



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***Echinacea pallida* (Nutt) Nutt. TÜRÜNDE IN
VITRO KÖK KÜLTÜRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI ve KAFEİK ASİT
MİKTARLARININ BELİRLENMESİ**

Havva ÇAĞLAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Haziran-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Havva ÇAĞLAR tarafından hazırlanan “*Echinacea pallida* (Nutt) Nutt. TÜRÜNDE *IN VITRO* KÖK KÜLTÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI ve KAFEİK ASİT MİKTARLARININ BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Unvanı Adı SOYADI

.....

Danışman

Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Emine ATALAY

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Dilek KİLLİ HAWORTH

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ömer Faruk YÜKSEL
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21201032 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Havva ÇAĞLAR

22.06.2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Echinacea pallida* (Nutt) Nutt. TÜRÜNDE *IN VITRO* KÖK KÜLTÜRLERİNİN ARAŞTIRILMASI ve KAFEİK ASİT MİKTARLARININ BELİRLENMESİ**

Havva ÇAĞLAR

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR
İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Münüre TANUR ERKOYUNCU**

2023, 52 Sayfa

Jüri

**Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR
Dr. Öğr. Üyesi Emine ATALAY
Dr. Öğr. Üyesi Dilek KİLLİ HAWORTH**

Bu tez çalışmasında, çeşitli oksinler ve bunların farklı konsantrasyonlarının *E. pallida* bitkisinde iki farklı eksplant üzerinde adventif kök uyarımı, kök biyokütlesi ve kafeik asit türevleri miktarlarına etkisi araştırılmıştır. Araştırmada adventif kök uyarımı için *in vitro* koşullarda MS besin ortamında çimlendirilen fidelerin yaprak ve kök eksplantları kullanılmıştır. Yaprak eksplantları IBA, IAA ve NAA'nın 3 farklı konsantrasyonu (0.5, 1.0, 2.0 mg/L), kök eksplantları ise IBA ve IAA'nın 3 farklı konsantrasyonu (0.5, 1.0, 2.0 mg/L), %5 sakkaroz ve %2 phytigel içeren MS besin ortamlarında karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Otuz günlük kültür süresi sonunda yapraktan adventif kök uyarımı konsantrasyon fark etmeksizin tüm IBA ve IAA içeren ortamlarda gerçekleşirken, NAA uygulanan ortamlarda gözlenmemiş, bu ortamlarda sadece kallus uyarımı meydana gelmiştir. Yaprak eksplantından en yüksek kök oluşum yüzdesi 0.5 mg/L IBA (%25) ve 0.5 mg/L IAA (%23) içeren ortamlardan elde edilirken biyokütle bakımından IBA daha yüksek sonuçlar vermiştir. Kök eksplantından adventif kök uyarımı tüm IBA ve IAA konsantrasyonlarında gözlenmiş olup en fazla kök oluşturma yüzdesi 0.5 mg/L IBA (%57) uygulamasından, toplam biyokütle en fazla 1.0 mg/L IBA (2.44 mg) uygulamasından elde edilmiştir. Adventif kök gelişimi ve biyokütle bakımından yaprak eksplantından uyarımın daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Kafeik asit türevleri miktarları yalnızca yapraktan elde edilen adventif köklerde belirlenebilmiştir. En yüksek toplam kafeik asit türevleri miktarı (6.54 mg/g) 0.5 mg/L IBA uygulamasından elde edilirken, en yüksek ekinakozit (2.38 mg/g) 0.5 mg/L IAA içeren ortamlarda kültüre alınan köklerden elde edilmiştir. Kök oluşum yüzdesi, toplam biyokütle ve kafeik asit türevleri birikimi için 0.5 mg/L IBA uygulaması en iyi sonuçları vermiştir. Bu çalışma ile önemli bir tür olan *E. pallida*'nın yaprak ve kök eksplantından başarılı bir şekilde adventif kök oluşumu sağlanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar *E. pallida* türüne ait önemli kimyasal bileşiklerin temini ve bunların büyük ölçekli üretimi için kullanılabilecek faydalı bir protokol niteliği taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Adventif kök kültürü, *Echinacea pallida*, Kafeik asit türevleri, Oksin

ABSTRACT

MS THESIS

***Echinacea pallida* Nutt. INVESTIGATION OF *IN VITRO* ROOT CULTURES IN SPECIES AND DETERMINATION OF CAFFEIC ACID AMOUNTS**

Havva ÇAĐLAR

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN FIELD CROPS**

**Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR
Second Advisor: Dr. Münüre TANUR ERKOYUNCU**

2023, 52 Pages

**Jury
Assoc. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR
Dr. Emine ATALAY
Dr. Dilek KILLİ HAWORTH**

In this thesis, the effects of various auxins and their different concentrations on adventitious root induction, root biomass and caffeic acid derivatives amounts on two different explants in *E. pallida* plants were investigated. Leaf and root explants of seedlings germinated in MS medium under *in vitro* conditions were used for adventitious root induction. Leaf explants were cultured with 3 different concentrations of IBA, IAA and NAA (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) and root explants were cultured with 3 different concentrations of IBA and IAA (0.5, 1.0, 2.0 mg/L), 5% sucrose and 2% phytagel in MS medium under dark conditions. At the end of the thirty-day culture period, adventitious root induction from the leaves occurred in all IBA and IAA containing media regardless of the concentration, while it was not observed in NAA treated media, only callus induction occurred in these media. The highest percentage of root formation from leaf explant was obtained from media containing 0.5 mg/L IBA (25%) and 0.5 mg/L IAA (23%), while IBA gave higher results in terms of biomass. Adventive root induction from root explants was observed at all IBA and IAA doses, with the highest percentage of root formation obtained from a 0.5 mg/L IBA (57%) application and a maximum total biomass of 1.0 mg/L IBA (2.44 mg) application. It was observed that the use of leaf explants gave better results in terms of adventitious root formation and biomass. The amounts of caffeic acid derivatives could be determined only in adventitious roots obtained from the leaf. The highest total amount of caffeic acid derivatives (6.54 mg/g) was obtained from 0.5 mg/L IBA treatment, while the highest amount of echinacoside (2.38 mg/g) was obtained from roots cultured in media containing 0.5 mg/L IAA. For root formation percentage, total biomass and accumulation of caffeic acid derivatives, 0.5 mg/L IBA treatment gave the best results. With this study, successful adventitious root formation was achieved from the leaf and root explant of an important species, *E. pallida*. Our results are a useful protocol that can be used for the supply of important chemical compounds of *E. pallida* species and their large-scale production.

Keywords: Adventitious root culture, *Echinacea pallida*, Caffeic acid derivatives, Auxin

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimimin her aşamasında bilgileriyle bana önderlik eden, tez konumun belirlenmesinde, teorik konularda ve laboratuvar çalışmalarında beni her zaman destekleyen değerli danışmanlarım Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR ve Dr. Öğr. Üyesi Münüre TANUR ERKOYUNCU'ya harcadıkları zaman ve gösterdikleri sabır için tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Materyal temini ve HPLC analizlerinde destek veren Prof. Dr. Yüksel KAN'a yardım ve desteklerinden ötürü Dr. Öğr. Üyesi Emine ATALAY'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarındaki büyük katkıları ve manevi desteğinden ötürü değerli arkadaşım Yük. Zir. Müh. Hatice SÜSLÜ'ye, desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Yük. Zir. Müh. Rümeysa Omay, Zir. Müh. Ayşenur ÖZDEMİR ve Zir. Müh. Abdurrahman MUTLU'ya çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en çok emeği geçen, beni maddi manevi destekleyen, sabırla ve sevgiyle her zaman arkamda duran annem Nezire ÇAĞLAR, babam Alırza ÇAĞLAR, abim Muhammet ÇAĞLAR ve kardeşlerime tüm kalbimle teşekkür ederim. Çalışmamı anlamasa da beni her zaman destekleyen Gözel YAŞAR'a teşekkür ederim.

Araştırmaya finansman sağladığı için Selçuk Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne (Proje No 21201032) teşekkür ederim.

Havva ÇAĞLAR
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Ekinezyanın Morfolojisi	4
2.2. Ekinezya Türlerinde Yapılan Adventif Kök Çalışmaları	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal	11
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. <i>In vitro</i> çalışmalar için yapılan ön hazırlıklar	11
3.2.2. Besin ortamlarının hazırlanması	13
3.2.3. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi.....	14
3.2.4. Adventif kök kültürlerinin oluşturulması	15
3.2.5. Adventif köklerde kafeik asit türevleri analizi	16
3.2.6. Gözlem ve ölçümler.....	19
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	20
4.1. Yaprak Eksplantından Adventif Kök Uyarımı ve Biyokütle Miktarı.....	20
4.2. Kök Eksplantından Adventif Kök Uyarımı ve Biyokütle Miktarı.....	23
4.3. Elde Edilen Adventif Köklerde Kafeik Asit Türevleri Miktarı	28
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	32
5.1. Sonuçlar	32
5.2. Öneriler	33
KAYNAKLAR	34
EKLER	40
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C: Santigrat Derece

%: Yüzde

mg/L: Miligram/ Litre

g/L: Gram/ Litre

ml: Mililitre

mg/g: Miligram/ Gram

g: Gram

L: Litre

a/h: Ağırlık/ Hacim

Lux: Birim Alana Düşen Işık Akısı Ölçü Birimi

M: Molar

mM: Milimolar

μM: Mikromolar

vvm: Hava hacmi/ Kültür hacmi/ dk

UV: Ultraviyole ışın

HCl: Hidroklorik asit

KOH: Potasyum hidroksit

EtOH: Etil alkol

atm: Atmosfer basıncı

dk: Dakika

2,4-D: 2,4-Diklorafenoksiasetik asit

NAA: α-naftalen asetik asit

IAA: Indol-3-asetik asit

IBA: Indol-3-bütirik asit

MS : Murashige ve Skoog ortamı

1. GİRİŞ

Ekinezya (*Echinacea*) *Asteracea* familyasına ait, çok yıllık, otsu bir bitki (Bruneton, 1999) olup bu familya içerisinde 9 tür toplanmıştır (McGregor, 1968). McGregor tarafından bu dokuz takson *E. angustifolia* DC, *E. atrorubens* Nutt., *E. laevigata* (Boyton & Beadle) Blake., *E. pallida* (Nutt.) Nutt., *E. paradoxa* (Norton) Britton, *E. purpurea* (L.) Moench., *E. simulata* McGregor., *E. sanguinea* Nutt., *E. tennesseensis* (Beadle) Small. şeklinde tanımlanıp sınıflandırılmıştır. Belirlenen türler içerisinde *Echinacea angustifolia* D.C., *Echinacea pallida* (Nutt) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench., potansiyel farmakolojik etkileriyle bilinen ve ekonomik öneme sahip türler olup dünya genelinde preparatları bitkisel ilaç olarak değerlendirilmektedir (Mazza ve Cottrell, 1999; McKeown, 1999; Mistriková ve Vavrková, 2007). Dünya üzerinde Black Sampson, Hedgehog, Purple Coneflower, Red Sunflower, Rudbeckia, gibi farklı isimlerle tanınan bitki, ülkemizde daha çok pembe koni çiçeği, mor koni çiçeği veya kirpiotu isimleriyle bilinmektedir (Çelik, 2016). Anavatanı Kuzeydoğu Amerika olan bitki, ülkemizde ilk kez 2005 yılında Konya’da kültüre alınmıştır (Kurkin ve ark., 2011; Çelik ve Yüksel, 2019).

Kuzey Amerika'daki Kızılderililer tarafından en yaygın kullanılan şifalı bitkilerden biri olan ekinezya; öksürük, soğuk algınlığı, iltihap, kuduz, yılan ısırığı, boğaz ağrısı, diş ağrısı, bağırsak kurdu gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde ve ayrıca hayvanları tedavi etmek için yüzyıllar boyunca kullanılmıştır (Gruenwald ve ark., 1998; Kindscher, 2016). Geleneksel kullanımının yanı sıra bağışıklık sistemini düzenleyici özellikleri sayesinde günümüzde üst solunum yolu iltihaplanması tedavisinde kullanılmaktadır (Barrett, 2003). Güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olup ayrıca antiviral, antibakteriyel (Sharma ve ark., 2010), antimikrobiyel (Jamshidi ve ark., 2014) ve yaraları iyileştirici (Speroni ve ark., 2002) özelliklere sahiptir. Tüm bu özellikleri sayesinde ekinezya bitkisine olan talep her geçen gün artmaktadır.

Ekinezya türleri bünyelerinde terpenoidler, alkalamidler, alkaloidler, poliasetilenler, polisakkaritler ve fenolik bileşiklerden flavonoidler ile fenilpropanoidler (kafeik asit türevleri) gibi tıbbi bileşenler bulundurmaları sebebiyle zengin bir kimyasal kompozisyona sahiptir. En sık görülen kafeik asit türevleri ekinakozit, kikorik asit, kaftarik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve sinarindir (Bauer, 1991; Barnes ve ark., 2005; Mistrikova ve Vavrkova, 2006). Her üç türün fitokimyasal bakımdan benzer olduğu görülmektedir ancak yapılan bazı araştırmalarda

özellikle kafeik asit türevleri bakımından bazı farklılıkların olduğunu bildirilmiştir. Örneğin, ekinakozit en fazla *E. pallida* (Nutt.) türünün kök bölgesinde ve eser miktarda *E. angustifolia*'da bulunurken, *E. purpurea*'da bulunmaz. Kikorik asit en fazla *E. purpurea* türünün hem yaprak hem de kök bölgesinde bulunur. Sinarin ise sadece *E. angustifolia* köklerinde bulunmaktadır (Pietta ve ark., 1998; Speroni ve ark., 2002; Kabganian ve ark., 2003; Lin ve ark., 2011).

Başta Avrupa ülkeleri olmak üzere, dünyanın büyük bir bölümünde kültürü yapılmakta olan ekinezya türlerinden *E. pallida* bitkisi tıbbi ve ekonomik değerini içerdiği bir grup kimyasal bileşimlerden almaktadır. Ekinakozit bu grup içindeki önemli kafeik asitlerden biri olup güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Ayrıca güneş hasarına karşı cilt dokusunu koruyucu etkisi olduğu ve yaraların iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir (Facino ve ark., 1995; Bauer, 1999; Speroni ve ark., 2002). Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıkların (Alzheimer, Parkinson, SMA vb.) tedavisinde ilaç geliştirmek için ekinakozit kullanımının uygun olabileceği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2018; Li ve ark., 2022).

Ticari değeri olan tıbbi ve aromatik bitkilerin çok az bir kısmı tarlada üretilmekte olup, geri kalan çok büyük bir kısmı ise floradan toplanarak değerlendirilmektedir. Özellikle ekinezya gibi metabolit üretiminin toprak altı organlarda gerçekleştiği bitkilerin sürekli doğadan toplanması doğal dengeyi etkilemekte ve türlerinin yok olma tehlikesi gibi öngörülebilir zararlara neden olmaktadır. Ayrıca ilgili metabolitin miktar ve kalitesinin mevsime bağlı oluşu, belli gelişim dönemlerinde ve eser miktarda sentezlenmeleri, materyallerin mikroorganizmalarda bulaşması gibi sebeplerle standart miktar ve kalitede sekonder metabolit elde edilememektedir (Özhatay ve Atay, 1997; Bayram ve ark., 2010; Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015).

Tüm bu sorunlara alternatif ve yenilikçi bir çözüm olarak, gelecek vaat eden bir teknik olan bitki hücre ve doku kültürü sunulmaktadır. Bu yöntemle bitkinin yaşam alanı korunurken kontrollü şartlar altında, iklim ve toprak koşullarından bağımsız olarak, minimum alan ve iş gücüyle, yıl boyunca ürün elde edilebilmektedir (Vanisree ve ark., 2004). Bitki doku kültüründe sekonder metabolit üretimi için sıklıkla kullanılan kök kültürleri tekniği ile birçok tıbbi bitkide insan sağlığı için faydalı olan metabolitler başarılı bir şekilde üretilmiştir (Yu ve ark., 2000; Kim ve ark., 2007; Jeong ve ark., 2009b; Cui ve ark., 2010; Reis ve ark., 2011; Wu ve ark., 2011; Yin ve ark., 2014; Saxena ve ark., 2017; Sharifzadeh Naeini ve ark., 2021). Ancak özellikle

saçak kök kültürlerinin memeli hücreleri için potansiyel bir tehlike olarak görülen bazı opin benzeri substratlar içermeleri, bu yöntemi tehlikeli ve maliyetli yapmakta olup ayrıca *Agrobacterium rhizogenes* aracılığıyla genetik transformasyon yoluyla elde edildiği için ilaç endüstrisi tarafından da tercih edilmemektedir (Gaosheng ve Jingming, 2012; Khanam ve ark., 2022). Bu yüzden sekonder metabolit üretiminde adventif kök kültürü tekniği daha uygun görülmekte ve daha çok tercih edilmektedir.

