizasyonu

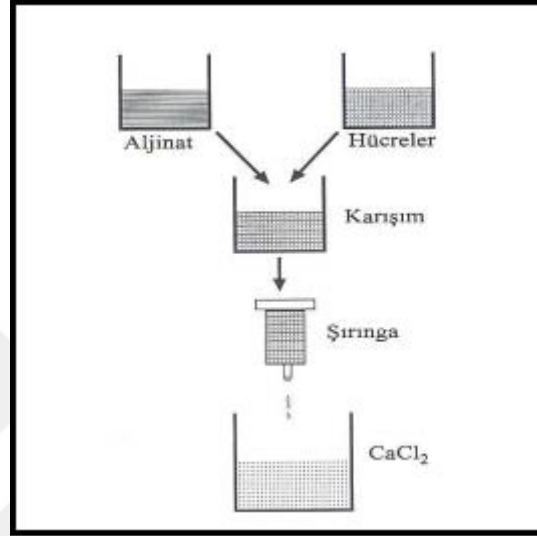
In vitro sekonder metabolit üretiminde metabolit verimini artırmak amacıyla kullanılacak önemli uygulamalardan biri de bitki hücrelerinin uygun bir matriste sabitlendiği (hareketsizleştirildiği) immobilizasyon tekniğidir (Pras ve Woenderbag, 1999). İmmobilizasyon tekniği başta mikroorganizmaların enzim immobilizasyonu olmak üzere birçok endüstriyel uygulamada 25 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Bitki hücreleri, mikroorganizmalara göre daha yavaş büyürler, hedeflenen sekonder metabolitleri daha yavaş üretirler, fiziksel stres tarafından daha kolay bozulurlar ve çevresindeki kimyasal sinyallerden etkilenirler. İmmobilizasyon, sinyal moleküllerinin hareketi ile hücreler arası iletişim kurabilen hücresel çapraz etkileşimi kolaylaşmaktadır. Bu da bitki hücrelerinde sekonder metabolit verimini arttırmaktadır (Haigh ve Linden, 1989; Pras ve Woerdenbag, 1999; Aoyagi vd. 1998;

Villegas vd., 1999). Serbest haldeki bitki hücreleri çoğunlukla sekonder metabolitleri, büyümelerinin durduğu noktada, büyüme döngüsünün durağan fazında biriktirmektedirler. Bitki hücrelerinin immobilize edilmesi, sekonder metabolitlerin üretiminin artırabilmek için büyümenin inhibe edilebildiği koşullar yaratmak için kullanılan bir araçtır (Pras ve Woerdenbag, 1999). Bitki hücrelerinin immobilizasyonu, durağan fazda hücrelerin canlılığını uzun süre koruyarak, geniş bir peryotta biyokütle elde edilmesine imkan tanıma, maliyeti ve kontaminasyon riskini azaltarak küçük biyoreaktörler içinde yüksek hücre yoğunluğunu sağlama, sekonder metabolit üretimini artırma, hücre süspansiyonlarında karıştırma ve havalandırma problemlerine neden olan sıvı viskozitesini en aza indirme gibi avantajlar sunmaktadır (Dicosmo ve Misawa, 1995). Ayrıca immobilize hücrelerin yavaş büyümesi, hızlı büyüme için gerekli primer metabolizmanın baskılanarak, sekonder metabolit verimini artırmasına da neden olmaktadır (Lindsey ve Yeoman, 1983).

İmmobilizasyon yüzey immobilizasyon yöntemi ve jel içinde tutuklama yöntemi olmak üzere başlıca 2 şekilde gerçekleştirilmektedir. Yüzey immobilizasyonu kültüre alınmış bitki hücrelerinin sıvı ortam içine batırılmış inert yüzeylere yapışması esasına dayanmaktadır. Nitekim cam fiberlerin kullanıldığı yüzey immobilizasyonu Madagaskar menekşesi, tütün ve soya da sekonder metabolit üretimi için kullanılmıştır (Asada ve Shuler, 1989; Archambault vd., 1989). Ancak en yaygın kullanılan immobilizasyon tekniği, polimerize olma özelliği taşıyan belirli bir jel veya jel kombinasyonu içinde hücrelerin tutuklandığı (matrislendiği) tekniktir. Bunun sebebi, esnek koşullara sahip, ucuz, basit ve tekrarlanabilir olan bir teknik olmasından kaynaklanmaktadır (Hulst ve Tramper, 1989). Kalsiyum alginat en sık kullanılan matris olmakla birlikte bu amaçla agaroz, jelatin, karragenan, ve poliakrilamid de kullanılabilir (Nilsson vd., 1983; Dornenburg ve Knorr, 1995; Rao ve Ravishankar, 2002). Ancak hücrenin tutuklanmasında kullanılan matrisin, hücreler için toksik olmaması, ucuz ve iyi polimerizasyon aktivitesine sahip olması gerekmektedir. Bu yöntemle yapılan ilk immobilizasyon çalışması Brodelius vd. (1979) tarafından *Morinda citrifolia*, *Digitalis purpurea* ve *Catharanthus roseus* bitkilerine ait hücre kültürlerinde gerçekleştirilmiştir.

Bitki hücrelerinin aljinat boncuklarla tutuklanması, sodyum aljinat ve hücre süspansiyon karışımının damlacıklar halinde iki değerli katyonlarla, genellikle de

kalsiyum klorür içeren tuz çözeltisinde sabitlenmesiyle elde edilmektedir (Majerus ve Pareilleux, 1986). Oluşturulan damla kalsiyum klorür çözeltisine düştüğünde, sodyum ve kalsiyum iyonlarının yer değiştirmesiyle damlaların dış yüzeyinde suda çözünmeyen bir kalsiyum aljinat jeli oluşturarak küresel jel boncukları formuna dönüşmektedir (Şekil 2.3). Elde edilen boncuklar, tuz çözeltisinde tutularak sertleştirilme işlemi gerçekleştirilmektedir (Hulst ve Tramper, 1989).



Şekil 2.3. Hücrelerin aljinat ile tutuklanması (Sökmen ve Gürel, 2012)

Daha önce yapılan çalışmalarda sekonder metabolit üretiminde hücrelerin tutuklanarak immobilize edilmesi ile çok dramatik sonuçların elde edildiği tespit edilmiştir. Nitekim *Capsicum* türlerinde immobilize hücrelerden kapsaisin üretiminde 100 katlık bir artışın tespit edildiği bulunmuştur (Lindsey ve Yeoman, 1984; Ravishankar vd., 1988). Ayrıca *Coffea arabica* ve *Catharanthus roseus*'da immobilize edilmiş hücre kültürlerinde sırasıyla metilksantin 13 kat, ajmalisin ise 3.4 kat arttığı bulunmuştur (Asada ve Shuler, 1989; Haldimann ve Brodelius, 1987).

Villegas vd. (1999), acem lalesi (*Eschscholtzia californica*) hücre kültürlerinde immobilizasyon tekniği ve elisitör uygulamalarının, benzofenantridin alkaloidleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sodyum aljinatla immobilize edilen hücrelerde alkaloid üretiminin serbest hücrelere oranla 800 kata kadar yükseldiği, üretilen alkaloidlerin büyük bir kısmının da büyüme ortamına salındığını belirlenmiştir.

Yine immobilizasyon tekniği ile alkaloid sentezini artırmaya yönelik yapılan bir diğer çalışmada *Datura innoxia* bitkisine ait hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Bu

araştırmada *Datura innoxia*'ya ait hücre hattının stabilize edilmiş iki yıllık hücre süspansiyonları kullanılmıştır. Araştırmada kalsiyum-aljinat immobilizasyonu sonucunda alkaloid üretiminin 10 katlık bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Gontier vd., 1994).

İmmobilizasyon tekniği ile fenolik bileşiklerin üretiminin incelendiği bir araştırmada ise Inyai vd. (2019), beyaz dut (*Morus alba* L.)'a ait immobilize olmuş hücre kültürlerinde mulberrosid A'nın hücre dışı matriks ve kültür ortamına salgılanmasını % 60'a kadar artırırken, oksiresveratrol seviyesini 12 kat, resveratrol seviyesini 27 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Araştırmada immobilize hücelere 24 saat boyunca uygulanan 50 µM MeJA ve 0.5 mg/ml maya ekstraktının bu üç stilbenoidin üretimini 2 kat arttırdığı belirtilmiştir. Bunun yanında 0.05 mM L-fenilalanin, 0.03 mM L-tirozin uygulamasının mulberrosid A, oksiresveratrol ve resveratrol üretimini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir.

Bu açıklamalardan da anlaşıldığı üzere immobilizasyon yöntemi *in vitro* koşullarda sekonder metabolit üretiminde kullanılma potansiyeli yüksek olan bir teknik olma özelliği taşımaktadır. Ancak siyah banotunda bu teknikle ilgili hiçbir çalışmanın yapılmadığı görölmektedir.

Siyah banotunda tropan alkaloidlerinin sentezini artırmak amacıyla yapılan *in vitro* çalışmaların az, fenolik bileşiklerin artırılmasına yönelik çalışmaların da bulunmaması nedeniyle, konunun daha iyi anlaşılması için tropan alkaloidlerince zengin bitki türlerinde bu amaçla yapılmış araştırmalar incelenmiş ve aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Bu alanda yapılan ilk çalışma Yamada ve Hashimoto (1982) tarafından gerçekteşirilmiş olup, bu araştırmada *Atropa belladonna*, *Datura stramonium* ve siyah banotuna ait kallus kültürlerinde yapılan kromatografik analizler sonucunda, siyah banotunda hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerinin elde edildiği tespit edilmiştir.

Hashimoto ve Yamada (1987) siyah banotuna ait hücre süspansiyon kültürlerinde tropan alkaloid üretim olanaklarını araştırmışlardır. Bu amaçla araştırıcılar kullanmış

oldukları farklı besin ortamları içinde, White besin ortamının hücre büyümesini inhibe ettiğini, hiyosiyamin miktarını ise artırdığını belirlemişlerdir. 0.2 mM fosfat içeren modifiye LS ortamında ise % 0.05 oranında hiyosiyamin üretiminin gerçekleştiği tespit edilmiştir. N-metilputresin, tropin, fenilalanin ve tropik asit gibi öncül maddelerin alkaloid üretimi üzerine etkilerinin de incelendiği araştırmada, elde edilen sonuçların öncül maddelere, uygulamanın yapıldığı döneme ve konsantrasyona bağlı olarak değiştiği saptanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerden naftalin asetik asit (NAA)'in ise hücre büyümesini uyardığı ancak hiyosiyamin üretimini engellediği tespit edilmiştir.

Ballica vd. (1993), de tropan alkaloid üretimi için *Datura stramonium* bitkisinden elde edilen hücre süspansiyon kültürlerinde çeşitli elisitör ve öncül madde uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre biyotik elisitör olarak kullanılan *Phytophthora megasperma*'nın tropan alkaloid üretimini 5 kat artırdığı, fenilalanin ve ornitin gibi öncül maddelerin kültür ortamına eklenmesinin ise toplam alkaloid miktarını 5 kat, tropik asit miktarını ise 7 kat artırdığı tespit edilmiştir.

Mısır banotu (*Hyoscyamus muticus*)'na ait saçak kök kültürlerini içeren ortamlara eklenen büyüme düzenleyicilerinin büyüme, kök fenotipi ve tropan alkaloid üretimine etkilerinin araştırıldığı bir başka araştırmada, kök kültürlerinin 0.01-5 µmol/l arasındaki oksin uygulamalarını tolere edebildiği belirtilmiştir. Kök büyümesi üzerine indol asetik asit (IAA) ve NAA'nın bir etkisinin bulunmadığı, ancak alkaloid üretimini oksin içermeyen kök kültürlerine kıyasla 2 kat artırdığı saptanmıştır. En yüksek metabolit üretimi 0.1-1.0 µmol/L konsantrasyonlarında IAA içeren ortamlarda, 117 mg/l hiyosiyamin ve 0.2 mg/l skopolamin olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçları içsel oksin içeriğinin yüksek miktarda tropan alkaloid üretimi için yeterli olmadığını göstermiştir. Sitokinin uygulamalarının kök fenotipi ve büyüme hızına bir etkide bulunmadığının belirlendiği araştırmada, absisik asit (ABA) ve gibberellik asit (GA₃) uygulamalarının hiyosiyamin üretimini engellediği de tespit edilmiştir (Vanhala vd., 1998).

Yine *Hyoscyamus muticus* türünde yapılan bir araştırmada, Basu ve Chand (1998) bu bitkiden alınan kotilendonları 2 mg/l 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 0.5

mg/l benziladenin (BA) içeren modifiye Murashige ve Skoog (MS) ortamında (Murashige ve Skoog, 1962) kültüre alarak kallus elde etmişlerdir. Kallus hücrelerinden elde edilen sürgün ve köklerde alkaloid üretimini ince tabaka kromatografisi ile inceleyen araştırmacılar, alkaloid üretiminin dokulara göre farklılık gösterdiğini, en yüksek hiyosiyaminin de köklerden elde edildiğini saptamışlardır.

Borazan çiçeği (*Datura stramonium*) kök kültürlerinde çeşitli elisitör ve oligogalakturonidlerin alkaloid üretimi üzerine etkilerini inceleyen Zabetakis vd. (1999), 0.1 µM MeJA'nın kültür ortamına eklenmesinin hiyosiyamin miktarını 12.16 µmol/g'dan 22.14 µmol/g'a, skopolamin miktarını 2.45 µmol/g'dan 6.14 µmol/g'a, littorin miktarını ise 1.19 µmol/g' dan 3.70 µmol/g'a çıkardığını tespit etmişlerdir.

Boitel-Conti vd. (2000) ise L-ornitin, L-arjinin, L-fenilalanin, DL-β-fenilasetik asit ve tropinon öncül maddeleri ile tween 20 uygulamalarının *Datura inoxia* saçak kök kültürlerinde metabolit üretimine etkilerini incelenmişlerdir. Öncül maddelerin tween 20 olmaksızın 0.5 mM konsantrasyonunda tek tek uygulamalarının hiyosiyamin üretimi üzerinde etkili olmadığı, ancak kombinasyon halinde uygulamalarının metabolit verimi üzerine olumlu etkiler gösterdiği belirtilmiştir. L-fenilalanin ile tween 20 kombinasyonunu içeren uygulamada hiyosiyamin üretiminde % 40'lık, DL-β-fenilasetik asit ve tween 20 kombinasyonu içeren uygulamada ise % 60'lık bir artışın ortaya çıktığı tespit edilmiştir.

Melek borusu (*Brugmansia candida*) bitkisi üzerinde yapılan bir araştırmada ise, bu bitkiye ait saçak kök kültürlerinde biyotik ve abiyotik elisitörlerin alkaloid üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır (Pitta- Alvarez vd., 2000). Salisilik asit (SA)'ın skopolamin üretimini 2 kat; hiyosiyamin üretimini 12 kat artırdığının belirlendiği araştırmada gümüş nitrat (AgNO₃) uygulamasının ise skopolamin üretimini 5 kat, hiyosiyamin üretimini ise 8 kat artırdığı belirtilmiştir. Araştırmada elde edilen bu sonuçların, AgNO₃ ve SA'nın etilen üzerindeki inhibe edici etkisinden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Maya ekstaktı uygulaması hiyosiyamin üretimini 3 kat, skopolamin üretimini ise 7 kat artırırken; kalsiyum klorür (CaCl₂)'ün metabolit üretimi üzerinde çok az etki gösterdiği tespit edilmiştir. Kadmiyum klorür (CdCl₂) uygulamasının ise büyümeyi önemli ölçüde inhibe ederken, skopolamin üretimini 3 kat, hiyosiyamin üretimini 24 kat artırdığı belirlenmiştir.

Brugmansia candida bitkisine ait saçak kök kültürlerinde gerçekleştirilen bir başka araştırmada Spollansky vd. (2000), 2.5-25 µg/ml jasmonik asit ile 25-250 mM alüminyum klorür (AlCl₃) uygulamalarının alkaloid üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmada 19 günlük saçak kök kültürlerinde 24 ve 48 saat aralığında jasmonit asit uygulaması gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlara göre 24 saat boyunca uygulanan 25 µg/ml jasmonik asitin hiyosiyamin salınımını % 1200 arttırdığı, 48 saat boyunca uygulanan 2.5 µg/ml jasmonik asitin ise skopolamin salınımını % 30 artırdığı tespit edilmiştir. AlCl₃'ün 25 mM ve 250 mM konsantrasyonunda uygulamalarının hiyosiyamin üretimini % 43 oranında artırırken, skopolamin üretiminin % 83 oranında artırdığı saptanmıştır. Ayrıca 48 saat boyunca uygulanan 250 mM AlCl₃'ün skopolamin üretimini % 150 oranında artırdığı da belirtilmiştir.

Lee vd. (2001) *Agrobacterium rhizogenes* ile transforme edilen güzel avratotu (*Atropa belladonna*) saçak kök kültürlerinde elisitör olarak kullanılan SA uygulamasının alkaloid üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. ½ MS ortamında kültüre alınan 18 günlük kök kültürlerine 0.2 mM ve 2 mM konsantrasyonlarında yapılan SA uygulaması sonrasında 1., 3. ve 7. günlerde hasat işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol bitkileri ile kıyaslandığında kök kültürlerine uygulanan 0.2 mM SA'in metabolit üretimi üzerine bir etki göstermediği, 2 mM SA uygulamasının 1. günde alkaloid üretimini % 35; 3. günde % 80; 7. günde ise % 90 oranında azalttığı tespit edilmiştir.

