

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Echinacea purpurea (L.) Moench'da *Agrobacterium rhizogenes*
Kullanımı ve Bazı Dışsal Uygulamalarla Sekonder Metabolit
Üretiminin Artırılması

Tunhan DEMİRCİ

Danışman
Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

DOKTORA TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2017



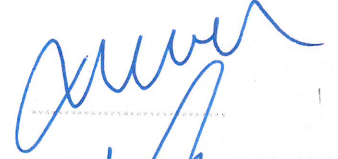
© 2017 [Tunhan DEMİRCİ]

TEZ ONAYI

Tunhan DEMİRCİ tarafından hazırlanan "*Echinacea purpurea* (L.) Moench'da *Agrobacterium rhizogenes* Kullanımı ve Bazı Dışsal Uygulamalarla Sekonder Metabolit Üretiminin Artırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Olcay ARABACI
Adnan Menderes Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Bekir ŞAN
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN
Akdeniz Üniversitesi



Enstitü Müdürü

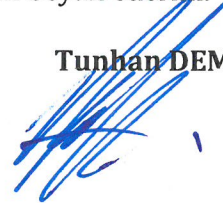
Prof. Dr. Yasin TUNCER

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Tunhan DEMİRCİ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. <i>Echinacea purpurea</i> Bitkisinin Botanik Özellikleri	5
2.2. <i>Echinacea purpurea</i> Bitkisinin Tıbbi ve Ekonomik Önemi	6
2.3. <i>Echinacea purpurea</i> Bitkisinde Bulunan Sekonder Metabolitler	9
2.4. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ve Saçak Kök Kültürleri	13
2.5. Kök Kaynaklı Sekonder Metabolitlerin Üretiminde <i>In vitro</i> Tekniklerin Avantajları	21
2.6. <i>In Vitro</i> Koşullarda Kök Kaynaklı Sekonder Metabolit Üretiminin Artırılmasında Kullanılan Dışsal Uygulamalar.....	22
2.7. Brassinosteroidler	28
2.8. L-Fenilalanin.....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. Materyal	35
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirilmesi	35
3.2.2. <i>A. rhizogenes</i> suşuna ait bakterilerin çoğaltılması ve inokülasyonu.....	37
3.2.3. Bitki eksplantlarının <i>A. rhizogenes</i> ile inokülasyonu ve saçak köklerin oluşturulması.....	39
3.2.4. Southern Blot Analizi	43
3.2.5. Saçak köklerin çoğaltılması	46
3.2.6. 24-eBL ve L-Fenilalanin uygulamaları	46
3.2.7. Fiziksel özelliklerin belirlenmesi	48
3.2.8. Kök ekstraktlarının hazırlanması.....	49
3.2.9. Toplam fenolik madde analizi	49
3.2.10. Toplam flavonoid miktarı	49
3.2.11. Kafeik asit türevlerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'nde belirlenmesi.....	50
3.2.12. İstatistik analiz.....	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	51
4.1. Yüzey Sterilizasyon Yöntemleri ve Çimlendirme Ortamlarına İlişkin Bulgular	51
4.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATCC 43057 Suşunun Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular	52
4.3. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ile Yapılan Transformasyon ve Saçak Kök Oluşturma Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	52
4.4. Southern Blot Analizine İlişkin Bulgular	54

4.5. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Hasat Sonrası Yaş Ağırlıkları Üzerine Etkileri.....	56
4.6. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Hasat Sonrası Kuru Ağırlıkları Üzerine Etkileri.....	57
4.7. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Kuru Madde Oranları Üzerine Etkileri	59
4.8. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Kök Büyüme İndeksleri Üzerine Etkileri.....	60
4.9. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Toplam Fenolik Madde Miktarları Üzerine Etkileri	62
4.10. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Toplam Flavonoid Miktarları Üzerine Etkileri.....	63
4.11. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Kafeik Türevlerinin Miktarları Üzerine Etkileri	65
4.11.1. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin klorojenik asit miktarları üzerine etkileri.....	65
4.11.2. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin klorojenik asit miktarları üzerine etkileri.....	67
4.11.3. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin kaftarik asit miktarları üzerine etkileri.....	68
4.11.4. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin ekinakozit miktarları üzerine etkileri.....	70
4.11.5. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin <i>p</i> -kumarik asit miktarları üzerine etkileri.....	72
4.11.6. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin <i>o</i> -kumarik miktarları üzerine etkileri.....	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ.....	112

ÖZET

Doktora Tezi

***Echinacea purpurea* (L.) MOENCH'DA *Agrobacterium rhizogenes* KULLANIMI VE BAZI DIŞSAL UYGULAMALARLA SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİNİN ARTIRILMASI**

Tunhan DEMİRCİ

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

Bu araştırma *Agrobacterium rhizogenes* aracılığıyla elde edilen *Echinacea purpurea* türüne ait saçak köklere uygulanan 24-epibrasinolid (24-eBL) ile L-fenil alanin (FA) uygulamalarının kök gelişimi ve kafeik asit türevlerinin birikimi üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı dozlarda 24-eBL (0.5, 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹) ile FA (100, 500 ve 1000 µM) uygulamaları yapılan saçak kökler, uygulamanın 10. gününden başlamak üzere 10'ar gün aralıklarla 5 farklı dönemde hasat edilmişlerdir. Hasat sonrasında uygulamalara göre kökler, hasat sonrası yaş ağırlık (HSKY), hasat sonrası kuru ağırlık (HSKK), kuru madde oranı, büyüme indeksi ile toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve kafeik asit türevleri içeriği bakımından değerlendirilmiştir.

Araştırma sonucunda 24-eBL ve FA uygulanarak farklı zamanlarda hasat edilen köklerde en yüksek HSYA, HSKA ve büyüme indeksinin 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılarak 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği; FA'nın bu kriterler bakımından önemli bir etkiye bulunmadığı tespit edilmiştir. Yapılan 24-eBL uygulamaları içinde en yüksek toplam fenolik madde, toplam flavonoid, klorojenik asit, kaftarik asit, ekinakozit ve *p*-kumarik asit miktarlarının elde edilmesini sağlayan 1.0 mg l⁻¹ konsantrasyonundaki 24-eBL uygulaması en uygun uygulama olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan 500 µM FA uygulaması, incelenen bütün kriterler bakımından en yüksek değerlerin elde edildiği en uygun FA uygulaması olarak tespit edilmiştir. Sekonder metabolit birikimi için 50. günde en uygun hasat dönemi olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, 24-eBL ve FA uygulamalarının *E. purpurea* bitkisine ait transgenik saçak kök kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik olarak başarı ile kullanılabileceği; ancak 24-eBL uygulamalarının FA uygulamalarına göre daha etkili bir strateji olabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Echinacea purpurea*, *Agrobacterium rhizogenes*, fenilalanin, brassinosteroid, kafeik asit türevleri

2017, 113 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INCREASING OF SECONDARY METABOLITE PRODUCTION BY *Agrobacterium rhizogenes* AND SOME EXTERNAL APPLICATIONS IN *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH.

Tunhan DEMİRCİ

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

In this study, it was aimed to determine the effects of 24-epibrasinolide (24-eBL) and L-phenylalanine (FA) on the root growth and caffeic acid accumulation in *A. rhizogenes* mediated hairy roots of *Echinacea purpurea*. For this aim, different concentrations of 24-eBL (0.5, 1.0 and 2.0 mg l⁻¹) and FA (100, 500 and 1000 µM) were applied to hairy roots and harvest was done in five times at 10 days intervals. After harvest, hairy roots were evaluated for fresh root weight, dry root weight, growth index, dry matter percentage and contents of total phenolic, total flavonoid and caffeic acid derivatives.

It was determined that the highest fresh root weight, dry root weight and growth index were obtained from the roots treated with 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL and harvested at 50 days after treatment while FA had no significant influence on root growth. Among the 24-eBL applications, 24-eBL at 1.0 mg l⁻¹ concentration was found as optimum application providing the highest total phenolics, total flavonoids, cichoric acid, caftaric acid, echinacoside and ve *p*-coumaric acid contents. On the other hand, 500 µM FA was determined as the most suitable FA treatment because of giving the maximum values in terms of all investigated parameters. As optimal harvesting period, 50th day was determined for secondary metabolite accumulation. Consequently, it was determined that 24-eBL and FA treatments can be used successfully in order to increase the production of secondary metabolites in transgenic hairy roots of *Echinacea purpurea* but 24-eBL implementations could be a more effective strategy than those of FA.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*, *Echinacea purpurea*, phenylalanine, brassinosteroid, caffeic acid derivatives

2017, 113 pages

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışman hocam sayın Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince, Tez İzleme Komitesi'nde yer alarak bilimsel düşüncelerini benimle paylaşan, ilgilerini esirgemeyen hocalarım Yrd. Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY'a ve Doç. Dr. Bekir ŞAN'a teşekkür ederim.

İstatistik değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Özgür KOŞKAN'a, aynı laboratuvarı paylaştığım arkadaşlarım Pınar OLGUNSOY, Hande Nur KURU, İbrahim Ertan ERKAN, Ramazan DİLMEN ve Uzm. Dr. Özlem ARAS AŞÇI'ya çalışmalarım sırasında benden desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Erkan KARACABEY'e ve Arş. Gör. Sebahattin Serhat TURGUT'a teşekkür ederim.

Doktora çalışmam müddetince her zaman maddi manevi desteğiyle yanımda olan eşim Nazire DEMİRCİ'ye ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca 2130517 No'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen TÜBİTAK (TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU), Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma ve Destek birimine teşekkür ederim.

Tunhan DEMİRCİ
ISPARTA, 2017

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Ekinezya bitkisine ait bazı ürünler	9
Şekil 2.2. Kafeik asit türevlerinin biyosentez yolları	11
Şekil 2.3. Kafeik asit türevleri	12
Şekil 2.4. <i>A. rhizogenes</i> Ri plazmidinin dairesel gen haritası	16
Şekil 2.5. T-DNA bölgesinin bitki genomuna aktarılması.....	17
Şekil 3.1. Kültür tüpleri içerisinde çimlendirilmiş ekinezya bitkileri	36
Şekil 3.2. Katı besin ortamında elde edilen <i>Agrobacterium rhizogenes</i> kolonileri	38
Şekil 3.3. Vakum infiltrasyonu kullanımı ile bakteri ve bitki eksplantlarının inokülasyonu	42
Şekil 3.4. Southern blot düzeneğinin şeması	45
Şekil 3.5. Sıvı kültürlerde çoğaltılan potansiyel transgenik kökler	46
Şekil 3.6. Uygulamalarda kullanılacak aynı hattan çoğaltılmış saçak kökler	47
Şekil 3.7. Yaş kök ağırlıklarının belirlenmesi.....	48
Şekil 4.1. Vakum infiltrasyon uygulaması ile yaprak eksplantlarından elde edilen saçak kökler	54
Şekil 4.2. Sekiz farklı potansiyel transgenik ekinezya kök hattının 21 günlük gelişme sonrası görünüşleri	55
Şekil 4.3. X ışınlarına duyarlı filmlere aktarılan, digoksinin ile işaretlenmiş <i>rol</i> genleri	55
Şekil 4.4. HSYA'nın hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi.....	57
Şekil 4.5. HSKA'nın hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	59
Şekil 4.6. Kuru madde oranlarının (%) hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	60
Şekil 4.7. Kök büyüme indeksinin hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	62
Şekil 4.8. Toplam fenolik madde miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	63
Şekil 4.9. Toplam flavonoid miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	65
Şekil 4.10. Kikorik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	67
Şekil 4.11. Klorogenik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	68
Şekil 4.12. Kaftarik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	70
Şekil 4.13. Ekinakozit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	71
Şekil 4.14. <i>p</i> -Kumarik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	73
Şekil 4.15. <i>o</i> -Kumarik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Kök kaynaklı sekonder metabolit birikiminin artırılması için <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'le saçak kök uyarımının yapıldığı araştırmalar	15
Çizelge 2.2. "vir" genleri tarafından sentezlenen proteinlerin fonksiyonları	18
Çizelge 3.1. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> 'in çoğaltılmasında kullanılan ortamlarının içerikleri.....	38
Çizelge 3.2. HPLC cihazına ait özellikler ve parametreler	50
Çizelge 3.3. HPLC analizlerinde kullanılan gradient program	50
Çizelge 4.1. Farklı yüzey sterilizasyon yöntemlerine göre elde edilen sonuçlar	51
Çizelge 4.2. Farklı besin ortamlarının çimlenme üzerine etkileri.....	52
Çizelge 4.3. Farklı eksplantlarda transformasyon uygulamalarından elde edilen saçak kök oranları	53
Çizelge 4.4. Saçak köklerin hasat sonrası yaş ağırlıkları (HSYA)	57
Çizelge 4.5. Saçak köklerin hasat sonrası kuru ağırlıkları (HKA)	58
Çizelge 4.6. Hasat sonrası kök kültürlerinin kuru madde oranları	60
Çizelge 4.7. Hasat sonrası kök kültürlerinin büyüme indeksleri	61
Çizelge 4.8. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre toplam fenolik madde miktarları (mg g ⁻¹) üzerine etkileri	63
Çizelge 4.9. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre toplam flavonoid miktarları (mg g ⁻¹) üzerine etkileri	64
Çizelge 4.10. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre klorojenik asit miktarları (mg g ⁻¹) üzerine etkileri	66
Çizelge 4.11. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre klorojenik asit miktarları (mg g ⁻¹) üzerine etkileri	68
Çizelge 4.12. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre kaftarik asit miktarları (mg g ⁻¹) üzerine etkileri.....	69
Çizelge 4.13. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre ekinakozit miktarları (mg g ⁻¹) üzerine etkileri.....	71
Çizelge 4.14. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre p-kumarik asit miktarları (mg g ⁻¹) üzerine etkileri.....	73
Çizelge 4.15. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre o-kumarik asit miktarları (mg g ⁻¹) üzerine etkileri.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BR	Brassinosteroid
24-eBL	24-Epibrassinolid
FA	Fenilalanin
MS	Murashige and Skoog (1962)
B5	Gamborg B-5 besin ortamı
IBA	İndol 3-bütirik asit
IAA	İndol asetik asit
NAA	Naftalen asetik asit
SNP	Sodyum nitroprusit
PAL	Fenilalanin amonyun liyaz
HSYA	Hasat sonrası kök yaş ağırlığı
HSKA	Hasat sonrası kök kuru ağırlığı
IL-10	İnterlökin-10
TGF β -1	Transforming growth faktör-beta1
TNF α	Anti-Tümör Nekroz Faktör alfa
g	Gram
mg	Miligram
l	Litre
μ M	Mikromolar

1. GİRİŞ

Ekinezya (*Echinacea*) Asteraceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitki olup (Cozzolino vd., 2006), tıbbi ve süs bitkileri arasında büyük önem taşımaktadır (Hobbs, 1989; Foster ve Duke, 1990). Tıbbi araştırmalarda alyuvarların sayısını arttırarak, immun sisteminin güçlenmesini sağladığı (Bauer ve Wagner, 1991; Barrett, 2003), antioksidan özellikler gösterdiği ve yara iyileşmesini teşvik ettiği bilinmektedir. “Anti-enfektif” ajan olarak nitelendirilen ekinezya, ayrıca bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda, hafif septisemi (kan zehirlenmesi), fronküloz (deride sürekli tekrarlayan ağrılı ve kalıcı nodüller), çıban, karbonkül (deri şarbonu) gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, tümör hücrelerinin büyümesini engellediği de belirlenmiştir (Barnes vd., 2005; Lee vd., 2010). Avrupa’da *Echinacea purpurea* bitkisinden yapılmış başta merhem, tentür, losyon, krem, sıvı ve kuru ekstrakt ve diğ macunları olmak üzere 280’in üzerinde ürün bulunduğu; Amerika’da ise köklerin kapsüllenerek besin takviyesi olarak da marketlerde satıldığı bildirilmektedir (Çalışkan ve Odabaş, 2011). Ekinezyanın, bu çok yönlü kullanım alanları nedeniyle popülerliği giderek artmış ve son yıllarda küresel olarak ticarileşmesiyle birlikte Avrupa’nın en çok satan tıbbi bitkisi haline gelmiştir (Yu vd., 2013). Artan tüketim ile birlikte 2014 yılında sadece Amerika’da 50 milyon dolardan fazla satış rakamına ulaşarak, bir önceki yıla göre %79’luk talep artışı gösteren ekinezya, Amerika’da en çok satan üçüncü tıbbi aromatik bitki olmuştur (Smith vd., 2015).

Ekinezya türleri bünyelerinde biyolojik aktivitesi ispatlanmış birçok biyokimyasal bulundurmaktadır. Yapılan kimyasal analizler sonucunda ekinezya türleri içinde yer alan *Echinacea purpurea* türünde tıbbi olarak oldukça önemli olan polisakkaritler, flavonoidler, kafeik asit türevleri, uçucu yağlar, alkamitler, poliasetilenler ve çeşitli kimyasal maddeler de dahil olmak üzere 7 farklı grup metabolit tespit edilmiştir (Cozzolino vd., 2006). Bu maddelerden özellikle bitkinin köklerinde bulunan kikorik asit, kafeik asit, ekinakozit gibi kafeik asit türevleri ile izobutilamidlerin tıbbi olarak önemli olmaları ekinezya bitkisine olan talebin artmasına neden olmuştur. Ekinezyanın

sağlık üzerindeki etkisinin, içermiş olduğu birçok kimyasalın bir araya gelmesiyle meydana gelmiş kompakt bir etki olması nedeniyle, aynı tıbbi etkileri sağlayabilecek sentetiklerinin yapılması olanağını ortadan kaldırmakta ve üretimin mutlaka ekinezya bitkilerinden karşılanması zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır (Jones vd., 2009). Diğer taraftan bu metabolitlerin ekinezya bitkilerinin köklerinden elde edilmeleri, artan taleple birlikte ekinezya türlerinin yok olma tehlikesini de ortaya çıkarmaktadır. Nitekim Amerika'da ekinezyanın aşırı toplanması sonucunda bitki türünün tehlike altına girmesi nedeniyle doğadan sökümlü yasalarla engellenmeye çalışılmaktadır (Adam, 2002). Doğadan toplama ile sekonder metabolitlerin elde edilmesi, bitki türlerinin zaman içinde yok olmasına neden olabileceği gibi, bitki materyallerinin mikroorganizmalar tarafından toplu istilası, aktif bileşenlerin değişken oluşu, saf ve standard bitki materyali bulma kıtlığı, mevsimlere ve araziye bağımlılık, işgücü gibi birçok kısıtlamaları da beraberinde getirmektedir (Raman vd., 2004). Bu nedenle *in vitro* koşullarda sekonder metabolit üretim tekniklerinin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır (Roesler vd., 1991; Smith vd., 2002). Bu tekniklerle yukarıda sayılan geleneksel yöntemlerden kaynaklanan bazı problemler ortadan kalkmakta ve uygun sistem sağlanabildiğinde yılın her döneminde yüksek miktar ve saflıkta ürün eldesi mümkün olabilmektedir (Dörnenburg ve Knorr, 1997; Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002).

Agrobacterium rhizogenes aracılığı ile saçak kök kültürlerinin elde edilmesi, *Echinacea purpurea* türünde olduğu gibi önemli sekonder metabolitlerin köklerinden elde edildiği türlerde metabolit üretimini artırmaya yönelik yapılabilecek yaklaşımlardan ilki olup, bu uygulama ile kontrol bitkilerine oranla çok daha fazla saçak kök ve çok daha fazla metabolit üretimi söz konusu olabilmektedir. Ancak yapılan literatür incelemeleri sonucunda ekinezyada *Agrobacterium rhizogenes* aracılığıyla saçak kök oluşumuna ilişkin çalışmaların çok sınırlı olduğu ve bu konunun gün geçtikçe önem kazanması nedeniyle de bu çalışmaların özellikle son yıllarda yoğunlaştığı görülmektedir. (Liu vd., 2006; Abbasi vd., 2007a; Liu vd., 2012; Abbasi vd., 2012).

In vitro koşullarda sekonder metabolit artırılmasına yönelik yapılabilecek bir diğer yaklaşım da bazı dışsal uygulamalarla sentezin uyarılmasıdır. Bunlar içerisinde en yaygın olarak kullanılanları ağır metal (bakır, civa, kadmiyum, kurşun vb.), ışık radyasyonu, UV, jasmonik asit, sakkaroz, metil jasmonat, ozon ve büyümeyi düzenleyici madde uygulamaları sayılabilmektedir. Diğer taraftan yapılan taramalar sonucunda ekinezyada saçak köklerde metabolit üretimini artırmaya yönelik dışsal uygulama olarak sadece gibberillik asit (GA₃) (Abbasi vd., 2012), GA₃ ve triazol (Jones vd., 2009) ile ultrasonik uygulamaların (Liu vd., 2012) etkilerinin incelendiği görülmektedir. Ancak metabolit üretimini artırmak için gerek *in vitro* gerekse *in vivo* koşullarda yapılacak uygulamaların bitki, hücre ya da dokularının canlılığını olumsuz yönde etkilemeyecek evre ve insanla dost uygulamalar olması büyük önem taşımaktadır. Bitkiler üzerinde bu yönde etkiler gösterme potansiyeli olan uygulamalardan biri de yeni nesil hormonlar olarak ifade edilen ve oksinler, gibberellinler ve sitokininler gibi büyümeyi teşvik edici özellikleri bulunan (Tanaka vd., 2003; Sun vd., 2004) brassinosteroid (BR)'lerdir. Bitki gelişimi, tohum çimlenmesi, eklenme, köklenme, hücre genişlemesi ve uzaması gibi pek çok fizyolojik olayda rol oynayan (Clouse ve Sasse, 1998; Nemhauser ve Chory, 2004) ve çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin neden olduğu olumsuzlukların düzeltilmesi ya da engellenmesi yönünde etkide bulunan (oban ve Baydar, 2016) BR'lerin, bir diğer önemli işlevi de dışsal uygulamalarıyla sekonder metabolitlerin sentezini artırmalarıdır (Farooq vd., 2009; Farooq vd., 2010; oban ve Göktürk Baydar, 2017).

In vitro koşullarda sekonder metabolit verimini artırmada kullanılabilecek uygulamalardan bir diğeri de öncül madde kullanımıdır. ncl madde üretilmek istenen asıl metabolitin elde edilmesinde kullanılan başlatıcı ya da ara aşamalarda ortaya çıkan ürünler olup; bunların içsel seviyeleri sentezi engelleyecek boyutta olduğunda, bu bileşiklerin dışsal uygulamalar şeklinde kullanılması metabolit verimini artırmada oldukça etkili olmaktadır (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002). L-fenilalaninin (FA) de özellikle fenolik bileşiklerin biyosentezinde yer alan ucuz ve etkili öncül maddelerden biridir.

Bu araştırma *Agrobacterium rhizogenes* aracılığı ile elde edilmiş saçak köklere farklı konsantrasyonlarda yapılan bir BR homoloğu olan 24-eBL ile FA uygulamalarının ve farklı hasat dönemlerinin kök büyümesi ve kafeik asit türevlerinin sentezi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ekinezya bitkisine ait transgenik saçak köklerde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla 24-eBL ve FA uygulamalarının ilk olarak gerçekleştirileceği bu çalışmada, hasat sonrası kök yaş ve kuru ağırlığı, kuru madde oranı, büyüme indeksi ile saçak köklerdeki toplam fenolik madde, toplam flavonoid ile kafeik asit türevlerinin (kikorik asit, klorogenik asit, kaftarik asit, kafeik asit, ekinakozit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asit) miktarlarının uygulamalara ve hasat dönemlerine göre gösterdiği değişimler incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Echinacea purpurea* Bitkisinin Botanik Özellikleri

Echinacea cinsine ait ve gen merkezi Kuzey Amerika olan ekinezya türleri, ilk kez Mc Gregor tarafından 1968 yılında taksonomik olarak sınıflandırılmışlar ve *Asteraceae* familyası içerisinde 9 tür altında toplanmışlardır. Mc Gregor (1968)'a göre bu türler, *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* var. *angustifolia*, *E. pallida*, *E. sanguinea*, *E. tennesseensis*, *E. atrorubens*, *E. paradoxa* var. *paradoxa*, *E. paradoxa* var. *neglecta*, *E. simulate*, *E. laevigata*, *E. angustifolia* var. *strigose* şeklinde isimlendirilmişlerdir. Daha sonra Binns vd. (2004) tarafından revize edilen *Echinacea* cinsi 4 tür altında toplanmıştır. Bu türler, *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida* (*E. pallida* var. *angustifolia*, *E. pallida* var. *pallida*, *E. pallida* var. *sanguinea*, *E. pallida* var. *tennesseensis* ve *E. pallida* var. *simulate*), *Echinacea atrorubens* ve *Echinacea laevigata* şeklinde birbirlerinden ayrılmışlardır (Çalışkan ve Odabaşı, 2011).

Çok yıllık otsu bitkilerden olan ekinezya türleri dik gövdelidir ve yaprakları alt kısımlarda gövdeye sap ile bağlanırken üst kısımlarda doğrudan tutunur. Yaprakları 3 ila 5 damarlı yapıda olup, mızrak şeklinde ve genellikle dişli bazen tüylü yapıdadır. Merkezi ışınsal çiçeklerle çevrelenmiş koni başlı pembe, beyaz, sarı, mor ve genellikle de kırmızı renkli çiçeklere sahiptir (Çalışkan ve Odabaşı, 2011).

Gövdesi 60 ila 180 cm uzunluğunda olan *E. purpurea* türü üst dallanma göstermekte olup, türü ayırt edici en önemli özelliklerinden birisi, alt yapraklarının mızrak şeklinde ve düzensiz dişlerle çevrelenmesidir. Merkezi koninin genelde parlak portakal renginde olması ise ikinci ayırt edici özelliğidir. Işınsal çiçekleri kırmızı renkten koyu mora kadar değişebilmektedir. Nadiren beyaz renkli çiçekler de görülmektedir. Serin iklim bitkisi olmasına rağmen, sıcak yaz aylarına ve kuraklığa karşı yüksek tolerans göstermektedir. Genelde fakir, kayalık, iyi drene olmuş alkali ve nötr pH'ya yakın topraklarda yetişmektedir (Çalışkan ve Odabaşı, 2011).

2.2. *Echinacea purpurea* Bitkisinin Tıbbi ve Ekonomik Önemi

Ekinezya bitkisinin geleneksel tıpta kullanımı çok eskilere dayanmakta olup, bitkinin kullanılışını yerlilerden öğrenen Meyer, *E. angustifolia* köklerinden hazırladığı droglara kan temizleyici anlamına gelen "blood purifier" adını vermiştir. İlacını romatizma, migren, ağrı, yılançık, yaralar, hazımsızlık, bitki zehirlenmeleri, zehirli yılan sokması, sifilis, kangren, malarya, difteri, hemoroit gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanmıştır. Meyer'in ilacı 1887'de Dr. John King ve Ecz. John Uri Lloyd'un dikkatini çekmiş ve böylece *Echinacea* üzerindeki ilk bilimsel çalışma King ve Lloyd tarafından yapılmıştır (Mat, 2004; Çalışkan ve Odabaş, 2011).

Anavatanı Kuzey Amerika olan ekinezya, soğuk algınlığına karşı Avrupa'da da yaygın olarak kullanılan bir bitkidir (Abbasi vd., 2007a). Amerikan yerlileri tarafından ağız ve yutak dezenfektanı olarak kullanıldığı gibi, yara ve yanık tedavisinde, kabakulak, böcek ısırması, karın ve baş ağrılarında, öksürük, soğuk algınlığı, kızamık, diş eti iltihaplanması, bademcik iltihaplanması, belsoğukluğu, yılan ısırması ve zehirlenmelerde de tedavi amacı ile farklı droglar halinde uzun yıllar boyunca kullanılmışlardır (Muntean vd., 1998; Barrett vd., 1999; Mills ve Bone, 2000; BHMA, 2003).

Ekinezya Amerika'da üst solunum yolları enfeksiyonu tedavisinde kullanılan ve en çok satılan üç bitkiden biridir (Kligler, 2003). Solunum yollarındaki hücresel aktiviteyi ve lökositlerin mobilitesini artırmaktadır. Yapısında bulunan alkamidlerin lokal anestezik etki ve anti-inflamatuvar aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Toprak üstü kısımlarından elde edilen taze öz suyu ve köklerinden hazırlanan sulu ekstrakt, egzama ve akne gibi diğer cilt problemlerinin tedavisinde, influenza, stomatit ve uçuk enfeksiyonlarının engellenmesinde kullanılmaktadır (Fetrow ve Avila, 1999; Lee ve Scagel, 2010).

Ekinezyanın immüno-düzenleyici, antioksidan ve yara iyileşmesini teşvik edici etkilerinin yanı sıra, birçok viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı ve tümör hücresi büyümesini önlemede de etkilerinin olduğu bilinmektedir (Lee vd., 2010). İmmüno-düzenleyici etkisinin yanısıra fagositoz, lenfositik aktivite,

hücre solunum, T-hücre üretiminin uyarılması ve anti-hyaluronidaz (hyaluronik asitin etkisinin uzun süreli hale gelmesi), antiviral aktivite, HIV-1 integras (HIV 1 virüsüne ait genlerin taşıyıcıya geçmesini engelleyen enzim) ile kanser hücrelerine karşı anitioksidan etkilerinin de olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Cheminat vd., 1988; Facino vd., 1993; King vd., 1999; Lin vd., 1999; Barrett, 2003; Harborne ve Williams, 2004; Pellati vd., 2004).

Ekinezya droglarının toksik etki yapmadığı bazı bilimsel araştırmalarla gösterilmiştir. Hayvanlar üzerinde *in vitro* testlerde karsinojen veya mutajen etkisi gözlemlenmemiştir. *Echinacea purpurea* türünün köklerindeki pirolizidin alkaloidleri doymuş olduğu için, hepatotoksik olmadıkları tespit edilmiştir (Miller, 1998; Gruenwald vd., 2000; Blumenthal, 2003). Lindenmuth ve Lindenmuth (2000), soğuk algınlığı ve grip başlangıcında ekinezya çayının içilmesinin, semptomları plaseboya göre daha kısa sürede iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Schulten vd. (2001)'de *Echinacea purpurea*'nın iyi tolere edilen ve soğuk algınlığı semptomlarını hafifletmede plaseboya göre daha etkili bir ilaç olduğunu saptamışlardır.

Goel vd. (2002), ratlarla yapmış oldukları araştırmada, *Echinacea purpurea*'dan izole edilip saflaştırılmış olan kikorik asit, polisakkaritler ve alkamidlerin immün sistem üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu saptamışlardır. Uluşık ve Keskin (2012)'in, ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, ekinezya içeren yemlerle beslenen ratların 20. günden sonra IL-10, TGF- β 1 ve TNF- α 'nın plazma seviyelerinde değişimler gözlemlenmiştir. Aldıkları sonuçlar ışığında ekinezya bitkisinin immün sistem üzerinde modüle edici etkilerinin olduğunu belirtmiş ve ratların plazma sitokin seviyesi üzerine olan etkisine dair daha detaylı araştırmalar yapılması gerektiğini vurgulamışlardır. Yang vd. (2013), ekinezya bitkilerinden elde edilen ekinakozit maddesinin osteopeni geliştirilmiş ratlarda etkili olduğunu ve kemik hücrelerinin azalmasını engelleyerek kemik erimesini azalttığını tespit etmişlerdir. Zhang vd. (2007)'nin yaptıkları araştırmada ekinakozit, radikal süpürücü etkisine dayanarak, oleik asit kaynaklı akut akciğer hasarına karşı koruyucu olarak ratlarda denenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hayvanların hayatta kalması ve yan etkisiz fayda görmesinde ekinakozitin

başarılı olduğunu göstermiştir. Anti-inflamatuvar, hasar önleyici ve koruyucu etkinlik gösteren ekinakozit, önemli antioksidan özelliğe sahiptir.

Ekinezya bitkisinin köklerinden, çiçeklerinden ve tohumlarından yararlanılabildiği gibi, tüm bitkinin sıkılması ile elde edilen suyu da kullanılmaktadır (Hu ve Kitts, 2000). Kök ve toprak üstü kısımlarının kullanıldığı *Echinacea purpurea* ile sadece köklerinin kullanıldığı *E. angustifolia* ve *E. pallida* ilaç sanayinde kullanılan ekinezya türleri olup (Perry vd., 2001), *Echinacea purpurea* türü *Echinacea* cinsi içerisinde 50 ton taze örnekten 10 ton kuru örnek elde etme oranı ile en yüksek verim sağlayan türüdür (Galambosi, 2004).

Avrupa'nın en büyük ekinezya üreticisi Almanya, İsviçre, Hollanda, İtalya ve İspanya'dır (Galambosi, 2004) ve son birkaç yıldır ekinezya tarımı Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Avustralya ülkeleri başta olmak üzere diğer ülkelerde de yaygınlaşmaya başlamıştır (Yu ve Kaarlas, 2004). Şifalı bitkilerin tüketimi 2001 yılı itibarıyla %15'ten %35'e yükselmiş; bunlardan ekinezya ve sarımsak en popüler bitkiler olmuşlardır (Anonim, 2001).

Yıllık satış rakamları ile 1998 yılında Avrupa'da en çok satan tıbbi bitkiler sıralamasında 10. sırada yer alırken, Amerika'da ise en çok satan 11 bitkisel ekstrakt arasında yer almıştır (Şekil 2.1) (Yu ve Kaarlas, 2004). 2003 yılında ekinezya ürünlerinin yıllık perakende satışının tüm dünyada 1.3 milyar dolardan fazla olduğu tahmin edilmektedir (Blumenthal, 2003). Popülerliği giderek artan ekinezya, son yıllarda küresel olarak ticarileşmesiyle birlikte Avrupa'nın en çok satan tıbbi bitkisi haline gelmiştir (Yu vd., 2013).



Şekil 2.1. Ekinezya bitkisine ait bazı ürünler

2.3. *Echinacea purpurea* Bitkisinde Bulunan Sekonder Metabolitler

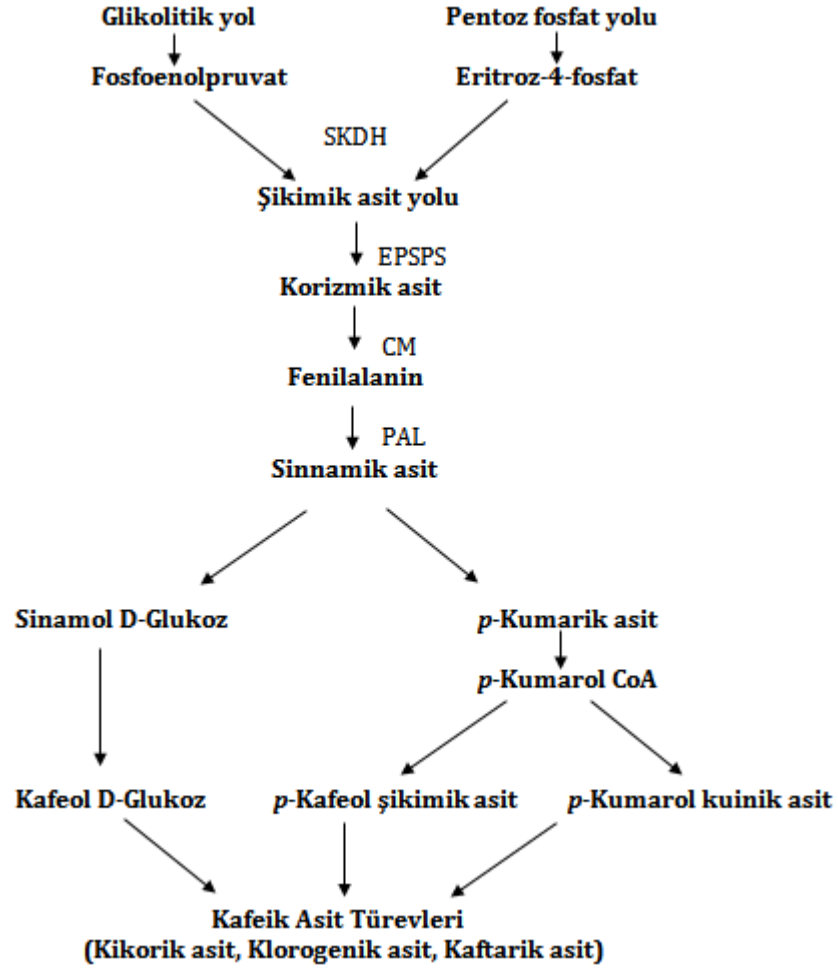
Sekonder metabolitler, biyotik ve abiyotik stres faktörleri karşısında bitkide savunma amacıyla üretilen önemli biyokimyasal bileşiklerdir. Bitkinin yaşamsal fonksiyonları için primer metabolitler kadar hayati önem taşımamakla birlikte (Büyük vd., 2012; Göçmez ve Seferoğlu, 2014; Çulha ve Çakırlar, 2015; Demirci vd., 2015), bitkinin savunma sisteminin önemli bir parçası olmalarının yanı sıra, bitkilerde renk, tat ve koku oluşumu ile tozlaşma ve tohum dağılımında da çok önemli roller üstlenmektedirler (Harborne ve Williams, 2000). Ayrıca, başta ilaç sanayi olmak üzere; gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektöründe ekonomik açıdan yeri doldurulamaz bileşikler olan sekonder metabolitler, bitkilerin yaprak, sürgün, dal, çiçek organları, meyve, meyve kabuğu, tomurcuk ve tohum gibi çok farklı organlarında sentez edilip, depolanabilmektedirler (Vanisree vd., 2004; Mirona vd., 2013; Douglassa vd., 2014; Samber vd., 2014). Birçok değerli metabolitin sentez edildiği yerlerden biri de köklerdir (Flores vd., 1987; Hartmann, 1996; Wink, 2011; Demirci vd., 2015).