Adventif kökler genellikle bitkinin gövde, yaprak, boğum ve boğum aralarından gelişerek olumsuz çevre koşullarında ortaya çıkan ve bitkinin bu şartlar altında hayatta kalmasını sağlayan yapılardır (Murthy ve ark., 2016). Kök kültürleri adventif köklerin bu özeliğinden yararlanarak, tıbbi öneme sahip bitkilerden ticari anlamda sekonder metabolit üretimini amaçlayan verimli biyoteknolojik yöntemlerdir (Baque ve ark., 2012). Karmaşık bir moleküler yapıya sahip olan adventif köklerin (Sorin ve ark., 2005) biyoteknolojik yöntemlerle verimli bir şekilde geliştirilmesi için besin ortamı, eksplant tipi, pH, karbon kaynağı ve miktarı ile kültür şartları gibi faktörlerin etkili bir şekilde optimize edilmesi gerekir (Yu ve ark., 2001; Wu ve ark., 2006; Paek ve ark., 2009). Uluslararası literatürde ekinezya ve diğer tıbbi bitkilerde biyoteknolojik yollarla sekonder metabolit üretimi için kullanılan kök kültürü uygulamalarından özellikle saçak kök kültürü alanındaki araştırmalara yoğunluk verildiği tespit edilmiştir. Adventif kök kültürü alanında yürütülen araştırmalar ise daha çok ekinezyanın diğer türleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Wu ve ark., 2007d; Cui ve ark., 2013). *E. pallida* türünde ise bu teknikle yapılan çalışmalar az sayıda olup, sınırlı düzeyde kalmıştır (Gao ve ark., 2018). Türün tıbbi ve ekonomik önemi düşünüldüğünde, farklı doku kültürü teknikleri ile çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında tıbbi ve ekonomik öneme sahip *Echinacea pallida* Nutt. türünde farklı oksin tipleri ve bunların farklı konsantrasyonları kullanılarak, yaprak ve kök olmak üzere iki farklı eksplant tipinde kök uyarımlarını incelemek, bu anlamda etkili bir protokol geliştirmek ve son olarak elde edilen adventif köklerde kök büyümesi ile kafeik asit türevlerinin miktarlarını belirlemek amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ekinezyanın Morfolojisi

Ekinezya cinsi *Asteraceae* familyasının çok yıllık, önemli bir üyesi olup ismini yunanca kirpi anlamına gelen “echinos” kelimesinden almıştır. Genellikle yarı dallanmış, dik gelişen, tüylü, uzun bir gövde ve bu gövdeyi oluşturan çok yıllık dikey bir ana kökten oluşmaktadır. Yapraklar oval, eliptik ya da mızrak şeklinde gövdeden gelişir ve yaprak sapları yukarı doğru çıkıldıkça küçülen bir yapıdadır. Gövdenin en uç kısmında konik şeklinde, dikenli, hafif kokulu çiçekler bulunur. Bu çiçekler ait oldukları familyanın diğer üyeleriyle benzer, papatyamsı bir görünümde olup renkleri türlere göre değişmekle birlikte çoğunlukla beyaz, pembe, mor ve sarı tonlarındadır. Türlerin çoğunluğu kazık kök yapısına sahip olmakla birlikte güçlü dallanmış lifli kök yapısına sahip türler de bulunmaktadır. Genellikle yavaş büyüyen ve kurağa dayanıklı bitkilerdir (Li, 1998; McKeown, 1999).

Echinacea pallida (Nutt.) türü nadiren dallanmış, ortalama 40-90cm yüksekliğinde, maksimum 140 cm'ye kadar uzayabilen, tüylü bir gövdeye sahiptir. Yaprakların her iki yüzeyi tüylü, koyu renkli, dikdörtgen mızrak şeklindedir. Çiçekleri, 4-9 cm uzunluğunda, 0.5-0.8 cm genişliğinde, mor, pembe ve beyazımsı renklerde yukarıdan aşağı doğru eğilmiş bir görünümündedir (McGregor, 1968; Mistríková ve Vavrková, 2007; Keller, 2014). Çiçekler diğer türlerden farklı olarak beyaz polenlere sahiptir (McKeown, 1999).



Şekil 2.1. Ülkemizde yetiştirilen *E. pallida* Nutt. türünün görünümü (Çelik, 2016)

2.2. Ekinezya Türlerinde Yapılan Adventif Kök Çalışmaları

Wu ve ark. (2006) tarafından yapılan bir araştırmada, *E. angustifolia*'da adventif köklerden fenolikler ve biyokütle üretimi için kültür koşullarının optimizasyonu araştırılmıştır. Farklı tip [α -naftalen asetik asit (NAA), Indol-3-asetik asit (IAA) ve Indol-3-bütirik asit (IBA)] ve konsantrasyonlarda (1.0, 2.0, 4.0, 6.0 mg/L) oksin, MS gücü (1/4, 1/2, 3/4, 1/1, 3/2, 2/2), sakkaroz (%1, %3, %5, %7, %9), amonyum nitrat içeriği (0:40, 0:35, 0:30, 5:25, 10:20, 15:15, 20:10, 25:5, 30:0) ve pH'nın toplam adventif kök büyümesi, fenoller ve flavonoidlere etkisine bakılarak optimum konsantrasyonlar belirlenmiştir. IBA'nın adventif kökler için en uygun oksin olduğunu bildiren araştırmacılar 2.0 mg/L IBA destekli ortamın biyokütle ve sekonder metabolitler için en uygun ortam olduğunu bildirmişlerdir. ½MS ortamı, %5 sakkaroz ve pH 5-6 olan ortamlardan maksimum biyokütle ve sekonder metabolit elde edilmiştir. Ayrıca amonyum yerine nitrat kullanımının kök büyümesi için daha uygun olduğu ve 5:25 mM amonyum/nitrat oranının optimum olduğu bildirilmiştir.

Wu ve ark. (2007a), yine bu konuyla ilgili yürüttükleri bir araştırmada, *E. purpurea* adventif kök gelişimi için en uygun ortamın ½MS olduğunu, özellikle kikorik asit, kaftarik asit ve klorojenik asit birikimlerinin ½MS ortamıyla muamelesinde en yüksek sonuçların ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Ayrıca kültüre aldıktan 2. veya 3. hafta sonra ortamları yenileyen araştırmacılar, ortam yenilemenin biyokütle ve kafeik

asit türevleri birikimi için daha faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Bu bağlamda en iyi sonuç; ½MS ortamından 2. hafta yapılan ortam değişikliğinde alınmıştır.

Dewir ve Paek (2007), kültür ortamı ve şartlarının *E. angustifolia* bitkisinde biyokütle artışı, toplam fenoller ve flavonoidler üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, adventif kök gelişimi için en etkili oksinin IBA olduğunu, ortam pH'sının 5.0'in altında veya 6.0'nın üzerinde tutulduğunda kök büyümesinin engellediğini, kök büyümesi ve fenolik birikimi açısından nitratın daha gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada maksimum biyokütle artışı ve toplam fenoller ve flavonoidler 2.0 mg/L IBA, %5 sakkaroz, 5:25 (mM) amonyum/nitrat ile desteklenmiş ½MS ortamından (pH 6.0), 10 g/L (yaş ağırlık) aşılama yoğunluğu kullanılarak elde edilmiştir. Araştırmacılar büyük ölçekli üretimlerde kültür ortamının optimizasyonunun faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

E. purpurea 'da kikorik asit, kaftarik asit ve klorojenik asit üretimi için adventif kök kültürlerinin büyük ölçekli üretiminin amaçlandığı bir araştırmada, (Wu ve ark., 2007b), eksplant kaynağı olarak bitkinin doğal köklerini kullanmışlardır. Başlangıçta 1.0 mg/L IBA ve %5 sakkarozla desteklenmiş ½MS ortamına alınan kökler, karanlık koşullarda, 5 litrelik balon tipi biyoreaktörlerde, 4 hafta boyunca alınmıştır. Elde edilen adventif kökler 7 g/L olacak şekilde 2.0 mg/L IBA ve %5 sakkarozla desteklenmiş ½MS ortamı içeren, 20 L, 500 L ve 1000 L'lik biyoreaktörlere alınmıştır. 60 günlük kültür süresi sonunda 20 L biyoreaktörde maksimum verim, (11 g kuru biyokütle) elde edilmiş ancak toplam fenolik madde miktarı (57 mg/g Kuru Ağırlık), flavonoidler (34 mg/g kuru ağırlık) ve kafeik asit türevleri (38 mg/g kuru ağırlık) 50. günde en yüksek değere ulaşmıştır. 500 L biyoreaktörde 3.6 kg, 1.000 L biyoreaktörde 5.1 kg kuru biyokütle elde eden araştırmacılar, 1.000 L biyoreaktörlerde yetiştirilen adventif köklerde 5 mg/g klorojenik asit, 22 mg/g kikorik asit ve 4 mg/g kaftarik asit elde edildiğini bildirmişlerdir.

Wu ve ark. (2007c), yürüttükleri araştırmada, nitrit oksit uygulamasının *E. purpurea* adventif köklerindeki sekonder metabolitlerin sentezine etkisini araştırmışlardır. Başlangıçta adventif kök uyarımı için *E. purpurea* taze kökleri 2.0 mg/L IBA ve 50 g/L sakkarozla desteklenmiş MS (pH 6.0) besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültürlerde 1 ay sonra kallus uyarımı gerçekleşmiş ve bu çoğalan kalluslar kök uyarımı için 2.0 mg/L IBA ve 50 g/L sakkarozla desteklenmiş ½MS (pH 6.0) besin ortamında bir ay boyunca kültürde tutularak adventif kök uyarımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen adventif kökler çoğaltıldıktan sonra 1.5-2.0 cm uzunluklarda kesilerek 2.0

mg/L IBA ve 50 g/L sakkarozla desteklenmiş ½MS besin ortamı içeren 5 L'lik biyoreaktörlere aşılama yoğunluğu 7 g/L olacak şekilde koyulmuş ve 4 haftalık büyümeden sonra farklı konsantrasyonda sodyum nitroprussid (SNP) (0, 50, 100 veya 250 µM SNP) uygulanmıştır. Araştırma sonucunda yüksek konsantrasyonlarda SNP (250 µM) uygulamasının askorbik asit, askorbat peroksidaz ve sekonder metabolitlerin birikimini azalttığı görülmüştür. 100 µM SNP uygulamasının adventif köklerde fenolikler, flavonoidler ve kafeik asit türevleri birikimini arttırdığını bildiren araştırmacılar ayrıca bu dozun köklerde antioksidan savunmaların düzenlenmesinde olumlu etkilerinin olduğunu bildirmiştir.

Paek ve ark. (2009), *E. purpurea* adventif kök uyarımı için bitkinin serada ya da tarlada yetişen köklerinin eksplant kaynağı olarak kullanılabileceğini ve 50 g/L sakkaroz, 4.9 mM IBA, %0.2 gelrite ile desteklenmiş, pH'sı 6.0 olan ½MS besin ortamının bu amaçla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Jeong ve ark. (2009b), *E. purpurea* bitkisinin adventif köklerinden balon tipi hava kaldırmalı biyoreaktörler kullanarak biyokütle ve kafeik asit türevlerini üretmek amacıyla yürüttükleri çalışmalarında, adventif kökler 2.0 mg/L IBA ve 50 g/L sakkaroz ile desteklenmiş ½MS besin ortamında, (5:25 mM amonyum/nitrat oranı) karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Elde edilen adventif kökler optimum aşılama yoğunluğunu belirlemek amacıyla 2.5-5.0-7.0-10.0 ve 15.0 g/L taze ağırlıklar kullanılarak 0.2 vvm havalandırma oranıyla 25°C'de, karanlık koşullarda, 5 hafta boyunca tutulmuştur. Ayrıca optimum havalandırma oranını belirlemek için adventif kökler, 0.05-0.1-0.2 ve 0.3 vvm'de 10 g/L konsantrasyonda aşılansak kültüre alınmıştır. 4 haftalık kültür süresi sonunda biyokütle ve sekonder metabolitlerde yaklaşık 10 kat artış gözlemleyen araştırmacılar en yüksek biyokütlenin (79.0 g/L yaş ağırlık ve 10.4 g/L kuru ağırlık) 15 g/L taze ağırlıklı aşı yoğunluğu kullanımından elde edildiğini bildirmiştir. Bununla birlikte, en yüksek fenolik ve flavonoid içeriğinin (sırasıyla 58.5 mg/g kuru ağırlık ve 38.6 mg/g kuru ağırlık) 7 g/L taze ağırlıklı aşı yoğunluğundan elde edilmiştir. Araştırmacılar 0.1 vvm'lik havalandırma oranı ve 7 g/L taze ağırlıklı aşı yoğunluğunun biyokütle ve sekonder metabolitlerin birikimi için en uygun değerler olduğunu bildirmişlerdir.

Cui ve ark. (2013), *E. angustifolia*'da adventif köklerin büyütülmesi ve kafeik asit türevleri üretimi amacıyla yürüttükleri çalışmada, eksplant kaynağı olarak bitkinin *in vitro*'da yetiştirilmiş yeşil yapraklarını kullanmışlardır. 1.0 mg/L IBA, %3 sakkaroz ve %0.2 gelrite ile desteklenmiş katı MS ortamına alınan ve 5 hafta karanlık koşulda

bekletilen yapraklarda kök uyarımı başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Elde edilen kökleri çoğaltmak amacıyla 1.0 mg/L IBA ve %5 sakkaroz ile desteklenmiş sıvı MS ortamı kullanılmıştır. Çoğaltılan kökler ortam tuzu ve sakkaroz konsantrasyonu optimizasyonu için kültüre alınmıştır. Beş haftalık kültür süresi sonunda maksimum kök verimi (6.50 g/L kuru ağırlık) ile kafeik asit türevleri, flavonoidler ve fenoliklerin üretimi için en uygun ortamın ½MS olduğunu belirleyen araştırmacılar, bu ortamda kültüre alınan köklerde toplam fenolik birikimi 22.06 mg/g, toplam flavonoidler 5.77 mg/g ve toplam kafeik asit türevlerinin 10.63 mg/g miktarlarında olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ¾, 1 ve 2 MS gibi daha yüksek tuz içeren ortamların bu metabolitlerin üretimi için uygun olmadığını bildirmişler. Çalışmanın devamında çeşitli sakkaroz konsantrasyonlarının biyokütle ve biyoaktif maddelere etkisi incelenmiş ve %5 sakkaroz konsantrasyonunun bu maddelerin üretiminde optimum miktar olduğu bildirilmiştir.

Wu ve ark. (2017) tarafından üç farklı ekinezya türünde [*E. pallida* (Epa), *E. purpurea* (Epu) ve *E. angustifolia* (Ean)] ortak kültür koşullarını araştırmak ve biyoaktif bileşikleri verimli bir şekilde üretmek amacıyla yürütülen bir araştırmada, üç ekinezya türünde adventif kök uyarımı sağladıktan sonra tüm gruplarda toplam aşılama yoğunluğu 7 g/L olacak şekilde, 7 farklı grup (Epa+Epu, Epa+Ean, Epa+Ean, Epa+Epa+Ean, Epa, Epu ve Ean) 1.0 mg/L IBA ve 50 g/L sakkaroz içeren ½MS besin ortamında (4 L), 5 L'lik balon tipi hava kaldırmalı biyoreaktörde, karanlık koşullarda kültüre almıştır. Daha sonra aynı koşullarda, toplam 7 g/L aşılama yoğunluğunda, farklı aşılama oranlarının (Epa:Epu = 1:6, 2:5, 3:4, 1:1, 4:3, 5:2, 6:1) etkisini araştırmış ve buradan çıkan sonuçlar doğrultusunda adventif kök ortak kültürünün farklı boyutlardaki biyoreaktörlerde uyarlanabilirliği araştırılmak üzere 5 L (4 L ortam), 10 L (8 L ortam) ve 20 L (16 L ortam) biyoreaktörlerde, Epa:Epu = 4:3 oranında, 7 g/L aşı yoğunluğunda, 30 gün boyunca kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda adventif köklerin biyokütlesi Epu+Epu grubunda artmış, ancak Epa+Ean ve Epu+Epu+Ean'ın ortak kültür gruplarında azalmıştır. Epa+Epu grubunda, toplam fenolikler, flavonoidler ile kafeik asit türevlerinin içeriği ve üretkenliği artmış, ayrıca bu grup en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Epa+Epu aşı oranlarının ortak kültür koşullarını önemli derecede etkilediğini bildiren araştırmacılar, 4:3 (Epa:Epu) aşılama oranının biyokütle ve biyoaktif bileşik birikimi için en uygun olduğunu ve antioksidan aktivite de 4:3 oranında zirveye ulaşıldığı bildirilmiştir. Büyük biyoreaktörler (10 ve 20 L) bir ortak

kültür sistemi için uygun bulunmuş ve adventif kök biyokütlesi ile biyoaktif bileşiklerin miktarında bir azalma olmadan artmıştır.