Tropan alkaloidlerince zengin bir başka tür olan *Scopolia parviflora*'ya ait adventif kök kültürlerinde biyotik elisitörlerin sekonder metabolit verimi üzerine etkileri araştırılmıştır (Jung vd., 2003). Araştırmada kökler, 2 gram pozitif, 1 de gram negatif bakteri suşu ile 3 gün inoküle edildikten sonra, elisitör uygulamalarını takip eden 3 farklı (12., 24. ve 48. saat) dönemde hasat edilmişlerdir. Maksimum skopolamin miktarı gram pozitif bakteri suşları ile inoküle edilen ve 12. saatte hasat edilen köklerde elde edilmiştir. Özellikle *S. aureus* ile inoküle edilen kültürlerde kontrole kıyasla 2.8 kat daha fazla skopolamin üretiminin gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

Hank vd. (2003), tarafından yapılan araştırmada ise, *Atropa belladonna*'da *Agrobacterium rhizogenes* R1601 hattı ile transforme edilmesi sonucu elde edilen

saçak kök kültürleri B5 ortamında alt kültüre alınarak, kök büyümesi ve sekonder metabolit üretimi üzerine farklı konsantrasyonlarda magnezyum sülfat (MgSO₄) uygulamalarının etkileri araştırılmıştır. En yüksek hiyosiyamin içeriği % 0.8-0.9 ile 125 mg/l MgSO₄ içeren ortamda; skopolamin içeriği ise %0.016 ile 1000 mg/l MgSO₄ içeren ortamda ve % 0.018 ile 125 mg/l MgSO₄ içeren ortamda kültüre alınan köklerde tespit edilmiştir. En yüksek kök oluşumu 500 mg/l MgSO₄ ilave edilmiş ortam (yaş ağırlık: 4.18 g, kuru ağırlık: 0.23 g) ve 125 mg/l MgSO₄ ilave edilmiş ortamda (yaş ağırlık: 13.63g, kuru ağırlık: 0.73 g) elde edilmiştir.

Scopolia parviflora adventif kök kültürlerinde elisitör olarak kullanılan SA ve MeJA'nın alkaloid üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda ve farklı günlerde hasat edilen kök kültürlerinde yapılan HPLC analizleri sonucunda, en yüksek skopolamin üretiminin 703.4 µM ve 1690.2 µM hiyosiyamin üretimi ile 1.0 mM MeJA uygulamasından elde edildiği tespit edilmiştir. 2.0 mM MeJA uygulaması ile 72 saatlik kültürlerde hiyosiyamin içeriğinde kontrol bitkilerine kıyasla % 700 artış olduğu saptanmıştır. Elisitör olarak kullanılan SA'nın 1.0 mM konsantrasyonunda yapılan uygulamayı takip eden 24 saatte hasat edilen kültürlerde en yüksek skopolamin değeri elde etmesine rağmen, ilerleyen sürelerde skopolamin miktarının hızla düştüğü saptanmıştır. 0.01 mM SA uygulamasının ise skopolamin üretimini kontrole kıyasla %40 oranında artırdığı; skopolaminin kültür ortamına yayılmasının 12 saatlik SA uygulaması ile başladığı ve 48 saatin sonunda ise kontrole göre 2 katlık bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (Kang vd., 2004).

Zayed ve Wink (2004), *Agrobacterium rhizogenes* ile transforme edilen *Brugmansia suaveolens* saçak köklerindeki alkaloid miktarını arttırmak amacıyla 10, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında MeJA, kuersetin ve SA gibi elisitör uygulamaları gerçekleştirilmiştir. 200 µM MeJA uygulamasının kontrole kıyasla alkaloid üretiminin 25 kat artırarak, 1 mg/g ağırlığa ulaştırdığı, kuersetin uygulamalarının ise 24 saat içerisinde alkaloid üretimini 10 kat artırarak 0.4 mg/g'a ulaştırdığı tespit edilmiştir. 100 µM salisilik asit uygulamasının ise alkaloid üretimini inhibe ederek, 1 µg/g'a düşürdüğü belirtilmiştir.

Datura metel L. bitkisine ait kök kültürlerinde farklı biyotik ve abiyotik elisitör uygulamalarının metabolit üretimi üzerine etkileri incelenmiştir (Ajungla vd., 2009).

Araştırmada yaprak eksplantlarından elde edilen kök kültürleri, 6 hafta süresince *Aspergillus niger*, *Alternetia sp.*, *Fusarium monoliferme* ile maya ekstraktı gibi biyotik elisitörler ve SA, AlCl₃, CaCl₂, sodyum klorür (NaCl), sodyum sülfat (Na₂SO₄) gibi abiyotik elisitörler uygulanmıştır. En iyi sonuçlar 4.35 mg/g hiyosiyamin ve 0.069 mg/g skopolamin birikimi ile 500 µM SA uygulamasından elde edilmiştir. 0.75 g/l konsantrasyonundaki maya ekstraktı uygulaması ise 3.17 mg/g hiyosiyamin ve 0.16 mg/g skopolamin üretimi sağlayarak en iyi biyotik elisitör olarak belirlenmiştir.

İbrahim vd. (2009) de *Hyoscyamus muticus* bitkisine ait kallus kültürlerinde farklı karbon kaynakları, öncül madde ve elisitör uygulamalarının alkaloid üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda en yüksek alkaloid üretimi 43 mM sakkaroz, 0.5 mM tropik asit ve 2 g/l maya ekstraktını içeren kültürlerde belirlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada diploid ve tetraploid *Datura stramonium* L. bitkilerinden elde edilen saçak kök kültürlerinde nitrat (NO₃⁻), potasyum fosfat (KH₂PO₄) ve sakkarozun hiyosiyamin üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Diploid kök kültürlerine 31 ve 47 mM arasında NO₃⁻, 20 ila 40 g/l arasında sakkaroz uygulanırken, tetraploid kök kültürlerine 31 ve 47 mM arasında NO₃⁻, 0.50 ve 1.25 mM arasında KH₂PO₄ ve 50-70 g/l arasında sakkaroz uygulanmıştır. En iyi sonuçlar diploid kök kültürlerinde 1.10 g/l NO₃⁻, 0.17 g/l KH₂PO₄ ve 40 g/l sakkaroz içeren ortamlarda tespit edilirken, tetraploid kök kültürlerinde 1.10 g/l NO₃⁻, 0.17 g/l KH₂PO₄ ve 50 g/l sakkaroz içeren ortamlarda tespit edilmiştir (Pavlov, 2009).

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

Zimare ve Malpathak (2011), tarafından yapılan bir çalışmada ise *Datura metel* L. bitkisine ait hücre süspansiyon kültürlerinde çeşitli elisitörlerin hiyosiyamin ve

skopolamin alkaloidleri üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki SA (0.1, 0.25 ve 0.5 mM) ve maya ekstraktını (100, 200 ve 400 mg/l) 24, 36 ve 48 saat boyunca uygulamışlardır. En yüksek alkaloid üretimi 0.254 mg/g hiyosiyamin ve 8.588 mg/g skopolamin ile 0.25 mM SA ile 36 saat boyunca muamele edilen kültürlerde tespit edilmiştir. 200 mg/l konsantrasyonundaki maya ekstaktı 36 saat süreyle uygulandığında 0.224 mg/g hiyosiyamin ve 8.490 mg/g skopolamin üretimini ile SA ile benzer etkiler gösterdiği belirtilmiştir.

Pudersell vd. (2012) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise siyah banotu bitkisine ait kök kültürleri kullanılmıştır. Alkaloid üretimi üzerine kalsiyum, magnezyum ve demir iyonlarının etkilerinin incelendiği araştırmada, kültür ortamında artan magnezyum ve kalsiyumun, skopolamin üretimini artırdığı tespit edilmesine karşın, magnezyum iyonlarının artmasının hiyosiyamin üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Siyah banotu bitkisinde farklı elisitörlerin hiyosiyamin ve skopolamin üretimine etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, yaprak eksplantlarından elde edilmiş kallus hücreleri, sakkaroz, NaCl, prolin ve BA gibi elisitör uygulamalarına tabii tutulmuşlardır (Aljibouri vd., 2012). Araştırma sonucunda kontrol grubu kallus hücrelerinde 81.25 ppm olan hiyosiyamin miktarının, 50 mg/l prolin uygulaması ile 128.40 ppm'e ve 100 mg/l prolin uygulaması ile de 90.42 ppm'e yükseldiği saptanmıştır. Kontrol grubu kallus hücrelerinde 56.93 ppm olan skopolamin üretiminin ise, 50g/l sakkaroz uygulaması ile 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 yükseldiği belirlenmiştir.

Deghan vd. (2012) de *Hyoscyamus muticus*'a ait saçak kök gelişimi ve alkaloid üretimi üzerine farklı besin ortamları ile sakkaroz konsantrasyonlarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada aynı büyüme düzenleyicilerini içeren MS ve B5 ortamları ile farklı sakkaroz konsantrasyonları (20, 30, 40, 50 ve 60 g/l) kullanılmıştır. Diploid bitkiler için en yüksek saçak kök oluşumu sırasıyla 30 g/l sakkaroz içeren B5 ve MS ortamlarında 19.40 g/l ve 17.32 g/l olarak tespit edilmiştir. Tetraploid klonlarda en yüksek saçak kök oluşumu ise 18.77 g/l ile 40 g/l sakkaroz içeren B5 ortamında ve 17.26 g/l ile 50g/l sakkaroz içeren MS ortamında belirlenmiştir. Alkaloid üretiminde

en iyi sonuçlar ise tetraploid klonlarda 60 g/l sakkaroz içeren MS ortamında ve 40 g/l sakkaroz içeren B5 ortamında 13.87 mg/l skopolamin ve 107.7 mg/l hiyosiyamin olarak belirlenmiştir.

Siyah banotu bitkisine ait kök kültürlerinde hiyosiyamin ve skopolamin üretimi için kazein hidrolizat, maya ekstratı, d-sorbitol ve kitosan gibi elisitör uygulamalarının etkilerini inceleyen Hong vd. (2012), kök kültürlerine yapılan 5.0 g/l kazein hidrolizat uygulamasının, kontrol kökleri ile kıyaslandıklarında hiyosiyamin miktarını 16.36 mg/g' dan 11.07 mg/g'a, skopolamin miktarını ise 35.06 mg/g'dan 25.08 mg/g'a düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Başka bir elisitör olan d-sorbitolün 5.0 g/l konsantrasyonundaki uygulamasının ise kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında 16.42 mg/g olan hiyosiyamin miktarını 20.04 mg/g'a ve 16.38 mg/g olan skopolamin miktarını 22.75 mg/g'a yükselttiği belirlenmiştir. Kitosan uygulamasının alkaloid üretimini inhibe ederken, 0.5 g/l konsantrasyonunda uygulanan maya ekstratının ise kontrol bitkilerine kıyasla 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 tespit edilmiştir.

Siyah banotunda yapılan başka bir çalışmada Ghorbanpour vd. (2013a), *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens* gibi iki farklı bakteri suşu ile inoküle edilen *in vitro* bitkilere %30, 60, 90 olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda su stresi uygulayarak, bitkilerde antioksidant enzim aktivitesi ve metabolit üretimini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens* suşları ile inokülasyonun su stresinin büyüme üzerine meydana getirdiği engelleyici etkisini azalttığı tespit edilmiştir. Kök ve yaprakta ölçülen süperoksit dismutaz ve peroksidaz aktivitelerinin 3 farklı su stresi altına her iki bakteri suşu uygulanan bitkilerde arttığı belirlenmiştir. En yüksek alkaloid üretimi *Pseudomonas putida* suşu ile inoküle edilmiş ve %30 su stresi uygulanmış bitkilerde saptanmıştır. Kontrol bitkileri ile kıyaslandığında bitki başına 16.96 mg olan alkaloid miktarının, uygulama sonrasında bitki başına 25.71 mg'a yükseldiği tespit edilmiştir.

Siyah banotu bitkisine ait kök kültürlerinde hiyosiyamin ve skopolamin üretimi üzerine besin ortamına ilave edilen büyümeyi düzenleyicilerin etkilerinin incelendiği bir araştırmada (Ghorbanpour vd., 2013b), kültür ortamına 0.5, 1 ve 2 mg/l konsantrasyonunda eklenen oksin (IAA, 2,4-D, IBA, NAA) ve sitokinlerin (kinetin,

BA) etkileri incelenmiştir. Köklerde en yüksek hiyosiyamin birikiminin % 0.2, skopolamin içeriğinin % 0.76 ile 0.5 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren ortamlarda tespit edilmiştir. Sürgünlerde en yüksek hiyosiyamin miktarı % 0.394 ile 1 mg/l BAP ortamından; en yüksek skopolamin miktarı ise % 0.234 ile 0.5 mg/l IBA içeren kültür ortamında saptanmıştır. En yüksek alkaloid miktarı 5 mg/l NAA ile 1 mg/l BAP içeren besin ortamında 0.269 mg/l olarak belirlenmiştir.

Besher vd. (2014) *Hyoscyamus aureus*'da *in vitro*da tohumdan çimlenen bitkileri, bunlardan elde edilen kallusları ve doğadan toplanan bitkileri eksplant olarak kullanmışlardır. 21 günlük *in vitro* bitkilerden elde edilen 1 cm uzunluğundaki sürgünlerden kalluslar elde edilmiştir. Tropan alkaloidler, GC-MS yöntemi ile belirlenmiş ve en yüksek hiyosiyamin içeriği *in vitro* bitkiler ile kalluslardan elde edilirken; skopolamin içeriği ise en fazla doğadan toplanan bitkilerde 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) miktarları kabarcıklı sütun biyoreaktöründen elde edilmiştir. Her iki biyoreaktör sisteminde de benzer skopolamin (1 ve 0.98 mg/1 gün) ve kuskohidrin (5 ve 5.4 mg/1 gün) miktarları elde edilirken, anizodamin birikiminin hibrid biyoreaktörde 3.5 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MeJA hibrit biyoreaktörde kültüre alınan köklerde skopolamin üretimini % 146 arttırırken; dimetil sülfoksitin ise skopolamin miktarını 4, hiyosiyamin miktarını 5, anizodamin miktarını 25 ve kuskohidrin miktarını da 28 kat artırdığı 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 ise artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Datura metel bitkisine ait *Agrobacterium rhizogenes* tarafından transforme edilen 18 günlük saçak kök kültürleri *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*, AgNO₃ ve nanosilver gibi biyotik ve abiyotik elisitör uygulamalarına tabi tutulmuşlardır (Shakeran vd., 2015). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sırasıyla kontrol bitkilerinde 12., 24. ve 48. saatlerde atropin miktarı % 0.166, % 0.119 ve % 0.107 olarak tespit edilirken, AgNO₃ uygulaması ile bu değerlerin % 0.032, %0.042 ve % 0.053'e düştüğü belirlenmiştir. Nanosilver uygulamasının ise atropin içeriğini 12, 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda kontrol grubu bitkilerle kıyaslandığında 1.15, 1.12 ve 2.42 kat artırdığı tespit edilmiştir. 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 *S. aureus* uygulamasının 12., 24. ve 48. saatlerinde atropin seviyesini sırasıyla % 0.095, % 0.038 ve % 0.056 değerleri ile önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır.

SA ve asetil salisilik asit (ASA) uygulamalarının *Datura stramonium* bitkisinde bulunan alkaloid üretimi üzerine etkilerini araştıran Belabbasi vd. (2016), MS ortamında büyütülen 20 günlük bitkilere 10M SA ve 4M ASA uygulamışlardır. Analiz sonuçları diploid kontrol bitkilerinde 4.406 mg/g olan hiyosiyamin miktarını, SA uygulaması ile 7.697 mg/g'a; ASA uygulaması ile 6.330 mg/g'a yükseldiğini göstermiştir. Tetraploid bitkilerde ise herhangi bir elisitör uygulaması yapılmadığında 9.075 mg/g olarak tespit edilen hiyosiyamin miktarının, SA uygulaması ile 12.315 mg/g'a, ASA uygulaması ile de 11.309 mg/g'a yükseldiği tespit edilmiştir.

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).

Zeynali vd. (2016) ise *Hyoscyamus recilatus* bitkisinin *Agrobacterium rhizogenes* ile transforme olan saçak köklerinde kolkisin ve UV-B uygulamalarının alkaloid üretimine olan etkilerini araştırmışlardır. Kökler % 0, 0.1, 0.3 ve 0.5 a/h kolkisin ile 0, 3, 6 ve 9 dakika boyunca da UV-B uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol köklerindeki % 0.18 olan hiyosiyamin içeriği, kolkisin uygulamaları sonucunda maksimum değere ulaşarak % 0.58'e ulaşmıştır. Bitkinin bir diğer önemli alkaloidi olan skopolaminin ise kontrol köklerinde % 0.37 iken UV-B uygulaması sonucunda % 0.68'e çıkarak maksimum değere ulaştığı tespit edilmiştir.

