

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

BİYOTİK ELİSİTÖR UYGULAMALARININ *Isatis tinctoria* L.
KÖK KÜLTÜRLERİNDE KÖK BÜYÜMESİ VE ALKALOİD
ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Alper CESSUR

Danışman
Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

ISPARTA - 2022



© 2022 [Alper CESSUR]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Çivit Otunun Tarihçesi ve Yayılım Alanları	4
2.2. Çivit Otu Bitkisinin Botanik Özellikleri	6
2.3. Çivit Otu Bitkisinde Bulunan Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları	7
2.4. Biyotik Elisitörlerin Sekonder Metabolit Üretiminde Kullanımı	13
2.5. <i>Isatis</i> Türlerinde Sekonder Metabolit Verimini Artırmak Amacıyla Yapılan Çalışmalar	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Tohumların <i>in vitro</i> koşullarda çimlendirilmesi	23
3.2.2. Köklerin sıvı besin ortamlarında çoğaltılması	25
3.2.3. Köklere biyotik elisitör uygulamalarının yapılması	25
3.2.4. Köklerde yapılan incelemeler	26
3.2.4.1. Yaş kök ağırlığının belirlenmesi	26
3.2.4.2. Kök büyüme indeksinin belirlenmesi	26
3.2.4.3. Kuru kök ağırlığının belirlenmesi	27
3.2.5. Çivit otu köklerinde ekstraksiyon işleminin yapılması	27
3.2.6. Köklerde indigotin ve indirubin miktarlarının HPLC ile belirlenmesi	27
3.2.7. İstatistik analizlerin yapılması	28
4. BULGULAR	29
4.1. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının Yaş Kök Ağırlığı Üzerine Etkileri	29
4.2. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının Kök Büyüme İndeksi (BI) Üzerine Etkileri	31
4.3. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının Kuru Kök Ağırlığı (KKA) Üzerine Etkileri	33
4.4. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının İndigotin Birikimi Üzerine Etkileri	35
4.5. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının İndirubin Birikimi Üzerine Etkileri	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	63

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOTİK ELİSİTÖR UYGULAMALARININ *Isatis tinctoria* L. KÖK KÜLTÜRLERİNDE KÖK BÜYÜMESİ VE ALKALOİD ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Alper CESSUR

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

Bu araştırma, *in vitro* koşullarda *Isatis tinctoria* (çivit otu) bitkisine ait köklere farklı konsantrasyonlarda uygulanan maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının kök gelişimi ve bitkinin en önemli indol alkaloidleri olan indigotin ve indirubin birikimi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 21 günlük çivit otu kök kültürlerine farklı konsantrasyonlarda maya ekstraktı (1, 2, 3 ve 4 g/l), kitosan (100, 150, 200 ve 250 mg/l) ve pektin (%0.5, 1, 2 ve 3) 7 gün boyunca uygulanmıştır. Hasat sonrasında uygulamalara göre kökler, yaş kök ağırlığı, kök büyüme indeksi, kuru kök ağırlığı ile indigotin ve indirubin içerikleri bakımından değerlendirilmiştir.

Araştırma sonunda, kök büyümesi üzerine kitosan engelleyici etkide bulunurken, maya ekstraktının pozitif etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan pektin kök büyümesi üzerinde pozitif ya da negatif herhangi bir etkide bulunmamıştır. Maya ekstraktı ve kitosan uygulamaları kontrol ile kıyaslandığında köklerde indigotin birikimini artırırken, indigotin miktarı pektin uygulamaları ile azalmıştır. Maya ekstraktı uygulamaları içinde en yüksek indirubin miktarı 3 ve 4 g/l maya ekstraktı uygulamalarından elde edilmiştir. Bütün kitosan uygulamaları kontrole göre indirubin miktarını artırmıştır. Pektin uygulamalarının indirubin birikimine etkilerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiği ve en yüksek indirubin miktarlarının %0.5 ve 1 pektin uygulamalarından elde edildiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, kök gelişimi için 1 g/l maya ekstraktı, indigotin ve indirubin miktarı bakımından da 100 mg/l kitosan, en yüksek değerleri sağlayan en uygun uygulamalar olarak seçilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Isatis tinctoria*, İndigotin, İndirubin, Kitosan, Maya ekstraktı, Pektin

2022, 63 sayfa

ABSTRACT

Master's Thesis

EFFECTS OF BIOTIC ELISITOR APPLICATIONS ON ROOT GROWTH AND ALKALOID PRODUCTION IN *Isatis tinctoria* L. ROOT CULTURES

Alper CESSUR

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

Supervisor: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

This study was carried out to determine the effects of yeast extract, chitosan and pectin on the root growth and the accumulation of indigotin and indirubin, the most important indole alkaloids of the plant, in the root of *Isatis tinctoria* (woad). in *in vitro* conditions. For this purpose, different concentrations of yeast extract (1, 2, 3 and 4 g/l), chitosan (100, 150, 200 and 250 mg/l), and pectin (0.5, 1, 2 and 3%) were applied to 21 days old roots for 7 days. After harvest, roots were evaluated in terms of fresh root weight, root growth index, dry root weight and contents of indigotin and indirubin.

As a result of the study, it was determined that yeast extract showed positive effects on root growth while chitosan inhibited. On the other hand pectin had no positive or negative effects on root growth parameters. Yeast extract and chitosan applications increased indigotin accumulation in roots compared to control roots while indigotin amounts decreased with the pectin application. Within yeast extract applications, the highest indirubin contents were obtained from the roots applied with 3 and 4 g/l of yeast extract. All chitosan application enhanced the indirubin accumulation compared to control. The effect of pectin applications on indirubin accumulation was changed depending on its concentrations. Pectin at 0.5 and 1% increased indirubin contents compared to control and other pectin concentrations. As a conclusion, 1 g/l of yeast extract for root growth and 100 mg/l of chitosan for indigotin and indirubin contents were selected the most appropriate applications suppling the highest values.

Key Words: *Isatis tinctoria*, Indigotin, Indirubin, Chitosan, Yeast extract, Pectin

2022, 63 pages

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olduğum günden beri desteklerini, emeğini ve zamanını hiçbir zaman esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım sayın Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

HPLC analizleri başta olmak üzere laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Tunhan DEMİRCİ'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Zehra BABALIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Alper CESSUR
ISPARTA, 2022