Wu ve ark. (2018), *E. pallida* ve *E. purpurea* adventif kök kültürlerinin hava kaldırmalı biyoreaktör sistemlerinde ortak kültür koşullarını optimize etmek amacıyla yürüttükleri çalışmalarında, MS besin ortamı güçlerinin (0.50-0.75 ve 1.0) ve sakkaroz konsantrasyonlarının (30, 50, 70 ve 90 g/L) adventif köklerde biyokütle, biyoaktif bileşik birikimi ve antioksidan aktivite üzerindeki etkilerini araştırmış ve uygun bir kültür periyodu belirlemek için bir kinetik çalışma yapmışlardır. MS ortam gücü ve şeker konsantrasyonlarının, adventif kök ortak kültürü verimliliğini kritik bir şekilde etkilediğini bildiren araştırmacılar, en yüksek adventif kök biyokütlesi ve toplam polisakaritler, fenolikler, flavonoidler ve toplam kafeik asit türevleri (kaftarik asit, klorojenik asit, kafeik asit, sinarin, ekinakozit ve kikorik asit) birikimi bakımından en iyi ortamı 50 g/L sakkaroz ilaveli $\frac{3}{4}$ MS olarak belirlemişlerdir. Kinetik çalışmada, kültür süresinin artmasıyla adventif kök biyokütlesinin arttığını, biyoaktif bileşik içeriklerinin ilk 10 günde azalırken 10.-35. günlerde önemli ölçüde arttığı ve 35.-50. günlerde tekrar azaldığı gözlemlenmiştir. Biyoaktif bileşikler 35. günde 502.1 mg/L polisakaritler, 564.3 mg/L fenolikler, 457.4 mg/L flavonoidler ve 416.1 mg/L kafeik asit türevleri ile en yüksek seviyelere ulaştığı bildirilmiştir.

Gao ve ark. (2018), yürüttükleri araştırmada, nitrojen, fosfor ve sakkaroz gibi kültür ortamı bileşenlerinin *E. pallida* bitkisinde adventif kök üretimine etkisini incelemişlerdir. İlk olarak adventif kök uyarımı için 1.0 mg/L IBA, 50 g/L sakkarozla desteklenmiş $\frac{3}{4}$ MS besin ortamı kullanılmış ve adventif kök uyarımı gerçekleşmiştir. Araştırmanın devamında elde edilen adventif kökler 12 farklı miktarda azot, fosfor ve sakkaroz ile desteklenmiş 1.0 mg/L IBA ilaveli $\frac{3}{4}$ MS besin ortamına aktarılmış ve 30 günlük kültür süresi sonunda optimum koşulları belirlemek amacıyla adventif kök kuru ağırlığı, toplam fenolik ve flavonoid miktarı belirlenmiştir. Araştırma sonucunda adventif kök kuru ağırlığı (5.2 g/L), toplam fenolik (57.3 mg/g) ve flavonoid (40.8 mg/g) miktarının en fazla 45 mM azot + 1.56 mM fosfor + 50 g/L sakkaroz içeren ortamdan elde edildiği bildirilmiştir.

An ve ark. (2022), yürüttükleri araştırmada, *E. pallida* ve *E. purpurea* adventif kök kültüründe metil jasmonatın (MeJa) biyoaktif bileşik sentezine etkilerini araştırmışlardır. Her iki türün aşılama için kullanılacak kökleri 1.0 mg/L IBA ve %50 sakkarozla desteklenmiş $\frac{1}{2}$ MS ortamında, karanlık koşullarda tutulmuştur. 30 günlük kültür süresi sonunda elde edilen köklere 5 gün boyunca 0, 10, 25, 50, 100 ve 200 μ M

MeJa ilave edilmiştir. Araştırma sonucunda 25 μ M MeJa uygulanan adventif köklerin fenoliklerin (728.2 mg/L), flavonoidlerin (622.2 mg/L) ve kafeik asit türevlerinin (255.3 mg/L kikorik asit ve 143.9 mg/L ekinakozit) metabolit birikiminde maksimum verime ulaştığını, ancak MeJa konsantrasyonu 25 μ M den yüksek olanlarda azalma olduğunu bildirmişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak tıbbi ve ekonomik öneme sahip *Echinacea pallida* tohumları kullanılacaktır. Tohumlar; Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tıbbi Bitkiler Uygulama Çiftliği'nden, Prof. Dr. Yüksel KAN tarafından yetiştirilen bitkilerden temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan *E. pallida* tohumları

Araştırma 2021-2022 yılları arasında, Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Biyoteknolojisi Doku Kültürü ve Tıbbi Bitkiler Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. *In vitro* çalışmalar için yapılan ön hazırlıklar

3.2.1.1. Alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Tüm doku kültürü uygulamaları 0.22 µm porozitede hepa filtreye sahip yatay hava akışlı (laminar air flow) kabin içinde aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Steril çalışmalara başlamadan önce yatay hava akışlı kabinin içi %96'lık etil alkolle silinmiş ve kabin içi 20 dk süreyle açık bırakılan ultraviyole (U.V.) lamba ile sterilize edilmiştir. Steril çalışmalarda kullanılacak aletler (bisturi, pens vb.) öncelikle %70'lik etil alkol

kullanılarak ön sterilizasyon işleminden geçirilip kurutulduktan sonra, 250°C'ye kadar ısıtılmış cam boncuklu sterilizatör (Steri 250, Swiss-Made) içerisinde 10-20 sn bekletilerek sterilize edilmişlerdir. Denemelerde kullanılan kültür kapları (Magenta GA7 ve cam petriler), otoklavda 1.5 atm basınç altında, 121°C'de 20 dk boyunca sterilize edilmişlerdir.

Sterilizasyonda kullanılacak saf su, ısıya dayanıklı cam şişeler içinde, eksplantların kesiminde kullanılacak fayanslar (10x15 cm) ise alüminyum folyo içine sarılarak, otoklavda 1.5 atm basınç altında, 121°C'de 20 dk boyunca sterilize edilmişlerdir.

3.2.1.2. Stok çözeltilerinin hazırlanması

Araştırmamızda, tüm uygulamalarda besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel ortam bileşimi kullanılmıştır ve maliyeti düşürmek için stok çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır. MS besin ortamı içeriği ve stok çözeltilerin hazırlanmasına ait bilgiler aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. MS temel besin ortamı içeriği ve stok çözeltilerin konsantrasyonları

Makro Elementler Stok Çözeltisi		
Kimyasalın Adı	MS (mg/L)	20x Stok (g/L)
NH ₄ NO ₃	1650	33
KNO ₃	1900	38
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	7.4
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	8.8
KH ₂ PO ₄	170	3.4
Mikro Elementler Stok Çözeltisi		
Kimyasalın Adı	MS (mg/L)	200x Stok (mg/L)
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	4460
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	1720
H ₃ BO ₃	6.2	1240
KI	0.83	166
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	50
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	5
Vitamin Stok Çözeltisi		
Kimyasalın Adı	MS (mg/L)	100x Stok (mg/L)
Glisin	2	200
Nikotinik Asit	0.5	50
Pridoksin HCl	0.5	50
Thiamin HCl	0.1	10

Makro besin elementi stok çözeltisi, Çizelge 3.1’de belirtilen maddeler, konsantrasyonlarının 20 katı olacak şekilde hassas terazide tartılarak 700 ml saf su içerisine sırasıyla ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözündürülmüştür. Daha sonra hacim saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti, kabaklı cam kavanoza alındıktan sonra +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Mikro besin elementi stok çözeltisi, Çizelge 3.1’de belirtilen maddeler konsantrasyonlarının 200 katı olacak şekilde hassas terazide tartılarak sırasıyla 700 ml saf su içerisine ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözündürülmüştür. Daha sonra hacim, saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti, kabaklı cam kavanoza alındıktan sonra +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Mikro besin elementleri içerisinde yer alan demirin, şelatlanmış formu besin ortamına ilave edilmesi gerektiği için; FeNa₂-EDTA stok çözeltisi farklı olarak hazırlanmıştır. Hassas terazide 5.57g FeSO₄.7H₂O ve 7.45g Na₂EDTA tartılmış, maddeler tamamen çözündürüldükten sonra hacmi saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Isıya dayanıklı cam şişe içerisinde 121°C’de 20 dk boyunca otoklav edilerek şelat oluşması sağlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti, oda sıcaklığına geldikten sonra +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Vitamin stok çözeltisi, Çizelge 3.1’de belirtilen maddeler konsantrasyonlarının 100 katı olacak şekilde hassas terazide tartılarak sırasıyla 70 ml saf su içerisine ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözündürülmüştür. Daha sonra hacim saf su ile 100 mililitreye tamamlanarak hazırlanmıştır. *myo*-inositol çökelti oluşturduğu için vitamin stok solüsyonuna dâhil edilmemiş, besin ortamı hazırlanırken 100 mg/L tartılarak ortama ilave edilmiştir. Hazırlanan stok çözelti, cam şişelere konulduktan sonra +4°C de muhafaza edilmiştir.

Bitki büyüme düzenleyicileri stok çözeltisi, her üç oksin (IBA, IAA, NAA) için ayrı ayrı 1/1 (mg/ml) oranında hazırlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin 10 ml stok çözeltisini hazırlamak için 10 mg madde hassas terazide tartılmış ve yaklaşık 2 ml 1M (KOH) ilave edilerek çözündürülmüştür. Daha sonra stokların hacimleri saf su ile 10 ml ye tamamlanmış ve temiz falkon tüplere alınarak +4 °C muhafaza edilmiştir.

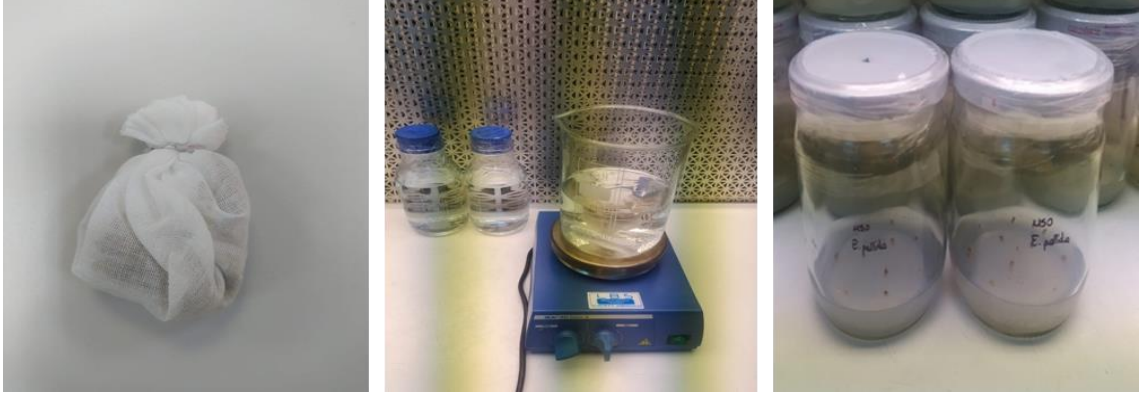
3.2.2. Besin ortamlarının hazırlanması

Bir litre MS besin ortamı hazırlamak için 700 ml saf su içerisine 50 ml makro besin elementi stok çözeltisi, 5 ml mikro besin elementi stok çözeltisi, 1 ml vitamin stok çözeltisi ile 5 ml FeNa₂-EDTA stok çözeltisi sırasıyla ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra 100 mg *myo*-inositol tartılarak ortama ilave edilmiştir. Karbon kaynağı olarak %5 (a/h) sakkaroz (Wu ve ark., 2006) ilave edilmiş ve tamamen çözündürüldükten sonra ortam pH'sı 0.1-1 N KOH ya da 0.1-1 N HCl ile 5.8'e ayarlanıp hacim saf su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan ortamlar kavanozlara boşaltılıp, %0.2 (a/h) phytagel (Cui ve ark., 2013) eklenerek otoklavda 20 dk boyunca 1.5 atm basınçta 121°C'de sterilizasyona tabi tutulmuştur. Büyüme düzenleyicileri için de hazırlanan stok çözeltiler kullanılmıştır. NAA yüksek ısıdan etkilenmeyen bir büyüme düzenleyicisi olduğu için otoklavdan önce besin ortamına gerekli miktarlarda ilave edilmiştir. IBA ve IAA yüksek ısıdan etkilendikleri için, 0.22 µm poroziteli filtreler (milipor) ile sterilize edilmiş ve ortamlara otoklav sonrasında steril pipet yardımıyla istenilen konsantrasyonlarda ilave edilmiştir.

3.2.3. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Tez kapsamında yürütülecek çalışmalarda eksplant kaynağı olarak steril fideler kullanılacağı için *Echinacea pallida* türüne ait tohumlar, öncelikle şekil 3.2'de görüldüğü biçimde sterilize edilerek çimlendirilmeye alınmıştır.

Tohumlar ön sterilizasyon için 10 dakika boyunca akan çeşme suyunda yıkanmış ve sterilizasyon öncesinde bez kese içine alınmıştır. Daha sonra keselenen tohumlar cam bir beher içerisinde %96'lık etanol (a/h) çözeltisinde 2 dakika ve yaklaşık 2-3 damla yayıcı-yapıştırıcı (Tween-20) ilave edilmiş %10'luk sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 10 dakika bekletildikten sonra 3 kere steril su ile 5'er dakika çalkalanarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sterilizasyon işlemi sonrasında tohumlar kabinde steril fayans üzerinde kurutulmuş ve çimlendirme için kültür kapları (Magenta GA7) içerisinde, her kapta 8 adet tohum olacak şekilde steril MS besin ortamına yerleştirilmiştir. 24±2°C sıcaklık, %65 nem, 5 LS ışık şiddeti, 16/8 saat fotoperiyotta kontrollü şartlar altında, iklim odasında çimlendirmeye alınmıştır. 6-8 haftalık steril fideler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

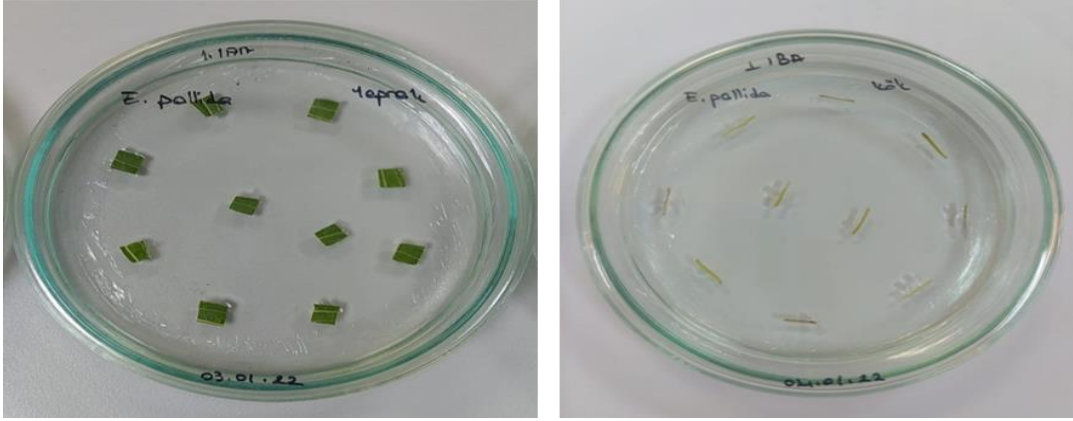


Şekil 3.2. *E. pallida* tohumlarının sterilizasyon ve ekim aşaması

3.2.4. Adventif kök kültürlerinin oluşturulması

Kök kültürü için en uygun eksplant tipinin, büyüme düzenleyicisinin ve kültür süresinin belirlenmesi amacıyla başlatılacak kök kültürlerinde, doku kültüründe yetiştirilen steril fidelerin kökleri ve yaprakları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Steril fidelerin yaprak ve kökleri kabin içerisinde steril fayans üzerinde, steril bistüri ve pens kullanılarak eşit parçalarda (kökler 1cm uzunluğunda) kesilmiş ve yaprak eksplantları alt kısmı ortama bakacak şekilde, kökler ise tamamen ortama temas edecek şekilde içerisinde 30 ml besin ortamı bulunan cam petri kaplarına yerleştirilmiştir.