Echinacea purpurea türünde 216 adet aktif tıbbi bileşiğin varlığı ortaya konulmuştur (Murch vd., 2006). *Echinacea* türlerinde tussilagin ve izotussilagin

gibi alkoloitler (Röder, 1995; Miller ve Yu, 2004; Upton ve Graff, 2007) 2,4-di-en tipinde alkamitler (Miller ve Yu, 2004); 4-*O*-metilglukuronoarabinoksilan ile asidik arabinoramnogalakattan yapısında polisakkaritler (Stimpel vd., 1984; Proksch ve Wagner, 1987; Miller ve Yu, 2004; Gruenwald vd., 2004); aspartat, glisin, glutamat ve alanin gibi amino asitlerin arabinoz, galaktoz ve glukozamin gibi şekerlerle birleşmesinden oluşan glukoproteinler; karyofillen, karyofillen epoksit ve α -felandren gibi terpenoidler (Gülpınar, 2009) bulunmaktadır. Ancak ekinezya bitkisinin en önemli bileşenlerini fenolik bileşikler, bunlar içinde de özellikle kafeik asit türevleri oluşturmaktadır.

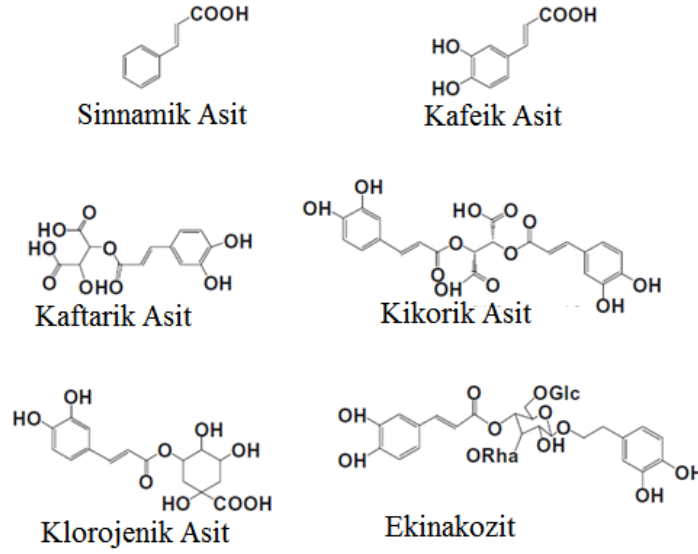
Antioksidan özelliklerinin yüksek olması nedeniyle özellikle son yıllarda sayısız araştırmaya konu olan fenolik bileşikler, antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin yanı sıra, birçok hastalığın tedavisinde de etkili oldukları belirlenmiş bileşiklerdir (Baydar vd., 2004; Korukluoğlu vd., 2010; Perumalla ve Hettiarachchy, 2011; Doğmuş ve Durucasu, 2013). Bitkilerde bulunan en önemli sekonder metabolit gruplarından birini oluşturan bu bileşikler, en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Vermerris ve Nicholson, 2008).

Fenolik bileşikler, primer metabolizma ürünleri olan basit şekerlerden şikimik asit yolu ile sentezlenirler. Başlangıç basamağı karbonhidratların eritroz-4-fosfata ve fosfofenol pirüvata dönüşmesiyle gerçekleşen fenilalanin sentezi, şikimik asit metabolik yolu içinde yer almaktadır. Biyosentezin ilk önemli aşamasını fenilalaninden, fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesi ile amin grubunun uzaklaştırılması (deaminasyon) oluşturmaktadır (Boudet, 2007). PAL enziminin neden olduğu deaminasyon, sinamik asit ve türevlerinin (*p*-kumarik asit ve *p*-kumarol CoA) sentezlenmesini sağlar (Boudet, 2007). Bu basamaktan sonra üç farklı biyosentez yolu kullanılarak kafeik asit ve türevleri oluşturulmaktadır (Şekil 2.2) (Tuan vd., 2014).



Şekil 2.2. Kafeik asit türevlerinin biyosentez yolları (Ramawat vd., 2009; Ohno vd., 2012; Tuan vd., 2014; Chikezie vd., 2015).

Echinacea purpurea bitkisi fenolik bileşiklerce özellikle de bu bileşikler içinde yer alan kafeik asit türevlerince zengin bir bitkidir (Harborne ve Williams, 2004). Kaftarik asit, klorogenik asit, kafeik asit ve ekinakozit gibi kafeik asit türevlerini de içermekle birlikte (Şekil 2.3), bu türde en fazla bulunan ve en önemli kafeik asit türevi kikorik asittir (Perry vd., 2001; Molgaard vd., 2003).



Şekil 2.3. Kafeik asit türevleri (Bauer ve Wagner, 1991; Letchamo vd., 1999).

Kikorik asidin biyosentez yolu hala tam olarak bilinmemekle birlikte genel olarak diğer fenolik asitlerin oluştuğu şikimik asit/fenilpropanoid yolunu kullanarak, kafeik asit türevlerinden olan rosmarinik asit ya da klorojenik asidin oluşumuna benzer şekilde sentezlendiği düşünülmektedir (Kühnl vd., 1987; Shetty, 2001; Petersen ve Simmonds, 2003; Petersen vd., 2009). Bugüne kadar, kikorik asit biyosentezinde yer alan spesifik enzimler hakkında yayınlanmış herhangi bir araştırma bulunmamaktadır (Lee ve Scagel, 2013).

Echinacea purpurea köklerinde en fazla bulunan kafeik asit türevi olan kikorik asidi, kaftarik asidin izlediği bildirilmektedir (Perry vd., 2001). *Echinacea purpurea* köklerinde 1.4-20.5 mg g⁻¹ arasında değişen değerlerde kikorik asit, 2.4-4.9 mg g⁻¹ arasında değişen değerlerde de kaftarik asidin bulunduğu tespit edilmiştir (Stuart ve Wills, 2000; Nüsslein vd. 2000; Perry vd., 2001; Binns vd., 2002). Ancak *Echinacea purpurea* bitkisinde fenolik madde ve kafeik asit türevi madde miktarlarının kültür şartları, hasat zamanı, saklama koşulları ile ekstraksiyon ve analiz yöntemlerine göre büyük değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir (Stuart ve Wills, 2000; Upton ve Graff, 2007).

o-Kumarik, *p*-kumarik ve *m*-kumarik asitlerin içinde yer aldığı kumarik asitler ise sinamik asitten sentezlenen monohidroksisinamik asitler olup, bunlardan dihidroksisinamik asit olan kafeik asit ve türevleri sentezlenmektedir

(Kikugawa vd., 1983; Ferguson vd., 2005; Ramawat vd., 2009; Chikezie vd., 2015). Kafeik asit ve türevlerinin biyosentezinde öncül bileşikler olmalarına karşın, ekinezya bitkilerinde kafeik asit türevlerinin incelendiği çalışmalarda kumarik asitlere dair bilgilere rastlanmamıştır. Şekil 2.2.'de görüldüğü üzere sinamik asitten sentezlenen *p*-kumarik asitin, *p*-kumarol CoA'ya dönüştürüldükten sonra iki farklı yol kullanılarak kafeik asitlerin sentezlendiği bilinmektedir (Tuan vd., 2014). Ekinezyada oldukça önemli olan kafeik asit türevlerinin biyosentez basamaklarının araştırıldığı çalışmalarda *p*-kumarik asit miktarlarına ait sadece bir çalışma tespit edilmiş olup, bu çalışmada *E. purpurea* türüne ait bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktlarda 0.18 mg g⁻¹ *p*-kumarik asit olduğu bildirilmiştir (Glowniak vd., 1996).

2.4. *Agrobacterium rhizogenes* ve Saçak Kök Kültürleri

Saçak kök kültürleri genetik ve biyokimyasal istikrarları nedeniyle birçok tıbbi bitkide, değerli metabolitlerin standart bir şekilde üretilmesi için umut verici bir *in vitro* yöntem olarak görülmektedir (Coker ve Camper, 2004; Liu vd., 2006). Saçak köklerin tercih edilmesinin nedeni, dışarıdan herhangi bir oksin kaynağına ihtiyaç duyulmadan hızlı kök gelişiminin sağlanabilmesi ile genetik stabilitelerinin yanında metabolit verimlerinin de oldukça stabil olmasıdır (Kuzovkina ve Schneider, 2006). Bu avantajları nedeniyle hücre kültürü için uygun olmadığı düşünülen birçok bitkide kök kaynaklı metabolitler saçak kök kültürü teknolojisiyle üretilmiştir (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002).

Saçak kökler, sınırlı sekonder büyüme gösteren ve parankima hücrelerinden çok farklı olmayan basit idioblastların (özelleşmiş bitki hücreleri) varlığı ile karakterize edilmektedir. Yağ cisimciği ya da laktiferler (süt taşıyan) gibi farklılaşmış depoları bulunmamakta (Brunner ve Tanker, 1988), genellikle sekonder metabolitleri lipofilik vesiküllerde ya da vakuollerde depolamaktadırlar. Bazal kök segmentlerinin çaplarındaki artışlar, hücre bölünmesinden çok, primer kök korteksinin kalınlaşmasından kaynaklanmaktadır. Bu kök parçalarında hücrelerarası boşluklar, korteks hücrelerinin salgıları ile doldurulabilmektedir. Saçak kök kültürlerinin diğer bir

morfolojik özelliği ise, kök uçlarındaki statolit denilen özel amiloplast miktarlarının azalmasına ve dolayısı ile yerçekimi hassasiyetlerini kaybetmelerine bağlı olarak plagiotrofik (yatay) büyüme göstermeleridir. Transforme saçak köklerin en belirgin özellikleri ise kök saçaklanmalarıdır. Saçak kök kültürlerinin epidermisi, genellikle çok sayıda kök tüyü ile kaplıdır. Sıvı ortamda büyütüldüklerinde bu köklerin, kök uçlarından besin ortamına sekonder metabolitlerin salınmasında önemli rol oynayan kaliptrayı muhafaza ettikleri belirlenmiştir (Kuzovkina ve Schneider, 2006).

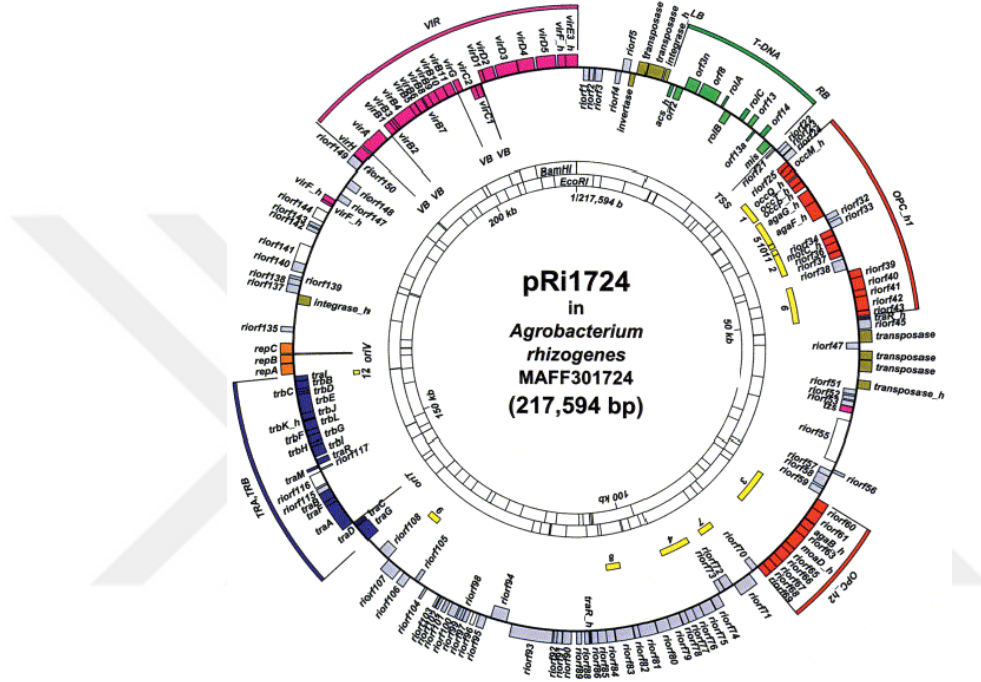
Agrobacterium rhizogenes bitkilerde hastalık yapıcı bir gram negatif toprak bakterisi olup, saçak köklenmeyi arttırıcı etkisi bulunmaktadır. Bitki ile etkileşimi sırasında, Ri plazmiti üzerindeki *rol* genlerini, etkileşime geçtiği bitkinin çekirdek genomuna aktarmakta ve sınırsız büyüme potansiyeline sahip köklerin oluşmasına neden olmaktadır. “*rol*” genleri, *rolA*, *rolB*, *rolC* ve *rolD* genlerinden oluşmaktadır. Saçak kök oluşumunu sağlamalarının yanında her birinin ayrı ayrı sekonder metabolitlerin sentezlenmesini uyardığı da düşünülmektedir (Sharma vd., 2013). Bu nedenle de *A. rhizogenes* bulaştırması ile elde edilen saçak kök kültürleri, bazı tıbbi öneme sahip bitkilerin sekonder metabolitlerini üretmek için oldukça önemli bir biyoteknolojik yöntem haline gelmiş, birçok tıbbi ve aromatik bitkide sekonder metabolit üretiminde kullanılmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kök kaynaklı sekonder metabolit birikiminin artırılması için *Agrobacterium rhizogenes*'le saçak kök uyarımının yapıldığı araştırmalar (Demirci vd., 2015).

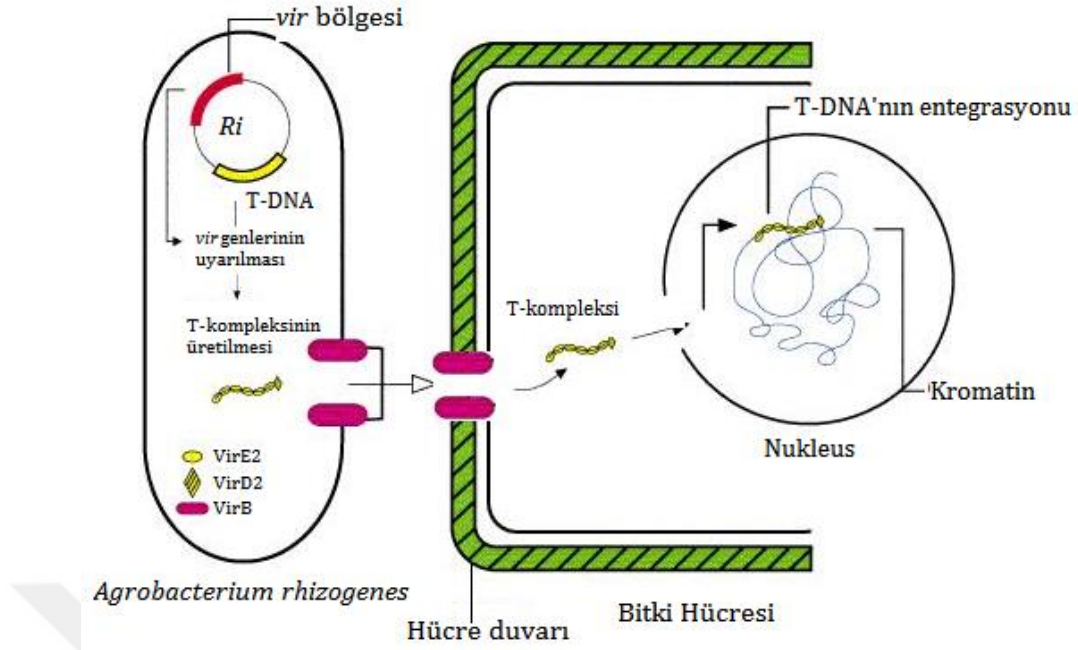
Bitki	Sekonder Metabolit
<i>Atropa belladonna</i>	Atropin
<i>Camptotheca acuminata</i>	Kamptothekin, 10-hidroksikamptothekin
<i>Echinacea purpurea</i>	Kikorik asit, klorojenik asit, kaftarik asit
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolides
<i>Gmelina arborea</i>	Verbaskozit
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Saponin
<i>Gymnema sylvestre</i>	Gimnemik asit
<i>Linum flavum</i>	Koniferin
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shikonin
<i>Ocimum basilicum</i>	Rosmarinik asit, kafeik asit
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Kamptotesin, kuinolin
<i>Papaver somniferum</i>	Morfin, sanguinarin, kodein
<i>Puararia phaseoloides</i>	Puerarin
<i>Rauvolfia micrantha</i>	Ajmalisin, ajmalin
<i>Rubia tinctorum</i>	Lusidin
<i>Saussurea medusa</i>	Yaseosidin,
<i>Tagetes patula</i>	Thiopen, piperitone, piperitenone, limonen, cistagetone

Bakterinin bitkiye gen aktarımı, bitki üzerindeki yaralı dokulardan asetosiringon adında bir bileşiğin salgılanması ile başlamaktadır. Bakteri, salgılanan bu bileşiği *virA* ve *virG* genleri sayesinde algılayarak, bu doku ya da açıklıklardaki bitki hücrelerine bağlanır. Bu bağlanma *virB* genlerinin bakteri ile bitki arasında kanal oluşturmasıyla gerçekleşmektedir. Bakteri T-DNA'sının sınır bölgelerine yapışmış olan *virD* genleri ise T-DNA'da çentik oluşturmakta ve onu paket haline getirmektedir ki bu işlevi ile endonükleaz görevini üstlenmektedir. *virB* genleri aracılığıyla oluşan tünelden geçen T-DNA bitki stoplazmasındaki nüklear lokalizasyon görevini gören, bakteride bulunan *vir* genleri sayesinde paketlenmiş olan T-DNA'yı çekirdek içine yönlendirir (Giri ve Narasu, 2000). Ayrıca bakteri kromozomları üzerinde bulunan *chvA*, *chvB*,

pscA ve *attR* genlerinin de bu transformasyon sürecinde görev aldıkları bilinmektedir (Emiroğlu ve Gürel, 1999). Bitki hücresine bağlanan *A. rhizogenes*'in plazmidi (Ri plazmidi) (Şekil 2.4) üzerinde bulunan ve T-DNA (transferred-DNA) bölgesinin (Şekil 2.5) bitki genomuna aktarılması ve sabit bir şekilde bitki genomuna bağlanmasının ardından saçak kök oluşumu ve opin sentezi meydana gelmektedir (Sinkar vd., 1987; Gartland, 1995).



Şekil 2.4. *A. rhizogenes* Ri plazmidinin dairesel gen haritası (Moriguchi vd., 2001).



Şekil 2.5. T-DNA bölgesinin bitki genomuna aktarılması (Nottenburg ve Rodriguez, 2008'e göre modifiye edilmiştir).

Transformasyon boyunca, bir ya da iki T-DNA sınır bölgesi (TL- ve TR- DNA) bitki genomuna aktarılmaktadır (Kuzovkiana ve Schneider, 2006). *A. rhizogenes*'in bitkiye bağlanmasından sonra T-DNA bölgesi bitki hücresine aktarılmakta ve bitki genomuna stabil olarak yerleşmektedir. *Vir* bölgesi, 35 baz çiftinden oluşmakta, sol sınır bölgesine yakın ve T-DNA bölgesinin dışında kalmaktadır (Choi vd., 2008). Transformasyon sırasında *Ri* plazmitlerinde *vir* bölgesindeki 6 ile 8 genin etkili olduğu bilinmektedir (Bensaddek vd., 2008) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. “*vir*” genleri tarafından sentezlenen proteinlerin fonksiyonları

Vir Proteinlerinin Fonksiyonları	Vir Proteinleri
Fenolik maddelerin algılanması	VirA
Tüm vir operonlarına ait ekspresyonların uyarılması (transkripsiyon aktivatörü)	VirG
T iplikçığının bitki membranından geçmesi için açıklık oluşturma	VirB
T-DNA sınır sekanslarından DNA’nın gevşetilmesi	VirD1
T-DNA sınır sekanslarından DNA’nın kesilmesi, T iplikçığının bitki hücresine ve nükleusa yönelmesi	VirD2
T iplikçığının nükleusa yönelmesi	VirE2, VirD2
T iplikçığının bitki hücresi içindeki nükleotik bozunmadan korunması	VirE2
T iplikçığının ve vir proteinlerinin bakteriden aktarılması	VirB, VirD4
T-DNA’nın entegrasyonundan önce T iplikçiklerine ait proteinlerin açılması	VirF

Ri ve Ti plazmitleri arasında *vir* operonlarının organizasyonunu da içeren, oldukça büyük benzerlikler olmasına rağmen, bazı *A. rhizogenes* bakteri ırklarının Ri plazmitlerinde ve geri kalan genomlarında, *virE1* ve *virE2*’nin bulunmaması önemli bir farklılıktır. Bu *A. rhizogenes* ırklarının virulensliğini GALLS genleri sağlamaktadır (Hodges vd., 2006). *A. tumefaciens*’de ise bu virulanslık *virE2* genleri sayesinde gerçekleşmektedir (Veena ve Taylor, 2007).

Bitki genomuna *A. rhizogenes*’e ait Ri plazmidinin T-DNA aktarımını sağlayan sınır bölgeleri bulunmaktadır. Bu sınır bölgeleri T-DNA transfer stimulator sekansı (TSS) olarak adlandırılmakta olup, 8 baz çifti ile tekrarlanan dizilerdir. *A. rhizogenes* ırkları iki özellik bakımından ele alınmaktadırlar. Bunlardan ilki TSS bölgesindeki sekans farklılıkları (Veena ve Taylor, 2007), ikincisi ise opin tipleridir (Kuzovkina ve Schneider, 2006).

Opin sentezinin gerçekleşmesi için T-DNA bölgesinde bulunan genlerin transkripsiyonunun gerçekleşmesi gerekmektedir. Transkripsiyon sonucu saçak kök oluşumu ile normalde bitki bünyesinde mevcut olmayan opinlerin sentezi gerçekleşmektedir. Opinlerin, bakteriler tarafından karbon, azot ve enerji kaynağı olarak kullanılabilen aminoasit ve şeker türevleri oldukları bilinmektedir (Sinkar vd., 1987).

TSS bölgesine göre yapılan gruplandırmada mikimopin, mannopin, agropin ve cucumopin olmak üzere dört farklı ırk belirlenmiştir. Mikimopin ırklarının 12 tekrarlı 5'-TGCCTTCG-3'sekansları, mannopin ırklarının 6 tekrarlı 5'-ATTAGTTC-3'sekansları, agropin ırklarının 5 tekrarlı 5'-TTGTTCAA-3'sekansları ve cucumopin ırklarının da 16 tekrarlı 5'-GTTCGTCA-3' sekanslarını bulundurdıkları tespit edilmiştir (Veena ve Taylor, 2007).

Opin tiplerine göre 3 yabancı *A. rhizogenes* ırkı vardır. Bunlar agropin, mannopin ve cucumopin ırklarıdır. Agropin, mannopin ve agropinik asit üreten ırkların Agropin tip (örn: A4, 15834 ve 1855), sadece mannopin üreten ırkların mannopin (örn: 8196), sadece cucumopin üretenlerin de cucumopin ırkları olduğu belirlenmiştir (Kuzovkina ve Schneider, 2006). *Agrobacterium* ırklarının çoğu sadece bir T-DNA bölgesi içermektedir (Georgiev vd., 2007). Mannopin ve cucumopin tip plazmidler, Ri plazmidlerinde sadece tek T-DNA bölgesi içerirken, agropin tipi plazmidler (A4 gibi) iki T-DNA bölgesi içermektedirler (TL- ve TR-DNA). Mannopin, cucumopin ya da mikomopin gibi opinleri üreten bakteri ırklarının transfer ettikleri tek T-DNA bölgesi, agropin TL-DNA bölgesine homologdur, ancak *rolD* geni içermemektedir (Veena ve Taylor, 2007).

TL-DNA ve TR-DNA bölgeleri, bitki genomuna birbirinden bağımsız olarak aktarılmaktadır. TL-DNA bölgesi, saçak köklülük fenotipinden sorumlu olan *rol* genlerini içermektedir. TL-DNA bölgesinde ORF 10, 11, 12 ve 15'le bağlantılı olan *rolA*, *rolB*, *rolC* ve *rolD* genlerini içeren 18 ORF (Açık Okuma Çerçevesi = Open Reading Frame) bölgesi bulunmaktadır (Christey, 2001). Ri TL-DNA bölgesindeki bu genler, hücrelerin köke farklılaşmasını sağlayarak saçak köklülüğe neden olmaktadır (Giri ve Narasu, 2000). Bu bölgenin hızlı büyüme oranı ve yüksek oranda dallanma gibi saçak köklülüğün fenotipik özelliklerinden sorumlu olduğu ifade edilmiştir (Kuzovkina ve Schneider, 2006). TL-DNA bölgesi, saçak köklülüğün uyarılması için mutlak gerekli iken (Christey, 2001, Veena ve Taylor, 2007), TR-DNA'nın aktarılmasının, saçak köklerde kök oluşumuna doğrudan bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (Georgiev vd., 2007).

Elde edilen saçak köklerin transgenik olduklarını anlamak için direkt veya indirekt olarak bilinen, T-DNA'nın veya opinlerin belirlenmesi metotları kullanılmaktadır. Direkt olarak T-DNA'nın bitki genomundaki varlığının tespit edilmesi transformasyonun doğrulanmasında en güvenilir yöntemdir. Bitki genomunda T-DNA varlığının kanıtlanması için Southern blot ve PCR teknikleri kullanılmaktadır. (Hunter ve Neil, 1990; Emiroğlu ve Gürel, 1999; Georgiev vd., 2007). Bu yöntemler ile *rolA*, *rolB*, *rolC* ve *rolD* gibi *A. rhizogenes* Ri plazmitinin T-DNA bölgesinde bulunan genlerin bitki genomuna entegre olup olmadıkları belirlenmeye çalışılır (Tao ve Li, 2006). Saçak kök kültürü çalışmalarında, transformasyonun varlığının ispatlanması için *rolA* (Kumar vd., 2006), *rolB* (Dhalkulkar vd., 2005; Tao ve Li, 2006) ya da *rolC* (Lee vd., 2004) primer çiftleri kullanılmaktadır.

Agrobacterium rhizogenes ile bitkilerden saçak kök elde edilmesine yönelik çalışmalar incelendiğinde, *Agrobacterium*'ların doğal genetik mühendisler olarak adlandırıldığı ve 1980'li yılların ortalarından itibaren bitkilere gen transferi yapılması amacı ile yaygın olarak kullanıldıkları görülmektedir (Özcan vd., 2001).

Sevón ve Oksman-Caldentey (2002)'de yaptığı çalışmada *Atropa belladonna* L., *Catharanthus trichophyllus* L., ve *Datura candida* L. bitkilerinde *A. rhizogenes* aracılığıyla elde edilen saçak köklerde yüksek miktarda alkaloid biyosentezinin gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Transgenik saçak kök eldesi gerçekleştirilen *Rubia peregrina* bitkisinde antrokinon metabolitinin (Lodhi vd., 1996), *Catharanthus roseus* bitkisinde ajmalisin, katarantin, serpentin ve kampesterol üretimini kontrole göre artırdığı (Ayora-Talavera vd., 2002) yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

A. rhizogenes ile ekinezya bitkisinde saçak kök oluşumuna ilişkin çalışmaların çok az sayıda olmasına karşın, bu çalışmalarda kafeik asit türevlerinin üretilmesinde kullanılabilecek özellikte çok sayıda saçak kök elde edildiği

bildirilmiştir (Wang vd., 2006; Liu vd., 2006; Abbasi vd., 2007b; Liu vd., 2012; Abbasi vd., 2012).

2.5. Kök Kaynaklı Sekonder Metabolitlerin Üretiminde *In vitro* Tekniklerin Avantajları

Bitkilerden sekonder metabolitlerin elde edilmesi sırasında, bazı durumlarda ilgi duyulan bileşik kolaylıkla tanımlanabilmekte ve sentetik olarak da üretilmektedir. Ancak birçok durumda tıbbi etkinliğin tek ya da daha fazla sayıdaki bileşikten mi kaynaklandığı ya da bunlar arasındaki sinerjik etkilerin olup olmadığını belirlemek hiç de kolay olmamaktadır. Bu durumlarda sentetik üretim mümkün olamamakta, tıbbi preparatların ya doğada yayılmış bulunan bitkilerden, ya kültüre alınan bitkilerden ya da *in vitro* koşulların kullanıldığı kültür tekniklerinden elde edilmesi zorunluluğu ortaya çıkmaktadır (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002).

Ekinezya türleri, tıbbi etkinliğinin tek bir kimyasala atfedilemeyeceği bitki türleri arasında yer almakta olup (Pellati vd., 2004), bu nedenle de metabolitlerin tümünün elde edilmesi için bitkiye ihtiyaç duyulmaktadır (Jones vd., 2009). Ayrıca Abbasi vd. (2012), kafeik asit türevlerinin sentezinin zor, pahalı ve zaman alıcı olması nedeniyle bu bileşiklerin doğada yetişen bitkilerden elde edildiğini bildirmektedirler. Bu da özellikle ekinezya gibi metabolit üretiminin köklerde gerçekleştiği bitki türleri için yok olma tehlikesini de beraberinde getirmektedir. Bu önemli sorunun yanı sıra bitki materyallerinin mikroorganizmalar tarafından istilası, standart miktar ve kalitede metabolit elde edilememesi, saf ve standardize bitki materyali kıtlığı, mevsime bağlılık gibi sorunlar da doğadan toplama yoluyla metabolit üretiminin en önemli problemleri olarak ortaya çıkmaktadır (Raman vd., 2004). Bütün bu olumsuzlukları ortadan kaldırmada başarı ile kullanılma potansiyeli bulunan *in vitro* sekonder metabolit üretim teknikleri, bu nedenle günümüzde en önemli araştırma konularından biri haline gelmiştir (Jones vd., 2009).

Değerli bir çok sekonder metabolitin bitkide sentezlendiği yerlerden biride köklerdir (Flores vd., 1987; Hartmann, 1996; Wink, 2011; Demirci vd., 2015). Kök kaynaklı sekonder metabolitlerin geleneksel yöntemlerle elde edilmesi, bitkilerin topraktan sökülmesi ve köklerin değişik yöntemlerle ekstraksiyonuna dayanmaktadır. Bu durum plantasyonların her yıl yenilenmesi zorunluluğunu gerektirdiği gibi, özellikle doğada yetişen birçok bitki için yok olma tehlikesini de beraberinde getirmektedir. Bütün bu zorlukları aşmak ve doğadaki tahribatı önlemek için *in vitro* teknikler özellikle kök kaynaklı metabolitler için büyük bir fırsat sunmaktadır. Ancak metabolit verimliliğinin çok daha yüksek seviyelere çıkartılması gerekmektedir (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002; Lila, 2005; Demirci vd., 2015).

2.6. *In Vitro* Koşullarda Kök Kaynaklı Sekonder Metabolit Üretiminin Artırılmasında Kullanılan Dışsal Uygulamalar

In vitro koşullarda sekonder metabolit üretiminin en önemli amacı, yüksek kalite ve miktarda metabolitin elde edilmesidir. Bu nedenle metabolit verim ve kalitesini artırmak amacıyla çok farklı dışsal uygulamalar yapılabilmektedir. *In vitro* kültür ortamlarında köklerin iyi derecede gelişebilmesi ve sekonder metabolit üretebilmesi için en kritik faktörlerden birisi besin ortamının içeriğidir. Uygun besin ortamı kompozisyonu sağlandığında, hem kök büyümesinin hem de sekonder metabolit üretiminin arttığı tespit edilmiştir (Baque vd., 2010). Nitekim sakkaroz, mineral maddeler, Hindistan cevizi sütü, büyümeyi düzenleyiciler gibi ortam bileşenleri ile pH ve ortam kuvvetinde yapılan değişimlerle kök kaynaklı sekonder metabolit birikimin artırılabilceğine yönelik çok sayıda araştırma sonucu bulunmaktadır (Vanhala vd., 1998; Wu vd., 2006; Park ve Lee, 2009; Abbasi vd., 2012; Praveen ve Murthy., 2012; Oba vd., 2012; Siva vd., 2012; Pandey vd., 2014; Demirci vd., 2015). Besin ortamlarında yapılan değişiklikler bitkilerde stres faktörü olarak algılanarak, bitkinin savunma mekanizmasının aktifleşmesine ve ilgili genlerin etkisi ile sekonder metabolit üretiminin teşvik edilmesine neden olmaktadır (Giri ve Narasu, 2000). Nitekim besin ortamlarına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri maddelerin fenilalanin amonyum liyaz, klorofilaz ve peroksidaz

enzimlerinin artmasına neden olarak metabolit üretimini artırırken (Abbasi vd., 2012); şekerlerin neden olduğu osmotik stresin de, kalkon sentez geni gibi içinde antosiyaninlerin de bulunduğu fenolik bileşiklerin sentezinde rol alan genlerin ekspresyonunu sağlayarak (Takeuchi vd., 1994) bu artışı sağladıkları tespit edilmiştir.

Kök kültürlerinde kök gelişimi ve sekonder metabolit birikimini etkileyen bir diğer faktör de pH olup, farklı bitkilerde yapılan çalışmalarda sekonder metabolit üretiminin artırılmasında oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir (Thimmaraju vd., 2002; Wu vd., 2006; Praveen ve Murthy, 2012). Bu çalışmalarda pH'deki değişimlerin ortamın asidikliğini ya da bazikliğini değiştirerek bitki materyalleri üzerinde strese neden olduğu ve bu şekilde metabolit birikimini artırdığı ifade edilmiştir.