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Çivit otu bitkisi (a), çiçeği (b) ve meyveleri (c).....	7
Şekil 2.2. İndigotin (a) ve indirubin (b)	7
Şekil 2.3. Çivit otunda indol alkaloidleri biyosentezi	8
Şekil 2.4. İndigotin boyasının tekstil ve vücut boyama sanatında kullanımı.....	9
Şekil 2.5. Çivit otu kökleri (Radix isatidis) ve bu köklerden elde edilen ekstraktı....	11
Şekil 2.6. Çivit otu bitkisinden elde edilen cilt bakım ürünleri	12
Şekil 3.1. Çivit otu tohumları (a), besin ortamlarına aktarılan tohumların iklim odasındaki görünüşleri (b)	24
Şekil 3.2. Çimlenme ortamında 15 gün boyunca kültüre alınan çivit otu bitkicikleri.....	24
Şekil 3.3. Çimlenen bitkiciklerden alınan köklerin sıvı besin ortamında kültüre alınması (a), sıvı ortamlarda kültüre alınan köklerin gelişme durumları (b).....	25
Şekil 3.4. Biyotik elisitör uygulamalarının yapıldığı kökler.....	26
Şekil 3.5. Toz haline getirilmiş kökler (a), ultrasonik banyo ve infrared ışık altında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi (b)	27
Şekil 3.6. Araştırmada gerçekleştirilen işlem basamaklarının şematik olarak görünümü.....	28
Şekil 4.1. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının yaş kök ağırlığı üzerine etkileri.....	31
Şekil 4.2. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının kök büyüme indeksi (BI) üzerine etkileri	33
Şekil 4.3. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının kuru kök ağırlığı üzerine etkileri.....	35
Şekil 4.4. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının indigotin miktarı üzerine etkileri	37
Şekil 4.5. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının indirubin miktarı üzerine etkileri.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının yaş kök ağırlığı (YKA) üzerine etkileri.....	29
Çizelge 4.2. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının kök büyüme indeksi (BI) üzerine etkileri.....	31
Çizelge 4.3. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının kuru kök ağırlığı üzerine etkileri	33
Çizelge 4.4. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının indigotin birikimi üzerine etkileri	35
Çizelge 4.5. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının indirubin birikimi üzerine etkileri	37



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDK	Sikline bağımlı kinaz
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
GA ₃	Giberilik asit
GSK	Glikojen sentaz kinaz
IC ₅₀	Yarı en yüksek inhibitör konsantrasyon
K	Kitosan
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi
ME	Maya ekstraktı
MeJA	Metil jasmonat
MS	Besin ortamı
P	Pektin
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
POD	Peroksidaz
ROS	Reaktif oksijen türevleri
SA	Salisilik asit
SARS	Akut solunum sendromu
SPINDIGO	The Sustainable Production of Plant-Derived Indigo
UV-B	Ultraviyole ışınım

1. GİRİŞ

Bitkiler, büyüme ve gelişmeleri için mutlak gerekli olan karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitler gibi primer metabolitlerin yanı sıra, farklı stres faktörlerine karşı bitkinin savunma sisteminin en önemli parçalarından biri olan sekonder metabolitleri de sentezlemektedirler. Fenolik bileşikler, terpenoidler, alkaloidler gibi birçok farklı bileşiği içinde bulunduran sekonder metabolitler, biyotik ya da çevresel etkenlerden kaynaklanan stres faktörlerine karşı bitkinin toleransını artırma ve koruma etkilerinin yanında, bitkilerde renk, koku, tat gibi özellikleri de oluşturan bileşiklerdir. Bitkilerde sentezlenen bu sekonder metabolitler tıp, eczacılık, kozmetik, parfümeri, gıda, tekstil gibi birçok alanda kullanılmaları nedeniyle, özellikle son yıllarda bu bileşiklerin sentezine ve sahip oldukları özelliklerin ortaya çıkartılmasına yönelik çalışmalar büyük popülarite kazanmıştır. Sekonder metabolitler, farklı alanlarda büyük talep görmelerine karşın, bitki bünyesinde çok düşük miktarlarda sentezlenirler. Bu nedenle bu bileşikler “yükte hafif, pahada ağır” bileşikler olarak da anılmaktadır.

Bitkilerde sentezlenen bu değerli metabolitlerin elde edilmesinde kullanılan en yaygın yöntem bitkilerin doğadan toplanmasıdır. Ancak doğadan toplama ile ihtiyaç duyulan taleplerin karşılanması, endemik türlerle kontrolsüzce toplanan bitki türleri, özellikle de kök kaynaklı metabolitlere sahip bitkiler için nesillerinin devamı bakımından büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Ayrıca sekonder metabolit üretiminde iklim ve coğrafi koşullardan kaynaklanan kalite ve kantite farklılıklarının ortaya çıkması, bitkilerin hastalık zararlı ya da olumsuz çevre koşulları nedeniyle tahrip olması, yılın belirli dönemlerinde ve uygun olmayan arazi koşullarında da toplanma zorunluluğunun bulunması, geleneksel yöntemlerle yapılan bu metabolit üretim tekniğinin diğer olumsuz yönlerini oluşturmaktadır (Dornenburg ve Knorr, 1997; Fazili vd., 2022). Sayılan bu olumsuzlukları ortadan kaldırarak yılın her döneminde standart miktar ve kalitede üretimi sağlayacak alternatif üretim tekniklerinin arayışı sonucunda, *in vitro* tekniklerin bu amaçla kullanılabilir önemli bir potansiyel oluşturduğu ortaya çıkmıştır (Verpoorte vd., 2002; Ramirez-Estrada vd., 2016; Fazili vd., 2022). Ayrıca *in vitro* koşullarda bitki, hücre ve dokulara doğada yapılması mümkün olmayan farklı uygulamalar yapılarak metabolit verimi çok daha yüksek seviyelere çıkartılabilmektedir (Ramawat, 2007). Besin ortamlarının içeriği ile sıcaklık, ışık gibi kültürel koşullarda yapılan değişiklikler, iki fazlı kültür sistemi, genetik

transformasyon, immobilizasyon, permeabilizasyon, öncül ya da ara maddelerin kullanılması ile sekonder metabolit sentez yollarındaki enzim ve genleri uyaran elisitör uygulamaları *in vitro* koşullarda sekonder metabolit üretimini artırmada uygulanabilecek yöntemler arasında yer almaktadır (Dornenburg ve Knorr, 1995; Zhao vd., 2005; Isah vd., 2018). Elisitör bitkinin strese tepkisini engelleyici ya da teşvik edici olarak açığa çıkaran ve elisitasyon olarak da isimlendirilen kimyasal reaksiyonları uyaran sinyal karakterindeki biyotik ve abiyotik kökenli etmenlerdir (Gorelick ve Bernstein, 2014). Düşük miktarlarda uygulandıklarında bitkilerde sekonder metabolit biyosentezini uyaran sinyal molekülleri olarak hareket eden elisitörler, *in vitro* kültürlerde sekonder bileşiklerin üretimini arttırmada yoğun olarak kullanılmaktadır. Elisitörler abiyotik ve biyotik olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır (Weathers vd., 2010). Abiyotik elisitörler fiziksel ya da kimyasal kökenli iken biyotik elisitörler, biyolojik kaynaklı bitki hücre duvarlarından oluşan polisakkaritler ile mikroorganizmalara ait hücre duvarı bileşenlerinden oluşmaktadır (Namdeo, 2007; Weathers vd., 2010).