En iyi kök oluşumunu sağlayan büyüme düzenleyicilerinin belirlenebilmesi için her bir eksplant tipi (kök, yaprak), farklı tip (NAA, IAA veya IBA) ve farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) oksin içeren MS besin ortamlarında, her petride 10 eksplant ve her tekerrürde 5 petri olmak üzere 3 tekerrürlü olarak kültüre alınmıştır. Kültürler $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de ve karanlık şartlardaki iklim odasında 4 hafta boyunca muhafaza edilmiştir. Kültür süresi sonunda oluşan adventif köklerde, yaş ağırlık, kuru ağırlık ve kök oluşturma yüzdesi belirlenmiştir.



Şekil 3.3. *E. pallida* yaprak ve kök eksplantlarının besin ortamına aktarımı



Şekil 3.4. . İklim odasında karanlık koşullarda kültüre alınmış eksplantlar

3.2.5. Adventif köklerde kafeik asit türevleri analizi

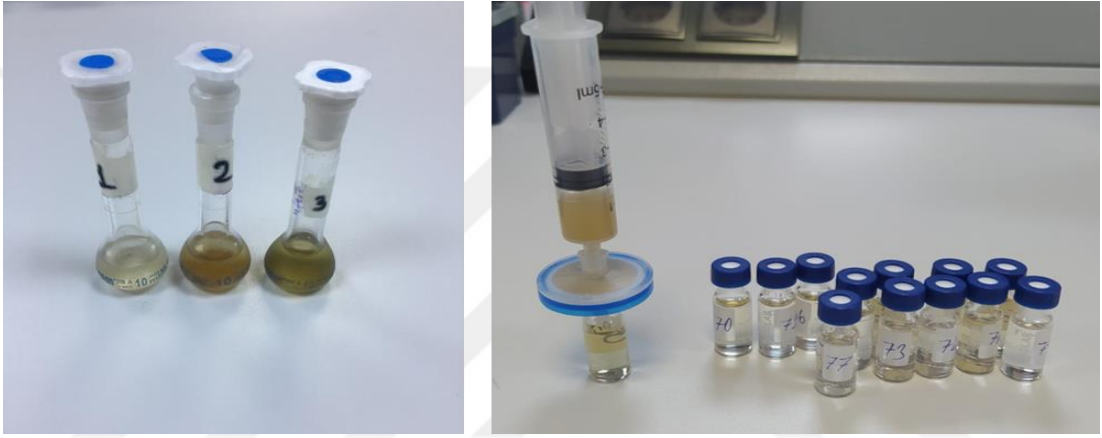
E. pallida adventif köklerinde bulunan kafeik asit türevleri içeriği Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (YSBK veya HPLC) cihazı kullanılarak Erkoyuncu (2019)'a göre analiz edilmiştir.

3.2.5.1. Numunelerin hazırlanması

Kök ve yaprak eksplantlarından elde edilen adventif kökler ayrı ayrı hasat edildikten sonra küçük kese kağıtlarına alınmış ve etüvde 50°C'de 48 saat boyunca bekletilerek ekstraksiyon öncesi kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutulan numuneler, havan yardımıyla parçalanarak toz haline getirilmiştir. Daha sonra, örnekler analiz için numaralandırılıp nem çekmeyecek şekilde muhafaza edilmiştir.

3.2.5.2. Ekstraksiyon

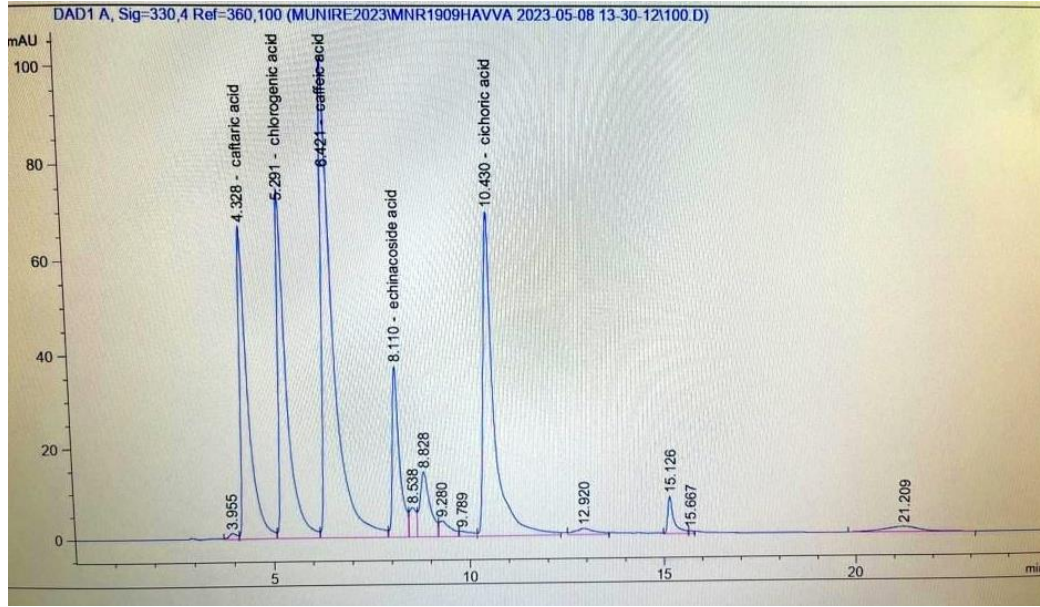
Kurutulmuş ve öğütülmüş kök materyalleri hassas terazi yardımıyla 0.2 g tartılarak 20 ml'lik balon joje içerisine alınmıştır. Üzerine 8 ml metanol (%70 h/h) ilave edilerek 15 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Ultrasonik banyo sonrasında örneklerin üzerine tekrardan 2 ml metanol (%70 h/h) ilave edilmiş ve toplam hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Tekrar hafifçe çalkalandıktan sonra katı parçaların çökmesi için bir süre bekletilmiştir. Son olarak sıvı kısım bir şırıngaya boşaltılarak 0.45µm'lik membran filtreden süzölmüş ve 2 ml'lik şeffaf cam HPLC şişelerine (viyal) aktarılmıştır.



Şekil 3.5. Ekstraksiyon işlemi

3.2.5.3. Standart çözeltilerinin hazırlanması ve kromatogram

Fenolik standart stok çözeltisini hazırlamak için öncelikle standartlar hassas terazide 10 mg tartılıp 10 ml'lik balon joje içerisine alınmış daha sonra üzerlerine 5 ml metanol (%70 h/h) ilave edilerek 15 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. Ultrasonik banyo işlemi sonrasında çözünen standartlar üzerine 5 ml metanol (%70 h/h) ilave edilerek hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan standart stok çözeltileri 0.45µm'lik membran filtreden süzölmüş ve bu stoklardan 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlanarak HPLC'de koşturulmuştur. Standartların alıkonma zamanları belirlenmiştir (Şekil 3.6)



Şekil 3.6. Ayrılma zamanlarını gösteren kromatogram

3.2.5.4. Kromatografik metot ve koşullar

Kafeik asit türevlerinin miktar tayini için, Avrupa Farmakopesi'nde açıklanmış olan HPLC analiz metodu seçilmiştir. Agilent 1200 Series HPLC sistemi ve Zorbax OD S4 tipi kolon kullanılmıştır. Hareketli faz çözeltileri, %0.1 fosforik asit (hareketli faz A) ve asetonytril (hareketli faz B) akış hızı 1.5 ml/dk ve akış tipi gradient elüsyon olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Enjeksiyon hacmi ise 10 µl'dir. Diod-Array Dedektör (DAD) ile 330 nm dalga boyunda çalışılmıştır.

Çizelge 3.2. Gradient elüsyon programı

Zaman (dk)	%A	%B	Akış Hızı
			(ml/dk)
0	90	10	1.5
13	78	22	1.5
14	40	60	1.5
20	60	40	1.5

3.2.6. Gözlem ve ölçümler

3.2.6.1. Kök oluşturma oranı (%)

Kültüre alınan eksplantlardan, 4 haftalık kültür süresi sonunda kök oluşturanlar sayılmış ve kök oluşturma oranı yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.2. Kök yaş ağırlığı (mg)

Hasat edilen adventif kökler bulundukları ortamdan dikkatli bir şekilde alınmış ve ortam kalıntılarını temizlemek amacıyla su ile yıkanmıştır. Ağırlığı etkilememesi için yıkama kaynaklı su, kurutma kağıtları kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Kısa süre sonra hassas terazide tartım yapılmış ve kök yaş ağırlıkları mg cinsinden kaydedilmiştir.

3.2.6.3. Kök kuru ağırlığı (mg)

Yaş ağırlığı belirlendikten sonra kökler etüvde, 50°C'de 48 saat boyunca kurutulduktan sonra hassas terazide tekrar tartılarak kuru ağırlıkları mg cinsinden kaydedilmiştir.

3.2.7. Verilerin analizi ve değerlendirilmesi

Denemeler “Tesadüf Parselleri Deneme Deseni” yöntemine göre kurulmuştur. Denemeye ait verilerin istatistiki analizi JMP 13.0 istatistik programında Tukey Testi ile $p < 0.05$ önem seviyesinde karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Yaprak Eksplantından Adventif Kök Uyarımı ve Biyokütle Miktarı

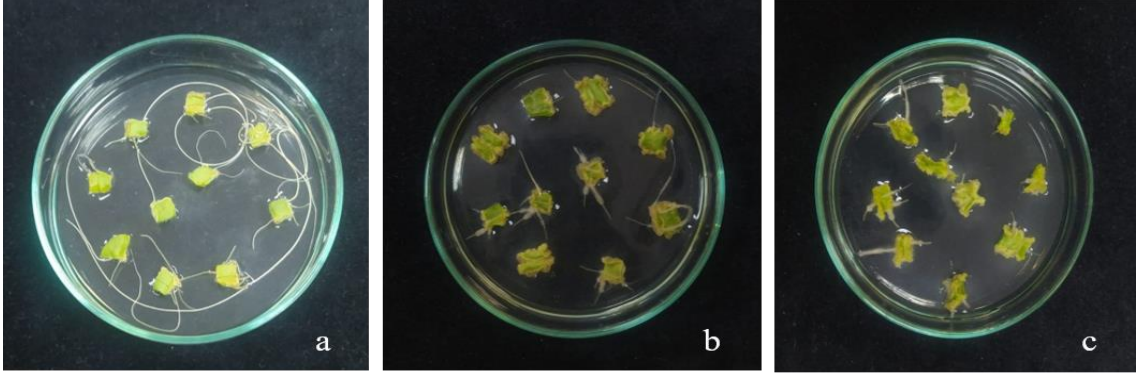
Kök oluşum yüzdesi, kök taze ağırlığı ve kök kuru ağırlığına ait ortalama değerler Çizelge 4.1’de verilmiştir. Farklı tip ve konsantrasyonlardaki oksin kaynaklarının yaprak eksplantının kök oluşum yüzdesi (%) ve kök taze ağırlığı (mg) üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$), kök kuru ağırlığı (mg) üzerine etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4. 1. Farklı konsantrasyonlarda IAA, IBA ve NAA oksinlerinin *E. pallida* yaprak eksplantından adventif kök oluşturma oranları ve kök yaş ağırlığı miktarları

Oksinler	Konsantrasyon (mg/L)	Kök Oluşum Oranı (%)*	Kök Yaş Ağırlığı (mg)*	Kök Kuru Ağırlığı (mg)*
IBA	0.5	25a	11.63a	2.01
	1.0	12b	12.88a	2.35
	2.0	7bc	4.71b	1.05
NAA	0.5	0c	0c	0
	1.0	0c	0c	0
	2.0	0c	0c	0
IAA	0.5	23a	4.53b	1.47
	1.0	7bc	4.00b	0.47
	2.0	13b	0.63c	0.27

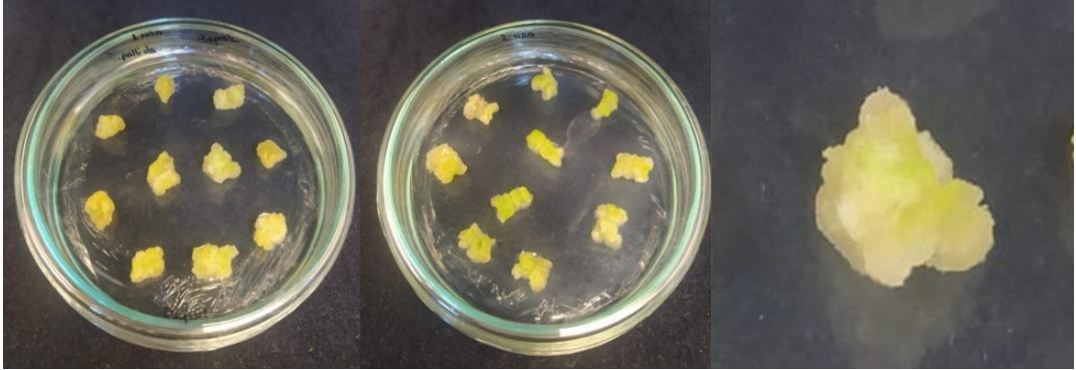
* Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Tukey karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

Farklı oksin türü ve konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınan yaprak eksplantlarında ortalama 10-15 günlük periyottan sonra adventif kök uyarımı gerçekleşmeye başlamıştır. Kök uyarımı için geçen zaman, mevcut bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonlarına göre farklılık göstermiştir. Kök uyarımı, farklı konsantrasyonlarda IAA ve IBA içeren tüm ortamlarda gözlenmiştir. *E. pallida*’da yaprak eksplantından adventif kök uyarımı için en iyi sonuçların 0.5 mg/L IBA veya IAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Oluşan köklerde konsantrasyonlar arasında morfolojik farklılıklar ortaya çıkmıştır. Düşük konsantrasyonlarda IBA ve IAA uygulamasından elde edilen kökler genellikle az tüylü, uzun ve beyazken, yüksek IAA ve IBA konsantrasyonuna sahip ortamların daha yoğun kısa tüylü, kısa ve sarımsı kökler oluşturduğu gözlemlenmiştir.



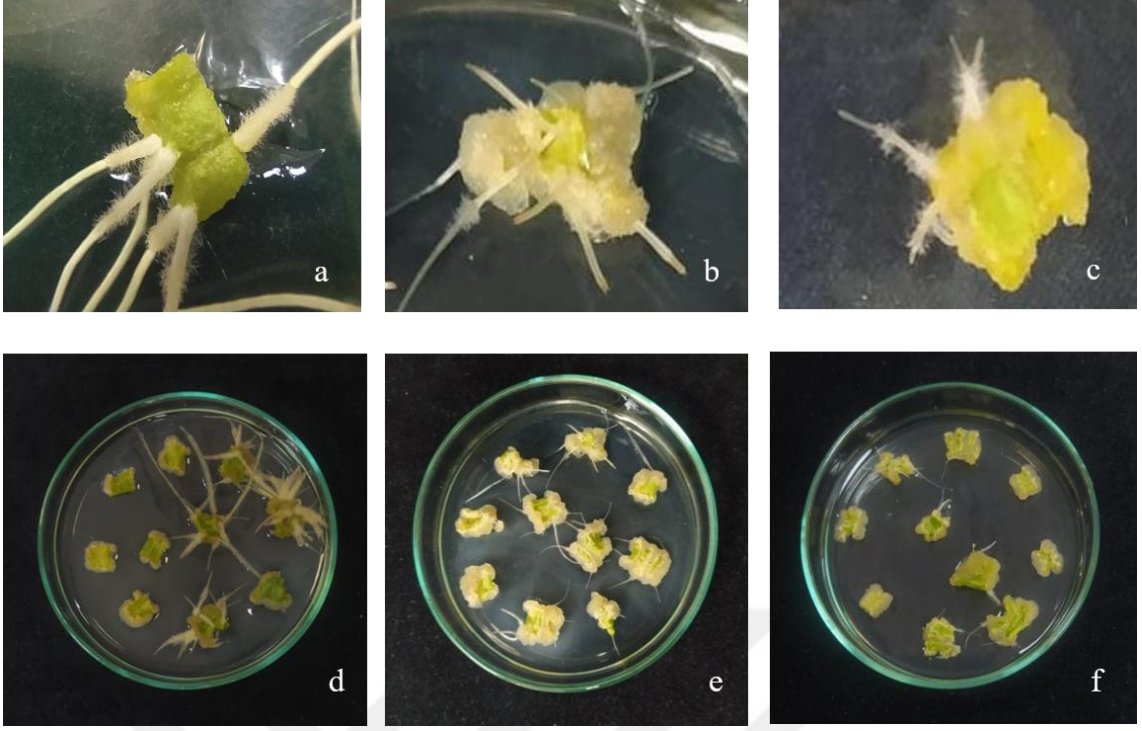
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda IAA'nın yaprak eksplantından adventif kök uyarımı a) 0.5 mg/L IAA, b) 1.0 mg/L IAA, c) 2.0 mg/L IAA

Farklı konsantrasyonlarda NAA içeren ortamlarda kültüre alınan eksplantların hiçbirinde ise kök uyarımı sağlanamamıştır. Çalışmada kullanılan diğer oksin türleri ile karşılaştırıldığında NAA'nın tüm konsantrasyonlarında kallus uyarımının sağlandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda NAA'nın yaprak eksplantından kallus uyarımı

Kök oluşum yüzdesi açısından, düşük IBA veya IAA konsantrasyonları en iyi ortam olarak belirlenmiş, taze kök ağırlığı tüm IAA konsantrasyonlarında IBA'ya göre düşük kalmıştır. 0.5 mg/L IBA ve 1.0 mg/L IBA içeren ortamlarda daha kalın kökler elde edilmiştir. Hem kök oluşum yüzdesi hem de taze kök ağırlığı açısından en iyi oksin türü ve konsantrasyonu 0.5 mg/L IBA olarak belirlenmiştir. Silja ve Satheeshkumar (2015), düşük IAA ve IBA konsantrasyonlarının kombinasyon halinde veya tek başına kullanımının yapraktan adventif kök büyümesi için daha uygun olduğunu gözlemlemiştir. Bu gözlemler sonuçlarımızı doğrulamaktadır.



