

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ\*FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Rubia tinctorum.* BİTKİSİNDE  
*Agrobacterium rhizogenes* ARACILIĞIYLA  
TRANSFORME SAÇAKLI KÖK  
KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI VE  
SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Araş. Gör. Burcu ÇETİN**

**Anabilim Dalı : Biyoloji**

**Programı : Moleküler Biyoloji**

**MANİSA 2006**

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ\*FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Rubia tinctorum* BİTKİSİNDE *Agrobacterium rhizogenes* ARACILIĞI İLE  
TRANSFORME SAÇAKLI KÖK KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI ve  
SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Araş. Gör. Burcu ÇETİN**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21.11.2006**

**Tezin Savunulduğu Tarih : 13.12.2006**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL (EGE)**

**Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ülkü EMİROĞLU (EGE)**

**Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN (EGE)**

**Yrd. Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU (CBÜ)**

**Yrd. Doç. Dr. Güngör AY (CBÜ)**

*A. Gürel*  
*Ü. Emiroğlu*  
*H. Özakatan*  
*S. Uzunoğlu*  
*G. Ay*

## ÖNSÖZ

*Rubia tinctorum* L., halk arasında 'kök boya' olarak bilinir ve çok eski zamanlardan beri halıcılık sektöründe kullanılan, dünya piyasalarında 'Türk kırmızısı' olarak tanınan doğal kırmızı boyanın ham maddesini oluşturur. Bitkinin köklerinde bulunan antrakinonlar, boyama özelliklerinin yanı sıra tıbbi öneme sahiptirler.

Sentetik kimyadaki ilerlemelere rağmen, kompleks yapı özellikleri nedeniyle sentezlenemeyen biyolojik kaynaklı birçok sekonder metabolite ilaç, gıda, tarım, kozmetik vb. sektörlerde ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki biyoteknolojisi yöntemleri ile sekonder metabolitlerin eldesi üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bitki hücre ve doku kültürleri yoluyla, kültür koşulları optimizasyonu sağlanarak ve metabolik yolda genetik farklılıklar oluşturularak değerli sekonder metabolitler uygun miktarlarda elde edilmeye başlanmıştır.

*Agrobacterium rhizogenes*, enfekte olduğu bitkide saçaklı kök hastalığına neden olan gram negatif bir bakteridir. Doğal genetik mühendisler olarak da adlandırılan *Agrobacterium*' lar, 1980'li yılların ortalarında bitkilere gen transferi yapılması amacı ile ilgi çekmeye başlamışlardır. Saçaklı kökler bol dallanmaları, kılcal köklerinin çok yoğun olması ve en hızlı çoğalan hücre kültürleri kadar veya onlardan daha fazla biomass üretim potansiyelleri ile karakteristik olmaları nedeniyle bu kültürler, sekonder bitki metabolitlerinin üretimi için önemli bir potansiyele sahiptirler.

Tez çalışmasında, içerdiği sekonder metabolitler nedeniyle tıbbi ve ekonomik önemi olan *Rubia tinctorum* bitkisinin mikroçoğaltım koşullarının optimizasyonunun sağlanması ve saçaklı kök kültürlerinin kurulması amaçlanmıştır. Elde edilen saçaklı köklerdeki sekonder metabolit miktarları; çeşitli besin ortamları, yüksek sukroz konsantrasyonu ve elisitör kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışması, Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından " *Rubia tinctorum* Bitkisinde *Agrobacterium rhizogenes* Aracılığı ile Saçaklı Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Sekonder Metabolit Eldesi" adlı 2004/47 numaralı ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından " *Rubia tinctorum* L. 'da *Agrobacterium rhizogenes* Aracılığı ile Transforme Saçaklı Kök Kültürlerinin Oluşturulması " adlı 2002/ Muh /003 numaralı projeler tarafından desteklenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu doktora tezinde gerekli olanakları sağlayarak, değerli bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren danışmanım Sayın Prof. Dr. Aynur GÜREL'e en içten, saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Üretilen sekonder metabolitlerin saflaştırma ve yapı aydınlatmasına yönelik çalışmalarda bilgi, destek ve yorumlarıyla beni aydınlatan, zamanını paylaşan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Erdal BEDİR'e, bakterilerle ilgili yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. HATİCE ÖZAKTAN'a, PCR çalışmalarındaki yardımları nedeniyle Sayın Prof. Dr. Mahinur AKKAYA'ya, çalışmadaki bakterileri temin etmemizi sağlayan Sayın Prof. Dr. Rengin ELTEM ve Dr. Tijen TALAS OĞRAŞ'a şükranlarımı sunarım. Değerli bilgileri ile beni aydınlatan Cavit Gündüz DEMİR'e de çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında HPLC metodu ile sekonder metabolitlerin ölçümü aşamasındaki yardımlarından dolayı Yüksek Kimyager İsmail Hakkı AKGÜN' e, ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarındaki yardımları nedeniyle Yüksek Biyolog Şebnem BIÇKICI'ya, Araş. Gör. Şadiye HAYTA, Yüksek Ziraat Mühendisi Sündüs ÜNAL ve Yüksek Kimyager Nur AŞICI'ya çok teşekkür ederim. Celal Bayar Üniversitesi'ndeki tüm arkadaşlarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Benden anlayış, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen AİLEME, EŞİME ve en çok da biricik OĞLUM'a çok teşekkür ederim.

Burcu ÇETİN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLER DİZİNİ	II
ÇİZELGELER DİZİNİ	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
1. GİRİŞ	1
<b>2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ</b>	<b>3</b>
2.1. Sekonder Metabolitler	3
2.1.1. Bitki Hücre ve Doku Kültürleri Yolu ile Sekonder Metabolit Üretimi	6
2.1.2. Sekonder Metabolit Üretiminin Arttırılması	8
2.2. Saçaklı Kök Kültürleri	11
2.3. <i>Rubia tinctorum</i> L. Bitkisinin Botanik Özellikleri	16
2.3.1. <i>Rubia tinctorum</i> L.'nin Sınıflandırılması	16
2.3.2. <i>Rubia tinctorum</i> L.'nin Morfolojik Özellikleri	16
2.3.3. <i>Rubia tinctorum</i> L.'nin Yayılışı	18
2.4. <i>Rubia tinctorum</i> L.'nin Önemi	19
2.5. <i>Rubia tinctorum</i> Bitkisinin Kimyasal İçeriği ile İlgili Bilgiler	21
2.6. <i>Rubia tinctorum</i> L. ile Yapılan Çalışmalar	23
<b>3. MATERYAL VE METOD</b>	<b>24</b>
3.1. Bitkisel Materyal ve Bakteri İrkları	24
3.2. Tohum Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi	24
3.3. Mikroçoğaltım	25
3.4. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> Irklarının Aktivasyonu	25
3.5. Bitki Eksplantlarına <i>Agrobacterium rhizogenes</i> Irklarıyla İnokulasyon ve Saçaklı Köklerin Elde Edilmesi	25
3.6. Saçaklı Kök Kültürlerinin Oluşturulması	25
3.6.1. Saçaklı Köklerin Sıvı MS, B5, SH Ortamlarında Kültüre Alınması	25
3.6.2. Farklı Irklar ile Elde Edilen Saçaklı Köklerin Sıvı MS Ortamında Kültüre Alınması	25
3.6.3. Saçaklı Köklerin Sukroz ve Elisitör Eklenen Sıvı B5 Ortamında Kültüre Alınması	25
3.7. Opin ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizi	28
3.7.1. Opin Analizi	28
3.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	28
3.8. Saçaklı Köklerde Bulunan Sekonder Metabolit Analizleri	29
3.8.1. Spektrofotometre Yöntemi	29
3.8.2. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Yöntemi	29
3.9. Verilerin Değerlendirilmesi	31

<b>4. BULGULAR</b>	<b>32</b>
4.1. Tohum Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi	32
4.2. Mikroçoğaltım	34
4.3. Elde Edilen Saçaklı Kökler	34
4.4. Köklerin Sıvı Ortamlarda Kültüre Alınması	37
4.5. Transformasyonun Doğrulanması	39
4.5.1. Opin Analizi	39
4.5.2. PCR Analizi	39
4.5.3. Morfoloji	39
4.6. Saçaklı Köklerde Bulunan Sekonder Metabolit Analizleri	39
4.6.1. Spektrofotometre Yöntemi	39
4.6.2. HPLC Yöntemi	40
4.6.2.1. Sıvı MS, B5, SH Ortamlarında Kültüre Alınan Saçaklı Köklerdeki Sekonder Metabolitler	44
4.6.2.2. Farklı Irklar Kullanılarak Oluşturulan Saçaklı Köklerin Sıvı MS Ortamında Kültüre Alınmaları ile Elde Edilen Sekonder Metabolitler	44
4.6.2.3. Sukroz ve Elisitör Eklenen Sıvı B5 Ortamlarında Kültüre Alınan Saçaklı Köklerdeki Sekonder Metabolitler	45
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>46</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>50</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Şekil 2.1.</b> Asetil-CoA, şikimik asit, mevalonik asit ve amino asit yoluyla sekonder metabolit üretimine yönelik biyosentetik yollar	5
<b>Şekil 2.2.1.</b> <i>Agrobacterium</i> bakterisi (Özcan ve ark. (2001)' e ait şekil değiştirilmiştir.)	13
<b>Şekil 2.2.2.</b> <i>Agrobacterium</i> bakterisinden bitki hücrelerine T-DNA' nın aktarımı	15
<b>Şekil 2.3.1.</b> <i>Rubia tinctorum</i> L. (Kök Boya) bitkisi	16
<b>Şekil 2.3.2.</b> Manisa-Karaali lokasyonunda kültüre alınan Kök Boya bitkileri, kökler ve parçalanmış kökler	17
<b>Şekil 2.4.1.</b> Kök Boyanın kullanım alanları	19
<b>Şekil 2.5.</b> Rubiaceae familyasına dahil bitkilerde antrakinonların biyosentez yolları	22
<b>Şekil 3.1.</b> <i>Rubia tinctorum</i> L. tohumları	24
<b>Şekil 3.5.</b> Bitki eksplantlarına <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ırklarıyla yapılan inokulasyon	27
<b>Şekil 3.8.2.</b> Doğadan toplanan <i>Rubia tinctorum</i> kökünde yapılan MeOH ekstraksiyonu	30
<b>Şekil 4.1.1.</b> Sterilizasyon yöntemine göre çimlenme ve enfeksiyon yüzdesi	32
<b>Şekil 4.1.2.</b> Çimlenmiş <i>Rubia tinctorum</i> L. Tohumlarında çimlenmeler	33
<b>Şekil 4.2.1.</b> <i>In vitro</i> koşullarda elde edilen kök boya bitkiciklerinin mikroçoğaltımları	34
<b>Şekil 4.3.</b> İnokulasyon sonucu yaralanan kısımlarda gözlenen saçaklı kökler	36
<b>Şekil 4.4.1.</b> MS sıvı ortam içerisinde kültüre alınan saçaklı kökler; gelişmiş saçaklı kökler	37
<b>Şekil 4.4.2.</b> Farklı sıvı ortamlarda yetiştirilen saçaklı kökler, ortamlardaki renk değişimleri	38
<b>Şekil 4.6.1.</b> Alizarin kalibrasyon eğrisi	39
<b>Şekil 4.6.2.1.</b> 254nm'de Lusidin primeverozit, Ruberitrik asit, Alizarin Bağıl Pik Alanı-Derişim Kalibrasyon Grafikleri	40
<b>Şekil 4.6.2.2.</b> Lusidin Primeverozit <sup>1</sup> H NMR Spektrumu	41
<b>Şekil 4.6.2.3.</b> Ruberitrik asit <sup>1</sup> H NMR spektrumu	42-43

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Çizelge 2.1.</b> Bitkiler tarafından üretilen önemli sekonder metabolitler, kullanıldıkları sektörler	4
<b>Çizelge 2.1.1.</b> Bitki hücre ve doku kültürleri yolu ile yüksek bitkilerden elde edilen temel sekonder metabolit grupları	7
<b>Çizelge 2.2.1.</b> Saçaklı kök kültürlerinden elde edilen bazı sekonder metabolitler	12
<b>Çizelge 2.2.2.</b> <i>Vir</i> proteinlerinin <i>Agrobacterium</i> ve bitki hücrelerindeki fonksiyonları	14
<b>Çizelge 2.4.</b> Doğal boyaların dünya pazarlarındaki fiyatları	19
<b>Çizelge 2.5.</b> Antrakininonların yapıları	21
<b>Çizelge 3.2.1.</b> Tohumlara uygulanan sterilizasyon işlemleri	24
<b>Çizelge 3.3.</b> Doku kültürü çalışmalarında kullanılan MS, B5 ve SH ortamlarının kimyasal içeriği	26
<b>Çizelge 3.4.</b> <i>Agrobacterium rhizogenes</i> bakterisinin üretildiği besiyeri	26
<b>Çizelge 4.1.1.</b> VII numaralı yöntemin yüzey sterilizasyonu basamakları	31
<b>Çizelge 4.1.2.</b> Üç lokasyondan toplanan tohumların MS ve sulu ortamlarda belirlenen çimlendirme oranları	33
<b>Çizelge 4.3.</b> <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 8196, 15834, A4 ve R1000 ırklarının inokulasyon yapıldığı eksplantlara göre MS ortamında saçaklı kök oluşum yüzdeleri	35
<b>Çizelge 4.6.2.1.</b> Sıvı MS, B5, SH ortamlarında kültüre alınan saçaklı köklerdeki antrakininon miktarları	44
<b>Çizelge 4.6.2.2.</b> A4, R1000, 8196 ırkları ile inokulasyon sonucu elde edilen saçaklı köklerdeki antrakininon miktarları	44
<b>Çizelge 4.6.2.3.</b> Elisitör içeren ve içermeyen sukrozlu B5 ortamlarında kültüre alınan saçaklı köklerdeki antrakininon miktarları	45



# ***Rubia tinctorum* BİTKİSİNDE *Agrobacterium rhizogenes* ARACILIĞIYLA TRANSFORME SAÇAKLI KÖK KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI ve SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ**

## **ÖZET**

Bitkisel sekonder metabolitler tıp, gıda, ziraat gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda özellikle doku kültürü teknikleri ile sekonder metabolitlerin elde edilmesi üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

Bitki büyüme hormonları içermeyen ortamlarda biyokimyasal ve genetik açıdan stabilize ve hızlı büyüme yeteneklerine sahip olan saçaklı kök kültürleri, tercih edilebilir en uygun doku kültürü teknikleridir. *Agrobacterium rhizogenes*, birçok dikotiledon bitkide gen transferi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bakterinin enfeksiyonu sonucunda, kök teşvik edici plazmidin (Ri plazmid) T-DNA'sı, bitki hüresine aktarılır ve genomik (nükleer) DNA'sına entegre edilir. Enfeksiyon bölgesinde hızlı çoğalabilen ve çok dallı saçaklı kökler oluşur. Bu kökler, bazı sekonder metabolitlerin üretimi için önemli bir potansiyele sahiptirler.

*Rubia tinctorum* L. "Kök Boya", halk arasında boyama özelliğinden dolayı çok eski zamanlardan beri halıcılıkta kullanılan, ayrıca diüretik, antispazmodik, antiskorbütik ve antibakteriyel özellikleri nedeniyle tıbbi öneme sahip bir bitkidir. Bu tez çalışmasında *Rubia tinctorum* L. bitkisinin saçaklı kök kültürleri ve sekonder metabolit içerikleri incelenmiştir.

Tohumların yüzeysel sterilizasyonlarından sonra, bitkiciklerin mikroçoğaltımları 0.5 mg/l IBA içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamlarında başarılmıştır. Transformasyon çalışmalarında, bitkiciklerin yaprak ve nod eksplantları *Agrobacterium rhizogenes*'in 4 farklı ırkı (15834, A4, 8196, R1000 ) ile inokule edilmiştir. En yüksek saçaklı kök oluşumu %61.2 oranında 15834 ırkı ile inokule edilen nod eksplantlarında belirlenmiştir. Elde edilen saçaklı kökler MS, B5, SH ortamlarında kültüre alınmışlardır. Özellikle MS ortamından elde edilen kökler altın sarısı renginde iken B5 ortamında üretilen köklerin ise kırmızı renkte oldukları ve ortam renginin de kırmızıya dönüştüğü gözlenmiştir. SH ortamına ait köklerin ise sarımsı ve ince yapıda oldukları saptanmıştır.

Farklı ırklar (A4, 8196, R1000) ile oluşturulan saçaklı kök kültürlerindeki sekonder metabolit miktarları HPLC ile belirlenmiştir. En yüksek antrakinon miktarları R1000 ırkı ile elde edilen saçaklı köklerde lusidin primeverozit 1.13 mg/g; ruberitrik asit 8.4 mg/g; alizarin 0.072 mg/g olarak saptanmıştır.

Sekonder metabolit miktarını arttırmak için B5 ortamına elisitör olarak metil jasmonat (0.1µM) ve yüksek sukroz (%12) ilaveleri ile çalışmalar yapılmıştır. Metil jasmonat (MeJA) içermeyen, sukroz ilaveli B5 (B5S) ortamında kuru saçaklı kökte lusidin primeverozit, ruberitrik asit ve alizarin miktarları sırasıyla 13.45 mg/g; 93.2 mg/g; 0.78 mg/g olarak tespit edilmiştir. Metil jasmonat ve 120 gr sukroz içeren B5 (B5SMeJA) ortamında da lusidin primeverozit, ruberitrik asit ve alizarin miktarları sırasıyla 12.31 mg/g, 86.8 mg/g, 0.11 mg/g olarak belirlenmiştir. Doğadan toplanan kökte ise alizarin dışındaki lusidin primeverozit ve ruberitrik asit metabolitleri, saçaklı köklere göre daha yüksek miktarlarda bulunmuşlardır.

## **Anahtar Sözcükler:**

*Rubia tinctorum*, *Agrobacterium rhizogenes*, saçaklı kök, sekonder metabolit, alizarin

## Formation of *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformed Hairy Root Cultures of *Rubia tinctorum* L. and Production of Secondary Metabolites

### ABSTRACT

Plant secondary metabolites have been widely used in various sectors; i.e, medicine, food, agriculture. For this reason researches especially on the production of secondary metabolites via tissue culture techniques have been accelerated.

Hairy root cultures which have biochemical and genetic stabilities, fast growing abilities in media without plant growth hormones are the most suitable and preferable tissue culture techniques. *Agrobacterium rhizogenes* has been used regularly for gene transfer in many dicotyledonous plants. As a result of the infection of this bacteria, T-DNA of root inducing plasmid (Ri-plasmid) is transferred to the plant cell and integrated to genomic DNA. The proliferative and multibranched hairy roots are formed in infection regions. These roots have very important potentials in the production of some plant secondary metabolites.

*Rubia tinctorum* L. 'Madder' used by local people in dyeing of carpets with its roots for many years has diuretic, antispasmodic, antiscorbutic and antibacterial properties. In this thesis, hairy root cultures of *Rubia tinctorum* L. and their secondary metabolites were investigated.

After surface sterilization of seeds, micropropagation of plantlets was achieved in MS media containing 0,5 mg/l IBA. In transformation studies, the leaf and nod explants of the plantlets were inoculated by 4 different strains (15834, A4, R1000, 8196) of *Agrobacterium rhizogenes*. The highest hairy root occurrence was determined as 61,2% in the nod explants inoculated with 15834 in solid MS medium. The obtained hairy roots were cultured in liquid MS, B5 and SH media. Especially the hairy roots obtained from MS medium were golden color; the roots from B5 media were red and also the color of liquid B5 media turned red. The roots obtained from SH media were yellowish and thin.