In vitro koşullarda sıcaklık, ışık, çalkalama hızı gibi fiziksel şartlarda yapılan değişimler de sekonder metabolit üretimini artırıcı etkilerde bulunmaktadır. Sıcaklık ve ışık *in vitro* kültürlerde hücre veriminde artış ya da azalışlarla sekonder metabolit birikimini uyarırken; çalkalama hızı sıvı kültürlerde homojen dağılımı ve hücrelerin sürekli yer değiştirmesi ile oksijene ulaşılmasını sağlayarak metabolit verimini değiştirmektedir (Bourgaud vd., 1999; Kuzovkina vd., 2001; Shibasaki-Kitakawa vd., 2003). Farklı ışık yoğunluklarının (Liu vd., 2002), ışıklandırma sürelerinin (Wu vd., 2007a) ve farklı dalga boylarındaki ışık uygulamalarının (Wang vd., 2001), kök gelişimi ve sekonder metabolit birikimini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Karanlık ve ışık altında büyütülen *Echinacea purpurea* bitkisinde ışığın etkisinin kabul edilebilir düzeyde olduğunu ve kafeik asit miktarlarının önemli derecede artırdığını tespit eden Guarnerio vd., (2012), çevresel etmenlerin kullanılarak bitki metabolizması ile sekonder metabolit birikiminin önemli ölçüde değiştirilebileceğini ifade etmişlerdir.

Sıcaklık ve ışık, kök kaynaklı metabolit verimini etkileyen en önemli faktörler arasında yer almakta olup; sıcaklık stresi, bitkilerde protein denatürasyonu, lipid sıvılaşması ve membran bütünlüğünün bozulması gibi birçok fizyolojik,

biyokimyasal ve moleküler değişikliklere neden olmaktadır (Levitt, 1980). Bu değişiklikler sonucunda stres sinyallerinin etkisi ile sekonder metabolit üretimi artmaktadır (Zobayed vd., 2005).

Işığın, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi üzerine olan etkisinin yanında (Halliday ve Fankhauser, 2003), primer ve sekonder metabolitlerin üretiminde de etkili olduğu bilinmektedir (Vanquez-Flota ve De Luca 1998; Liu vd., 2002; Hemm vd., 2004). Nitekim ışığın antosiyanin birikimini artırdığı kabul görmüş ve kanıtlanmış bir olgu olup, ışığın fotooksidatif strese neden olarak, hücrelerin ışığa tepki olarak antosiyanin sentezini artırdıkları tespit edilmiştir (Song ve Lee, 1998).

Karanlık koşullar altında kültüre alınan *Echinacea purpurea* köklerinin daha kalın olmakla birlikte, aydınlık koşullarda kültüre alınan köklerin antosiyanin ve kafeik asit türevleri birikiminin daha fazla olduğu belirlenmiştir (Abbasi vd., 2007b). Farklı bitkilerde yapılan çalışmalarla da kök kültürlerinde sıcaklık, ışık gibi çevresel faktörlerin sekonder metabolit birikimi üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalardan birinde sıcaklık ve ışığın birlikte etkilerini pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinde inceleyen Thimmaraju vd. (2002) de, kök miktarı ve ginsenosit miktarı açısından en uygun koşulların 20°C'de 16 saat ışık, 13°C'de 8 saat karanlık uygulamasının olduğunu belirlemişlerdir. Yu vd. (2005) ise ginseng (*Panax ginseng*) de kök gelişimi ve sekonder metabolit üretiminin artırılması için kök kültürlerine 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodunda farklı sıcaklıkların etkilerini araştırmış, aydınlık ve karanlıkta farklı sıcaklıklarda sekonder metabolit üretiminde önemli derecede değişimlerin olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışma içerisinde aydınlık ortamda kullanılan ışıklandırmanın ve ışık renginin de önemli olduğu, en yüksek sekonder metabolit üretiminin sırasıyla kırmızı ışık, karanlık, mavi ışık ve florasan ışıktaki olduğunu bildirilmiştir.

Besin ortamlarında ve kültür koşullarında yapılan değişiklikler yanında, biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bitkilerde savunma mekanizmalarını uyardığı ve bu savunma sisteminin önemli birer ögesi olan sekonder metabolitlerin

sentezini artırdıkları bilinmektedir (Ramakrishna ve Ravishankar, 2011). Bu nedenle *in vitro* koşullarda kültürleri strese sokan faktörler kullanılarak sekonder metabolit birikimini artırma eğilimi birçok bitkide farklı metabolitlerin elde edilmesinde yaygın olarak uygulanmaktadır (Zhao vd., 2010; Çetin vd., 2011; Çetin vd., 2012). Kök kültürlerinde fungal, bakteriyel ve maya kaynaklı biyotik elisitörler ile polisakkaritler, glikoproteinler, inaktif enzimler, ksantan ve kitosan, ağır metal tuzları gibi abiyotik elisitörler çeşitli sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılmıştır (Guo vd., 1992; Rajendran vd., 1994; Ramachandra vd., 1996).

Absisik asitle birlikte elisitör olarak kullanılan salisilik asit, dimetil sülfoksit, kitosan gibi farklı maddelerin kök kültürlerinde kullanıldığı çalışmalarda, dimetil sülfoksitin kültürün canlılığına ve sekonder metabolit üretimine olumsuz etkilerde bulunduğu; kitosan, absisik asit ve salisilik asidin hem kök gelişimini hem de sekonder metabolit üretimini artırdığı tespit edilmiştir (Shinde vd., 2009; Panwar ve Guru, 2013).

Farklı mineral maddelerde *in vitro* kültürlerde metabolit üretimini teşvik etmek amacıyla elisitör olarak bir çok bitki kültüründe kullanılmış; bu çalışmalarda Li^+ , Fe^{3+} , Rb^+ , Sr^{2+} , Zr^{4+} , Cs^+ , Hf^{4+} , Ti^{4+} , Co^{3+} , Cu^+ , Pd^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^+ , Pt^{2+} , Pb^{4+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} gibi ağır metallerin strese neden olarak hem kültür canlılığı hem de metabolit birikimini etkilediği belirlenmiştir (Cobbett, 2000; Schützendübel vd., 2001; Schützendübel ve Polle, 2002; Ali vd., 2006). Ancak bu ağır metallerin daha çok köklerde biriktiği bilinmekle birlikte, kök kültürlerinde bunların metabolit birikimine olan etkilerinin incelendiği araştırma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmaların birinde kırmızı ada çayı olarak bilinen *Salvia miltiorrhiza* saçak kök kültürlerinde Ag^+ uygulamasının litospermik asit ve öncül maddesi olan rosmarinik asidin üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir (Xiao vd., 2010). Cheng vd., (2013) ise Ag^+ uygulamasının, elisitör olarak çokça kullanılan Metil Jasmonat uygulanmasına göre sekonder metabolit birikimini daha fazla artırdığını tespit etmişlerdir.

Datura metel saçak kök kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda NaCl, Na₂SO₄, CaCl₂, SA, AlCl₃ kullanılması ile tıbbi olarak oldukça önem taşıyan hiyosiyamin ve skopolamin metabolitlerinin üretiminin artırıldığı saptanmıştır (Ajunгла vd., 2009).

Bitkilerde kök kaynaklı metabolitlerin birikimini artırmada kullanılabilecek potansiyeline sahip elisitörlerden biri de, bazı bakteriler ve mantarların kullanıldığı biyotik stres uygulamalarıdır. Bu çalışmalardan birinde, *Taverniera cuneifolia* saçak kök kültürlerinde ilaç ve gıda sanayisinde oldukça önemli olan glisirizik asit üretimini artırmak için 5 farklı bakteriyel ve 5 farklı fungal elisitör kullanılmıştır. Araştırma sonunda bakteriyel elisitör olarak kullanılan *Rhizobium leguminosarum*'un glisirizik asit üretimini önemli derecede artırdığı belirlenmiştir (Awad vd., 2014). Fungus olan *Trichoderma atroviride* (Wu vd., 2007b) ile *Bacillus cereus* (Ming vd., 2013) bakterisinin, tanshinon biyosentezinde öncül olan bileşiklerin sentezinden sorumlu genleri aktif hale getirerek başta tanshinon olmak üzere bazı metabolitlerin birikimini artırdığı saptanmıştır. *Apergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium moniliforme* kullanılması ile de *Datura metel* bitkisinin köklerinde hiyosiyamin ve skopolamin üretiminin artırıldığı tespit edilmiştir (Ajunгла vd., 2009).

E. purpurea'da sekonder metabolitlerin üretimini artırmak amacıyla yapılan araştırmalar incelendiğinde, transgenik kök kültürlerine ait çalışmaların son derece kısıtlı olup, nitrik oksit, gibberellik asit (GA₃), triazoller ve sonikasyon uygulamaları ile sınırlı kaldığı görülmektedir.

Bu çalışmaların birinde Abbasi vd. (2012) *E. purpurea* türüne ait saçak kök kültürlerinde GA₃'ün sekonder metabolit üretimini artırmadaki etkinliğini incelemişlerdir. GA₃'ün 8 farklı konsantrasyonunun kullanıldığı araştırma sonucunda, 0.025 µM konsantrasyonunda kullanılan GA₃'ün, kök yaş ve kuru ağırlığı, renk farklılığı ve sekonder metabolit birikimi göz önüne alındığında, en uygun sonuç veren konsantrasyon olduğu belirlenmiştir. Araştırmada GA₃'ün *E. purpurea* bitkilerinde sekonder metabolit üretimini artırmak için çok iyi bir ajan olduğu, fakat konsantrasyonlarının çok iyi seçilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Wu vd. (2007c), *E. purpurea* bitkisinde, nitrik oksidin elisitör olarak köklerdeki sekonder metabolit sentezine etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmalarında, dış kaynaklı bir nitrik oksit üreticisi olan sodyum nitroprusit (SNP)'in fenolikler, flavonoidler ve kafeik asit türevlerinin miktarını artırdığını tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda 100 μ M SNP uygulamasının *E. purpurea* köklerinde sekonder metabolit sentezlenmesini artıran optimum değer olduğu, 250 μ M SNP uygulamasının ise maksimum doz olduğu da belirtilmiştir.

Jones vd. (2009) de *E. purpurea*'da tıbbi olarak önemli olan kaftarik asit ve kikorik asitin miktarlarını artırmak amacıyla *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkilerde GA₃ ile triazollerin (paklobutrazol, unikonazol) etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda GA₃ ile paklobutrazol kombinasyonunun *in vitro* bitkilerin köklerinde kaftarik asit miktarını artırdığı, ancak sürgünlerindeki kaftarik asit miktarı üzerinde çok az etki gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca, kontrol bitkilerine göre uygulama yapılmış *in vitro* bitkilerin köklerinde kikorik asitin daha yüksek olmasına karşın, bu kıyaslamaların sürgünlerde çok daha düşük olduğu da belirlenmiştir.

Sonikasyon (ultrasonik ses dalgası uygulaması) kök kültürlerinde etkili olduğu gösterilmiş diğer bir stres faktörüdür. Sonikatör adı verilen bir cihaz yardımı ile bitkiler ultrasonik ses dalgalarına maruz bırakıldıklarında, gazların ve sıvı besinlerin taşınımı ile fermantasyonlarındaki hızlanma sonucunda biyolojik aktivitelerinin artmasına neden olmaktadır. Metabolizmadaki bu ani artış bitkilerde strese neden olmakta ve sekonder metabolit üretimini artırmaktadır (Wu ve Ge, 2004; Wang vd., 2006). Sonikasyonun *Beta vulgaris* bitkilerine ait saçak kök kültürlerinde %8-12'lik artış sağlandığı ve sekonder metabolit birikiminin arttığı tespit edilmiştir (Thimmaraju vd., 2002). Liu vd., (2012) *Echinacea purpurea* saçak kök kültürlerinde sonikasyon uygulamaların saçak köklerde büyümeyi uyarmasının ve kikorik asit türevlerinin sentezini artırmasının, IAA biyosentezinin ve fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesinin artmasına bağlı olarak meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Elisitör olarak kullanılan uygulamalar sonucunda, bitkilerde stres meydana gelmesi ile kendilerini korumak için ya da sekonder metabolitlerin üretim yollarına doğrudan dahil oldukları için, bu metabolitleri artırma yoluna giderler. Ancak uygulamalar içinde bitki, hücre, doku ve organlarının canlılığını olumsuz yönde etkilemeksizin fazla miktarda metabolit üretiminin sağlanması çok daha önemli bir yaklaşımdır. Bu nedenle canlılık, büyüme ve gelişme üzerinde olumsuz etkileri bulunmayan, çevre ve insana dost uygulamalara yer verilmesi tercih edilmektedir. Bu bağlamda, BR'lerin doğal bitki büyüme düzenleyicileri olması ve FA'ların aromatik aminoasit olmaları nedeni ile canlılara ve çevreye zararları olmayan elisitör uygulamaları oldukları bilinmektedir.

2.7. Brassinosteroidler

Brassica cinsine ait yaklaşık 60 farklı türün polen ekstraktları çeşitli yöntemlerle incelemiş ve ilk olarak *Brassica napus* (kolza) polenlerinden elde edilmiş olan Brassinosteroidler (BR'ler)'in, büyümeyi teşvik edici özellikler taşıdıkları ve fasulyede boğum aralarında aşırı uzamaya neden oldukları tespit edilmiştir (Mitchell vd., 1970).

Brassinler olarak adlandırılan, bitki büyümesini yüksek oranda teşvik edici özellik gösteren bu bileşiklerin kimyasal yapısını belirlemek amacı ile yapılan araştırmada, 40 kg polenden 4 mg kristal elde edilmiş ve en aktif olan bu bileşik brassinolide (BL) olarak tanımlanmıştır (Grove vd., 1979).

Yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalar sonucunda bitki büyümesi ve gelişimi için gerekli oldukları bilinen bu bileşiklerin yeni bir bitki hormonu sınıfı olarak gruplandırılması gerektiği ifade edilmiştir. BL, steroid yapıdaki ilk bitki hormonu olup, BL ile onun stereo izomeri olan 24-epibrassinolide (24-eBL) kimyasal olarak sentezlenmiştir (Sasse, 1999; Clouse, 2002; Bajguz ve Tretyn, 2003).

BR'lerin bitkiler aleminde ne kadar yaygın oldukları, günümüze kadar araştırılmış olan tüm bitkilerde bulunması ile görülmüştür (Sasse, 1997). Bu bileşikler, nanogram gibi çok düşük konsantrasyonlarda bulunmakla birlikte; bitki türlerine, bitkinin yaşına ve bitkinin tohum, gövde, kök, çiçek gibi kısımlarında bulunmasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedirler (Fujioka, 1999).

Büyümekte olan dokular ile polen ve olgunlaşmamış tohum gibi üreme organlarının, olgun dokulara oranla daha fazla miktarda BR içerdikleri bilinmektedir (Schmidt vd., 1998; Clouse, 2002). BR'lerin tamamı biyolojik olarak aktif değildir, aktif olanlarından 24-eBLve 28-homobrassinolide (28-hBL) fizyolojik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Rao vd., 2002). BR'lerin kanser hücrelerine karşı savunma sistemine etki ederek bu hücrelerin baskılanması ya da yok edilmesinde etkili oldukları bilinmektedir (Tang ve Porter, 1997; Matsuya vd., 2005; Shi vd., 2005). Dolayısıyla BR'lerin çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde başarıyla kullanılabilecekleri ifade edilmektedir. Bu nedenle BR'lerin ilaç sanayiinde önemli olabilecekleri düşünülmektedir.

BR'lerin zirai ilaçlamada pestisit kullanımı sonrasında ortaya çıkan kalıntı sorununa çözüm olabilme potansiyelinin olması diğer bir etkili yönü olarak bilinmektedir (Khripach vd., 2000).

Benzer şekilde BR'leri "gelecek vadeden, çevreyle dost, insan ve çevre sağlığını pestisitlerden korumak için geniş biçimde kullanılmaya uygun doğal bileşenler" olarak tanımlayan Xia vd. (2006) de, bu doğal bitki hormonlarının insanlara ve diğer zararlılara karşı zararlı etkisinin görülmediğini belirtmişlerdir. Kısaca BR'ler toksik özellik taşımadığı gibi zararlı pestisit kalıntılarını azaltarak gıda güvenliğini kontrol altına alma potansiyeli taşıdığı için umut ışığı olan bileşiklerdir.

BR'ler bitkilerde tohum çimlenmesi, rhizogenesis, bitki gelişimi, çiçeklenme, köklenme, hücre genişlemesi ve uzaması gibi pek çok fizyolojik olayı etkilemektedirler (Clouse ve Sasse, 1998; Nemhauser ve Chory, 2004). BR'lerin

bu etkilerinden başka fungus ve hatta virüs gibi çeşitli biyotik; sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve ağır metal gibi abiyotik streslere karşı bitkilere dayanım kazandırdıkları da bilinmektedir. Bitkilerin herhangi bir strese maruz kalmaları durumunda o strese karşı koyabilmek için bir takım işlevler üstlendikleri bilinmektedir. Nitekim su stresine (Li ve Van Staden, 1998), sıcaklık stresine (Wilén vd., 1995), ağır metal stresine (Alam vd., 2007; Hayat vd., 2007) ve tuz stresine (Çoban ve Göktürk Baydar, 2016) karşı bitkileri antioksidan sistem ile korudukları yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir. Ayrıca dışsal uygulamalarla sekonder metabolitlerin sentezini artırdıkları da bilinmektedir (Farooq vd., 2009; Farooq vd., 2010; Çoban ve Göktürk Baydar, 2017).

BR'lerin transgenik saçak kök kültürlerinde ve ekinezya bitkilerinde sekonder metabolit üretimi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamasına karşın, bitkilere dışsal uygulamalarla büyüme, gelişme ve metabolit birikimi üzerine etkilerinin incelendiği bazı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde Swamy vd. (2009), ıtır (*Pelargonium graveolens*) bitkisine BR uygulaması ile bitkinin çeşitli büyüme parametrelerini ve sekonder metabolit üretimini incelemişlerdir. Araştırmacılar bitkiye 3 farklı konsantrasyonda (0.5, 1, ve 3 μ M) 24-eBL uygulamışlardır. Araştırma sonucunda 24-eBL'nin en düşük konsantrasyonunda dahi bitki gelişiminin olduğunu tespit etmişlerdir. 24-eBL uygulaması ile bitki boyunun, kök ve sürgün taze ağırlığının, kök ve sürgün kuru ağırlığının, yapraktaki klorofil miktarının, yaprak alanının ve bitkideki sekonder metabolit üretiminin arttığı ifade edilmiştir. Aynı araştırmacılar (Swamy ve Rao, 2011), *Plectranthus forskohlii* bitkisinde BR uygulamalarının bitki uzunluğu, yaprak sayısı, yaprak alanı, sürgün ve yaprak kuru ağırlığının yanı sıra, klorofil ve bazı karbonhidratların miktarı ile fotosentez oranını da artırdığını belirlemişlerdir. Koca ve Karaman (2015) tarafından *Ocimum basilicum* bitkisinde dışsal uygulama ile BR'nin etkileri incelenmiş, toplam fenolik madde, flavonoid madde, rosmarinik asit ve kafeik asit miktarlarını arttırdığı, PAL aktivitesinin önemli derecede yükseldiği, buna karşın kikorik asit miktarlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını tespit etmişlerdir.

Farooq vd. (2009), çeltik bitkisinde dışsal olarak uygulanan BR'lerin sekonder metabolit ve büyüme parametreleri üzerine etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında bitki yapraklarına 28-hBL ve 24-eBL uygulamışlardır. Strese maruz kalan bitkilerde fide boyunun, gaz alışverişinin ve kuru ağırlığın olumsuz etkilendiği ifade edilmiştir. BR uygulaması ile stresin olumsuz etkileri ve zararlarının ortadan kaldırıldığı, protein sentezinin teşvik edildiği, klorofil sentezi artırılarak fotosentez hızının ve kuru ağırlığın arttığı belirtilmiştir. Ayrıca antioksidan enzimlerin aktiviteleri, fenolik bileşikler ve antosiyaninler ile serbest prolin miktarının da arttığını ifade eden araştırmacılar, bu şekilde bitkinin strese karşı olan toleransının da arttığını ifade etmişlerdir.

Bu alanda yapılan bir diğer araştırmada da Farooq vd. (2010), dışsal poliamin, salisilik asit, BR, glisinbetain ve nitrik oksit uygulamalarının pek çok üründe abiyotik strese toleransı artırdığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında antosiyanin miktarlarını da belirleyen araştırmacılar, uygulanan bu kimyasal maddelerin çeltik bitkisinde oksidatif zararlanmadan korumada önem taşıdığını ve antioksidan etkili metabolitlerin sentezlenmesini sağladığını ifade etmişlerdir.

Çoban ve Göktürk Baydar (2017) ise nane (*Mentha piperita*)'de 24-eBL uygulamalarının, toplam fenolik madde, uçucu yağ oranı ve kalitesini kontrol bitkilerine göre önemli derecede artırdığını tespit etmişlerdir.

2.8. L-Fenilalanin

Hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmada yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem de besin ortamlarına öncül madde ilave edilmesidir (Contin vd., 1999). Hidrofobik özellikte, aromatik amino asit olan L-fenilalanin (2-amino-3-fenil propanoik asit, $C_9H_{11}NO_2$) (FA) hücrelerde fenilpropanoid ve flavonoid metabolik yollarıyla birçok fenolik bileşiğin sentezini başlatan bir bileşiktir.

Şikimat/arogenat biyosentez yolu *L*-fenilalanin, *L*-tirozine ve *L*-triptofan olmak üzere üç aromatik amino asitin oluşumunu sağlar. Bunlar fenilpropanoitler içerisindeki çeşitli sekonder metabolitler ile oksin tipi bitki hormonları için önemli öncül maddelerdir. *L*-fenilalanin ve *L*-tirozinin meydana gelmesi için deoksi-d-arabinoheptulosonat sentaz, 3-dihidrokuinat sentaz, 3-dihidrokuinat dihidrataz, şikimat 3-dihidrogenaz, 3-fosfoşikimat 1-karboksiviniltransferaz, korizmat sentaz, korizmat mutaz, pafenat aminotransferaz, arogenat dihidrogenaz ve arogenat dihidrataz enzimleri görev alır (Dey ve Harborne, 1997).

Bitkisel kökenli birçok fenolik bileşik, fenilpropanoid iskeletinden oluşmuştur (Croteau vd., 2000). Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalarda herhangi bir stresle karşılaşmaksızın sadece fenilpropanoid yolunun uyarılması ile sekonder madde miktarı artabilmektedir (Sharan vd., 1998; Szabo vd., 1999; Kim vd., 2006). Fenolik bileşiklerin birçoğu, bir aromatik aminoasit olan fenilalaninden bir amonyum molekülünün ayrılmasıyla meydana gelen sinnamik asitten türevlenmektedir (Boudet, 2007). Fenilpropanoid türevlerinin sentezindeki ilk kararlı adım, fenilalaninin sinnamik asite fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla dönüşümüdür. Sinnamik asitten daha sonra lignin, antosiyanin, flavonoid ve fenolik bileşiklerin sentezi gerçekleşmektedir (Perassolo vd., 2007). Bu nedenle fenolik bileşiklerin sentezinde öncül bir madde olan FA'nın, bitkilere uygulanması ile enzimatik yollar uyarılıp, bu bileşiklerin üretimi artırılabilir. Nitekim *in vitro* koşullarda FA uygulaması ile sekonder metabolit üretiminin artırılabilirliği önceden yapılan bazı araştırmalarla da ortaya konulmuştur (Al-Gendy vd., 2015; Koca ve Karaman, 2015).

FA metabolik yollardaki diğer öncül maddelerle kıyaslandığında daha ucuz ve metabolit üretiminde etkili bir bileşik olarak kendini göstermektedir (Tohge vd., 2013). Kakegawa vd. (1995), hücreler arasında yüksek seviyelerde biriken FA'nın, antosiyanin ve flavonoidlerin biyosentetik öncül maddesi olarak kullanıldığını, aynı zamanda fenilalaninin amonyum liyaz ya da kalkon sentaz gibi fenolik bileşik sentezinde görev alan enzimlere ait genlerin

transkripsiyonunu teşvik edici bir çeşit sinyal görevi üstlendiğini bildirmişlerdir. Dahası FA'nın, besin ortamlarına hücreler arası miktarının düşük olduğu dönemlerde ilave edildiğinde, içsel FA miktarını hemen yükselterek metabolit birikimini başlattığı da tespit edilmiştir. FA, fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzimi aracılığı ile sinnamik asitte dönüşmektedir (Nelson ve Cox, 2000). PAL aktivitesi, besin maddesi eksikliği, ışık, hastalık ve zararlı etmenlerin etkisiyle artış gösterir. Örneğin, fungus bulaşması PAL'ı kodlayan mRNA transkripsiyonunu tetikleyerek bitkide PAL düzeyinde bir artışın ortaya çıkmasına ve böylelikle fenolik bileşiklerin sentezinin uyarılmasına neden olmaktadır (Kodan vd., 2002).

Iphiona mucronata bitkisinde yapılan çalışmada dışsal FA uygulamalarının *in vitro* koşullarda hücre büyümesini teşvik ettiği ve flavonoid miktarını artırdığı tespit edilmiştir (Al-Gendy vd., 2015). Çilek hücre süspansiyon kültürlerinde ise 2 gün aralıklarla yapılan FA uygulamasının antosiyanin birikimini kontrol kültürlerine göre %81, bir kez FA uygulamalarına göre de %30 oranında artırdığını tespit etmişlerdir (Edahiro vd., 2005).

Mobin vd. (2015)'nin transgenik olmayan *E. purpurea* kök kültürlerinde kök gelişimi ve sekonder metabolit üretimine aromatik amino asitlerin etkilerini incelemek için yaptıkları çalışmada, L-fenilalanin (FA) (0, 0.5, 1.0 ve 5mM), L-triptofan (TRP) (0, 0.5, 1.0 ve 5mM), glifosat (GLY) (0, 0.5, 1.0 ve 5mM), FA+GLY (0.5 + 0.5 mM) ve TRP+GLY (0.5 + 0.5 mM) uygulamaları yapmışlardır. Sonuçlar incelendiğinde FA'nın kök gelişimine ve kök kuru ağırlığına diğer uygulamalara göre istatistiksel olarak önemli derecede artırdığını tespit etmişlerdir. Toplam fenolik madde bakımından yapılan incelemeler sonucunda ise FA ve TRP uygulamalarının toplam fenolik madde sentezini artırdığı, ancak TRP'nin olumlu uyarıcı etkisinin FA'e göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Flavanoid madde miktarları incelendiğinde ise, FA ve TRP uygulamalarının ikisinde de düşük dozlarının flavanoid sentezini artırırken, doz yükseldikçe flavanoid sentezinin azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak, transgenik olmayan *E. purpurea* kök kültürlerinde kök gelişimi ve sekonder metabolit madde üretimleri göz önünde

bulundurulduğunda FA uygulamalarının optimum konsantrasyonlarda etkili bir strateji olabileceğini tespit etmişlerdir.

Bu tez çalışmasında kök gelişimi ve sekonder metabolit üretiminde etkili bileşikler olması nedeniyle, kök gelişimi ve kafeik asit türevlerini artırmak amacıyla dışsal uygulama olarak FA ile bir brassinosteroid analogu olan 24-eBL uygulamalarına yer verilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, transformasyon işlemleri sırasında kullanılacak olan bitkilerin elde edilmesi için eksplant kaynağı olarak *Echinacea purpurea* tohumları kullanılmıştır. Bu tohumlar, SDÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden temin edilmişlerdir. *A. rhizogenes* ile yapılan transformasyon çalışmalarında ise Liu vd. (2006)'nin *E. purpurea*'da saçak kök oluşumunda kullandığı *A. rhizogenes* ATCC 43057 bakteri suşu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Tohumlar için en uygun yüzey sterilizasyon yöntemi ile çimlendirme ortamını belirlemek amacıyla, daha önce ekinezya bitkisine ait tohumların sterilizasyonunda ve çimlendirilmesinde farklı araştırmacılar tarafından önerilen yöntemler kullanılarak ön çalışmalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen sterilizasyon yöntemi ve çimlendirme ortamları kullanılarak araştırma yürütülmüştür.

Kullanılan yüzey sterilizasyon yöntemleri:

1. *Yöntem:* Tohumlar 30 saniye %70'lik etilalkolde bekletilmelerinin ardından, 15 dakika boyunca içinde %0.1'lik Tween 20 bulunan %15'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde çalkalanarak sterilize edilmiş ve sonrasında her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su içinde durulanmışlardır (Liu vd., 2006).

2. *Yöntem:* Tohumlar 30 saniye %70'lik etilalkolde bekletilmelerinin ardından 18 dakika boyunca içinde %0.1'lik Tween 20 bulunan %5.4'lük sodyum hipoklorit çözeltisi içinde çalkalanarak sterilize edilmiş ve sonrasında her biri

5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su içinde durulanmışlardır (Choffe vd., 2000).

3. Yöntem: Tohumlar 30 saniye %100'lük etilalkolde bekletilmelerinin ardından 15 dakika boyunca içinde %0.1'lik Tween 20 bulunan % 5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde çalkalanarak sterilize edilmiş ve sonrasında her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su içinde durulanmışlardır (Trypsteen vd., 1991).

Deneme 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 200 tohum olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilen tohumlar, 30 gl⁻¹ sakkaroz ve 6 gl⁻¹ agar içeren ½ kuvvetindeki MS besin ortamına aktarılmışlardır (Liu vd., 2006). Tohumlar bu besin ortamına dikilmelerinin ardından sıcaklığı 25°C, ışıklandırma periyodun da 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olarak ayarlandığı koşullarda kültüre alınmışlardır (Şekil 3.1). 21 günlük çimlenme süresi sonrasında enfeksiyon oranı ve çimlenme oranları dikkate alınarak en uygun sterilizasyon yöntemi tespit edilmiştir.



Şekil 3.1. Kültür tüpleri içerisinde çimlendirilmiş ekinetza bitkileri

Kullanılan çimlendirme ortamları:

En uygun sterilizasyon yöntemi belirlendikten sonra, tohumların farklı besin ortamlarındaki çimlenme başarısını karşılaştırmak amacıyla üç farklı besin ortamı kullanılmıştır. Bu besin ortamları;

1. *Besin ortamı:* 30 gl⁻¹ sakkaroz ve 6 gl⁻¹ agar içeren ½ kuvvetindeki MS besin ortamı (Liu vd., 2006).

2. *Besin ortamı:* 30 gl⁻¹ sakkaroz ve 6 gl⁻¹ agar içeren MS besin ortamı (Wang vd., 2006).

3. *Besin ortamı:* 30 gl⁻¹ sakkaroz, 7 gl⁻¹ agar ve 0.5 mg⁻¹ benzil amino purin (BAP) içeren MS besin ortamı (Harbage, 2001).

Deneme 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 200 tohum olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 21 günlük çimlenme süresi sonunda, bu üç besin ortamına ekilen tohumların çimlenme oranları belirlenmiş ve en yüksek çimlenme oranı elde edilen besin ortamı transformasyon çalışmalarında kullanılan bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılmıştır.

3.2.2. *A. rhizogenes* suşuna ait bakterilerin çoğaltılması ve inokülasyonu

A. rhizogenes ATCC 43057 suşuna ait bakterilerin çoğaltılarak sonraki aşamalarda kullanılabilmesi için, literatürde belirtilen ve bakterilerin çoğaltımı için uygun olan LB, YEB ve YMB bakteri büyüme ortamları hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). 15 ml'lik steril tüplerde hazırlanan sıvı ortamlara aktarılan bakteriler, 25±1°C sıcaklık ve 185 rpm çalkalama hızında hem aydınlık hem de karanlık koşullarda 48 saat boyunca kültüre alınmışlardır. 48 saatlik periyot boyunca sürekli takip edilen bakterili besin ortamlarında, bakteri çoğalmasının karanlık koşullarda inoküle edilen YMB besin ortamında meydana gelmesi nedeniyle, çalışmanın sonraki aşamalarında bakterilerin çoğaltılmasında karanlık koşul ile YBM ortamı kullanılmıştır. Sıvı besin ortamından steril

koşullarda öze yardımı ile alınan bakteriler, içinde katı YMB ortamı bulunan petri kutularına inoküle edilmişlerdir. 48 saatlik inokülasyon süresinin sonunda katı ortamda oluşan koloniler (Şekil 3.2), yine steril koşullarda, steril kürdanlar ile alınarak transformasyonda kullanılmak üzere sıvı YMB ortamına aktarılarak çoğaltılmış ve gliserollü stokları oluşturularak steril eppendorf tüpleri içerisinde -80°C’de depolanmışlardır.

Çizelge 3.1. *Agrobacterium rhizogenes*’in çoğaltılmasında kullanılan ortamlarının içerikleri

YBM Ortamı		LB Ortamı		YEM ortamı	
İçeriği	Miktarı (g.l ⁻¹)	İçeriği	Miktarı (g.l ⁻¹)	İçeriği	Miktarı (g.l ⁻¹)
Yeast ekstrakt	1.0	Tryptone 0 g	10.0	Beef extract	5.0
Mannitol	10.0	Yeast extract g	5.0	Yeast extract	1.0
Dipotasyum fosfat	0.5	NaCl 10.0 g	10.0	Peptone	5.0
Magnezyum sülfat	0.2	Agar (katı ortam)	20.0	Sucrose	5.0
Sodyum klorür	0.1	pH	7.0	Magnezyum sülfat	0.3
Agar (katı ortam)	10.0			Agar (katı ortam)	20.0
pH	6.8			pH	7.2



Şekil 3.2. Katı besin ortamında elde edilen *Agrobacterium rhizogenes* kolonileri

Bitki eksplantlarının *Agrobacterium rhizogenes* ile inokülasyonu için, stoklardan alınarak sıvı haldeki YMB besin ortamında yeniden aktif hale getirilen ve çoğaltılan bakteriler, öze yardımı ile katı besin ortamına aktarılmışlardır. 48

saat sonunda oluşan koloniler, transformasyon işleminin gerçekleşeceği sıvı besin ortamlarında oğaltılmışlardır.

3.2.3. Bitki eksplantlarının *A. rhizogenes* ile inokulasyonu ve saçak köklerin oluşturulması

Ekinezya bitkisinde en yüksek transgenik saçak kök olumunu elde etmek için öncelikle farklı eksplant kaynakları ile transformasyon yöntemleri denenmiştir. Bu nedenle *in vitro* koşullarda tohumların imlendirilmesi ile elde edilen bitkilerden yaprak, hipokotil ve epikotil kısımları alınarak, transformasyon aşamasında bakterilerin eksplantlara nüfus etmesinde etkili olabilecek farklı uygulamalar yapılmıştır. Bu uygulamalar aşağıda sunulmuştur.