Şekil 4.3. . Farklı konsantrasyonlarda IBA' nın yaprak eksplantından adventif kök uyarımı a-d) 0.5 mg/L IBA, b-e) 1.0 mg/L IBA e-f) 2.0 mg/L IBA

IBA'nın, tıbbi bitkilerin adventif kök kültürünün uyarılması ve geliştirilmesi için en uygun oksin olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (Rahmat ve Kang, 2019). *Panax ginseng* (Kim ve ark., 2003), *E. angustifolia* (Wu ve ark., 2006), *Podophyllum hexandrum* (Rajesh ve ark., 2012), *Silybum marianum* (Riasat ve ark., 2015) gibi birçok bitki türünde IBA ile ilgili başarılı sonuçlar alındığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, adventif köklerin farklı oksinlere tepkisi bitki türlerine bağlıdır. Örneğin, IAA ile muamele, *Orthosiphon stamineus*'un kök kültürlerinden biyokütle üretimini teşvik etmede NAA'dan daha etkilidir (Ling ve ark., 2009). Buna karşılık, tıbbi bitki *Andrographis panikulata*'nın yaprak eksplantından adventif kök kültürü çalışmasında, NAA'da IAA ve IBA'ya kıyasla daha yüksek biyokütle birikimi elde edilmiştir (Praveen ve ark., 2009). Benzer şekilde *Eurycoma longifolia* tıbbi bitkisinde yaprakтан adventif kök oluşumu için en etkili oksinin NAA (3.0 mg/L) olduğu bildirilmiştir (Hussein ve ark., 2012). Öte yandan, Zolman ve ark. (2000), köklenme tepkisindeki üstün aktivite, kullanılan bitkinin taşınması, alınması, parçalanması veya metabolizmasındaki farklılıklardan da kaynaklanabilir. Ayrıca daha önce eksplantlar tarafından kullanılmış olan sentetik oksinleri, NAA'yı doğal IAA formuna dönüştürmek için daha fazla enerji harcanması, kök oluşumu sırasında hücre büyümesi ve gelişimi için yetersiz enerjiye yol açmaktadır (Krisantini ve ark., 2006). Doğal olarak oluşan

oksinlerin (IAA veya IBA), NAA gibi sentetik oksinlerle karşılaştırıldığında köklerin uyarılması ve uzaması üzerinde farklı etkiler gösterdiği ifade edilmektedir (Biondi ve ark., 1997).

Kullanılan oksin türlerinin yanı sıra, uygulanan oksin konsantrasyonunun da adventif kök uyarımı için önemli bir faktör olduğu, yüksek konsantrasyonlarda (2.0 mg/L) oksin uygulamasının yapraktan adventif kök oluşumunu yavaşlatarak kök biyokütlesini olumsuz yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Benzer durumlar *Plumbago rosea* (Silja ve Satheeshkumar, 2015) ve *Silybum marianum* (Khan ve ark., 2015) tıbbi bitkilerinde yapılan çalışmalarda da görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda yüksek konsantrasyonlarda oksin uygulamasının yapraktan kallus uyarımına sebep olduğu görülmüştür. Rose ve ark. (2006), tarafından bu durum klasik bir oksin tepkisi olarak açıklanmış ve adventif kök uyarımının gerçekleşmediği farklılaşmamış yaprak hücrelerinin kallus uyarımı yapmasından kaynaklandığı şeklinde bildirilmiştir.

4.2. Kök Eksplantından Adventif Kök Uyarımı ve Biyokütle Miktarı

E. pallida bitkisinin kök eksplantından oluşan adventif köklerin farklı tip ve konsantrasyonlarda oksin içeren ortamlarda uyarımı ve büyüme tepkisi değerlendirilmiş, sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Oksinlerin farklı tip ve konsantrasyonlarının kök eksplantında kök oluşum yüzdesi (%), kök taze ağırlığı (mg) ve kök kuru ağırlığı (mg) üzerindeki etkileri istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur. (Çizelge 4.2)

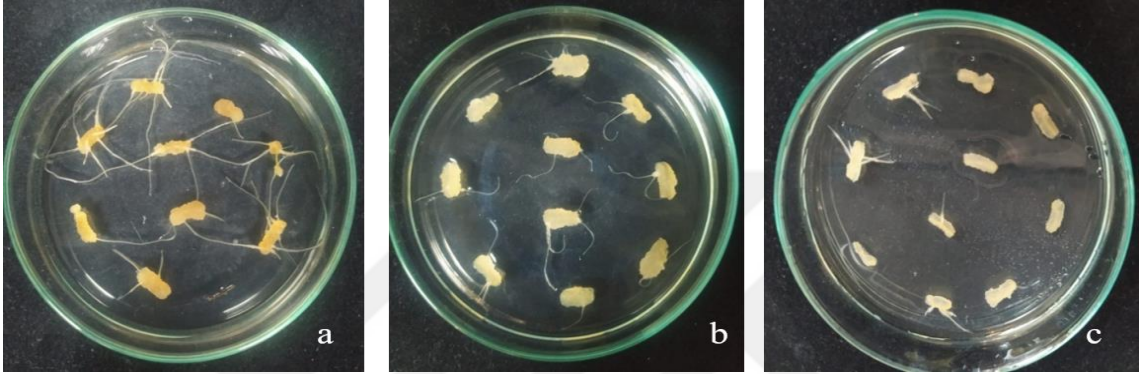
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda IBA ve IAA oksinlerinin *E. pallida* kök eksplantında adventif kök oluşturma oranları ve kök yaş ağırlığı miktarları

Oksinler	Konsantrasyon (mg/L)	Kök Oluşturma Oranı (%)*	Kök Yaş Ağırlığı (mg)*	Kök Kuru Ağırlığı (mg)*
IBA	0.5	57a	1.25bc	0.71a
	1.0	20b	2.44a	0.44ab
	2.0	21b	0.87c	0.16c
IAA	0.5	22b	0.85c	0.18bc
	1.0	19b	1.76b	0.29bc
	2.0	19b	0.89c	0.19bc

*Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Tukey karşılaştırma testine göre %1 düzeyinde farklılık vardır.

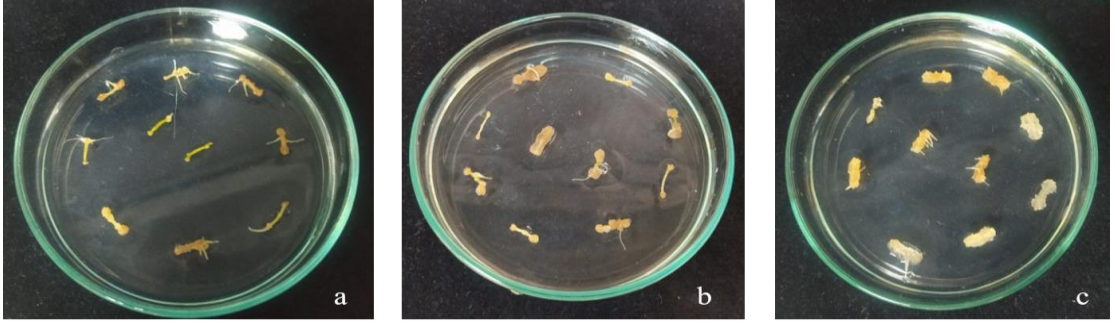
Adventif kökler hem doğrudan kök eksplantlarından hem de kök eksplantlarından oluşan kalluslardan meydana gelmiştir. Özellikle IBA uygulamasının

eksplantlarda yoğun bir kallus uyarımına sebep olduğu gözlemlenmiştir. 15-20 günlük periyottan sonra kök eksplantlarından adventif kök uyarımı başlamıştır. Kök uyarımı IBA ve IAA'nın tüm konsantrasyonlarında gerçekleşirken iki türde de düşük konsantrasyonlarda daha fazla adventif kök uyarımı gözlenmiştir. *E. pallida*'da kök eksplantından adventif kök uyarımı için en iyi sonuçlar 0.5 mg/L IBA kullanılan ortamlardan alınmıştır. Yapraktan adventif kök uyarımında NAA kullanımından kök oluşumu gözlemlenmediği için kökten adventif kök uyarımında NAA kullanılmamıştır.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda IBA'nın kök eksplantından adventif kök uyarımı a) 0.5 mg/L IBA b) 1.0 mg/L IBA ve c) 2.0 mg/L IBA

Farklı tip ve konsantrasyonlarda oksin uygulanmış besin ortamlarında geliştirilen adventif köklerin biyokütlesi, uygulanan oksinin türüne ve konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Adventif kök biyokütlesini arttırmada IBA'nın (2,44 mg) daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. IBA'nın farklı konsantrasyonlarında biyokütle bakımından farklılıklar da gözlenmiş ve 1.0 mg/L IBA içeren ortamlarda maksimum kök biyokütlesine (3 kat daha fazla) ulaşılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda IAA uygulanan ortamlarda ise kök biyokütlesi bakımından fark tespit edilmemiştir. Benzer çalışmalar ekinezyanın *E. purpurea* (Wu ve ark., 2006) ve *E. angustifolia* (Dewir ve Paek, 2007) türlerinde de yapılmış ve kök eksplantından adventif kök uyarımında, yüksek miktarlarda biyokütle verimi için en uygun oksinin IBA olduğu bildirilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda IAA' nın kök eksplantından adventif kök uyarımı a) 0.5 mg/L IAA, b) 1.0 mg/L IAA c) 2.0 mg/L IAA

Oksin tipinin ve konsantrasyonunun adventif kök uyarımı ve kök biyokütlesi üzerine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Araştırmamızda, bu anlamda IBA uygulaması öne çıkmıştır. Yürütülen birçok çalışmada hem süspansiyon hem katı kültürlerde kök eksplantları kullanılarak adventif kök uyarımı ve verimli bir biyokütle için optimum koşullar belirlenirken, IBA kullanımı öne çıkmıştır. Örneğin, *Panax notoginseng* bitkisinde tek başına ya da kombinasyonlar halinde IBA kullanımı kök eksplantından adventif kök uyarımını olumlu yönde etkilerken, 2,4-D uygulamasından yalnızca kallus oluşmuştur (Gao ve ark., 2005). Benzer şekilde, *Allochrysa gypsophiloides* bitkisinde IBA uygulamasının kontrolün 3 katı fazla kök biyokütlesi oluşturarak NAA'dan daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Mursaliyeva ve ark., 2023). Ayrıca *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (Yin ve ark., 2014), *Panax ginseng* (Jeong ve ark., 2009a), *Astragalus membranaceus* (Wu ve ark., 2011) gibi tıbbi bitkilerde de kök eksplantından adventif kök uyarımı için IBA kullanılmıştır. Bu çalışmaların aksine, *Ajuga bracteosa* bitkisinde en yüksek kök oluşum oranı ve biyokütle 2,4-D ve IAA'ya kıyasla (1.2 mg/L) NAA uygulamasından alınmıştır (Saeed ve ark., 2017). Reis ve ark. (2011) *Stevia rebaudiana* bitkisinde kök uyarımı için NAA kullanımının daha uygun olduğunu bildirmişlerdir. Yürütülen önceki çalışmalar, oksinlerin adventif kök uyarımı ve biyokütle üzerindeki etkinliğinin kullanılan türe, eksplant tipine ve yetiştirme koşullarına göre değişiklik gösterdiğini bildirmiştir. Örneğin, *Passiflora pohlii* bitkisi süspansiyon kültürlerinde kök eksplantlarından adventif kök biyokütlesi diğer oksinlerle (IBA ve NAA) kıyaslandığında (2.85 μ M) IAA içeren ortamlarda önemli derecede artış gösterirken, aynı bitkinin katı ortamlarda kültüre alınan boğum arası eksplantlarında en yoğun adventif kök uyarımı (2.7 μ M) NAA içeren ortamlardan tespit edilmiştir (Simão ve ark., 2015). *Boerhaavia diffusa* bitkisinde en yüksek kök oluşum oranı NAA (1.0 mg/L) içeren katı MS besin ortamında, yaprak eksplantları kullanılarak elde edilmiştir.

Aynı koşullar altında tek bir türün çeşitli eksplantları kültürlerde farklı tepkiler verir, bu durum eksplant tiplerinin genetik yapısındaki değişkenliklerle ilişkili olabilir (Tripathi ve Tiwari, 2004; Abbasi ve ark., 2016).

Adventif kök biyokütlesi açısından yaprak eksplantları kök eksplantlarına göre çok daha etkili bulunmuştur. Bu durum hem iyi bir köklenme yüzdesi hem de daha fazla kök yaş ve kuru ağırlığı değerleriyle kanıtlanmıştır. Konsantrasyon fark etmeksizin yaprak eksplantından çok daha fazla adventif kök biyokütlesi gerçekleşmiştir. Benzer şekilde *Orthosiphon stamineus* (Ling ve ark., 2009), *Withania somnifera* (Sivanandhan ve ark., 2012) ve *Ajuga bracteosa* (Saeed ve ark., 2017) tıbbi bitkilerinde yapılan çalışmalarda adventif kök uyarımı ve biyokütle için en iyi eksplant tipinin yaprak olduğu sonucuna ulaşmıştır. Ling ve ark. (2009) bu durumun oksinler tarafından kolayca uyarılabilen yaprak damarlarıyla ilişkili hücrelerin varlığından kaynaklı olabileceği sonucuna varmıştır.



Şekil 4.6. İki farklı eksplanttan kök uyarımı a) *İn vitro* *E. pallida* fideleri b-d) Kök eksplantından adventif kök uyarımı, c-e) Yaprak eksplantından adventif kök uyarımı

4.3. Elde Edilen Adventif Köklerde Kafeik Asit Türevleri Miktarı

Farklı oksin tipi ve konsantrasyonlarının uygulandığı, farklı eskplantlardan uyarılan adventif köklerin kafeik asit türevleri içeriği kültürden yaklaşık 30 gün sonra HPLC cihazı ile belirlenmiştir.

Farklı tip ve konsantrasyonlarda oksin uygulamasının *E. pallida* bitkisinin yaprak eksplantından elde edilen adventif köklerin kaftarik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ekinakozit ve kikorik asit içeriği Çizelge 4.3’de verilmiştir.