Sekonder metabolit üretiminde en çok tercih edilen bitkiler, özellikle farmakolojik aktiviteleri yüksek olan tıbbi bitkilerdir. Ülkemiz de coğrafi konumu ve iklimi ile birçok tıbbi bitkiye ev sahipliği yapmaktadır. Toplamda 338 cins ve 3350 tür ile temsil edilen ve çok önemli tıbbi bitkileri bünyesinde toplayan Brassicaceae familyası da Amerika Birleşik Devletleri'nden sonra en çok ülkemizde yayılım gösteren familyadır (Çömlekçioğlu, 2019). Brassicaceae familyasına ait bir tür olan çivit otu (*Isatis tinctoria* L.) da indigotin ya da indigo adı verilen ve mavi renge dönüşebilen bir boya maddesi içermesi nedeniyle önemli bir boya bitkisidir (Karagüzel ve Taşçioğlu, 2007). Dünyada yıllık üretiminin 16 bin ton olduğu tahmin edilen indigotin (Çömlekçioğlu, 2011), endüstriyel alanda çok kullanılması ve doğada nadir bulunan mavi renge sahip olması nedeniyle en önemli bitkisel boyalardan biri olarak kabul edilmektedir (Tansı, 1998; Kızıl ve Arslan, 2001; Blackburn vd., 2009). Çoğu benzen ve benzenden türeyen aromatik hidrokarbon yapısında olan sentetik boyaların, kanserojen etkileri ile insan sağlığı ve çevre üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle doğal ve çevre dostu boyalara olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Kızıl ve Arslan, 2001). Bunun sonucunda da sentetik boyalara alternatif olarak indigotinin *Isatis* türlerinden doğal olarak elde edilmesine yönelik olarak AB tarafından geçtiğimiz 20 yıl içerisinde birçok proje desteklenmeye başlanmış, 2001 yılında SPINDIGO (The Sustainable Production of

Plant-Derived Indigo) projesine yaklaşık 3.5 milyon Euro fon sağlamıştır. Ayrıca çeşitli Avrupa ülkeleri mavi boya eldesi için *Isatis* ve *Polygonum* türlerinin yetiştirilmesi, indigotin ekstraksiyonu ve tekstil sanayinde kullanılmasıyla ilgili çeşitli projeleri önemli oranda desteklemiştir (CORDIS, 2020). Boya bitkisi olarak kullanılmalarının yanı sıra *Isatis* türleri içermiş oldukları indol alkaloidleri ve fenilpropanoidleri ile tıbbi amaçlar için de eski dönemlerden beri kullanılmaktadır (Çömlekçioğlu vd., 2017). Nitekim farengit, larenjit, erizipel, karbonkül, hepatit A, menenjit, kanser ve iltihap önleyici etkilerinin yanında antibakteriyel, antiseptik ve antiviral aktivitelerin de olduğu belirlenmiştir (Han vd., 2011). Geleneksel Çin Tıbbında "Banlangen" olarak adlandırılan çivit otunun kurutulmuş kökleri, anti-influenza etkinlikleri nedeniyle şiddetli akut solunum sendromu (SARS) ve H1N1 hastalıklarının tedavisinde de başarılı bir şekilde kullanıldığı belirlenmiştir (Xiao vd., 2015). Bu farmakolojik etkileri nedeniyle çivit otu Doğu Asya bölgelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok satan tıbbi bitkiler arasında yer almaktadır (Ni vd., 2012).

Hem boya hem de ilaç bitkisi olarak önem taşıyan çivit otunda *in vitro* koşullarda metabolit üretimine yönelik çalışmaların son derece az olduğu görülmektedir. Özellikle son yıllarda yoğunlaşan bu çalışmaların da çoğunluğunun flavanoid (Gai vd., 2015a; Jiao vd., 2018a; Jiao vd., 2018b; Gai vd., 2019), daha azının da alkaloid (Gai vd., 2015b; Gai vd., 2019) birikimine yönelik olarak gerçekleştirildiği görülmektedir.

Bu araştırma *in vitro* koşullarda çivit otuna ait köklere uygulanan kitosan, maya ekstraktı ve pektinden oluşan uygun maliyetli biyotik elisitörlerin kök gelişimi ile indol alkaloidlerinden indigotin ve indirubin birikimi üzerine etkilerini belirlemek ve en uygun elisitör uygulamasını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Çivit Otunun Tarihçesi ve Yayılım Alanları

Çivit otu tıbbi özellikleri ve çivit mavisi rengi nedeniyle uzun ve iyi belgelenmiş bir tarihe sahiptir. Adını, yaraları tedavi etmek anlamında kullanılan Latince “Isazein” ve Yunanca “Isadso” kelimesinden türetilen “*Isatis*” (Branca, 2015) ile boya işlerinde kullanımı ifade eden “*Tinctoria*” kelimesinin birleşmesinden almıştır (Speranza vd., 2020). Bu türün geçmişinin Neolitik, Bronz ve Demir Çağ’larında maviye boyanmış ve korunmuş tekstil kalıntılarının keşfiyle doğrulandığı üzere Geç Prehistorya ve Protohistorya dönemlerine kadar uzandığı görülmektedir (Zech-Matterne ve Leconte, 2010). Eski Mısırlılar, çivit otundan elde edilen mavi boyayı asalet simgesi olarak imparator elbiselerinin boyanmasında, MÖ 3000’de de mumya bezlerinin süslenmesinde kullanmışlardır (Balfour-Pau, 2006; De Melo vd., 2006). Avrupa’da indigotin kullanımıyla ilgili tarihsel kayıtlar ise Roma Dönemi’ne kadar uzanmaktadır. Tarihsel kaynaklar, Kelt ve Germen halklarının hastalıklardan korunmak veya ritüel amaçlarla vücutlarını ve saçlarını boyamak için çivit otunu kullandıklarını göstermektedir. Ünlü tarihçi Büyük Plinius (MÖ 23-79) yazılarında sık sık çivit otundan söz etmiş ve İngiliz kadınlarının dini törenlerde bedenlerini çivit mavisi ile boyadıklarını bildirmiştir (Guarino vd., 2000). Julius Caesar’da “*De Bello Gallico*” kitabında, Kelt topluluklarının korkunç bir görünüm elde etmek için çivit otundan elde edilen indigotikle vücutlarını renklendirdiklerini yazmıştır (Meijer vd., 2007). Mavi bir dövme oluşturmak için derilerini delen ve ovuşturan bu insanlara Romalılar “boyalı insanlar” anlamına gelen “*Picti*” adını vermişlerdir (Guarino vd., 2000). Bütün bunlar çivit otu boyasının hem tekstil hem de vücut sanatı için kullanılmış olduğunu göstermektedir (Zech-Matterne ve Leconte, 2010). 12. yüzyıldan 17. yüzyıla kadar, çivit otu boya ve tıbbi bitki olarak Avrupa’da özellikle Almanya (Thüringen, Jülich), Fransa (Languedoc, Somme, Normandy), İngiltere (Somerset, Lincoln shire) ve İtalya’da (Toskana) yaygın olarak yetiştirilmiştir. 17. yüzyılın başlarında, sömürgeciler tarafından çivit otu tekstil boya ürünü olarak Avrupa’dan Kuzey Amerika’ya götürülmüştür (Hamburger, 2002). 17. yüzyılın sonlarında daha kolay ve ekonomik boya ekstraktı elde edilmesine imkan kılan Asya’da (Hindistan, Bangladeş) yetiştirilen *Indigofera tinctoria*’nın ve Karayipler’deki diğer *Indigofera* türlerinin Avrupa’ya ithal edilmesiyle çivit otunun üretimi azalmaya başlamıştır. 1905 yılında Adolf von Bayer