The amounts of secondary metabolites in hairy roots formed by inoculation with different strains ( A4, R1000 and 8196) in MS medium were analyzed with HPLC. The highest amount of anthraquinones in hairy roots obtained with R1000 strain were determined as 1.13 mg/g for lucidin primeveroside; 8.4 mg/g for ruberythric acid, and 0.072 mg/g for alizarin.

0,1 $\mu$ M methyl jasmonate as an elicitor and high amount of sucrose (%12) were added into B5 media in order to increase the amount of secondary metabolite. In the dried hairy roots obtained from B5 media containing sucrose without methyl jasmonate (B5S), the amounts of lucidin primeveroside, ruberythric acid and alizarin were determined as 13,45 mg/g, 93,2 mg/g and 0,78 mg/g, respectively. The hairy roots belonging to B5 media containing methyl jasmonate and 120 g sucrose (B5SMeJA) the amounts of lucidin primeveroside, ruberythric acid, and alizarin were found as 12,31 mg/g, 86,8 mg/g 0,14 mg/g, respectively. In the collected roots from nature, the amounts of lucidin primeveroside, ruberythric acid, except alizarin metabolites were higher than the hairy roots.

### Key words

*Rubia tinctorum*, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, secondary metabolite, alizarin

## 1. GİRİŞ

Bitkiler, temel besin maddelerinin kaynağını oluştururlar. Bunun yanısıra, “sekonder metabolitler” adı verilen ilaç, kimya, gıda, tekstil, kozmetik sanayi ve tarımsal mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz bazı maddeler de bitkilerden elde edilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Son yıllarda bitki biyoteknolojisi yöntemleri ile sekonder metabolitlerin elde edilmesi üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Sentetik kimyadaki ilerlemelere rağmen, kompleks yapı özellikleri nedeniyle sentezlenemeyen biyolojik kaynaklı birçok sekonder metabolit, bitki hücre ve doku kültürleri yoluyla kültür koşulları optimizasyonu sağlanarak ve metabolik yolda genetik farklılıklar oluşturularak uygun miktarlarda elde edilmeye başlanmıştır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Yüksek bitkilerde kökler, bitkinin hayatta kalması ile ilişkili işlevlerin yanı sıra aynı zamanda çok zengin ve kompleks metabolizmaları ile birçok değerli sekonder metabolitin de sentez yeridir. Bu özellikleri nedeniyle doku kültürü yoluyla sekonder metabolit üretiminde, kök kültürlerinin kullanımı tercih edilmektedir (Gürel ve ark., 2006). Ancak kök kültürlerinde kök büyümesinin devamlılığını sağlamak için bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç vardır. Bu büyüme düzenleyicilerinden gerek oksin ve sitokininlerin niteliği ve miktarı, gerekse birbirlerine oranları kök gelişimini ve sekonder metabolit üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, son yıllarda, bitkilerin doğal genetik mühendis olarak adlandırılan *Agrobacterium rhizogenes* ile enfeksiyonu sonucu elde edilen ve bitki büyüme düzenleyicilerine gereksinim duymayan, basit besin ortamında çok hızlı gelişim gösteren saçaklı kök kültürleri tercih edilmektedir.

Saçaklı köklerin en önemli avantajı; bu yöntemle elde edilen sekonder metabolitlerin ana bitki ile kıyaslandığı zaman, çoğunlukla aynı ya da daha fazla miktarlarda sentezlenmeleridir (Chen ve ark.,1999; Kittipongpatana ve ark., 1998). Besin elementleri, elisitörler, prekürsörler ve *Agrobacterium rhizogenes*’ın Ri plazmidinde yapılan genetik manipulasyonlar gibi birçok faktörlerin yardımı ile sekonder metabolit üretimleri artırılabilir.

*Rubiaceae* familyası 450 cins ve 6500 tür içermektedir. Bu familyaya ait bitkiler özellikle köklerinde antrakinonları sentezlemeleriyle bilinirler. *Rubiaceae* bitkilerinin hücre ve doku kültürleri aynı zamanda çok miktarda antrakinon biriktirebilirler ve bazı hallerde hücre kültürleri içerisindeki antrakinonların miktarları ana bitkinin içeriğinden daha fazla olabilmektedir. Familyaya ticari önem kazandıran bu antrakinonları, Wijnsma ve Verpoorte adlı araştırmacılar belirlemiştir (Han ve ark., 2001).

*Rubiaceae* familyasında yer alan *Rubia tinctorum* bitkisinin kökleri antimikrobiyal, antifungal, analjezik, antispazmodik, antiskorbütik, diüretik ve böbrekteki kalsiyum ve magnezyum fosfatlarının parçalanmasını sağlayan antrakınonları (alizarin, purpurin, lusidin ve bunların türevlerini) içermektedir.

Bu doktora tez çalışmasında, *Rubia tinctorum*'un *in vitro* klonal çoğaltımının oturtulması, yaprak ve nod eksplantlarında *Agrobacterium rhizogenes* aracılığı ile saçaklı köklerin elde edilmesi; saçaklı kök kültürlerinin geliştirildiği besin ortamlarına ilave edilen yüksek sukroz konsantrasyonu ve elisitör uygulamalarının sonucunda üretilen antrakınonların spektrofotometre ve HPLC ile miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

### 2.1. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler, bitkinin ekosistemle olan ilişkisinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda çeşitli avantajlar sağlayan kimyasal maddelerdir. Bunlar arasında; bitkiyi patojenlere karşı koruyan antibakteriyel, antifungal, antiviral; diğer bitkilere karşı doğal yaşamda rekabet gücünü arttıran anti-germinatif ve toksik maddeler; UV ışınları, tuzluluk, kuraklık gibi zararlı çevresel etmenlerin neden olduğu stres koşullarında direnç artırıcı metabolitler; zararlı hayvanlar ve otlara karşı korunmayı sağlayan insektisit, pestisit, molluskusit ve herbisidler; polinasyon ve tohum dağılımını sağlamak üzere hayvanları cezbedecek renkli ve güzel kokulu metabolitler bulunmaktadır (Bourgaud ve ark., 2001; Zarate ve ark., 2003; Sökmen ve Gürel, 2001).

Sekonder metabolit kavramı ilk olarak A. Kossel (1891) tarafından ileri sürülmüş; bundan otuz yıl sonra F. Czapek (1921) birincil metabolitlerden modifiye olan bu metabolitleri 'endproductt (son ürün)' terimi ile tanımlamıştır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Son yıllarda birçok endüstriyel alanda insan sağlığını tehdit edici sentetik ürünlerin yerini, doğal olan bitkisel sekonder metabolitler almıştır. Gıda sektöründe tatlandırıcı, kıvam arttırıcı, renk ve koku verici birçok madde; kozmetik endüstrisinde parfüm ve kozmetik ürün (krem, tonik, maske), tarım alanında insektisit gibi kimyasallar; tekstilde kumaş boyamada kullanılan doğal boyalar çeşitli bitkisel sekonder metabolitlerden elde edilmektedir. Ayrıca, Dünya Sağlık Örgütü tarafından temel ilaçlar kapsamında ilan edilen 252 ilacın %11'i bitkisel sekonder metabolitlerden üretilmektedir. Bunlardan en ünlüleri; *Salix* türlerinden izole edilen antipiretik ve analjezik özelliği olan salisin (aspirin), *Taxus brevifolia*'dan elde edilen anti kanser etkisi olan taxol (paclitaxel) ve *Papaver somniferum*'dan elde edilen güçlü analjezik, narkotik etkisi olan morfindir (Raskin ve ark., 2002; Tolonen, 2003; Verpoorte ve Memelink, 2002)(Çizelge 2.1).

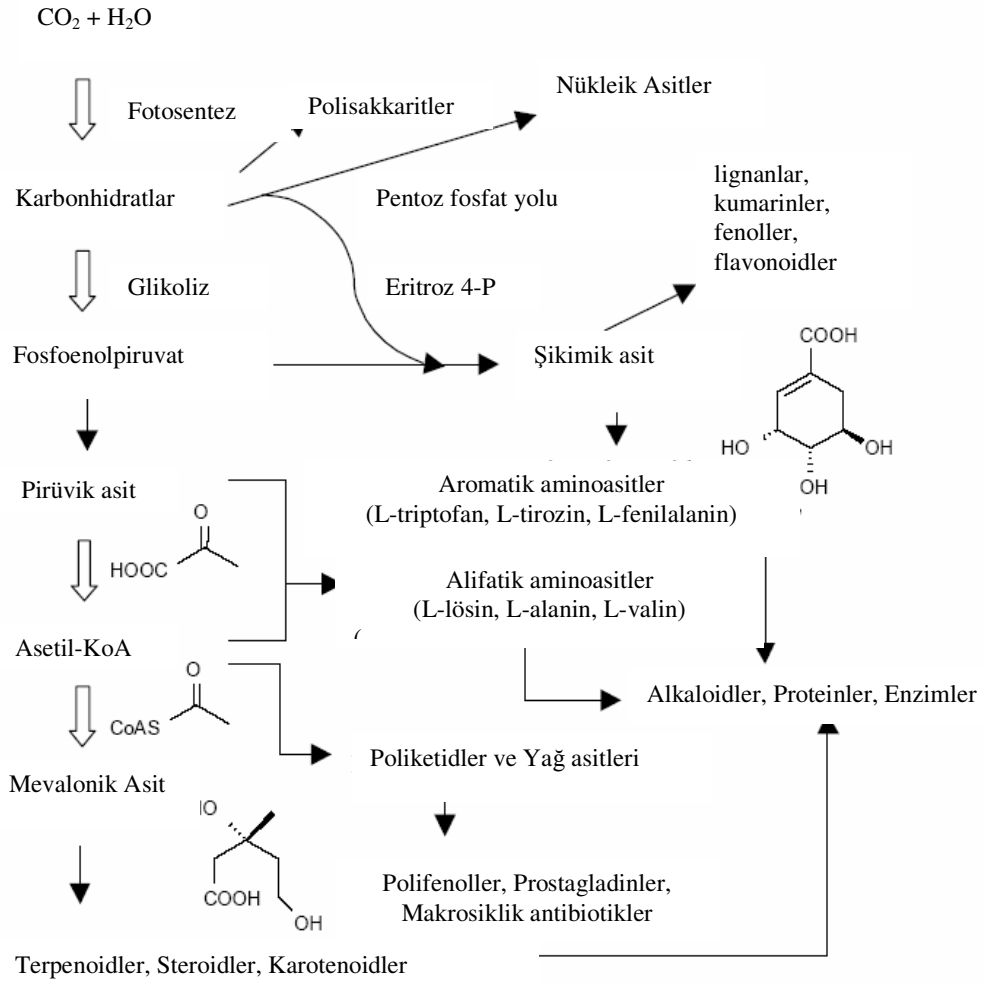
Bunun yanısıra, sekonder metabolitlerin doğal koşullar altında bitkilerden elde edilmesi; genellikle zorlu çevresel koşullarda yetişen bitkilerin toplanmasının zor ve pahalı olması, bitkilerin doğadan toplanması sonunda bitki türlerinin zamanla soylarının tükenmesi, sekonder metabolit miktar ve kalitesinin çevresel ve iklimsel koşullardan etkilenmesi, belli gelişim evrelerinde ve çok az miktarda üretilmeleri gibi sorunlar nedeniyle zordur ve bu nedenle gün geçtikçe artan talep karşılanamamaktadır.

Çizelge 2.1. Bitkiler tarafından üretilen önemli sekonder metabolitler ve kullanıldıkları sektörler

Sektör	Sekonder Metabolit	Kullanımı	Üretici Bitki
TIP	Ajmasilin	Antihipertansif	<i>Catharanthus roseus</i>
	Artemisin	Antimalarial	<i>Artemisia annua</i>
	Berberine	Bağırsak rahatsızlığı	<i>Coptis japonica</i>
	Kamptotesin	Antitümoral	<i>Camptotheca acuminata</i>
	Kapsaisin	Analjezik	<i>Capsicum frutescens</i>
	Kodein	Yatıştırıcı	<i>Papaver somniferum</i>
	Kolşisin	Antitümoral	<i>Colchicum autumnale</i>
	Digoksin	Kardiyotonic	<i>Digitalis lanata</i>
	Digitoksin	Kardiyovasküler	<i>Dioscorea deltoidea</i>
	Elliptisin	Antitümoral	<i>Ochrosia elliptica</i>
	Ginsenosides	Tonik	<i>Panax ginseng</i>
	Morfin	Yatıştırıcı	<i>Papaver somniferum</i>
	Podofillotoksin	Antitümoral	<i>Podophyllum petalum</i>
	Kinin	Antimalarial	<i>Cinchona ledgeriana</i>
	Sanguinarin	Veba önleyici	<i>Sanguinaria canadensis</i>
	Şikonin	Antibakteriyel	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
	Taksol	Antikanser	<i>Taxus brevifolia</i>
Vinkristin	Antilösemik	<i>Catharanthus roseus</i>	
Vinblastin	Antilösemik	<i>Catharanthus roseus</i>	
GIDA	Antosiyanin	Renklendirici	<i>Vitis vinifera</i>
	Betalain	Renklendirici	<i>Beta vulgaris</i>
	Likopen	Renklendirici	<i>Lycopersicum esculentum</i>
	Kinin	Acılaştırıcı	<i>Cinchona ledgeriana</i>
	Naftokinonlar	Renklendirici	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
	Vanilin	Koku verici	<i>Vanilla plenifolia</i>
	Meyan	Tatlandırıcı	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
	Mirakulin	Tatlandırıcı	<i>Synsepalum dulcificum</i>
	Taumatın	Tatlandırıcı	<i>Thaumatococcus danielli</i>
Nane yağı	Esansiyel yağ	<i>Mentha piperata</i>	
KOZMETİK	Yasemin yağı	Esansiyel yağ	<i>Jasminum officinale</i>
	Gül yağı	Parfüm	<i>Rosa damascena</i>
	Lavanta yağı	Parfüm ve kozmetik	<i>Lavandula officinalis</i>
	Şikonin	Kozmetik	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
ZİRAAT	Piretrin, Sinerin	İnsektisit	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>
	Yasmolin	İnsektisit	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>
	Nikotin	İnsektisit	<i>Nicotiana tabacum</i>

Kaynak: Giri ve Narasu, 2000, Ramachandra ve Ravishankar, 2002.

Sekonder metabolitler birincil metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilmektedirler ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılırlar (Bourgaud ve ark., 2001). Bu metabolitler, bitkiler tarafından çok az miktarlarda üretilirler ve bazı bileşikler belirli türlere özeldirler. Çoğunlukla bitkilerin belli organlarında, hatta belli organların belli hücrelerindeki belli kompartımanlarda bulunurlar ve bitkinin belli bir gelişim periyodu süresince üretilirler (Sökmen ve Gürel, 2001). Şekil 2.1'de, Asetil-CoA, şikimik asit, mevalonik asit ve amino asit üzerinden sekonder metabolit üretimine yönelik biyosentetik yolları gösterilmiştir (Tolonen,2003).



Şekil 2.1. Asetil-CoA, şikimik asit, mevalonik asit ve amino asit yoluyla sekonder metabolit üretimine yönelik biyosentetik yollar (Tolonen, 2003)

### 2.1.1. Bitki Hücre ve Doku Kùltürleri Yolu ile Sekonder Metabolit Üretimi

Bitki hücre ve doku kùltürleri, aseptik koşullar altında ve uygun besin ortamlarında bitki hücre (meristematik hücreler, hücre süspansiyonu veya kallus hücreleri) doku, organ (apikal meristem, kök, gövde, yaprak vb.) veya bitkiciklerin üretildiği ya da ürünlerin (metabolitler) elde edildiği tekniklerdir (Babaoğlu, 2001) (Çizelge 2.1.1).

Farklılaşmamış ve organize olmamış kùltürlerden sekonder metabolit eldesi için; hücre süspansiyon kùltürleri ile çalışan araştırmacılar, yeterli miktarda metabolit eldesinin yapılamadığını, ancak dışarıdan çeşitli ürün arttırımına dayalı teknik yaklaşımlarda bulunulması gerektiğini bildirmişlerdir. Kallus kùltürleri ile yapılan çalışmalarda ise kùltürün başlatıldığı doku parçası (eksplant) orijininin sekonder metabolit üretiminde önemli olduğu, alt kùltürlemelerde genetik stabiliteyi sağlamanın gerekli, ancak zor olduğu belirtilmiştir. Ayrıca özellikle, belli bir organ (kök, sürgün veya embriyo benzeri yapılar) oluşturmak üzere farklılaşan kallus kùltürlerinde sekonder metabolit birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, son yıllarda farklılaşmış ve organize olmuş kùltürler ile yapılan sekonder metabolit eldesinin, farklılaşmamış ve organize olmamış kùltürlere göre çok daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001). Farklılaşmış ve organize olmuş kùltürler ile sekonder metabolit eldesinde, metabolitin sentezlendiği organ dikkate alınmaktadır. Bitki tarafından üretilen maddenin sentez yerinin köklerde bulunduğu durumlarda, kök kùltürlerinin kullanımı tercih edilmektedir. Ancak kök kùltürlerinde kök büyümesinin devamlılığını sağlamak için bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç vardır. Bu büyüme düzenleyicilerinden gerek oksin ve sitokinlerin niteliği ve miktarı, gerekse birbirlerine oranları kök gelişimini ve doğrudan sekonder metabolit sentezini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle son yıllarda, *Agrobacterium rhizogenes* ile enfeksiyon sonucu elde edilen, bitki büyüme düzenleyicilerine gereksinim duyulmayan, basit besin ortamlarında çok hızlı gelişim gösteren saçaklı kök kùltürleri tercih edilmektedir (Giri ve Narasu, 2000; Hasançebi, 2003).



Çizelge 2.1.1. Bitki hücre ve doku kültürleri yolu ile yüksek bitkilerden elde edilen temel sekonder metabolit grupları

<b>Fenilpropanoidler</b>	<b>Alkaloidler</b>	<b>Terpenoidler</b>	<b>Kinonlar</b>	<b>Steroidler</b>
Antosiyaninler	Akridinler	Karotenoidler	Antrakininler	Kardiyoaktif Glikozidler
Kumarinler	Betalainler	Monoterpenler	Benzokinonlar	Pregnenolon
Flavonoidler	Kinolizidinler	Seskiterpenler	Naftokinonlar	
Hidroksisinnamoil türevleri	Furonokinonlar	Diterpenler		
İsoflavonoidler	Harritoninler	Triterpenler		
Lignanlar	İzokinolinler			
Fenolenonlar	İndoller			
Proantosiyanidinler	Pürinler			
Stilbenler	Piridinler			
Tanenler	Tropan alkaloidler			

Kaynak: Ramachandra ve Ravishankar, 2002

### 2.1.2. Sekonder Metabolit Üretimini Arttırılması

Sekonder metabolit üretimi çevresel faktörlerden büyük ölçüde etkilenir. Bitki doku ve hücre kültürlerinde kültür ortamında yer alan beslenme faktörleri; yani karbon, fosfor, azot kaynakları ve diğer makro elementler ile bitki büyüme düzenleyicileri, yani oksin ve sitokininler hem metabolit oluşumuna, hem de büyümeye etki etmektedir. Kimyasal etkenlerin yanı sıra, ortamdaki fiziksel faktörler de *in vitro* sekonder metabolit üretiminde doğrudan veya dolaylı etkide bulunabilmektedir. Bu faktörlerin her biri kültürü yapılan bitkiye, kültür tipine, hücre hattına ve hatta kültürün yaşına göre etkide bulunmaktadır (Bhagyalakshmi ve ark., 2004, Gundlach ve ark., 1992, Sökmen ve Gürel, 2001).