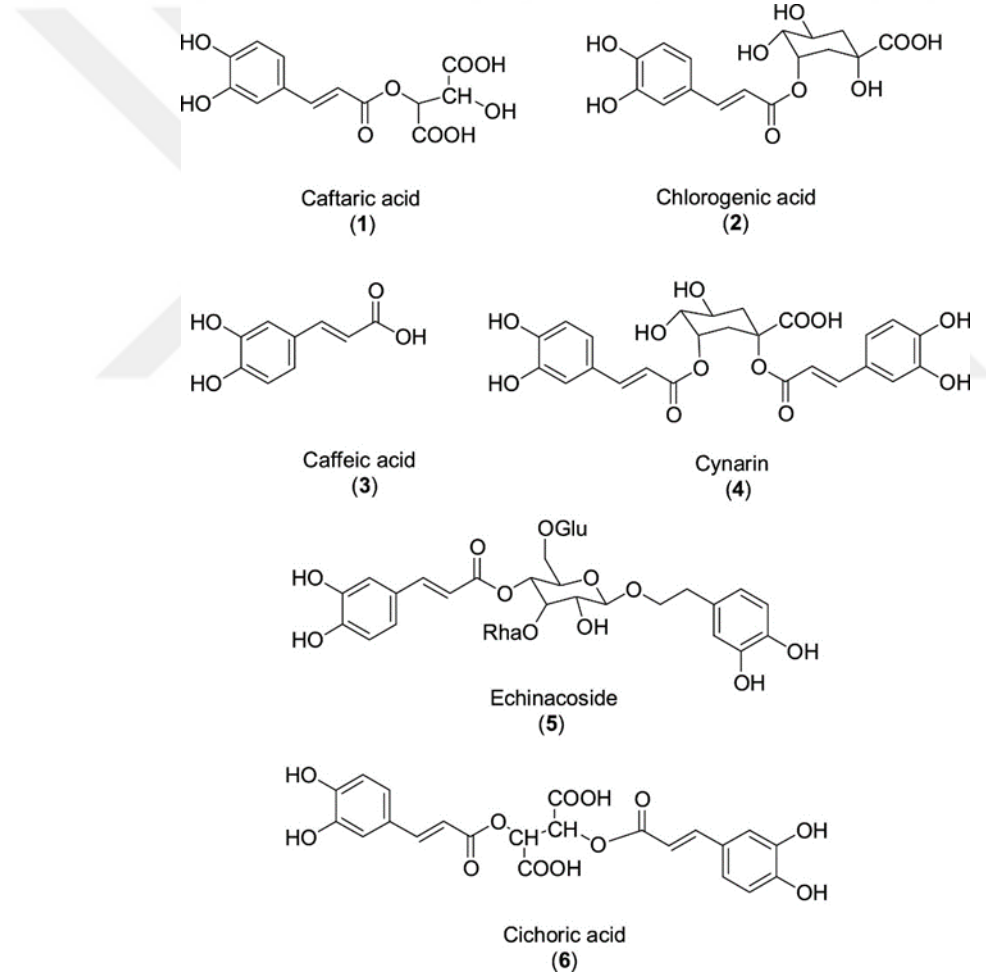
Çizelge 4.3. Farklı oksin tipi konsantrasyonları uygulanan yaprak eskplantlarından elde edilen adventif köklerde kafeik asit türevlerinin miktarları (mg/g)

Oksinler	Konsantrasyon (mg/l)	Kaftarik Asit	Klorojenik Asit	Kafeik Asit	Ekinakozit	Kikorik Asit	Toplam
IBA	0.5	1.76±0.01	1.43±0.00	0.22±0.00	1.84±0.03	1.29±0.03	6.54
	1.0	0.50±0.14	1.30±0.06	0.25±0.20	0.86±0.18	0.64±0.13	3.55
	2.0	0.53±0.14	1.14±0.02	-	1.61±0.08	0.78±0.16	4.06
IAA	0.5	0.86±0.02	0.97±0.09	0.14±0.20	2.38±0.09	0.77±0.04	5.12
	1.0	0.65±0.03	1.20±0.02	0.14±0.01	1.75±0.03	0.82±0.07	4.56
	2.0	0.50±0.10	1.83±0.05	0.29±0.00	2.01±0.07	1.20±0.03	5.38
İn Vitro Kök	-	1.38±0.02	0.72±0.05	0.72±0.10	1.50±0.02	0.84±0.06	5.16

Araştırmamızda her iki oksin türü ve bu oksinlerin farklı konsantrasyonlarında kafeik asit dışındaki tüm bileşikler tespit edilmiştir. Elde edilen kafeik asit türevleri arasında tüm uygulamalarda en yüksek miktarlar ekinakozitte tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (0.5 mg/L) IBA ve IAA uygulamaları adventif köklerde ekinakozit birikimi için daha uygun bulunmuştur. IBA konsantrasyonları arasında en yüksek ekinakozit 1.84 mg/g miktarında 0.5 mg/L IBA uygulamasından elde edilirken, en düşük ekinakozit 0.86 mg/g miktarında 1.0 mg/L IBA konsantrasyonundan elde edilmiştir. Benzer şekilde, IAA konsantrasyonları arasında en yüksek ekinakozit miktarı (2.38 mg/g), 0.5 mg/L IAA içeren ortamlarda kültüre alınan köklerden elde edilirken; en düşük ekinakozit miktarı (1.75 mg/g) ile 1.0 mg/L IAA uygulamasından elde edilmiştir. IBA ile karşılaştırıldığında, ekinakozit miktarı bakımından büyük bir fark olmasa da IAA uygulamasından daha iyi sonuçlar alınmıştır. Toplam kafeik asit türevlerinin (kaftarik asit+ klorojenik asit+ kafeik asit+ ekinakozit+ kikorik asit) miktarı değerlendirildiğinde, en yüksek miktar (6.54 mg/g) 0.5 mg/L IBA uygulamasından elde edilmiştir.

Araştırmamızda, tüm uygulamalarda en yüksek miktarda elde edilen kafeik asit türü ekinakozit olmuştur. Bunun en önemli nedenlerinden biri, ekinakozitin *E. pallida*'nın karakteristik bileşiği olması ve çoğunlukla kök bölgesinde bulunmasıdır. Ayrıca kikorik asit ve kaftarik asit, *E. purpurea*'nın ana bileşikler olup, *E. pallida*'da az miktarda ve çoğunlukla yapraklarında bulunur (Kabganian ve ark., 2003).

Adventif köklere ait kafeik asit türevleri miktarları, *in vitro* koşullarda yetiştirilen steril fide kökleriyle karşılaştırıldığında, daha yüksek çıkmıştır. Özellikle oksin uygulanan ortamlardaki ekinakozit içeriği, 1 mg/l IBA uygulamasının dışındaki tüm uygulamalarda *in vitro* şartlarda yetiştirilen steril fide köklerine göre daha yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.7. Kafeik asit türevlerinin kimyasal yapıları

Araştırmamızda, toplam kafeik asit türevleri miktarı, en fazla 0.5 mg/L IBA içeren ortamlarda oluşan köklerde gerçekleşmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer

şekilde, *E. purpurea* (Wu ve ark., 2007a) ve *E. angustifolia* (Cui ve ark., 2013) türlerinde adventif kök kültürlerinde, kafeik asit türevleri birikiminin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için IBA kullanılmıştır. Oksinlerin kültür ortamına eklenmesi adventif köklerin uyarılması, çoğalması ve biyoaktif bileşiklerin içeriği bakımından çok büyük önem arz etmektedir (Zhang ve ark., 2020). Ancak etkileri türler arasında değişiklik göstermektedir. Örneğin, *Polygonum multiflorum* bitkisinde biyoaktif bileşik birikimi NAA'ya kıyasla IBA içeren ortamlarda daha yüksek çıkmıştır (Ho ve ark., 2020). Sonuçlarımızla benzer şekilde *Panax notoginseng* (Zhao ve ark., 2020), *Allochrysa gypsophiloides* (Mursaliyeva ve ark., 2023) ve *Eurycoma longifolia* (Lulu ve ark., 2015) gibi tıbbi bitkilerde de IBA kullanımı başarılı sonuçlar vermiştir. Bunun tam aksine önemli bir tıbbi bitki olan *Tripterygium wilfordii*'de en yüksek biyoaktif bileşik birikimi 2.0 mg/L NAA içeren ortamlarda gözlemlenmiştir (Zhang ve ark., 2020). Aynı şekilde *Valeriana jatamansi* tıbbi bitkisinde biyoaktif bileşikler IBA ve IAA ile karşılaştırıldığında en fazla NAA (2.0 mg/L) uygulanan adventif köklerden elde edilmiştir (Pandey ve ark., 2021). Bununla birlikte, maksimum biyoaktif bileşik verimini (3.38 mg/g) 2.0 mg/L IBA + 3.2 mg/L NAA kombinasyonlu ortamlarda kültüre alınan adventif köklerden elde eden Yun ve ark. (2022), kombinasyon şeklinde oksin kullanımının tek tür oksin uygulamasına göre kök büyümesi ve sekonder metabolit birikimini daha çok etkilediğini bildirmiştir. Bu durum adventif kök kültürlerinde bitki büyüme düzenleyicilerin seçimi ve konsantrasyonlarının yanı sıra kültür ortamı ve kültür şartlarının da sekonder metabolit içeriğini etkilemesinden kaynaklanmaktadır (Wu ve ark., 2006).

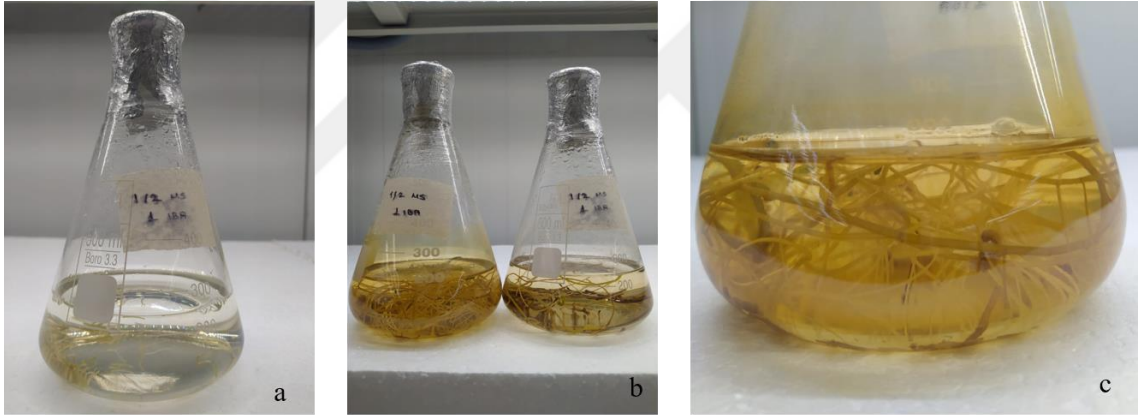
Çalışmamızda, toplam kafeik asit türevleri miktarı, en az (3.55 mg/g) 1.0 mg/L IBA uygulamasından elde edilmiştir. Benzer şekilde, Cui ve ark. (2013), *E. angustifolia* türünde kafeik asit türevlerinin 1.0 mg/L IBA ilaveli MS besin ortamında kültüre alınan köklerde düşük miktarlarda (4.95 mg/g) elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, çalışmamızla paralellik göstermiştir.

Araştırmamızda, kök eksplantından elde edilen adventif köklerin miktarları yeterli olmadığı için kafeik asit türevleri miktarları saptanamamıştır. Ancak *E. purpurea* türünde yapılan bir çalışma esas alınarak (Wu ve ark., 2007b), *E. pallida* türünde sıvı kültürlerde adventif kök büyümesi ve kafeik asit türevleri miktarlarının araştırılması amacıyla, *in vitro*'da yetiştirilen steril fidelerden alınan kök eksplantları 1.0 mg/L IBA ve %5 sakkaroz içeren ½MS sıvı besin ortamında (pH 6.0) karanlık koşullarda, iklim

odasında kültüre alınmıştır. Elde edilen adventif köklere ait biyokütle ve kafeik asit türevleri (Çizelge 4.4) tespit edilmiştir. Başlangıçta, 0.10 g miktarlarında kültüre alınan kökler, 30 günlük kültür süresi sonunda 5.19 g yaş ağırlık ve 1.18 g kuru ağırlık değerlerine ulaşmıştır. Sıvı kültürlerden çok daha fazla biyokütle elde edildiği için kafeik asit türevleri miktarları daha kolay tespit edilmiştir. Katı kültürlerle karşılaştırıldığında toplam kafeik asit türevleri miktarları benzer çıkmıştır. Ancak en yüksek ekinakozit miktarı (3.31 mg/g) sıvı ortamlarda kültüre alınan adventif köklerden elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. *E. pallida* türünde sıvı oramdan elde edilen adventif köklere ait kafeik asit türevleri miktarı (mg/g)

Oksin	Kaftarik Asit	Klorojenik Asit	Kafeik Asit	Ekinakozit	Kikorik Asit	Toplam
1.0 mg/L IBA	0.33±0.02	1.17±0.03	0.15±0.00	3.31±0.04	0.66±0.02	5.62



Şekil 4.8. Sıvı ortamlarda kültüre alınan *E. pallida* kök eksplantlarından adventif kök uyarımı, a) başlangıçta kültüre alınan kök eksplantlarının görünümü, b-c) adventif kök uyarımı

Bu çalışma, kök eksplantından adventif kök uyarımında sıvı ortamların biyokütle anlamında daha uygun sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bu alanda yapılacak bundan sonraki çalışmalar genişletilerek devam edilebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, *E. pallida* türünde *in vitro* şartlarda adventif kök kültürü tekniği kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda çeşitli büyüme düzenleyicileri uygulanan iki farklı eksplant türünün bu uygulamalara tepkisi belirlenmiştir. Ayrıca oluşan adventif köklerden kafeik asit türevleri miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirilmiş ve sonuçlar özetlenmiştir.

Tohumların yüzey sterilizasyonu, %96'lık etanol (a/h) çözeltisinde 2 dakika ve 2-3 damla Tween-20 ilave edilmiş % 10'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dakika bekletildikten sonra 3 kere steril su ile durulama şeklinde yapılmıştır. Sterilizasyon bu şekilde yapıldığında kontaminasyonla karşılaşılmaştır. *E. pallida* tohumları *in vitro* şartlarda başarılı bir şekilde çimlendirilmiş ve fideler sağlıklı bir şekilde büyümüştür. Eksplantlar steril fidelerden alınmıştır.

Kök oluşum oranı, toplam biyokütle ve kafeik asit türevleri, kültüre alınan eksplant, kullanılan oksin ve bu oksinin farklı konsantrasyonlarından farklı şekilde etkilenmiştir.

Her iki eksplantta da kök uyarımı gerçekleşmiş ancak yaprak eksplantlarında daha sağlıklı ve uzun kökler olmuştur. Buna bağlı olarak toplam biyokütle yaprak eksplantlarından uyarılan adventif köklerde daha yüksek olmuştur. Kafeik asit türevleri miktarları yalnızca yaprak eksplantından uyarılan köklerde tespit edilebilmiştir. Kök eksplantından elde edilen kökler analiz için yeterli miktarları sağlayamamıştır.

Elde edilen sonuçlara göre kök oluşum oranı ve toplam biyokütle kullanılan oksin türüne göre değişiklik göstermiştir. Yaprak eksplantında kök oluşum oranı ve toplam biyokütle için en iyi oksinler IBA ve IAA seçilmiştir. NAA içeren ortamlarda kök uyarımı gerçekleşmemiştir. Kök eksplantında ise IBA daha iyi sonuçlar vermiştir. Oksin konsantrasyonları da kök oluşumu ve toplam biyokütleyi etkileyen faktörlerden birisi olmuştur. Düşük oksin konsantrasyonları (0.5 mg/L) hem yaprak eksplantları için hem de kök eksplantları için en uygun olarak belirlenmiştir.

Kafeik ait türevleri birikimi hem IBA hem de IAA içeren ortamlarda kültüre alınan köklerden elde edilmiştir. Toplam kafeik asit türevleri en fazla (6.54 mg/g) 0.5 mg/L IBA uygulamasından elde edilirken, en yüksek ekinakozit miktarı (2.38 mg/g) 0.5 mg/L IAA uygulamasından elde edilmiştir. Kullanılan oksin türünün kafeik asit

türevleri birikimine çok büyük etkisi olmasa da düşük konsantrasyonlar daha iyi sonuç vermiştir.

Çalışmamızda *E. pallida* türünde adventif kök kültüründe özellikle biyokütle için sıvı ortam kullanılmasının daha uygun olduğu gözlemlenmiştir.