1. *uygulama:* 10°C'de 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen bakteriler dibe çöktürüldükten sonra, pelet faz 20 l asetosiringon (10 mg ml⁻¹) içeren 5 ml sıvı ve vitaminsiz MS ortamı ile çözdürülmüş, farklı bitki eksplantlarıyla biraraya getirilerek 20 dakika boyunca inoküle edilmiş ve bu sürenin sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

2. *uygulama:* 10°C'de 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen bakteriler dibe çöktürüldükten sonra, pelet faz 80 l asetosiringon (10mg ml⁻¹) içeren 20 ml sıvı ve vitaminsiz MS ortamı ile çözdürülmüş, farklı bitki eksplantlarıyla biraraya getirilerek 20 dakika boyunca inoküle edilmiş ve bu sürenin sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

3. *uygulama:* 10°C'de 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilen bakteriler dibe çöktürüldükten sonra, pelet faz 20 l asetosiringon (10 mg ml⁻¹) içeren 5 ml sıvı ve vitaminsiz YMB ortamı ile çözdürülmüş, farklı bitki eksplantlarıyla biraraya getirilerek, 20 dakika boyunca inoküle edilmiş ve bu sürenin sonunda bakteri

bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

4. uygulama: Santrifüj edilmemiş, 70 µl asetosiringon içeren 15 ml bakterili YMB ortamında, bakterilerle farklı bitki eksplantları biraraya getirilerek, 20 dakika boyunca inoküle edilmiş ve bu sürenin sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

5. uygulama: Santrifüj edilmemiş, 20 µl asetosiringon (10mg ml⁻¹) içeren 5 ml sıvı ve vitaminsiz MS ortamı ile çözdürülmüş, farklı bitki eksplantlarıyla biraraya getirilerek, 20 dakika boyunca inoküle edilmiş ve bu sürenin sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

6. uygulama: Santrifüj edilmemiş, 80 µl asetosiringon (10 mg ml⁻¹) içeren 20 ml sıvı ve vitaminsiz MS ortamı ile çözdürülmüş, farklı bitki eksplantlarıyla biraraya getirilerek, 20 dakika boyunca inoküle edilmiş ve bu sürenin sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar, MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

7. uygulama: Santrifüj edilmemiş, 20 µl asetosiringon (10 mg ml⁻¹) içeren 5 ml sıvı ve vitaminsiz YMB ortamı ile çözdürülmüş, farklı bitki eksplantlarıyla biraraya getirilerek, 20 dakika boyunca inoküle edilmiş ve bu sürenin sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar, MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

8. uygulama: Santrifüj edilmemiş ve asetosiringon eklenmemiş YMB ortamı içerisinde bitki eksplantlarıyla bakteriler biraraya getirilmiş, 20 dakikanın

sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

9. *uygulama*: Santrifüj edilmemiş ve asetosiringon eklenmemiş YMB ortamı içerisinde bitki eksplantlarıyla bakteriler biraraya getirilmiş, 30 dakikanın sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

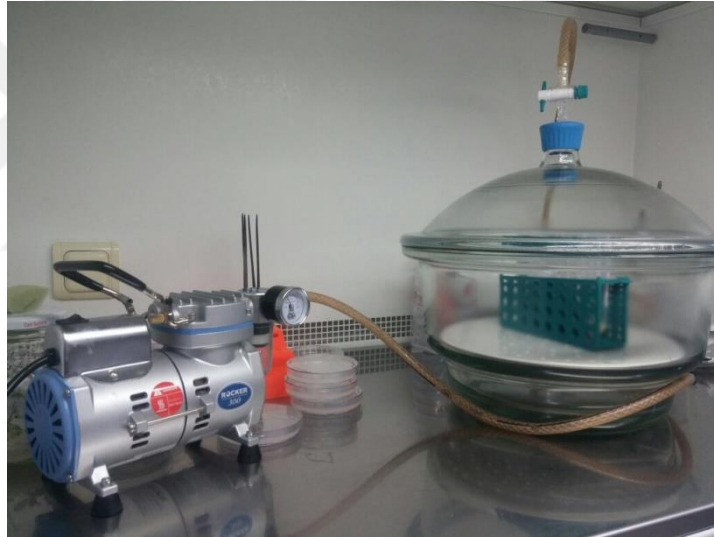
10. *uygulama*: Santrifüj edilmemiş ve asetosiringon eklenmemiş YMB ortamı içerisinde bitki eksplantlarıyla bakteriler biraraya getirilmiş, 30 dakikanın sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.2 gelrite) aktarılmışlardır.

11. *uygulama*: Santrifüj edilmemiş ve asetosiringon eklenmemiş YMB ortamı içerisinde bitki eksplantlarıyla bakteriler biraraya getirilmiş, 20 dakikanın sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 100 mg l⁻¹ sefotaksim 50 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

12. *uygulama*: Santrifüj edilmemiş ve asetosiringon eklenmemiş YMB ortamı içerisinde bitki eksplantlarıyla bakteriler biraraya getirilmiş, 30 dakikanın sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 100 mg l⁻¹ sefotaksim 50 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.

13. *uygulama*: Santrifüj edilmemiş ve asetosiringon eklenmemiş YMB ortamı içerisinde bitki eksplantlarıyla bakteriler biraraya getirilmiş, 30 dakikanın sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 100 mg l⁻¹ sefotaksim 50 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.2 gelrite) aktarılmışlardır.

14. *uygulama:* Yukarıda sıralanan doğrudan transformasyon yöntemlerinin yanısıra, araştırmada transformasyon çalışmalarının başarısını artırmak için, farklı araştırmacılar (Victor vd., 1999; Sanyal vd., 2005) tarafından da başarılı sonuçlar verdiği belirtilen vakum infiltrasyonu yöntemi de kullanılmıştır. Bu amaçla steril kabin içerisine yerleştirilen steril edilmiş desikatör ve vakum pompası kullanılmıştır (Şekil 3.3). Santrifüj edilmemiş ve asetosiringon eklenmemiş YMB ortamı içerisinde bitki eksplantlarıyla bakteriler direk olarak biraraya getirilerek vakum infiltrasyonu yapılmış, 30 dakikanın sonunda bakteri bulaştırılmış eksplantlar MS ortamında 3 gün kokültüre alınmalarının ardından, 200 mg l⁻¹ kanamisin içeren ½ katı MS ortamlarına (%0.6 agarlı) aktarılmışlardır.



Şekil 3.3. Vakum infiltrasyonu kullanımı ile bakteri ve bitki eksplantlarının inokülasyonu

Yukarıda belirtilen transformasyon işlemlerinden sonra saçak kök oluşturmak amacıyla, besin ortamlarına aktarılan eksplantlarda kök oluşum oranları tespit edilmiş ve kök oluşturan ortamlardaki kökler daha sonra antibiyotik içermeyen 30 gl⁻¹ sakkaroz ve 6 gl⁻¹ agar içeren ½ kuvvetindeki MS besin ortamında üç kez alt költüre alınmışlardır. Yapılan transformasyon uygulamaları sonucunda vakum infiltrasyon yöntemi ile gerek saçak kök oluşum oranı ve gerekse kök büyüme hızı bakımından diğer uygulamalara göre daha başarılı sonuçlar

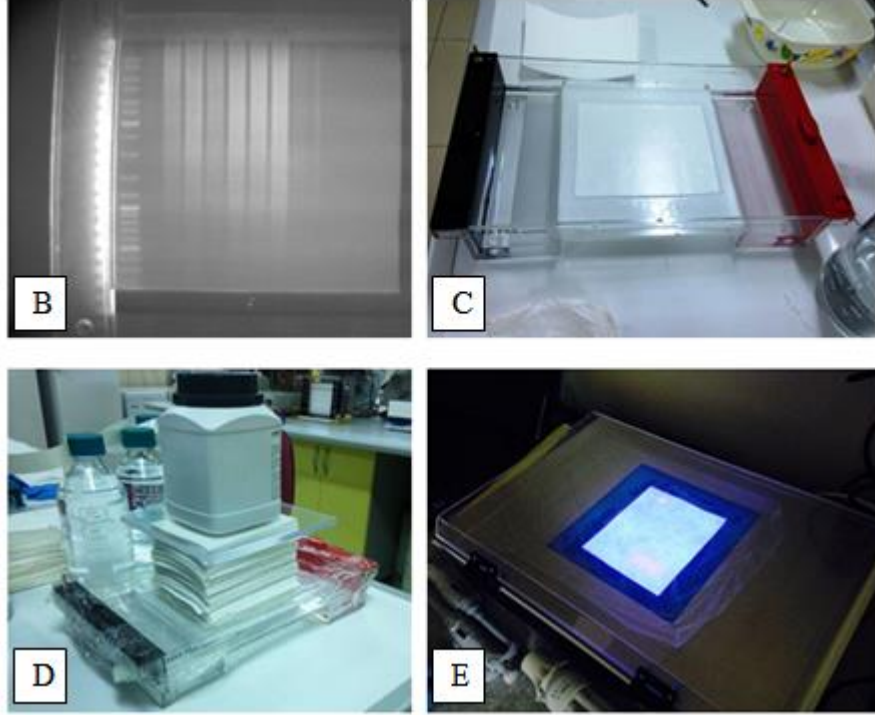
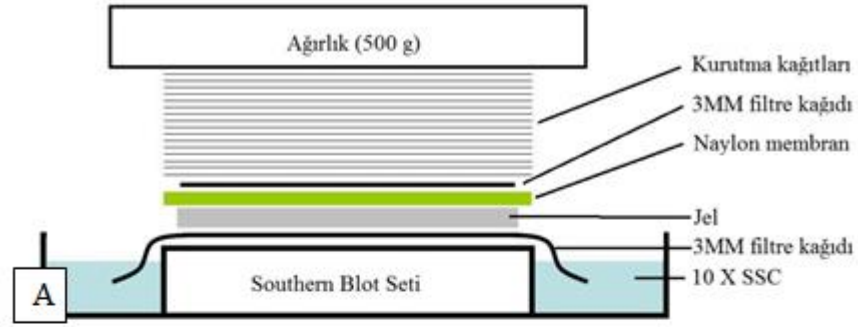
alınmıştır (Sonuçlar bulgular kısmında verilmiştir). Bu nedenle 3 alt kültür sonrasında vakum infiltrasyon yöntemi ile elde edilmiş hızlı büyüme gösteren ve bakteri oluşumu gözlemlenmeyen saçak kökler, hem Southern blot analizi hem de çoğaltım için yeterli miktarda kök elde etmek amacıyla sıvı ortamlarda alt kültüre alınmışlardır. Bu amaçla besin ortamı olarak 50 g l⁻¹ sakkaroz, 1 mg l⁻¹ indol butirik asit (IBA) içeren ½ kuvvetteki sıvı MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortamdan 100 ml içeren 250 ml'lik erlenlere aktarılan kökler, 100 rpm hızdaki çalkalayıcılar üzerinde, karanlıkta ve 25°C'de kültüre alınmışlardır. Yeterli saçak kök elde edildiğinde her biri tek bir kökten çoğaltılan potansiyel transgenik kökler, ayrı ayrı numaralandırılarak, Southern blot analizinde *rol* genlerinin varlığının doğrulanmasında kullanılmışlardır.

3.2.4. Southern Blot Analizi

Transformasyon çalışmaları sonrasında vakum infiltrasyon yöntemiyle elde edilen köklerden devamlı büyüme eğiliminde olan ve sürekli yan kökler oluşturan, potansiyel transgenik kök dokularından total DNA izolasyonu yapılmıştır. Total DNA'nın izole edilmesi işlemlerinde QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit kullanılmıştır. Kite ait protokole bağlı kalınarak total DNA izolasyonu tamamlanmış, DNA yoğunluğu ve kalitesi Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer) yardımıyla belirlenmiştir.

Southern blot tekniği, Maniatis vd. (1982)'nin protokolü temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle elde edilen total kök DNA'ları, HindIII restriksiyon enzimi ile 37°C'de 16 saat süre ile inkübe edilerek kesim yapılmıştır. Genomik DNA parçaları %1 TBE tampon çözeltisi ile hazırlanan %1'lik agaroz jelde 30 Volt şiddetinde elektrik alana maruz bırakılarak 20 saat süreyle yürütülerek ayrılmışlardır. Endonükleaz kesim verimliliği, jelin etidyum bromür ile boyanması ve görüntülenmesi ile belirlenmiş, daha sonra jel distile su ile bir kaç kez yıkanarak ve örnekleri içerecek şekilde kesilip küçültülerek blota hazır hale getirilmiştir.

10x SSC çözeltisi kullanılarak kapiler blot düzeneği kurulmuş ve jeldeki DNA örnekleri artı yüklü naylon membrana (Amersham Hybond+) 20 saat süre ile transfer edilmiştir. Naylon membrana aktarılan DNA parçaları 45 saniye süresince UV ışınlarına maruz bırakılarak ve ardından 80°C'de 1 saat bekletilerek membrana sabitlenmiştir. Prob olarak kullanılmak üzere T-DNA bölgesinden *rolC* geni seçilmiş ve gen, koloni PCR aracılığıyla çoğaltılmıştır. Agaroz jelden kesilerek alınan *rolC* çoğaltım ürünü, Qiaquick jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) yardımıyla saflaştırılmış ve PCR DIG Probe Synthesis Kit, (Roche) protokol kılavuzuna uygun olarak digoksinin (DIG-11-dUTP) ile işaretlenmiştir. Hazırlanan probun membran ile hibridizasyonu 42°C'de 16 saat süreyle muamele edilerek sağlanmıştır. Hibridizasyon sonrasında membran, DIG-High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche) protokol kılavuzuna uygun biçimde yıkanıp Anti-DIG alkaline fosfatase bağlantısının gerçekleştirilmesinin ardından, CDP-Star kemilüminesans bileşeni (New England Biolabs) kullanılarak, membran üzerindeki sinyal görüntülenmeye hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.4).

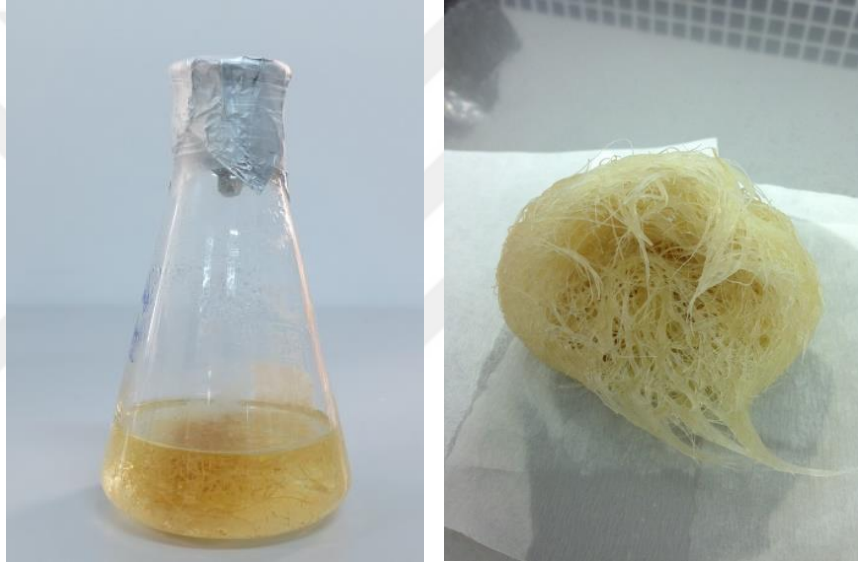


Şekil 3.4. Southern blot düzeneğinin şeması (A), Restriksiyon enzim kesimini takiben agaroz jelde koşturularak ayrıştırılan marker ve potansiyel transgenik bitkilere ait DNA'lar (B), Southern blot düzeneğine jel ve membranın yerleştirilmesi (C), Marker ve potansiyel transgenik bitki DNA'larının membrana geçirilmesi (D), UV de DNA'ların görüntülenmesi (E).

Görüntüleme, membran üzerindeki ışıma bir saat süreyle maruz bırakılan X-ışınlarına duyarlı bir röntgen filmi (Fujifilm) aracılığı ile yapılmıştır. Film üzerine aktarılan ışımların sabitlenmesi için röntgen filmi banyo solüsyonları (KONIX) hazırlanarak, film tab edilmiş, daha sonra film yıkanıp kurutularak sinyal sabitlenmiştir.

3.2.5. Saçak köklerin çoğaltılması

Southern blot analizi sonrasında transgenik oldukları belirlenmiş kökler, yapılacak 24-eBL ve FA uygulamaları için yeterli miktarda kök elde edilinceye kadar sıvı ortamlarda alt kültüre alınmaya devam edilmişlerdir. Bu amaçla yine aynı besin ortamı (50 g l⁻¹ sakkaroz, 1 mg l⁻¹ indol butirik asit (IBA) içeren ½ kuvvetteki sıvı MS ortamı) kullanılmış olup, saçak kökler 100 rpm hızdaki çalkalayıcılar üzerinde, karanlıkta ve 25°C'de kültüre alınmışlardır (Abbasi vd., 2012). Kökler çoğaltılmak amacıyla 21 gün aralıklarla alt kültüre alınmışlardır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Sıvı kültürlerde çoğaltılan potansiyel transgenik kökler

3.2.6. 24-eBL ve L-Fenilalanin uygulamaları

Saçak köklerde kök gelişimi ve kafeik asit türevlerinin sentezini artırmak için BR ve FA uygulamalarına yer verilmiştir. Bu amaçla BR olarak, bir BR analogu olan ve yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda da diğer analoglarına göre daha etkin ve daha stabil olduğu bildirilen (Khripach vd., 2003) ve aynı zamanda enzimatik aktivitede ve antioksidant sistemlerde uyarıcı etkisinin çok daha yüksek (Hayat vd., 2010) olduğu belirlenen 24-epibrassinolid (24-eBL) kullanılmıştır. 24-eBL 0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹ konsantrasyonlarında; FA ise 0, 100, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarında kullanılmışlardır. Araştırma 3

tekerrürlü ve her tekerrürde 3 erlen olacak şekilde kurulmuştur. Buna göre araştırmada; 7 uygulama ve 5 hasat dönemi için toplam 315 adet erlen ve her bir erlende de 1 g kök olmak üzere 315 g saçak kök kullanılmıştır (7 uygulama X 5 hasat dönemi X 3 tekerrür X her tekerrürde 3 erlen x her erlende 1 g kök) (Şekil 3.6). Uygulamalarda kullanılacak olan kökler lag fazını atlatıp büyümeye devam edebilmeleri için 10 gün boyunca karanlık koşullarda büyütülmeye devam edilmiştir. Bu sürenin sonunda belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan 24-eBL ve FA filtre sterilizasyonu sonrasında uygun konsantrasyonlarda steril otomatik uç atmalı pipetler yardımıyla ortamlara ilave edilmişlerdir. Uygulamaların gerçekleştirildiği saçak kökler, kök gelişimi ve sekonder metabolit birikimi için uygun olduğu belirlenen 20°C sıcaklık, 3 saat aydınlık ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ve 21 saat karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır (Wu vd., 2007b). Analizler için örnekler, uygulamaları takip eden 10. günden başlamak üzere 10 gün aralıklarla toplam 5 kez (10., 20., 30., 40. ve 50. günlerde) alınmışlardır.



Şekil 3.6. Uygulamalarda kullanılacak aynı hattan çoğaltılmış saçak kökler

3.2.7. Fiziksel özelliklerin belirlenmesi

Örnek alım dönemlerinde toplanan örneklerde aşağıdaki incelemeler yapılmıştır:

Hasat sonrası kök yaş ağırlığı (HSYA): Hasat edilen kökler steril saf su ile yıkanıp, fazla suları kurutma kağıdı ile alındıktan sonra, kök yaş ağırlıkları analitik terazi yardımı ile g cinsinden belirlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Yaş kök ağırlıklarının belirlenmesi

Hasat sonrası kök kuru ağırlığı (HKA): 60°C'de 48 saat boyunca bekletilerek sabit ağırlığa gelen kuru köklerin analitik terazide tartılması ile g cinsinden belirlenmiştir.

Kuru madde oranı: Köklerin kuru madde oranları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Kuru madde oranı (\%)} = (\text{HKA (g)} \times 100) / \text{HSYA (g)}$$

Kök büyüme indeksi: Köklerin büyüme indeksleri aşağıdaki formülden yararlanılarak belirlenmiştir:

$$\text{Büyüme indeksi} = (\text{HSYA (g)} - \text{Uygulama öncesi kök yaş ağırlığı (g)}) / \text{Uygulama öncesi kök yaş ağırlığı (g)}$$

3.2.8. Kök ekstraktlarının hazırlanması

Ekstraksiyon işlemi Liu vd. (2006)'nin kullandığı yöntemle göre yapılmıştır. Buna göre kurutulmuş toz haline getirilmiş kök örnekleri içinde %0.1 fosforik asit bulunan %70'lik metanol içinde 30 dakika süreyle ultrasonik su banyosunda ekstrakte edilmişlerdir. Santrifüj işleminin ardından üst faz alınarak, pelet kısmı aynı çözelti içinde 15 dakika daha ekstrakte edilmiş, birleştirilen üst fazların filtreden geçirilmesinin ardından analizlerde kullanılmışlardır.

3.2.9. Toplam fenolik madde analizi

Elde edilen ekstraktlar kullanılarak toplam fenolik madde analizleri Singleton ve Rossi (1965)'ye göre spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Okumalar 765 nm'de yapılmış ve standart gallik asit çözeltisinden hazırlanan körveden yararlanılarak toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri olarak mg g⁻¹ cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.10. Toplam flavonoid miktarı

Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi için 0.50 ml kök ekstraktı 2.5 ml distile su ile karıştırılmış, ardından 150 µl %5 sodyum nitrit solüsyonu eklenmiştir. 6 dakika sonra 0.30 ml %10 alüminyum klorit solüsyonu eklenerek karışım 5 dakika bekletilmiştir. Sonrasında 1 ml sodyum hidroksit eklenip, spektrofotometrede 510 nm'deki absorpsanları okunmuştur. Standart kateşin çözeltisinden hazırlanan körveden yararlanılarak toplam flavonoid madde miktarı kateşin eşdeğeri olarak mg g⁻¹ cinsinden hesaplanmıştır (Wu vd., 2006).

3.2.11. Kafeik asit türevlerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'nde belirlenmesi

Kafeik asit türevlerinden olan kikorik asit, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kaftarik asit, kafeik asit, klorogenik asit ve ekinakosid miktarlarının HPLC ile belirlenmesi, üniversitemizin gıda mühendisliği bölümüne ait Agilent marka HPLC (Agilent 1290 Infinity II) cihazı ile yapılmıştır. Araştırmada HPLC analizleri Abbasi vd. (2007b)'ne göre yapılmış olup, kullanılan parametreler Çizelge 3.2'de gradient programı Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.2. HPLC cihazına ait özellikler ve parametreler

Parametreler	
Dedektör	1290 Infinity II HDR- DAD
Otosampler	1290 Infinity II Multisampler
Kolon	Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 250 mm, 5 µm)
Mobil faz	A: %0.1 fosforik asit içeren ultra saf su ve B: Asetonitril
Akış hızı	0.8 ml dak ⁻¹
Kolon sıcaklığı	25 °C

Çizelge 3.3. HPLC analizlerinde kullanılan gradient program

Zaman (dakika)	Mobil faz A (%)	Mobil faz B (%)
Başlangıç	90	10
30	80	20
110	20	80
Bitiş		

3.2.12. İstatistik analiz

Araştırma 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 erlen olacak şekilde kurulmuştur. Tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulan çalışmada, incelenen özellikler bakımından elde edilen veriler, faktöriyel düzende varyans analizi tekniği kullanılarak analiz edilmişlerdir. Faktörlerin seviye ortalamaları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Echinacea purpurea bitkisinde *A. rhizogenes* ile elde edilen saçak köklere uygulanan 24-eBL ve FA uygulamalarının kök büyümesi ve kafeik asit türevlerinin birikimi üzerine olan etkilerinin incelendiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar başlıklar halinde aşağıda sunulmuştur.

4.1. Yüzey Sterilizasyon Yöntemleri ve Çimlendirme Ortamlarına İlişkin Bulgular

E. purpurea bitkisine ait tohumlarda en uygun yüzey sterilizasyon yöntemini belirlemek amacıyla, farklı araştırmacılar tarafından önerilen yöntemlerin kullanılması ile yapılan ön çalışmadan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Buna göre incelemeye alınan 3 yüzey sterilizasyonu yöntemi içinde %12.17 ile en düşük enfeksiyon oranı ve %76.17 ile en yüksek çimlenme oranını sağlayan Liu vd. (2006) tarafından da önerilen 1. yöntem en uygun sterilizasyon yöntemi olarak seçilmiştir. Araştırmanın bundan sonraki aşamalarında tohumların sterilizasyonunda bu yöntem kullanılarak tohumlar steril hale getirilmişlerdir.

Çizelge 4.1. Farklı yüzey sterilizasyon yöntemlerine göre elde edilen sonuçlar

Sterilizasyon Yöntemi	Enfeksiyon oranı (%)	Çimlenme oranı (%)
1. Yöntem (Liu vd., 2006)	12.17 c*	76.17 a
2. Yöntem (Choffe vd., 2000)	26.67 b	60.16 b
3. Yöntem (Trypsteen vd., 1991)	30.00 a	60.83 b

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

Tohumlardaki çimlenme oranını artırmak amacıyla, en uygun çimlendirme ortamını belirlemek için yapılan ön çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Buna göre denemeye alınan 3 farklı besin ortamından %76.17 ile en yüksek çimlenme oranının elde edildiği Liu vd. (2006) tarafından da önerilen 30 gl⁻¹ sakkaroz ve 6 gl⁻¹ agar içeren ½ MS ortamı bir başka deyimle

1. besin ortamı en uygun çimlendirme ortamı olarak seçilmiş ve çalışmanın ileri aşamalarında tohumlar bu ortam kullanılarak çimlendirilmişlerdir.

Çizelge 4.2. Farklı besin ortamlarının çimlenme üzerine etkileri

Çimlendirme ortamı	Çimlenme oranı (%)
1. Besin ortamı (Liu vd., 2006)	76.17 a*
2. Besin ortamı (Wang vd., 2006)	70.83 b
3. Besin ortamı (Harbage, 2001)	67.00 b

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

4.2. *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 43057 Suşunun Çoğaltılmasına İlişkin Bulgular

Gen transformasyonunda kullanılan *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 43057 suşuna ait bakteriler LB, YEB ve YMB olmak üzere üç farklı besin ortamına aktarılmış ve gelişimleri 48 saatlik periyot boyunca sürekli olarak takip edilmiştir. Süre sonunda hem karanlık hem de aydınlık koşullardaki LB ve YEB ortamlarında hiçbir bakteri çoğalması görülmemiştir. YMB ortamında kültüre alınan bakterilerden aydınlıkta kültüre alınanlarda bakteri gelişimi çok yavaş olurken, buna karşılık karanlık koşullardaki bakterilerin daha fazla miktarlarda çoğaldıkları görülmüş, spektrofotometre yardımı ile bakterilerin transformasyonda kullanılabilmeleri için uygun yoğunlukta olup olmadıkları belirlenmiştir (OD_{600}). Bu nedenle sonraki aşamalardaki bakteri çoğaltılmasında karanlık koşullarda ve YMB ortamında yapılan inokülasyonlar kullanılmıştır.

4.3. *Agrobacterium rhizogenes* ile Yapılan Transformasyon ve Saçak Kök Oluşturma Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Araştırmada en yüksek saçak kök oluşumunu sağlayacak farklı eksplant tipleri ile transformasyon uygulamasını belirlemek amacıyla, eksplant olarak seçilen yaprak, epikotil ve hipokotillere 14 farklı transformasyon uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Farklı eksplantlara ve transformasyon uygulamalarından elde edilen saçak kök oranları

Transformasyon uygulaması	Eksplant tipi	Elde edilen saçak kök oranı (%)
1	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	5.00
2	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	5.00
3	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	5.00
4	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	5.00
5	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	5.00
6	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	5.00
7	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	5.00
8	epikotil	10.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	21.67
9	epikotil	3.33
	hipokotil	0.00
	yaprak	8.33
10	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	1.67
11	epikotil	6.67
	hipokotil	0.00
	yaprak	10.00
12	epikotil	1.67
	hipokotil	0.00
	yaprak	8.33
13	epikotil	0.00
	hipokotil	0.00
	yaprak	3.33
14	epikotil	8.00
	hipokotil	28.50
	yaprak	71.25

E. purpurea bitkisinde en yüksek saçak kök oluşumunu sağlayan eksplant tipi ve transformasyon uygulamasını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, en yüksek saçak kök oluşum oranının %71.25 ile eksplant olarak yaprakların, uygulama olarak da vakum infiltrasyon yönteminin kullanıldığı 14. uygulamadan elde edildiği belirlenmiştir.

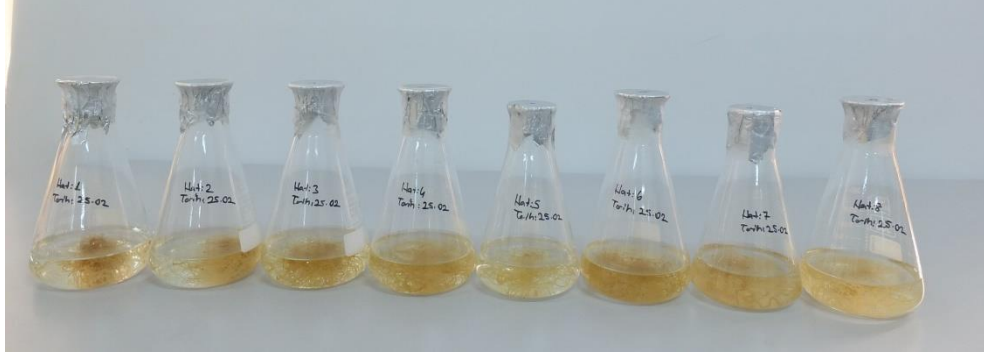


Şekil 4.1. Vakum infiltrasyon uygulaması ile yaprak eksplantlarından elde edilen saçak kökler

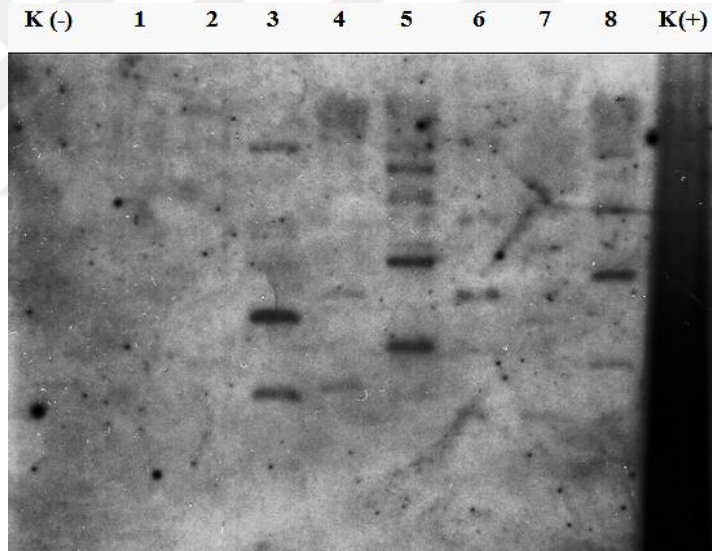
4.4.Southern Blot Analizine İlişkin Bulgular

Maniatis vd. (1982)'nin protokolü temel alınarak gerçekleştirilen, *rol* genlerinin varlığının ispatlanması için yapılan Southern blot analizinde, hızlı büyüme gösteren ve transgenik oldukları düşünülen 8 farklı kök hattında (Şekil 4.2), digoksigenin (DIG-11-dUTP) ile işaretlenen *rol* genleri otoradyografi ile X ışınlarına duyarlı filmlere aktarılmıştır. Southern blot hibridizasyon analizi, *Agrobacterium* Ri plazmidi, T-DNA bölgesinde bulunan ve sol sınır segmenti TL ile bitki genomuna taşınan *rolC* geninin, saçak kök kültür hücrelerinin genomuna kararlı biçimde bağlandığını kanıtlamıştır (Şekil 4.3). Transformasyona tabi tutulmayan kontrol kök hücre genomundan hibridizasyon sinyali alınmamıştır. Analiz sonucuna göre, 1. hatta hibridizasyon sinyali gözlemlenemezken, 2. hatta 2, 3. hatta 5, 4. hatta 3, 5. hatta 7, 6. hatta 4,

7. hatta 4, 8. hatta 5 adet hibridizasyon sinyali gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, ışına görüntülerinden *rol* genlerinin varlığı ispatlanan hatların transgenik oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Sekiz farklı potansiyel transgenik ekinezya kök hattının 21 günlük gelişme sonrası görünüşleri



Şekil 4.3. X ışınlarına duyarlı filmlere aktarılan, digoksisenin ile işaretlenmiş *rol* genleri (K(-): transgenik olmayan ekinezya kökleri; 1-8: potansiyel transgenik kökler; K(+):pozitif kontrol- *rolC* probe)

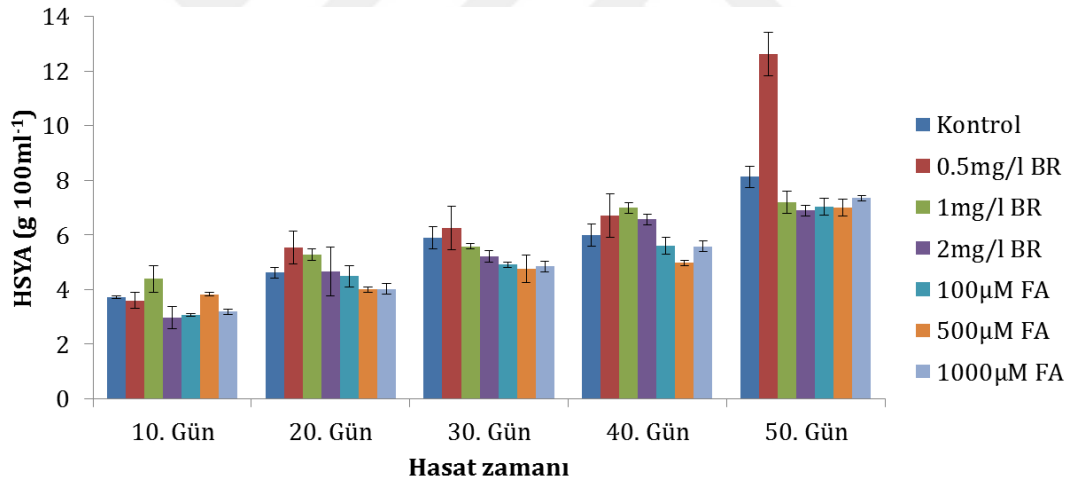
4.5. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Hasat Sonrası Yaş Ağırlıkları Üzerine Etkileri

Saçak köklerin hasat sonrası yaş ağırlıkları (HSYA) üzerine yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Çizelge 4.4'ün incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, HSYA'nın uygulamalar ve hasat zamanlarına göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir. Buna göre bütün uygulamalarda genel olarak hasat için geçen süre arttıkça HSYA miktarının da arttığı belirlenmiştir. En yüksek HSYA değerlerinin 6.99 ile 12.63 g 100 ml⁻¹ arasında değişen değerlerle 50. gün örneklerinden elde edildiği, ayrıca 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹ 24-eBL ile 100 µM FA uygulamalarında 40. ve 50. gün örnekleri arasında da önemli bir farklılığın bulunmadığı tespit edilmiştir. Hasat zamanlarına göre uygulamalar arasındaki farklılıklar incelendiğinde ise 10, 20 ve 30. günlerde uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmezken, 40. ve 50. günlerde hasat edilen köklerin yaş ağırlıklarının uygulamalara göre önemli değişiklikler gösterdikleri saptanmıştır. Buna göre 0.5 ve 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulamaları yapılan ve 40. günde hasat edilen köklerin yaş ağırlıklarının, 500 µM FA uygulananlara göre daha yüksek olduğu; 50. günde hasat edilen örnekler arasında ise 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılan köklerin yaş ağırlıklarının kontrol ve diğer uygulamalara göre önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, en yüksek HSYA'nın 12.63 g 100ml⁻¹ ile 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılmış ve 50. günde hasat edilmiş köklerden elde edildiği; 50. günde hasat edilen diğer uygulamalar ve kontroller arasında ise önemli bir farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Saçak köklerin hasat sonrası yaş ağırlıkları (HSYA) (g 100ml⁻¹)

Uygulamalar		Hasat zamanı					Ortalama
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	3.71 Ca*	4.61 BCa	5.89 Ba	5.99 Bab	8.12 Ab	5.66
	0.5	3.59 Ca	5.53 Ba	6.24 Ba	6.71 Ba	12.63 Aa	6.94
	1.0	4.38 Ca	5.27 Ca	5.58 BCa	6.98 Aa	7.19 Ab	5.89
	2.0	2.97 Da	4.66 Ca	5.21 BCa	6.56 ABab	6.89 Ab	5.26
	100	3.06 Ca	4.48 Ba	4.91 Ba	5.59 ABab	7.03 Ab	5.04
FA (µM)	500	3.82 Ba	3.99 Ba	4.75 Ba	4.97 Bb	6.99 Ab	4.90
	1000	3.18 Da	4.01 CDa	4.84 BCa	5.57 Bab	7.35 Ab	4.99
	Ortalama	3.53	4.66	5.34	6.10	8.03	
p Değerleri		Hasat zamanı		0.000			
		Uygulama		0.000			
		Hasat zamanı*Uygulama		0.000			

*) Büyük harfler her bir uygulamada hasat zamanları arasındaki farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir (p<0.01).