#### A. Bitkisel Koşullar

Kültürlerin başlatılmasına kaynak teşkil eden hücre veya dokular, sekonder metabolit üretimi üzerinde önemli bir faktör olarak kabul edilirler. Kuramsal olarak herhangi bir metabolit açısından verimi yüksek bitkinin uygun kısmından başlatılan doku veya hücre kültürlerinden *in vitro* koşullarda da yüksek verim beklenir.

#### B. Kültür Ortamındaki Kimyasal Koşullar

Bitki doku ve hücre kültürleri için besin ortamında yer alan her kimyasal, aslında hem büyüme, hem de sekonder metabolit üretimi için teşvik edici veya kısıtlayıcı faktör olabilmektedir. Örneğin, besin ortamında yer alan herhangi bir madde büyümeyi teşvik ederken, metabolit birikimini azaltabilmektedir. Dolayısı ile sekonder metabolit üretimi söz konusu olduğunda besin ortamının kimyasal bileşenleri açısından hem büyüme, hem de metabolit üretimi için her hücre kültürünün kendine has istekleri olduğu da hatırlanmalıdır.

**-Karbon Kaynağı;** Birkaç istisna hariç, bitki hücre kültürlerinin pek çoğu heterotrofik (dışbeslek) olarak büyümektedir. Bir başka deyişle fotosentez yapamazlar, kültürlerin gereksinim duydukları karbon kaynağının kültür ortamına verilmesi gerekmektedir. Karbon kaynağının besleyici rolünün yanı sıra sekonder metabolit üretiminde düzenleyici rol oynadığı düşünülmektedir (Smeekens, 2000).

Karbon kaynağının besin ortamındaki derişimi metabolit üretimi açısından önemli bir faktördür. Özellikle yüksek derişimde karbon kaynağı kullanıldığında, kültürü yapılan hücre ve dokular ozmotik strese uğramakta, böylece hücre büyümesi ve bölünmesi baskılanmaktadır. Böylece kültür, sekonder metabolit üretimine doğru bir eğilim göstermektedir.

Bitki hücre ve kök kültürlerinde kullanılan karbon kaynağının miktarının yanı sıra tipi de sekonder metabolit üretimini etkiler. Genellikle kullanılan sukrozun yanı sıra glikoz ve fruktozun da yüksek oranda metabolit üretimi sağladığı bildirilmiştir.

**-Azot Kaynağı;** Bitki doku ve hücre kültürlerinde kullanılan pek çok besin ortamında nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) ve/veya amonyum ( $\text{NH}_4^+$ ) azot kaynağı olarak işlev görmektedir. Tek başına kullanıldıklarında amonyum, nitrata göre daha zayıf büyüme sağlamaktadır. Bu nedenle hücre süspansiyon kültürlerinde genelde nitrat azot kaynağı olarak tercih edilmekle beraber her ikisinin kullanıldığı kültürlerde kütlese hücre verimi çok daha yüksek olmaktadır. Genellikle nitrat/amonyum oranı 1:1 olmakla beraber, bu oranın değiştirilmesi ile birçok sekonder metabolitin *in vitro* üretilmesinde azalışa veya artışa neden olduğu görülmektedir.

**-Fosfor Kaynağı;** Bitki hücre kültürlerinde fosfor kaynağı olarak fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) kullanılmaktadır. Fosfor; gerek nükleik asit, gerekse enerji metabolizmasında gerekli olduğundan, bitki hücreleri için çok önemli bir elementtir. Fosfor hücre miktarında artış sağlamak ve fosfat miktarı arttıkça biyomas verimi artmaktadır. Dolayısı ile fosfat sekonder metabolitlerin *in vitro* üretiminde önemli bir madde olmaktadır. Büyüme ile sekonder metabolit üretimi arasındaki zıt ilişki göz önüne alındığında, fosfatın büyümeyi sınırlandırıcı bir faktör olarak hücre kültürlerinin başlangıcında düşük miktarda yer alması genellikle metabolit üretimini arttırmakta, büyümeyi ise sınırlamaktadır.

**-Bitki Büyüme Düzenleyicileri;** Bitki büyüme düzenleyicileri sekonder metabolitlerin biyosentetik yollarının baskılanması ya da aktive edilmesinde önemli rol oynarlar. Gerek kullanılan oksin ve sitokinlerin niteliği ve miktarı, gerekse oksin/sitokin oranı büyümeyi ve doğrudan sekonder metabolit birikimini etkilemektedir.

**-Diğer Elementler;** Kültür ortamında bulunan bazı makro (S, Ca, Mg, K) ve mikro (Cu, Mo, Mn) elementler de sekonder metabolit üretiminde etkili olabilirler.

**-pH;** Kültür ortamının pH' sının değişmesi, hem büyüme, hem de sekonder metabolit üretimini etkileyebilmektedir.

**-Ozmotik Basınç;** Yüksek şeker ve tuz derişimi genelde metabolit verimini arttırmakta, ancak büyümeye olumsuz etki yapmaktadır.

### C. Kùltür Ortamındaki Fiziksel Koşullar

**-Işık;** Sekonder metabolitlerin üretimi söz konusu olduğunda ışık, doku ve hücrelerde metabolit birikimini etkilemekte ve fotoperiyod, ışık kalitesi ve şiddeti önemli parametreler olmaktadır.

**-Sıcaklık;** Kùltürlerin büyüme ve gelişmesinin yanı sıra, sekonder metabolitlerin üretiminde sıcaklık önemli bir faktördür.

**-Diğer;** Havalandırma ve kùltür ortamının çalkalanması gibi fiziksel etmenler de kùltürlerin büyüme ve sekonder metabolit üretiminde önemli etkide bulunmaktadır .

### D. Deneysel Yaklaşımlar

**-Öncüller;** Bitki doku ve kùltürlerinde üretilmesi istenen bir metabolitin biyosentez metabolizması biliniyorsa ve bu metabolik yolda yer alan başlangıç maddesi (öncül) ve/veya ara ürünler saptanmış ise, kùltürleri bu maddelerle besleyerek enzimatik yollar uyarılabilir ve böylelikle hedef metabolitin üretimi arttırılabilir.

**-Elisitörler;** Bitkilerin mikroorganizmalara karşı bir çeşit savunma mekanizması olarak fitoaleksinler adı verilen antimikrobiyal bileşikler sentezledikleri bilinmektedir. Fitoaleksinler; poliasetilenler, thiopenler, seskiterpenler, diterpenler, kumarin ve izokumarinler, stilbenler, antrakinonlar vb. gibi farklı kimyasal sınıflarda olabilirler.

Fitoaleksin sentezine yol açan elisitörler, biyolojik olmayan (abiyotik) (UV, yaralanma, ağır metal iyonları, deterjanlar, metil jasmonat vb.) veya biyolojik kökenli (biyotik) (polisakkaritler, proteinler, glikoproteinler, bakteri, mantar vb.) olmak üzere başlıca iki gruba ayrılırlar. Yapılan çalışmalarda kùltür sistemlerine elisitörlerin ilavesi ile sekonder metabolitlerin miktarının arttırılabileceği ve hatta yeni bileşiklerin elde edilebileceği belirlenmiştir (Han ve ark., 2001).

## 2.2. Saçaklı Kök Kültürleri

*Agrobacterium rhizogenes*, Rhizobiacea familyasından, toprakta yaşayan gram-negatif bir bakteridir (Şekil 2.2.1). Dikotiledon bitkileri enfekte ederek “saçaklı kök” hastalığına neden olmaktadır. Doğal genetik mühendisler olarak da adlandırılan *Agrobacterium*’lar, 1980’li yılların ortalarında bitkilere gen transferi yapılması amacı ile ilgi çekmeye başlamışlardır (Özcan ve ark., 2001).

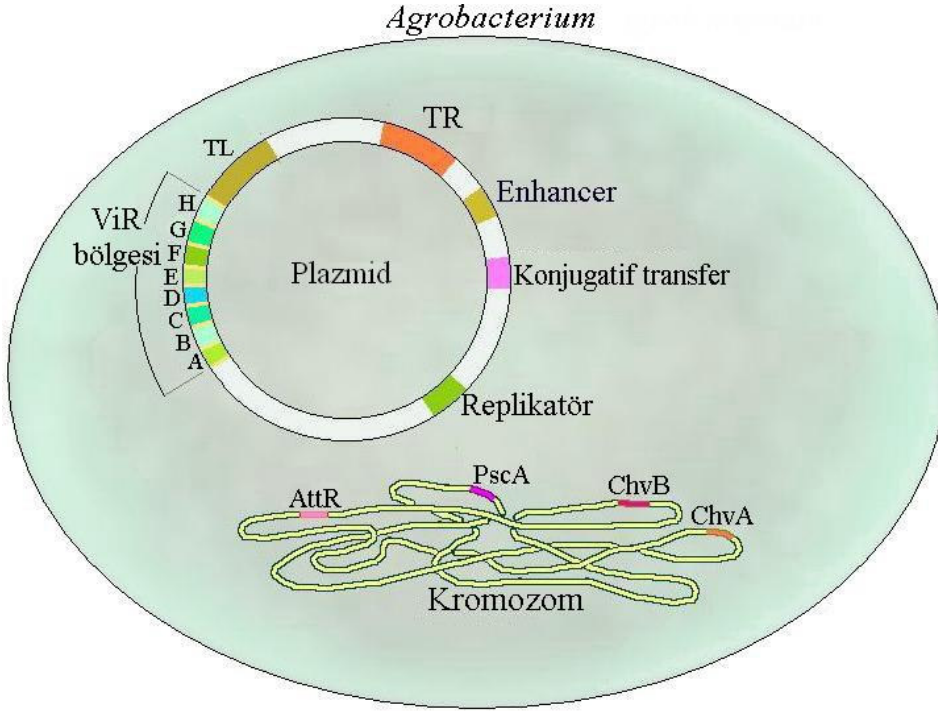
*A. rhizogenes*’e ait Ri (Root inducing/saçak kök oluşturan) plazmidinin T-DNA (transferred DNA/transfer DNA) bölgesinin, enfekte bitki DNA’sına entegre olması, saçaklı kök fenotipini ortaya çıkarmaktadır (Emiroğlu ve Gürel, 1999). Saçaklı kökler bol dallanmaları, kılcak köklerinin çok yoğun olması ve en hızlı çoğalan hücre kültürleri kadar veya onlardan daha fazla biomass üretim potansiyelleri ile karakteristiktir (Kim ve ark., 2002). Bu nedenlerle saçaklı kök kültürleri, sekonder bitki metabolitlerinin üretimi için önemli bir potansiyele sahiptirler.

Uygulamadaki kolaylığı, ekonomik oluşu, transformasyon oranının yüksekliği ve aktarılan genin stabil bir şekilde genoma yerleşerek ekspresyon yapması, hızlı kök büyümesi, ana bitki ile eşit hatta daha yüksek oranda sekonder metabolit üretim potansiyeli göstermeleri ve sentezin gerçekleştiği metabolik yolda yapılmak istenen genetik manipulasyonlara olanak tanınması gibi avantajlara sahip olması nedeniyle *Agrobacterium*’lar bitkilere gen transferi çalışmalarında rutin olarak kullanılmaktadırlar (Giri ve Narasu, 2000; Hammond, 2000) (Çizelge 2.2.1.).

Çizelge 2.2.1. Saçaklı kök kültürlerinden elde edilen bazı sekonder metabolitler

<b>Bitki Adı</b>	<b>Sekonder Metabolit</b>
<i>Aconitum heteropyllum</i>	Akonitler
<i>Ajuga reptans</i>	Fitoekdisteroidler
<i>Ambrosia sps.</i>	Poliasetilenler ve tiyofenler
<i>Amsonia elliptica</i>	İndol alkaloidleri
<i>Anisodus luridus</i>	Tropanalkaloidleri
<i>Armoracia lapathifolia</i>	Peroksidaz, izoperoksidaz, fusikoksin
<i>Artemisia absynthium</i>	Uçucu yağlar
<i>Atropa belladonna</i>	Atropin
<i>Astragalus mongholicus</i>	Sikloartan saponinler
<i>Beta vulgaris</i>	Betalain pigmentler
<i>Bidens alba</i>	Poliasetilenler
<i>Brugmansia candida</i>	Tropan alkaloidleri
<i>Calystegia sepium</i>	Kuskohigrin
<i>Campanula medium</i>	Poliasetilenler
<i>Cassia spp.</i>	Tropan
<i>Catharanthus roseus</i>	İndol alkaloidleri, aymalisin
<i>Cinchona ledgeriana</i>	Kuinolen Alkaloidleri
<i>Cichorium intybus</i>	Eskulentin
<i>Coleus forskohlii</i>	Forskolin
<i>Datura stramonium</i>	Hyosiyamin, seskiterpen
<i>Duboisia leichhardtii</i>	Tropan alkaloidleri
<i>Echinacea purpurea</i>	Alkaloidler
<i>Lawsonia inermis</i>	Lavson
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Tropan alkaloidleri,hyosiyamin,pirolin
<i>Hyoscyamus niger</i>	Hyosiyamin
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Flavonoidler
<i>Lobelia cardinalis</i>	Poliasetilen glikozitleri
<i>Lobelia inflata</i>	Lobelin, poliasetilen
<i>Papaver somniferum</i>	Kodein
<i>Paulownia tomentosa</i>	Verbaskosid
<i>Pimpinella anisum</i>	Esansiyel yağlar
<b><i>Rubia tinctorum</i></b>	<b>Antrakinonlar</b>
<i>Salvia miltiorhiza</i>	Diterpenoitler
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Flavonoidler
<i>Solanum aviculare</i>	Solasodin
<i>Tagetes patula</i>	Tiyofenler
<i>Trachelium caeruleum</i>	Poliasetilenler
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Ribosome inaktivite edici protein
<i>Valeriana wallichii</i>	Valepotriatlar

Kaynaklar: Özcan ve ark., 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Shanks ve ark., 2001



Şekil 2.2.1. *Agrobacterium* bakterisi (Özcan ve ark., 2001' e ait şekil değiştirilmiştir.)

Bakterinin patojenik özelliği, taşıdığı Ri plazmidinde bulunan 25 bp (base pair)' lik sağ ve sol sınır dizileri ile ayrılan T-DNA (transfer DNA) bölgesinden kaynaklanmaktadır. *A. rhizogenes*'de T-DNA bölgesi; bitki büyüme hormonları, opin sentezi ve kök gelişiminden sorumlu genleri taşımaktadır. *Agrobacterium*'lar T-DNA bölgesinde taşınan opin genlerinin tipine bağlı olarak sınıflandırılırlar ve bu sınıflandırmada agropin, mannopin, cucumopin tipleri yer alır. Agropin tiplerinde T-DNA, 2 bölgeden oluşur ve bu bölgeler  $T_R$  ve  $T_L$  DNA olarak isimlendirilir.  $T_R$  DNA bölgesinde oksin ve opin biyosentezinden sorumlu genler bulunur.  $T_L$  DNA bölgesinde ise *rolA*, *rolB*, *rolC* ve *rolD* olmak üzere 4 gen taşınır ve bu genler kök gelişimi ile kök devamlılığında sorumlu proteinleri kodlar.  $T_L$  DNA bölgesindeki rol genlerinin hiç biri  $T_R$  DNA bölgesi ile homoloji göstermemektedir. Mannopin ve cucumopin ırkları ise agropin tiplerindeki  $T_L$  DNA ile yüksek oranda homoloji gösteren tek bir DNA bölgesi içerir, bu nedenle  $T_L$  DNA bölgesinin saçaklı kök oluşumunda daha önemli olduğu düşünülmektedir (Giri ve Narasu, 2000; Hu ve Du, 2006; Hunter ve Neill, 1990).

Bakterinin kendi kromozomu üzerinde bulunan dört adet lokus (*chvA*, *chvB*, *pscA*, *exoC* ve *attR*); bakterinin bitki hücrelerine tutunması, yaralanmış bitki dokularında bakterinin çoğalması ve plazmid üzerinde bulunan *vir* genlerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

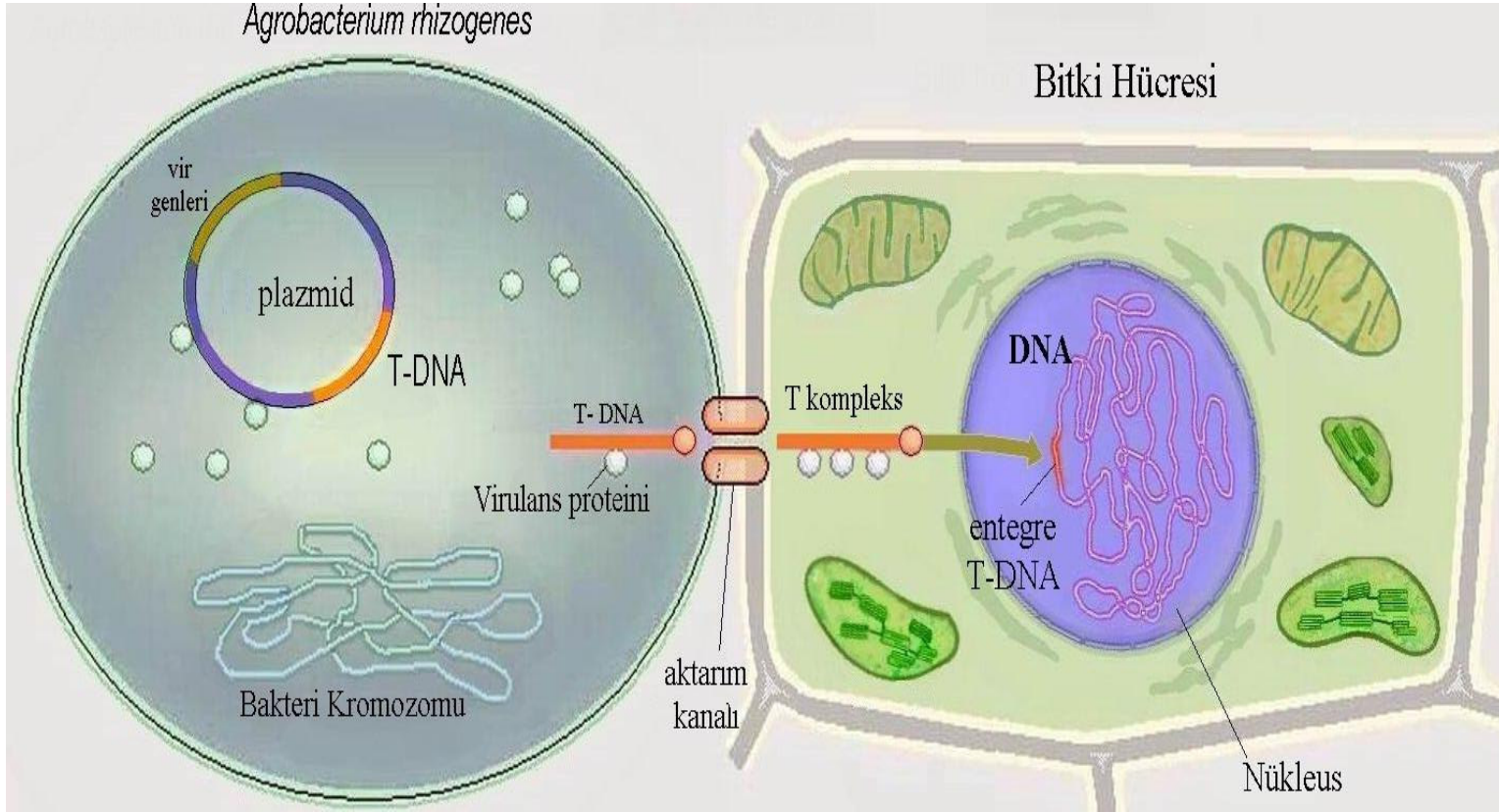
R<sub>i</sub> plazmidinin geri kalan kısmında ise T-DNA'nın bitki hücrelerine transferi ve genoma entegrasyonu ile ilişkili olan virülens (*vir*) genleri bulunur. Bu bölge T-DNA aktarımında mutlak gerekli olan 6 ana operon (VirA, VirB, VirC, VirD, VirE ve VirG) ve çok gerekli olmayan diğer 2 operon (VirF ve VirH)'dan meydana gelmektedir. VirA ve VirG operonları *vir* genlerinin aktivitelerini yönlendiren pozitif bir düzenleyici sistemini kodlamaktadır. VirA geninin ürettiği hücre içi membran proteini, yaralanmış bitki hücrelerinin salgıladığı fenolik bileşikler tanıyarak onlarla bağlantı kurar. Daha sonra, VirA geni, muhtemelen protein fosforilasyonu ile bu bilgiyi VirG lokusuna aktarır. Sonuçta, uyarılan VirG proteini ise kendi geni ve diğer *vir* genleri için transkripsiyon işlemcisi görevini üstlenmektedir. VirD operonu, T-DNA iplikçığının rejenerasyonunu sağlarken; VirC, bu bölgenin sınırlarından kesilmesinde, VirB ve VirE operonları ise T-DNA'nın bakteriden bitki hücresine hareketinde etkili olmaktadır. VirB proteinleri bakteri ve bitki hücre zarında açıklık oluşmasını sağlarken T- pilus oluşmasında da etkilidir. VirE proteinleri ise T iplikçığını sararak kompleksin çapını azaltmakta ve hücre zarı açıklığından geçişi kolaylaştırmaktadır. VirC proteini T-DNA'nın sınırlardan kesilmesinde etkilidir. VirH operonunun T-DNA transferinde gerekli olmadığı bildirilmekle birlikte, bu lokusun kodladığı enzimlerin enfeksiyon sırasında bitkinin salgılamış olduğu bakteriyosidal bileşiklere karşı bakteriyi koruduğu belirtilmektedir (Özcan ve ark., 2001) (Çizelge 2.2.2), (Şekil 2.2.2).