indigotinin sentetik üretilebileceğini keşfetmiş ve bu keşfi ile Nobel ödülünü kazanmıştır (Anonim, 1998). Sentetik boyaların doğal indigotinin yerini almasıyla birlikte bitki önemini kaybetmeye başlamıştır (Meijer vd., 2007; Spataro ve Negri, 2008). Bu dönem içinde boyar madde olarak öneminin ve üretiminin azalması ile birlikte şifalı bitki olarak da unutulmaya yüz tutmuştur (Hamburger, 2002). Ancak son yıllarda sentetik boyaların insan sağlığı ve çevreye olan zararları nedeniyle doğal boyalara ve çivit otuna olan ilgi yeniden artmaya başlamıştır. Nitekim AB tarafından geçtiğimiz 20 yıl içerisinde indigotinin *Isatis* türlerinden doğal olarak elde edilmesine yönelik yüksek bütçeli birçok proje desteklenmeye başlanmıştır. Çeşitli Avrupa ülkeleri de indigotin üretimi için *Isatis* ve *Polygonum* türlerinin yetiştirilmesi, indigotinin ekstraksiyonu ve tekstil sanayinde kullanılmasıyla ilgili çeşitli projeleri önemli oranda desteklemiştir (CORDIS, 2020).

Çivit otu boya bitkisi olmasının yanında Geleneksel Çin Tıbbında da tıbbi amaçlar için yaygın olarak kullanılmakta olup (Hamburger, 2002; Recio vd., 2006), 2011 yılından itibaren Avrupa'da bir farmakope bitkisi olarak tanınmaktadır (Anonim, 2011).

Çivit otu antik çağlardan beri indigotin kaynağı olarak Asya ve Avrupa'nın farklı bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilmiştir (Varga ve Evans, 1978; Mohn vd., 2008). Yapılan genetik analizler çivit otunun, Orta Asya kökenli olduğunu düşündürmesine karşın (Spataro vd., 2007; Spataro ve Negri, 2008), birçok kaynakta da onun Güneydoğu Rusya'ya, Güney-Batı Asya'ya ve belki de Güneydoğu Avrupa'nın bazı bölgelerine özgü olabileceğinden bahsedilmektedir (Akeroid, 2002; Hamburger, 2002). Anadolu'da da yetiştirilen çivit otu, Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika genelinde yaygındır. Ülkemizde Bolu, Zonguldak, Bursa, Manisa İzmir, Kütahya, Isparta, Konya ve İçel'de boş arazilerde ve yol kenarlarında doğal olarak yayılım göstermektedir (Yıldırım, 1988). Boya maddesi olarak kullanımından dolayı Anadolu'da tarım arazileri üzerinde yıllar boyu kültürü yapılmış ve hasatta elde edilen ürünler yurtdışına ihraç edilmiştir.

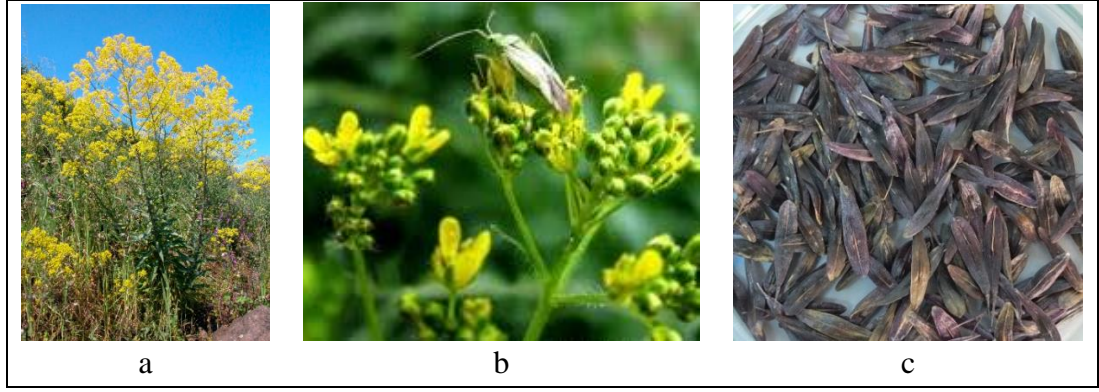
Kuru ve güneşli iklime sahip lokasyonların kayalık alanlarında, terkedilmiş ekinlerinde, açık ormanlarında ve yol kenarlarında kendiliğinden yetişen çivit otu, deniz seviyesinden maksimum 1900 metre yüksekliğe kadar yayılabilmektedir.

Genellikle sıcak ve azotça zengin kireçli toprakları tercih etmektedir (Speranza vd., 2020).

2.2. Çivit Otu Bitkisinin Botanik Özellikleri

Dünya üzerinde daha çok kuzey yarım kürede nadiren de Ekvator'a yakın tropikal bölgelerde yayılış gösteren çivit otunun da yer aldığı Brassicaceae (turpgiller) familyası, 338 cins ve 3700 türün yer aldığı ekonomik önemi yüksek en geniş familyalardan biridir (Sıralı vd., 2013). Çivit otu (*Isatis tinctoria*)'nun içinde yer aldığı *Isatis* cinsinin ise dünyada yaklaşık 79 türü bulunmakta olup (Baytop, 1984), Türkiye 20 türü ile 5 alttürü endemik olmak üzere 34 tür, 16 alt tür ve iki çeşitle temsil edilmektedir (Çömlekçioğlu vd., 2014).