Şekil 4.4. HSYA'nın hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.6. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Hasat Sonrası Kuru Ağırlıkları Üzerine Etkileri

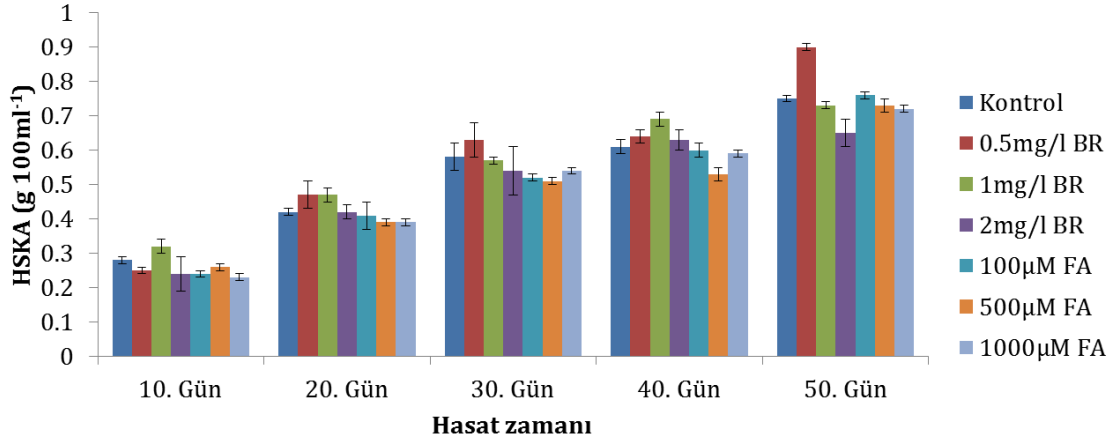
Saçak köklerin hasat sonrası kuru ağırlıkları (Hska)'na ilişkin elde edilen verilerden yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistik olarak önemli bulunmuş olup (p<0.05), elde edilen bulgular Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Saçak köklerin hasat sonrası kuru ağırlıkları (HSKA) (g 100ml⁻¹)

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	0.28 Da*	0.42 Ca	0.58 Bab	0.61 Bab	0.75 Ab	0.53
	0.5	0.25 Da	0.47 Ba	0.63 Ba	0.64 Bab	0.90 Aa	0.58
	1.0	0.32 Ca	0.47 Ba	0.57 Bab	0.69 Aa	0.73 Ab	0.56
	2.0	0.24 Da	0.42 Ca	0.54 Bab	0.63 ABab	0.65 Ab	0.49
	100	0.24 Da	0.41 Ca	0.52 Bab	0.60 Bab	0.76 Ab	0.51
FA (µM)	500	0.26 Da	0.39 Ca	0.51 Bb	0.53 Bb	0.73 Ab	0.49
	1000	0.23 Da	0.39 Ca	0.54 Bab	0.59 Bab	0.72 Ab	0.49
Ortalama		0.26	0.42	0.56	0.62	0.75	
p Değerleri	Hasat zamanı	0.000					
	Uygulama	0.000					
	Hasat zamanı*Uygulama	0.011					

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Bütün uygulamalarda hasat zamanı uzadıkça HSKA miktarının arttığı belirlendiği araştırmada, en düşük HSKA değerleri bütün uygulamalarda 10. günde hasat edilen köklerde tespit edilmiştir. En yüksek değerler kontroller de dahil olmak üzere bütün uygulamalarda 50. günde hasat edilen köklerde saptanırken, 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanıp, 40. ve 50. günlerde hasat edilen köklerin HSKA değerleri arasında önemli bir farklılığın bulunmadığı da belirlenmiştir. Hasat zamanlarına göre uygulamalar arasındaki farklılıklar incelendiğinde ise, 10. ve 20. günlerde uygulamalar arasında bir farklılık görülmezken, 30. günden itibaren HSKA bakımından uygulamalar arasında önemli farklılıkların ortaya çıktığı saptanmıştır. 30. ve 40. günlerde hasat edilen kökler arasında sırasıyla 0.5 mg l⁻¹ ile 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanan köklerde HSKA değerinin 500 µM FA uygulanan köklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 50. gün örnekleri arasında ise kontrol ve diğer uygulamalarla kıyaslandığında en yüksek HSKA değeri 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanan köklerde tespit edilmiştir. Araştırmada yapılan incelemeler sonucunda hasat dönemi uzadıkça saçak köklerde HSKA'nın arttığı ve 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanıp 50. günde hasat edilen köklerde ise 0.90 g 100 ml⁻¹ ile en yüksek HSKA değerinin elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. HSKA'nın hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

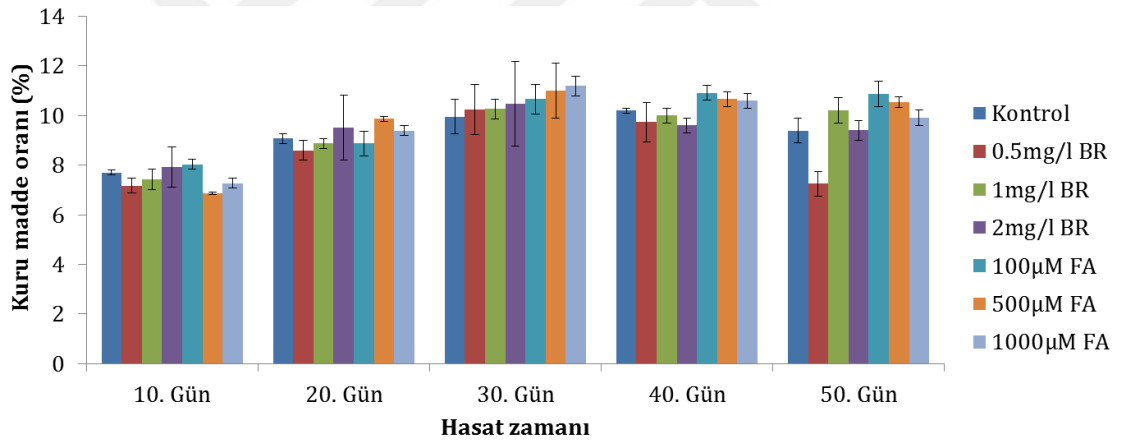
4.7. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Kuru Madde Oranları Üzerine Etkileri

Saçak kök kültürlerinin hasat sonrası kuru madde oranları (%) bakımından elde edilen verilere yapılan varyans analizi sonucunda, hasat zamanı*uygulama etkileşimini önemli bulunmazken; hasat zamanı ve uygulamalar ayrı ayrı ele alındıklarında aralarında istatistiksel olarak önemli farklılıkların olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6). Hasat zamanları karşılaştırıldıklarında, en düşük kuru madde oranı %7.49 ile 10. günde hasat edilen köklerden, en yüksek değerler ise %10.54 ve 10.25 ile sırasıyla 30. ve 40. gün örneklerinden tespit edilmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılıklar incelendiğinde ise 100µM FA ve 500µM FA uygulamaları yapılan köklerin kuru madde oranlarının 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılanlara göre daha yüksek olduğu, diğer uygulamalar arasında ise önemli bir farklılık bulunmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.6. Hasat sonrası kök kültürlerinin kuru madde oranları (%)

Uygulamalar	Hasat zamanı					
	10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
Kontrol	7.70	9.08	9.95	10.20	9.39	9.26 ab*
24-eBL (mg l⁻¹)	0.5	7.17	8.59	10.24	9.73	7.25
	1.0	7.43	8.88	10.26	10.00	10.21
	2.0	7.92	9.52	10.47	9.60	9.41
	100	8.04	8.88	10.66	10.91	10.87
FA (µM)	500	6.88	9.87	11.00	10.67	10.54
	1000	7.27	9.39	11.19	10.60	9.91
	Ortalama	7.49 C	9.17 B	10.54 A	10.25 A	9.66 B
p Değerleri		Hasat zamanı				
		0.000				
		Uygulama				
		0.023				
		Hasat zamanı*Uygulama				
		0.563				

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.6. Kuru madde oranlarının (%) hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.8. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Kök Büyüme İndeksleri Üzerine Etkileri

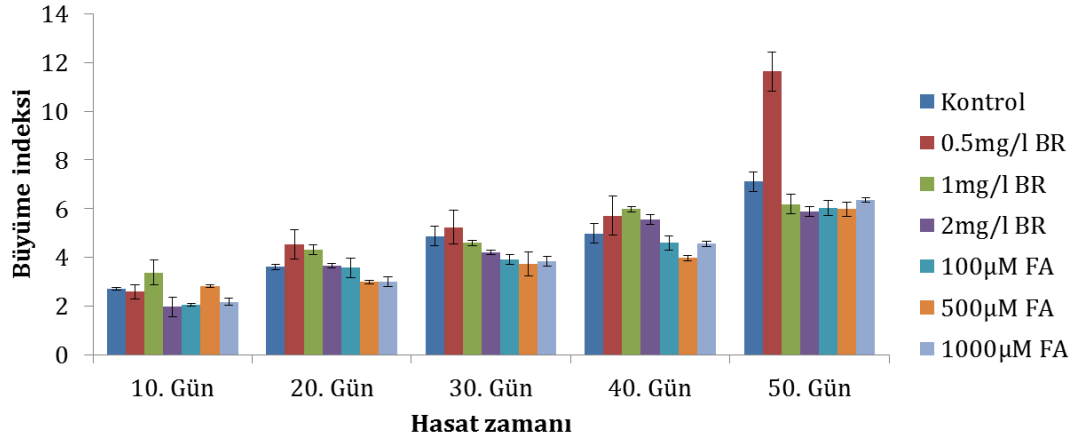
Saçak köklerin büyüme indekslerine ilişkin elde edilen verilerle yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Çizelge 4.7'nin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, büyüme indeksinin uygulamalar ve hasat zamanlarına göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir. Buna göre bütün uygulamalarda genel

olarak hasat için geçen süre arttıkça kök büyüme indeksinin de arttığı belirlenmiştir. En yüksek kök büyüme indeksinin bütün uygulamalarda 50. günde hasat edilen köklerle, 1.0 ve 2.0 mg l⁻¹ 24-eBL ile 100 µM FA uygulanıp 40. günde hasat edilen köklerden elde edildiği tespit edilmiştir. Hasat zamanlarına göre uygulamalar arasındaki farklılıklar incelendiğinde ise, 10, 20 ve 30. günlerde uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmezken, 40. ve 50. günlerde hasat edilen köklerin büyüme indekslerinin uygulamalara göre önemli değişiklikler gösterdikleri saptanmıştır. Buna göre 40. günde hasat edilen kökler arasında üç farklı konsantrasyonda yapılan bütün 24-eBL uygulamalarının 500 µM FA uygulamasına göre kök büyüme indeksini önemli derecede artırdığı, 50. günde yapılan hasatta ise 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılan köklerin büyüme indekslerinin kontrol ve diğer uygulamalara göre önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. 50. günde hasat edilen diğer uygulamalar ve kontrol arasında ise kök büyüme indeksi bakımından önemli bir farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, en yüksek kök büyüme indeksinin 11.63 ile 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılmış ve 50. günde hasat edilmiş köklerden elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.7).

Çizelge 4.7. Hasat sonrası kök kültürlerinin büyüme indeksleri

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	2.71 Ca*	3.61 BCa	4.88 Ca	4.99 Cab	7.12 Ab	4.66
	0.5	2.59 Ca	4.53 Ba	5.24 Ba	5.71 Ba	11.63 Aa	5.94
	1.0	3.38 Ca	4.30 Ca	4.59 BCa	5.98 ABa	6.18 Ab	4.88
	2.0	1.97 Da	3.65 Ca	4.21 BCa	5.56 ABa	5.89 Ab	4.26
	100	2.06 Ca	3.57 BCa	3.91 Ba	4.59 ABab	6.03 Ab	4.03
FA (µM)	500	2.82 Ba	2.99 Ba	3.74 Ba	3.97 Bb	5.98 Ab	3.90
	1000	2.18 Ca	3.01 BCa	3.84 Ba	4.56 Bab	6.35 Ab	3.99
Ortalama		2.53	3.66	4.34	5.05	7.03	
p Değerleri		Hasat zamanı			0.000		
		Uygulama			0.000		
		Hasat zamanı*Uygulama			0.000		

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir (p<0.01).



Şekil 4.7. Kök büyüme indeksinin hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.9. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Toplam Fenolik Madde Miktarları Üzerine Etkileri

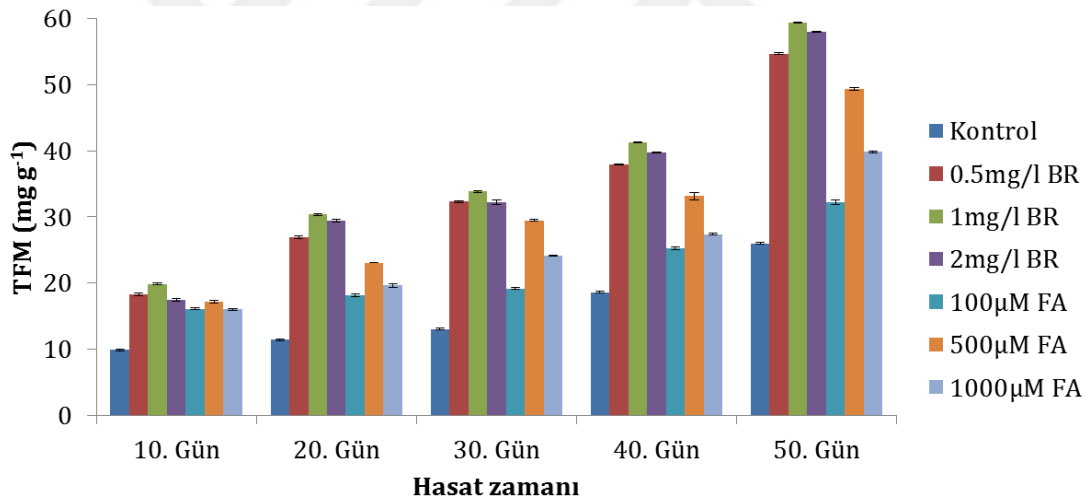
Saçak köklerde farklı hasat zamanları ve uygulamalara göre hesaplanan toplam fenolik madde miktarlarına ilişkin yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksiyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Buna göre bütün uygulamalarda hasat için geçen süre arttıkça toplam fenolik madde miktarının önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.8). En düşük toplam fenolik madde miktarları 9.87 ile 19.86 mg g⁻¹ arasında değişen değerlerle 10. günde hasat edilen köklerden elde edilirken, en yüksek değerler ise 25.98 ile 59.41 mg g⁻¹ arasındaki değerlerle 50. gün köklerinde tespit edilmiştir. Hasat zamanlarına göre uygulamalar arasındaki farklılıklar incelendiğinde ise, toplam fenolik madde miktarlarının uygulamalara göre önemli değişiklikler gösterdikleri saptanmıştır. Araştırmada yapılan bütün 24-eBL ve FA uygulamalarının kontrole göre toplam fenolik madde miktarını önemli derecede artırdığı; uygulamalar arasında ise 1.0 mg l⁻¹ konsantrasyonunda yapılan 24-eBL uygulamasının, bütün hasat zamanlarında en yüksek toplam fenolik madde miktarının elde edildiği uygulama olarak dikkat çektiği belirlenmiştir. Buna göre toplam fenolik madde miktarı bakımından en uygun uygulama ve hasat zamanı kombinasyonunun 59.41mg g⁻¹ değerinin elde edildiği 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL + 50. gün kombinasyonunun olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.8. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre toplam fenolik madde miktarları (mg g⁻¹) üzerine etkileri

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	9.87 Ee*	11.40 Dg	13.05 Cf	18.62 Bg	25.98 Ag	15.78
	0.5	18.29 Eb	26.93 Dc	32.29 Cb	37.93 Bc	54.68 Ac	34.02
	1.0	19.86 Ea	30.34 Da	33.84 Ca	41.26 Ba	59.41 Aa	36.94
	2.0	17.44 Ec	29.45 Db	32.19 Cb	39.70 Bb	57.94 Ab	35.35
	100	16.11 Ed	18.15 Df	19.17 Ce	25.26 Bf	32.19 Af	22.18
FA (µM)	500	17.19 Ec	23.08 Dd	29.47 Cc	33.12 Bd	49.34 Ad	30.44
	1000	15.98 Ed	19.60 De	24.10 Cd	27.40 Be	39.82 Ae	25.38
Ortalama		16.39	22.71	26.30	31.90	45.62	

p Değerleri	Hasat zamanı	0.000
	Uygulama	0.000
	Hasat zamanı*Uygulama	0.000

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir (p<0.01).



Şekil 4.8. Toplam fenolik madde miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.10. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Toplam Flavonoid Miktarları Üzerine Etkileri

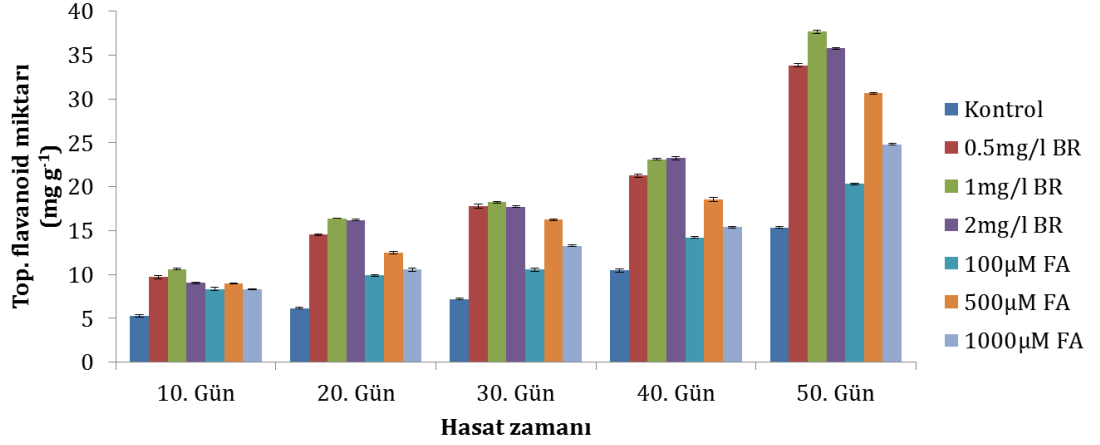
Saçak köklerden elde edilen toplam flavonoid miktarlarına ait verilere yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistikî olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Araştırmada flavonoid madde miktarlarının uygulamalar ve hasat zamanlarına göre önemli derecede değiştiği

tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). Buna göre bütün uygulamalarda hasat için geçen süre arttıkça flavonoid madde miktarının da arttığı belirlenmiştir. En düşük değerle toplam fenolik madde miktarında da olduğu gibi 10. günde hasat edilen köklerden elde edilirken; en yüksek flavonoid madde miktarları ise 15.34 ile 37.64 mg g⁻¹ arasında değişen değerlerle 50. günde hasat edilen köklerde tespit edilmiştir. Hasat zamanlarına göre uygulamalar arasındaki farklılıklar incelendiğinde ise flavonoid madde miktarının uygulamalara göre önemli değişiklikler gösterdikleri saptanmıştır. Bütün 24-eBL ve FA uygulamalarının kontrole göre toplam flavonoid miktarını istatistiksel olarak önemli derecede artırdığının belirlendiği araştırmada, 10. ve 50. günlerde en yüksek değerler 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulamasından elde edilirken, 20., 30. ve 40. günlerde 24-eBL uygulamalarının FA uygulamalarına göre toplam flavonoid miktarını daha yüksek değerlere çıkardığı tespit edilmiştir. Sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, en yüksek flavonoid madde miktarının 37.64 mg g⁻¹ ile 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılmış ve 50. günde hasat edilmiş köklerden elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.9. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre toplam flavonoid miktarları (mg g⁻¹) üzerine etkileri

Uygulamalar		Hasat zamanı					Ortalama
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	5.27 Ed*	6.13 De	7.17 Ce	10.46 Bf	15.34 Ag	8.87
	0.5	9.68 Eb	14.52 Db	17.77 Ca	21.25 Bb	33.82 Ac	19.41
	1.0	10.59 Ea	16.38 Da	18.23 Ca	23.10 Ba	37.64 Aa	21.19
	2.0	9.05 Eb	16.20 Da	17.70 Ca	23.26 Ba	35.77 Ab	20.40
	100	8.33 Dc	9.87 Cd	10.54 Cd	14.19 Be	20.32 Af	12.65
FA (µM)	500	8.93 Ebc	12.47 Dc	16.24 Cb	18.53 Bc	30.65 Ad	17.37
	1000	8.28 Ec	10.56 Dd	13.26 Cc	15.38 Bd	24.82 Ae	14.46
	Ortalama	8.60	12.30	14.42	18.02	28.34	
p Değerleri		Hasat zamanı					0.000
		Uygulama					0.000
		Hasat zamanı*Uygulama					0.000

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir (p<0.01).



Şekil 4.9. Toplam flavonoid miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.11. FA ve 24-eBL Uygulamalarının Saçak Köklerin Kafeik Türevlerinin Miktarları Üzerine Etkileri

Araştırmada 24-eBL ve FA uygulamalarının kafeik asit türevleri üzerine olan etkileri de incelenmiş olup, bu kapsamda kikorik asit, klorogenik asit, kaftarik asit, kafeik asit, ekinakozit ile aynı metabolik yollardan sentez edilen *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asit miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Saçak köklerde kafeik asit tespit edilemezken, diğer bileşenlere ait sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.11.1. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin kikorik asit miktarları üzerine etkileri

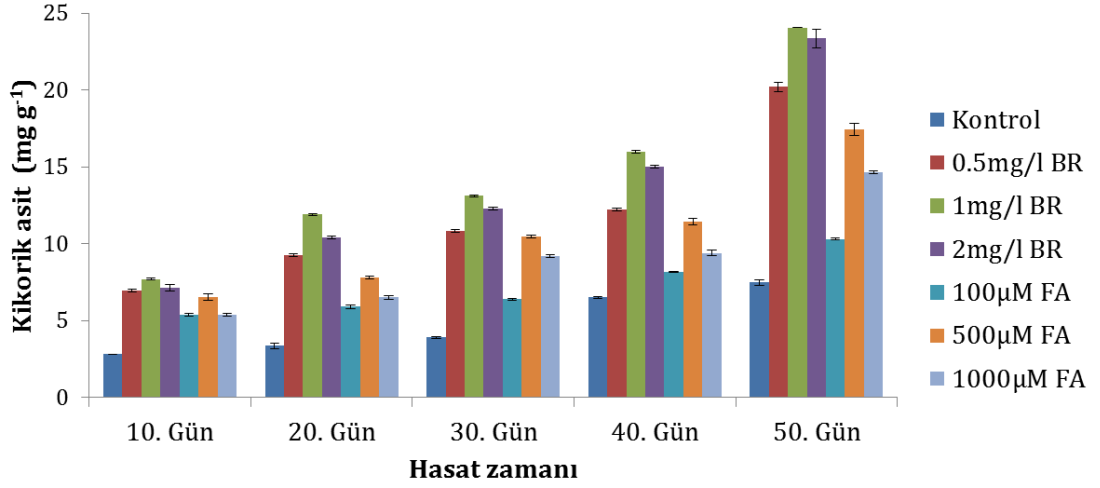
Ekinezya bitkisinin köklerindeki kafeik asit türevleri içinde en fazla bulunan kikorik asit bakımından uygulamalara ve hasat dönemlerine göre yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistikî olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Buna göre kikorik asit miktarlarının, yapılan 24-eBL ve FA uygulamaları ile hasat zamanlarına göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Hasat dönemlerine göre saçak köklerdeki kikorik asit birikimleri incelendiğinde, hasat için geçen süre bir başka deyimle kültür süresi uzadıkça kikorik asit miktarlarının da arttığı belirlenmiştir. En yüksek kikorik asit miktarlarının 7.48 ile 24.05 mg g⁻¹ arasında değişen değerlerle 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği tespit

edilmiştir. Her bir hasat döneminde uygulamalar arasındaki farklılıklar karşılaştırıldıklarında ise, kontrole göre bütün uygulamaların kikorik asit miktarını istatistiksel olarak önemli derecede artırdığı belirlenmiştir. Buna göre 10. günde hasat edilen köklerden en yüksek kikorik asit miktarları konsantrasyona bağlı kalmaksızın 24-eBL uygulamalarına tabi tutulanlarda; diğer hasat dönemlerinde ise sadece 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanan köklerde saptanmıştır. Sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, en yüksek kikorik asit birikimini elde etmek için, köklere 1.0 mg l⁻¹ konsantrasyonunda 24-eBL uygulaması yapılarak, 50. günde hasat edilmesi gerektiği ortaya konulmuştur. Böylece kikorik asit birikiminde kontrole göre 3.22 kat artış sağlanabileceği tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

Çizelge 4.10. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre kikorik asit miktarları (mg g⁻¹) üzerine etkileri

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	2.81 Dd*	3.36 CDf	3.90 Cf	6.52 Bg	7.48 Ag	4.81
	0.5	6.97 Eab	9.27 Dc	10.82 Cc	12.23 Bc	20.19 Ac	11.90
	1.0	7.70 Ea	11.90 Da	13.12 Ca	15.97 Ba	24.05 Aa	14.55
	2.0	7.12 Eab	10.40 Db	12.27 Cb	15.00 Bb	23.35 Ab	13.63
	100	5.38 Dc	5.90 CDe	6.39 Ce	8.15 Bf	10.30 Af	7.22
FA (µM)	500	6.55 Eb	7.82 Dd	10.48 Cc	11.44 Bd	17.41 Ad	10.74
	1000	5.38 Dc	6.51 Ce	9.18 Bd	9.40 Be	14.63 Ae	9.02
Ortalama		5.99	7.88	9.45	11.24	16.77	
p Değerleri	Hasat zamanı			0.000			
	Uygulama			0.000			
	Hasat zamanı*Uygulama			0.000			

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir (p<0.01).



Şekil 4.10. Kikoric asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.11.2. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin klorojenik asit miktarları üzerine etkileri

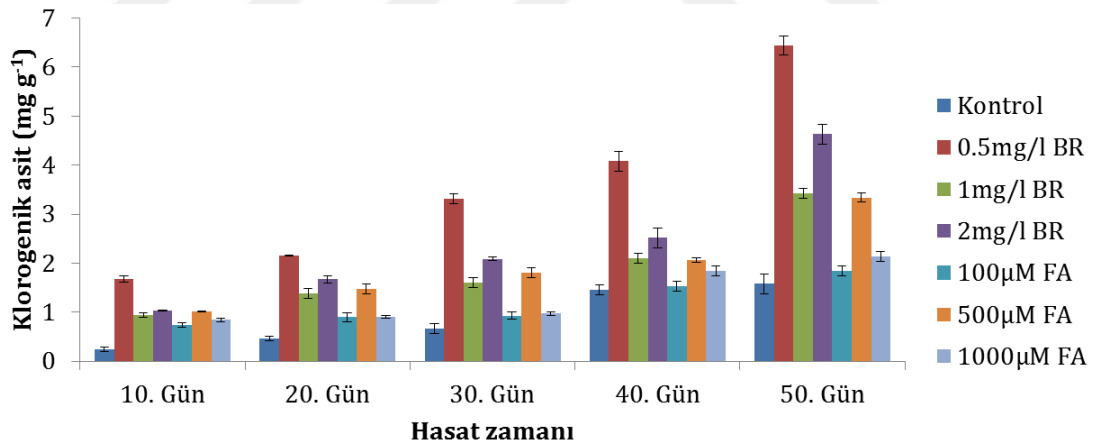
Farklı konsantrasyonlarda 24-eBL ve FA uygulamaları yapılarak 5 farklı dönemde hasat edilen saçak köklerden elde edilen klorojenik asit miktarlarına ilişkin yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuş olup ($p<0.01$), klorojenik asit miktarlarının uygulamalar ve hasat zamanlarına göre önemli derecede değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Buna göre bütün uygulamalarda genel olarak hasat için geçen süre arttıkça klorojenik asit miktarının da arttığı tespit edilmiştir. En yüksek klorojenik asit miktarları kontrol ve 1000 µM FA uygulamalarında 40. ve 50. gün örneklerinde saptanırken; bütün 24-eBL uygulamaları ile 500 µM FA uygulamasında 50., 100 µM FA uygulamasında ise 40. günde hasat edilen köklerde bulunmuştur. Uygulamalara göre yapılan değerlendirmede ise, 24-eBL uygulamalarının kontrole göre klorojenik asit miktarını önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Özellikle 0.5 mg l⁻¹ konsantrasyonunda yapılan 24-eBL uygulaması, 20. gün dışındaki diğer hasat dönemlerinde en yüksek klorojenik asit miktarının elde edildiği uygulama olarak belirlenmiştir. Ancak 0.5 ve 2.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanıp, 20. günde hasat edilen örnekler arasında önemli bir farklılığın ortaya çıkmadığı da saptanmıştır. Sonuç olarak, en yüksek miktarda

klorojenik asit birikiminin 6.44 mg g^{-1} ile 0.5 mg l^{-1} 24-eBL uygulanan ve 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.11).

Çizelge 4.11. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre klorojenik asit miktarları (mg g^{-1}) üzerine etkileri

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	0.24 Cc*	0.46 BCc	0.67 Bd	1.45 Ad	1.58 Ae	0.88
	0.5	1.68 Da	2.15 Da	3.32 Ca	4.08 Ba	6.44 Aa	3.53
	1.0	0.94 Db	1.38 Cb	1.60 Cc	2.10 Bbc	3.42 Ac	1.88
	2.0	1.04 Db	1.67 Cab	2.09 BCb	2.52 Bb	4.63 Ab	2.39
	100	0.74 Bb	0.90 Bc	0.93 Bd	1.53 Ad	1.84 Bde	1.19
FA (µM)	500	1.01 Db	1.47 Cb	1.81 BCbc	2.06 Bbc	3.34 Ac	1.90
	1000	0.84 Bb	0.91 Bc	0.97 Bd	1.84 Acd	2.14 Ad	1.34
Ortalama		0.93	1.27	1.62	2.22	3.34	
p Değerleri	Hasat zamanı			0.000			
	Uygulama			0.000			
	Hasat zamanı*Uygulama			0.000			

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir ($p < 0.01$).



Şekil 4.11. Klorojenik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.11.3. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin kaftarik asit miktarları üzerine etkileri

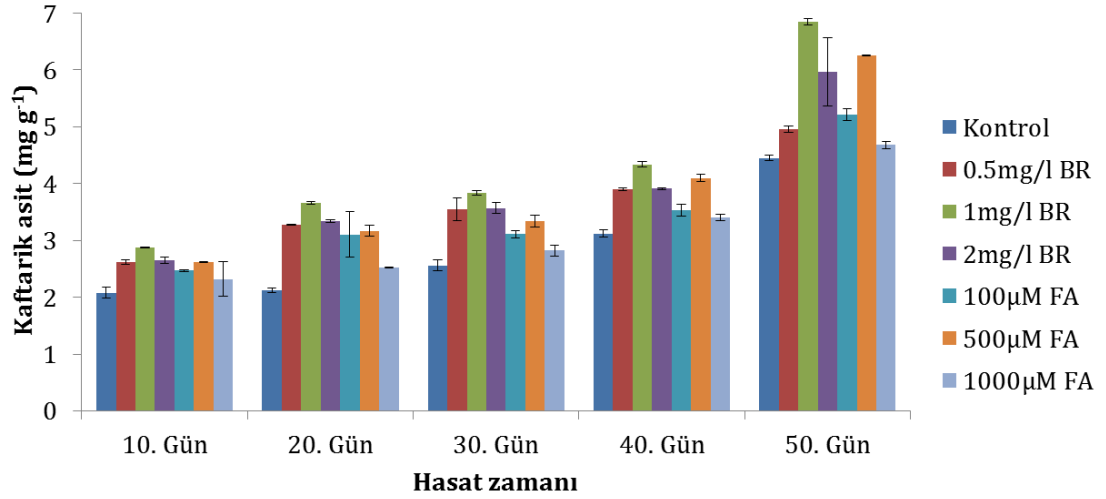
Saçak köklerden elde edilen kaftarik asit miktarlarına ait verilere yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistikî olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Çizelge 4.12'deki verilerin

incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, kaftarik asit miktarlarının uygulamalar ve hasat zamanlarına göre önemli değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir. Genel bir değerlendirme yapıldığında, kültür süresi arttıkça bir başka deyimle hasat için geçen süre arttıkça kaftarik asit miktarının da doğru orantılı olarak arttığı; en yüksek değerlerin de 4.45-6.85 mg g⁻¹ arasında değişen değerlerle 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). Uygulamalar bazında bir değerlendirme yapıldığında ise, hasat için geçen süre arttıkça uygulamalar arasındaki farklılıkların da arttığı tespit edilmiştir. 10. günde hasat edilen köklerde sadece 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulamasının kontrole göre kaftarik asit miktarını artırdığı belirlenmiştir. En yüksek değerlerin elde edildiği 50. gün örneklerinde ise, 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL ile 500 µM FA uygulamalarının kontrol ve diğer uygulamalara göre daha yüksek kaftarik asit miktarlarının elde edildiği uygulamalar olarak dikkat çektikleri saptanmıştır. Araştırma sonucunda 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL ile 500 µM FA uygulamalarının, kontrole göre sırasıyla 1.54 ve 1.40 kat artışla ve 6.85 mg g⁻¹ ve 6.25 mg g⁻¹ değerler ile en yüksek kaftarik asit birikiminin elde edildiği uygulamalar oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

Çizelge 4.12. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre kaftarik asit miktarları (mg g⁻¹) üzerine etkileri

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	2.08 Cb*	2.12 Cc	2.56 BCd	3.12 Bd	4.45 Ad	2.87
	0.5	2.62 Cab	3.28 Ba	3.54 Bab	3.90 Babc	4.96 Acd	3.66
	1.0	2.87 Ca	3.66 Ba	3.84 Ba	4.34 Ba	6.85 Aa	4.31
	2.0	2.65 Cab	3.34 BCa	3.57 Bab	3.91 Babc	5.97 Ab	3.89
	100	2.47 Cab	3.10 BCab	3.11 BCbcd	3.53 Bbcd	5.21 Ac	3.48
FA (µM)	500	2.62 Dab	3.17 CDa	3.34 Cabc	4.10 Bab	6.25 Aab	3.89
	1000	2.32 Cab	3.52 Cbc	2.82 BCcd	3.40 Acd	4.68 Acd	3.15
Ortalama		2.52	3.02	3.25	3.75	5.48	
p Değerleri		Hasat zamanı		0.000			
		Uygulama		0.000			
		Hasat zamanı*Uygulama		0.000			

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir (p<0.01).