Çizelge 2.2.2. *Vir* proteinlerinin *Agrobacterium* ve bitki hücrelerindeki fonksiyonları

Vir proteini	<i>Agrobacterium</i> 'daki fonksiyonu	Bitkideki fonksiyonu
VirA	Fenolik algılayıcı	-
VirG	Fenolik tepki regülatörü	-
VirB1-11	T- pilusunun sentezi ve oluşumu	-
VirC1	Muhtemel "overdrive" bağlanma proteini; T-DNA transferinin artırılması	-
VirD1	<i>In vivo</i> T-DNA prosesi ve çift sarmal T-DNA'nın sınırlarında <i>in vitro</i> çentik açılması	-
VirD2	T-DNA sınır spesifik endonükleaz; muhtemelen T-iplikçğini bitkiye taşıyan "pilot protein"	T-iplikçığının 5' ekzonükleotik degradasyondan korunması ve bitki genomuna entegrasyonu
VirE1	Vir E2'nin taşınması ve korunması	-
VirE2	<i>Agrobacterium</i> 'da muhtemel T-kompleksinin oluşumu	Bitkide muhtemel T- kompleksinin oluşumu; T- iplikçığının nükleotik degradasyondan korunması, nüklear hedeflenmesi ve oluşan nüklear açıklık kompleksinden geçişi
VirF	?	Konukçu duyarlılık faktörü; bitki hücresinin bölünme çemberinin düzenlenmesi için Skp1 proteinleriyle muhtemel etkileşim
VirH	Muhtemel sitokrom p450 enzimi	-

Kaynak: Özcan ve ark., 2001





Şekil 2.2.2. *Agrobacterium* bakterisinden bitki hücresine T-DNA'nın aktarımı  
([www.nature.com/nature/journal/v433/n7026/fig\\_tab/433583a\\_F2.html](http://www.nature.com/nature/journal/v433/n7026/fig_tab/433583a_F2.html) kaynağından değiştirilmiştir.)

### 2.3. *Rubia tinctorum* L. Bitkisinin Botanik Özellikleri

#### 2.3.1. *Rubia tinctorum* L.'nin Sınıflandırılması

*Rubia tinctorum* (Kök Boya)'ın bitki sistematığındeki yeri (Seçmen ve ark. 1998):

Division: Magnoliophyta

Classis: Magnoliopsida

Subclass: Asterida

Ordo: Rubiales

Familya: Rubiaceae

Genus: *Rubia*

Species: *Rubia tinctorum* L. – Kök Boya

#### 2.3.2. *Rubia tinctorum* L.'nin Morfolojik Özellikleri

Bitki morfolojik olarak; uzun, silindirik, kalın, dallanmış, derinlere ilerleyen, kızılımsı kahve, çok yıllık köklere sahiptir. Gövde; otsu, kırılğan, dallanmış, tetragonal ve pürüklüdür. Yapraklar dört veya altılı halka dizilişli, lanseolat, damarlar elsidir. Çiçekler küçük ve sarı renklidir. Korolla rotat ve beş parçalıdır. Meyveler, küresel, parlak ve sulu yapıdadır (Şekil 2.3.1), (Şekil 2.3.2).



www.3.uci.edu

Şekil 2.3.1. *Rubia tinctorum* L. (Kök Boya) bitkisi



Şekil 2.3.2. Manisa-Karaali lokasyonunda kültüre alınan kök boya bitkileri, kökler ve parçalanmış kökler

### 2.3.3. *Rubia tinctorum* L.'nin Yayılışı

Dünya üzerinde Güneybatı ve Orta Asya'dan Kuzeybatı Himalayalar'a kadar; Batı, Güney ve Güneydoğu Avrupa gibi geniş alanda yayılış gösteren Kök Boya bitkisi Türkiye'de de geniş bir yayılış gösterir. Flora of Turkey And East Aegean Islands kitabındaki verilere dayanarak bitkinin Türkiye'deki yayılışı verilmiştir (Davis,1982; Deli, 2004).

- A1(E) Çanakkale Boğazı, Mayıs 1867, Calvert  
A2(E) İstanbul: Büyükçekmece, A. Baytop (ISTE 15605)  
A2(A) İstanbul: Haklı, Krause 1519  
A4 Çankırı: Şabaözü, 970 m, A. Baytop (ISTE 5223)  
A5 Sinop: Boyabat'ın 13 km batısı, 400 m, Sorger 69-16-32  
A8 Erzurum: Totum Gölü'nün batısı, 1070 m, Hub.-Mor.14878  
A9 Erzurum: Olur, T. Baytop (ISTE 14370)  
B1 İzmir: Ilıca, Çeşme'nin 3 km doğusu, Alava 4833  
B2 Kütahya: Gediz, 850 m, D.36887  
B3 Konya: Akşehir, 1000 m, Bornm. 1899:4533  
B4 Ankara: Kızılırmak kenarı, Ankara'dan Kayseri' ye giderken 100. km, 900 m, McNeill 353  
B5 Nevşehir: Ürgüp'ün 5 km güneydoğusu, 1200 m, Roper 138  
B6 Maraş: Çardak, D. 20394!  
B7 Erzincan: Cimin, 1500 m, D.31733!  
B8 Muş: Muş, 1330 m, Kotschy 1859: 503  
B9 Van: Gevaş'ın 10 km kuzeydoğusu, 1750 m, Sorger 77-89-1  
C2 Antalya: Elmalı, Bourgeau 1860:128  
C4 Konya: Konya'dan Çumra'ya, Küçük Köy, 980 m, Helbaek 2686  
C5 Niğde: Niğde civarı, 22 Haziran 1927, Kadri Achmed  
C6 Hatay: Belen, 450 m, D. 27010  
C8 Mardin: Kavs, Sint. 1888:994  
C9 Siirt: Siirt civarı, Mar Jakup, 90 m, Nabelek 4309  
Ada: Khios, Platt 52

#### 2.4. *Rubia tinctorum* L.'nin Önemi

Doğal boyalar XIX. yüzyılın sonlarına kadar, boyacılığın gelişmesinde çok önemli olmuşlardır. Tüm renkler bitkilerden elde edilebilmektedir, bunlardan önemli olanları, sarı rengi veren cehri ve safran, siyahı veren mazı ve kırmızı rengi veren kök boya bitkisidir. Bu bitkilerden en değerlisi kök boya bitkisidir (Baykara, 1993). Halıcılık sektöründe kullanılan doğal kırmızı boya, bu bitkinin kök ve rizomlarından elde edilir ve 'Türk kırmızısı' olarak tanınır (Şekil 2.4.1). Ekonomik olarak dünya piyasalarında öneme sahiptir (Çizelge 2.4). Tıbbi olarak; antimikrobiyal, antifungal, analjezik, antimalarial, antioksidant, antileukemik, antispazmodik, antiskorbütik, diüretik ve böbrekteki kalsiyum ve magnezyum fosfatları parçalama özelliklerine sahiptir (Enez, 1989; Kalyoncu ve ark., 2004; Krizsan ve ark., 1996; Kuzovkina ve ark., 1996; Manojlovic ve ark., 2006; Meral ve ark., 2001). Dermatolojik çalışmalarda histokimyasal boya olarak da yararlanılmaktadır (Norton, 1998).

Çizelge 2.4. Doğal boyaların dünya pazarlarındaki fiyatları

Doğal Boyalar	Elde Edilen Bitki	Fiyat (1kg)
Alkanna Kökü	<i>Alkanna tinctoria</i>	48\$
Brezilya Talaşı	<i>Caesalpinia echinata</i>	48\$
Kamala Tozu	<i>Mallatus philippiensis</i>	111\$
İndigo (Doğal)	<i>Indigofera tinctoria</i>	353\$
Kök Boya	<i>Rubia tinctorum</i>	48\$

Kaynak: Joyhandspinning, 2005



Kök boya ile boyanmış halı

<http://www.wovenlegends.com/rubia.html>



Diyet hapları

<http://www.diet-pills-24h.com>

Şekil 2.4.1. Kök Boyanın kullanım alanları

*R. tinctorum*, tınlı ve killi-tınlı bünyeli, nötr ve hafif alkali, az tuzlu, organik maddece zengin, içinde yüksek miktarda P ve K içeren topraklarda yetişebilmektir (Başlar ve Oflas, 1996). XIX.Yüzyıl sonlarında “Malatya, Siirt, Maraş, Diyarbakır, Ankara, Kayseri, Çankırı, Konya, Isparta, Burdur, Antalya, Niğde, Balıkesir, Kütahya, İzmir, Manisa” illerinde tarımı yapılmıştır. Anadolu'nun hemen her tarafında yetişebilen kök boya bitkisinin en iyi ve en ünlüsü Kırkağaç yakınındaki Bakır Kasabası'nda üretilmiştir. Ayrıca, Manisa, Akhisar ve Gelenbe' de yetiştirilen kök boya bitkileri de iyiler arasında yer almıştır (Baykara, 1993). Başlar ve Oflas, 1996 yılında yaptıkları araştırmalarında, *R.tinctorum* bitkisinin Manisa-Demirci ve çevresinde yayılış gösterdiği yerleri belirlemişlerdir.

Kayıtlar incelendiğinde, 17. yüzyılda dış ticarete kök boyanın, hububat ve ipekten sonra önemli bir yere sahip olduğu ve ihracatının %90'ının İzmir limanından gerçekleştirildiği saptanmıştır. Fransa ve İtalya'da Anadolu'dan götürülen tohumlarla kök boya tarımı geliştirilmeye çalışılmakla birlikte, Anadolu kök boyasının kalitesinin daha üstün olduğu ifade edilmiştir (Baykara, 1993). Vetter ve ark., 1997 yılında yaptıkları çalışmalarında; Avrupa'da kültürü yapılması için bazı boya bitkilerini seçerek, *R. tinctorum*'ün kırmızı renk eldesi, hızlı boyama, solmama gibi özellikleri açısından çok uygun olduğunu belirlemişler, en az miktarda boya maddesi kaybı için bitki hasatı esnasında hızlı ve dikkatli davranılması gerektiğini vurgulamışlardır.

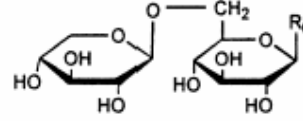
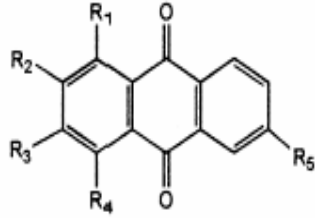
Kök boyanın dış ticaretteki önemi daha sonraki yıllarda yavaş yavaş azalmıştır. Bunun nedenleri çeşitlidir. Amerikan iç savaşı sırasında özellikle İngiliz dokuma sanayisinin pamuk tedariki bakımından sıkıntı çekmesi bu boya bitkisine talebi azaltmıştır. 1870'li yıllarda ise kimya endüstrisinde çeşitli sentetik boyaların geliştirilmesi ve bunların daha ucuza mal olması da diğer bir nedendir. Bugün ise halıcılık sektöründe boyama işleminde kullanılmak üzere çok küçük alanlarda kültürü yapılmaktadır.

Bunun yanı sıra günümüzde, tekstilde kullanılan sentetik boya maddelerinin insan sağlığında alerjik bazı reaksiyonlara, yüksek miktarda çevre kirliliğine neden olmaları, üretimde zararlı maddelerle temas halinde olan personel açısından tehlike arz etmeleri gibi önemli dezavantajlarından dolayı, ekotekstil kavramının üretici ve tüketici kesimlerinde hızla yaygınlaşması sonucu dayanıklı doğal boyalara olan ilgi hızla artmaktadır ve kök boyanın elde edilmesi ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır.

## 2.5. *Rubia tinctorum* Bitkisinin Kimyasal İçeriği ile İlgili Bilgiler

Kök boya bitkisi, sekonder metabolit olarak alizarin, rubiadin, purpurin ve lusidin gibi bazı hidroksiantrakinon glikozidlerini içermektedir (Angelini ve ark., 1997), (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Antrakinonların yapıları (Derksen ve ark., 1998)



Disakkariti

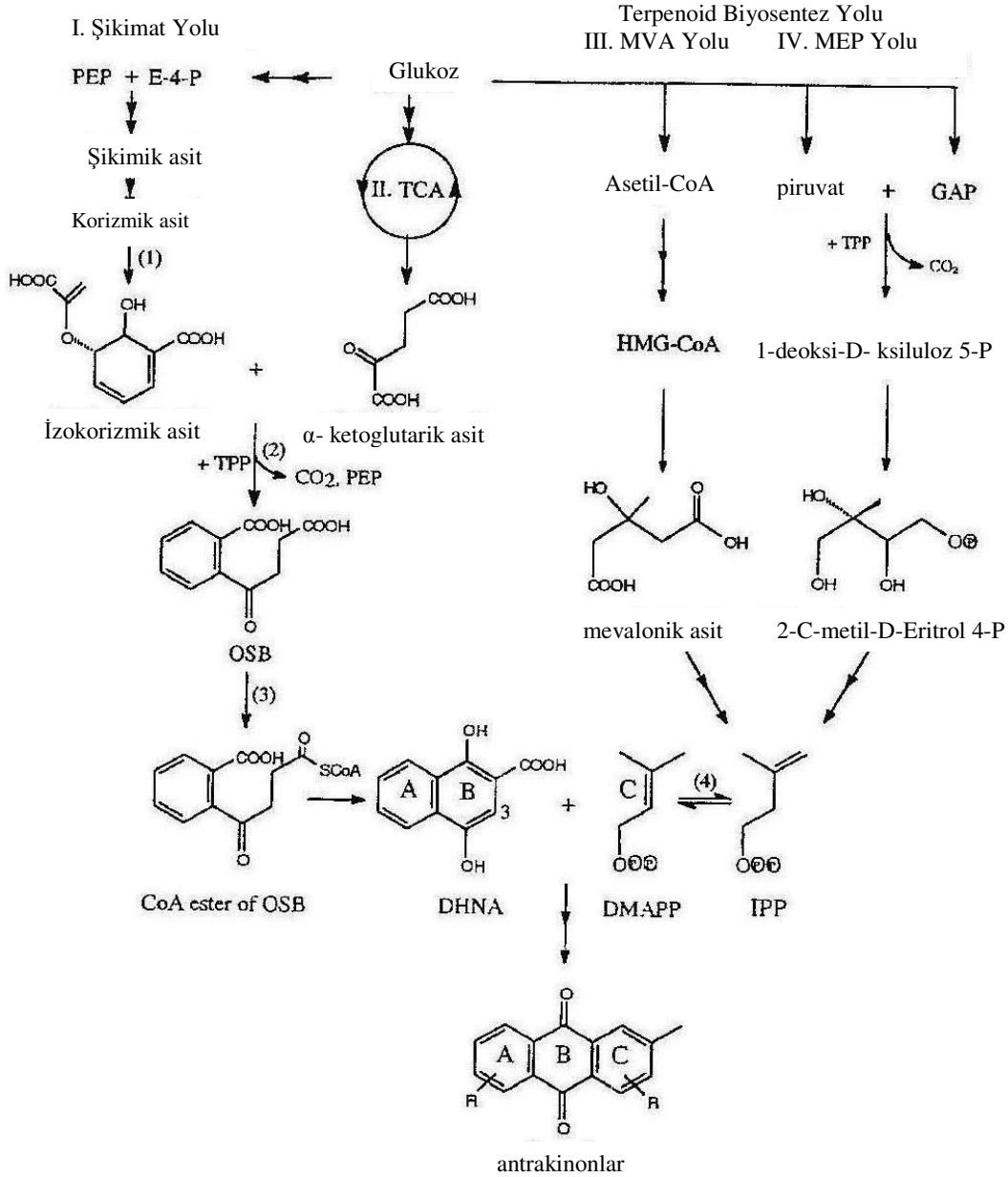
R<sub>6</sub>=-O-aglikon

Adı	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
1 Lusidin primeverozit	OH	CH <sub>2</sub> OH	O-Primeverozit	H	H
2 Ruberitrik asit	OH	O-Primeverozit	H	H	H
3 2,6 Dihidroksiantrakinon	H	OH	H	H	H
4 Lucidin	OH	CH <sub>2</sub> OH	OH	H	H
5 Alizarin	OH	OH	H	H	H
6 Purpurin	OH	OH	H	OH	H
7 Kuinizarin	OH	H	H	OH	H
8 Purpuroksantin	OH	H	OH	H	H

Yüksek yapılı bitkilerde antrakinonlar başlıca iki biyosentez yolu ile elde edilir. Bunlar Poliketid biyosentez yolu ve Korizmat/o-süksinilbenzoik asit biyosentez yoludur.

Poliketid biyosentez yolunda antrakinonlar bir Asetil-CoA'nın oktaketid zinciri yoluyla 7 Malonil-CoA ünitesini kendine bağlaması ile oluşur.

Rubiacea familyasındaki bitkilerde antrakinonlar genellikle korizmat/o-süksinilbenzoik asit biyosentez yoluyla meydana gelir. Bu biyosentez yolunda A ve B halkaları, o-süksinil benzoik asit (OSB) yoluyla korizmik asit ve α- ketoglutarat' tan oluşur. C halkası ise terpenoid biyosentez yoluyla izopentil di fosfat (IPP)'dan meydana gelir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Rubiaceae familyasına dahil bitkilerde antrakinonların biyosentez yolları

DHNA: 1,4-dihidroksi-2-naftoik asit; DMAPP: 3,3-dimetilalil difosfat; E:4-P-eritroz 4-fosfat; GAP: gliseraldehit 3-fosfat; HMG: CoA- 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A; IPP: izopentenil difosfat; MVA: mevalonik asit; MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat; OSB: *o*-süksinilbenzoik asit; PEP: fosfoenol piruvat; TCA: trikarboksilik asit; TPP: tiamin difosfat. Enzimler: (1) izokorizmat sentaz; (2) *o*-süksinilbenzoat sentaz; (3) OSB:CoA ligaz; (4) IPP izomeraz (Han ve ark., 2001).