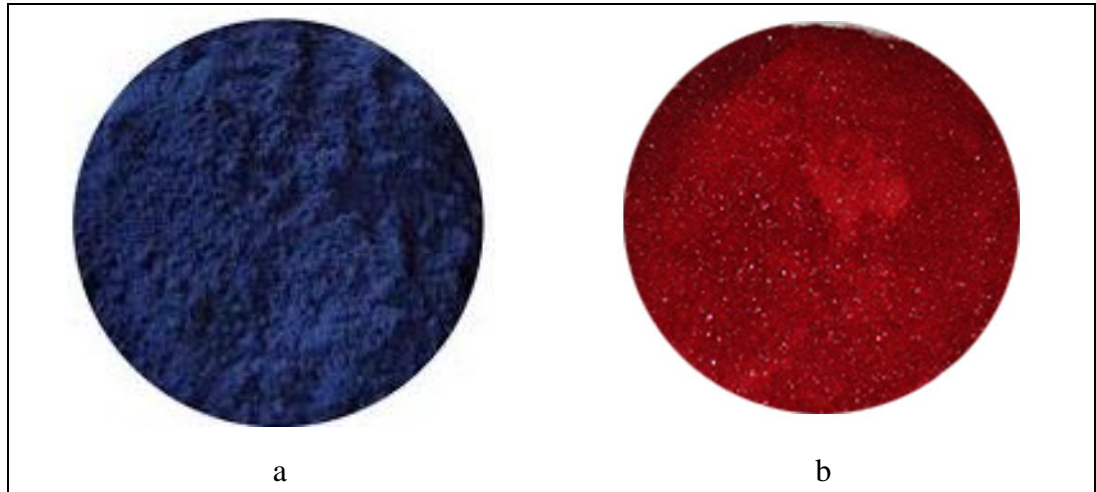
Çivit otu iki yıllık ya da kısa ömürlü çok yıllık otsu bir bitki türüdür (Şekil 2.1a). Çimlendikten sonra toprak üstündeki ilk oluşumuna, rozet yaprak dizilişine sahip birkaç uzun saplı bazal yaprakların çıkışı ile başlamaktadır. Basit tüylerle kaplı bu yapraklar, yaklaşık 4-10 cm uzunluğunda ve 0.8-4 cm genişliğindedir. Gövdesi dik ve 130 cm'ye kadar boylanabilirken, çok sağlam ve odunsu yapıya sahip bir ana köke sahiptir (Callihan vd., 1984). Kazık kökleri 1.5 m ya da daha derine inebilirken, daha küçük yan kökler ise toprak yüzeyinin 20-30 cm'lik kısmında yoğunlaşmakta ve 40 cm'ye kadar yanlara yayılabilmektedir (Varga ve Evans, 1978). Mavimsi yeşil renkte olan yaprakların üstü düz ve beyaz damarlıdır. Bazal yapraklar dikdörtgen-mızrak şeklinde ve uzun saplıdır. Bazala göre daha dar ve yukarıya doğru kademeli olarak küçülen üst yapraklar ise basit, bütün ve yay şeklindedir. Bitki toprak yüzeyinden itibaren dallanmakta ve her dal bir çiçek topluluğu ile son bulmaktadır. Haziran-temmuz ayında çiçeklenen bitkinin çiçekleri bileşik şemsiyemsi salkım şeklinde olup, çiçek sapları 4.5-9 mm, çanak yapraklar 1.5-3 mm, parlak sarı renkli taç yaprakları ise 2-4 mm boyutlarındadır (Şekil 2.1b). Olgun meyveleri koyu kahverengimsi siyah renkli, 8-19x1.5-4 mm boyutlarında şeritsi yapıda olup (Şekil 2.1c), her meyvede 1 tohum bulunmaktadır (Speranza vd., 2020).



Şekil 2.1. Çivit otu bitkisi (a), çiçeği (b) ve meyveleri (c) (Speranza vd., 2020)

2.3. Çivit Otu Bitkisinde Bulunan Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları

Çivit otunun biyokimyasal yapısı incelendiğinde, birçok farklı bileşikle karakterize edilen ilginç bir kimyasal profil gösterdiği ve başta alkaloidler olmak üzere fenolik bileşikler (Taviano vd., 2018), glukozinolatlar (Mohn vd., 2008), karotenoidler, yağ asitleri (Mohn vd., 2009), mineraller (Kızıl vd., 2009), aldehytler, monotrpenler, seskiterpenler, hidrokarbonlar, ketonlar (Condurso vd., 2006) ve karbonhidratlar (Han vd., 2011) olmak üzere birçok metaboliti içerdiği görülmektedir. Ancak bu türü bu denli önemli kılan, esas olarak içermiş oldukları indol alkaloidleridir. Bu türün en önemli indol alkaloidleri indigotin ve indirubin olup, indigotin mavi renge, indirubin ise kırmızı renge sahip bileşiklerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. İndigotin (a) ve indirubin (b)

Çivit otunda bulunan bu alkaloidler tekstil, kozmetik, gıda ve farmasötik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu alkaloidlerin sentezinin gerçekleşmesi için, bitki önce

Doğal mavi renk veren bitkilerin çok nadir olması nedeniyle çivit otu çok değerli bir boya bitkisi olarak kabul edilmektedir. Bu bitkinin yapraklarda bulunan indikan adlı glikozitin hidrolizi ve hidroliz ürününün oksidasyonu sonucu meydana gelen mavi renkli boyar madde olan indigotin, başta tekstil ve vücut boyama olmak üzere farklı alanlarda doğal boya olarak büyük önem taşımaktadır (Şekil 2.4). Nitekim doğal boya elde etmek, sentetik boyalara göre daha uzun zaman almasına, daha zahmetli ve pahalıya mal olmasına karşın, ürünleri çok daha değerli ve uzun ömürlü olmaktadır. Üstelik insan ve çevre sağlığı bakımından zararsız olmalarından dolayı da bu boyalara karşı günümüzde artan bir ilgi söz konusudur (Kızıl, 2000).



Şekil 2.4. İndigotin boyasının tekstil ve vücut boyama sanatında kullanımı

Boya bitkisi olmasının yanı sıra önemli farmakolojik özellikleri nedeniyle çivit otu aynı zamanda çok eski dönemlerden bu yana tıbbi bir bitki olarak da kullanılmaktadır. Avrupa'da bu bitkinin tıbbi kullanımı hakkında ilk yazılı kayıtlar, yaraları, ülserleri ve hemoroidleri tedavi etmek için kullanımını destekleyen Hipokrat'a (M.Ö. 460) aittir. Galen (M.Ö. 129-216) ve Büyük Plinius (M.Ö. 23-79) de bu hastalıklara karşı bitkinin kullanımını tavsiye etmişlerdir (Hamburger, 2002; Buhner, 2013). 12. yüzyıldan 17. yüzyıla kadar Avrupa'da mavi boya olan indigotin elde etmek için yapılan geniş çaplı üretimi sırasında, bitki aynı zamanda yılan ısırıkları, yaralar ve inflamatuvar rahatsızlıklarını tedavi etmek için tıbbi bir bitki olarak da yaygın olarak kullanılmıştır. Rönesans ve Barok bitkisel metinlerinde hemoroid, ülser ve tümör tedavisi için çivit otunu öneren bilgiler yer almaktadır (Hamburger, 2002). Yapraklarından tifo, kızamık ve grip tedavisinde yararlanılmasının yanı sıra (Perry, 1980), Orta Çağ'da yaygın