5.2 Öneriler

Dünya üzerinde yaygın olarak kullanılan, tıbbi ve ekonomik öneme sahip ekinezya bitkisinde daha önce yürütülen çalışmalarda etkili bir mikroçoğaltım sistemi kurulmuş ve çeşitli rejenerasyon protokolleri oluşturulmuştur. Günümüzde ekonomik öneme sahip ekinezya türlerinde *in vitro* sekonder metabolit üretimi ve elde edilen metabolitleri arttırmaya yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Özellikle istenilen standart ve kalitede sekonder metabolit üretimi için adventif kök kültürleri ümit vadeden bir tekniktir. Bu bağlamda çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar *E. pallida* türüne ait önemli kimyasal bileşiklerin temini ve bunların büyük ölçekli üretimi için kullanılabilecek faydalı bir protokol niteliği taşımaktadır. Bununla birlikte büyük ölçekli üretim sürecinin endüstriyel üretime uygulanmadan önce hala optimize edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbasi, B. H., Ali, H., Yucesan, B., Saeed, S., Rehman, K. ve Khan, M. A., 2016, Evaluation of biochemical markers during somatic embryogenesis in *Silybum marianum* L., 3 *Biotech*, 6 (1), 71.
- An, D., Wu, C.-H., Wang, M., Wang, M., Chang, G.-N., Chang, X.-J. ve Lian, M.-L., 2022, Methyl jasmonate elicits enhancement of bioactive compound synthesis in adventitious root co-culture of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58 (1), 181-187.
- Baque, M. A., Moh, S.-H., Lee, E.-J., Zhong, J.-J. ve Paek, K.-Y., 2012, Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor, *Biotechnology Advances*, 30 (6), 1255-1267.
- Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S. ve 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 (8), 929-954.
- Barrett, B., 2003, Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review, *Phytomedicine*, 10 (1), 66-86.
- Bauer, R., 1991, *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs, *Economic and Medical Plant Research*, 253-321.
- Bauer, R., 1999, Chemistry, analysis and immunological investigations of *Echinacea* phytopharmaceuticals, *Immunomodulatory agents from plants*, 41-88.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansi, S., Yılmaz, G., Kızıl, O. A. S. ve Telci, İ., 2010, Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları, *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, 11, 15.
- Biondi, S., Lenzi, C., Baraldi, R. ve Bagni, N., 1997, Hormonal effects on growth and morphology of normal and hairy roots of *Hyoscyamus muticus*, *Journal of Plant Growth Regulation*, 16, 159-167.
- Bruneton, J., 1999, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, 2nd ED Paris, *Lavoisier*, 173-175.
- Cui, H.-Y., Abdullahil Baque, M., Lee, E.-J. ve 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, 297-308.
- Cui, X.-H., Chakrabarty, D., Lee, E.-J. ve Paek, K.-Y., 2010, Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor, *Bioresource technology*, 101 (12), 4708-4716.
- Çelik, S. A., 2016, *Ekinezya türlerinde (Echinacea spp.) bazı sekonder metabolitlerin miktarlarının ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Çelik, S. A. ve Yüksel, K., 2019, *Ekinezya Türlerinde Uçucu Yağ Verim ve Bileşenlerinin Belirlenmesi*, *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 2 (2), 7-14.
- Dewir, Y. H. ve Paek, K. Y., 2007, Optimization of the Culture Conditions for the Biomass and Phenolics production from Adventitious Roots of *Echinacea angustifolia*.
- Erkoyuncu, M. ve Yorgancılar, M., 2015, Bitki doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi, *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 2 (1), 66-76.
- Erkoyuncu, M. T., 2019, *Ekinezya türlerinin (Echinacea pallida Nutt (Nutt), Echinacea purpurea (L.) Moench) doku kültürü teknikleri ile çoğaltılması ve in vitro*

- koşullarda sekonder metabolit içeriğinin araştırılması, Doktora tezi *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Facino, R. M., Carini, M., Aldini, G., Saibene, L., Pietta, P. ve Mauri, P., 1995, Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of Echinacea extracts in the prevention of skin photodamage, *Planta medica*, 61 (06), 510-514.
- Gao, X., Zhu, C., Jia, W., Gao, W., Qiu, M., Zhang, Y. ve Xiao, P., 2005, Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of *Panax notoginseng*, *Biotechnology Letters*, 27, 1771-1775.
- Gao, Y., Wu, C., Piao, X., Han, L., Gao, R. ve Lian, M., 2018, Optimization of culture medium components and culture period for production of adventitious roots of *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135, 299-307.
- Gaosheng, H. ve Jingming, J., 2012, Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants, *Recent advances in plant in vitro culture*, 197-210.
- Gruenwald, J., Brendler, T. ve Jaenicke, C., 1998, Bitkisel İlaçlar için PDR. 1. baskı Montvale, NJ: Tıbbi Ekonomi Şirketi, Inc.
- Ho, T.-T., Le, K.-C., Kim, S.-W. ve Park, S.-Y., 2020, Culture condition optimization and FT-IR analysis of *Polygonum multiflorum* Thunb. adventitious root cultures grown in an air-lift bioreactor system, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144 (2), 371-381.
- Hussein, S., Ling, A. P. K., Ng, T. H., Ibrahim, R. ve Paek, K. Y., 2012, Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant, *Eurycoma longifolia*, *Romanian Biotechnological Letters*, 17 (1), 7026-7035.
- Jamshidi, M., Barzegar, M. ve Sahari, M., 2014, Effect of gamma and microwave irradiation on antioxidant and antimicrobial activities of *Cinnamomum zeylanicum* and *Echinacea purpurea*, *International Food Research Journal*, 21 (4).
- Jeong, C., Murthy, H., Hahn, E., Lee, H. ve Paek, K., 2009a, Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer), *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 219-222.
- Jeong, J.-A., Wu, C.-H., Murthy, H. N., Hahn, E.-J. ve Paek, K.-Y., 2009b, Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*, *Biotechnol Bioprocess Eng*, 14 (1), 91-98.
- Kabganian, R., Carrier, D., Rose, P., Abrams, S. ve Sokhansanj, S., 2003, Localization of alkamides, echinacoside and cynarin with *Echinacea angustifolia*, *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 10 (2), 73-81.
- Keller, H. W., 2014, The genus *Echinacea* (Asteraceae) floral, stem, and petiole morphology, *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 8 (1), 87-126.
- Khan, M. A., Abbasi, B. H., Shah, N. A., Yücesan, B. ve Ali, H., 2015, Analysis of metabolic variations throughout growth and development of adventitious roots in *Silybum marianum* L.(Milk thistle), a medicinal plant, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123, 501-510.
- Khanam, M. N., Anis, M., Javed, S. B., Mottaghipisheh, J. ve Csupor, D., 2022, Adventitious root culture—an alternative strategy for secondary metabolite production: a review, *Agronomy*, 12 (5), 1178.

- Kim, Y.-S., Hahn, E.-J., Yeung, E. C. ve Paek, K.-Y., 2003, Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 245-249.
- Kim, Y.-S., Yeung, E. C., Hahn, E.-J. ve Paek, K.-Y., 2007, Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer, *Biotechnology Letters*, 29, 1789-1792.
- Kindscher, K., 2016, The uses of *Echinacea angustifolia* and other *Echinacea* Species by Native Americans, *Echinacea: herbal medicine with a wild history*, 9-20.
- Krisantini, S., Johnston, M., Williams, R. R. ve Beveridge, C., 2006, Adventitious root formation in *Grevillea* (Proteaceae), an Australian native species, *Scientia Horticulturae*, 107 (2), 171-175.
- Kurkin, V., Akushskaya, A., Avdeeva, E., Velmyaikina, E., Daeva, E. ve Kadentsev, V., 2011, Flavonoids from *Echinacea purpurea*, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37, 905-906.
- Li, J., Yu, H., Yang, C., Ma, T. ve Dai, Y., 2022, Therapeutic potential and molecular mechanisms of echinacoside in neurodegenerative diseases, *Frontiers in Pharmacology*, 13, 11.
- Li, T. S., 1998, *Echinacea*: Cultivation and medicinal value, *HortTechnology*, 8 (2), 122-129.
- Lin, S.-D., Sung, J.-M. ve 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.
- Ling, A. P. K., Chin, M. F. ve Hussein, S., 2009, Adventitious root production of *Centella asiatica* in response to plant growth regulators and sucrose concentration, *Medicinal Aromatic Plant Sci Biotechnol*, 3 (1), 36-41.
- Liu, J., Yang, L., Dong, Y., Zhang, B. ve Ma, X., 2018, Echinacoside, an inestimable natural product in treatment of neurological and other disorders, *Molecules*, 23 (5), 1213.
- Lulu, T., Park, S. Y., Ibrahim, R. ve Paek, K. Y., 2015, Production of biomass and bioactive compounds from adventitious roots by optimization of culturing conditions of *Eurycoma longifolia* in balloon-type bubble bioreactor system, *J Biosci Bioeng*, 119 (6), 712-717.
- Mazza, G. ve Cottrell, T., 1999, Volatile components of roots, stems, leaves, and flowers of *Echinacea* species, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (8), 3081-3085.
- McGregor, R. L., 1968, The taxonomy of the genus *Echinacea* (Compositae), *Univ. Kansas Sci. Bull.*, 48, 113-142.
- McKeown, K. A., 1999, A review of the taxonomy of the genus *Echinacea*, *Perspectives on new crops and new uses*, 482, 489.
- Mistrikova, I. ve Vaverkova, S., 2006, *Echinacea*—chemical composition, immunostimulatory activities and uses, *Thaiszia J Bot*, 16, 11-26.
- Mistríková, I. ve Vaverková, Š., 2007, Morphology and anatomy of *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* and *Parthenium integrifolium*, *Biologia*, 62 (1), 2-5.
- Murashige, T. ve Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15 (3), 473-497.

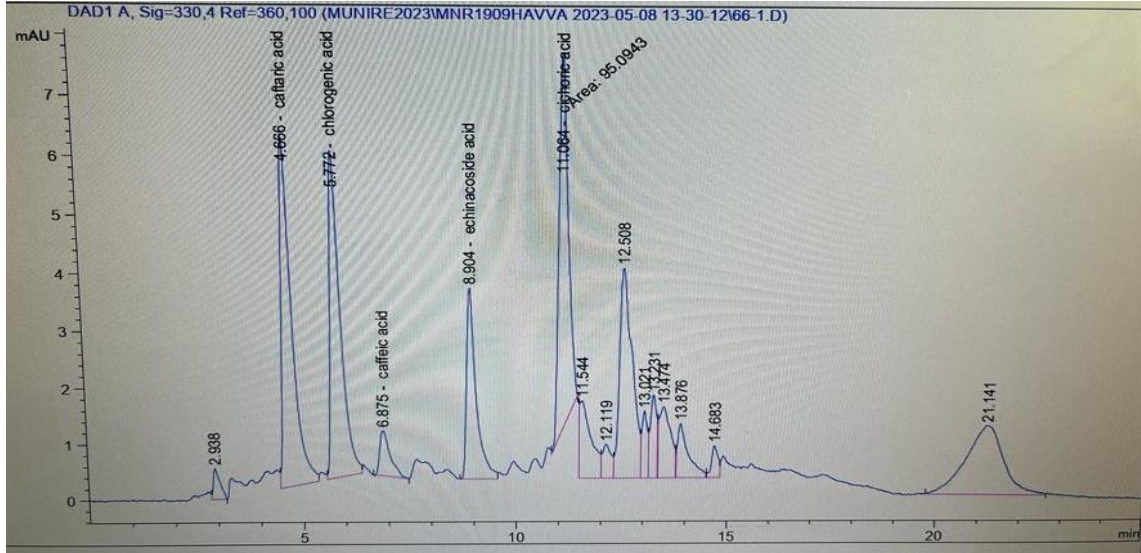
- Mursaliyeva, V., Algazy, A., Satybaldiyeva, D. ve Mukhanov, T., 2023, Obtaining of adventitious roots culture of *A llochrusa gypsophiloides*: saponins-bearing endemic rare species, *Plant biotechnology reports*, 1-5.
- Murthy, H. N., Dandin, V. S. ve Paek, K.-Y., 2016, Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures, *Phytochemistry reviews*, 15, 129-145.
- Özhatay, N. ve Atay, S., 1997, Kekik in Trade in Turkey, *Proceeding of the XI World Forestry Congress*, 3, 234-237.
- Paek, K.-Y., Murthy, H. N. ve Hahn, E.-J., 2009, Establishment of adventitious root cultures of *Echinacea purpurea* for the production of caffeic acid derivatives, *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*, 3-16.
- Pandey, S., Sundararajan, S., Ramalingam, S. ve Pant, B., 2021, Elicitation and plant growth hormone-mediated adventitious root cultures for enhanced valepotriates accumulation in commercially important medicinal plant *Valeriana jatamansi* Jones, *Acta Physiologiae Plantarum*, 44 (1).
- Pietta, P., Mauri, P. ve Bauer, R., 1998, MEKC analysis of different *Echinacea* species, *Planta medica*, 64 (07), 649-652.
- Praveen, N., Manohar, S., Naik, P., Nayeem, A., Jeong, J. ve Murthy, H., 2009, Production of andrographolide from adventitious root cultures of *Andrographis paniculata*, *Current Science*, 694-697.
- Rahmat, E. ve Kang, Y., 2019, Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: a review, *Journal of Plant Biotechnology*, 46 (3), 143-157.
- Rajesh, M., Jeyaraj, M., Sivanandhan, G., Subramanyam, K., Dev, G. ve Ganapathi, A., 2012, Adventitious root culture in *Podophyllum hexandrum* Royle (syn. *P. emodi* Wall. ex Hook. f. & Thomas)-An important medicinal plant, *J Biotechnol Biomater*, 2 (6).
- Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito, T. P. C., de Souto, E. R., de Souza, L. M., Iacomini, M., de Oliveira, A. J. B. ve Gonçalves, R. A. C., 2011, Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106, 329-335.
- Riasat, R., Riasat, Z., Abbasi, B. H., Liu, C. ve Khan, M., 2015, *Silybum marianum*: adventitious roots induction along with free radical scavenging activity, *J Plant Biol Res*, 4 (1), 12-21.
- Rose, R. J., Wang, X.-D., Nolan, K. E. ve Rolfe, B. G., 2006, Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene, *Journal of Experimental Botany*, 57 (10), 2227-2235.
- Saeed, S., Ali, H., Khan, T., Kayani, W. ve Khan, M. A., 2017, Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth., a high valued endangered medicinal plant, *Physiol Mol Biol Plants*, 23 (1), 229-237.
- Saxena, P., Ahlawat, S., Ali, A., Khan, S. ve Abdin, M. Z., 2017, Gene expression analysis of the withanolide biosynthetic pathway in hairy root cultures of *Withania somnifera* elicited with methyl jasmonate and the fungus *Piriformospora indica*, *Symbiosis*, 71, 143-154.
- Sharifzadeh Naeini, M., Naghavi, M. R., Bihamta, M. R., Sabokdast, M. ve Salehi, M., 2021, Production of some benzyloquinoline alkaloids in *Papaver armeniacum*

- L. hairy root cultures elicited with salicylic acid and methyl jasmonate, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57, 261-271.
- Sharma, S., Anderson, M., Schoop, S. ve Hudson, J., 2010, Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized Echinacea extract (Echinaforce®): dual actions against respiratory bacteria, *Phytomedicine*, 17 (8-9), 563-568.
- Silja, P. ve Satheeshkumar, K., 2015, Establishment of adventitious root cultures from leaf explants of *Plumbago rosea* and enhanced plumbagin production through elicitation, *Industrial Crops and Products*, 76, 479-486.
- Simão, M. J., Fonseca, E., Garcia, R., Mansur, E. ve Pacheco, G., 2015, Effects of auxins and different culture systems on the adventitious root development of *Passiflora pohlii* Mast. and their ability to produce antioxidant compounds, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124 (2), 419-430.
- Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T. S., Manickavasagam, M., Selvaraj, N. ve Ganapathi, A., 2012, Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal, *Industrial Crops and Products*, 37 (1), 124-129.
- Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., McKhann, H., Garcion, C., Vaucheret, H. ve Sandberg, G., 2005, Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1, *The Plant Cell*, 17 (5), 1343-1359.
- Speroni, E., Govoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C. ve Guerra, M., 2002, Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. root extract, *Journal of ethnopharmacology*, 79 (2), 265-272.
- Tripathi, M. K. ve Tiwari, S., 2004, Differentiation abilities of callus induced from diverse explants of soybean (*Glycine max* L. Merrill.), *SOYBEAN RESEARCH*, 1.
- Vanisree, M., Lee, C.-Y., Lo, S.-F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y. ve Tsay, H.-S., 2004, Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures, *Bot. Bull. Acad. Sin*, 45 (1), 1-22.
- Wu, C.-H., Dewir, Y. H., Hahn, E.-J. ve 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. ve Paek, K.-Y., 2007a, Improved production of caffeic acid derivatives in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by medium replenishment strategy, *Archives of Pharmacal Research*, 30, 945-949.
- Wu, C.-H., Murthy, H. N., Hahn, E.-J. ve Paek, K.-Y., 2007b, Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid, *Biotechnology Letters*, 29, 1179-1182.
- Wu, C.-H., Tewari, R. K., Hahn, E.-J. ve Paek, K.-Y., 2007c, 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, C., An, D., Sun, L., Wang, M., Chang, G., Zhao, C. ve Lian, M., 2017, A novel co-culture system of adventitious roots of *Echinacea* species in bioreactors for high production of bioactive compounds, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130, 301-311.
- Wu, C., Tang, J., Jin, Z., Wang, M., Liu, Z., Huang, T. ve Lian, M., 2018, Optimizing co-culture conditions of adventitious roots of *Echinacea pallida* and *Echinacea purpurea* in air-lift bioreactor systems, *Biochemical engineering journal*, 132, 206-216.