Moharrami vd. (2017) de farklı bir tür olan *Hyoscyamus recilatus*'a ait saçak köklerde alkaloid birikimini artırmak amacıyla demir oksit partikülleri kullanmışlardır. Bu amaçla araştırmacılar 0, 450, 900, 1800 ve 3600 mg/l konsantrasyonlarında demir oksit partiküllerini uygulayarak 3 farklı dönemde (24., 48. ve 72. saat) alkaloid miktarlarını incelemişlerdir. En yüksek hiyosiyamin üretimi 24 saat boyunca 900 mg/l demir oksit partiküllerine maruz bırakılan bitkilerde gözlenirken; kontrol kültürlerinde % 8.69 olan hiyosiyamin içeriğinin 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.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında bitkisel materyal olarak kullanılan siyah banotu (*Hyoscyamus niger* L.)'na ait tohumlar, İstanbul Zeytinburnu Belediyesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bahçesi Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

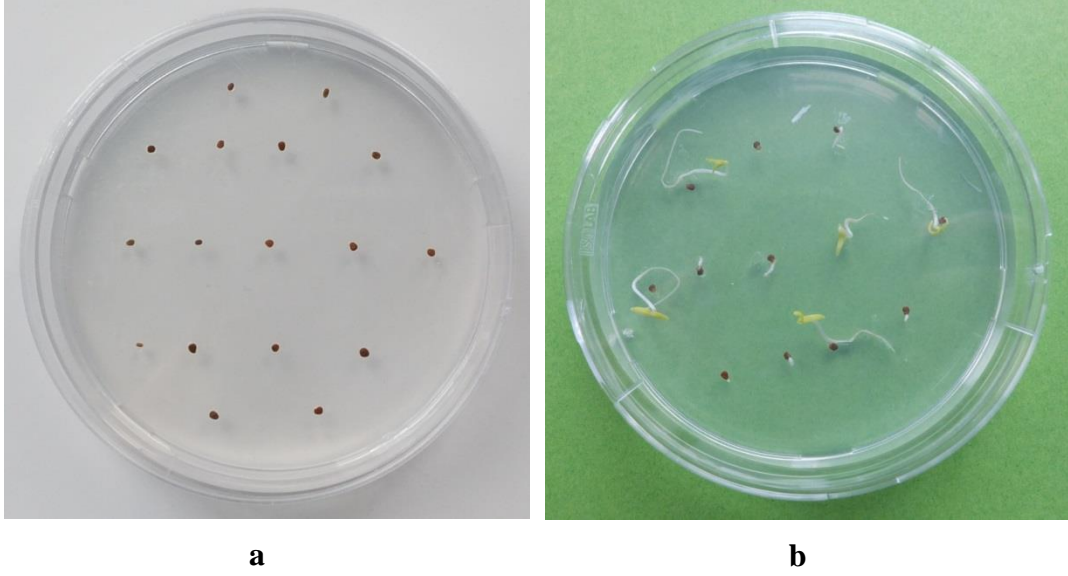
3.2. Yöntem

3.2.1. Tohumlara GA₃ uygulamasının yapılması

Siyah banotu tohumlarının normal laboratuvar koşullarında çimlenme oranlarının düşük olması nedeniyle, tohumlardaki dormansiyi kırmak ve çimlenme oranını artırmak için tohumlar, besin ortamlarına aktarılmadan önce 48 h süreyle 250 mg/l GA₃ çözeltisinde bekletilmişlerdir (Ghorbanpour vd., 2013a).

3.2.2. Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Tohumlar, GA₃ çözeltisi ile muamele edildikten sonra kabin içerisinde steril saf su ile 4 kez yıkanmış ve ardından 10 saniye süreyle % 70'lik etanol içinde bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar birkaç damla Tween-20 içeren % 0.1 civa klorür (HgCl₂) çözeltisi ile 10 dakika sterilize edilmiştir. HgCl₂ içinde bekletilmelerinin ardından, tohumlar her biri en az 5 dakika olmak üzere 4 kez de steril saf su ile yıkanarak çimlendirme için hazır hale getirilmişlerdir (Aljibouri vd., 2012). Tohumlar daha sonra 30 g/l sakkaroz ve 6 g/l agar içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamlarına aktarılarak (Şekil 3.1a), 25°C sıcaklıkta ve 24 h karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır (Aljibouri vd., 2012). Besin ortamına aktarılmalarından 15 gün sonra çimlenen bitkicikler (Şekil 3.1b), 15 gün de sıcaklığı 25°C, ışıklandırma periyodu da 16 saat ışık, 8 saat karanlık olarak ayarlanmış koşullarda yetiştirilmişlerdir.



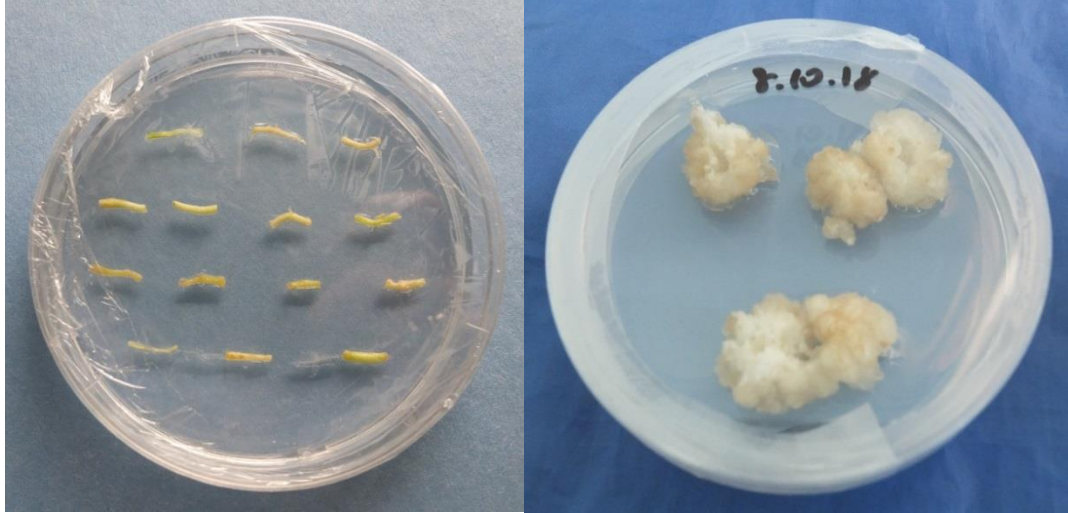
Şekil 3.1. Besin ortamlarına ekilmiş tohumlar (a) ile ekimden 15 gün sonra çimlenmiş bitkicikler (b)

3.2.3. Kallus kültürlerinin elde edilmesi ve çoğaltılması

Araştırmada kallus dokusunu oluşturmak amacıyla bitkisel materyal olarak dört haftalık *in vitro* fidelerden (Şekil 3.2) alınan hipokotil dokuları kullanılmıştır. Uzunluğu 0.5 cm olacak şekilde hazırlanan hipokotil parçaları, içinde 0.5 mg/l BA, 2 mg/l NAA, 30 g/l sakkaroz ve 6 g/l agar bulunan MS ortamlarına dikilmiş (Şekil 3.3a) ve 25 °C sıcaklık ve karanlık koşullarda kültüre alınmıştır (Aljibouri vd., 2012). Oluşan kalluslar daha sonra aynı besin ortamlarında ve kültür koşullarında 4 hafta aralıklarla alt kültüre alınarak kallus dokusunun çoğaltılması sağlanmıştır (Şekil 3.3b).



Şekil 3.2. Dört haftalık siyah banotu bitkileri



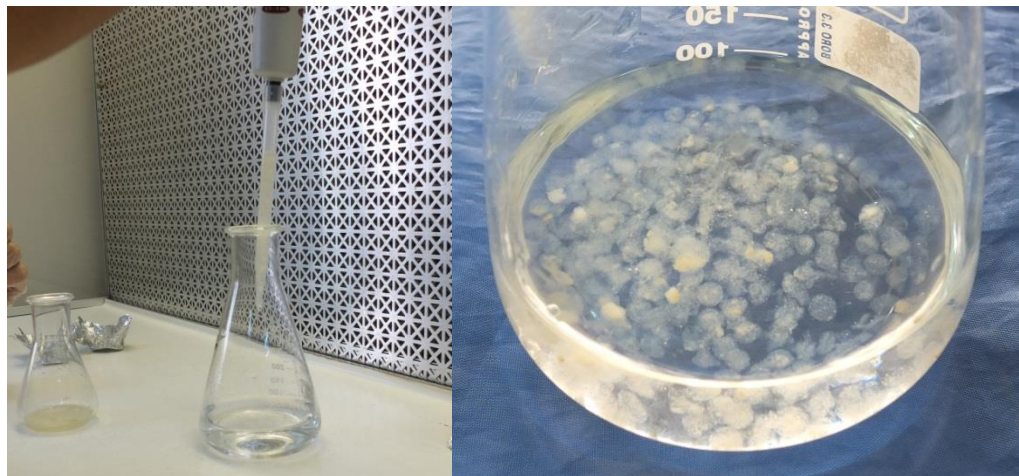
a

b

Şekil 3.3. Besin ortamlarına dikilmiş hipokotil eksplantları (a) ile bunlardan oluşan kalluslar (b)

3.2.4. İmmobilizasyon işleminin yapılması

2 haftalık kallus kültürlerinden alınan yaklaşık 1 g hücre, 50 ml %2 sodyun aljinat ve içinde 0.5 mg/l BA, 2 mg/l NAA ve 30g/l sakkaroz bulunan 25 ml sıvı MS ortamı ile karıştırılarak, 0.2 M CaCl_2 çözeltisi içine bir pipet yardımıyla damla damla pompalanarak jel boncukları oluşturulmuştur (Şekil 3.4 a) (Sajc vd., 1995). Bu ortamda 30 dakika bekletilerek sertleşmesi sağlanan boncuklar, daha sonra süzülüp, 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra uygulamalarda kullanılmışlardır (Şekil 3.4b).



a

b

Şekil 3.4. Jel boncuklarının oluşturulması (a) ve CaCl_2 çözeltisinde sertleştirilen jel boncukları (b)

3.2.5. İmmobilize edilmiş hücelere MeJA ve 24-eBL uygulamalarının yapılması

İmmobilize olmuş hücelere MeJA ve BR uygulamaları MeJA ve BR kombinasyonlarından oluşan 8 farklı uygulama şeklinde yapılmıştır. Araştırmada BR olarak etkin ve stabil olmasının yanı sıra (Khrpach vd., 2003), enzimatik aktivite ve antioksidant sistemlerdeki uyarıcı etkisinin daha yüksek olması nedeniyle 24-epibrassinolid (24-eBL) kullanılmıştır (Hayat vd., 2010). Hazırlanan MeJA ve 24-eBL stok çözeltileri filtre sterilizasyona tabi tutulduktan sonra, Çizelge 3.1'deki kombinasyon ve miktarlarda olmak üzere içinde 0.5 mg/l BA, 2 mg/l NAA ve 30g/l sakkaroz bulunan 50 ml sıvı MS besin ortamlarına ilave edilmişlerdir. Daha sonra bu ortamlarda immobilize olmuş hüceler, 25°C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda 100 rpm hızında çalkalanarak kültüre alınmışlardır. Hasat, uygulamaları takip eden 30. günde yapılmıştır (Khater ve Elashtokhy, 2015). Hasattan sonra immobilize olmuş hüceler, kalsiyum-aljinat boncuklarından ayrılmalrı için %1'lik sodyum sitrik asit çözeltilisinde 25°C'de 30 dakika süresince bekletilmişlerdir (Sajc vd., 1995). Daha sonra serbest hale gelen hüceler, steril saf su ile yıkanıp, kurutma kağıdı ile suları alındıktan sonra analizlerde kullanılmışlardır. Araştırma 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 4 erlen olacak şekilde kurulmuştur.

Çizelge 3.1. Araştırmada yapılan 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

3.2.6. Hücre büyümesine ilişkin yapılan incelemeler

3.2.6.1. Yaş hücre ağırlığının belirlenmesi

Hücrelerin uygulamalar sonrasında ağırlıklarının analitik terazide tartılmasıyla g olarak bulunmuştur.

3.2.6.2. Kuru hücre ağırlıklarının belirlenmesi

Hasat edilmiş hücrelerin yaş ağırlıklarının alınmasından sonra, 40°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmalarının ardından analitik terazide tartılmaları ile g olarak belirlenmiştir.

3.2.6.3. Hücre büyüme indeksinin belirlenmesi

Hücre büyüme indeksi aşağıdaki formülden yararlanılarak belirlenmiştir (Biçer vd., 2017). Büyüme indeksi (BI): (hasat edilen hücre yaş ağırlığı (g)-inoküle edilen hücre yaş ağırlığı (g))/inoküle edilen hücre yaş ağırlığı (g)

3.2.7. Siyah banotu hücrelerinde metabolit ekstraksiyonlarının yapılması

Araştırmada tropan alkaloidlerinin ekstraksiyonu Jakobová vd. (2012)’nin kullandıkları yönteme göre yapılmıştır. Buna göre kurutulup havan ve kolu ile ezilerek toz haline getirilen 200 mg örnek, 10 ml metanol:saf su (3:2) karışımında 30 dakika boyunca ultrasonik su banyosu kullanılarak ekstrakte edilmişlerdir. Daha sonra 15 dakika boyunca 10000 rpm’de santrifüj edilen örneklerin sıvı kısımları ayrı bir kaptan toplanmıştır. Bu şekilde ekstraksiyon işlemi ultrasonik su banyosundaki kalma süresi 15 dakikaya düşürülerek 2 kez daha tekrarlanmıştır. Bir araya getirilen sıvı fazlar evaporatörde uçurulduktan sonra, kalıntı 750 µl saf metanol ile çözdürülmüştür. Örnekler 0.45 µm’lik filtrelerden geçirilerek analizlerde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

Fenolik madde analizleri için ise ekstraksiyon 100 mg kuru hücrenin, 3 kez %0.1 HCl içeren 10 ml metanol içinde 30 dakika ultrasonik su banyosunda tutulması ve santrifüj edilmesi ile elde edilen supernatant kısımlarının rotary evaporatörde uçurularak, kalıntının 1 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 belirlenmiştir. Bu nedenle fenolik bileşik analizleri de tropan alkaloidleri ekstraksiyonu kullanılarak yapılmıştır.

3.2.8. Tropan alkaloidlerinin belirlenmesi

Tropan alkaloidlerinden hiyosiyamin ve skopolamin miktarlarının belirlenmesi Shimadzu marka Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) ile yapılmış olup, HPLC cihazının özellikleri ve kullanılan gradient program Çizelge 3. 2’de verilmiştir (Jakabová vd., 2012).

Çizelge 3.2. Tropan alkaloidlerinin HPLC ile belirlenmesinde kullanılan parametre ve gradient programı

Parametreler		Gradient Program		
Dedektör	SPD-M20 A DAD	Zaman (dakika)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)
Pompa	LC-20 AD	0	100	0
Gaz arındırıcı	DGU-20A	12	88	12
Kolon fırını	CTO-10 AS vp	13	80	20
Kolon	Agilent-C18 (250 mm x 4.6 mm) 5 µm	33	72	28
Mobil faz	A: Asetik asit-Ultra saf su (2:98) B: Metanol	48	70	30
Akış hızı	0.8 ml/dak			
Kolon sıcaklığı	40 °C			

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

3.2.9. Toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi

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

3.2.10. Fenolik bileşenlerin HPLC ile belirlenmesi

İmmobilize olmuş hücrelerdeki fenolik bileşiklerin (gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, vanilin, *p*-kumarik, *o*-kumarik, ferulik asit, rutin, sinamik asit, kuersetin,) miktarlarının HPLC ile belirlenmesi laboratuvarımızca geliştirilen ve Çizelge 3.3 de belirtilen metot ile yapılmıştır (Baydar vd., 2011).