korkunç bir hastalık olan ve cildin aşırı şekilde iltihaplanmasına neden olan St. Anthony'nın Ateşine karşı da kullanıldığı bildirilmiştir (Garland, 1988). Bitkinin, demir ve vitamin eksikliğinden kaynaklanan hastalıkların tedavisinde kullanımı da yapraklarında bulunan demir ile A ve C vitaminlerinden kaynaklandığı ifade edilmektedir. Yapraklardan elde edilen ekstraktlar ayrıca akrodermatit, hemorajik diyatezi, skrofuldan egzama, furunküloz, zehirlenmeler, hiperkoliye, sarılık, mide nevrozu, kurdeşen, uyuşukluk, skroful, mide ekşimesi ve sebore tedavisinde kullanılmıştır (Palma, 1964). Günümüze kadar yapılan araştırmalarda da *Isatis* türlerininde bulunan kimyasal bileşiklerin antibakteriyel, antikanser, antiviral özelliklerinin yanı sıra menenjit, beyin iltihabı, kabakulak, grip, deri iltihabı, deri döküntüsü de dahil olmak üzere çok farklı rahatsızlıkların tedavisinde de etkili oldukları tespit edilmiştir (Bown, 1995). Avrupa'da ve geleneksel Çin tıbbında uzun yıllardır iyi bilinen bir bitki olması nedeniyle çivit otunun hem *in vitro* hem de *in vivo* deney modellerinde farklı biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiş ve bu çalışmalar sonucunda bitkinin antiinflamatuvar, antiviral, antioksidan, antibakteriyel ve antitümör etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Song vd., 1996; Yang vd., 2013; Qi vd., 2017; Ullah vd., 2017). Bitkinin farmakolojik özelliklerinin özellikle içerdiği indol alkaloidleri ile fenilpropanoidlerle (flavonoidler ve lignanlar) ilişkili olduğu düşünülmektedir (Hamburger, 2002; Lin vd., 2005). Nitekim çivit otu indol alkaloidlerinin yanı sıra flavanoidleri de yüksek miktarlarda içeren bir bitkidir. Yapılan çalışmalarda çivit otunda aralarında rutin, neohesperidin, buddleosid, quercetin, isorhamnetin, kamferol, soliquiritigenin de yer aldığı bir çok flavanoidi içerdiği belirlenmiştir (Gai vd., 2019). Geleneksel Çin Tıbbında "Banlangen" olarak adlandırılan çivit otunun kurutulmuş kökleri (*Radix isatidis*) (Şekil 2.5) (Hamburger, 2002), şiddetli akut solunum sendromunun (SARS) ve yeni domuz kökenli influenza A'nın (H1N1) tedavisinde büyük ilgi görmüştür (Lin vd., 2005; Wang vd., 2011). Doğu Asya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok satan bitkisel ilaçlardan biri olan çivit otunun (Ni vd., 2012) kökleri yaygın olarak eczanelerde reçetesiz ilaç olarak satılabilen "Banlangen Keli" ve "Banlangen Tangjiang" olmak üzere iki farklı ticari farmasötik preparasyon olarak işlenmektedir (Zhou ve Zhang, 2013). Kökler farenjit, larenjit, erizipel, karbonkül, hepatit A, menenjit, kanser ve iltihabı önlemek için kullanılmakta olup, ayrıca antibiyotik, antiseptik ve antiviral aktiviteler gösterdikleri de bilinmektedir (Han vd., 2011).



Şekil 2.5. Çivit otu kökleri (Radix isatidis) ve bu köklerden elde edilen ekstraktı

Bitkinin fungisidal, bakteriyosidal, nematosidal ve allelopatik özelliklere sahip glukozinolatları ve onların parçalanması ile oluşan ürünlerinin kanser önleyici etkileri yoğun ilgi çekmektedir (Branca, 2015). Bitkinin yaprak, kök ve tohumlarında bulunan indol alkaloidlerinden (Çömlekcioglu vd., 2017) indirubin ve indirubin türevleri, kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu kontrol etmede dikkate değer bir etki gösterdikleri belirlenmiştir. İndirubin, sikline bağımlı kinaz (CDK) ve glikojen sentaz kinaz (GSK) proteinleri gibi hücre döngüsü düzenleyicilerini inhibe etmekte, bu nedenle de hücrelerin normal bölünme yeteneğini sınırlamaktadır (Hoessel vd., 1999). İndirubin, hücre çoğalmasını kontrol etmek için aktif bir mekanizma olan kanser hücrelerinde apoptozu teşvik etmektedir (Eisenbrand vd., 2004; Nam vd., 2005; Nam vd., 2012). Çin Hematoloji Enstitüsü, lösemi tedavisi için geleneksel Çin Tıbbında kullanılan 11 farklı bitkiyi incelemiş ve lösemi üzerinde etkili bileşiğin indigotin olduğunu bildirmiştir (Anonim, 1979). Fakat daha sonraki araştırmalarda antilösemik etkinin indigotinden değil, indigotinin izomeri olan indirubinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Meijer vd., 2007). İndirubin, DNA sentezini engelleyerek lösemi hücrelerini yok etme, dalağın boyutunu önemli ölçüde azaltma, hemoglobin konsantrasyonunu normal düzeye çıkarma ve karaciğer şişmesini azaltma gibi etkilerinin yanı sıra bağışıklık sistemini de artırıcı özelliklere sahiptir. İndirubinin kanser önleyici etkisinin de vücut bağışıklık sistemini iyileştirmesiyle ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (Song vd., 2018). İndirubinin antikanser, antibakteriyel, toksinleri uzaklaştırıcı ve bağışıklık fonksiyonunu arttırıcı özelliklerinin yanında anti-inflamatuar (iltihap önleyici) etkilerinin de olduğu bildirilmektedir (Speranza vd., 2020). İndirubinin, iltihaplanmayı ve oksidatif stresi malondialdehit üretimini azaltarak gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Branca, 2015). Hızlı iyileştirici etkisi ve

düşük yan etkileri ile indirubin ve türevleri, özellikle antikanser ilaçları alanında yeni bir araştırma konusu olarak büyük önem kazanmıştır (Song vd., 2018).

Çivit otu önemli bir boya ve tıbbi bitki olmasının yanında kozmetik sektöründe sabun ve vücut kremlerinin üretiminde de yararlanılmaktadır (Şekil 2.6). Tohumunun yağı ile kök ve yapraklarının toz ya da ekstraktları yumuşatıcı ve nemlendirici etkileriyle cilt ve saç bakım ürünlerinde kullanılmaktadır (Spataro ve Negri, 2008). Ayrıca bitkide bulunan erusik asit de endüstriyel açıdan plastik sanayinde kullanılmaktadır.

Son yıllarda çivit otunun hem kurak ve su streslerine toleransı hem de uzun çiçeklenme dönemi ve çekici sarı renkli çiçek salkımları nedeniyle bahçe süs bitkisi olarak da değer kazandığı görülmektedir. Yenilebilir bir bitki olarak kabul edilmemesine karşın, Sicilya'da yaşayan yerel halk tarafından kaynatılmış çiçek tomurcukları salata ve omletlere katılarak gıda maddesi olarak da değerlendirilmektedir (Branca, 2015).

Kısaca çivit otu boya, ilaç, süs, kozmetik ve gıda sektöründe kullanılan değerli bir bitkidir.