Şekil 4.12. Kaftarik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

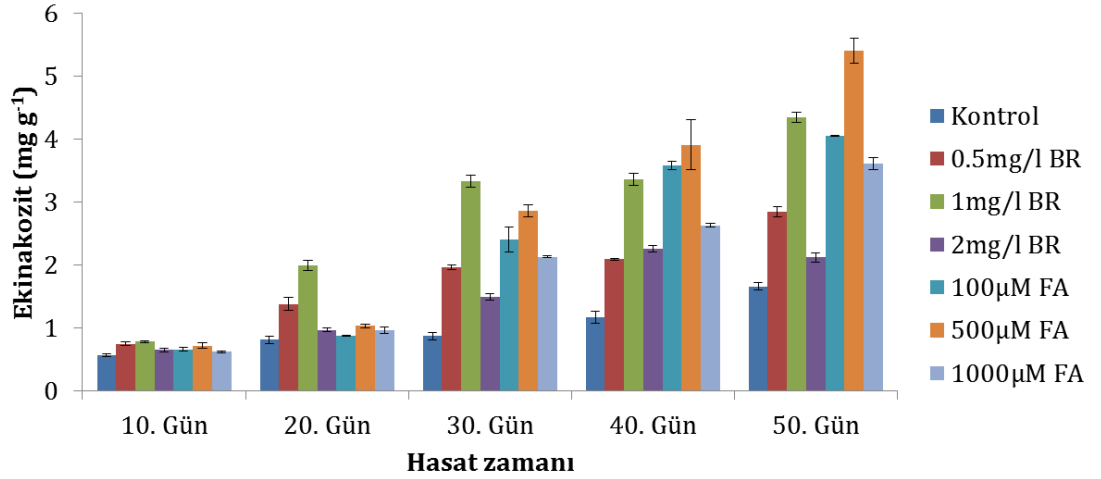
4.11.4. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin ekinakozit miktarları üzerine etkileri

Saçak köklerde tespit edilen ekinakozit miktarlarına ait verilere yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Ekinakozit miktarlarının uygulamalar ve hasat zamanlarına göre önemli derecede değiştiğinin belirlendiği araştırmada, kültür süresi arttıkça ekinakozit miktarlarının da arttığı saptanmıştır. Saçak köklerde en yüksek ekinakozit içeriği 1.66 ile 5.41 mg g⁻¹ arasında değişen değerlerle 50. gün örneklerinden elde edilirken; 2.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulamasında 40. ve 50. günlerde hasat edilen kökler arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı da tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Uygulamalar bakımından bir inceleme yapıldığında, 10. günde hasat edilen saçak kökler arasında ekinakozit içeriği bakımından önemli bir farklılık gözlenmezken; diğer hasat dönemlerinde 24-eBL ve FA uygulamalarının kontrole göre ekinakozit miktarlarını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Buna göre 20. ve 30. günlerde 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL; 40. ve 50. günlerde ise 500 µM FA uygulaması ile en yüksek ekinakozit miktarlarının elde edildiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, en yüksek ekinakozit miktarının 5.41 mg g⁻¹ ile 500 µM FA uygulaması yapılarak 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği ve bu uygulama ile kontrole göre ekinakozit birikimin 3.26 kat arttığı bulunmuştur (Şekil 4.13).

Çizelge 4.13. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre ekinakozit miktarları (mg g⁻¹) üzerine etkileri

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	0.57 Ca*	0.81 Cc	0.87 BCf	1.17 Be	1.66 Af	1.02
	0.5	0.75 Da	1.38 Cb	1.96 Bd	2.09 Bd	2.85 Ad	1.80
	1.0	0.78 Da	1.99 Ca	3.33 Ba	3.36 Bb	4.34 Ab	2.76
	2.0	0.65 Ca	0.97 Cc	1.49 Be	2.26 Acd	2.12 Ae	1.50
	100	0.66 Da	0.88 Dc	2.40 Cc	3.58 Bb	4.05 Ab	2.31
FA (µM)	500	0.72 Da	1.03 Dc	2.86 Cb	3.91 Ba	5.41 Aa	2.79
	1000	0.62 Ea	0.96 Dc	2.13 Ccd	2.63 Bc	3.61 Ac	1.99
Ortalama		0.68	1.14	2.15	2.71	3.43	
p Değerleri	Hasat zamanı			0.000			
	Uygulama			0.000			
	Hasat zamanı*Uygulama			0.000			

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.13. Ekinakozit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.11.5. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin *p*-kumarik asit miktarları üzerine etkileri

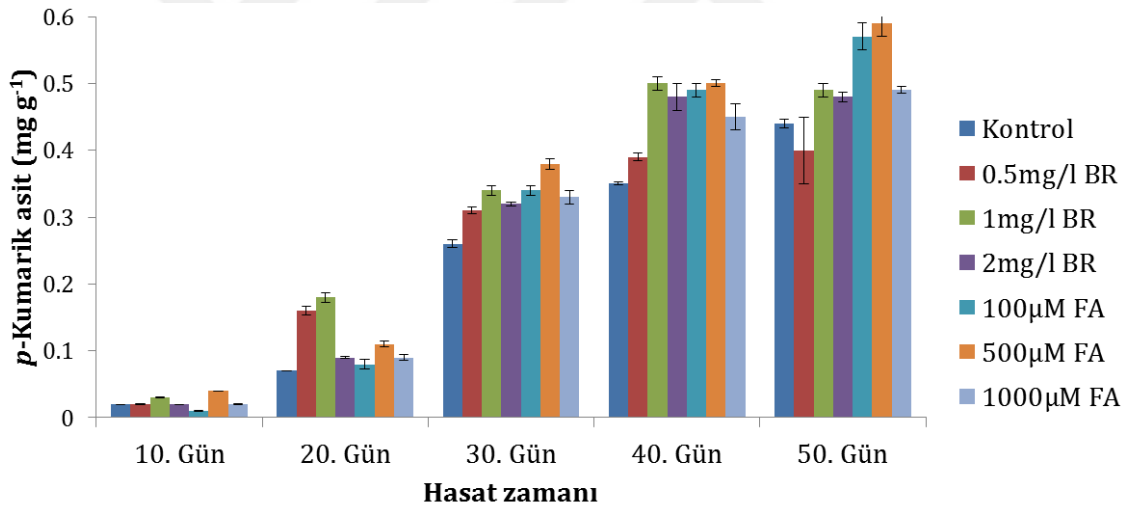
Farklı 24-eBL ve FA uygulamalarına tabi tutularak 5 ayrı dönemde hasat edilen saçak köklerde hesaplanan *p*-kumarik asit miktarları bakımından yapılan varyans analizi sonucunda, uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Çizelge 4.14'ün incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, *p*-kumarik asit miktarlarının yapılan uygulamalara ve hasat zamanlarına göre önemli farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Buna göre en yüksek *p*-kumarik asit miktarı, kontrol ile 100 ve 500 μM konsantrasyonlarında yapılan FA uygulamalarında 50. günde hasat edilen köklerde belirlenirken; bütün 24-eBL uygulamaları ile 1000 μM FA uygulamasında aralarında istatistiksel bir fark bulunmaksızın 40. ve 50. gün örneklerinden elde edildiği tespit edilmiştir. Hasat zamanlarına göre uygulamalar arasındaki farklılıklar incelendiğinde, 10. günde hasat edilen köklerde 0.01 ile 0.04 mg g^{-1} arasında değişen değerlerle *p*-kumarik asit miktarı bakımından uygulamalar arasında önemli bir farklılık bulunmadığı; ancak hasat için geçen süre arttıkça uygulamalar arasında farklılıkların ortaya çıktığı belirlenmiştir. Buna göre 50. gün örneklerinde en yüksek değerlerin 0.57 ve 0.59 mg g^{-1} ile sırasıyla 100 ve 500 μM FA uygulamalarından elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.14).

Çizelge 4.14. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre *p*-kumarik asit miktarları (mg g⁻¹) üzerine etkileri

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	0.02 Ea*	0.07 Db	0.26 Cc	0.35 Bc	0.44 Ac	0.23
	0.5	0.02 Da	0.16 Ca	0.31 Bb	0.39 Ac	0.40 Ac	0.26
	1.0	0.03 Da	0.18 Ca	0.34 Bab	0.50 Aa	0.49 Ab	0.31
	2.0	0.02 Da	0.09 Cb	0.32 Bb	0.48 Aab	0.48 Ab	0.28
	100	0.01 Ea	0.08 Db	0.34 Cab	0.49 Ba	0.57 Aa	0.30
FA (μM)	500	0.04 Ea	0.11 Db	0.38 Ca	0.50 Ba	0.59 Aa	0.32
	1000	0.02 Da	0.09 Cb	0.33 Bb	0.45 Ab	0.49 Ab	0.28
Ortalama		0.02	0.11	0.33	0.45	0.50	

<i>p</i> Değerleri	Hasat zamanı	0.000
	Uygulama	0.000
	Hasat zamanı*Uygulama	0.000

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.14. *p*-Kumarik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

4.11.6. FA ve 24-eBL uygulamalarının saçak köklerin *o*-kumarik miktarları üzerine etkileri

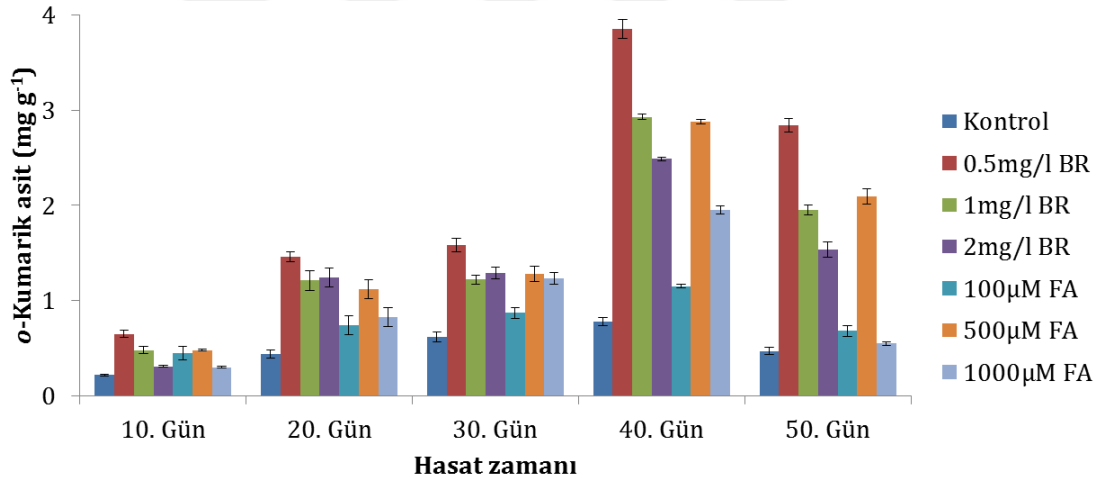
Araştırmada ekinezya bitkisine ait saçak köklerde incelenen bir diğer kafeik asit türevi de *o*-kumarik asit olup, *o*-kumarik asit için yapılan varyans analizi sonucunda uygulama*hasat zamanı interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Çizelge 4.15'te de görüldüğü üzere, *o*-kumarik asit

miktarlarının uygulamalar ve hasat zamanlarına göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir. Hasat dönemlerine göre *o*-kumarik asit miktarlarındaki değişimler incelendiğinde, daha önceki kafeik asit türevlerinden farklı bir seyir gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim araştırmada incelenen diğer kafeik asit türevlerinin miktarları hasat için geçen süre uzadıkça artmış ve en yüksek değerlere 50. günde ulaştıkları saptanmıştır. Oysa *o*-kumarik asitte kontrol ve 100 μ M FA uygulamasında en yüksek değerler 30. ve 40. günlerde; diğer uygulamalarda ise 40. günde hasat edilen köklerden elde edilmiştir. Hasat için geçen süre 50 güne çıktığında bütün uygulamalarda *o*-kumarik asit miktarının düştüğü tespit edilmiştir. Her bir hasat dönemindeki uygulamalar arasındaki farklılıklar incelendiğinde ise, 10. gün hasat edilen köklerde *o*-kumarik asit miktarı 0.22 ile 0.65 mg g⁻¹ arasında değişen değerlerle, en düşük miktarların elde edildiği hasat dönemi olarak belirlenmiştir. En yüksek *o*-kumarik asit birikiminin elde edildiği 40. gün örneklerinde ise bütün 24-eBL ve FA uygulamalarının kontrole göre *o*-kumarik asit miktarını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda en yüksek *o*-kumarik asit miktarının 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanan ve 40. günde hasat edilen köklerden elde edildiği, bu örneklerde 3.85 mg g⁻¹ olarak tespit edilen *o*-kumarik asit miktarının kontrole göre 4.94 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15).

Çizelge 4.15. FA ve 24-eBL uygulamalarının hasat zamanlarına göre *o*-kumarik asit miktarları (mg g⁻¹) üzerine etkileri

Uygulamalar		Hasat zamanı					
		10. Gün	20. Gün	30. Gün	40. Gün	50. Gün	Ortalama
24-eBL (mg l ⁻¹)	Kontrol	0.22 Cc*	0.44 BCd	0.62 ABd	0.78 Af	0.47 Bd	0.50
	0.5	0.65 Da	1.46 Cb	1.58 Ca	3.85 Aa	2.84 Ba	2.08
	1.0	0.48 Dab	1.21 Cc	1.22 Cb	2.93 Ab	1.95 Bb	1.56
	2.0	0.31 Dbc	1.24 Cbc	1.29 BCb	2.49 Ac	1.54 Bc	1.37
	100	0.45 Cabc	0.74 BCa	0.87 ABc	1.15 Ae	0.68 BCd	0.78
FA (µM)	500	0.48 Dab	1.12 Cc	1.28 Cb	2.88 Ab	2.09 Bb	1.57
	1000	0.30 Dbc	0.83 Ca	1.23 Bb	1.95 Ad	0.55 Cd	0.97
	Ortalama	0.41	1.01	1.16	2.29	1.45	
<i>p</i> Değerleri		Hasat zamanı					
		Uygulama					
		Hasat zamanı*Uygulama					
		0.000					
		0.000					
		0.000					

*) Büyük harfler her bir uygulamada zamanlar arası farklılığı, küçük harfler her bir zamanda uygulamalar arası farklılığı göstermektedir (p<0.01).



Şekil 4.15. *o*-Kumarik asit miktarlarının hasat dönemi ve uygulamalara göre değişimi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırma *in vitro* koşullarda elde edilen *Echinacea purpurea* türüne ait bitkilerden alınan yaprak eksplantlarının *Agrobacterium rhizogenes* ile bulaştırılması sonucu, saçak köklülüğe neden olan *rol* genlerinin bitki genomuna transferi ile elde edilen saçak kök kültürlerine yapılan 24-eBL ve FA uygulamaları ile farklı hasat dönemlerinin kök büyümesi ve kafeik asit türevlerinin birikimi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kök büyümesi ile ilgili kriterler (hasat sonrası yaş kök ağırlığı, hasat sonrası kuru kök ağırlığı, kök kuru madde oranı, kök büyüme indeksi), toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve kafeik asit türevleri (kikoric asit, klorogenik asit, kaftarik asit, ekinakozit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit)'nin uygulamalara göre değişimleri incelenmiştir. Ayrıca *in vitro* bitkilerin elde edilmesi aşamalarındaki tohum sterilizasyon yöntemlerinin etkinliği, farklı çimlendirme ortamlarının çimlenme oranları üzerine etkileri ile *Agrobacterium rhizogenes* ile gen transferinde en uygun eksplant kaynağının belirlenmesine yönelik çalışmalar da gerçekleştirilmiştir.

Ekinezya tohumlarının yüksek miktarlarda mikroorganizma taşımaları nedeniyle (Mechanda vd., 2003; Perry vd., 2004), ekinezya bitkisine ait saçak kök kültürlerinin elde edilmesi için *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş bitkilerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Nitekim *Agrobacterium rhizogenes* ile inokülasyon aşamasında steril olarak elde edilen bitkilerden alınan eksplantların kullanılmasının, sera ya da araziden alınan eksplantların kullanılmasına göre daha sorunsuz ve güvenilir olduğu bildirilmektedir (Mathis ve Hinchee, 1994; Hu ve Du, 2006). Bu nedenle araştırmada öncelikle *in vitro* koşullarda çok sayıda steril *E. purpurea* bitkisi elde edilmesini sağlayacak sterilizasyon yöntemi ile çimlendirme ortamının belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla daha önceden farklı araştırmacılar tarafından ekinezya bitkisinde kullanılan farklı sterilizasyon ve çimlendirme ortamları kullanılarak, enfeksiyon riskinin en düşük olduğu sterilizasyon yöntemi ile çimlenme oranının en yüksek olduğu çimlendirme ortamı belirlenmiştir. Araştırma sonucunda %12.17'lik en düşük enfeksiyon oranı ile Liu vd. (2006) tarafından da önerilen yöntem en

uygun sterilizasyon yöntemi olarak seçilmiştir. Buna göre tohumlar 30 saniye %70'lik etil alkolde bekletilmelerinin ardından, 15 dakika boyunca içinde Tween 20 bulunan %15'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde çalkalanarak sterilize edilmiş ve sonrasında her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su içinde durulanmışlardır. En uygun çimlendirme ortamının seçilmesine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda da %76.17 çimlenme oranı ile yine Liu vd. (2006) tarafından ekinezya tohumlarının çimlendirilmesinde kullanılan 30 gl⁻¹ sakkaroz ve 6 gl⁻¹ agar içeren ½ MS besin ortamı uygun çimlendirme ortamı olarak belirlenmiştir. Ekinezya bitkisine ait tohumların çimlenme oranlarının, ticari üretimden ya da doğal popülasyonlardan elde edilmeleri, karanlıkta ya da ışık altında çimlendirilmeleri, tohumların taze olup olmamalarına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Sorenson ve Holden, 1974; Shalaby vd., 1997; Qu vd., 2005). Ticari üretimle elde edilen ekinezya tohumlarının, ışık altında % 90, karanlıkta % 82-97 oranında çimlendiği, doğal popülasyonlardan elde edilen tohumların ise ışık altında % 56, karanlıkta % 4-78 oranında çimlendiği tespit edilmiştir (Qu vd., 2005). Shalaby vd. (1997), ekinezya türleri arasında çimlenme oranları bakımından yaptıkları araştırmada, *E. purpurea* türünde çimlenme oranının %70 civarında olduğunu belirlemişlerdir. Bu değerler dikkate alındığında araştırmada elde edilen sonuçların literatürle uyum içinde olduğu görülmektedir.

Saçak kök kültürleri, genetik ve biyokimyasal olarak istikrarlı olmaları nedeniyle, doku kültürü ile sekonder metabolit üretiminde en popüler yöntemlerden biri haline gelmiştir (Coker ve Camper, 2004; Liu vd., 2006). *A. rhizogenes* ile transformasyonda başarıyı etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Transformasyonda kullanılan eksplant tipi ile kullanılan *A. rhizogenes* ırkı da bu faktörler arasında yer almaktadır (Wang vd., 2006; Tiwari vd., 2007; Sujatha vd., 2013). Bakteri ırklarının, farklı plazmit tiplerine sahip oldukları için transformasyon başarısını etkilediği belirtilmektedir (Giri ve Narasu, 2000; Tao ve Li, 2006; Akramian vd., 2008). Ekinezya bitkilerinde *A. rhizogenes* ile saçak kök elde edilmesi için yapılan çalışmalarda, farklı bakteri ırkları ve eksplant tipleri kullanılmış, agropin tip ırklarda ve yaprak eksplantlarından saçak kök oluşumunun %80 oranında gerçekleştiği

belirlenmiştir (Liu vd., 2006; Wang vd., 2006). Sunulan bu araştırmada, sekonder metabolitlerin üretilmesinde kullanılacak transgenik saçak köklerin yüksek oranda elde edilmesini sağlayacak farklı uygulamalar ve eksplantlar denenmiştir. Bu amaçla *in vitro* şartlarda yetiştirilen steril bitkilerden alınan hipokotil, epikotil ve yaprak eksplantları agropin tipi *A. rhizogenes* ATCC 43057 suşu ile 14 farklı transformasyon uygulaması ile bulaştırılarak, bu uygulamalar sonrasındaki saçak kök oranları hesaplanmıştır. Araştırma sonucunda en yüksek saçak kök oluşum oranının % 71.25 ile vakum infiltrasyonu yapılan yaprak eksplantlarından elde edildiği tespit edilmiştir. Yaprak eksplantlarının *A. rhizogenes* ile yapılan transformasyon çalışmalarında en uygun eksplant kaynağı olduğu daha önce yapılan çalışmalarla da belirlenmiştir (Liu vd., 2006; Wang vd., 2006; Abbasi vd., 2007a). Yine, yapılan literatür taramaları sonucunda, vakum infiltrasyonu ile transformasyon başarısının direkt daldırma ile yapılan transformasyon uygulamalarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Kapila vd., 1997; Victor, 1999; Mahmoudian vd., 2002; Sanyal, 2005). Nitekim, vakum infiltrasyon uygulamasının, bakterilerin yaralı dokulardan veya stoma gibi açıklıklardan bitkiye girişlerini hızlandırıp kolaylaştırarak transformasyonun başarısını arttırdığı bildirilmektedir (Bechtold vd., 1993).

Sunulan bu tez çalışmasında elde edilen köklerin transgenik olup olmadıklarını belirlemek için Southern blot metodu kullanılmıştır. PCR da çoğaltılan *rolC* baz çiftleri saflaştırıldıktan sonra dioksijenin ile işaretlenmiş, hibridizasyon sonrasında X ışınlarına duyarlı bir filmde görüntü elde edilerek *rolC* geninin varlığı gösterilmiştir. Transgenik oldukları düşünülen hatlarla birlikte pozitif ve negatif kontrollere ait görüntüler incelenmiş ve *rol* genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Nitekim *A. rhizogenes* uygulanmamış negatif kontrollerde *rolC* genine ait baz çiftleri görülmezken, pozitif kontrolde ve *A. rhizogenes* uygulanan bazı hatlarda *rolC* geninin varlığı tespit edilmiştir. Böylece yaprak eksplantlarında sürekli büyüme ve yan dallanmalar gösteren saçak köklerden transgenik olanlar Southern blot yöntemi ile belirlenmiştir. Lee vd. (2004) de *A. rhizogenes* aracılığıyla elde edilen saçak köklerde transformasyonu doğrulamak için *rolC* genine ait primer baz çiftlerinin başarıyla kullanılabildiğini bildirmişlerdir.

Araştırmada transgenik olduğu Southern blot metodu ile belirlenen hatlardan birine ait kökler 21 günlük periyotlarla alt kültüre alınarak klonal çoğaltımları sağlanmıştır. Yeterli çoğaltım sağlandıktan sonra transgenik saçak köklere farklı konsantrasyonlarda 24-eBL ve FA uygulamaları yapılmış ve 10. günden başlayarak 10 gün aralıklarla 5 farklı dönemde hasat işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hasattan sonra kökler fiziksel ve biyokimyasal analizlere tabi tutulmuşlardır.

Farklı konsantrasyonlarda saçak köklere yapılan 24-eBL ve FA uygulamalarının kök büyümesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesine yönelik olarak, köklerde hasat sonrası yaş ağırlık (HSYA), hasat sonrası kuru ağırlık (HSKA), kuru madde oranı ile kök büyüme indeksi değerleri incelenmiştir. Uygulama ve hasat dönemlerine göre kök gelişimi ile ilgili incelenen kriterlerden HSYA, HSKA ve kök büyüme indeksinin birbiri ile benzer sonuçlar gösterdikleri tespit edilmiştir. Buna göre incelenen bu kriterlerin hepsinde değerlerin hasat için geçen süre uzadıkça arttığı ve en yüksek değerlere 50. gün örneklerinde ulaşıldığı saptanmıştır. Ayrıca ilk 3 hasat döneminde HSYA ve büyüme indeksinin, ilk 2 hasat döneminde de HSKA'nın uygulamalara göre değişmediği, en yüksek değerlerin elde edildiği 50. gün örneklerinde ise 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulamasının kontrol ve diğer uygulamalara göre önemli bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. FA uygulamalarının kontrole kıyaslandıklarında HSYA, HSKA ve büyüme indeksi bakımından önemli bir etkide bulunmadıkları, 24-eBL uygulamalarının ise konsantrasyona bağlı olarak kök gelişimini uyardıkları tespit edilmiştir. Saçak kök kültürlerinin büyüme indekslerinin, lineer kök uzamasına, yeni büyüme noktalarının oluşumuna ve köklerdeki ikincil kalınlaşmanın olmasına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Apikal meristem, boyuna uzamayı sağlarken, aynı zamanda bölünme geçirerek lateral köklerin oluşumunu sağlayan yeni büyüme noktalarını da meydana getirmektedir. Bu yeni büyüme noktalarından da lateral (yan, kılcak) kökler meydana gelmektedir (Liu vd., 2006). Büyüme indeksi köklerin boyuna uzamalarına ve meydana getirdikleri lateral köklerin miktarına bağlı olarak artış göstermektedir. Boyuna uzama ve lateral köklerin oluşumu ne kadar sık ise kök büyüme indeksi, kök yaş

ağırlığı ve kök kuru ağırlığı da aynı oranda artmaktadır (Giri ve Narasu, 2000; Kuzovkina ve Schneider, 2006). Bu sonuçlara benzer şekilde, araştırmada HSYA, HSKA ve büyüme indeksi birbirlerine paralel sonuçlar vermiş, bu gelişimi uyaran uygulama ve hasat dönemi olarak da 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL ile 50. gün seçilmiştir.

Kök gelişimi ile ilgili incelenen bir diğer kriter de kök kuru madde oranı olup, bu kriter bakımından yapılan uygulama*hasat dönemi interaksiyonunun da önemli olmadığı belirlenmiştir. Kuru madde oranları bakımından en yüksek değerlerin 30. ve 40. gün örneklerinden elde edildiği; kültür süresinin 50 güne çıkmasıyla da azaldığı tespit edilmiştir. Uygulamalar içinde ise en düşük değerin elde edildiği 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması dışında diğer uygulamalarla kontrol grubu arasında bir farklılığın ortaya çıkmadığı saptanmıştır. Abdoli vd. (2013), *E. purpurea* transgenik saçak kök kültürlerinde besin ortamı içerisindeki KNO₃, CaCl₂ ve MgSO₄ oranlarının etkilerini inceledikleri çalışmalarında, kontrol grubu köklerde 4 hafta sonunda kök yaş ağırlığını 2.52 g 100 ml⁻¹, kuru ağırlığını da 0.13 g 100ml⁻¹ olarak tespit etmişlerdir. Liu vd. (2006) ise kültürün 40. gününde alınan *E. purpurea* saçak köklerinde kök kuru ağırlığını 1.22 g 100ml⁻¹ olarak belirlemişlerdir. Sunulan bu araştırmada en yüksek değerlerin elde edildiği 50. gün örneklerinde kök yaş ağırlığının uygulamalara göre 6.89 ile 12.63 g 100ml⁻¹; kök kuru ağırlıklarının 0.65 ile 0.90 g 100ml⁻¹ arasında değiştiği tespit edilmiştir. Abdoli vd. (2013) ekinezya saçak köklerinde 4 hafta sonra kontrol grubunda kuru madde oranını %5.06 olarak tespit ederken, bu araştırmada kontrol grubunun 30. gün örneklerinde kuru madde oranı %9.95 olarak tespit edilmiştir. Kök yaş ve kuru ağırlıkları ile kuru madde oranlarında meydana gelen bu farklılıklar, kültür şartlarına, besin ortamı içeriklerine (Jacob ve Malpathak, 2005), transgenik köklerde bulunan T-DNA'nın kopya sayısına, bitki genomunda entegre olduğu pozisyona ve T-DNA genlerinin farklı ekspresyon düzeylerine (Akramian vd., 2008) bağlı olarak değişebilmektedir. Ayrıca kültür süresi bir başka değişimle hasat dönemi de bu farklılıkların ortaya çıkmasında etkili olan bir diğer faktör olarak dikkati çekmektedir (Liu vd., 2006; Abbasi vd., 2007b; Liu vd., 2012; Abbasi vd., 2012).

Brassinosteroidlerin hem hücre bölünmesini hem de hücre uzamasını teşvik ederek büyümeyi uyardıkları belirlenmiştir (Clouse ve Zurek, 1991; Oh ve Clouse, 1998). Brassinosteroidler ayrıca, hücre duvarının gevşetmesinden sorumlu olan ksiloglukan endotransglisozilazı (XET) proteinlerini kodlayan BRU1 ve TCH4 genlerinin aktivitelerini artırarak da bitki büyümesi üzerinde uyarıcı etkide bulunmaktadır (Cosgrove 1997; Felner 2003). Nitekim 24-eBL uygun konsantrasyon ve uygun gelişme döneminde uygulandıklarında hıyar (Yu vd., 2004), turp (Anuradha ve Rao, 2009), sardunya (Swamy ve Rao, 2009), domates (Hayat vd., 2010) ve fasülye (Rady, 2011) gibi farklı bitkilerde büyümeyi artırdığı belirlenmiştir.

Ekinezya bitkisinde saçak kök kültürlerinde 24-eBL uygulamalarının etkilerinin incelendiği bir araştırma bulunmamaktadır. Ancak brassinosteroidlerin hücre bölünmesi ve büyümesini teşvik edici özelliklerinden dolayı kök gelişimini artırdığı düşünülmektedir. Nitekim brassinosteroidlerin bitki gelişimi, tohum çimlenmesi, rhizogenesis, çiçeklenme, köklenme, hücre genişlemesi ve uzaması gibi pek çok fizyolojik olayı etkiledikleri bilinmektedir (Clouse ve Sasse, 1998; Nemhauser ve Chory, 2004). Nitekim *in vitro* koşullarda farklı bitkilerde yapılan çalışmalarda uygun konsantrasyonlarda kullanılan 24-eBL'nin kök gelişimini artırdığı tespit edilmiştir (Sathiyamoorthy ve Nakamura, 1990; Müssig vd., 2003; Bao vd., 2004).

Ekinezyada FA uygulamalarının kök gelişimi üzerine olan etkilerinin incelendiği tek çalışmada da transgenik olmayan adventif kökler kullanılmış olup, bu çalışmada 500, 1000 ve 5000 μM konsantrasyonunda uygulanan FA'nın kök kuru ağırlığı ile büyüme indeksini kontrole göre artırdığı, en yüksek değerlerin de sırasıyla 1.35 g 100ml⁻¹ ve 12.5 g ile 500 μM FA uygulamasından elde edildiği belirlenmiştir (Mobin vd., 2015). Diğer taraftan elde edilen bu sonuçlardan farklı olarak Edhahiro vd. (2005) ve Palacio vd. (2011), çilek ve *Larrea divaricata*'da yüksek FA konsantrasyonlarının hücre büyümesini büyük oranda engellediğini bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise, FA'nın kök gelişimi üzerinde önemli bir etkide bulunmadığı tespit edilmiştir. Ortaya çıkan bu farklılıkların, köklerin transgenik olup olmamasına, kültür şartlarına, besin

ortamı içeriklerine, kullanılan FA konsantrasyonlarına ve hasat dönemlerinin farklılığına bağlı olarak ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (Jacob ve Malpathak, 2005; Mobin vd., 2015). Nitekim Giri ve Narasu (2000) ile Mehrotra vd. (2015) de transgenik kökler ile transgenik olmayan kökler arasında kök gelişimi arasında farklılıklar bulunduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmada *A. rhizogenes* aracılığı ile *E. purpurea* bitkilerinden elde edilen saçak kök kültürlerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki 24-eBL ve FA uygulamaları ile hasat zamanlarının köklerdeki sekonder metabolit birikimi üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Bu bağlamda ilk olarak incelenen kriterler toplam fenolik madde ile toplam flavonoid miktarları olup, hasat için geçen süre arttıkça bunların miktarının da doğru orantılı olarak arttığı ve en yüksek değerlerin 50. günde hasat edilen saçak köklerden elde edildiği belirlenmiştir. Gerek 24-eBL gerekse FA uygulamalarının kontrolle kıyaslandıklarında toplam fenolik madde miktarı ile toplam flavonoid miktarlarını önemli ölçüde artırdıklarının tespit edildiği araştırmada, 24-eBL uygulamalarının bunların sentezi üzerindeki olumlu etkisinin FA'dan daha yüksek olduğu da saptanmıştır. Buna göre en yüksek toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid miktarlarının sırasıyla 59.41 mg g⁻¹ ve 37.64 mg g⁻¹ ile 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanan ve 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği belirlenmiştir.

E. purpurea'da sekonder metabolit birikimi üzerine dışsal uygulamaların yapıldığı çalışma son derece kısıtlı olup, nitrik oksit (Wu vd., 2007b), GA₃ (Abbasi vd., 2012), GA₃ ve triazoller (Jones vd., 2009) ile ultrasonik uygulamalarının (Liu vd., 2012) etkilerinin incelendiği bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ekinezya bitkisinde ne dış koşullarda ne de *in vitro* koşullarda brassinosteroidlerin toplam fenolik madde miktarı ile toplam flavonoid miktarları üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, farklı bitkilerde brassinosteroid uygulamalarının toplam fenolik madde ile flavonoid miktarını artırmada son derece etkili bir yöntem olduğu tespit edilmiştir (Ahammed vd., 2013; Koca ve Karaman, 2015; Gao vd., 2016).

FA'nın ise fenolik bileşiklerin biyosentezinde kullanılan öncül bir madde olarak, fenilpropanoid ve flavonoid metabolik yollarını başlattığı ve birçok fenolik bileşiğin sentezlenmesini sağladığı bilinmektedir (Koca ve Karaman, 2015). Buna rağmen ekinezyada transgenik saçak kök kültürlerinde FA uygulamalarına daha önceden hiç yer verilmediği, sadece transgenik olmayan adventif köklerde bir çalışmanın bulunduğu görülmektedir. FA uygulamalarının ekinezyada toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarı üzerine olan etkilerinin incelendiği bu araştırmada Mobin vd. (2015), transgenik olmayan adventif köklere uygulanan 500µM FA'nın toplam fenolik madde miktarını kontrole göre %29, toplam flavonoid miktarını da %18 oranında artırdığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde ortamlara ilave edilen FA'nın *Capsicum frutescens*'de kapsaisin (Lindsey ve Yeoman, 1984), *Coleus blumei*'de rosmarinik asit (İbrahim, 1987), *Taxus cuspidata*'da taksol (Fett-Neto vd., 1993, 1994) ve *Cassia occidentalis*'de rotenoit (Vats ve Kamal, 2014) üretimini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Nitekim farklı bitkilerde fenolik bileşiklerin sentezinde öncül bir madde olan FA'nın, bitkilerde enzimatik yolların uyarılmasıyla bu bileşiklerin sentezinin artırılabilirdiği belirlenmiştir (Al-Gendy vd., 2015; Koca ve Karaman, 2015).

Ekinezyanın köklerinde bulunan metabolitlerin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, ekinezya köklerinin kikorik asit, kaftarik asit, klorogenik asit ve ekinakozit başta olmak üzere kafeik asit türevlerince zengin oldukları belirlenmiştir (Binns vd., 2002; Molgaard vd., 2003; Pellati vd., 2004; Lucchesini vd., 2009; Lin vd., 2011; Liu vd., 2012; Cui vd., 2013). Ekinezya köklerinin kafeik asit türevlerince zengin olması nedeniyle, bu araştırmada 24-eBL ve FA uygulamalarının saçak köklerdeki kafeik asit türevlerinin sentezi üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla kikorik asit, kaftarik asit, klorogenik asit, kafeik asit ve ekinakozitin yanısıra, kafeik asit türevleri ile benzer metabolik yoldan üretilen *p*-kumarik ve *o*-kumarik asit miktarları HPLC ile belirlenmiştir.

İncelenen kafeik asit türevlerinden sadece kafeik asitin saçak köklerde tespit edilemediği araştırma sonucunda, yapılan 24-eBL ve FA uygulamaları ile hasat dönemlerinin kafeik asit türevlerinin birikiminde önemli farklılıklara neden oldukları saptanmıştır. Buna göre ekinezya köklerinde sentezlenen en önemli

kafeik asit türevi olan kikorik asit birikiminin hasat için geçen süre uzadıkça arttığı ve en yüksek değerlere 50. gün örneklerinde ulaşıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca kontrolle kıyaslandığında kikorik asit miktarının 24-eBL ve FA uygulamaları ile önemli ölçüde arttığı; ancak 24-eBL uygulamalarının FA uygulamalarına göre daha etkili olduğu ve kikorik asit birikimini daha fazla teşvik ettiği belirlenmiştir. Özellikle en yüksek kikorik asit miktarının elde edildiği 1.0 mg l⁻¹ konsantrasyonundaki 24-eBL uygulamasının kikorik asit birikimi bakımından en uygun uygulama olduğu ve kontrole göre kikorik asit miktarını 3.22 kat artırdığı tespit edilmiştir. FA uygulamaları arasında ise 500 µM konsantrasyondaki uygulama ile kontrole göre kikorik asit miktarının 2.33 kat arttığı, ancak konsantrasyonun 1000 µM'ye yükselmesi ile kikorik asit miktarının düştüğü tespit edilmiştir. Benzer şekilde Mobin vd. (2015) de transgenik olmayan ekinezya bitkisine ait adventif köklerde 500 µM konsantrasyonunda uyguladıkları FA'nın kikorik asit miktarını kontrole göre %23.62 oranında artırdığını, ancak konsantrasyonun artmasıyla kikorik asit miktarında önemli düşüşlerin meydana geldiğini saptamışlardır. Ekinezya bitkisine ait saçak köklerde 24-eBL ve FA uygulamasına ilişkin bir araştırma bulunmamasına karşılık, GA₃ uygulaması ile kontrole göre 1.29 kat (Abbasi vd, 2012), ultrasonik ses dalgalarıyla da 1.42 kat (Liu vd., 2012) daha fazla kikorik asit elde edildiği belirlenmiştir.