Çizelge 3.3. Fenolik bileşiklerin HPLC analizlerinde kullanılacak parametre ve gradient programı

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

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)		

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

3.2.11. İstatistik analizler

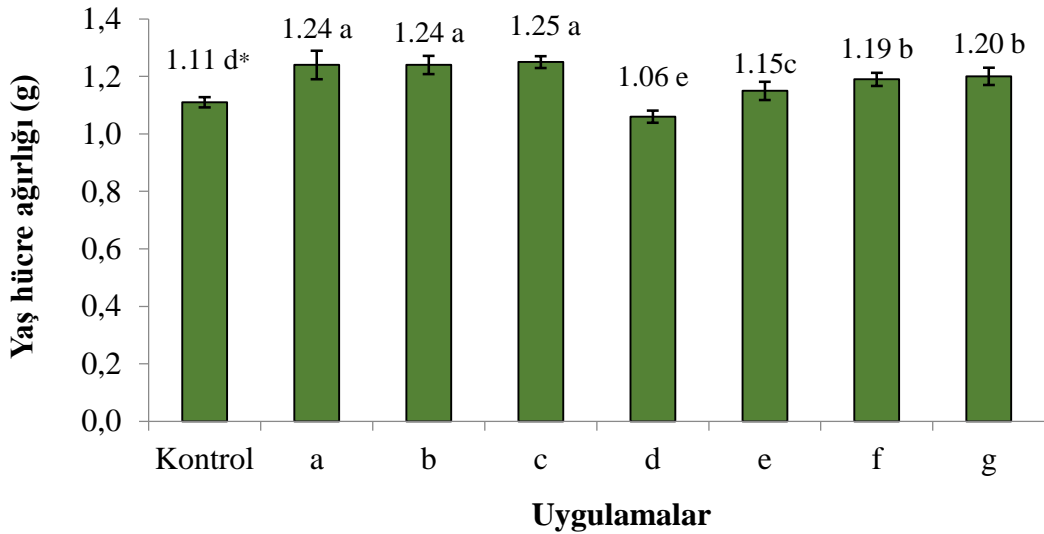
Araştırma sonucunda elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak yapılmış olup, uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Siyah banotuna ait immobilize edilmiş hücrelerde farklı konsantrasyonlarda uygulanan 24-eBL'nin, MeJA ile yapmış olduğu tekli ya da ikili kombinasyonlarının hücre 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 Hücre Ağırlığı Üzerine Etkileri

Araştırmada hücre büyümesinin bir göstergesi olarak ilk incelenen özellik yaş hücre ağırlığı olup, bu özellik bakımından yapılan istatistiksel analizler sonucunda, 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre yaş hücre 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 hücre 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)

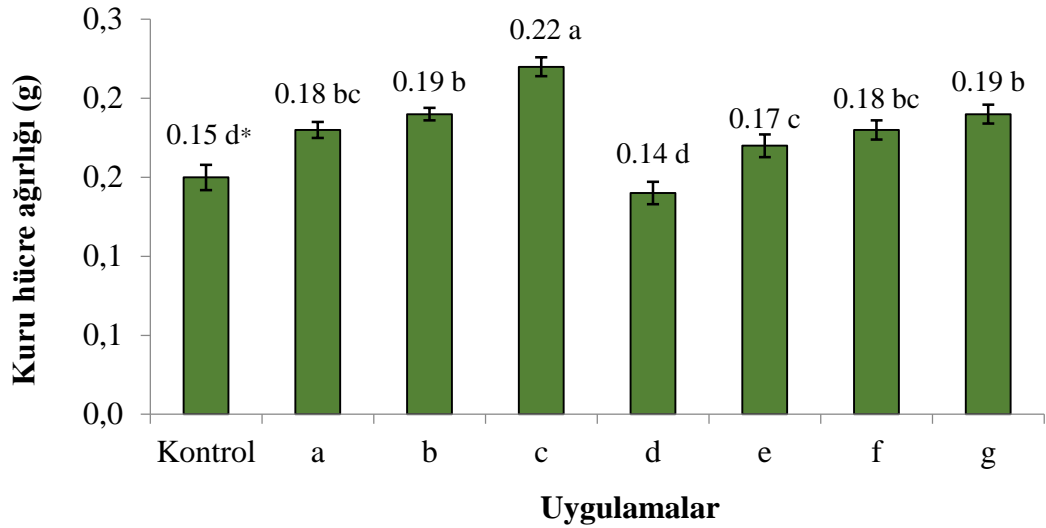
*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır ($p<0.05$).

Araştırmada en yüksek yaş hücre ağırlıkları 1.24 g ile 1.25 g arasında değişen değerlerle sadece 24-eBL içeren uygulamalarda tespit edilmiştir. En düşük hücre yaş ağırlığı ise 1.06 g ile 1 mM MeJA uygulamasından elde edilmiş olup, bu uygulamayı 1.11 g ile kontrol grubunun izlediği belirlenmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde, yaş

hücre ağırlığı üzerinde 24-eBL'nin olumlu bir etkisinin bulunduğu ve bu olumlu etkinin konsantrasyonlara göre önemli bir farklılık yaratmadığı saptanmıştır. MeJA'nın ise yaş hücre ağırlığı üzerinde engelleyici bir etkide bulunduğu; ancak bu engelleyici etkinin 24-eBL ile yaptıkları kombinasyonlarda azaldığı tespit edilmiştir.

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

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



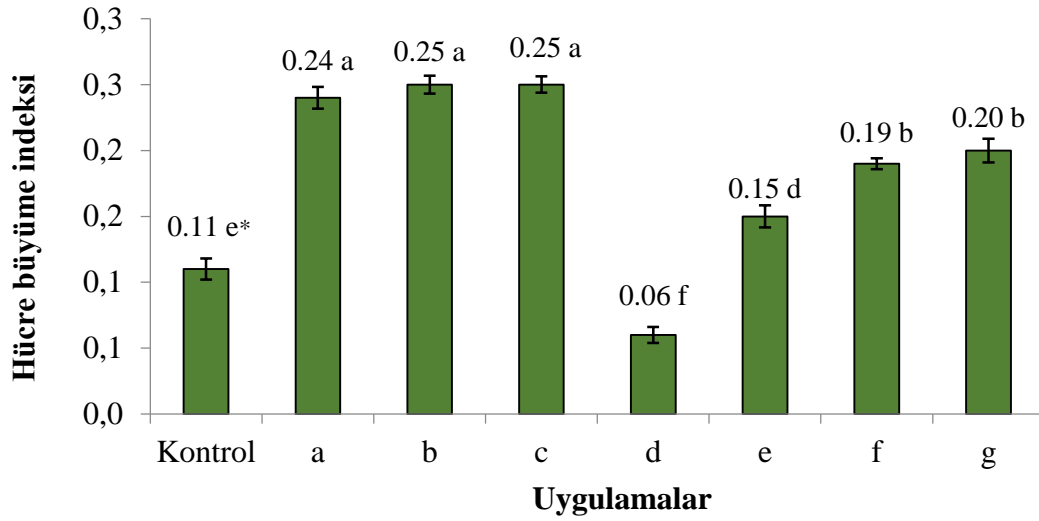
Şekil 4.2. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının kuru hücre ağırlığı üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

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

Şekil 4.2 incelendiğinde, en yüksek kuru hücre ağırlığı 0.22 g ile 2 mg/l 24-eBL uygulaması yapılmış hücrelerde saptanırken; en düşük kuru hücre ağırlıklarının ise 0.14 g ve 0.15 g gibi birbirine çok yakın değerlerle sırasıyla 1 mM MeJA içeren uygulamalarda kültüre alınan hücrelerle kontrol grubu hücrelerden elde edildiği tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca kuru hücre ağırlığının 24-eBL konsantrasyonunun artışına paralel olarak arttığı, MeJA'nın ise tek olarak kullanıldığında kuru hücre ağırlığı üzerinde kontrolle kıyaslandığında önemli bir farklılık yaratmadığı belirlenmiştir.

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

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



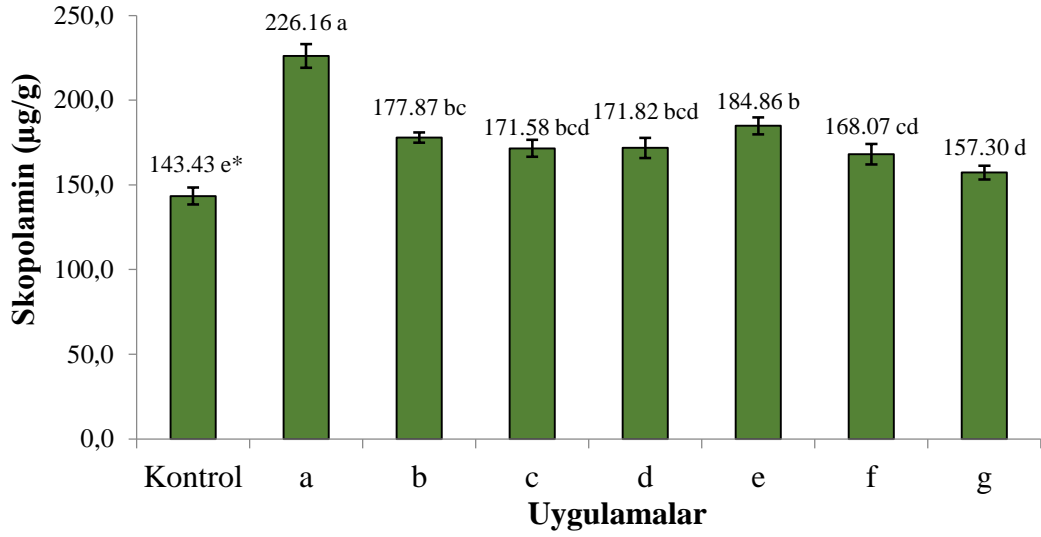
Şekil 4.3. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının hücre büyüme indeksi üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

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

En yüksek hücre büyüme indeksinin, yaş hücre ağırlığında olduğu gibi sadece 24-eBL uygulanan kültürlerde elde edildiği tespit edilmiştir. Bu uygulamalarda hücre büyüme indeksi 0.24 ile 0.25 arasında değişmiştir. En düşük değer 1mM MeJA uygulaması yapılan hücrelerde 0.06 olarak bulunurken, bu uygulamayı kontrol grubunun 0.11 ile izlediği tespit edilmiştir. Araştırmada kontrol grubu hücreler ile kıyaslandığında 24-eBL uygulamalarının hücre büyüme indeksi üzerine olumlu etkiler gösterirken, MeJA uygulamasının ise engelleyici yönde etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca 24-eBL ve MeJA'nın birlikte kullanılmasının, MeJA'nın hücre büyümesi üzerine gösterdiği olumsuz etkiyi azaltarak, hücre büyüme indeksini kontrole göre artırdığı da belirlenmiştir.

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

Siyah banotu bitkisine ait immobilize kültürlerde yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarının skopolamin birikimi üzerine etkilerinin incelendiği bu araştırmada elde edilen sonuçlar Şekil 4.4’de sunulmuştur.



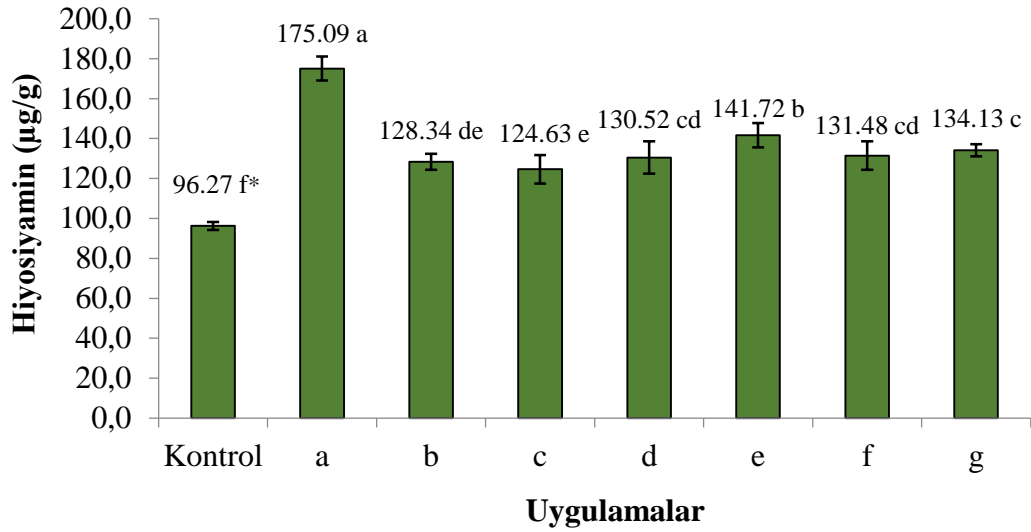
Şekil 4.4. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının skopolamin miktarı üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

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

Araştırmada yapılan istatistiksel analizler sonucunda, hücrelerde skopolamin birikiminin, 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Buna göre yapılan tüm uygulamaların kontrol grubuna göre skopolamin birikimini artırdığı belirlenmiştir. En düşük skopolamin birikimi kontrol grubu hücrelerde 143.43 µg/g olarak tespit edilmiştir. En yüksek skopolamin birikimi ise 226.16 µg/g ile 0.5 mg/l 24-eBL uygulamasında belirlenmiştir. Araştırmada dikkate değer bulgulardan biri de artan 24-eBL konsantrasyonlarının hem tek hem de 1 mM MeJA ile yapmış olduğu kombinasyonlarda skopolamin birikimini azaltıcı yönde etki göstermesidir.

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

Siyah banotuna ait immobilize hücrelerin, 24-eBL ve MeJA uygulamaları sonucunda hiyosiyamin birikimi bakımından göstermiş oldukları performanslara ilişkin elde edilen bulgular Şekil 4.5’de sunulmuştur. İstatistiksel analizler sonucunda hücrelerde hiyosiyamin birikiminin, yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarına göre farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$).



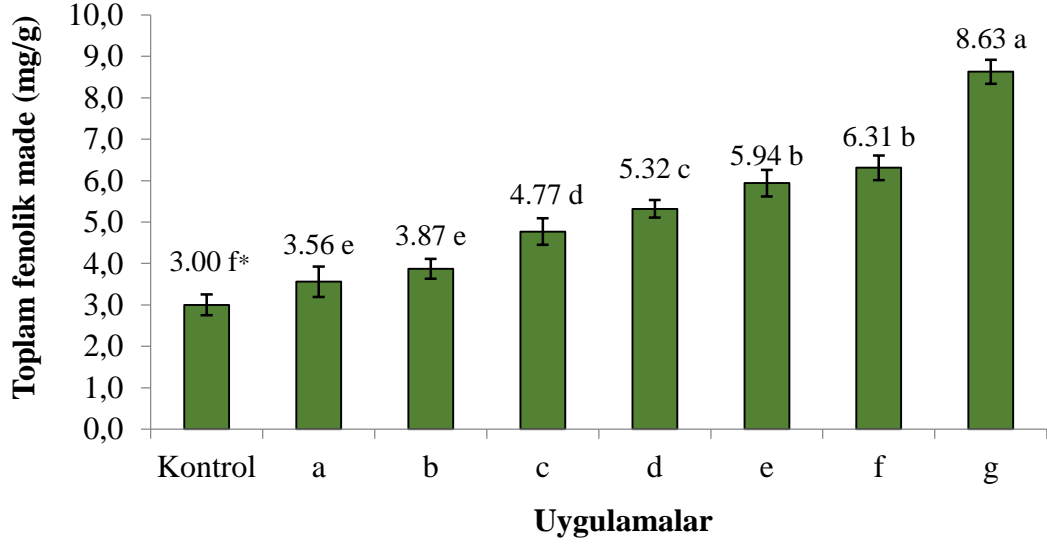
Şekil 4.5. 24-eBL ve MeJA uygulamalarının hiyosiyamin üzerine etkileri (a: 0.5 mg/l 24-eBL; b: 1 mg/l 24-eBL; c: 2 mg/l 24-eBL; d: 1 mM MeJA; e: 0.5 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; f: 1 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA; g: 2 mg/l 24-eBL+1 mM MeJA)

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

Şekil 4.5’in incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, bütün 24-eBL ve MeJA uygulamalarının hiyosiyamin birikimini kontrole göre önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Hiyosiyamin miktarının uygulamalara göre değişimi, skopolamin miktarındaki değişikliklere benzer bir eğilim göstermiştir. Buna göre en yüksek hiyosiyamin birikimi 175.09 µg/g ile 0.5 mg/l 24-eBL uygulamasında tespit edilirken, en düşük hiyosiyamin birikimi de 96.27 µg/g ile kontrol grubu hücrelerde belirlenmiştir. Artan 24-eBL konsantrasyonlarının 0.5 mg/l 24-eBL uygulamasına göre hiyosiyamin birikimi üzerinde kısıtlayıcı bir etki gösterdiği de belirlenmiştir.

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

Toplam fenolik madde miktarı üzerine 24-eBL ve MeJA uygulamalarının etkilerinin 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’da sunulmuştur.



Şekil 4.6. 24-eBL ve 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)

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

Araştırmada yapılan tüm uygulamaların kontrol ile kıyaslandığında toplam fenolik madde miktarını önemli ölçüde artırdığı; en düşük değerinde elde edildiği kontrol grubu hücrelerdeki toplam fenolik madde miktarının da 3.00 mg/g olarak bulunduğu tespit edilmiştir. En yüksek toplam fenolik madde miktarı ise 8.63 mg/g ile 1mM MeJA + 2 mg/l 24-eBL kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde saptanmıştır. Araştırmada 1mM MeJA uygulamasının, 24-eBL'nin tek olarak kullanıldığı ortamlara göre toplam fenolik madde miktarını daha fazla artırdığı belirlenmiştir. Ancak toplam fenolik madde miktarının MeJA ve 24-eBL'nin birlikte kullanıldığı ortamlarda daha yüksek düzeylerde bulunduğu tespit edildiği araştırmada, 24-eBL konsantrasyonları içinde de 2 mg/l en uygun konsantrasyon olduğu saptanmıştır.