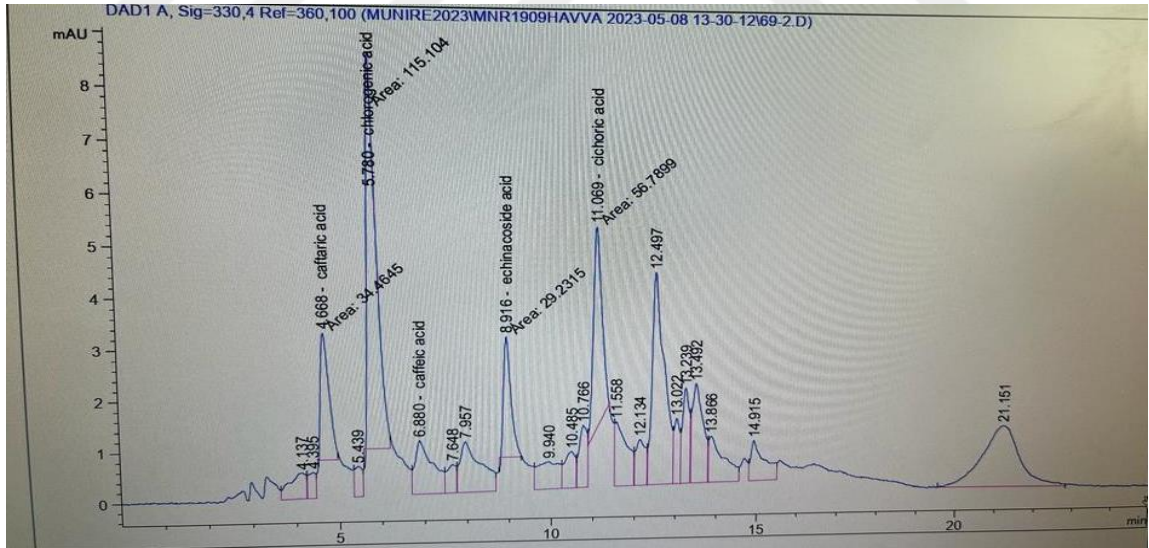
- Wu, C. H., Dewir, Y. H., Hahn, E. J. ve Paek, K. Y., 2007d, Optimization of the culture conditions for the biomass and phenolics production from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*, *Proceedings of the International Symposium on Plant Biotechnology: From Bench to Commercialization, IHC 2006*, 187-193.
- Wu, S. Q., Lian, M. L., Gao, R., Park, S. Y. ve Piao, X. C., 2011, Bioreactor application on adventitious root culture of *Astragalus membranaceus*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47, 719-724.
- Yin, S., Zhang, Y., Gao, W., Wang, J., Man, S. ve Liu, H., 2014, Effects of nitrogen source and phosphate concentration on biomass and metabolites accumulation in adventitious root culture of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 915-921.
- Yu, K.-W., Gao, W.-Y., Son, S.-H. ve Paek, K.-Y., 2000, Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer), *In vitro cellular & developmental biology. Plant*, 424-428.
- Yu, K.-W., Gao, W. Y., Hahn, E.-J. ve Paek, K.-Y., 2001, Effects of macro elements and nitrogen source on adventitious root growth and ginsenoside production in ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer), *Journal of Plant Biology*, 44, 179-184.
- Yun, C., Zhao, Z., Gu, L., Zhang, Z., Wang, S., Shi, Y., Miao, N., Ri, I., Wang, W. ve Wang, H., 2022, In vitro production of atractylon and beta-eudesmol from *Atractylodes chinensis* by adventitious root culture, *Appl Microbiol Biotechnol*, 106 (21), 7027-7037.
- Zhang, B., Chen, L., Huo, Y., Zhang, J., Zhu, C., Zhang, X. ve Ma, Z., 2020, Establishment of adventitious root cultures from leaf explants of *Tripterygium wilfordii* (thunder god vine) for the production of celastrol, *Industrial Crops and Products*, 155.
- Zhao, Y., Guo, W.-H., Sun, X.-Y., Li, K.-H., Liu, K.-J., Wang, J., Wang, Y., Tan, X. ve You, X.-L., 2020, A culture system for the stable and high-efficiency proliferation of adventitious roots of *Panax notoginseng* and ginsenoside accumulation, *Industrial Crops and Products*, 157.
- Zolman, B. K., Yoder, A. ve Bartel, B., 2000, Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes, *Genetics*, 156 (3), 1323-1337.

EKLER

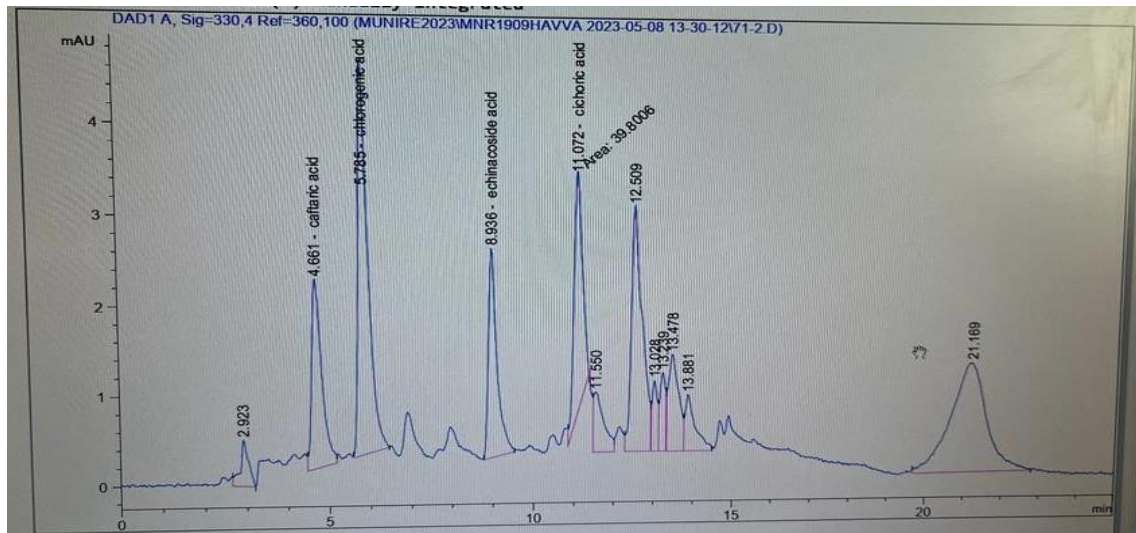
EK-1 *Echinecea pallida* Nutt. türünün yaprak eksplantından farklı tip ve konsantrasyonlarda oksin uygulamasından elde edilen adventif köklere ait kromatogramlar



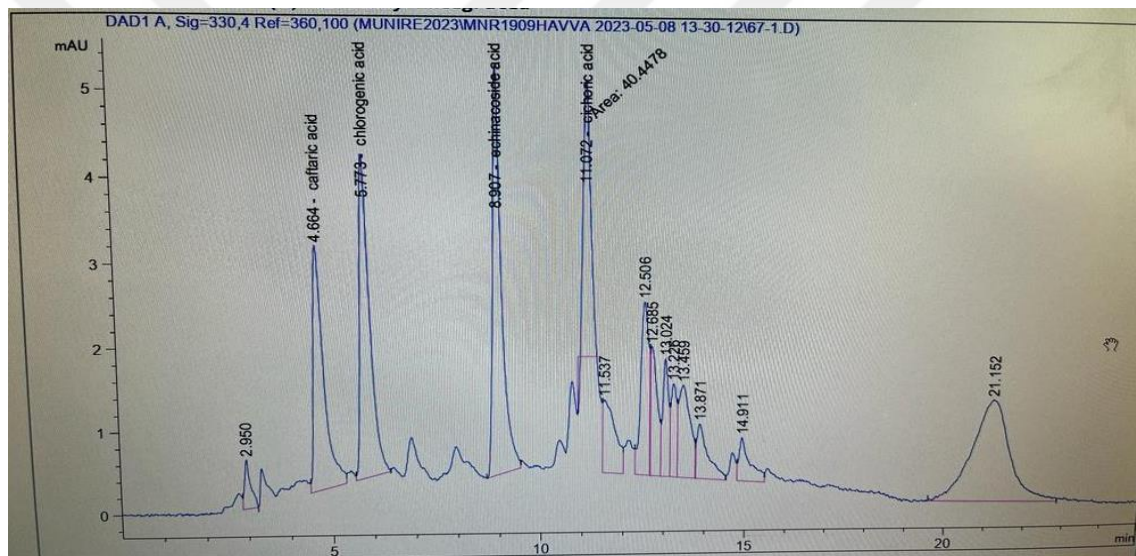
Şekil 1. 0.5 mg/L IBA



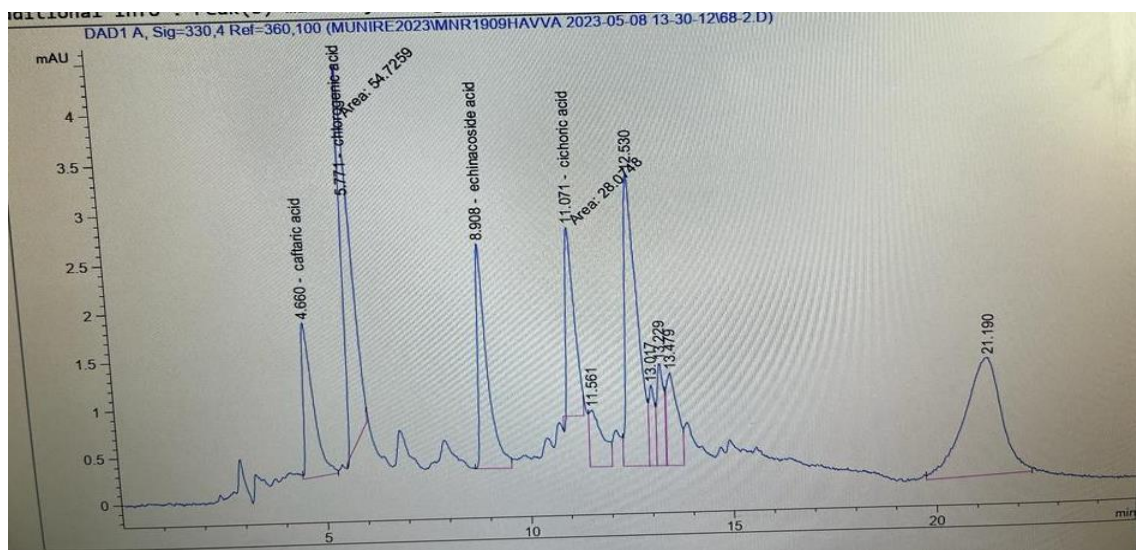
Şekil 2. 1.0 mg/L IBA



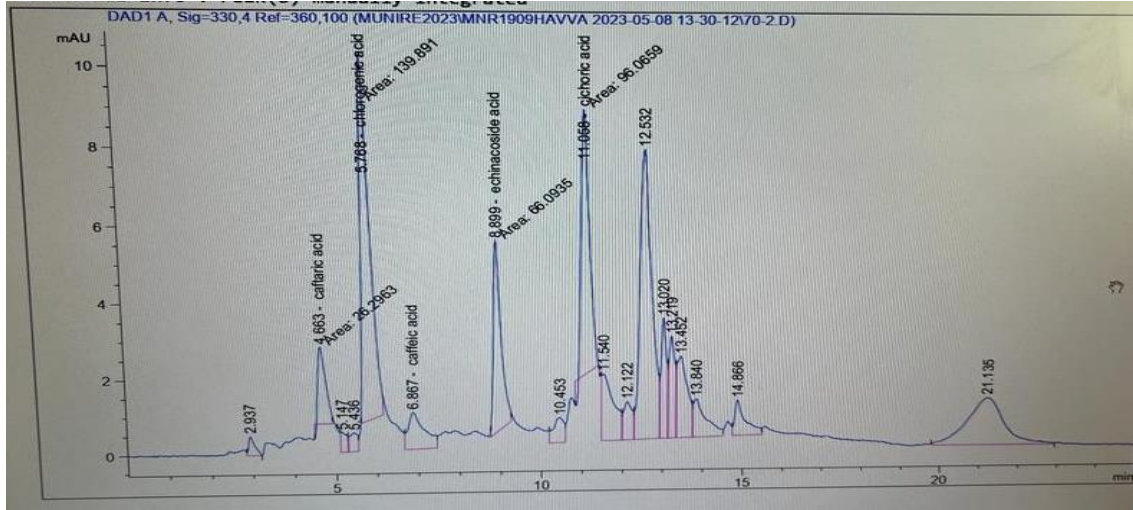
Şekil 3. 2.0 mg/L IBA



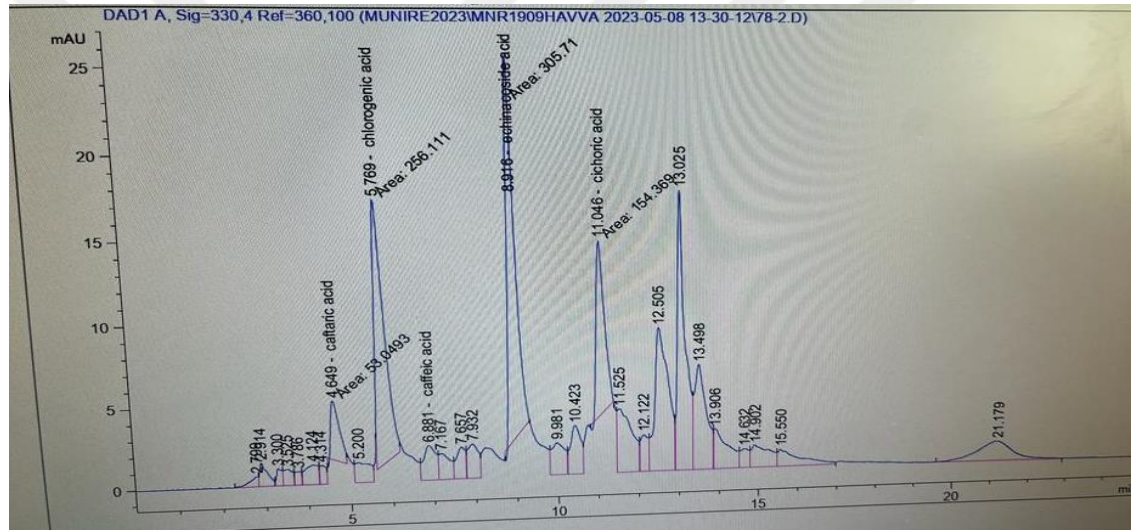
Şekil 4. 0.5 mg/L IAA



Şekil 5. 1.0 mg/L IAA



Şekil 6. 2.0 mg/L IAA



Şekil 7. Sıvı ortamlarda kültüre alınan *Echinecea pallida* Nutt. türünün kök eksplantından elde edilen adventif köklere ait kromatogram

EK-2 Varyans analiz tabloları

Çizelge 1. *E. pallida* kök eksplantından adventif kök oluşum yüzdesi varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Büyüme Düzenleyicileri	5	3326.0694	665.214	19.5412**
Hata	12	408.5000	34.042	
Genel	17	3734.5694		

ns: önemsiz (not significant) *: önemli %5 seviyesinde **: önemli %1 seviyesinde

Çizelge 2. *E. pallida* kök eksplantı adventif kök yaş ağırlığı varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Büyüme Düzenleyicileri	5	6.1644155	1.23288	13.1619**
Hata	12	1.1240839	0.09367	
Genel	17	7.2884995		

ns: önemsiz (not significant) *: önemli %5 seviyesinde **: önemli %1 seviyesinde

Çizelge 3. *E. pallida* kök eksplantı adventif kök kuru ağırlığı varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	SD	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Büyüme Düzenleyicileri	5	0.67723352	0.135447	13.9554**
Hata	12	0.11646831	0.009706	
Genel	17	0.79370184		

ns: önemsiz (not significant) *: önemli %5 seviyesinde **: önemli %1 seviyesinde

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Havva ÇAĞLAR
Uyruğu : T.C.

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Selçuklu Lisesi, Ahlat, Bitlis	2015
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi	2019
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	-
Doktora	:	