## 2.6. *Rubia tinctorum* L. ile Yapılan Çalışmalar

Sato ve ark.(1991), bitki besin ortamına ilave edilen çeşitli fitohormonların; IAA, NAA, 2,4-D, kinetin ve farklı sukroz konsantrasyonlarının *R. tinctorum* 'un saçaklı kök kültürlerinin büyümesi ve elde edilen antrakinon pigmentlerinin miktarları üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 5µM IAA içeren sıvı MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında kültüre alınan köklerden maksimum büyüme oranı ve yüksek antrakinon üretimi sağlamışlardır. Bu çalışmada, kinetin etkisiz bulunmuştur. Yüksek sukroz konsantrasyonları (% 6-18) ve 5µM IAA ya da 0,5µM NAA fitohormonları kullanıldığında büyümenin inhibe olduğu; buna karşın, fitohormonsuz, %12 sukroz içeren sıvı ortamda ise maksimum büyüme ve antrakinon üretiminin elde edildiği bildirilmiştir.

Ercan (1996), farklı hormon konsantrasyonları kullanarak *R. tinctorum*' un yaprak, boğum, boğum arası ve hipokotil eksplantlarının rejenerasyon yeteneklerini araştırmıştır. Boğum ve hipokotilden kallus oluşturulamamış, yaprak ve boğum arasından alınan eksplantlarda ise NAA artışının kallus ve kök oluşumunu teşvik ettiği, BAP artışının ise inhibe edici etkide bulunduğu belirlenmiştir. Sürgün gelişimi teşvik edilememiştir.

Kuzovkina ve ark. (1996), *A. rhizogenes*'in Ri-plazmidini kullanarak, büyüme hormonu içermeyen ve normal kültürler için öngörülen ortamlarda saçaklı kök kültürlerini elde etmeyi amaçlamışlardır. MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve B5 (Gamborg ve ark., 1968) ortamlarında oluşturdukları transgenik saçaklı köklerin içerdikleri antrakinon miktarlarındaki farklılıkları, köklerin nitrat ve amonyum azotu oranlarına gösterdikleri tepki ile açıklamışlardır. Araştırmacılar, B5 ortamında nitrat azotunun amonyum azotundan on kat daha fazla bulunmasının sekonder metabolit üretimini olumlu yönde etkilemiş olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, inokulasyonda kullanılan bakteri ırklarındaki farklılıkların, elde edilen kültürlerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine yansdığı da ifade edilmiştir.

Ercan ve ark. (1999), İzmir, Antalya, Uşak ve Konya lokasyonlarından toplanan *R. tinctorum* tohumlarını serada ekerek çimlenen bitki kotiledon yapraklarının *A. rhizogenes* ırkları (15834, 2628, R1000, 9365) ile inokulasyonları sonucunda oluşan antrakinon pigmentlerini karşılaştırmışlardır. *A. rhizogenes*' in 2628 ırkı, kesim yüzeylerinde kallus oluştururken, diğer ırkların sadece saçak kök oluşturdukları gözlenmiştir. Uşak populasyonunun diğer populasyonlardan daha yüksek antrakinon içerdiği tespit edilmiş ve tarla koşullarında yetişen bitkilere ait antrakinon miktarlarının *in vitro* koşullara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, gözledikleri bu farklılığın kültür ortamlarında kullanılan fitohormon ve sukroz konsantrasyonlarından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Bitkisel Materyal ve Bakteri İrkları

Tohumlar, 2001, 2002 ve 2003 yıllarının Eylül aylarında Manisa ilinin Üçpınar, Karaali köylerinden ve Akhisar ilçesinin Selçikli köyünden toplanmıştır (Şekil 3.1).

Transformasyon çalışmalarında kullanılan *Agrobacterium rhizogenes*'in 15834, A4 (agropin) ve R1000, 8196 (mannopin) yabancı tip ırkları Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. Rengin Eltem ve TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsünde görevli Uzman Dr. Tijen Talas Oğraş' tan sağlanmıştır.



Şekil 3.1. *Rubia tinctorum* L. tohumları

#### 3.2. Tohum Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi

Steril bitkicikler elde etmek için öncelikle, üç lokasyondan elde edilen tohumlara 8 farklı yüzey sterilizasyonu denenmiştir (Çizelge 3.2.1). Steril edilen tohumlar, agar ve sukroz içermeyen MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve su ile ıslatılmış pamuklu ortamlar içeren kavanozlarda çimlendirilmeye alınmışlardır.

Çizelge 3.2.1 Tohumlara uygulanan sterilizasyon işlemleri

Sterilizasyon No	Kabin Dışında (dk.)		Kabin İçinde (dk.)		
	1/100 Sabun su	1/10 Savlex	(%70) Alkol	(%2,5) NaOCI	(0,25 g/ml) Fungisit (Captan 50WP)
I	-	-	2	10	-
II	-	-	2,5	15	-
III	5	5	3	15	-
IV	5	5	3	10	3
V	5	5	3	15	-
VI	5	10	5	10	3
VII	5	10	5	15	2
VIII	5	5	5	15	-

**3.3. Mikroçoğaltım:** İnokulasyon için yeterli bitkisel materyali sağlamak amacıyla steril bitkiciklerin mikroçoğaltımları, 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamında (30 g/l sukroz, 7g/l agar, pH=5.8) gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3). Kültürler, ortalama 25°C sıcaklıkta 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta muhafaza edilmişlerdir. Altkültürlemeler, her dört haftada bir yaprakların uzaklaştırılıp, gövdelerin internod aralarından kesilerek taze kültür ortamlarına aktarılmaları ile yapılmıştır.

**3.4. *Agrobacterium rhizogenes* Irklarının Aktivasyonu:** Bakteriler, Yeast Mannitol Broth (YMB) besiyerine aktararak 4°C'de saklanmışlardır (Çizelge 3.4.). İnokulasyon için tek bir bakteri kolonisi, 100 ml sıvı YMB ortamında, 28°C'de, orbital çalkalayıcıda (120 devir/dakika ) 48 saat karanlıkta çoğaltılmıştır. Daha sonra bakteriler, 5000 devir/dakika hızda santrifüjlemeye tabi tutulmuşlardır. Bakteriler, steril saf su içinde süspansiyon edilerek yoğunlukları O.D<sub>600</sub> değerleri 0,8-1 olacak şekilde inokulasyon için hazırlanmışlardır.

**3.5. Bitki Eksplantlarına *Agrobacterium rhizogenes* Irklarıyla İnokulasyon ve Saçaklı Köklerin Elde Edilmesi:** İnokulasyon için kök boya bitkisinin yaprak ve nod eksplantları kullanılmıştır. Eksplantlar, steril bistüri ucu ile yaralanarak *A. rhizogenes* ırkları ve negatif kontrol için steril saf su içerisinde 100 devir/dakika' da 30 dakika bekletilmişler, steril peçeteler ile kurulandıktan sonra karanlıkta 28°C'de, yarı katı MS ortamında kültüre alınmışlardır. İki gün antibiyotiksiz ortamda tutulan eksplantlar, bakterilerin eliminasyonunu sağlamak için 500 mg/l cefotaxime içeren MS ortamında 1 hafta, 250 mg/l cefotaxime içeren MS ortamında ise 2 hafta süreyle kültüre alınmışlardır. Daha sonra eksplantlar, antibiyotik içermeyen MS ortamına aktarıldıklarında saçaklı kökler elde edilmiştir (Şekil 3.5).

### 3.6. Saçaklı Kök Kültürlerinin Oluşturulması

**3.6.1. Saçaklı Köklerin Sıvı MS, B5, SH Ortamlarında Kültüre Alınması;** Yaralanan bölgelerde oluşan saçaklı kökler, eksplantlardan uzaklaştırılarak hormonsuz sıvı MS, B5 ve SH ortamlarında 24°C'de 140 devir/dakika olarak orbital çalkalayıcıda, karanlık ortamda kültüre alınmışlardır.

**3.6.2. Farklı Irklar ile Elde Edilen Saçaklı Köklerin Sıvı MS Ortamında Kültüre Alınması;** Farklı ırkların sekonder metabolit üretimi üzerine etkilerini daha iyi belirlemek üzere, Karaali lokasyonundan elde edilen bitkiciklere ayrıca *A. rhizogenes*; A4, R1000, 15834, 8196 ırkları ile inokulasyon gerçekleştirilmiş ve oluşan saçaklı kökler sıvı MS (30 g/l sukroz, pH=5.8) ortamında kültüre alınmışlardır.

**3.6.3. Saçaklı Köklerin Sukroz ve Elisitör Eklenen Sıvı B5 Ortamında Kültüre Alınması;** Saçaklı kökler, 120 gr. sukroz ilave edilmiş, 0,1 µM metil jasmonat içeren (B5SMeJA) ve içermeyen (B5S) sıvı B5 ortamlarına aktarılmışlardır.

Çizelge 3.3. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan MS, B5 ve SH ortamlarının kimyasal içeriği

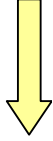
Komponentler	Kültür Ortamlarındaki Konsantrasyon (mg/l)		
	MS	B5	SH
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	2500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	-
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	300
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250	400
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150	200
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	150	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	10	10
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3	-	-
KI	0.83	0.75	1.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.0	5.0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	2.0	1.0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.1
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	15.0
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3	20.0
Nikotinik asit	0.5	1.0	5.0
Pridoksin-HCl	0.5	1.0	0.5
Thiamin-HCl	0.1	10.0	5.0
<i>myo</i> -inositol	100	100	1000
Glisin	2.0	-	-
Sakkaroz	30 000	20 000	30 000

Kaynak: Chawla , 2002; Özcan ve ark., 2001

Çizelge 3.4. *Agrobacterium rhizogenes* bakterisinin üretildiği besiyeri (pH:7.0)

Komponentler	Miktar (g/l)
Mannitol	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
Yeast Extract	0,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0.1
Agar	15

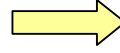
Kaynak: Hunter ve Neill, 1990



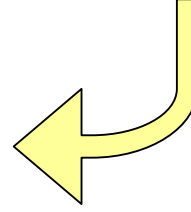
Mikroçoğaltım  
ile elde edilen  
bitkicikler



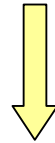
Yaralanmış  
eksplantlar



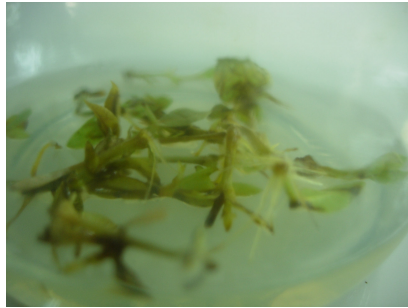
YMB ortamında  
büyütülen bakteriler



Orbital çalkalayıcıda 100  
Rpm'de 30dk. inokulasyon



Eksplantlar bakterilerin eliminasyonu için  
500 mg/l cefotaxime MS ortamında 1 hafta,  
250 mg/l cefotaxime içeren MS ortamında ise  
2 hafta süreyle kültüre alınmışlardır.



Yaralanmış bölgelerde  
oluşan saçaklı kökler

Şekil 3.5. Bitki eksplantlarına *Agrobacterium rhizogenenes* ırklarıyla yapılan inokulasyonlar

### 3.7. Opin ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizi

#### 3.7.1. Opin Analizi

Kök boya bitkisinin *A. rhizogenes* ırkları ile inokulasyonundan elde edilen köklerin transformasyon doğrulamaları için Golds ve ark. (1990) tarafından belirtilen opin analiz yöntemi kullanılmıştır. 10 günlük 100'er mg taze kök dokusu, 100µl 0.1N HCl ile homojenize edilmiştir. Homojenat 5.000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilerek üst sıvı ayrılmıştır ve bu üst sıvı kağıt elektroforezi için kullanılmıştır. Elektroforezde durağan faz olarak kullanılan Whatmann 3MM kağıdı üzerine sırasıyla; 2µl 1.0 mg/ml derişimde stok olarak hazırlanmış mannopin standardı, 10µl inokulasyon yapılmamış *Rubia tinctorum* kök ekstresi, 10'ar µl inokulasyon yapılmış *Rubia tinctorum*'a ait kök ekstreleri spotlanarak oda sıcaklığında kurutulmuşlardır. Örnekler, hareketli faz olan formik asit: asetik asit: su (5:15:80, v/v/v) sisteminde 45 V/cm elektrik akımında 30 dakika elektroforez yapılarak ayrılmışlardır. Elektroforez sonunda opinlerin görünür hale gelmesi için Petit ve ark.(1993)'na ait yöntemde belirtildiği gibi AgNO<sub>3</sub> boyaması yapılmıştır;

**A Solüsyonu:** 0.625 g AgNO<sub>3</sub>, 250µl distile su ile çözündürülmüş; üzerine 50ml aseton ilave edilmiş ve çökelen AgNO<sub>3</sub>'ün tamamen çözündürülmesi için solüsyon berraklaşınca kadar damla damla distile su ilave edilmiştir.

**B Solüsyonu:** Distile su ile %20'lik (w/v) NaOH çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan NaOH' den 10 ml alınarak üzerine 90 ml MeOH ilave edilmiştir.

**C Solüsyonu:** %5 (w/v) derişimde olacak şekilde, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> distile suda tamamen çözülerek hazırlanmıştır.

Elektroforez sonucunda oda sıcaklığında kurutulan örneklerin bulunduğu Whatmann kağıdı, içinde A solüsyonu bulunan bir kap içine batırılıp çıkarılarak tamamen ıslatılmıştır. Daha sonra 20 dk. oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından B solüsyonu içine batırılıp çıkarılarak tamamen bu solüsyonda ıslanması sağlanmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında tekrar kurutulan kağıt, C solüsyonu ile ıslatılarak üzerindeki boyanmış opinler fikse edilmiştir ve soğuk akar su altında 1-2 saat yıkanarak kağıt zemin temizlenmiştir. Boyanan Whatmann kağıdı oda sıcaklığında kurutularak opin varlığı analiz edilmiştir (Hasançebi, 2003).

#### 3.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Saçaklı ve normal köklerden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Araştırma kapsamında, primerler oluşturulmuştur. Doğal şartlarda bakterilerde bulunan *rol A*, *rol B*, *rol C* genlerinin, inokulasyon ile saçaklı köklere aktarılıp aktarılmadığının belirlenmesi için polimeraz zinciri reaksiyonunun oturtulmasına ODTÜ Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. Mahinur Akaya ile birlikte çalışılmıştır.

### 3.8. Saçaklı Köklerde Bulunan Sekonder Metabolit Analizleri

#### 3.8.1. Spektrofotometre Yöntemi

Ercan ve ark. (1999)'nın belirttiği yönteme dayanılarak ölçme işlemi yapılmıştır. Standart olarak kullanılacak alizarin Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik laboratuvarından elde edilmiştir. Ölçme işleminde Unicam marka spektrofotometre kullanılmıştır. Saçaklı kökler, 2 gün süreyle 60°C'de kurutulmuşlardır. Daha sonra toz hale getirilen köklerin 50 mg'ı, 50 ml distile su ile karıştırılarak 16 saat çalkalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu karışım, 70°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Süspansiyon soğutulduktan sonra üzerine 50 ml %50 methanol eklenerek karıştırılmış ve filtre kağıdında süzümüştür. Berrak solüsyon, 450 nm' de 1mg/ 100 ml alizarine karşılık okunmuştur.

#### 3.8.2. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Yöntemi

Saçaklı kökler üzerinde HPLC (High Performance Liquid Chromatography; yüksek performanslı sıvı kromatografisi) zamanlı analizlerin yapılabilmesi için öncelikle kök boyada bulunan referans bileşiklere ihtiyaç duyulmuştur. Bu yöntem Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Erdal BEDİR' in yardımları ile oturtulmaya çalışılmıştır.

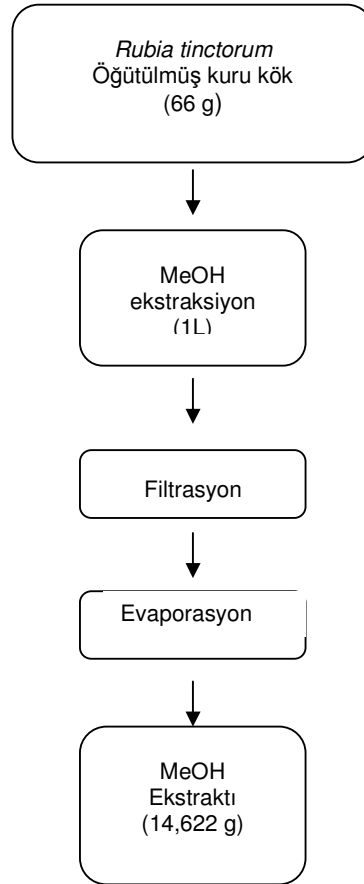
Kolon kromatografileri silika jel 60 (Merck 7734), Li Chroperp RP (C-18, Merck, 1077) adsorbanları, ince tabaka kromatografisi pre-coated Kieselgel 60 F<sub>254</sub> alüminyum kağıtlar (Merck 5554) kullanılarak yapılmıştır. UV aktif bileşikler 254 ve 366 nm UV lambada Camag marka cihaz yardımı ile detekte edilmiştir.

Ticari olarak bulunamayan referans bileşiklerin elde edilmesi amacı ile doğadan toplanan 66 g kök boya bitkisi kökünün 1L MeOH ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra çözücü rotavaporda yoğunlaştırılmıştır. Devamında materyal liyofilize edilmiş ve fraksiyonlama işlemleri uygulanmış, 14,622 g MeOH ekstraktı elde edilmiştir (Çizelge 3.8.2).

MeOH ekstraktı, Li Chroperp RP (C-18, Merck, 1077) marka RP kolondan sırasıyla %100 sudan %100 metanole, metanol oranı %10'ar arttırılarak geçirilmiştir. İşlem sonucunda 49 fraksiyon elde edilmiştir. 40. fraksiyon 70:30:3; kloroform: metanol: su sistemi ile şartlandırılmış, (Merck 7734) marka silika jel kolondan geçirilmiştir. Elüsyon sonucunda toplam 32 fraksiyon elde edilmiş bunlardan 22. ve 23. fraksiyonlar, 27. ve 28. fraksiyonlar birleştirilerek <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR'ı (Nükleer Magnetik Rezonans) tayini için Ege Üniversitesi NMR Uydu Laboratuvarı' na

Bruker Avance DRX-400 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) ve 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) gönderilmiştir. NMR işlemi  $\text{D}_2\text{O}$  çözügeni kullanılarak yaptırılmıştır. 22. ve 23. fraksiyonların lusidin primeverozit ve 27. ve 28. fraksiyonların Ruberitrik asit ve Lusidin primeverozit olduğu belirlenmiştir.

Standart Çözelti Hazırlıkları: Stok çözelti için 10 mg Alizarin, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  olacak şekilde 10 ml metanolle ultrasonik banyoda 15 dk. tutularak çözülmüştür. Bu stok çözeltilerden yola çıkarak 5'er ml 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  son derişime sahip Alizarin çözeltileri hazırlanmıştır. Ruberitrik asit ve Lucidin primeverozit için; 1 mg Ruberitrik asit ve Lucidin primeverozit derişimleri 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  olacak şekilde 1 ml metanolle ultrasonik banyoda 15 dk. tutularak çözülmüştür. Stok çözeltilerinden yola çıkarak 1'er ml 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lik çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir örnek duplike uygulanmıştır. Dublike uygulamaların ortalamalar alınıp Microsoft Excel Programı ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir.