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

Araştırmada 24-eBL ve MeJA uygulamalarının immobilize hücrelerdeki fenolik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkileri de incelenmiş olup, bu kapsamda gallik asit, kateşin, epikateşin, vanilin, sinnamik asit, rozmarinik asit, *p*-kumarik asit ve klorogenik asit miktarlarının birikimi HPLC ile belirlenmiştir. İncelenen fenolik bileşiklerin birikiminin yapılan uygulamalara göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). İncelenen bu bileşikler içinde *o*-kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit hücrelerde tespit edilemezken; diğer bileşiklerin birikiminin yapılan uygulamalara göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Fenolik bileşiklerden elde edilen bulgular Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden ilki gallik asit olup, yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarının hücrelerdeki gallik asit miktarını kontrole kıyasla önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). En düşük gallik asit miktarı 2.20 $\mu\text{g/g}$ ile kontrol grubu hücrelerde belirlenmiştir. En yüksek gallik asit miktarı ise 1mM MeJA ve 2mg/l 24-eBL uygulamasında 57.05 $\mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiştir. Araştırmada hem 24-eBL’nin hem de MeJA’nın gallik asit miktarını artırdıkları, fakat en yüksek birikimini 24-eBL ve MeJA’nın birlikte kullanıldığı kombinasyonlardan elde edildiği belirlenmiştir.

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik de kateşindir. Kontrol grubu hücrelerde kateşin tespit edilemezken, yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamaları ile hücrelerde kateşin birikiminin gerçekleştiği görülmüştür. En yüksek kateşin miktarı 66.48 $\mu\text{g/g}$ ile 1mM MeJA’nın 0.5 mg/l 24-eBL ile yaptığı kombinasyonda tespit edilmiştir. MeJA ve 24-eBL’nin birlikte kullanımlarının kateşin birikimini önemli ölçüde artırdığının belirlendiği araştırmada, tek olarak uygulandıkları taktirde MeJA’nın, 24-eBL’ye göre kateşin miktarını artırmada daha etkili bir uygulama olduğu da belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Epikateşin bakımından yapılan incelemeler sonucunda, MeJA ve 24-eBL uygulamalarının kontrole göre epikateşin miktarını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu hücrelerde 225.59 $\mu\text{g/g}$ ile en düşük epikateşin miktarı elde

edilirken, en yüksek epikateşin miktarı ise 648.03 µg/g ile kateşinde olduğu gibi 1 mM MeJA + 0.5 mg/l 24-eBL kombinasyonundan elde edilmiştir. Araştırmada 24-eBL tek olarak uygulandığında artan konsantrasyonlarının kateşin birikimi üzerinde önemli bir etkide bulunmadığı; ancak, MeJA ile birlikte kullanıldığında artan 24-eBL dozu ile ters orantılı olarak epikateşin miktarının da azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Araştırmada incelenen diğer bir fenolik bileşik olan vanilin birikiminin, yapılan MeJA ve 24-eBL uygulamaları sonucunda arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.1). En düşük vanilin birikimi kontrol grubu hücrelerde 0.19 µg/g olarak tespit edilmiştir. En yüksek vanilin miktarları ise 1mM MeJA'nın 0.5 ve 1 mg/l 24e-BL ile yapmış oldukları kombinasyonlardan elde edilmiştir. MeJA ile birlikte kullanıldığında 24-eBL konsantrasyonunun 2 mg/l çıkmasının ise vanilin birikimini olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır.

Sinamik asit de araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşiktir. Sinamik asit miktarı yapılan MeJA ve 24-eBL uygulamaları ile kontrole göre önemli derecede artmıştır. En düşük sinamik asit birikimi 0.11 µg/g ile kontrol grubu hücrelerde saptanırken; en yüksek sinamik asit birikimi ise 2.80 µg/g ile 2.87 µg/g arasında değişen değerlerle 1mM MeJA'nın 24-eBL ile yaptığı kombinasyonlardan elde edilmiştir. Araştırmada tek olarak kullandıklarında MeJA ve 24-eBL'nin kontrole göre vanilin miktarını artırmaya karşın; birlikte kullanımlarının daha etkili olduğu da belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Siyah banotuna ait immobilize hücrelerinde yapılan uygulamaların rosmarinik asit birikimi üzerine etkilerinin incelendiği araştırmada, en düşük rosmarinik asit birikimi kontrol grubu hücrelerde 4.21 µg/g olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.1). Araştırmada tüm MeJA ve 24-eBL uygulamalarının rosmarinik asit birikimini kontrole göre artırdığı; ancak bunların tek olarak kullanımlarına göre birlikte kullanımlarının rosmarinik asit birikimi bakımından daha etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir. En yüksek rosmarinik asit birikimi ise 37.40 µg/g ile 1mM MeJA ve 2mg/l 24-eBL uygulamasında 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	<i>p</i> -kumarik asit	Klorojenik asit
Kontrol	2.20 g*	0.00 e	225.59 e	0.19 d	0.11 e	4.21 f	3.38 c	27.90 g
0.5 mg/l 24-eBL	12.88 f	9.66 d	277.00 d	0.22 d	2.72 ab	11.12 e	15.15 ab	112.23 f
1 mg/l 24-eBL	17.29 e	9.53 d	267.34 d	0.30 c	2.26 d	11.74 e	15.20 ab	475.18 e
2 mg/l 24-eBL	24.01 d	9.60 d	259.22 d	0.23 d	2.49 bc	18.61 d	16.15 a	707.54 d
1 mM MeJA	31.66 c	55.86 b	545.65 c	0.38 b	2.37 cd	21.72 cd	12.87 b	821.92 c
0.5 mg/l 24-eBL +1 mM MeJA	35.26 c	66.48 a	648.03 a	0.48 a	2.83 a	24.99 bc	14.84 ab	816.55 c
1 mg/l 24-eBL+ 1 mM MeJA	42.91 b	40.73 c	590.29 b	0.50 a	2.80 a	25.96b	14.67 ab	951.04 b
2 mg/l 24-eBL + 1 mM MeJA	57.05 a	41.30 c	541.64 c	0.35 b	2.87 a	37.40 a	14.86 ab	1126.29 a

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

Araştırmada bir diğer fenolik bileşik olan *p*-kumarik asit birikimi incelendiğinde, MeJA ve 24-eBL uygulamalarının kontrol hücrelerine kıyasla *p*-kumarik asit birikimini arttırdığı tespit edilmiştir. En düşük *p*-kumarik asit birikimi 3.38 µg/g ile kontrol grubu hücrelerde belirlenirken, sadece 1mM MeJA uygulaması dışındaki diğer uygulamalar arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 24-eBL'nin *p*-kumarik asit birikimi bakımından MeJA'ya göre daha etkili bir bileşik olduğu da tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Araştırmada son olarak incelenen fenolik bileşik klorogenik asit olup, MeJA ve 24-eBL uygulamaları ile birlikte kontrole göre klorogenik asit birikiminde önemli miktarda artış tespit edilmiştir. En düşük klorogenik asit birikimi 27.90 µg/g ile kontrol grubu hücrelerden; en yüksek klorogenik asit birikimi ise 1126.29 µg/g ile 1mM MeJA ve 2mg/l 24-eBL uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu sonuç kontrol grubu hücrelerle karşılaştırıldığında klorogenik asit birikimini 40 kat arttırdığı göstermektedir. Araştırmada tek olarak uygulandıklarında MeJA uygulamasının, 24-eBL'ye göre daha etkili olduğu; ancak ikili kullanımlarının klorogenik asit birikimi bakımından tercih edilmesi gerektiği de saptanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

In vitro koşullarda gerçekleştirilen bu araştırmada, siyah banotu bitkisinin kalsiyum aljinat ile immobilize edilmiş hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki 24-eBL'nin tekli ya da MeJA ile yaptığı ikili kombinasyonların hücre büyüme parametreleri ile tropan alkaloidleri ve fenolik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

İmmobilizasyon, bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak için kullanılan etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde bitki hücreleri, agar, agaroz, kalsiyum aljinat, cam veya poliüretan köpük gibi bir destekleyici malzeme veya matris içinde sabitlenmektedir (Lindsey ve Yeoman, 1985). Bu teknik sayesinde kültür ortamında bir arada tutulan hücrelerde meydana gelen hücre-hücre etkileşimine bağlı olarak bazı gen ifadelerinin artması sonucunda sekonder metabolit sentezi uyarılabilmektedir (Smetanska, 2008). Ayrıca immobilize hücre kültürlerinde hücre süspansiyon kültürlerine kıyasla daha fazla miktarda sekonder metabolit üretiminin sağlandığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Gillet vd., 2000; Premjet ve Tachibana, 2004).

Bununla birlikte sekonder metabolit üretkenliği için besin ortamlarında ve kültürel koşullarda yapılan değişiklikler ile metabolitlerin biyosentez yolunda görevli olan öncül ya da ara maddelerin ortamlara ilave edilmeleri de oldukça popüler bir yöntemdir. Sekonder metabolitlerin senteziyle ilişkili genlerin aktivasyonunu sağladığı bilinen anahtar bir sinyal molekülü olan MeJA ile yeni nesil bir büyüme hormonu olarak karşımıza çıkan 24-eBL'nin bu yöntemler arasında başarı ile kullanılan uygulamalar olduğu bilinmektedir (Zhao vd., 2002; Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2016). Bu araştırmada da siyah banotu bitkisine ait tropan alkaloidlerinin ve fenolik bileşiklerinin sentezini artırmak amacıyla immobilize edilmiş hücre kültürlerinde 24-eBL ve MeJA uygulamalarına yer verilmiştir.

Araştırmada elde edilen sonuçlara göre, siyah banotuna ait immobilize hücrelere yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamalarının gerek hücre büyüme parametrelerini gerekse sekonder metabolit üretimini önemli ölçüde değiştirmiş olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, immobilize hücrelerin yaş ve kuru hücre ağırlıkları ile hücre

büyüme indeksi bakımından en düşük değerlerin 1mM konsantrasyonundaki MeJA uygulamasından elde edildiği tespit edilmiştir. Ancak MeJA ile birlikte ortama ilave edilen 24-eBL'nin, MeJA'nın hücre büyümesi üzerindeki olumsuz etkilerini iyileştirdiği de belirlenmiştir. Swiatek vd. (2003) MeJA'nın hücre büyümesi üzerindeki olumsuz etkisini, temel hücre döngüsünde G1/S ve G2/M evrelerine geçişin MeJA tarafından engellenerek aktif olarak bölünen hücre sayısını azaltmasına bağlamışlardır. Ayrıca immobilizasyon tekniği de hücrelerin büyümesini yavaşlatan bir uygulamadır. Nitekim Ketel vd. (1987) da immobilize edilmiş hücrelerde büyümenin yavaşlamasını ortamdaki oksijen transferinin immobilize edici ajanlar tarafından azaltılmasına bağlı olarak gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Elde ettiğimiz bulgulara paralel olarak Urdová vd. (2015) *Phyllanthus pulcher* bitkisi kallus kültürlerine uyguladıkları MeJA'nın kallus gelişimini baskıladığını tespit etmişlerdir. Riedel vd. (2012) de Muscat de Frontignan üzüm çeşidinde hücre süspansiyon kültürlerine uyguladıkları jasmonik asidin, kültüre ilave edilmesi sonucunda hücrelerin biyokütle miktarında azalmalar meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bulgularımızı destekler nitelikteki bir diğer araştırma da Ding vd. (2004) tarafından yapılmış olup, araştırmacılar *Onosma paniculatum* hücre kültürlerine 0.004-4.45 µm konsantrasyonunda uygulanan MeJA'nın, hücre büyümesini kontrol grubu hücrelere göre sırasıyla 2 ila 8 kat azalttığını ortaya koymuşlardır. Diğer taraftan Walker vd. (2002) *Hypericum perforatum* L. hücre kültürlerine uygulamış oldukları jasmonik asidin hücre büyümesini artırdığını; Sanchez-Sampedro vd. (2005) ise deve dikenini hücre süspansiyon kültürlerinde uygulanan MeJA'nın hücre büyümesi üzerine önemli bir etkide bulunmadığını ifade etmişlerdir. Bu sonuçlardan da anlaşılmaktadır ki, jasmonatların hücre büyümesi üzerine etkisi bitki tür ve çeşidine, uygulamanın jasmonik asit ya da MeJA formunda yapılmasına ve konsantrasyona bağlı olarak önemli değişiklikler gösterebilmektedir.

Araştırmada siyah banotu immobilize hücrelerine uygulanmış olan 24-eBL'nin hücre büyümesi üzerine etkileri incelendiğinde, 0.5, 1 ve 2 mg/l seviyelerindeki 24-eBL'nin incelenen bütün hücre gelişim parametreleri bakımından kontrole kıyasla daha fazla artış sağladığı, özellikle 2 mg/l konsantrasyonunda uygulanan 24-eBL'nin en yüksek değerlerin elde edildiği uygulama olduğu saptanmıştır. Hu vd. (2000), brassinosteroidlerin hücre bölünmesini uyaran siklin genlerinin transkripsiyonunu arttırarak hücre büyümesine katkı sağladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmada elde

edilen sonuçlara paralel olarak, Seldimirova vd. (2017) de buğday kallus kültürlerine uygulanan 24-eBL'nin hücrelerin kuru ve yaş ağırlıklarını arttırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, maş fasulyesi ve hardal otu bitkilerine dışsal olarak uygulanan farklı konsantrasyonlardaki 24-eBL ve 28-hBL'nin bitkilerdeki taze ve kuru ağırlığı kontrole göre önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir (Vardhini vd., 2011; Kumar., 2011). Que vd. (2018) de havuç fidelerine uyguladıkları 24-eBL'nin hücre uzamasını teşvik ederek havuç saplarının kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde büyüme gösterdiğini bildirmişlerdir. Diğer yandan Cheon, vd. (2010) ise farekulağı teresi bitkisine ait kallus kültürlerine 30 gün boyunca uyguladıkları BR'nin hücrelerin büyüme oranında azalmalar meydana getirdiğini ifade etmişlerdir. Nitekim BR'lerin kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre bölünmesi üzerinde hem teşvik edici hem de engelleyici etki gösterebildiği; kültür ortamındaki çok düşük BR konsantrasyonlarının büyüme teşvik ederken; çok yüksek konsantrasyonların ise büyüme inhibe edebileceği bildirilmiştir (Clouse ve Zurek, 1991; Grove vd., 1979). Bu durum Hu vd. (2000) tarafından, kullanılan BR konsantrasyonlarının mitotik hücre döngüsü ile olan etkileşimi ile ilişkilendirilmiştir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, siyah banotuna ait immobilize hücrelerde kullanılan 24-eBL ve MeJA'nın, bitkideki tropan alkaloidlerinden hiyosiyamin ve skopolamin miktarlarını da önemli ölçüde değiştirdiği tespit edilmiştir. Buna göre araştırmada en yüksek hiyosiyamin miktarı kontrole kıyasla 1.81 kat artış sağlayan 0.5 mg/l 24-eBL uygulaması sonucunda elde edilirken; en yüksek skopolamin miktarı da hiyosiyaminde olduğu gibi 0.5 mg/l 24-eBL'nin kullanıldığı hücrelerde belirlenmiştir. Bu uygulama ile skopolamin miktarında kontrole kıyasla 1.58 katlık bir artışın sağlandığı saptanmıştır.

Bitki hücrelerinde sekonder metabolitlerin senteziyle ilişkili reaksiyonlarda bir sinyal molekülü olarak görev alan MeJA, bu yönüyle *in vitro* sekonder metabolit üretiminde etkili olarak kullanılan anahtar bir bileşen olarak karşımıza çıkmaktadır. MeJA'nın, yaralanma, soğuk, UV ve patojen saldırısı gibi çevresel streslere karşı görev alarak bitki hücrelerinde sekonder metabolitlerin biyosentezini uyardığı bilinmektedir (Cheong ve Choi, 2003; Wasternack ve Hause, 2007; Koo ve Howe, 2009). Nitekim dışsal MeJA uygulamalarının, fenolik bileşikler, terpenoidler, antosiyaninler, poliaminler, antrakınonlar ve alkaloidler gibi birçok metabolitin

sentezini etkili bir şekilde artırmış olduğu bildirilmektedir (Onrubia vd., 2013; Ram vd., 2013; Ahn vd., 2014; Cao vd., 2014; Zhou vd., 2015; Çetin ve Baydar, 2016; Ducaiova vd., 2016; Biçer vd., 2017). Sunulan bu çalışmada siyah banotu immobilize hücrelerine uygulanan MeJA'nın kontrollere kıyasla hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerini sırasıyla 1.35 ve 1.12 kat artırmış olduğu belirlenmiştir. MeJA'nın alkaloid üretimindeki etkisini Aerts vd. (1994), alkaloidlerin senteziyle ilişkili enzimlerin ifadesinin MeJA tarafından kontrol ediliyor olmasıyla açıklamışlardır. Zhang vd. (2007) de MeJA'nın tropan alkaloidlerinin sentezinden sorumlu olan *h6h* geninin aktivitesinin arttırmasına bağlı olarak alkaloid sentezinin arttığını ifade etmişlerdir. Sunulan bu araştırmada, elde edilen bulgulara paralel olarak Jaremicz vd. (2014), siyah banotu bitkisi kök kültürlerinde kullandıkları 1 mM MeJA'ın 24. saat sonunda kontrol köklerine kıyasla skopolamin miktarını %100 oranında artırmış olduğunu bildirmişlerdir. Reddy ve Shankar (1993) ise immobilize edilmiş hücrelerdeki metabolit artışını immobilizasyon sonucu hücre zarı membran geçirgenliğinin artmasının bir sonucu olarak görmüşlerdir. Gontier vd. (1994), immobilize edilmiş *Datura innoxia* Mill. hücrelerinde tropan alkaloid birikiminin kontrol hücrelerine kıyasla 10 kat artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar bu artışın sebebini ortamda serbest halde bulunan kalsiyum klorür ile jel matriksindeki kalsiyum iyonlarının, alkaloid biyosentez mekanizmasını bir takım yollarla etkilemesine bağlamışlardır. Benzer şekilde Kang vd. (2004) *Scopolia parviflora* bitkisine ait kök kültürüne uyguladıkları MeJA'nın hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerini kontrole kıyasla önemli ölçüde artırmış olduğunu bildirmişlerdir. Bunlara ek olarak MeJA uygulaması yapılan acem lalesi, *Atropa baetica*, pervane çiçeği, üzerlik ve peygamber süpürgesi bitkilerinde alkaloid içeriğinde önemli artışlar meydana geldiği bildirilmiştir (Zayed ve Wink, 2005; Cho vd., 2008; El Jaber-Vazdekis vd., 2008; Uddin vd., 2018). Ancak MeJA'nın metabolit üretkenliği üzerindeki etkisi bitki tür ve çeşidine, MeJA konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak değişiklikler gösterebilmektedir. Bu nedenle, tropan alkaloidlerinin biyosentezinin maksimum uyarımını sağlamak için, sinyal bileşiklerinin hem konsantrasyonlarının hem de maruz kalma sürelerinin optimize edilmesi gerekmektedir (Kang vd., 2004).