Araştırmada incelenen bir diğer kafeik asit türevi de klorogenik asit olup, tıpkı kikorik asitte olduğu gibi 50. günde yapılan hasattan en yüksek klorogenik asit birikiminin elde edildiği ve 24-eBL uygulamalarının FA uygulamalarına göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna göre 24-eBL uygulamaları içinde en yüksek klorogenik asit miktarının elde edildiği 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması ile kontrole göre 4.08 kat daha fazla klorogenik asit elde edilirken; FA uygulamaları içinde en uygun konsantrasyon olarak bulunan 500 µM FA'da bu artış 2.11 kat seviyesinde kalmıştır. Bu sonuçlara göre kikorik asitte olduğu gibi, klorogenik asit üretimini artırmada da 24-eBL uygulamalarının etkin bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ekinezya bitkisinin transgenik olmayan adventif köklerine uygulanan 1000 µM FA'nın klorogenik asit miktarını kontrole göre %14.5 oranında artırırken; konsantrasyonun 5000 µM'ye çıkmasıyla

klorogenik asit miktarında kontrole göre %69.81 gibi önemli bir düşüşün ortaya çıktığı belirtilmiştir (Mobin vd., 2015). Saçak köklerdeki klorogenik asit miktarının artırılmasına yönelik olarak yapılan araştırmalarda, ışıktan süresinin değiştirilmesi (Abbasi vd., 2007b), 0.025 μM konsantrasyonunda GA_3 uygulaması (Abbasi vd., 2012) ve ultrasonik ses dalgalarının kullanılması (Liu vd., 2012) ile kontrol grubu köklere göre klorogenik asit miktarının önemli miktarlarda artırılabilirdiği de belirlenmiştir.

Araştırmada hasat dönemi uzadıkça miktarı artan ve 50. gün örneklerinde en yüksek birikiminin sağlandığı kafeik asit türevlerinden biri de kaftarik asit olup, uygulamalar arasında 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL ile 500 μM FA uygulamalarının diğer uygulama ve kontrole göre kaftarik asit birikimini önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. Mubin vd. (2015) ise ekinezyada transgenik olmayan adventif köklere uygulanan 500, 1000 ve 5000 μM konsantrasyonlarındaki FA'nın, kontrole kıyaslandıklarında kaftarik asit miktarında önemli bir farklılık yaratmadıklarını tespit edilmiştir. Elde edilen bu farklı sonuçlar, kaftarik asit birikiminin köklerin transgenik olup olmamalarına, kullanılan besin ortamlarına, FA konsantrasyonlarına ve hasat dönemlerine göre değişebileceğini göstermektedir. Ancak dışsal uygulamalarla ekinezyada kaftarik asit miktarlarının artırılabilirdiği daha önce GA_3 ve ultrasonik ses dalgaları ile yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Abbasi vd, 2012; Liu vd., 2012).

Ekinakozit de önemli bir kafeik asit türevi olup, araştırmada hasat zamanları ile 24-eBL ve FA uygulamalarının ekinakozitin birikimi üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Ekinakozit miktarının kültür süresi uzadıkça arttığı ve en yüksek ekinakozit birikiminin 50. gün örneklerinden elde edildiği saptanmıştır. Araştırmada kullanılan bütün 24-eBL ve FA uygulamalarının kontrole göre ekinakozit miktarını önemli derecede artırdığı; ancak kontrole göre 3.36 kat daha fazla ekinakozit üretiminin sağlandığı 500 μM FA uygulamasının diğer uygulamalara göre de daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Literatür taramaları sırasında *E. purpurea* bitkisine ait transgenik saçak kök kültürlerinde ekinakozit maddesinin miktarlarının belirlenmesine ya da artırılmasına ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Araştırmada incelenen diğer kafeik asit türevleri de *p*-kumarik ve *o*-kumarik asitlerdir. En yüksek değerlerin 40. ve 50. gün örneklerinden elde edildiği *p*-kumarik asitte, FA uygulamalarının 24-eBL uygulamalarına göre daha etkili olduğu, özellikle 100 ve 500 µM konsantrasyonlarında uygulanan FA'nın *p*-kumarik asit miktarını diğer uygulamalara göre daha yüksek seviyelere çıkardığı tespit edilmiştir. En yüksek *o*-kumarik asit birikiminin ise 40. gün örneklerinden elde edildiği ve *o*-kumarik asit üretiminde 24-eBL uygulamalarının FA uygulamalarına göre daha etkili oldukları belirlenmiştir. 24-eBL uygulamaları içinde ise 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulamasının en yüksek *o*-kumarik asit üretimini sağlayarak, kontrol grubuna göre 4.94 kat daha fazla birikimin gerçekleşmesini sağladığı saptanmıştır.

Yapılan literatür taramaları sonucunda ekinezyada *p*-kumarik ve *o*-kumarik asit miktarlarının belirlenmesine ya da artırılmasına ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak *p*-kumarik asit kafeik asitlerin üretimi için büyük önem taşımaktadır. Nitekim kafeik asit türevlerinin biyosentez basamağında kilit rol oynayan *p*-kumarik asit, FA'nın PAL aktivitesi ile sinamik asite, oradan da *p*-kumarol CoA'ya dönüşerek kuinik asit ve şikimik asit ile birleşerek başta klorogenik asit olmak üzere diğer kafeik asit türevlerinin biyosentezinin sağlanmasına öncülük etmektedir (Shetty, 2001; Petersen ve Simmonds, 2003; Boudet, 2007; Petersen vd., 2009; Tuan vd., 2014).

Ekinezyada transgenik saçak köklere uygulanan 24-eBL ve FA ile farklı hasat dönemlerinin kafeik asit türevlerinin birikiminde önemli farklılıklara neden olduğu, uygun hasat dönemi ve uygulama ile kafeik asit türevlerinin kontrole göre yüksek seviyelere çıkartılabileceği tespit edilmiştir. Ekinezya saçak köklerinde 24-eBL ve FA uygulamalarına ilişkin yapılan ilk çalışma olma özelliğini taşıyan bu araştırmada, gerek 24-eBL'nin gerekse FA'nın sekonder metabolit üretiminde başarı ile kullanılabilecek uygulamalar olduğu ortaya konulmuştur.

Naeem vd. (2012) brassinosteroidlerin sekonder metabolit üretiminden sorumlu iç genetik potansiyeli tetiklemesi ile metabolit birikimini artırdıklarını ifade etmişlerdir. Nitekim 24-eBL farklı bitki türlerinde fenolik madde, uçucu yağ gibi farklı metabolitlerin sentezinin artırılmasında başarı ile kullanıldığı yapılan bir çok araştırma ile belirlenmiştir (Maia vd., 2004; Faroog vd., 2009; Swamy ve Rao 2009; Çoban ve Göktürk Baydar, 2017).

Herhangi bir metabolitin biyosentez yolunda öncül madde olarak kullanılan maddelerin dışsal uygulamalar şeklinde bitkilere uygulanması da sekonder metabolit birikimini artırmaktadır. Nitekim adventif köklere uygulanan dışsal öncül maddelerin çeşitli metabolitlerin biyosentezini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (Palacio vd., 2011; Murthy vd., 2014). Sistematikteki adı 2-amino-3-fenil propanoik asit olan FA, fenolik bileşiklerin sentezinde yer alan öncül bir madde olup, gerekli enzimatik yolların uyarılmasıyla bu bileşiklerin sentezini birçok bitkide artırdığı belirlenmiştir (Koca ve Karaman, 2015; Al-Gendy vd., 2015).

Sonuç olarak, *E. purpurea* bitkisinde *A. rhizogenes* ile elde edilen transgenik saçak köklerde kafeik asit türevlerinin artırılması amacıyla uygulanan 24-eBL ve FA'nın etkilerinin belirlendiği bu doktora tez çalışmasında elde edilen veriler toplu olarak değerlendirildiğinde;

1. Transformasyon aşamalarında kullanılacak olan *in vitro* bitkilerin elde edilmesinde en düşük enfeksiyon oranının elde edildiği, 30 saniye %70'lik etil alkolde bekletilme, 15 dakika içinde Tween 20 bulunan %15'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde çalkalama ve her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su içinde durulama şeklinde yapılan sterilizasyon yöntemi en uygun sterilizasyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

2. En yüksek tohum çimlenme oranının elde edildiği 30 g l⁻¹ sakkaroz ve 6 g l⁻¹ agar ilave edilmiş ½ MS ortamı en uygun çimlendirme ortamı olarak belirlenmiştir.

3. *A. rhizogenes* ile yapılan transformasyon çalışmalarında en uygun eksplantın yapraklar olduğu ve vakum infiltrasyonu yönteminin diğer yöntemlere göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

4. Transgenik oldukları düşünülen hatların Southern blot tekniği ile transgenik oldukları belirlenmiştir.

5. 24-eBL ve FA uygulanarak farklı zamanlarda hasat edilen köklerde en yüksek HSYA, HSKA ve büyüme indeksinin 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılarak 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği; FA'nın bu kriterler bakımından önemli bir etkiye bulunmadığı tespit edilmiştir.

6. Toplam fenolik madde ile toplam flavonoid miktarının hem 24-eBL hem de FA uygulamaları ile kontrole göre önemli derecede arttığı; ancak 24-eBL uygulamalarının FA uygulamalarına göre daha etkili bulunduğu belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarlarının 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulaması yapılarak 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği saptanmıştır.

7. Hasat dönemleri ve 24-eBL ile FA uygulamalarının kafeik asit türevleri üzerine olan etkileri de incelenmiş olup, köklerde klorojenik asit, klorojenik asit, kaftarik asit, ekinakozit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitin varlığı tespit edilmiş, ancak kafeik asit köklerde tespit edilememiştir.

8. Araştırmada klorojenik asit birikimini artırmada 24-eBL uygulamalarının FA uygulamalarına göre daha etkili olduğu ve en yüksek klorojenik asit miktarının 1.0 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanarak 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği tespit edilmiştir.

9. Klorojenik asit üretiminde 24-eBL uygulamalarının uyarıcı etkisinin FA uygulamalarına göre daha fazla olduğu ve en yüksek klorojenik asit miktarının 0.5 mg l⁻¹ 24-eBL uygulanarak 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği belirlenmiştir.

10. Kaftarik asit için en uygun hasat döneminin 50. gün; en uygun uygulamaların da 1.0 mg l^{-1} 24-eBL ve $500 \text{ }\mu\text{M}$ FA uygulamaları olduğu belirlenmiştir.

11. Ekinakozit birikiminde en yüksek değerlerin $500 \text{ }\mu\text{M}$ FA uygulanıp, 50. günde hasat edilen köklerden elde edildiği belirlenmiştir.

12. *p*-kumarik asit birikiminde 40. ve 50. günler en uygun hasat dönemleri olarak belirlenirken; 100 ve $500 \text{ }\mu\text{M}$ konsantrasyonundaki FA'nın da en yüksek *p*-kumarik asit miktarlarının elde edildiği uygulamalar olduğu belirlenmiştir.

13. *o*-kumarik asit bakımından da en yüksek değerler, 0.5 mg l^{-1} 24-eBL uygulanarak 40. günde hasat edilen köklerden elde edilmiştir.

Sonuç olarak, *Agrobacterium rhizogenes* ile transforme edilmiş *E. purpurea* bitkisine ait saçak kök kültürlerinde 24-eBL ve FA uygulamalarının sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik olarak başarı ile kullanılabileceği; ancak 24-eBL uygulamalarının FA'ya göre daha fazla tercih edilebileceği tespit edilmiştir. Yapılan 24-eBL uygulamaları kendi içinde değerlendirildiğinde, en yüksek toplam fenolik madde, toplam flavonoid, kikorik asit, kaftarik asit, ekinakozit ve *p*-kumarik asit miktarlarının elde edilmesini sağlayan 1.0 mg l^{-1} 24-eBL uygulaması en uygun uygulama olarak belirlenmiştir. FA uygulamaları içinde ise $500 \text{ }\mu\text{M}$ FA uygulamasının, incelenen bütün kriterler bakımından, diğer FA konsantrasyonlarına göre daha başarılı sonuçlar verdiği saptanmıştır. Hasat dönemi olarak da hasat için geçen sürenin 50 gün olduğu bir başka deyimle 50. günde en uygun hasat dönemi olarak tespit edilmiştir. Kısaca başta 24-eBL olmak üzere hem 24-eBL hem de FA'nın uygun doz ve hasat dönemi seçildiğinde ekinezya saçak köklerinde kafeik asit türevlerinin artırılmasında başarı ile kullanılabilecek uygulamalar olduğu sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abbasi, B.H., Saxena, P.K., Murch, S.J., Liu, C.Z., 2007a. Echinacea Biotechnology: Challenges and Opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 43, 481–492.
- Abbasi, B.H., Stiles, A.R., Saxena, P.K., Liu, C.Z., 2012. Gibberellic Acid Increases Secondary Metabolite Production in *Echinacea purpurea* Hairy Roots. *Application of Biochemistry and Biotechnology*, 168, 2057–2066.
- Abbasi, B.H., Tian, C.L., Murch, S.J., Saxena, P.K., Liu, C.Z., 2007b. Light-Enhanced Caffeic Acid Derivatives Biosynthesis in Hairy Root Cultures of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Reports*, 26, 1367–1372.
- Abdoli, M., Moieni, A., Naghdi Badi, H., 2013. Influence of KNO₃, CaCl₂ and MgSO₄ Concentrations on Growth and Cichoric Acid Accumulation in Hairy Root Culture of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.). *Journal of Medicinal Plants*. Volume 12, No. 45.
- Adam, K.L., 2002. Echinacea as an Alternative Crop. ATTRA-National Sustainable Agriculture Information Service.
- Ahammed, G.J., Zhou, Y.H., Xia, X.J., Mao, W.H., Shi, K., Yu, J.Q., 2013. Brassinosteroid Regulates Secondary Metabolism In Tomato Towards Enhanced Tolerance to Phenanthrene. *Biologia Plantarum*. 57(1), 154-158.
- Ajungla, L., Patil, P.P., Barmukh, R.B., Nikam, T.D., 2009. Influence of Biotic and Abiotic Elicitors on Accumulation of Hiyosiyamin and Scopolamine in Root Cultures of *Datura metel* L. *Indian Journal of Biotechnology*. 8, 317-322.
- Akramian, M., Tabatabaei, S.M.F., Mirmasoumi, M., 2008. Virulence of Different Strains of *Agrobacterium rhizogenes* on Genetic Transformation of Four *Hyoscyamus* Species. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 3(5), 759-763.
- Alam, M.M., Hayat, S., Ali B., Ahmad, A., 2007. Effect of 28-Homobrassinolide Treatment on Nickel Toxicity in *Brassica juncea*, *Photosynthetica*. 45, 139-142.
- Al-Gendy, A.A., Bakr, R.O., El-Gindi, O.D., 2015. Production of Flavonoids and Phenolic Compounds by Elicitation of *Iphiona mucronata* (Forssk.) Asch. Schweinf (*Asteraceae*) Callus and Suspension Cultures. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 30(1), 1293-1300.
- Ali, M.B., Singh, N., Shohael, A.M., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2006. Phenolics Metabolism and Lignin Synthesis in Root Suspension Cultures of *Panax ginseng* in Response to Copper Stress. *Plant Science*. 171, 147-154.

- Anonim, 2001., Nutraceutical Market and Industry Information. Saskatchewan Nutraceutical Network. <http://www.nutranet.org/subpages/market.htm>.
- Anuradha, S., Rao, S.S.R., 2009. Effect of 24-epibrassinolide on The Photosynthetic Activity of Radish Plants Under Cadmium Stress. *Photosynthetica*, 47(2), 317-320.
- Awad, W., Kuvalekar, A., Harsulkar, A., 2014. Microbial Elicitation In Root Cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. for Elevated Glycyrrhizic Acid Production. *Industrial Crop Products*. 54, 13–16.
- Ayora-Talavera, T., Chappell, J., Lozoya-Gloria, E., Loyola-Vargas, V.M., 2002. Overexpression in *Catharanthus roseus* Hairy Roots of a Truncated Hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase Gene. *Applied biochemistry and biotechnology*, 97(2), 135-145.
- Bajguz, A., Tretyn, A., 2003. The Chemical Characteristic and Distribution of Brassinosteroids in Plants. *Phytochemistry*. 62, 1027-1046.
- Bao, F., Shen, J., Brady, S.R., Muday, G.K., Asami, T., Yang, Z. 2004. Brassinosteroids Interact with Auxin to Promote Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 134(4), 1624-1631.
- Baque, M.A., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2010. Growth, Secondary Metabolite Production and Antioxidant Enzyme Response of *Morinda citrifolia* Adventitious Root As Affected by Auxin and Cytokines. *Plant Biotechnology Reports*. 4, 109-116.
- Barnes, J., Anderson, L.A., Gibbons, S., Phillipson J.D., 2005. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): A Review of Their Chemistry, Pharmacology and Clinical Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57, 929-954.
- Barrett, B., 2003. Medicinal Properties of *Echinacea*: A Critical Review. *Phytomedicine*, 10, 66–86.
- Barrett, B., Vohmann, M., Calabrese, C., 1999. *Echinacea* for Upper Respiratory Infection. *Journal of Family Practice*, 48: 628-635.
- Bauer, R., Wagner, H., 1991. *Echinacea* Species as Potential Immunostimulatory Drugs. In: H Wagner and NR Farnsworth (eds) *Economic and Medicinal Plant Research*. Academic, New York, 253–321.
- Baydar, N.G., Özkan, G., Sağdıç, O., 2004. Total Phenolic Contents and Antibacterial Activities of Grape (*Vitis vinifera* L.) Extracts. *Food Control*, 15(5), 335-339.
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. 1993. In Planta *Agrobacterium* mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants. *Comptes*

Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la vie, 316(10), 1194-1199.

Bensaddek, L., Villarreal, M.L., Fliniaux, M.A., 2008. Induction and Growth of Hairy Roots for the Production of Medicinal Compounds, Electronic Journal of Integrative Biosciences. 3, (1), 2-9.

Binns, S.E., Arnason, J.T., Baum, B.R., 2004. Taxonomic History and Revision of the Genus Echinacea. Echinacea: the Genus Echinacea, 3-12.

Binns, S.E., Livesey, J.F., Arnason, J.T., Baum, B.R., 2002. Phytochemical Variation in *Echinacea* from Roots and Flowerheads of Wild and Cultivated Populations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(13), 3673-3687.

Blumenthal, M., 2003. The ABC Clinical Guide to Herbs. American Botanical Council. Thieme, New York.

Boudet, A.M., 2007. Evolution and Current Status of Research in Phenolic Compounds. Phytochemistry, 68(22), 2722-2735.

Bourgaud, F., Bouque, V., Guckert, A., 1999. Production of Flavonoids by *Psoralea* Hairy Root Cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 56, 97-104.

British Herbal Medicine Association, 2003. A Guide to Traditional Herbal Medicines. British Herbal Medicine Association, Bournemouth. ISBN 0-903032-11-2 Soft cover. <http://bhma.info/index.php/a-guide-to-traditional-herbal-medicines>

Brunner, H., Tanker, N., 1988. Eczacılık, Botanik ve Tıp Öğreniminde Yardımcı Mesleki Latince, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Sayı: 63.

Büyük, İ., Aydın, S.S., Aras, S., Okulu, U.M.Y., 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 69(2), 97-110.

Çalışkan, Ö., Odabaş, M.S., 2011. Ekinezya (*Echinacea* sp.) Türleri, Genel Özellikleri ve Yetiştiriciliği. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi, 26(3):265-270.

Çetin, E.S., 2012. Gamay Üzüm Çeşidine Ait Kallus Kültürlerinde Fenolik Bileşikler ile α -Tokoferol Üretiminin Artırılması: Potansiyel Bir Elisitör Olarak UV-C. SDU Journal of the Faculty of Agriculture/SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 7(2).

Çetin, E.S., Uzunlar, F., Baydar, N.G., 2011. UV-C Uygulamasının Gamay Üzüm Çeşidine Ait Kalluslarda Sekonder Metabolit Üretimi Üzerine Etkileri. Gıda Dergisi, 36(6).

- Cheminat, A., Zawatzky, R., Becker, H., Brouillard, R., 1988. Caffeoyl Conjugates from *Echinacea* Species: Structures and Biological Activity. *Phytochemistry*, 27, 2787-2794.
- Cheng, Q., He, Y., Li, G., Liu, Y., Gao, W., Huang, L., 2013. Effects of Combined Elicitors on Tanshinone Metabolic Profiling and SmCPS Expression in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Cultures. *Molecules*, 18(7), 7473-7485.
- Chikezie, P.C., Ibegbulem, C.O., Mbagwu, F.N., 2015. Bioactive Principles from Medicinal Plants. *Research Journal of Phytochemistry*, 9, 88-115.
- Choffe, K.L., Murch, S J., Saxena, P.K., 2000. Regeneration of *Echinacea purpurea*: Induction of Root Organogenesis from Hypocotyl and Cotyledon Explants. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 62(3), 227-234.
- Choi, Y., Kim, Y.S., Paek, K.Y., 2008, Types and Design of Bioreactors For Hairy Root Culture, *Plant Tissue Culture Engineering*, 161-172.
- Christey, M.C., 2001, Use of Ri-Mediated Transformation for Production of Transgenic Plants, *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37, 687-700.
- Clouse, S.D., Zurek, D., 1991. Molecular Analysis of Brassinolide Action in Plant Growth and Development. 122-140.
- Clouse, S.D., 2002. Brassinosteroids. *American Society of Plant Biologists*. 1-23.
- Clouse, S.D., Sasse, J.M., 1998. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 427-451.
- Çoban, Ö., Baydar, N.G., 2016. Brassinosteroid Effects on Some Physical and Biochemical Properties and Secondary Metabolite Accumulation in Peppermint (*Mentha piperita* L.) Under Salt Stress. *Industrial Crops and Products*, 86, 251-258.
- Çoban, Ö., Baydar, N.G., 2017. Brassinosteroid Modifies Growth and Essential Oil Production in Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-7.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiology*. 123, 825-832.
- Coker, P.S., Camper, N.D., 2004. *In vitro* Culture of *Echinacea* Species. *Echinacea. The genus Echinacea*. CRC, Boca Raton, 23-28.
- Contin, A., Van Der Heijden, R., Verpoorte, R., 1999. Effects of Alkaloid Precursor Feeding and Elicitation on The Accumulation of Secologanin in a *Catharanthus roseus* Cell Suspension Culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56(2), 111-119.

- Cosgrove, D., 1997. Relaxation in A High Stress Environment: The Molecular Basis of Extensible Cell Walls and Enlargement. *Plant Cell*, 9, 1031–1041.
- Cozzolino, R., Malvagna, P., Spina, E., Giori, A., Fuzzati, N., Anelli, A., Impallomeni, G., 2006. Structural Analysis of The Polysaccharides from *Echinacea angustifolia* Radix. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 263-272.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 24, 1250-1319.
- Cui, H.Y., Baque, M.A., Lee, E.J., Paek, K.Y., 2013. Scale-up of Adventitious Root Cultures of *Echinacea angustifolia* In A Pilot-scale Bioreactor for The Production of Biomass and Caffeic Acid Derivatives. *Plant Biotechnology Reports*. 7(3), 297-308.
- Çulha, Ş., Çakırlar, H., 2015. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(2), 11-34.
- Demirci, T., Özdamar, P., Baydar Göktürk, N., 2015. *In vitro* Applications for the Increasing of Root-Related Secondary Metabolite Production in Medicinal Plants and Vegetables. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(5), 261-270.
- Dey, P. M., Harborne, J. B. (Eds.), 1997. *Plant Biochemistry*. Academic press.
- Dhakulkar, S., Ganapathi, T.R., Bhargava, S., Bapat, V. A., 2005, Induction of Hairy Roots in *Gmelina arborea* Roxb. and Production of Verbascoside in Hairy Roots, *Plant Science*, 169,(5): 812-818.
- Doğmuş, D., Durucasu, İ., 2013. Keten Tohumu Çeşitlerinin n-Bütanol Fraksiyonlarının Fenolik Bileşenlerinin Antioksidan Aktivitesi. *Celal Bayar University Journal of Science*, 9(1), 47-56.
- Dörnenburg, H., Knorr, D., 1997. Challenges and Opportunities for Metabolite Production from Plant Cell and Tissue Cultures. *Food Technology*, 51, 47-53.
- Douglasa, M.H., Smallfieldb, B.M., Wallaceb, A.R., Mc-Gimpsey, J.A., 2014. Saffron (*Crocus sativus* L.): The Effect of Mother Corm Size on Progeny Multiplication, Flower and Stigma Production. *Science of Horticulture-Amsterdam*, 166: 50–58. DOI 10.1016/j.scienta.2013.12.007.
- Edahiro, J.I., Nakamura, M., Seki, M., Furusaki, S., 2005. Enhanced Accumulation of Anthocyanin In Cultured Strawberry Cells by Repetitive Feeding of L-Phenylalanine Into The Medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99(1), 43-47.
- Emiroğlu, Ü., Gürel, A., 1999. Transforme Saçaklı Kökler ve Sekonder Metabolitlerin Üretimi, Tarımda Biyoteknoloji, Ebiltem- İzmir.

- Facino, R.M., Carini, M., Aldini, G., Marinello, C., Arlandini, E., Franzo, L., Colombo, M., Pietta, P., Mauri, P., 1993. Direct Characterization of Caffeoylesters with Antihyaluronidase Activity in Crude Extracts from *Echinacea angustifolia* Roots by Fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry. *Farmaco*, 48, 1447–1456.
- Farooq, M., Wahid, A., Basra, S.M.A., 2009. Improving Water Relations and Gas Exchange with Brassinosteroids in Rice Under Drought Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(4), 262-269.
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D.J., Cheema, S.A., Aziz, T., 2010. Comparative Time Course Action of the Foliar Applied Glycinebetaine, Salicylic Acid, Nitrous Oxide, Brassinosteroids and Spermine in Improving Drought Resistance of Rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196, 336-345.
- Felner, M., 2003. Recent Progress in Brassinosteroid Research: Hormone Perception and Signal Transduction. In: Hayat S, Ahmad A (eds) *Brassinosteroids: Bioactivity and Crop Productivity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ferguson, L.R., Zhu, S.T., Harris, P.J., 2005. Antioxidant and Antigenotoxic Effects of Plant Cell Wall Hydroxycinnamic Acids in Cultured HT-29 Cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(6), 585-593.
- Fetrow, C.W., Avila, J.R., 1999. *Professional's Handbook of Complementary and Alternative Medicines*. Springhouse Corporation, Pennsylvania.
- Fett-Neto, A.G., Melanson, S.J., Sakata, K., DiCosmo, F., 1993. Developing Calli of *Taxus cuspidata* by Medium Composition Modification. *Bio/technology*, 731.
- Fett-Neto, A.G., Zhang, W.Y., Dicosmo, F., 1994. Kinetics of Taxol Production, Growth, and Nutrient Uptake in Cell Suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and bioengineering*, 44(2), 205-210.
- Flores, H.E., Hoy, M.W., Pickard, J.J., 1987. Secondary Metabolites from Root Cultures. *Trends Biotechnolgy*, 5, 64-69. DOI 10.1016/S0167-7799(87)80013-6.
- Foster, S., Duke, J. A., 1990. *A Field Guide to Medicinal Plants: Eastern and Central North America* (Vol. 395353092). Boston: Houghton Mifflin Company xii, 366p. ISBN.
- Fujioka, S., 1999. Natural Occurrence of Brassinosteroids in the Plant Kingdom, Eds: Sakurai A., Yokota T., Clouse S.D., *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*. Springer-Verlag, Tokyo.
- Galambosi, B., 2004. Cultivation in Europe. In: S Miller (ed) *Echinacea. The Genus Echinacea*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 29–52.

- Gao, H., Zhang, Z., Lv, X., Cheng, N., Peng, B., Cao, W., 2016. Effect of 24-epibrassinolide on Chilling Injury of Peach Fruit In Relation to Phenolic and Proline Metabolisms. *Postharvest Biology and Technology*. 111, 390-397.
- Gartland, J., 1995. *Agrobacterium* Virulance, Ed: Gartland, K, Daves, M, *Agrobacterium* Protocols, Humana Pres, 15-28.
- Georgiev, I., Pavlov, A.I., Bley, T., 2007. Hairy Root Type Plant *In Vitro* Systems as Sources of Bioactive Substances, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1175–1185.
- Giri, A., Narasu, M., 2000. Transgenic Hairy Roots: Recent Trends and Application, *Biotechnology Advances*, 18, 1-22.
- Główniak, K., Zgórk, G., Kozyra, M., 1996. Solid-phase Extraction and Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography of Free Phenolic Acids in Some *Echinacea* species. *Journal of Chromatography A*, 730(1-2), 25-29.
- Göçmez, A., Seferoğlu, H.G., 2014. Asmalarda Resveratrol İçeriğini Etkileyen Faktörler ve İnsan Sağlığına Faydaları. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1), 31-38.
- Goel, V., Chang, C., Slama, J.V., Barton, R., Bauer, R., Gahler, R., Basu, T.K., 2002. Alkylamides of *Echinacea purpurea* Stimulate Alveolar Macrophage Function in Normal Rats. *International Immunopharmacology*, 2, 381–387.
- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N.B., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., Cook, J.C., 1979. Brassinolide, A Plant Growth-Promoting Steroid Isolated from *Brassica napus* Pollen. *Nature*. 281, 216-217.
- Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C., 2000. *PDR for Herbal Medicines*, Medical Economic Company, Montvale, New Jersey, 261-266.
- Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C., 2004. *PDR for Herbal Medicines*, 3rd Ed. Montvale, NJ: Thomson Healthcare, 267-274.
- Guarnerio, C., Fraccaroli, M., Gonzo, I., Pressi, G., Toso, R.D., Guzzo, F., Levi, M., 2012. Metabolomic Analysis Reveals that The Accumulation of Specific Secondary Metabolites in *Echinacea angustifolia* Cells Cultured *In vitro* Can be Controlled by Light. *Plant Cell Reports*. 31, 361–367.
- Gülpınar, A.R., 2009. Türkiye’de Kültürü Yapılan *Echinacea purpurea* (L.) Moench. ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. Türleri Üzerinde Farmokognozik Çalışmalar. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 133 s.

- Guo, Y.G., Li, H.J., Cai, Y.X., Zhong, Y., Peng, Z.Y., 1992. Studies on The Production of Secondary Metabolites in Plant Cell Cultures. In: Biochemical Engineering For 2001 (Ed. Furusaki, S., Endo, I., Matsuno, R.), SpringerVerlag, Tokyo. 242–245.
- Halliday, K.J., Fankhauser, C., 2003. Phytochrome Hormonal Signaling Networks. *New Phytology*. 157, 449–493.
- Harbage, J.F., 2001. Micropropagation of *Echinacea angustifolia*, *E. pallida*, and *E. purpurea* from Stem and Seed Explants. *HortScience*. 36(2), 360–364.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in Flavonoid Research Since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2004. Phytochemistry of the Genus *Echinacea*. In: S Miller (ed) *Echinacea*. The Genus *Echinacea*. CRC Press, Boca Raton, FL., 55–71.
- Hartmann, T., 1996. Diversity and Variability of Plant Secondary Metabolism: A Mechanistic View. *Entomolgy Experimental Applications*, 80, 177–188. DOI 10.1111/j.1570-7458.1996.tb00914.x.
- Hayat, S., Ali, B., Hasan, S.A., Ahmad, A., 2007. Brassinosteroid Enhanced the Level of Antioxidants Under Cadmium Stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 33–41.
- Hayat, S., Yadav, S., Ali, B., Ahmad, A., 2010. Interactive Effect of Nitric Oxide and Brassinosteroids on Photosynthesis and the Antioxidant System of *Lycopersicon esculentum* L. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(2), 212–221.
- Hemm, M.R., Rider, S.D., Ogas, J., Murry, D.J., Chapple, C., 2004. Light Induces Phenylpropanoid Metabolism in *Arabidopsis* Roots. *Plant J.*, 38: 765–778.
- Hobbs, C., 1989. *Echinacea* Handbook. Eclectic Medical Publications, Portland, Oregon, 1–118.
- Hodges, L. D., Vergunst, A.C., Neal-McKinney, J., Dulk-Ras, A., Moyer, D.M, Hooykaas, P.J. J., Ream, W., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS Protein Contains Domains for ATP Binding, Nuclear Localization, and Type IV Secretion. *Journal of Bacteriology*. 8222–8230.
- Hu, C., Kitts, D.D., 2000. Studies on the Antioxidant Activity of Echinacea Root Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1466–1472.
- Hu, Z.B., Du, M., 2006. Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48(2), 121–127.
- Hunter, C. S., Neil, S. J., 1990. Induction of Hairy Roots by *Agrobacterium rhizogenes* and Growth of Hairy Roots. In *Vitro, Plant Cell and Tissue*

- Culture, eds. J. W, Pollard and J. M. Walker, Methods in Molecular Biology. Vol. 6. Chapter 28, 279-288.
- Ibrahim, R.K., 1987. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.1 F. Constable and I. Vasil (eds.), Academic Press, Inc. London, pp, 77-96.
- Jacob, A., Malpathak, N., 2005. Manipulation of MS and B5 Components for Enhancement of Growth and Salsodine Production in Hairy Root Cultures of *Solanum khasianum* Clarke, Plant Cell and Organ Culture. 80, 247-257.
- Jones, A.M.P., Saxena, P.K., Murch, S.J., 2009. Elicitation of Secondary Metabolism in *Echinacea purpurea* L. by Gibberellic Acid and Triazoles. Engineering in Life Sciences, 9(3), 205-210.
- Kakegawa, K., Suda, J., Sugiyama, M., Komamine, A., 1995. Regulation of Anthocyanin Biosynthesis In Cell Suspension Cultures of *Vitis* In Relation to Cell Division. Physiologia Plantarum. 94(4), 661-666.
- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., Angenon, G., 1997. An Agrobacterium-mediated Transient Gene Expression System for Intact Leaves. Plant science, 122(1), 101-108.
- Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., Khripach, N.B., 2003. New Practical Aspects of Brassinosteroids and Results of Their Ten-Year Agricultural Use in Russia and Belarus. In Brassinosteroids (pp. 189-230). Springer Netherlands.
- Kikugawa, K., Hakamada, T., Hasunuma, M., Kurechi, T., 1983. Reaction of p-hydroxycinnamic Acid Derivatives with Nitrite and its Relevance to Nitrosamine Formation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31(4), 780-785.
- Kim, I.H., Kaneko, N., Uchiyama, N., Lee, J.E., Takeya, K., Kawahara, N., Goda, Y., 2006. Two Phenylpropanoid Glycosides from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 54(2), 275-277.
- King, P.J., Ma, G., Miao, W., Jia, Q., McDougall, B.R., Reinecke, M.G., Cornell, C., Kuan, J., Kim, T.R., Robinson, W.E., 1999. Structure- Activity Relationships: Analogues of the Dicafeoylquinic and Dicafeoyltartaric Acids as Potent Inhibitors Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase and Replication. Journal of Medicinal Chemistry, 42, 497-509.
- Kligler, B., 2003. *Echinacea*. American Family Physician, 67, 77-80.
- Koca, N., Karaman, Ş., 2015. The Effects of Plant Growth Regulators and L-phenylalanine on Phenolic Compounds of Sweet Basil. Food Chemistry. 166, 515-521.
- Kodan, A., Kuroda, H., Sakai, F., 2002. A Stilbene Synthase from Japanese Red Pine (*Pinus densiflora*): Implications for Phytoalexin Accumulation and

Down-regulation of Flavonoid Biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99(5), 3335-3339.

- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., Ozer, E.T., Gücer, S., 2010. Antibacterial Activity and Chemical Constitutions of *Olea europaea* L. Leaf Extracts. Journal of Food Processing and Preservation, 34(3), 383-396.
- Kühnl, T., Koch, U., Heller, W., Wellmann, E., 1987. Chlorogenic Acid Biosynthesis: Characterization of A Light-induced Microsomal 5-O-(4-coumaroyl)-D-quinic/shikimate 3'-hydroxylase from Carrot (*Daucus carota* L.) Cell Suspension Cultures. Archives of Biochemistry and Biophysics, 258(1), 226-232.
- Kumar, V., Sharma, A., Prasad, B.C.N., Gururaj, H.B., Ravishankar, G.A., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Genetic Transformation Resulting in Hairy Root Formation is Enhanced by Ultrasonication and Acetosyringone Treatment, Electronic Journal of Biotechnology, 9(4), 249-357.
- Kuzovkina, I.N., Guseva, A.V., Alterman, I.E., Karnachuk, R.A., 2001. Flavonoid Production in Transformed *Scutellaria baicalensis* Roots and Ways of Its Regulation. Russian Journal of Plant Physiology. 48, 448-452.
- Kuzovkina, I.N., Schneider, B., 2006. Genetically Transformed Root Cultures – Generation, Properties and Application in Plant Sciences, Progress in Botany, (67), 275-324.
- Lee, J., Scagel, C.F., 2013. Chicoric Acid: Chemistry, Distribution, and Production. Frontiers in Chemistry, 1, 40.
- Lee, J., Scagel, C.F., 2010. Chicoric Acid Levels in Commercial Basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* Products. Journal of Functional Foods, 2(1), 77-84.
- Lee, M.H., Yoon, E. S., Jeong, J., H., Choi, Y. E., 2004, *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation of *Taraxacum platycapum* and Changes of Morphological Characters, Plant Cell Report. 22, 822-827.
- Lee, T.T., Huang, C.C., Shieh, X.H., Chen, C.L., Chen, L.J. Yu, B., 2010. Flavonoid, Phenol and Polysaccharide Contents of *Echinacea purpurea* L. and its Immunostimulant Capacity in vitro. International Journal of Environmental Science and Development, 1(1), 5-9.
- Letchamo, W., Livesey, J., Arnason, T.J., Bergeron, C., Krutilina, V.S., 1999. Chicoric Acid and Isobutylamide Content in *Echinacea purpurea* As Influenced by Flower Developmental Stages. Perspectives on New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 494-498.
- Levitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Volume II. Water, Radiation, Salt, and Other Stresses. London. Academic Press. 607.

- Li, L., Van Staden, J., 1998. Effect of Plant Growth Regulators on The Antioxidative System in Callus of Two Maize Cultivars Subjected to Water Stress. *Plant Growth Regulators*, 24, 55-66.
- Lila, M.A., 2005. Valuable Secondary Products from *In vitro* Culture. In: *Plant Development and Biotechnology* (ed. Trigiano RN and Gray D), CRC Press, Oxford, UK, 285-289.
- Lin, S.D., Sung, J.M., Chen, C.L., 2011. Effect of Drying and Storage Conditions on Caffeic Acid Derivatives and Total Phenolics of *Echinacea Purpurea* Grown In Taiwan. *Food Chemistry*. 125(1), 226-231.
- Lin, Z., Neamati, N., Zhao, H., Kiryu, Y., Turpin, J.A., Aberham, C., Strebel, K., Kohn, K., Wityrouw, M., Pannecouque, C., Debyser, Z., De Clercq, E., Rice, W.G., Pommier, Y., Burke, R.T., 1999. Cichoric Acid Analogues as HIV-1 Integrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 1401-1414.
- Lindenmuth, G.F., Lindenmuth, E.B., 2000. The Efficacy of Echinacea Compound Herbal Tea Preparation on the Severity and Duration of Upper Respiratory and Flu Symptoms: A Randomized, Double-Blind Placebo Controlled Study. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 6, 327-334.
- Lindsey, K., Yeoman, M.M., 1984. The Synthetic Potential of Immobilised Cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum*. *Planta*, 162(6), 495-501.
- Liu, C.Z., Abbasi, B.H., Gao, M., Murch, S.J., Saxena, P.K., 2006. Caffeic Acid Derivatives Production by Hairy Root Cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8456-8460.
- Liu, C.Z., Guo, C., Wang, Y.C., Quyang, F., 2002. Effect of Light Irradiation on Hairy Root Growth and Artemisinin Biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*. 38, 581-585.
- Liu, R., Li, W., Sun, L.Y., Liu, C.Z., 2012. Improving Root Growth and Cichoric acid Derivatives Production in Hairy Root Culture of *Echinacea purpurea* by Ultrasound Treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 62- 66.
- Lodhi, A.H., Charlwood, B.V., 1996. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Transformation of *Rubia peregrina* L. *in vitro* Accumulation of Anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(2), 103-108.
- Lucchesini, M., Bertoli, A., Mensuali-Sodi, A., Pistelli, L., 2009. Establishment of *In vitro* Tissue Cultures from *Echinacea angustifolia* DC Adult Plants for The Production of Phytochemical Compounds. *Scientia Horticulturae*. 122(3), 484-490.
- Mahmoudian, M., Celikkol, U., Yücel, M., Öktem, H.A., 2002. Vacuum Infiltration Based *Agrobacterium* Mediated Gene Transfer to Lentil (*Lens Culinaris* M.) Tissues. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 16(1), 24-29.

- Maia, N.B., Bovi, O.A., Zullo, M.A.T., Perecin, M.B., Granja, N.P., Carmello, Q.A.C., Coll, F., 2004. Hydroponic Cultivation of Mint and Vetiver with Spirostane Analogues of Brassinosteroids. *Acta horticulturae*.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Vol. 545). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mat, A., 2004. *Echinacea* Türleri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildirileri, 29-31 Mayıs 2002. Eskişehir.
- Mathis, N.L., Hinchey, M.A., 1994. *Agrobacterium* Inoculation Techniques for Plant Tissues. In *Plant Molecular Biology Manual*. Springer Netherlands. 115-123.
- Matsuya, Y., Masuda, S., Ohsawa, N., Adam, S., Tschamber, T., Eustache, J., Kamoshita, K., Sukenaga, Y., Nemoto H., 2005. Synthesis and Antitumor Activity of the Estrane Analogue of OSW-1. *European Journal of Organic Chemistry*. 5, 803-808.
- McGregor, R.L., 1968. The Taxonomy of the Genus *Echinacea* (*Compositae*). *Kansas University Science Bulletin*. 48(4), 113-142.
- Mechanda, S.M., Baum, B.R., Johnson, D.A., Arnason, J.T., 2003. Direct Shoot Regeneration from Leaf Segments of Mature Plants of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 39(5), 505-509.
- Mehrotra, S., Goel, M.K., Srivastava, V., Rahman, L.U. 2015. Hairy Root Biotechnology of *Rauwolfia serpentina*: A Potent Approach for the Production of Pharmaceutically Important Terpenoid Indole Alkaloids. *Biotechnology Letters*, 37(2), 253-263.
- Miller, C., YU, H., 2004. *Echinacea: The Genus Echinacea* (Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles, Vol. 39). Florida: CRC Press LLC.
- Miller, L.G., 1998. Herbal Medicinals: Selected Clinical Considerations Focusing on Known or Potential Drug Interactions. *Archives of Internal Medicine*, 158, 2200-2211.
- Mills, S., Bone, K., 2000. *Principles and Practice of Phytotherapy*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Ming, O., Su, C., Zheng, C., Jia, M., Zhang, O., Zhang, H., Rahman, K., Han, T., Qin, L., 2013. Elicitors from The Endophytic Fungus *Trichoderma atroviride* Promote *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Growth and Tanshinone Biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 64, 5687-5694.
- Mirona, T.L., Herrero, M., Ibanez, E., 2013. Enrichment of Antioxidant Compounds from Lemon Balm (*Melissa officinalis*) by Pressurized Liquid

- Extraction and Enzyme Assisted Extraction. Journal of Chromatography A, 1288: 1–9. DOI 10.1016/j.chroma.2013.02.075.
- Mitchell, J.W., Mandava, N.B., Worley, J.F., Plimmer, J.R., Smith, M.V., 1970. Brassins-a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen. *Nature*, 225, 1065-1066.
- Mobin, M., Wu, C.H., Tewari, R.K., Paek, K.Y., 2015. Studies on the Glyphosate Induced Amino Acid Starvation and Addition of Precursors on Caffeic Acid Accumulation and Profiles in Adventitious Roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(1), 291-301.
- Molgaard, P., Johnsen, S., Christensen, P., Cornett, C., 2003. HPLC Method Validated for The Simultaneous Analysis of Cichoric Acid and Alkamides in *Echinacea purpurea* Plants and Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6922–6933.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka, M., Nobukazu, T., Yoshida, K., 2001. The Complete Nucleotide Sequence of a Plant Root-inducing (Ri) Plasmid Indicates its Chimeric Structure and Evolutionary Relationship between Tumor-inducing (Ti) and Symbiotic (Sym) Plasmids in *Rhizobiaceae*. *Journal of Molecular Biology*, 307, 771-784.
- Muntean, L.S., Varban, D. Muntean S., Tamas M., Varban R., 1998. *Echinacea* Species of Medicinal Use. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. XXVIII*.
- Murch, S.J., Peiris, S.E., Shi, W.L., Zobayed, S.M.A., Saxena, P.K., 2006. Genetic Diversity in Seed Populations of *Echinacea purpurea* Controls the Capacity for Regeneration, Route of Morphogenesis and Phytochemical Composition. *Plant Cell Report*, 25, 522–532.
- Murthy, H.N., Wu, C.H., Cui, Y.Y., Paek, K.Y., 2014. Production of Caffeic Acid Derivatives from Adventitious Root Cultures of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. In *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. 167-184. Springer Netherlands.
- Müssig, C., Shin, G.H., Altmann, T. 2003. Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(3), 1261-1271.
- Naeem, M., Idrees, M., Alam, M.M., Aftab, T., Khan, M.M.A., 2012. Brassinosteroid-Mediated Enrichment in Yield Attributes, Active Constituents and Essential Oil Production in *Mentha arvensis* L. *Russian agricultural sciences*, 38(2), 106-113.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000. Amino Acids, Peptides and Proteins. In: Nelson, D.-L., Cox, M.M. (Eds.), *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, pp. 115–120.

- Nemhauser, J.L., Chory, J., 2004. BRing it on: New Insights into the Mechanism of Brassinosteroid Action. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 265-270.
- Nottenburg, C., Rodríguez, C.R., 2008. Agrobacterium-mediated Gene Transfer: A Lawyer's Perspective. In *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology* (pp. 699-735). Springer New York.
- Nüsslein, B., Kurzmann, M., Bauer, R., Kreis, W., 2000. Enzymatic Degradation of Cichoric Acid in *Echinacea purpurea* Preparations. *Journal of Natural Products*, 63(12), 1615-1618.
- Oba, E.G., Inthima, P., Supaibulwatana, K., 2012. Effect of (2chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (CPPU) on Artemisinin Production in Hairy Root Culture of *Artemisia annua* L. *African Journal of Biotechnology*. 11, 13992-13997.
- Oh, M.H., Clouse, S.D., 1998. Brassinolide Affects The Rate of Cell Division in Isolated Leaf Protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports*, 17(12), 921-924.
- Ohno, N., Yoshigai, E., Okuyama, T., Yamamoto, Y., Okumura, T., Sato, K., Nishizawa, M., 2012. Chlorogenic Acid from The Japanese Herbal Medicine Kinginka (*Flos Lonicerae japonicae*) Suppresses The Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase In Rat Hepatocytes. *HOAJ Biology*, 1(1), 2.
- Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001. Agrobacterium Aracılığı ile Gen Aktarımı, Ed. Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. 112-159.
- Palacio, L., Cantero, J.J., Cusidó, R., Goleniowski, M., 2011. Phenolic Compound Production by *Larrea divaricata* Cav. Plant Cell Cultures and Effect of Precursor Feeding. *Process biochemistry*, 46(1), 418-422.
- Pandey, P., Kaur, R., Singh, S., Chattopadhyay, S.K., Srivastava, S.K., Banerjee, S., 2014. Long-term Stability in Biomass and Production of Terpene Indole Alkaloids by Hairy Root Culture of *Rauwolfia serpentina* and Cost Approximation to Endorse Commercial Realism. *Biotechnology Letters*. 1-6.
- Panwar, S.G., Guru, S.K., 2013. Stimulation of Reserpine Production in The Whole Plant Culture of *Rauwolfia serpentina* L. by Elicitors and Precursor Feeding. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 10.
- Park, S.U., Lee, S.Y., 2009. Anthraquinone Production by Hairy Root Culture of *Rubia akane* Nakai: Influence of Media and Auxin Treatment. *Scientific Research and Essays*. 4, 690-693.

- Pellati, F., Benvenuti, S., Magro, L., Melegari, M., Soragni, F., 2004. Analysis of Phenolic Compounds and Radical Scavenging Activity of *Echinacea* spp. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35, 289-301.
- Perassolo, M., Quevedo, C., Busto, V., Ianone, F., Giulietti, A.M., Talou, J.R., 2007. Enhance of Anthraquinone Production by Effect of Proline and Aminoindan-2-phosphonic Acid in *Rubia tinctorum* Suspension Cultures. Enzyme and Microbial Technology. 41, 181-185.
- Perry, N.B., Burgess, E.J., Glennie, V.I., 2001. Echinacea Standardization: Analytical Methods for Phenolic Compounds and Typical Levels in Medicinal Species. Journal of the Science of Food and Agriculture, 49, 1702-1706.
- Perry, N.B., Wills, R.B., Stuart, D.L., 2004. Factors Affecting *Echinacea* Quality: Agronomy and Processing. *Echinacea*. The Genus *Echinacea*. CRC Press, Boca Raton, Fla. 111-126.
- Perumalla, A.V.S., Hettiarachchy, N.S., 2011. Green Tea and Grape Seed Extracts- Potential Applications in Food Safety and Quality. Food Research International, 44(4), 827-839.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Wolters, S., 2009. Evolution of Rosmarinic Acid Biosynthesis. Phytochemistry, 70(15), 1663-1679.
- Petersen, M., Simmonds, M.S., 2003. Rosmarinic Acid. Phytochemistry, 62(2), 121-125.
- Praveen, N., Murthy, H.N., 2012. Synthesis of Withanolide A Depends on Carbon Source and Medium pH in Hairy Root Cultures of *Withania somnifera*. Industrial Crops and Products. 35, 241-243.
- Proksch, A., Wagner, H., 1987. Structural Analysis of a 4-O-methyl-Glucuronarabinoxylan with Immuno-Stimulating Activity from *Echinacea purpurea*, Phytochemistry, 26, 1989-1993.
- Qu, L., Wang, X., Chen, Y., Scalzo, R., Widrlechner, M.P., Davis, J.M., Hancock, J.F., 2005. Commercial Seed Lots Exhibit Reduced Seed Dormancy In Comparison to Wild Seed Lots of *Echinacea purpurea*. HortScience. 40(6), 1843-1845.
- Rady, M.M., 2011. Effect of 24-Epibrassinolide on Growth, Yield, Antiwoxidant System and Cadmium Content of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Plants Under Salinity and Cadmium Stress. Scientia Horticulturae, 129, 232-237.
- Rajendran, L., Suvarnalatha, G., Ravishankar, G.A., Venkataraman, L.V., 1994. Enhancement of Anthocyanin Production in Callus Cultures of *Daucus carota* L. Under Influence of Fungal Elicitors. Applied Microbiology and Biotechnology. 42, 227-231.

- Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153.
- Ramachandra, R.S., Sarada, R., Ravishankar, G.A., 1996. Phycocyanin A New Elicitor of Capsaicin and Anthocyanin Accumulation in Plant Cell Cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46, 619–621.
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. *Plant Signalling & Behaviour*, 6, 1720-1731.
- Raman, P., Patino, L.C., Nair, M.G., 2004. Evaluation of Metal and Microbial Contamination in Botanical Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7822-7827.
- Ramawat, K.G., Dass, S., Mathur, M., 2009. The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants. In *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine* (pp. 7-32). Springer Berlin Heidelberg.
- Rao, S.S.R., Vardhini B.V., Sujatha, E., Anuradha, S., 2002. Brassinosteroids- A New Class of Phytohormones. *Current Science*. 82(10), 1239-1245.
- Röder, E., 1995. Medicinal Plants in Europe Containing Pyrrolizidine Alkaloids, *Pharmazie*, 50: 83-98.
- Roesler, J., Emmendorffer, A., Steinmuller, C., Luettig, B., Wagner, H., Lohmann-Matthes, M.L., 1991. Application of Purified Polysaccharides from Cell Cultures of The Plant *Echinacea purpurea* to Test Subject Mediates Activation of Phagocyte System. *International Journal of Immunopharmacol*, 13, 931-94.
- Sambar, N., Varma, A.L., Manzoor, N., 2014. Evaluation of *Mentha piperita* Essential oil and its Major Constituents for Antifungal Activity in *Candida* spp. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE)*, 3, 9404- 9411. ISSN: 2319-8753.
- Sanyal, I., Singh, A.K., Kaushik, M., Amla, D.V., 2005. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis* cry1Ac Gene for Resistance Against Pod Borer Insect *Helicoverpa armigera*. *Plant Science*. 168(4), 1135-1146.
- Sasse, J.M., 1997. Recent Progress in Brassinosteroid Research. *Physiologia Plantarum*. 100, 697-701.
- Sasse, J.M., 1999. Physiological Actions of Brassinosteroids, In: Sakurai, A., Yokota, T., Clouse, S.D. (Eds.), *Brassinosteroids-Steroidal Plant Hormones*. Springer-Verlag, Tokyo.

- Sathiyamoorthy, P., Nakamura, S. 1990. *In vitro* Root Induction by 24-epibrassinolide on Hypocotyl Segments of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Plant Growth Regulation, 9(1), 73-76.
- Schmidt, J., Porzel, A., Adam, G., 1998. Brassinosteroids and A Pregnane Glucoside from *Daucus carota*. Phytochemical Analysis. 9, 14-20.
- Schulten, B., Bulitta, M., Ballering-Brühl, B., Köster, U., Schäfer, M., 2001. Efficacy of *Echinacea purpurea* in Patients with A Common Cold. A Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blind Clinical Trial. Arzneimittel-Forschung, 51, 563-568.
- Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant Responses to Abiotic Stresses: Heavy Metal-induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization. Journal of Experimental Botany. 53, 1351-1365.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L., Polle, A., 2001. Cadmium-induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. Plant Physiology. 127, 887-898.
- Sevón, N., Oksman-Caldentey, K.M., 2002. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation: Root Cultures As a Source of Alkaloids. Planta Medica. 68(10), 859-868.
- Shalaby, A.S., El-Gengaihi, S.E., Agina, E.A., El-Khayat, A.S., Hendawy, S.F., 1997. Growth and Yield of *Echinacea purpurea* L. as Influenced by Planting Density and Fertilization. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 5(1), 69-76.
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N., Okazaki, M., 1998. Effects of Methyl Jasmonate and Elicitor on The Activation of Phenylalanine Ammonia-lyase and The Accumulation of Scopoletin and Scopolin in Tobacco Cell Cultures. Plant Science. 132(1), 13-19.
- Sharma, P., Padh, H., Shrivastava, N., 2013. Hairy Root Cultures: A Suitable Biological System for Studying Secondary Metabolic Pathways in Plants. Engineering in Life Sciences, 13(1), 62-75.
- Shetty, K., 2001. Biosynthesis and Medical Applications of Rosmarinic Acid. Journal of Herbs, Spices Medicinal Plants, 8(2-3), 161-181.
- Shi, B., Tang, P., Hu, X., Yu, B., 2005. OSW Saponins: Facile Synthesis Toward A New Type of Structures With Potent Antitumor Activities. The Journal of Organic Chemistry. 70, 10354-10367.
- Shibasaki-Kitakawa, N., Takeishi, J., Yonemoto, T., 2003. Improvement of Catechin Productivity in Suspension Cultures of Tea Callus Cells. Biotechnology Progress. 19, 655-668.

- Shinde, A.N., Malpathak, N., Fulzele, D.P., 2009. Enhanced Production of Phytoestrogenic Isoflavones from Hairy Root Cultures of *Psoralea corylifolia* L. Using Elicitation and Precursor Feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14, 288-294.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16(3), 144-158.
- Sinkar, V.P., White, F. F., Gordon, M.P., 1987. Molecular Biology of Riplasmid a Review. *Journal of Bioscience*. 11, 47-57.
- Siva, R., Mayes, S., Behera, S.K., Rjsekara, C., 2012. Anthraquinones Dye Production Using Root Culture of *Oldenlandia umbellata* L. *Industrial Crop Products*. 37, 415-419.
- Smith, M. A., Kobayashi, H., Gawienowski, M., Briskin, D. P., 2002. An *In Vitro* Approach to Investigate Medicinal Chemical Synthesis by Three Herbal Plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70, 105-111.
- Smith, T., Lynch, M.E., Johnson, J., Kawa, K., Bauman, H., Blumenthal, M., 2015. Herbal Dietary Supplement Sales In US Increase 6.8% In 2014. *HerbalGram*, 107, 52-59.
- Song, J.S., Lee, C.S., 1998. An Expression of CHS, CHI, and DFR Genes in Response to Light in Small Radish Seedlings. *Journal of Plant Biology*. 41, 277-282.
- Sorensen, J.T., Holden, D.J., 1974. Germination of Native Prairie Forb Seeds. *Journal of Range Management*, 123-126.
- Stimpel, M., Proksch, A., Wagner, H., Lohmann-Matthes, M.L., 1984. Macrophage Activation and Induction of Macrophage Cytotoxicity by Purified Polysaccharide Fractions from the Plant *Echinacea purpurea*, *Infection and Immunity*, 46, 845-849.
- Stuart, D.L., Wills R.B.H., 2000. Alkylamides and Cichoric Acid Levels in Plant Sections of *Echinacea purpurea* During Growth, *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 7, 91-101.
- Sujatha, G., Zdravković-Korać, S., Čalić, D., Flamini, G., Kumari, B.R., 2013. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Genetic Transformation In *Artemisia vulgaris*: Hairy Root Production and Essential Oil Analysis. *Industrial Crops and Products*. 44, 643-652.
- Sun, Y., Fokar, M., Asami, T., Yoshida, S., Allen, R. D., 2004. Characterization of the Brassinosteroid Insensitive 1 Genes of Cotton. *Plant Molecular Biology*, 54(2), 221-232.
- Swamy, K. N., Rao, S. S. R., 2009. Effect of 24-epibrassinolide on Growth, Photosynthesis and Essential Oil Content of *Pelargonium graveolens* (L.) *Herit. Russian Journal of Plant Physiology*. 56, 616-620.

- Swamy, K. N., Rao, S. S. R., 2011. Effect of Brassinosteroids on the Performance of *Coleus* (*Coleus forskohlii*). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 17, 12-20.
- Szabo, E., Thelen, A., Petersen, M., 1999. Fungal Elicitor Preparations and Methyl Jasmonate Enhance Rosmarinic Acid Accumulation in Suspension Cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports*. 18(6), 485-489.
- Takeuchi, A., Matsumoto, S., Hayastu, M., 1994. Chalcone Synthase from *Camellia sinensis*: Isolation of the cDNAs and the Organ-specific and Sugar-Responsive Expression of the Genes. *Plant Cell Physiology*. 35, 1011-1018.
- Tanaka, K., Nakamura, Y., Asami, T., Yoshida, S., Matsuo, T., Okamoto, S., 2003. Physiological Roles of Brassinosteroids in Early Growth of Arabidopsis: Brassinosteroids have a Synergistic Relationship with Gibberellin as well as Auxin in Light-Grown Hypocotyl Elongation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(3), 259-271.
- Tang, D.G., Porter, A.T., 1997. Target to Apoptosis: a Hopeful Weapon for Prostate Cancer. *Prostat*.
- Tao, J., Li L., 2006. Genetic Transformation of *Torenia fournieri* L. Mediated by *Agrobacterium rhizogenes*, *South African Journal of Botany*. 72, (2), 211-216.
- Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M.S., Ravishankar, G.A., 2002. Kinetics of Pigment Release from Hairy Root Cultures of *Beta vulgaris* Under The Influence of pH, Sonication, Temperature and Oxygen Stress. *Process Biochemistry*. 38 1069-1076.
- Tiwari, R.K., Trivedi, M., Guang, Z.C., Guo, G.Q., Zheng, G.C., 2007. Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: Growth and Production of Secoiridoid Glucoside Gentiopicroside In Transformed Hairy Root Cultures. *Plant Cell Reports*. 26(2), 199-210.
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., Fernie, A.R., 2013. Shikimate and Phenylalanine Biosynthesis in The Green Lineage. *Frontiers in Plant Science*, 4, 62.
- Trypsteen, M., Lijsebettens, M.V., Severen, R.V., Montagu, M.V., 1991. *Agrobacterium rhizogenes*- Mediated Transformation of *Echinacea purpurea*. *Plant Cell Reports*, 10, 85-89.
- Tuan, P.A., Kwon, D.Y., Lee, S., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., Park, N.I., Park, S.U., 2014. Enhancement of Chlorogenic Acid Production in Hairy Roots of *Platycodon grandiflorum* by Over-Expression of an *Arabidopsis thaliana* Transcription Factor AtPAP1. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 14743-14752.

- Uluşık, D., Keskin, E., 2012. The Effects of Ginseng and *Echinacea* on Some Plasma Cytokine Levels in Rats. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 18 (1), 65-68.
- Upton, R., Graff, A., 2007. *Echinacea purpurea* Aerial Parts Standards of Analysis, Quality Control and Therapeutics. *American Herbal Pharmacopoeia*, 1-61.
- Vanhala, L., Eeva, M., Lapinjoki, S., Hiltunen, R., Oksman-Caldentey, K.M., 1998. Effect of Growth Regulators on Transformed Root Cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Plant Physiology*. 153, 475-481.
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.H., Nalawade, S.M., Lin, C.Y., Tsay, S.H., 2004. Studies on the Production of Some Important Secondary Metabolites from Medicinal Plants by Plant Tissue Cultures. *Bot Bull Acad Sinica*, 45, 1-22.
- Vanquez-Flota, F.A., De Luca, V., 1998. Jasmonate Modulates Development and Light Regulated Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 49, 395-402.
- Vats, S., Kamal, R., 2014. *Cassia occidentalis* L.(A New Source of Rotenoids): Its *in vitro* Regulation by Feeding Precursors and Larvicidal Efficacy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116(3), 403-409.
- Veena, V., Taylor, C.G., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: Recent Developments and Promising Applications. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 43, 383-403.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2008. Isolation and Identification of Phenolic Compounds. In *Phenolic Compound Biochemistry* (pp. 151-196). Springer Netherlands.
- Victor, J.M.R., Murch, S.J., KrishnaRaj S., Saxena, P.K., 1999. Somatic Embryogenesis and Organogenesis In Peanut: The Role of Thidiazuron and N6-Benzylaminopurine In The Induction of Plant Morphogenesis. *Plant Growth Regulation*. Vol. 28, 9-15.
- Wang, B., Zhang, G., Zhu, L., Chen, L., Zhang, Y., 2006. Genetic Transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and Bioactive Ingredient Analysis in Transformed Cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(1), 101-104.
- Wang, Y., Zhang, H., Zhao, B., Yuan, X., 2001. Improved Growth of *Artemisia annua* L Hairy Roots and Artemisinin Production Under Red Light Conditions. *Biotechnology Letters*. 23, 1971-1973.
- Wilén, R.W., Sacco, M., Gusta, L.V., Krishna, P., 1995. Effect of 24-Epibrassinolide on Freezing and Thermo Tolerance of Brome grass (*Bromus inermis*) Cell Culture. *Physiologia Plantarum*, 95, 195-202.

- Wink, M., 2011. Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (Vol. 40). John Wiley & Sons.
- Wu, C.H., Dewir, Y.H., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2006. Optimization of Culturing Conditions for the Production of Biomass and Phenolics from Adventitious Roots of *Echinacea angustifolia*. Journal of Plant Biology. 49, 193-199.
- Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2007a. Enhanced Production of Caffeic Acid, Chlorogenic Acid and Cichoric Acid in Suspension Cultures of *Echinacea purpurea* by The Manipulation of Incubation Temperature and Photoperiod. Biochemical Engineering Journal. 36, 301-303.
- Wu, C.H., Tewari, R.K., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2007b. Nitric Oxide Elicitation Induces The Accumulation of Secondary Metabolites and Antioxidant Defense In Adventitious Roots of *Echinacea purpurea*. Journal of Plant Biology, 50, 636-643.
- Wu, J.Y., Ge, X., 2004. Oxidative Burst, Jasmonic Acid Biosynthesis, and Taxol Production Induced by Low-energy Ultrasound in *Taxus chinensis* cell Suspension Cultures. Biotechnology and Bioengineering. 85, 714-721.
- Wu, Y.Z., Janet, N., Shi, M., Wu, S.J., 2007c. Enhanced Secondary Metabolite (Tanshinone) Production of *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots In A Novel Root-bacteria Coculture Process. Applied Microbiology Biotechnology, 77: 543-550.
- Xia, X.J., Huang, Y.Y., Wang, L., Huang, L.F., Yu, Y.L., Zhou, Y.H., Yu, J.Q., 2006. Pesticides Induced Depression of Photosynthesis was Alleviated by 24-Epibrassinolide Pretreatment in *Cucumis sativus* L.. Pesticide Biochemistry and Physiology. 86, 42-48.
- Xiao, Y., Gao, S., Di, P., Chen, J., Chen, W., Zhang, L., 2010. Lithospermic Acid B is More Responsive to Silver Ions (Ag⁺) than Rosmarinic Acid in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Cultures. Bioscience Reports. 30, 33-40.
- Yang, X., Li, F., Yang, Y., Shen, J., Zou, R., Zhu, P., Li, P., 2013. Efficacy and Safety of Echinacoside in a Rat Osteopenia Model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013.
- Yu, D., Yuan, Y., Jiang, L., Tai, Y., Yang, X., Hu, F., Xie, Z., 2013. Anti-inflammatory Effects of Essential Oil in *Echinacea purpurea* L. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 26(2), 403-408.
- Yu, H.C., Kaarlas, M., 2004. Popularity, Diversity, and Quality of *Echinacea*, In: S Miller (ed) *Echinacea*. The genus *Echinacea*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp 29-52.
- Yu, J.Q., Huang, L.F., Hu, W.H., Zhou, Y.H., Mao, W.H., Ye, S.F., Nogués, S., 2004. A Role for Brassinosteroids in the Regulation of Photosynthesis in *Cucumis sativus*. Journal of Experimental Botany, 55(399), 1135-1143.

- Yu, K.W., Murthy, H.N., Hahn, E.J., Peak, K.Y., 2005. Ginsenoside Production by Hairy Root Cultures of *Panax ginseng*: Influence of Temperature and Light Quality. *The Biochemical Engineering Journal*. 23, 53-56.
- Zhang, Y.J., Li, G. F., Zhu, S.F., Shi, Z.W., Li, M.F., 2007. The Analysis on The Characteristics of The Coat Protein Genes of Cucumber Mosaic Virus Isolated from *Echinacea purpurea* Moench. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*. 1, 34-37.
- Zhao, L.J., Zhou, G.L., Wu, Y.J., 2010. Effects of Biotic and Abiyotic Elicitor on Cell Growth and Tanshinone Accumulation in *Salvia miltiorrhiza* Cell Cultures. *Microbial Biotechnology*, 87, 137-144.
- Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Kozai, T., 2005. Temperature Stress Can Alter The Photosynthetic Efficiency and Secondary Metabolite Concentrations in St. John's Wort. *Plant Physiology Biochemistry*. 43, 977-984.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tunhan DEMİRCİ

Doğum Yeri ve Yılı : Uşak, 1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : tunahandemirci@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Kocaeli Gölcük İhsaniye Anadolu Lisesi

Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü

Yayınları

Demirci, T., Çelikkol Akçay, U., Baydar N.G., 2016. Comparison of Different *Echinacea purpurea* Hairy Root Lines Mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in Terms of Root Growth and Caffeic Acid Derivatives. 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants – CIPAM 2016, Coimbra, Portugal May 29-June 1, 2016.

Asci, O.A., Demirci, T., Baydar, N.G., 2016. Effects of Sucrose on Root Growth and Secondary Metabolite Production İN Madder (*Rubia tinctorum*) Root Cultures. 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants – CIPAM 2016, Coimbra, Portugal May 29-June 1, 2016.

Yiğit, T., Şahiner, A., Babalık, Z., Demirci, T. Göktürk Baydar, N., 2016. Determination of the Best 24-eBL Application for the Accumulation of Antioxidant Compounds in Alphonse Lavallée Grape Cultivar by using Fuzzy Logic Modelling. Acta Horticulturae (basım aşamasında)

Demirci, T., Özdamar, P., Göktürk Baydar, N., 2015. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ile Sebzelerde Kök Kaynaklı Sekonder Metabolitlerin Üretiminin Artırılmasına Yönelik *In vitro* Uygulamalar. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(5), 261-270.

- Duran, R.E., Coskun, Y., Demirci, T., 2013. Comparison of Amino Acids for Their Efficiency on Regeneration in Wheat Embryo Culture. Asian Journal of Plant Science & Research, (3)1, 115-119.
- Coskun, Y., Duran, R.E., Savaskan, C., Demirci, T., Hakan, M.T., 2013. Efficient Plant Regeneration with Arabinogalactan-proteins on Various Ploidy Levels of Cereals. Journal of Integrative Agriculture, 12(3), 420-425. - Cover Figure (JIA, March 20, 2013, Vol.12 No.3).
- Demirci, T., Savaşkan, Ç., 2012. Bir Heksaploid Buğday Çeşidinin (*Triticum aestivum* L. cv. Gün-91) Anterlerinden Kallus Üretimi ve Bitki Regenerasyonu. Ege Üniversitesi 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 3-7 Eylül 2012, İzmir.
- Duran, R.E., Coşkun, Y., Demirci, T., Savaşkan, Ç., 2012. L-Alanin ve L-Glutamin Amino Asitlerinin 'Ç-1252' Makarnalık Buğday Çeşidinin Rejenerasyon Kabiliyetine Etkisi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). 3-7 Eylül, Ege Üniversitesi, İzmir, 719s.
- Demirci, T., 2012. Floristik Çeşitliliğin Korunmasında Bitki Doku Kültürü Çalışmalarının Önemi. Biyolojik Çeşitlilik Sempozyumu, 22-23 Mayıs 2012, Ankara.
- Coşkun, Y., Duran, R.E., Savaşkan, Ç., Demirci, T., Hakan, M.T., 2010. "Farklı Miktarlardaki Arabinogalakatan-Proteinlerinin Buğday (*Triticum* sp. L. ve Arpa (*Hordeum* sp. L.) Bitki Regenerasyonuna Etkisi". 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-25 Haziran 2010, Denizli.
- Duran, R.E., Coşkun, Y., Savaşkan, Ç., Hakan, M.T., Demirci, T., 2010. "Tuzlu Koşulların Makarnalık Buğday Bitkisinde Bazı Kantitatif ve Kalitatif Karakterlere Etkisi". 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-25 Haziran 2010, Denizli.