Şekil 3.8.2. Doğadan toplanan *Rubia tinctorum* kökünde yapılan MeOH ekstraksiyonu



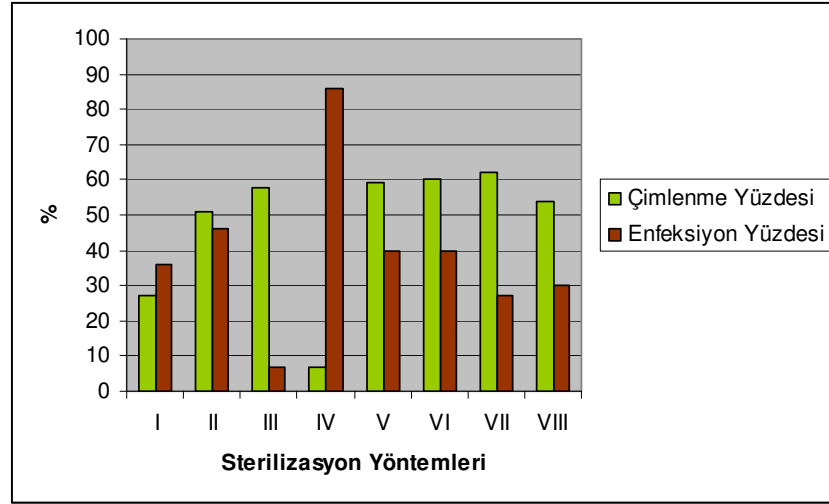
### 3.9. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmada elde edilen veriler, 4 (bakteri ırkı) x 2 (eksplant tipi) faktörlü tesadüf blokları deneme desenine göre değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, % ile ifade edilen özelliklerin değerlendirilmesi için "0" ile "100" arasında değişen verilere arcsin transformasyonu uygulanarak açı değerleri üzerinden istatistiki analizler yapılmıştır. Bu transformasyon tipinde "0" değeri yerine  $1/4n$ , "100" değeri yerine de  $100-1/4n$  formülü ile elde edilen değerler konulmuştur (n= ilgili tekerrürdeki örnek sayısı) (Açıkgöz, 1988). "Tarist" istatistiki program kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır (Açıkgöz ve ark., 1994).

#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Tohum Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi

Tohum sterilizasyonu için denenen 8 farklı yöntemden VII numaralı yöntemin %62 çimlenme oranı ile en uygun olduğu belirlenmiştir. Ancak, enfeksiyon yüzdesinin en düşük olduğu III no'lu yöntemin de etkili olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.1.1), (Çizelge 4.1.1).



Şekil 4.1.1. Sterilizasyon yöntemine göre çimlenme ve enfeksiyon yüzdesi

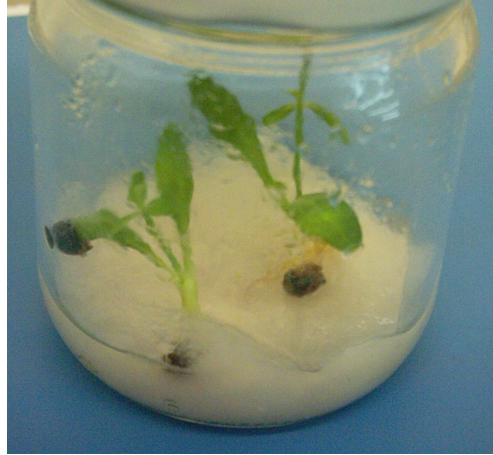
Çizelge 4.1.1. VII numaralı yöntemin yüzey sterilizasyonu basamakları

Uygulama Yeri	Uygulanan Kimyasal ve Süresi
Kabin Dışında	1/100 sabunlu su solüsyonu içinde 5 dk.
	1/10 Savlex solüsyonuiçinde 10 dk.
	3 defa çeşme suyu, 2 defa distile su
Kabin İçinde	Etil Alkolde 5dk.
	NaOCI' de 15 dk.
	Fungusit(0,25 g/ml) 2 dk.
	3 defa steril su

Çizelge 4.1.2 Üç lokasyondan toplanan tohumların MS'li ve sulu ortamlarda belirlenen çimlendirme oranları

<u>Lokasyon</u>	<u>Sulu pamuklu ortamda çimlendirmeye alınan tohum sayısı</u>	<u>Çimlenme %</u>	<u>MS'li pamuklu ortamda çimlendirmeye alınan tohum sayısı</u>	<u>Çimlenme %</u>
Karaali	294	54	270	61
Üçpınar	450	61	537	59
Selçikli	308	9	324	8

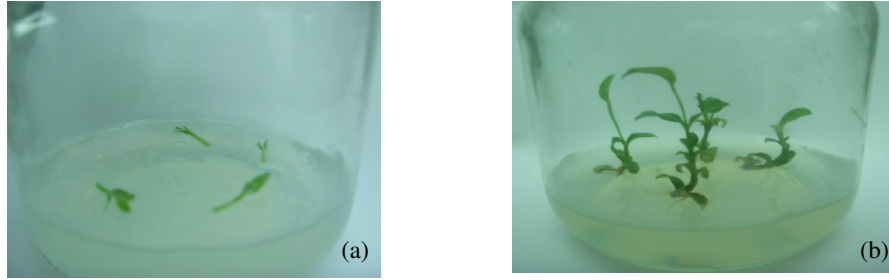
Steril edilen tohumların, agar ve sukroz içermeyen MS'li ve su ile ıslatılmış pamuklu ortamlar içeren kavanozlarda çimlendirilmeleri sonucunda çimlenme oranları arasında belirgin bir farklılık gözlenememiştir (Çizelge 4.1.2).



Şekil 4.1.2. *Rubia tinctorum* L. tohumlarında çimlenmeler

#### 4.2. Mikroçoğaltım

*Agrobacterium* ırkları ile inokulasyonları gerçekleştirmek üzere yeterli bitkisel materyallerin sağlanması amacıyla *in vitro*'da elde edilen steril bitkiciklerin mikroçoğaltımı için 0,5 mg/L IBA içeren MS besin ortamının (30 g/l sukroz, 7 g/l agar, pH=5.8) uygun olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.1). Nod aralarından kesilerek üretilen bitkiciklerin haftada bir nod verdikleri belirlenmiştir. En iyi mikroçoğaltım Karaali lokasyonundan elde edilen bitkiciklerde olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.2.1. *In vitro* koşullarda elde edilen kök boya bitkiciklerinin mikro çoğaltımları:

(a) Nod aralarından kesilmiş eksplantlar (b) Kesimden iki hafta sonra gelişen sürgünler

#### 4.3. Elde Edilen Saçaklı Kökler:

Transformasyon çalışmalarında, *Agrobacterium rhizogenes*'in 15834 ırkının nod eksplantlarıyla 30 dakika süreyle gerçekleştirilen inokulasyon sonucunda ve karanlık koşullarda sağlanan saçaklı kök oluşum oranı, en yüksek %61,2 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3.). Yaprak eksplantlarının inokulasyondan kısa süre sonra esmerleştikleri gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. *Agrobacterium rhizogenes* 8196, 15834, A4 ve R1000 ırklarının inokulasyon yapıldığı eksplantlara göre MS ortamında elde edilen saçaklı kök oluşum yüzdeleri

İrklar	Eksplant Tipi	İnokulasyon Yapılan Eksplant Sayısı			Saçaklı Kök Gözlenen Eksplant Sayısı			Eksplantlarda Saçaklı Kök Oluşumu				
		Tek I.	Tek II.	Tek III.	Tek I.	Tek II.	Tek III.	Yüzde			Ortalama X (%)	
								Tek I.	Tek II.	Tek III.		
8196	Yaprak	20	37	10	-	1	-	-	2,7	-	0,9	
	Nod	20	35	10	8	11	4	40.0	31,4	40.0	37,1	
15834	Yaprak	18	35	10	-	4	2	-	11,4	20.0	10,5	
	Nod	20	35	20	12	17	15	60.0	48,5	75.0	61,2	
A4	Yaprak	16	40	15	3	-	-	18,7	-	-	6,2	
	Nod	20	40	12	3	11	6	15.0	27,5	50.0	30,8	
R1000	Yaprak	20	40	15	2	5	3	10.0	12,5	20.0	14,1	
	Nod	20	40	20	10	22	11	50.0	55.0	55.0	53,3	

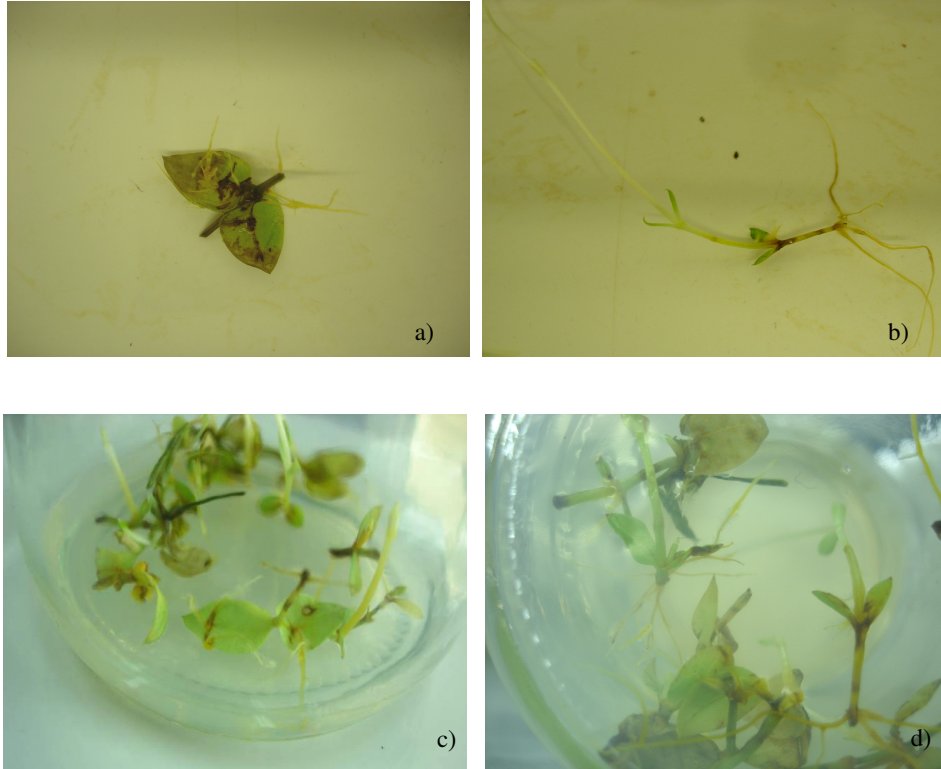
Arcsin transformasyonun uygulandığı veriler, basit faktöriyel tesadüf blokları deneme desenine göre değerlendirildiklerinde, *Agrobacterium* ırkları (F:6.132) ve eksplant tipleri (F:101.788) %1 seviyesinde istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. *Agrobacterium* ırkları x eksplant tipleri interaksyonunun ise her iki seviyede önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Buna göre, 15834 no'lu ırk saçaklı kök yüzdesi (%35.8) bakımından I. grupta; R1000 ırkı %33.5 ortalama değer ile II.grupta; 8196 ve A4 ırkları ise sırasıyla %19.0 ve %18.5 ile III. grupta yer almışlardır (LSD:15.658):

<u>Agrobacterium ırkları</u>	<u>Saçaklı Kök Yüzdesi</u>	<u>Sıralama</u>
15834	35.8	a I.grup
R1000	33.5	ab II.grup
8196	19.0	b III.grup
A4	18.5	b III.grup

Nod eksplantları, saçaklı köklerin oluşumu bakımından %45.5 ile I. Grupta yer alırken yaprak eksplantları ise %7.9 ile II. grubu oluşturmuştur (LSD: 11.072):

<u>Eksplant tipleri</u>	<u>Saçaklı Kök Yüzdesi</u>	<u>Sıralama</u>
Nod	45.5	a I. grup
Yaprak	7.9	b II. grup



Şekil 4.3. İnokulasyon sonucu yaralanan kısımlarda gözlenen saçaklı kökler

a) Yaprak eksplantında

b) Nod eksplantında

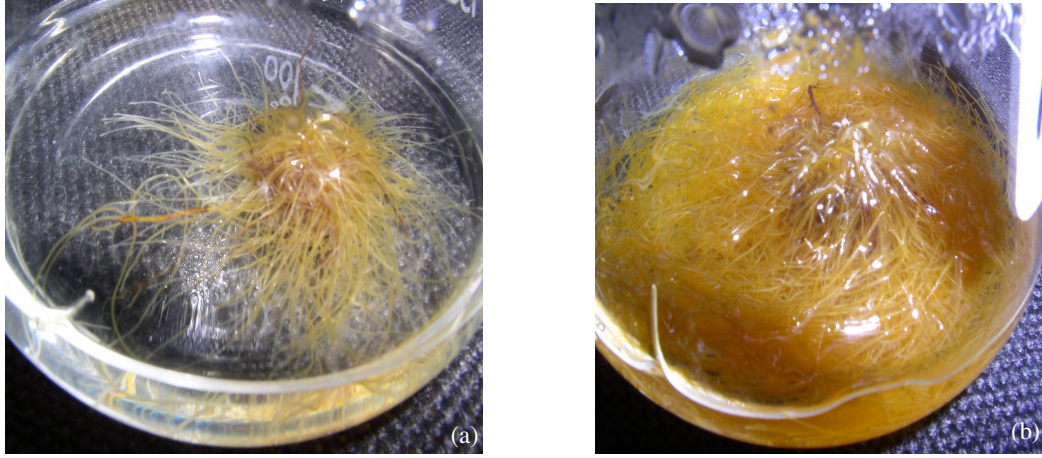
c) Çeşitli yaprak eksplantlarında

d) Çeşitli nod ekplantlarında

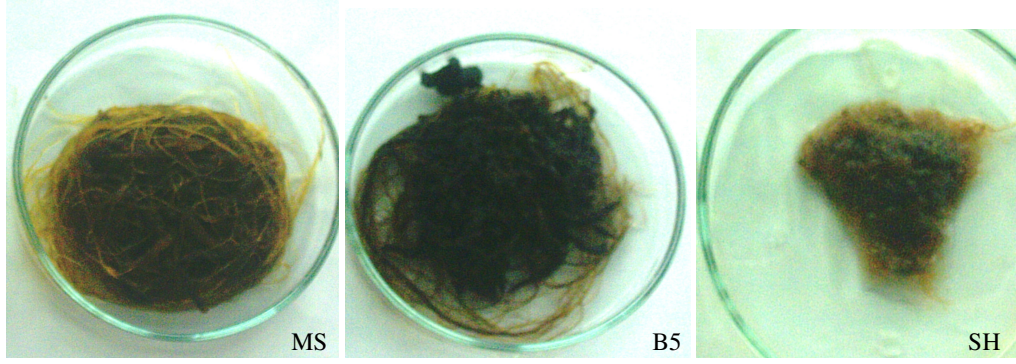
#### 4.4. Köklerin Sıvı Ortamlarda Kültüre Alınması

Saçaklı kökler kültürü alındıktan kısa süre sonra hızla gelişme göstermişlerdir (Şekil 4.4.1). Kullanılan sıvı MS, B5 ve SH kültür ortamlarından özellikle MS ortamından elde edilen köklerin altın sarısı renginde, B5 ortamında üretilen köklerin ise kırmızı renkte oldukları ve ortam rengini de kırmızılaştırdıkları gözlenmiştir (Şekil 4.4.2). SH ortamına ait köklerin ise sarımsı ve ince yapıda oldukları saptanmıştır.

B



Şekil 4.4.1. (a) MS sıvı ortam içerisinde kültüre alınan saçaklı kökler; (b) gelişmiş saçaklı kökler



Şekil 4.4.2. Farklı sıvı ortamlarda (MS, B5, SH) yetiştirilen saçaklı kökler  
ve ortamlardaki renk değişimleri



#### 4.5. Transformasyonun Doğrulanması

**4.5.1. Opın Analizi:** Opın analizinde metodun oturtulması için mannopin standardı kullanılmıştır. Mannopin tipi bakterilerin inokulasyonundan oluşan saçaklı köklerde analizler yapılmıştır. Kullanılan analizde, elektroforez esnasında oluşan ısı nedeniyle opınler net olarak belirlenememiştir.

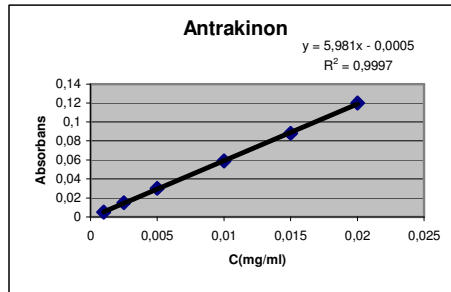
**4.5.2. PCR Analizi:** PCR analizi için ODTÜ Kimya Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında çalışılmıştır. Elde edilen saçaklı köklerden ve normal köklerden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Belirlenen primerler ile PCR çalışmaları yapılmıştır. Ancak, metodun oturtulması için çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir.

**4.5.3. Morfoloji:** Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen kültür ortamlarında transforme köklerin, daha hızlı, yoğun plagiotrop gelişme göstermeleriyle kontrol bitkilere ait köklerden morfolojik olarak farklı oldukları gözlenmiştir.

#### 4.6. Saçaklı Köklerde Bulunan Sekonder Metabolit Analizleri

##### 4.6.1. Spektrofotometre Yöntemi

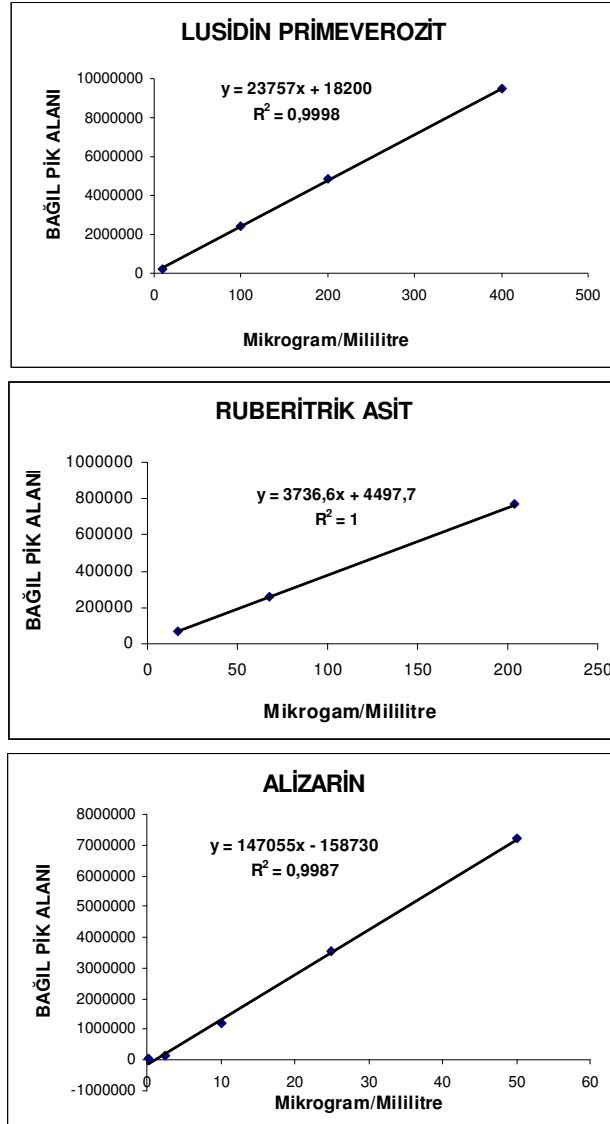
Spektrofotometre analizleri sonucu kök boya bitkisinin *Agrobacterium rhizogenes*'in A4 irkı ile inokulasyonu sonucu elde edilen saçaklı köklerdeki alizarin miktarı 6,4 µg/ml; 15834 irkı ile inokulasyonu sonucu elde edilen saçaklı köklerdeki alizarin miktarı 9,8 µg/ml bulunurken, doğadan toplanan köke ait alizarin miktarı 27,2 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6.1).