Araştırmada immobilize edilmiş siyah banotu bitkisine ait hücre kültürlerine uygulanan 24-eBL'nin, hiyosiyamin ve skopolamin alkaloidlerinin birikimi üzerine

olumlu etkilerde bulunduğu; özellikle 0.5 mg/l konsantrasyonda kullanılan 24-eBL'nin en yüksek hiyosiyamin ve skopolamin birikimini sağlayan uygulama olduğu tespit edilmiştir. Ancak yapılan detaylı literatür taramaları sonucunda, siyah banotu bitkisinde ne immobilize edilmiş hücrelerde ne de serbest hücrelerde 24-eBL'nin alkaloid birikimi üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte diğer bitki türlerinde 24-eBL uygulamalarının alkaloid birikimi üzerine etkilerinin incelendiği sınırlı sayıdaki çalışmalardan birinde, pervane çiçeği yapraklarına uygulanan 20 ppm dozundaki 24-eBL'nin vinkristin alkaloidi miktarını önemli ölçüde artırarak 297 µg/g'a ulaştırdığı rapor edilmiştir (Muthulakshmi ve Pandiyarajan, 2015), Benzer şekilde Raghu vd. (2016) de *Tinospora cordifolia* bitkisi yapraklarına uyguladıkları, 2 µM konsantrasyonundaki 24-eBL'nin bitkideki alkaloid içeriğini önemli ölçüde arttırmış olduğunu tespit etmişlerdir. BR'lerin metabolitlerle ilişkili enzimlerin sentezinden sorumlu genlerin ifadelerini etkileyerek metabolit üretimine katkı sağladıkları düşünölmektedir

Araştırmada immobilize hücrelere uygulanan MeJA ve 24-eBL'nin fenolik bileşikler üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Buna göre MeJA uygulamasının toplam fenolik madde miktarı üzerine olumlu etkilerde bulunduğu ve bu etkinin 2 mg/l 24-eBL ile birlikte kullanıldığı ortamlarda daha da artarak, kontrol hücrelerine kıyasla toplam fenolik madde miktarında 2.9 katlık bir artış sağladığı belirlenmiştir. İmmobilize edilmiş hücrelerde meydana gelen fenolik madde artışını Cocetta vd. (2015) fenolik madde mekanizmasındaki enzimlerin sentezinin immobilizasyona bağlı uyarıldığı şeklinde açıklamışlardır. Araştırmada elde edilen sonuçlara paralel bir çalışmada da Koca vd. (2015) tarafından bildirilmiş olup, buna göre 0.5 mM MeJA'nın 2 mM 24-eBL ile birlikte fesleğen bitkisine uygulanması durumunda bitkideki toplam fenolik madde miktarının yaklaşık olarak 1.5 kat arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde Wang vd. (2015) de *Hypericum perforatum* süspansiyon kültürlerinde MeJA uygulamasının toplam fenolik madde birikimini, kontrol grubu hücrelerine kıyasla 2.7 kat arttığını ifade etmişlerdir. Barrientos Carvacho vd. (2014) de immobilize edilmiş brokoli hücrelerinde fenolik madde biyosentezindeki gen ifalelerinin anlamlı bir şekilde değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca pervane çiçeği yapraklarına (Liu vd., 2016) ve menekşe bitkisine ait sürgün kültürlerine (Skrzypczak-Pietraszek vd., 2014) uygulanan MeJA'nın toplam fenolik madde miktarını kontrole kıyasla önemli miktarda arttırdığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra Chung vd. (2016) *Momordica*

charantia L. saçak kök kültürlerinde JA ve SA uygulamalarının fenolik bileşiklerin üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar yapılan uygulamalar sonucunda, toplam fenolik madde miktarının artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmalara ek olarak *Habenaria edgeworth*, domates, pamuk, lahana, ve *Polygonum multiflorum* bitkilerine uygulanan MeJA'nın fenolik madde miktarlarını artırmış olduğu tespit edilmiştir (Kim vd., 2007; Giri vd., 2012, Kepczynska ve Krol, 2012; Konan vd., 2014; Thiruvengadam vd., 2016). MeJA'nın fenolik bileşikler üzerindeki artırıcı etkisini Wang vd. (2015) fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzim aktivitesinin MeJA uygulamaları sırasında artış göstermesi ile ilişkilendirmişlerdir.

Siyah banotu hücrelerine uygulanan 24-eBL'nin bitkideki tropan alkaloidlerinin yanı sıra fenolik bileşikleri de kontrol hücrelerine kıyasla arttırdığı tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen bulgular, Koca ve Karaman (2015)'nin fesleğen bitkisine uyguladıkları 24-eBL'nin bitkideki toplam fenolik madde içeriğini kontrole göre önemli ölçüde arttırdığı çalışma ile uyum içindedir. Benzer şekilde Aşçı vd. (2019)'nin lavanta bitkisine uyguladıkları 24-eBL'nin toplam fenolik madde miktarını artırmış olduğunu bildirdikleri araştırmada sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Ding vd. (2009) de hıyar bitkisi kök ve yapraklarına uygulamış oldukları 24-eBL'nin bitkideki fenolik madde içeriğini artırmış olduğunu bildirmişlerdir. BR'ler fenolik bileşiklerin sentezinden sorumlu fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ile polifenol oksidaz enzimlerinin sentezinden sorumlu genlerin aktivasyonunu sağlayarak metabolit üretimini teşvik etmektedirler (Asghari ve Zahedipour, 2016; Gao vd., 2016). Bunlar dışında BR uygulaması yapılan domates, turp, nane, ekinezya ve biber bitkilerindeki fenolik madde içeriğinin arttığı saptanmıştır (Ahammed vd., 2013, Choudhary vd., 2012; Çoban ve Baydar, 2017, Demirci, 2017; Yazdizadeh Shotorban vd 2013). Diğer yandan Aghdam vd. (2012) ise sera koşullarında BR uygulaması yapmış oldukları domates bitkisinde fenolik madde içeriğinde herhangi bir artış tespit edememişlerdir. Bu çalışma ile bulgularımız arasında oluşan farklılığın, BR'nin uygulama şekline (*in vivo*), bitki tür ve çeşidinden ve kullanılan konsantrasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tropan alkaloidlerince zengin bir bitki olduğu bilinen siyah banotunda ayrıca fenolik bileşiklerden klorojenik asit, vanilin, ferullik asit ve sinamik asitin bulunduğu da rapor edilmiştir. (Ma vd., 2002; Begum, 2010; Jassbi vd., 2014; Elsharkawy vd.,

2018). Ancak yapılan çalışmalarda daha çok bitkideki alkaloidlerin üzerine durulduğu ve fenolik bileşiklerin yeterince araştırılmadığı göze çarpmaktadır. Bununla birlikte gerek MeJA'nın gerekse 24-eBL'nin bitkideki fenolik bileşikler üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma da bulunmamaktadır. Bu nedenle literatürdeki eksikliği gidermek adına siyah banotu bitkisinde bulunduğu bilinen klorogenik asit, vanilin, ferullik asit ve sinnamik asitin yanı sıra kateşin, epikateşin, gallik asit, *p*-kumarik asit, rosmarinik asit ve kafeik asitin miktarları da araştırmada incelenmiştir.

Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden ilki gallik asit olup, yapılan tüm 24-eBL ve MeJA uygulamaları sonucunda kontrollere kıyasla gallik asit miktarının önemli ölçüde artmış olduğu belirlenmiştir. Özellikle 1 mM MeJA+2 mg/l 24-eBL'nin kombinasyon halinde uygulanmış olduğu hücrelerdeki gallik asit miktarının kontrole kıyasla 25.9 kat artış sağladığı görülmüştür. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde tek başına kullanılan 24-eBL'nin, hücrelerdeki gallik asit uyarımını artırmada etkili olduğu ve bu etkinin MeJA ile birlikte yapmış olduğu kombinasyonlar sonucunda daha da arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgulara paralel olarak An vd. (2006) de kavak yapraklarına uygulamış oldukları MeJA'nın bitkideki gallik asit miktarını kontrole göre önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir.

24-eBL ile MeJA uygulamalarının kateşin birikimi üzerine olan etkilerinin incelendiği araştırmada, kontrol hücrelerinde kateşin tespit edilememiştir. Ayrıca tek olarak uyguladıklarında MeJA'nın kateşin birikimi üzerine 24-eBL'den daha etkili olduğu görülmüştür. MeJA'nın 24-eBL ile yapmış olduğu kombinasyonlarda hücrelerdeki kateşin sentezinin, tek olarak kullanıldığı ortamlara göre daha etkili sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde Bulgakov vd. (2011) Japon porsuğu hücre süspansiyon kültürlerine uyguladıkları MeJA'nın kateşin birikimini arttırdığını ifade etmişlerdir. Kohli vd. (2017) de hardal otu fidelerine uygulanan 24-eBL'nin kontrol grubuna kıyasla 2.8 kat daha fazla kateşin birikimi sağladığını belirlemişlerdir. Mattheis vd. (2002) ise Fuji elma çeşidine 0.224 g/l dozunda uyguladıkları MeJA'nın, kateşini artırmada etkili olmadığını ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar, MeJA'nın kateşin birikimine olan etkisinin kullanılan konsantrasyonlar ile bitki tür ve çeşidine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Araştırmada incelenen fenolik bileşiklerden biri de epikateşin olup, epikateşinin de yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamaları sonucunda arttığı tespit edilmiştir. Araştırmada hücrelerdeki epikateşin sentezinin uyarılmasında tek olarak uygulandıklarında MeJA'nın, 24-eBL'ye göre daha iyi bir performans sergilediği tespit edilmiştir. Ayrıca MeJA'nın 24-eBL ile birlikte kullanıldığı ortamlardaki etkisinin tek başına kullanıldığı ortamlara göre daha yüksek olduğu da belirlenmiştir. Tıpkı kateşinde olduğu gibi en yüksek epikateşin miktarının da 1mM MeJA'nın 0.5 mg/l 24-eBL ile birlikte kullanılmasıyla elde edildiği ve bu hücrelerde kontrolün 2.88 katı daha fazla epikateşin birikiminin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara paralel olarak Glowacz vd. (2017), avakado meyvesine uyguladıkları MeJA'nın epikateşin miktarını artırdığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde yaban mersinine 0.1 mM konsantrasyonunda uygulanan MeJA'nın epikateşin birikimini arttırdığı saptanmıştır (Cocetta vd., 2015). Gumerova vd. (2015) de Tatar karabuğdayına ait hücre süspansiyon kültürlerinde kullandıkları 10 µM MeJA'nın epikateşin miktarını arttırdığını bildirmişlerdir.

MeJA ve 24-eBL uygulamalarının vanilin miktarını da önemli ölçüde artırmış olduğunun belirlendiği araştırmada, epikateşin ve kateşinde de olduğu gibi MeJA'nın 24-eBL'ye kıyasla daha fazla vanilin birikimine yol açtığı belirlenmiştir. Özellikle 1 mM MeJA'nın, 0.5 ve 1 mg/l 24-eBL ile yapmış olduğu kombinasyonlarında en yüksek vanilin birikimi sağlanmış olup, bu uygulamalarla kontrole kıyasla sırasıyla 2.53 ile 2.63 kat daha fazla vanilin birikiminin elde edildiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde *in vitro* koşullarda kudret narı saçak kök kültürlerine MeJA uygulaması yapan Chung vd. (2016) de uygulama sonucunda vanilin miktarının artmış olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik sinamik asit olup, yapılan MeJA ve 24-eBL uygulamaları sonucunda sinamik asitin kontrole göre önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Kültür ortamında tek olarak kullanılan 24-eBL ve MeJA'nın kontrole kıyasla daha fazla sinamik asit birikimine yol açtığı belirlenmiştir. Bununla birlikte 24-eBL ve MeJA'nın kombinasyon halinde uygulandıkları hücrelerdeki sinamik asit miktarının, kontrole ve diğer uygulamalara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 1 mM MeJA'nın 24-eBL ile yaptığı kombinasyonlarda kontrole kıyasla 25.45-25.80 kat daha fazla sinamik asitin elde edildiği saptanmıştır.

Domates bitkisine 3 μ M BR uygulaması yapan Aghdam vd. (2012)'nin sinnamik asit içeriğinin kontrole kıyasla önemli ölçüde artmış olduğunu bildirdikleri araştırma sonuçlarıyla, bu çalışmada elde edilen sonuçlar uyum içerisindedir.

Rosmarinik asitin de incelendiği çalışmada, hücrelerdeki sinnamik asit birikimini uyarımda MeJA'nın 24-eBL'ye göre daha etkili sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. 1 mM konsantrasyonunda MeJA uygulaması yapılan hücrelerde, kontrollerin 5.16 katı kadar rosmarinik asit içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca kateşin, epikateşin, vanilin ve sinnamik asitte de olduğu gibi MeJA'nın hücrelerdeki rosmarinik asit birikimi üzerindeki artırıcı etkisinin, 24-eBL ile birlikte kullanıldığı ortamlarda daha da arttığı saptanmıştır. Özellikle 2 mg/l 24-eBL ile birlikte kullanılan MeJA'nın kontrole kıyasla 8.9 kat daha fazla rosmarinik asit üretimini sağladığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde Kikowska vd. (2012) *Eryngium planum* L. bitkisine ait kallus kültürlerine uyguladıkları 100 μ M MeJA'nın rosmarinik asit miktarını kontrollere kıyasla yaklaşık 2 kat artırmış olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmadaki bulgulara paralel olarak, Georgiev vd. (2007) de lavanta bitkisine ait hücre süspansiyon kültürlerine uygulamış oldukları 5 μ M MeJA'nın rosmarinik asit miktarını 2.4 kat artırdığını tespit etmişlerdir.

Siyah banotu bitkisine ait immobilize hücrelerde bir diğer fenolik bileşik olan *p*-kumarik asit miktarının yapılan 24-eBL ve MeJA uygulamaları sonucunda değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Araştırma sonucunda hücrelerdeki *p*-kumarik asit birikimi üzerine MeJA ve 24-eBL'nin benzer etkilerde bulunarak gerek tek gerekse kombinasyon halinde uygulamaları durumunda kontrol hücrelerine kıyasla daha fazla *p*-kumarik asit elde edilmesini sağladıkları belirlenmiştir. Hücrelerde *p*-kumarik asit üretimi en fazla 24-eBL'nin tek ve 1 mM MeJA ile yaptığı kombinasyonlarda elde edildiği saptanmıştır. Konan vd. (2014) dış koşullarda pamuk bitkisi yapraklarına uyguladıkları 5 mM MeJA'nın bitkideki *p*-kumarik asit miktarını artırdığını bildirdikleri çalışma ile sonuçlarımız örtüşmektedir. Benzer şekilde Demirci (2017), ekinezya bitkisi saçak köklerine uygulamış olduğu 0.5, 1 ve 2 mg/l konsantrasyonundaki 24-eBL'nin tüm hasat günlerinde *p*-kumarik asit miktarını artırdığını belirlemiştir. Elde edilen bulgulardan farklı olarak, Öztürk vd. (2013) tarla koşullarında yetiştirmiş oldukları 3 erik çeşidi (Black Amber, Black Beauty ve Fortune)'ne 2.240 mg/l MeJA uygulamaları sonucunda *p*-kumarik asit miktarının

azaltmış olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, MeJA'nın *p*-kumarik asit üzerine olan etkisinin bitki tür ve çeşidine, MeJA konsantrasyonuna ve çalışmanın *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda yapılmasına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Araştırmada son olarak incelenen fenolik bileşik klorogenik asit olup, yapılan tüm MeJA ve 24-eBL uygulamalarında klorogenik asit miktarının kontrole kıyasla önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. MeJA'nın klorogenik asit birikimi üzerine uyarıcı etkisinin 24-eBL'ye göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca MeJA'nın bu uyarıcı etkisinin 24-eBL ile birlikte kullanılması ile daha da arttığı, özellikle 2mg/l 24-eBL ile birlikte uygulandığı hücrelerdeki klorogenik asit miktarının kontrole kıyasla 40 kat yükseldiği de tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarımıza paralel olarak Kikowska vd. (2015) de *Eryngium planum* bitki sürgün kültürlerinde kullandıkları MeJA'nın klorogenik asit miktarını kontrollere göre önemli ölçüde artırmış olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen bulguları destekleyen bir çalışmada da Liu vd. (2018) tarafından bildirilmiş olup, buna göre adi gardenia bitkisine ait kallus kültürlerine uygulanan 200 µM konsantrasyonundaki MeJA'nın klorogenik asit miktarında kontrol grubuna kıyasla 11.07 kat artış sağladığı tespit edilmiştir. Demirci vd. (2017) *in vitro* koşullarda yetiştirmiş oldukları ekinezya bitkilerine 30 gün süreyle uygulamış oldukları 50 µM konsantrasyonundaki MeJA'nın klorogenik asit miktarını 5.26 kat arttırdığını bildirmiştir.