Şekil 2.6. Çivit otu bitkisinden elde edilen cilt bakım ürünleri

2.4. Biyotik Elisitörlerin Sekonder Metabolit Üretiminde Kullanımı

Bitkilerin çevre faktörlerine uyumu ile biyotik ya da abiyotik kaynaklı stres faktörlerine karşı savunma ve korunma mekanizmalarının en önemli parçası olan sekonder metabolitler, aynı zamanda tıp, gıda, kozmetik, parfümeri, tarımsal mücadele gibi pek çok alanda da önemli kullanım alanlarına sahip değerli bileşiklerdir. Bunların doğadan toplanan ya da dış koşullarda kültüre alınan bitkilerden elde edilmesi, iklimsel koşullardan kaynaklanan verim ve kalite dalgalanmalarının yanı sıra doğadan toplanan bitkilerin nesillerinin yok olma tehlikesi, coğrafi zorluklar ile hastalık ve zararlılarla kontaminasyon gibi birçok dezavantajı da beraberinde getirmektedir (Fazili vd., 2022). Nitekim çivit otunun dış koşullarda yetiştirilmesinin, kimyasal profillerinin coğrafi bölgelerden, iklimsel dalgalanmalardan ve toprak koşullarından etkilenmesine ve terapötik etkinliğinin önemli ölçüde değişmesine neden olabileceği ifade edilmiştir (Chen vd., 2015). Hem bu dezavantajlar hem de söz konusu metabolitlerin kimyasal sentez yoluyla üretimlerinin karmaşıklığı ve maliyetlerinin yüksek olması, gıda ve ilaç endüstrilerinin ihtiyacını karşılamak için çevre dostu ve yenilenebilir üretim sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç göstermiştir. Bu arayışlar sonucunda *in vitro* sekonder metabolit üretim teknikleri coğrafi, iklimsel veya çevresel varyasyonlardan ve kısıtlamalardan bağımsız olarak sürekli olarak yüksek değerli bileşenlerin üretimini sağlayan bir teknik olarak büyük ilgi çekmektedir (Davies ve Deroules, 2014; Wilson ve Roberts, 2014).

In vitro sekonder metabolit üretiminde eksplant kaynağı olarak kök, sürgün, hücre süspansiyon ya da kallus kültürleri kullanılmaktadır. Kök, sürgün gibi organize olmuş kültür teknikleri, hücre ya da kallus gibi organize olmamış kültür tiplerine göre sekonder metabolit üretiminde daha başarılı sonuçlar vermektedir. İstenen bileşiklerin düşük verimleri, pahalı kültürlenme işlemi, heterojen hücre tipleri, depolama dokusunun olmaması ve metabolitlerin ortamda salınan enzimler tarafından kolayca parçalanması hücre süspansiyon kültürlerinin en önemli dezavantajları arasında yer almaktadır (Chandra ve Chandra, 2011; Davies ve Deroules, 2014). Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için de farklılaşmış kültür tipleri tercih edilmektedir. Özellikle köklerde sentezlenen metabolitler için kök kültürleri en çok tercih edilen kültür tipidir. Çivit otunda *in vitro* sekonder metabolit üretim çalışmalarının saçak kök kültürleri ile sınırlı olduğu görülmektedir. Özellikle son yıllarda yoğunlaşan ve tamamında saçak

köklerin kullanıldığı bu çalışmaların da çoğunluğunun flavanoid (Gai vd., 2015a; Jiao vd., 2018a, Jiao vd., 2018b; Gai vd., 2019), daha azının da alkaloid birikimine (Gai vd., 2015b; Gai vd., 2019) yönelik olarak gerçekleştirildiği görülmektedir. *Agrobacterium rhizogenes* aracılığıyla elde edilen saçak köklerde eksplantlara aktarılan *rol* genlerinin kopya sayısı ve genom içinde yerleştiği yere bağlı olarak metabolit verimliliği önemli ölçüde değişebilmekte; hatta metabolit verimliliği transgenik olmayan köklerle aynı seviyelerde bulunabilmektedir (Demirci vd., 2020). Üstelik saçak kök elde etme, transformasyon çalışmaları, doğrulama analizleri gibi yoğun çalışmaları da beraberinde gerektirmektedir. Oysa uygun protokol geliştirildiğinde transgenik olmayan köklerde de yüksek miktarlarda kök gelişimi ve metabolit üretimi sağlanabilmektedir (Min vd., 2007; Murthy vd., 2008; Cui vd., 2010; Özdamar Biçer vd., 2017; Demirci vd., 2021).

In vitro sekonder metabolit üretiminde en önemli amaç hem biyokütle hem de biyoaktif metabolitlerin üretimini arttırmaktır. *In vitro* koşullarda biyokütle ve sekonder metabolit üretimini arttırmak için farklı uygulamalar yapılabilmektedir. Yüksek verimli hatların seçimi, besin ortamlarında ve kültürel koşullarda yapılan modifikasyonlar, genetik transformasyon, immobilizasyon, biyosentez yollarındaki öncül maddelerin kullanımı bu uygulamalar arasında sayılabilmektedir. *In vitro* koşullarda biyokütle ve metabolit verimini artırmanın en etkili yöntemlerinden biri de spesifik genlerin aktivasyonu ile sekonder metabolit biyosentezini tetikleyen farklı elisitörlerin kullanılmasıdır (Zhao vd., 2005; Baenas vd., 2014). Elisitasyon olarak ifade edilen ve bitkinin stres tepkisini engelleyici ya da teşvik edici olarak açığa çıkaran kimyasal reaksiyonları uyaran veya sinyal karakterindeki biyotik ve abiyotik etmenlere elisitör denilmektedir. Elisitörler az miktarlarda canlı sisteme uygulandığında fitokimyasalların biyosentezini uyarmakta ve bitkilerin stresli bir ortamda adaptasyonunu geliştirmektedir. Bir başka deyimle elisitörler, bitki hücrelerinde savunma veya korunma amaçlı sentezlenmesi gereken sekonder metabolit biyosentezini uyarıcı sinyal molekülleri olarak hareket etmektedirler (Srivastava ve Srivastav, 2014). Dolayısıyla elisitör uygulamaları, *in vitro* kültürlerde sekonder metabolitlerin üretimini arttırmak için kullanılacak pratik ve başarı oranı yüksek bir stratejidir. Kökenlerine bağlı olarak, elisitörler biyotik veya abiyotik olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır (Weathers vd., 2010). İnorganik tuzlar veya metal iyonları gibi kimyasallar ile UV ışınları, tuzluluk, su azlığı, ozmotik stres, kuraklık gibi fiziksel