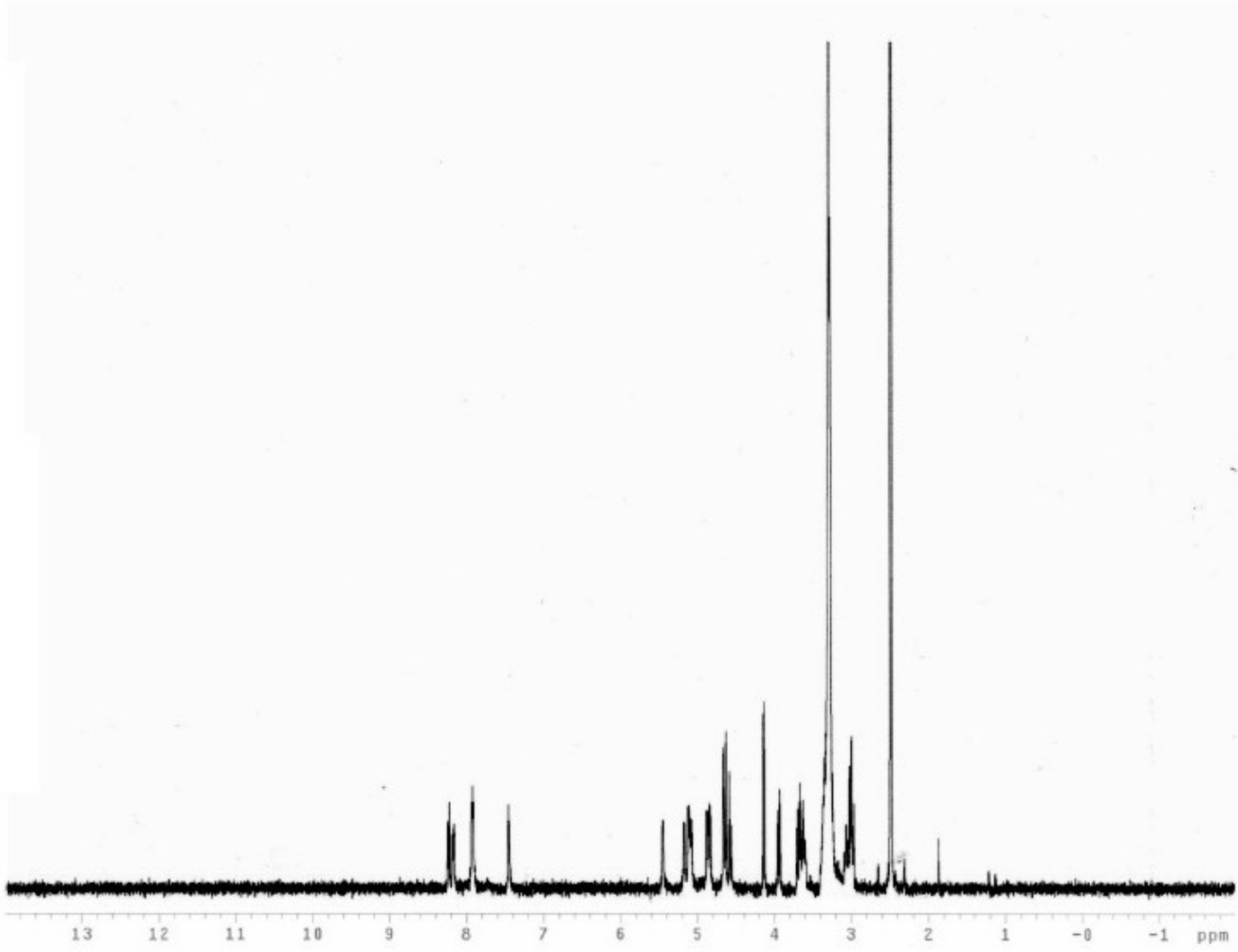
Şekil 4.6.1. Alizarin kalibrasyon eğrisi

#### 4.6.2. HPLC Yöntemi

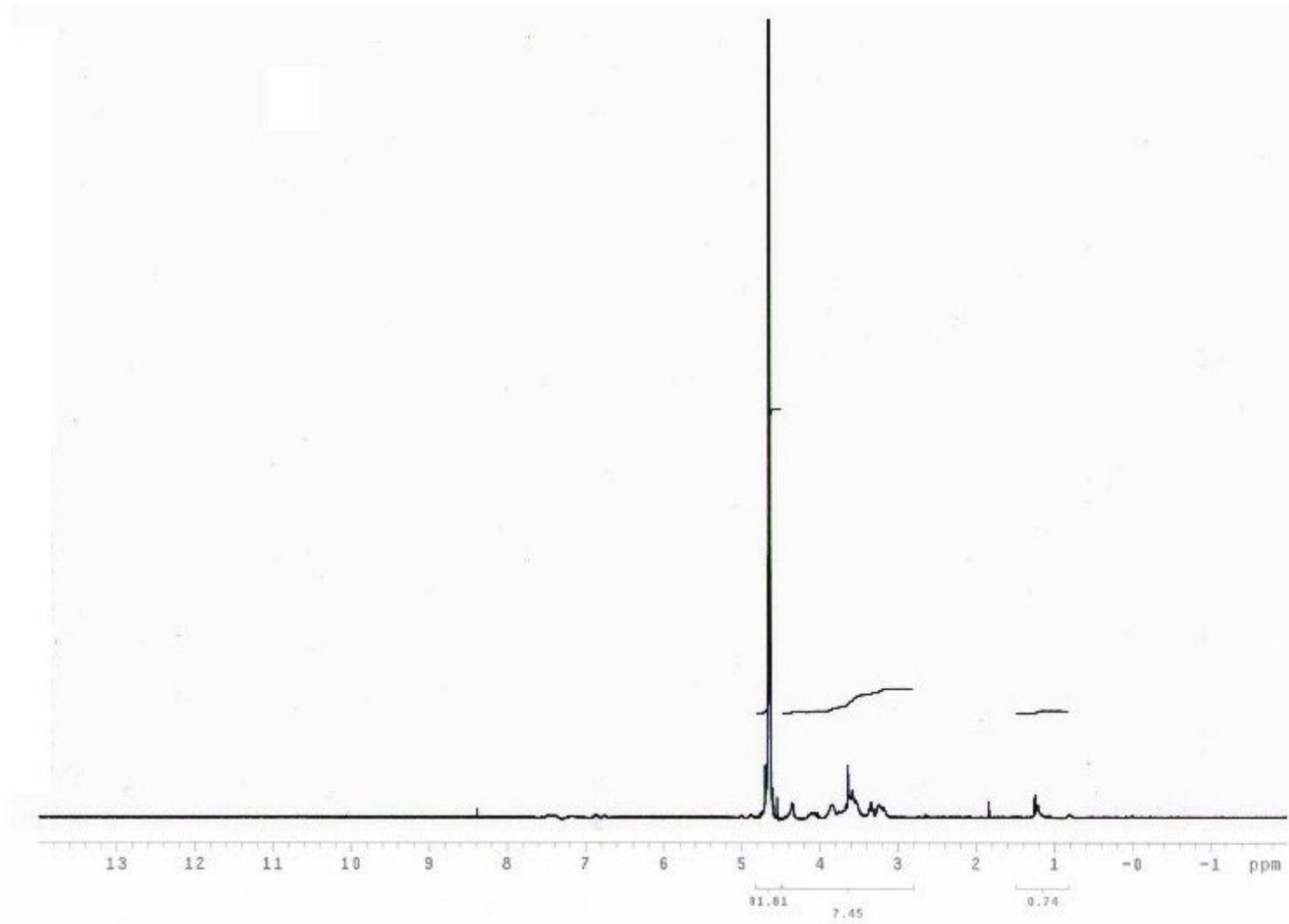
Referans bileşiklerin elde edilmesi amacı ile doğadan toplanan kök boya bitkisine ait köklerden Lusidin primeverozit ve Ruberitrik asit antrakınon bileşikleri izole edilmiş, NMR analizi ile doğrulanmaları yapılmıştır (Şekil 4.6.2.2; 4.6.2.3). Daha sonra HPLC’de bu standart bileşiklere ait kalibrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Lusidin primeverozit için  $R^2=0,9997$ , Ruberitrik asit  $R^2=1$  olarak tespit edilmiştir. Sonradan elde edilen Alizarin için  $R^2 =0,9987$  kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.6.2.1).



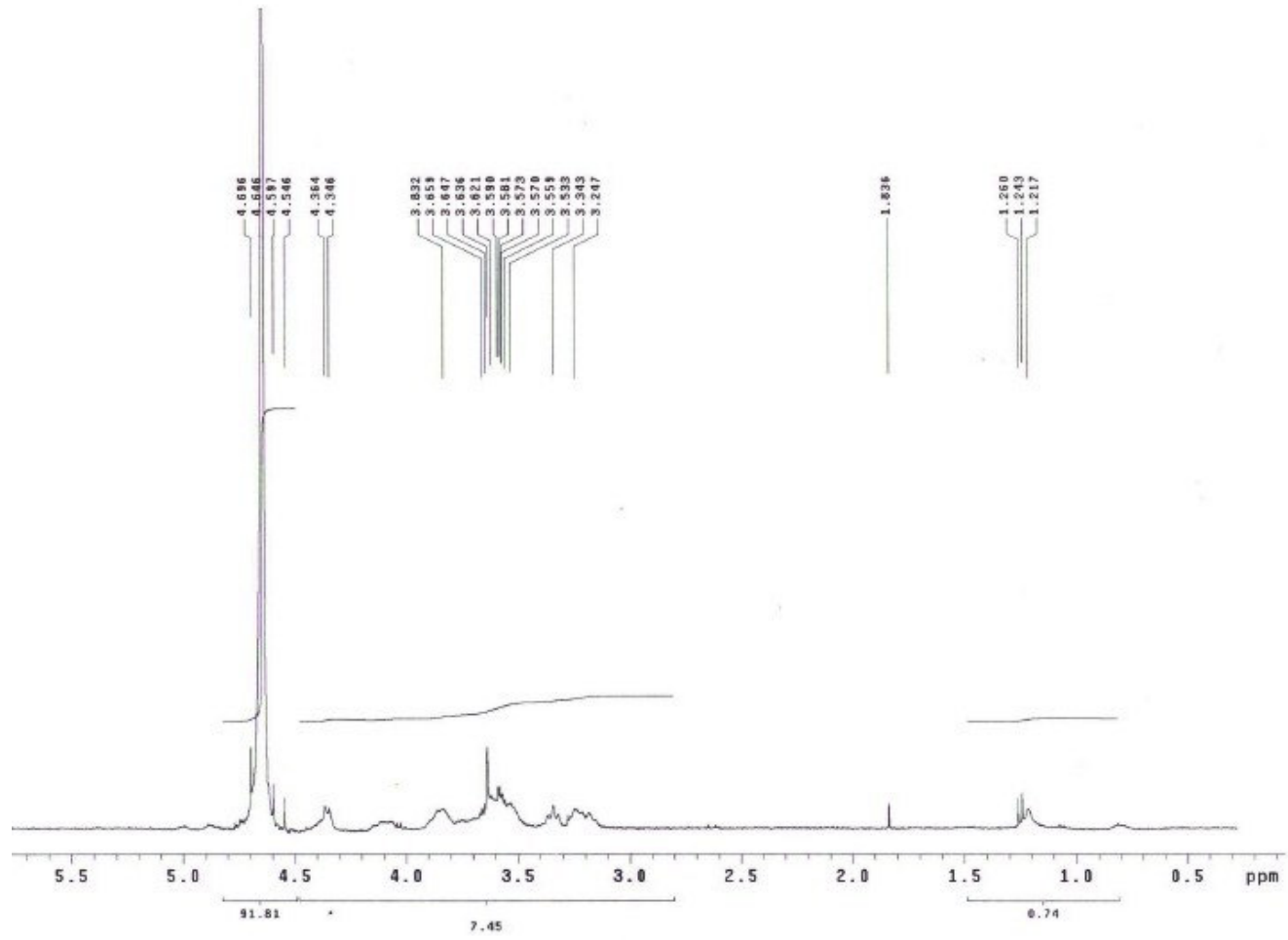
Şekil 4.6.2.1 254nm’de Lusidin primeverozit, Ruberitrik asit, Alizarin Bağıl PİK Alanı-Derişim Kalibrasyon Grafikleri



Şekil 4.6.2.2. Lusine Primeverozit <sup>1</sup>H NMR Spektrumu



Şekil 4.6.2.3. Ruberitrik asit <sup>1</sup>H NMR spektrumu (1)



Şekil 4.6.2.3. Ruberitrik asit <sup>1</sup>H NMR spektrumu (2)

#### 4.6.2.1. Sıvı MS, B5, SH Ortamlarında Kültüre Alınan Saçaklı Köklerdeki Sekonder Metabolitler

Elde edilen saçaklı köklerin sıvı MS, SH, B5 ortamlarındaki gelişmeleri ve antrakinin miktarları incelenmiştir. Lusidin primeverozit miktarları MS ortamında gelişen saçaklı köklerde 2.7mg/g, SH ortamında 0.1mg/g olarak belirlenirken B5 ortamında ise bu metabolit gözlenmemiştir. Ruberitrik asit miktarı, MS ortamında gelişen köklerde 8.5 mg/g olarak belirlenmiş, SH ve B5 ortamlarında gelişen köklerde ise bu metabolit gözlenmemiştir (Çizelge 4.6.2.1).

Çizelge 4.6.2.1. Sıvı MS, B5, SH ortamlarında kültüre alınan saçaklı köklerdeki antrakinin miktarları (mg/g, µg/ml)

	Lusidin primeverozit	Ruberitrik asit
<b>MS</b>	2.7 mg/g, 2,213 µg/ml	8.5 mg/g, 2,183 µg/ml
<b>B5</b>	-	-
<b>SH</b>	0.1 mg/g, 0,0069 µg/ml	-

#### 4.6.2.2. Farklı Irklar Kullanılarak Oluşturulan Saçaklı Köklerin Sıvı MS Ortamında Kültüre Alınmaları ile Elde Edilen Sekonder Metabolitler

Karaali lokasyonundan elde edilen bitkiciklere *Agrobacterium rhizogenes*; A4, R1000, 8196 ırkları ile inokule edilen kökler sıvı MS (30 g/l sukroz, pH=5.8) ortamında kültüre alınmışlardır (Çizelge 4.6.2.2). 8196 ırkı ile yapılan inokulasyon sonucu elde edilen köklerdeki lusidin primeverozit miktarı 0.95 mg/g; ruberitrik asit miktarı 6.2 mg/g; alizarin miktarı 0.067 mg/g olarak, R1000 ırkı ile yapılan inokulasyon ile elde edilen köklerdeki lusidin primeverozit miktarı 1.13 mg/g; ruberitrik asit miktarı 8.4 mg/g; alizarin miktarı ise 0.072 mg/g olarak, A4 ırkı ile yapılan inokulasyon sonucu elde edilen köklerdeki ruberitrik asit miktarı 0.0034 mg/g, alizarin miktarı 0.14 mg/g olarak belirlenmiştir. A4 ırkı ile yapılan inokulasyon sonucunda oluşan köklerde lusidin primeverozit görülmemiştir. Araştırmanın bu bölümünde, 15834 no'lu ırkla elde edilen saçaklı kökler, ekstraksiyon işlemi esnasında tüpün kırılması nedeniyle değerlendirilmeye alınamamıştır.

Çizelge 4.6.2.2. A4, R1000, 8196 ırkları ile inokulasyon sonucu elde edilen saçaklı köklerdeki antrakinin miktarları (mg/g)

	Lusidin primeverozit	Ruberitrik asit	Alizarin
<b>8196</b>	0.95 mg/g	6.2 mg/g	0.067 mg/g
<b>R1000</b>	1.13 mg/g	8.4 mg/g	0.072 mg/g
<b>A4</b>	-	0.034 mg/g	0.14 mg/g

#### 4.6.2.3. Sukroz ve Elisitör Eklenen Sıvı B5 Ortamlarında Kültüre Alınan Saçaklı Köklerdeki Sekonder Metabolitler

Sukroz ve elisitör madde etkisini görebilmek için 120g sukroz ilave edilmiş metil jasmonat (MeJA) içermeyen B5 ortamında (B5S) lusidin primeverozit miktarı kuru saçaklı kökte 13.45 mg/g; ruberitrik asit 93.2 mg/g; alizarin 0.78 mg/g olarak belirlenmiştir. 0.1µM Metil jasmonat ve 120 gr sukroz içeren B5 ortamında (B5SMeJA) lusidin primeverozit miktarı 12.31 mg/g; ruberitrik asit 86.8 mg/g, alizarin 0.11 mg/g olarak belirlenmiştir. Doğadan toplanan kökte ise bu değerler lusidin primeverozit miktarı 19.4 mg/g; ruberitrik asit 174.9 mg/g; alizarin 0.14 mg/g olarak saptanmıştır (Çizelge 4.6.2.3).

Çizelge 4.6.2.3. Elisitör içeren ve içermeyen sukrozlu B5 ortamlarında kültüre alınan saçaklı köklerdeki antrakinon miktarları (mg/g)

	<b>Lusidin primeverozit</b>	<b>Ruberitrik asit</b>	<b>Alizarin</b>
<b>B5S Ortamı</b>	13.45 mg/g	93.2 mg/g	0.78 mg/g
<b>B5SMeJA Ortamı</b>	12.31 mg/g	86.8 mg/g	0.11 mg/g
<b>Doğadan Toplanan Kök</b>	19.4 mg/g	174.9 mg/g	0.14 mg/g

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anadolu'nun hemen her tarafında yetişebilen *Rubia tinctorum* L. (kök boya) bitkisinin en iyi ve en ünlüsü geçmiş zamanlarda Kırkağaç yakınındaki Bakır Kasabası'nda üretilmiştir. Ayrıca, Manisa, Akhisar ve Gelenbe'de yetiştirilen kök boya bitkileri de iyiler arasında yer almıştır (Baykara, 1993). Çalışmamızda materyal olarak kullanılan *Rubia tinctorum* tohumları bu bilgilere dayanılarak Manisa'dan toplanmıştır.

Bitki doku kültürü çalışmalarında aşılması gereken en önemli sorunlardan biri bitkinin steril olarak yetiştirilmesidir. Bunun için bitki tohumu ya da eksplantı çeşitli sterilizasyon işlemlerinden geçirilmelidir. Kullanılacak olan sterilant maddenin cinsi, konsantrasyonu ve uygulama süresi sterilizasyonun başarısını etkilemektedir (Babaoğlu ve ark., 2001). Çalışmamızda tohumdan steril bitki elde edilmesi esas alınmıştır. Çoğunlukla uygulanan etil alkol, sodyum hipoklorit basamaklarına ek olarak *Rubia tinctorum* tohumlarının, önce 1/100 sabunlu su solüsyonu içinde 5 dk., daha sonra ise 1/10 (v/v) savlex solüsyonu içinde 10 dk. ve 0,25 g/ml fungusit içerisinde 2 dk. bekletilmesi olumlu sonuçlar vermiştir.

Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da mikrospor vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanan mikroçoğaltım ile çevresel faktörlerden bağımsız olarak bitkisel materyalin kısa sürede, çok miktarda, sağlıklı ve klonal olarak üretilmesi sağlanır. Bu yöntem özellikle ticari bitkilerin, endemik ya da çoğaltılması zor olan bitkilerin üretiminde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun için bitkinin uygun besin maddesi, hormon ve kültür isteklerinin bilinmesi gerekmektedir (Babaoğlu ve ark., 2001). Ercan ve ark. 1996 yılında *R. tinctorum* ile yaptıkları mikroçoğaltım çalışmalarında, gövde, nod ve yapraklardan aldıkları eksplantlardan doku kültürü ile yeni bitkicikler oluşturmaya çalışmışlar ve nodlara göre yaprak dokularının organogenez yeteneğinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda yaprakların uzaklaştırılarak nod aralarından kesilen materyalin 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamında hafta da bir nod oluşturdukları belirlenmesi bu bitkinin etkin biçimde mikroçoğaltım ile üretilbileceğini göstermiştir.

Literatürlerde farklı ırkların her bitki türü için farklı transformasyon etkinliği gösterdiği bildirilmiştir. (Giri ve ark., 2001). Tez araştırmasında dört farklı *A. rhizogenes* ırkı (15834, A4, 8196, R1000) kullanılmıştır. İnokulasyon sonucunda nod eksplantlarında gözlenen en yüksek saçaklı kök oluşum oranı 15834 ırkı ile %61.2 oranında elde edilirken, R1000, 8196 ve A4 ırklarında bu oranlar sırasıyla %53.3, %37.1, %30.8 olarak belirlenmiştir. Ercan ve ark. 1999, çalışmalarında *R. tinctorum* bitkisini 15834, R1000, 9365 ve 2628 ırkları ile inokule etmişler ve



15834 ırkını en yüksek virulent ırk olarak belirlemişlerdir (Ercan ve ark.,1999). Yaprak ve nod eksplantlarından elde edilen saçaklı kök yüzde ortalama değerler bakımından da *A. rhizogenes* ırklarından 15834 ırkı en yüksek değeri vermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre bizim kullandığımız 4 ırk içerisinde 15834 ırkının en yüksek transformasyon etkinliği göstermesi bu çalışmalarla uyumludur.

Transformasyon için uygun ırkın belirlenmesinin yanısıra inokulasyon yapılan bitki dokusu seçiminin özellikle transformasyona inatçı bitki türlerinde başarı elde etmek için önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Özcan ve ark., 2001). Yaprak ve hipokotil eksplantlarına yapılan inokulasyonlar sonucunda, saçaklı kök oluşum oranları; nod eksplantlarında ortalama %45,475, yaprak eksplantlarında ise ortalama %7,948 olarak belirlenmiştir. *R.tinctorum* bitkisinin son derece küçük yapraklara sahip olması nedeniyle, yaprak eksplantları inokulasyondan kısa bir süre sonra karamıştır. Bu sonuç yapraklardaki saçaklı kök oluşum oranını düşürmüştür.

Sekonder metabolit analizleri için ilk olarak spektrofotometre metodu kullanılmış daha sonra HPLC yöntemine başvurulmuştur. Ticari olarak bulunamayan bileşiklerin eldesi için doğadan toplanmış köklerde ekstraksiyon ve kolon kromatografileri yapılmış, lusidin primeverozit ve ruberitrik asit antrakınonları izole edilmiştir.

*Agrobacterium rhizogenes* ırklarının sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkisinin farklı olduğu belirtilmektedir (Giri ve ark., 2001). Araştırmamızda spektrofotometre yöntemi ile saçaklı köklerde bulunan alizarin miktarı *A. rhizogenes* 15834 ırkı ile 9,8 µg/ml, A4 ırkı ile 6,4 µg/ml olarak belirlenmiştir. Doğadan toplanan köklerde alizarin miktarı 27,2 µg/ml olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar Ercan ve ark., (1999) ve Kuzovkina ve ark., (1996)'na ait bulgularla uyum içerisindedir. Burada doğadaki bitkilerin çok yıllık olması bu sonucun elde edilmesinde önemlidir. Ancak uygun koşulların belirlenmesi saçaklı köklerdeki sekonder metabolit içeriklerini arttırmada zorunlu bir husustur.

Karaali lokasyonundan elde edilen materyallere 4 farklı ırk ile uygulanan inokulasyon sonucunda elde edilen saçaklı kökler sıvı MS ortamında kültüre alındıklarında antrakınon miktarları; R1000 ırkı ile lusidin primeverozit 1.13 mg/g; ruberitrik asit 8.4 mg/g; alizarin 0.072 mg/g , 8196 ırkı ile lusidin primeverozit 0.95 mg/g; ruberitrik asit 6.2 mg/g; alizarin 0.067 mg/g , A4 ırkı ile ruberitrik asit 0.0034 mg/g, alizarin 0.14 mg/g olarak belirlenmiştir. Araştırma bulgularına dayanılarak en yüksek antrakınon miktarlarının R1000 ırkıyla elde edildiği saptanmıştır.

Köklerin gelişimi ve sekonder metabolit üretimini arttırabilmek için sıvı MS, B5 ve SH ortamları ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. En iyi gelişmeler, MS ortamında kültüre alınan köklerde gözlenmiştir. SH ortamında ise köklerin ince yapıda oldukları belirlenmiştir. B5 ortamda gelişen köklerin ve besin ortamının kırmızı renkte olduğu gözlenmiştir. B5 köklerinde ve besin ortamında gözlenen kırmızılığın alizarin antrakininonundan kaynaklandığı düşünülmektedir ki daha sonraki çalışmalarda yüksek miktarda alizarin bu ortamda gelişen köklerde belirlenmiştir. Genellikle nitrat/amonyum oranı 1:1 olmakla beraber, bu oranın değiştirilmesi ile bir çok sekonder metabolitin *in vitro* üretilmesinde azalış veya artışa rastlanmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001). Kuzovkina ve ark. 1996 yılında yaptıkları çalışmalarında, köklerde kırmızı renk oluşumunu gözlemişler, B5 ortamında bulunan nitrat azot miktarının amonyum azotundan 10 kat fazla olmasının sekonder metabolit sentezini etkileyebileceğini ifade etmişlerdir. Bu farklılığın sekonder metabolit biyosentezinin araştırmada iyi bir model sistem olarak kullanılabilirliği de aynı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Çalışmamızda lusidin primeverozit miktarları MS ortamında gelişen saçaklı köklerde 2.7 mg/g, SH ortamında 0.1mg/g olarak belirlenirken B5 ortamında ise bu metabolit gözlenmemiştir. Ruberitrik asit miktarı, MS ortamında gelişen köklerde 8.5 mg/g olarak belirlenmiş, SH ve B5 ortamlarında gelişen köklerde ise bu metabolit gözlenememiştir.

Sukroz ve elisitör maddelerin sekonder metabolit üretimindeki etkilerini görebilmek için saçaklı kökler, 120 g sukroz ilave edilmiş 0.1µM metil jasmonat (MeJA) içeren B5 (B5SMeJA) ortamlarında metil jasmonat içermeyen B5 (B5S) ortamlarına göre daha az oranda alizarin oluşturmuşlardır. Diğer bir ifade ile 120 g sukroz içeren B5 besin ortamına yapılan 0.1µM metil jasmonat ilavesi antrakininonların miktarını arttırmamıştır. Doğadan toplanan köke ait sekonder metabolit analizlerinde lusidin primeverozit ve ruberitrik asit içeriklerinin saçaklı köklere göre daha yüksek olduğu, bununla birlikte alizarin içeriğinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu da ümit verici bir durumdur. Ancak bu konunun daha detaylı ele alınması gerekmektedir.

Araştırmamızda transformasyonun belirlenmesinde morfolojik özelliklerden yararlanılmıştır. Köklerin yaralanan bölgelerde plagiotrop oluşması ve hızlı büyüme göstermeleri yardımcı olmuştur.

Bu araştırmada karşılaşılan sorunlar dikkate alındığında, bundan sonra gerçekleştirilecek araştırmalarda, aşağıda belirtilen bazı hususların oldukça kapsamlı ele alınması yerinde olacaktır.

İnokulasyon yapılacak materyalin yaşı ve tipi önemlidir. Genç dokulara uygulanan inokulasyon sonucunda saçaklı kök oluşumunun daha fazla olduğu gözlenmiştir. Yaprak, internod gibi daha narin yapıları eksplantların yaralama ya da inokulasyon esnasında nekroza uğradıkları ve öldükleri dikkati çekmiştir.

Saçaklı köklerin yüksek oranda elde edilebilecekleri ve daha iyi gelişebilecekleri besin ortamlarının ve bileşimlerinin de göz önüne alınması gereklidir.

Saçaklı köklerin sıvı ortamlara aktarılmasında kök/sıvı oranına dikkat edilmelidir. Kütleli olarak düşük miktarlarda elde edilen başlangıç saçak köklerin çalkalama ile havalanmalarının ve daha iyi gelişmelerinin sağlanması açısından önce az miktarda sıvı ortama ihtiyaç vardır. Ayrıca aydınlık ve karanlık; sıcaklık gibi kültür koşullarının da dikkate alınması gereklidir.

Transformasyonların doğrulanması için gerek opin analizlerinin ve gerekse de PCR analizlerinin daha detaylı ele alınması yerinde olacaktır.

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, *Rubia tinctorum* bitkisinin doku kültürü koşullarında hızlı olarak çoğaltılabileceğini, *Agrobacterium rhizogenes* bakterileri aracılığı ile saçaklı kök kültürlerinin oluşturulabileceğini göstermiştir. Ancak uygun bitki genotipi, eksplant kaynakları, besin ortamları, bakteri ırkları, inokulasyon koşulları, kültür koşulları ve transformasyonların doğrulanması için gerek opin analizlerinin ve gerekse de PCR analizlerinin daha detaylı ele alınması yerinde olacaktır. Sekonder metabolitlerin laboratuardaki küçük ölçekte oluşum mekanizma ve koşullarının belirlenmesini hedefleyen araştırmalardan sonra elde edilecek bulguların optimizasyonunun sağlanması ile de ileride biyoreaktör çalışmalarına katkıda bulunulacaktır.

## 6. KAYNAKLAR:

Açıkgöz, N., 1988. Tarımda Araştırma ve Deneme Metodları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 478, İzmir, 181-189.

Açıkgöz, N., Akkaş, E., Moghaddam, A., Özcan, K., 1994. Tarımsal Araştırmaların Değerlendirilmesi İçin Bir Pc Paketi. Tarist. Tarla Bitkileri Kongresi Tebliği, Bornova.

Angelini, L.G., Pistelli, L., Belloni, P., Bertoli, A., Panconesi, S., 1997. *Rubia tinctorum*: a source of natural dyes: agronomic evaluation, quantitative analysis of alizarin and industrial assays. Industrial Crops and Products, 6, 303-311.

Babaoğlu, M. Yorgancılar, M. A. Akbudak, 2001. Doku Kültürü: Temel Labortuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Uygulamaları (M. Babaoğlu, E.Gürel, S. Özcan),1-35, S. Ü. Vakfı Yayınları, Konya.

Bhagyalakshmi, N., Thimmaraju, R., Narayan, M.S., 2004. Various hexoses and di-hexoses differently influence growth, morphology and pigment synthesis in transformed root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 78: 183–195.

Başlar, S., Ofas, S., 1996. Morfological and ecological investigation on *Rubia tinctorum* L. Distributed in Manisa-Demirci and its environs. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 33: 155-162.

Baykara, T., 1993. Kök Boya. <http://www.akmb.gov.tr/turkce/books/aris%204/>.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161, (5), 839-851.

Chawla, H.S., 2002. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publisher, Inc., Enfield, NH, USA: 16-17, India.

Chen, H.D., Liu, C.J., Ye, H.C.;Li, G.F., Liu, B.Y., Meng, Y.L., Chen, X.Y., 1999. Ri-mediated transformation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 57: 157–162.

Davis, P.H., 1982. Flora of Turkey.Vol:7, Edinburg.

Deli, Ö., 2004. *Rubia tinctorum* L. (Kök Boya) Bitkisinin Kök Dokularından Kallus Üretimi, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Derksen, C.H., 1998. High-performance liquid chromatographic method for the analysis of anthraquinone glycosides and aglycones in madder root (*Rubia tinctorum* L.). Journal of Chromatography A., 816, 277-281.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 13-15.

Emiroğlu, Ü., Gürel, A., 1999. Transforme saçaklı kökler ve sekonder metabolitlerin üretimi. Tarımda Biyoteknoloji, Ebiltem- İzmir, 12-16 Nisan.

Enez, N., 1989. Doğal Boyamacılık. Marmara Üniversitesi Yayın No:449, İstanbul.

Ercan, A.G., 1996. Kök Boyası (*Rubia tinctorum* L.) bitkisinin *in vitro* koşullarda rejenerasyon yeteneğinin araştırılması. Akdeniz Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

Ercan, A.G., Taşkın, K.M., Turgut, K.,M., Yüce, S., 1999. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. Tr. J. of Botany, 23, 373-377.

Ercan, A.G., Yüce, S., Turgut, K., 1997. An investigation on *in vitro* regeneration ability of madder (*Rubia tinctorum* L.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 21:5, 487-491.

Gamborg, O.L., Muller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of a suspension culture of soybean root cells. Exp.Cell Res., V.50, 1: 151-158.

Giri, A., Narasu, L. M., 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances, 18: 1–22.

Giri, A., Ravindra, T., Dhingra, V., Narasu, L., 2001. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. Current Science, 81:4

Golds, T. J., Devey M. R., Rech E. L., Power J. B., 1990. Methods of gene transfer and analysis in higher plant. Plant Cell and Tissue Culture. Vol:6, Humana Pres, New Jersey.

Gundlach, H., Muller, J.M., Kuthan, T.M., Zenk, M.H.,1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell cultures. Plant Biology, 89: 2389-2393.

Gürel, A., Bedir, E., Hayta, Ş., Nartop, P., Çetin, B., Akgün, İ.H., 2006. Bitki Hücre Kültürleri ile Sekonder Metabolit Analizleri. Uygulamalı Eğitim Kursu, E.Ü. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, 14-16 Haziran, İzmir.

Hasançebi S.,2003. *Astragalus chrysochlorus*'da Doku Kültürü Ve Transformasyon Çalışmaları. İstanbul Üniversitesi, Doktora tezi.

Hammond, J., 2000. Overview: The many uses and applications of transgenic plants. *Plant Biotechnology New Products and Applications*, 1-15, Springer, Verlag- Berlin.

Han, Y. S., Heijden V., Verpoorte R., 2001. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 201-220.

Hu, Z., Du, M., 2006. Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48 (2): 121–127.

Hunter, C., Neill, S., 1990. Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* and growth of hairy roots in vitro. *Methods in Molecular Biology*, 6: 279-288.

Kalyoncu, F., Çetin, B., Sağlam, H., 2006. Antimicrobial Activity of Common Madder (*Rubia tinctorum* L.). *Phytotherapy Research*, 20:490-492.

Kim, Y.,E. Wyslouzil, B.E., Weathers, P., 2002. Secondary Metabolism of Hairy Root Cultures in Bioreactors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38:1-10.

Kittipongpatana, N., Hock, S.R., Porter, J.R., 1998. Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 133–143.

Krizsan, K., Szokan, G., Toth, Z.A., Hollosy, F., Laszlo, M., Khlafulla, A., 1996. HPLC Analysis of anthraquinone derivatives in madder root (*Rubia tinctorum* L.) and its cell cultures. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19: 14, 2295-2314.

Kuzovkina, IN., Mantrrova, OV., Terman, IE., Yakimov, SA, 1996. Culture of genetically transformed hairy roots derived from anthraquinone producing European madder plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 43: 2, 252-258.

Manojlovic, N.T., Solujic, S., Sukdolak, M., Milosev, M., 2005. Antifungal activity of *Rubia tinctorum* *Rhamus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia*, 76,244-246.

Meral, G., Karamenderes, C., 2001. Cultivation and extraction of natural dyes for industrial use in natural textile production and pharmaceutical applications. *Workshop on Agricultural and Quality Aspects of Medicinal and Aromatic Plants*, May 29-June 01, Adana- Turkey.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, V.15, 3: 473-497.

Norton, SA., 1998. Useful plants of dermatology. IV. alizarin red and madder. *Plants of economic importance general. Journal of the American Academy of Dermatology*, 39:3,484-485.

Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi. Bitki Biyoteknolojisi, Gen Teknolojisi ve Uygulamaları (S.Özcan, E.Gürel, M.Babaoğlu), 112-159S.Ü.Vakfı Yayınları, Konya.

Pettit, A., David, C., Dahl, A.G., Ellis, G.J., Guyon, P., Casse-Delbart F.,Tepme, J., 1983. Future extention of the opine concept: plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. Mol. Gen. Genetics, 190:204-214.

Ramachandra, R., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, V 20, (2) , 101-153.

Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J. M., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlender, B., 2002. Plant and human health in the twenty-first century. Trends in Biotechnology, 20 (12):522-531.

Sato, K.,Yamakazi, T., Okuyama, E., Yoshiria, K., Shimomura, K., 1991. Antraqionone Production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum* : influence of phytohormones and sucrose concentration. Phytochemistry, V 30, N:5, 1507-1509.

Schenk, RU, Hildebrandt, AC., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Can.J.Bot., 50: 199-204.

Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat L., Leblebici E., 1998. Tohumuz Bitkiler Sistematigi Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:116, İzmir.

Shanks, V. J., Morgan, J., 1999. Current Opinion in Biotechnology. Plant "hairy root" culture, V:10, 151-155.

Smeekens, S., 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.51: 49-81.

Sökmen, A., Gürel, E., 2001. Sekonder Metabolit Üretimi, Bitki Biyoteknolojisi. Doku Kültürü ve Uygulamaları, (M. Babaoğlu, E.Gürel, S. Özcan), 211-261,S.Ü.Vakfı Yayınları, Konya.

Tolonen, A., 2003.Analysis of Secondary Metabolites in Plant and Cell Culture Tissue of *Hypericum perforatum* L. and *Rhodiola rosea* L. Qulu Üniversitesi, Doktora Tezi.

Verpoorte, R., Memelink, J., 2002 .Engineering secondary metabolite production in plants. Current Opinion in Biotechnology, V 13 (2), 181-187

Vetter, A., Wurl, G., Biertumpfel, A., 1997. Selection of dye plants suitable for cultivation in Central Europe. Zeitschrift- fur-Arznei- and- Gewurzpflanzen, 2:4,186-192.

Zarate, R., Yeoman, M. M., 2003. Application of Recombinant DNA Technology to Studies on Plant Secondary Metabolism. Festschrift Neumann, 07.

URL Adresleri:

[www.diet-pills-24h.com](http://www.diet-pills-24h.com)

[www.joyofhandspinnig.com](http://www.joyofhandspinnig.com)

[www.nature.com/nature/journal/v433/n7026/fig\\_tab/433583a\\_F2.html](http://www.nature.com/nature/journal/v433/n7026/fig_tab/433583a_F2.html)

[www.rsa.org.uk](http://www.rsa.org.uk)

[www.3.uci.edu](http://www.3.uci.edu)

[www.wovelegens.com/rubia.htm](http://www.wovelegens.com/rubia.htm)



## ÖZGEÇMİŞ

### BURCU ÇETİN

**Doğum yeri ve tarihi** : Elazığ, 21.02.1977

**Medeni Hali** : Evli, Bir çocuk annesi

**Adres** : Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Muradiye-MANİSA

**Telefon** : İş: (236) 241 21 51 - Cep: (505) 293 10 28 - Fax : (236) 241 21 58

#### **Eğitim:**

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1997, İzmir

Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı, 2001,  
Manisa

Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Doktora Programı, 2001- Manisa