Sonuç olarak araştırmada MeJA uygulamalarının hücre gelişimi üzerine olumsuz etkilerde bulunduğu tespit edilirken; 24-eBL uygulamalarının ise olumlu etkiler gösterdiği; ayrıca MeJA ile yapmış olduğu kombinasyonlar sonucunda 24-eBL'nin MeJA'nın hücre büyümesine olan olumsuz etkilerini iyileştirdiği de tespit edilmiştir. Tropan alkaloidleri ile fenolik bileşiklerin yapılan uygulamalara bağlı olarak gösterdiği değişikliklere bakıldığında ise, 24-eBL ve MeJA'nın bu metabolitlerin miktarını önemli derecede artırmış olduğu belirlenmiştir. Araştırma sonucunda en yüksek yaş ve kuru hücre ağırlığı ile hücre büyüme indeksi için 2 mg/l 24-eBL; skopolamin ve hiyosiyamin için 0.5 mg/l 24-eBL; fenolik bileşikler için de 1mM MeJA'nın 24-eBL ile yapmış olduğu ikili kombinasyonların en etkili uygulamalar olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aerts, R.J., Gisi, D., De Carolis, E., De Luca, V. & Baumann, T.W. (1994). Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *The Plant Journal*, 5(5), 635-643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1994.00635.x>
- 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>
- Ahamed, G.J., Ruan, Y.P., Zhou, J., Xia, X.J., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu. & J.Q. (2013). Brassinosteroid alleviates polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress by enhancing antioxidant enzymes activity in tomato. *Chemosphere*, 90(11), 2645-2653. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.041>
- Ahmed, Z.F. & Fahmy, I.R. (1949). Botanical and phytochemical studies in *hyoscyamus muticus*, LI. *Journal of The American Pharmaceutical Association*, 38(9), 479-483. <https://doi.org/10.1002/jps.3030380903>
- Ahn, S.Y., Kim, S.A., Cho, K.S. & Yun, H.K. (2014). Expression of genes related to flavonoid and stilbene synthesis as affected by signaling chemicals and *botrytis cinerea* in grapevines. *Biologia Plantarum*, 58(4), 758-767. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0437-2>
- 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.
- Alaghemand, A., Ghorbanpour, M., Eradatmand-Asli, D. & Moghaddasian, B. (2013). Influence of urea fertilization on tropane alkaloids content of henbane (*Hyoscyamus niger*) L. under hydroponic culture conditions. *Advances in Environmental Biology*, 7(2), 301-307.
- Ali, B., Hayat, S., Hasan, S.A. & Ahmad, A. (2006). Effect of Root Applied 28-Homobrassinolide on The Performance of *Lycopersicon esculentum*. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.015>
- 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.
- An, Y., Shen, Y.B., Wu, L.J. & Zhang, Z.X. (2006). A change of phenolic acids content in poplar leaves induced by methyl salicylate and methyl jasmonate. *Journal of Forestry Research*, 17(2), 107-110. <https://doi.org/10.1007/s11676-006-0025-1>

- Anonim (2012): [http://www. Naturatours.ch/bilder/ hyoscyamus_niger.jpg](http://www.Naturatours.ch/bilder/hyoscyamus_niger.jpg). (Son erişim tarihi:27.05.2019).
- Aoyagi, H., Yasuhira, J. & Tanaka, H. (1998). Alginate promotes production of various enzymes by *Catharanthus roseus* cells. *Plant Cell Reports*, 17(3), 243-247. <https://doi.org/10.1007/s002990050386>
- Archambault, J., Volesky, B. & Kurz, W.G.W. (1989). Surface Immobilization of Plant Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(3), 293-299. <https://doi.org/10.1002/bit.260330307>
- Arora, P., Bhardwaj, R. & Kanwar, M.K., (2010). 24-Epibrassinolide induced antioxidative defense system of *Brassica juncea* l. under zn metal stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(3), 285-293. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0031-9>
- Asada, M. & Shuler, M.L. (1989). Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption in situ, elicitors and alginate immobilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 475-481. <https://doi.org/10.1007/BF00263851>
- Asghari, M. & Zahedipour, P. (2016). 24-Epibrassinolide acts as a growth-promoting and resistance-mediating factor in strawberry plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(3), 722-729. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9577-2>
- Aşçı, Ö. A., Deveci, H., Erdeger, A., Özdemir, K.N., Demirci, T. & Baydar, N.G. (2019). Brassinosteroids promote growth and secondary metabolite production in lavandin (*Lavandula intermedia* emeric ex loisel.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 1-10. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i10.1448-1454.2072>
- Averesch, N.J. & Kayser, O. (2014). Assessing heterologous expression of hyoscyamine 6 β -hydroxylase a feasibility study. *Procedia Chemistry*, 13, 69-78. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00032>
- 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. (2010). Determination of hyoscyamine and scopolamine in four hyoscyamus species from iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 65-70. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2010.790>
- 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>

- Barrientos Carvacho, H., Pérez, C., Zúñiga, G. & Mahn, A. (2014). Effect of methyl jasmonate, sodium selenate and chitosan as exogenous elicitors on the phenolic compounds profile of broccoli sprouts. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2555-2561. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6596>
- Basu, P. & Chand, S. (1998). Tropane alkaloids from callus cultures, differentiated and shoots of *Hyoscyamus muticus* L. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 7(1), 39-42. <https://doi.org/10.1007/BF03263031>
- Baydar, H. (2013). *Tıbbi, Aromatik ve Keyif Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi*. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın Evi, (pp. 20-50), Isparta.
- 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, 67-76.
- Baytop, A. (1978). *Hyoscyamus* L. Flora of Turkey and The East Aegean Islands, 6, 453-456.
- Baytop, T. (1999). Therapy with Medicinal Plants in Turkey. Past and Present, 2, 142.
- Begum, A.S. (2010). *Hyoscyamus niger* Linn. seeds: a review. *Research Journal of Seed Science*, 3(4), 210-217. <https://doi.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.
- Besher, S., Al-Ammouri, Y. & Murshed, R. (2014). Production of tropan alkaloids in the *in vitro* and callus cultures of *Hyoscyamus aureus* and their genetic stability assessment using ISSR markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(3), 343-349. <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0242-6>
- Bhuyan, D.J. & Basu, A. (2017). Phenolic compounds potential health benefits and toxicity. In *Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Production Waste*. (pp. 27-59). CRC Press.
- Biçer, P.O., Demirci, T., Aşçı, Ö.A. & Baydar, N.G. (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.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.
- Brodelius, P., Deus, B., Mosbach, K. & Zenk, M.H. (1979). Immobilized plant cells for the production and transportation of natural products. *Febs Letters*, 103(1), 93-97. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81257-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81257-0)
- Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Veselova, M. V., Fedoreyev, S. A., Muzarok, T. I. & Zhuravlev, Y. N. (2011). Catechin production in cultured cells of *Taxus cuspidata* and *Taxus baccata*. *Biotechnology Letters*, 33(9), 1879-1883. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0632-6>
- Cao, S., Cai, Y., Yang, Z., Joyce, D. C. & Zheng, Y. (2014). Effect of MeJA treatment on polyamine, energy status and anthracnose rot of loquat fruit. *Food Chemistry*, 145, 86-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.019>
- 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>
- Cheon, J., Park, S.Y., Schulz, B., & Choe, S. (2010). Arabidopsis brassinosteroid biosynthetic mutant dwarf7-1 exhibits slower rates of cell division and shoot induction. *BMC plant biology*, 10(1), 270. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-270>
- 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*, vol. 96. Dorling Kindersley, London, (pp. 128)
- Cho, S.M., Kang, E.Y., Kim, M.S., Yoo, S.J., Im, Y.J., Kim, Y.C. & Cho, B.H. (2010). Jasmonate-dependent expression of a galactinol synthase gene is involved in priming of systemic fungal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Botany*, 88(5), 452-461. <https://doi.org/10.1139/B10-009>
- Choudhary, S.P., Oral, H.V., Bhardwaj, R., Yu, J.Q. & Tran, L.S.P. (2012). Interaction of brassinosteroids and polyamines enhances copper stress tolerance in *Raphanus sativus*. *Journal of Experimental Botany*, 63(15), 5659-5675. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers219>
- Chung, I.M., Thiruvengadam, M., Rekha, K. & Rajakumar, G. (2016). Elicitation enhanced the production of phenolic compounds and biological activities in hairy root cultures of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59. <http://dx.doi.org/10.1590/1678->

- Clouse, S.D. & Zurek, D. (1991). Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. In *ACS Symposium Series-American Chemical Society (USA)*.
- 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>
- Courdavault, V., Guirimand, G., St-Pierre, B. & Burlat, V. (2010). Biosynthesis and regulation of alkaloid. In *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*. (pp. 139–160)
- Cüneyt, Ç., Kevseroglu, K. & Saglam, 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>
- Çetin, E.S. & Baydar, N.G. (2016). Elicitor applications to cell suspension culture for production of phenolic compounds in grapevine. *Journal of Agricultural Sciences*, 22(1), 42-53.
- 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 Costa, F., CA Yendo, A., D Fleck, J., Gosmann, G. & G Fett-Neto, A. (2011). Immunoadjuvant and anti-inflammatory plant saponins: characteristics and biotechnological approaches towards sustainable production. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(10), 857-880. <https://doi.org/10.2174/138955711796575470>
- De-Baricevic, D., Umek, A., Kreft, S., Maticic, B. & Zupancic, A. (1999). Effect of water stress and nitrogen fertilization on the content of hyoscyamine and scopolamine in the roots of deadly nightshade (*Atropa belladonna*). *Environmental and Experimental Botany*, 42, 17-24. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(99)00014-3)
- 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).

- Demirci, T., Özmen, S., Yılmaz, E.G., Aşçı, Ö.A. & Baydar, N.G. (2017). The influence of methyl jasmonate on growth and caffeic acid derivative contents of *in vitro* shoot and roots in echinaceae (*Echinacea purpurea*). *Indian Journal Of Pharmaceutical Education And Research*, 51(3), S513-S517. <https://doi.10.5530/ijper.51.3s.77>
- Dicosmo, F. & Misawa, M. (1995). Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13(3), 425-453. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02005-N](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02005-N)
- Ding, J., Shi, K., Zhou, Y.H. & Yu, J.Q. (2009). Effects of root and foliar applications of 24-epibrassinolide on fusarium wilt and antioxidant metabolism in cucumber roots. *Hortscience*, 44(5), 1340-1345. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.5.1340>
- Ding, J., Shi, S., Jiang, B.H., Yang, Y.H., Huang, J., Shen, H.G. & Jiang, X. (2004). Effects of methyl jasmonate with indole-3-acetic acid and 6-benzylaminopurine on the secondary metabolism of cultured *Onosma paniculatum* cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40(6), 581-585. <https://doi.org/10.1079/IVP2004578>
- Dörnenburg, H. & Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(8), 674-684. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00108-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00108-4)
- Drager, B. (2002). Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 978(1-2), 1-35. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01387-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01387-0)
- Drager, B. (2004). Chemistry and biology of calystegines. *Natural Product Reports*, 21(2), 211-223. <https://doi.10.1039/B300289F>
- 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>
- Dučaiová, Z., Sajko, M., Mihaličová, S. & Repčák, M. (2016). Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. *Plant Growth Regulation*, 79(1), 81-94. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0114-2>
- El Jaber-Vazdekis, N., Barres, M.L., Ravelo, A.G., & Zarate, R. (2008). Effects of elicitors on tropane alkaloids and gene expression in *Atropa baetica* transgenic hairy roots. *Journal of natural products*, 71(12), 2026-2031. <https://doi.org/10.1021/np800573j>

- 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 841).
- Erkoyuncu, M.T. & Yorgancılar, M. (2016). Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi. *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 2(1), 66-76.
- Fahmy, I.R. (1963). Drug Plants Of Egypt 1. *Planta Medica*, 11(02), 202-224. <https://doi.10.1055/s-0028-1100236>
- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Ahmad, I. & Ahmad, A. (2014). Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum*, 58(1), 9-17. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0374-5>
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. & Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable Agriculture*. (pp. 153-188)
- Gao, H., Zhang, Z., Lv, X., Cheng, N., Peng, B. & Cao, W. (2016). Effect of 24-epibrassinolide on chilling injury of peach fruit in relation to phenolic and proline metabolisms. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 390-397. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.031>
- Georgiev, M.I., Kuzeva, S.L., Pavlov, A.I., Kovacheva, E.G. & Ilieva, M.P. (2007). Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* mm cell suspension culture with abiotic elicitors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 301-304. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9214-5>
- 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.10.3906/biy-1209-12>
- Ghorbanpour, M., Hatami, M. & Hatami, M. (2015). Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of *Hyoscyamus niger* L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application. *Acta Agriculturae Slovenica*, 105(1), 23-32. <https://doi.http://dx.doi.org/10.14720/aas.2015.105.1.03>
- Ghorbanpour, M., Omidi 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.
- Gilleta, F., Roisin, C., Fliniaux, M.A., Jacquin–Dubreuil, A., Barbotin, J.N. & Nava–Saucedo, J.E. (2000). Immobilization of *Nicotiana tabacum* plant cell

suspensions within calcium alginate gel beads for the production of enhanced amounts of scopolin. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 229-234. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00138-6)

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>

Glowacz, M., Bill, M., Tinyane, P.P. & Sivakumar, D. (2017). Maintaining postharvest quality of cold stored 'hass' avocados by altering the fatty acids content and composition with the use of natural volatile compounds—methyl jasmonate and methyl salicylate. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5186-5193. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8400>

Gontier, E., Sangwan-Norreel, B.S. & Barbotin, J.N. (1994). Simultaneous determination of some tropane alkaloids by reverse phase HPLC for *Datura innoxia* mill. plant material. *Agro-Food Industry Hi-Tech*, 3(5), 26-28.

Graham, J., Johnson, S. W., 2010. Managing Black Henbane; Fact Sheet-04-10. The University of Nevada Reno.

Grieve, M., 1977. Henbane. *A modern Herbal*. (pp. 397-404)

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>

Gumerova, E.A., Akulov, A.N. & Rummyantseva, N.I. (2015). Effect of methyl jasmonate on growth characteristics and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of tartary buckwheat. *Russian Journal of Plant Physiology*, 62(2), 195-203. <https://doi.org/10.1134/S1021443715020077>

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. & Başer, K.H.C. (2000). Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Supplement, 2, 28.

Haas, L.F. (1995). *Hyoscyamus niger* (henbane). *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 59(2), 114. <https://doi.org/10.1136/jnnp.59.2.114>.

Haigh, J.R. & Linden, J.C. (1989). Phenolics production by encapsulated *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell Reports*, 8(8), 475-478. <https://doi.org/10.1007/BF00269052>

Haldimann, D. & Brodelius, P. (1987). Redirecting cellular metabolism by immobilization of cultured plant cells: a model study with *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, 26(5), 1431-1434. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81828-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81828-2)

- Hank, H., Szoke, E., Tóth, K., László, I. & Kursinszki, L. (2004). Investigation of tropane alkaloids in genetically transformed *Atropa belladonna* L. cultures. *Chromatographia*, *60*(1), S55-S59. <https://doi.org/10.1365/s10337-004-0240-x>
- Harrison, A.P. & Bartels, E.M. (2006). A modern appraisal of ancient etruscan herbal practices. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, *1*(2), 21-24.
- Hashimoto, T. & Yamada Y. (1987). Purification and characterization of hyoscyamine 6 β -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., 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)
- Hayat, S., Ali, B., Hasan, S.A. & Ahmad, A. (2007). Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, *60*(1), 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.06.002>
- Hayat, S., Mori, M., Fariduddin, Q., Bajguz, A. & Ahmad, A. (2010). Physiological role of brassinosteroids: an update. *Indian Journal of Plant Physiology*, *15*, 99-109.
- Hocking, G.M. (1947). Henbane Healing herb of hercules and of apollo. *Economic Botany*, *1*(3), 306. <https://doi.org/10.1007/BF02858575>
- Hong, M.L.K., Bhatt, A., Ping, N.S. & Keng, C.L. (2012). Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. *Romanian Biotechnological Letters*, *17*, 7340-7351.
- Hu, Y., Bao, F. & Li, J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct *cyd3*-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *24*(5), 693-701. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00915.x>
- Huang, F., Dai, X.D., Hu, Y.L., Chen, C.Y. & Zhu, G.Z. (2005). Progress in synthesis of tropane alkaloids. *Chemical Reagents*, *27*, 141-144.
- Hulst, A.C. & Tramper, J. (1989). Immobilized Plant cells: a literature survey. *Enzyme and Microbial Technology*, *11*(9), 546-558. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90082-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90082-3)
- Inyai, C., Boonsongcheep, P., Komaikul, J., Sritularak, B., Tanaka, H. & Putalun, W. (2019). Alginate immobilization of *Morus alba* L. cell suspension cultures improved the accumulation and secretion of stilbenoids. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *42*(1), 131-141. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2021-1>

- İbrahim, A.I., Abd, E.K., Nower, A., Abdel, M. & Abd, E.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., Kilar, 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 A*, 1232, 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.036>
- Jalalpour, Z., Shabani, L., Afghani, L., Sharifi-Tehrani, M. & Aminı, S.A. (2014). Stimulatory effect of methyl jasmonate and squalstatin on phenolic metabolism through induction of lpx activity in cell suspension culture of yew. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 76-82. <https://doi.10.3906/biy-1306-91>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1426-9>
- Jassbi, A.R., Miri, R., Masroorbabanari, M., Asadollahi, M., Attarroshan, M. & Baldwin, I.T. (2014). HPLC-DAD-ESIMS analyses of *Hyoscyamus niger* and *H. reticulatus* for their antioxidant constituents. *Austin Chromatography*, 1(5).
- Jung, C., Lyou, S.H., Yeu, S., Kim, M.A., Rhee, S., Kim, M. & Cheong, J.J. (2007). Microarray-based screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 26(7), 1053-1063. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0311-1>
- Jung, H. Y., Kang, S. M., Kang, Y.M., Kang, M.J., Yun, D.J., Bahk, J.D. & Choi, M. S. (2003). Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(7), 987-990. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00253-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00253-9)
- Kai, G., Chen, J., Li, L., Zhou, G., Zhou, L., Zhang, L., Chen, Y. & Zhao, L. (2007). Molecular cloning and characterization of a new cDNA encoding hyoscyamine 6b-hydroxylase from roots of *Anisodus acutangulus*. *Journal Of Biochemistry and Molecular Biology*, (40), 715–722. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2007.40.5.715>
- 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.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.022>
- Kępczyńska, E. & Król, P. (2012). The phytohormone methyl jasmonate as an activator of induced resistance against the necrotroph *Alternaria porri* f. sp.

solani in tomato plants. *Journal of Plant Interactions*, 7(4), 307-315. <https://doi.org/10.1080/17429145.2011.645169>

- Ketel, D.H., Hulst, A.C., Gruppen, H., Breteler, H. & Tramper, J. (1987). Effects of immobilization and environmental stress on growth and production of non-polar metabolites of *Tagetes minuta* cells. *Enzyme and Microbial technology*, 9(5), 303-307. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90009-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90009-3)
- Kevseroglu, K. & Sağlam, B. (2004). Physical and physiological dormancy in black henbane (*Hyoscyamus niger* L.) seeds. *Journal of Plant Biology*, 47(4), 391-395. <https://doi.org/10.1007/BF03030556>
- 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.A., Zhabinskii, V.N. & Khripach, N.B. (2003). New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in russia and belarus. In *Brassinosteroids*. (pp. 189-230)
- Kikowska, M., Budzianowski, J., Krawczyk, A. & Thiem, B. (2012). Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in *In vitro* cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(6), 2425-2433. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1011-1>
- Koca, N. & Karaman, Ő. (2015). The effects of plant growth regulators and L-phenylalanine on phenolic compounds of *Sweet basil*. *Food Chemistry*, 166, 515-521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.065>
- Kohli, S.K., Handa, N., Bali, S., Arora, S., Sharma, A., Kaur, R. & Bhardwaj, R. (2018). Modulation of antioxidative defense expression and osmolyte content by co-application of 24-epibrassinolide and salicylic acid in pb exposed indian mustard plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 382-393. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.051>
- Konan, Y.K.F., Kouassi, K.M., Kouakou, K.L., Koffi, E., Kouassi, K.N., Sekou, D. & Kouakou, T.H. (2014). Effect of methyl jasmonate on phytoalexins biosynthesis and induced disease resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *International Journal of Agronomy*, [https:// dx.doi.org/10.1155/2014/806439](https://dx.doi.org/10.1155/2014/806439)
- Koo, A.J. & Howe, G.A. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1571-1580. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.018>
- Kreitmair, H. (1947). *Hyoscyamus niger* das bilsenkraut. *Pharmazi*. (pp. 2-423)
- Kumar, S., Sirhindi, G., Bhardwaj, R. & Kumar, M. (2011). Evaluation of brassinolide effect on growth, proteins and antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. *The Indian Botanical Society*, 90(1&2), 154-158.

- Lal, R.K., Khanuja, S.P.S. & Misra, H.O. (2005). Induced heterotic genetic diversity in black henbane (*Hyoscyamus Niger* L.). *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 65(1), 63-64.
- Lee, K.T., Hirano, H., Yamakawa, T., Kodama, T., Igarashi, Y. & Shimomura, K. (2001). Responses 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, R., Reed, D.W., Liu, E., Nowak, J., Pelcher, L.E., Page, J.E. & Covello, P.S. (2006). Functional genomic analysis of alkaloid biosynthesis in *Hyoscyamus niger* reveals a cytochrome p450 involved in littorine rearrangement. *Chemistry & Biology*, 13(5), 513-520. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.03.005>
- Lindsey, K. & Yeoman, M.M. (1984). The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* mill. cv. annum immobilized in reticulate polyurethane. *Journal of Experimental Botany*, 35(11), 1684-1696. <https://doi.org/10.1093/jxb/35.11.1684>
- Lindsey, K. & Yeoman, M.M. (1985). Immobilised plant cell culture systems. In *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. (pp. 304-315)
- Lindsey, K., Yeoman, M.M., Black, G.M. & Mavituna, F. (1983). A novel method for the immobilisation and culture of plant cells. *Febs Letters*, 155(1), 143-149. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80227-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80227-0)
- 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 metabolomics analysis. *Frontiers in physiology*, 7, 217. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00217>
- Liu, Z.B., Chen, J.G., Yin, Z.P., Shangguan, X.C., Peng, D.Y., Lu, T. & Lin, P. (2018). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation increase content and yield of chlorogenic acid and its derivatives in *Gardenia jasminoides* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(1), 79-93. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1401-1>
- Lunga, I., Kintia, P., Shvets, S., Bassarello, C., Piacente, S. & Pizza, C. (2008). Steroidal saponins from the seeds of *Hyoscyamus niger* L. *Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry*, 3, 89-93.
- 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>
- Majerus, F. & Pareilleux, A. (1986). Alkaloid accumulation in ca-alginate entrapped cells of *Catharanthus roseus*: using a limiting growth medium. *Plant Cell Reports*, 5(4), 302-305. <https://doi.org/10.1007/BF00269828>

- Mattheis, J.P., Rudell, D.R. & Buchanan, D.A. (2002). Ethylene Intensifies But is Not a Requirement for Methyl Jasmonate-Enhanced Anthocyanin Synthesis by 'Fuji' Apple Fruit. In *XXVI International Horticultural Congress: Key Processes in the Growth and Cropping of Deciduous Fruit and Nut Trees* 636 (pp. 455-460).
- Mitich, L. W. (1992). Intriguing World of Weeds: Henbane. *Weed Technol* 6:489–491.
- Moharrami, F., Hosseini, B., Sharafi, A. & Farjaminezhad, M. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(2), 104-111. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9802-0>
- Morishita, D.W. (1991). Dalmation toadflax, yellow toadflax, black henbane, and tansymustard: importance, distribution, and control. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 14.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <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.
- Nakajima, K. & Hashimoto, T. (1999). Two tropinone reductases, that catalyze opposite stereospecific reductions in tropane alkaloid biosynthesis, are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant and Cell Physiology*, 40(11), 1099-1107. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029494>
- Namdeo, A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 69-79
- Nilsson, K., Birnbaum, S., Flygare, S., Linse, L., Schröder, U., Jeppsson, U. & Brodelius, P. (1983). A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(6), 319-326. <https://doi.org/10.1007/BF00499497>
- Oksman-Caldentey, K.M. & Arroo, R. (2000). Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures. In *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. (pp. 253-281)
- 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., Vuorela, H., Strauss, A. & Hiltunen, R. (1987). Variation

in the tropane alkaloid content of *Hyoscyamus muticus* plants and cell culture clones. *Planta medica*, 53(04), 349-354. <https://doi.org/10.1055/s-2006-962736>

Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusidó, R.M., Goossens, A. & Palazón, J. (2013). Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*, 170(2), 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.004>

Ozawa, R., Arimura, G.I., Takabayashi, J., Shimoda, T. & Nishioka, T. (2000). Involvement of jasmonate-and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant and Cell Physiology*, 41(4), 391-398. <https://doi.org/10.1093/pcp/41.4.391>

Öztürk, B., Kucuker, E., Karaman, S., Yıldız, K & Kılıç, K. (2013). Effect of aminoethoxyvinylglycine and methyl jasmonate on individual phenolics and post-harvest fruit quality of three different japanese plums (*Prunus salicina* lindell). *International Journal of Food Engineering*, 9(4), 421-432. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2012-0257>

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.

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.

Pras, N. & Woerdenbag, H.J. (1999). *Production of secondary metabolites by bioconversion. biotechnology: secondary metabolites*. Science Publisher Inc, USA.

Premjet, D. & Tachibana, S. (2004). Production of podophyllotoxin by immobilized cell cultures of *Juniperus chinensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 1130-1134.

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>

- Que, F., Khadr, A., Wang, G.L., Li, T., Wang, Y.H., Xu, Z.S. & Xiong, A.S. (2018). Exogenous brassinosteroids altered cell length, gibberellin content, and cellulose deposition in promoting carrot petiole elongation. *Plant Science*, 277, 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.010>
- Raghu, K. & Rao, R. (2016). Effect of brassinosteroids on antioxidants content and radical scavenging activity of *Tinospora cordifolia* (willd.) miers ex hook. *Journal of Medicinal Plants*, 4(5), 117-121.
- Ram, M., Prasad, K.V., Singh, S.K., Hada, B.S. & Kumar, S. (2013). Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113(3), 459-467. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0287-1>
- 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+>
- Ramoutsaki, I.A., Askitopoulou, H & Konsolaki, E. (2002). Pain relief and sedation in roman byzantine texts: *Mandragoras officinarum*, *Hyoscyamos niger* and *Atropa belladonna*. In International Congress Series (Vol. 1242, pp. 43-50). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00699-4](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00699-4)
- 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)
- Reddy, L.G. & Shankar, V. (1993). Immobilized nucleases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 13(3), 255-273. <https://doi.org/10.3109/07388559309041320>
- Riedel, H., Akumo, D.N., Saw, N.M.M.T., Kütük, O., Neubauer, P. & Smetanska, I. (2012). Elicitation and precursor feeding influence phenolic acids composition in *Vitis vinifera* suspension culture. *African Journal of Biotechnology*, 11(12), 3000-3008. doi.org/10.5897/AJB11.1185
- Russowski, D., Maurmann, N., Rech, S.B. & Fett-Neto, A.G. (2013). Improved production of bioactive valepotriates in whole-plant liquid cultures of *Valeriana glechomifolia*. *Industrial Crops and Products*, 46, 253-257. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.027>
- Sajc, L., Vunjak-Novakovic, G., Grubisic, D., Kovačević, N., Vuković, D. & Bugarski, B. (1995). Production of anthraquinones by immobilized *Frangula alnus* mill. plant cells in a four-phase air-lift bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(3), 416-423. <https://doi.org/10.1007/BF00218443>
- Sánchez-Sampedro, M.A., Fernández-Tárrago, J. & Corchete, P. (2005). Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) gaertn. *Journal of Biotechnology*, 119(1), 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.012>

- Sangeeta, S. & Lavania, U.C. (1987). Karyomorphology and DNA Amount in Relation to Chiasma Formation in *Hyoscyamus L.* *India*, 30(3), 94-98.
- Seldimirova, O.A., Bezrukova, M.V., Galin, I.R., Lubyanova, A.R., Shakirova, F.M. & Kruglova, N.N. (2017). 24-Epibrassinolide effects on *in vitro* callus tissue formation, growth, and regeneration in wheat varieties with contrasting drought resistance. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(6), 919-929. <https://doi.org/10.1134/S1021443717060085>
- 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>
- Sharma, J.R., Lal, R.K., Gupta, M.M., Misra, H.O. & Sharma, S. (2000). Inheritance of biomass and crude drug content in black henbane (*Hyoscyamus niger* L.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 7(4), 75-84. https://doi.org/10.1300/J044v07n04_09
- 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.
- 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). https://doi.org/10.18388/abp.2014_1922
- Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In *Food Biotechnology*, (pp. 187-228)
- Sökmen, A. & Gürel, E. (2002). *Bitki Biyoteknolojisi 1 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>
- 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>
- Swiatek, A., Azmi, A., Witters, E. & Van Onckelen, H. (2003). Stress messengers jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 29, 172-178.

- Thiruvengadam, M., Baskar, V., Kim, S.H. & Chung, I.M. (2016). Effects of abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid on the content of phytochemicals and their gene expression profiles and biological activity in turnip *Brassica rapa* ssp. *rapa*). *Plant Growth Regulation*, 80(3), 377-390. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0178-7>
- Tuzlaci, E. & Aymaz, P.E. (2001). Turkish folk medicinal plants, part iv: gönen (balıkesir). *Fitoterapia*, 72(4), 323-343. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00277-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00277-X)
- Tytgat, G.N. (2007). Hyoscine Butylbromide. *Drugs*, 67(9), 1343-1357. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767090-00007>
- Uddin, M., Ahmad, D.T. & Rasheed, F. (2018). Enhancing the production of anticancer leaf-alkaloids of *Catharanthus roseus* (L.) g. don, using methyl jasmonate and irradiated sodium alginate in pot experiments. *Journal of Advanced Plant Sciences* 1(2), 212.
- Urdová, J., Rexová, M., Mučaji, P. & Balažová, A. (2015). Elicitation—a tool to improve secondary metabolites production in *melissa officinalis* l. suspension cultures/elicitácia ako nástroj na zlepšenie produkcie sekundárnych metabolitov v suspenzných kultúrach *Melissa officinalis* L. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 62(s9), 46-50. <https://doi.10.1515/afpuc-2015-0012>
- 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)
- 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>
- Villegas, M., León, R. & Brodelius, P.E. (1999). Effects of alginate and immobilization by entrapment in alginate on benzophenanthridine alkaloid production in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Biotechnology Letters*, 21(1), 49-55. <https://doi.org/10.1023/A:1005481919037>
- Volak, J. & Stodola, J. (1992). The illustrated book of herbs: *Their Medicinal and Culinary Uses*.
- Walker, T.S., Bais, H.P. & Vivanco, J.M. (2002). jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L.(st. john's

- wort). *Phytochemistry*, 60(3), 289-293. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00074-2)
- 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>
- Wasternack, C. & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. an update to the 2007 review in annals of botany. *Annals of Botany*, 111(6), 1021-1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- 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)
- Yamada, Y. & Hashimoto, T. (1982). Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Reports*, 1(3), 101-103. <https://doi.ORG/10.1007/BF00272363>
- Yazdizadeh Shotorban, N.I., Jamei, R., & Heidari, R. (2012). Antioxidant activities of two sweet pepper *Capsicum annuum* L. varieties phenolic extracts and the effects of thermal treatment. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3 (1), 25–34. <https://doi.10.22038/AJP.2012.8>
- 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)
- 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>
- Zayed, R. & Wink, M. (2005). β -Carboline and quinoline alkaloids in root cultures and intact plants of *Peganum harmala*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(5-6), 451-458. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-5-614>
- 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 (RJP)* 3(3), 43-53
- Zhang, G., Song, X., Guo, H., Wu, Y., Chen, X. & Fang, R. (2016). A small g protein as a novel component of the rice brassinosteroid signal transduction. *Molecular Plant*, 9(9), 1260-1271. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.010>

- Zhang, L., Yang, B., Lu, B., Kai, G., Wang, Z., Xia, Y. & Tang, K. (2007). Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing putrescine n-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Planta*, 225(4), 887-896. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0402-1>
- Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>
- 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 <https://doi.org/10.1104/pp.102.010918>
- Zhou, P., Yang, J., Zhu, J., He, S., Zhang, W., Yu, R. & Huang, X. (2015). Effects of β -cyclodextrin and methyl jasmonate on the production of vindoline, catharanthine, and ajmalicine in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 7035-7045. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6651-9>
- 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.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Serdar ÖZMEN
Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul, 1993
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : srdozmn@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Pendik Lisesi, 2011
Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Yayınlar

Demirci, T., Özmen, S., Yılmaz, E.G., Aşçı, Ö.A. & Baydar, N.G. (2017). The influence of methyl jasmonate on growth and caffeic acid derivative contents of *in vitro* shoot and roots in echinaceae (*Echinacea purpurea*). *Indian Journal Of Pharmaceutical Education And Research*, 51(3), S513-S517. <https://doi.10.5530/ijper.51.3s.77>