faktörler abiyotik elisitörler arasında yer almaktadır (Dornenburg ve Knorr, 1995; Radman vd., 2003). Salisilik asit (SA) ve jasmonatlar gibi bitki büyüme düzenleyicileri de abiyotik elisitörler olarak kabul edilmektedir (Baenas vd., 2014). Biyotik elisitörler ise pektin, pektik asit ve selüloz gibi bitki hücre duvarlarından türetilen polisakaritler gibi biyolojik kökenli maddelerle kitin, kitosan veya glukanlar gibi mikroorganizmalara ait hücre duvarı bileşenleridir (Namdeo, 2007; Weathers vd., 2010). Bitkiler doğada funguslar, bakteriler, zararlılar gibi farklı biyotik streslere maruz kaldıklarında, karşılaşılan stres türü için özel savunma mekanizmaları geliştirirler. Mikroorganizma kaynaklı moleküllerin, yani biyotik elisitörlerin saptanmasının ardından bitkide karmaşık bir uyarılmış metabolik yanıt dizisi tetiklenir. Bu tepkiler arasında fitoaleksin üretimi, reaktif oksijen türevleri, fenilpropanoid bileşikleri ile bitki hücre duvarının güçlendirilmesi ve savunma enzimlerinin ekspresyonu yer almaktadır (Grayer ve Kokubun, 2001; Vogt, 2010; Ward vd., 2010). Poli veya oligosakaritler, patojen istilasına benzer şekilde bitki savunma tepkisini uyarabilen biyotik kaynaklı sinyal molekülleridir (Zhao vd., 2005). Bitki hücrelerinin bu tür mikrobiyal glukanları ve oligosakaritleri algılama mekanizmaları tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte biyolojik elisitörlerin çeşitli bitki türlerinde sekonder metabolitlerin üretimi üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu yapılan bir çok çalışmayla ortaya konulmuştur (Zhao vd., 2010; Cai vd., 2012; Lim vd., 2013).

Maya ekstraktı ve hücre duvarı bileşenleri gibi karmaşık biyolojik preparatlar da biyotik elisitörler arasında yer almaktadır (Angelova vd., 2006). Maya ekstraktı, maya hücresinin hücre duvarı ve hücre bileşenlerin aktive edilen kendi enzimleri ile ya da hidroklorik asit gibi asitlerin ilavesiyle parçalanması sonucunda elde edilen bir üründür (Peppler, 1986). İçeriğinde çok sayıda aminoasitleri, peptidleri, mineralleri, suda çözünür vitaminleri ve karbonhidratları bulundurmaktadır. Toksik madde miktarının çok düşük olması nedeniyle gıdalarda aroma arttırıcı olarak da kullanılan maya ekstraktı, *in vitro* sekonder metabolit üretiminde biyotik bir elisitör olarak bir çok araştırmada kullanılmaktadır (Guizar-González vd., 2016; Kochan vd., 2017; Karalija vd., 2020).

Sekonder metabolit üretimini arttırmada en çok kullanılan biyotik elisitörlerden biri de kitosandır. Kitosan, esas olarak yenilebilir kabukluların atık dış iskeletlerinden elde

edilen düşük maliyetli bir biyopolimerdir (Hadwiger, 2013). Ayrıca kitosanın, fitoaleksin biyosentezini gerçekleştirmek üzere çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonları tetikleyebilen etkili bir “bitki savunma güçlendiricisi” olduğu da net bir şekilde ortaya konulmuştur (Katiyar vd., 2015). Kitosan biyoyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik özelliği yüksek (Sathiyabama vd., 2016), toksisitesi de tuz veya şekerinkine çok yakın olan doğal bir polimerdir (Singla ve Chawla, 2001). Kitosan uygulamalarının bitkilerde mantar patojen saldırısı etkisi oluşturarak çeşitli savunma reaksiyonlarını tetiklediği (Hadwiger, 2013) ve bu yolla metabolit biyosentezini teşvik ettiği düşünülmektedir. Kitosan sekonder metabolit üretimini artırmak için uygun maliyetli ve toksik olmayan biyotik bir elisitör olarak kullanımı tavsiye edilmektedir (Sivanandhan vd., 2012; Jaisi ve Panichayupakaranant, 2017; Malayaman vd., 2017).

Sekonder metabolit üretiminde kullanılan bir diğer biyotik elisitör de pektin olup, büyük ölçüde galakturonik asit birimlerinden oluşan bitki pektik maddeleri sınıfının bir parçasıdır. Yüksek bitkilerin hücre duvarlarında bulunan pektinin temel bileşenlerini d-galaktrunik asit ile d-galaktoz, L-ramnoz ve L-arabinoz gibi şekerlerden oluşmakta olup, farklı oranlarda metil ester içeren bir bileşiktir. Suda eriyebilen ve uygun koşullar altında şeker ve asitle jelimsi yapı oluşturan pektin, gıda, ilaç, kağıt tekstil gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (Thakur vd., 1997).

Biyotik elisitör olarak maya ekstraktı, kitosan ve pektin *in vitro* koşullarda farklı metabolitlerin birikimini artırmak amacıyla birçok bitki türünde kullanılmıştır. Bu çalışmalardan birinde önemli bir indigotin kaynağı olan *Polygonum tinctorium* türüne ait saçak kök kültürlerine indigo üretimini artırmak amacıyla kitosan ve pektinaz uygulanmıştır. Araştırmada en yüksek indigotin miktarının 200 mg/l kitosan (186 µg/kuru ağırlık) ile 20 U/l pektinaz (181 µg/kuru ağırlık) uygulamalarından elde edildiği tespit edilmiştir (Young-Am vd., 2000).

Bir diğer araştırmada ise tropik bir bitki olan *Cayratia trifolia*'nın kök kültürlerinde 500 mg/l maya ekstraktının tek ya da 1 mg/l alar içeren ortamlarda piceid, resveratrol, viniferin, ampelopsin gibi stilbenlerin birikimini kontrole göre artırdığı tespit edilmiştir (Arora vd., 2009). Baque vd. (2012) ise, *Morinda citrifolia*'nın adventif köklerinde kitosan ve pektin kombinasyonunun antrakınon, fenolik ve flavonoid

üretimi üzerinde kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak önemli derecede değişikliğe neden olduğu belirlenmiştir. Araştırmada en yüksek antrakınon (103.16 mg/g) ve flavanoid (75.32 mg/g) birikiminin kültürün 28. gününde 0.2 mg/ml kitosan uygulanarak 2. günde hasat edilen köklerden elde edildiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan en yüksek fenolik madde miktarının ise 52.45 mg/g ile 0.2 mg/ml kitosanın 0.2 mg/ml pektinle yaptığı ikili kombinasyondan elde edildiği saptanmıştır. Kitosanın 0.2 mg/ml üzerindeki konsantrasyonlarının majör bileşik olan antrokinonların birikimini azalttığı belirlenmiştir. Kitosanın farklı konsantrasyonlarda pektinle yaptığı kombinasyonların metabolit birikimini kontrole göre arttırdığı, ancak kök büyümesi üzerine güçlü engelleyici etkide bulunduğu da tespit edilmiştir. Kitosanın 0.2 mg/ml konsantrasyonda kullanıldığı köklerde hem yaş hem de kuru kök ağırlığı pektinle yapılan konsantrasyonlara göre daha yüksek bulunmuştur.

Calotropis gigantea'nın saçak kök kültürlerinde mekanik yaralanma ile MeJA'nın yanı sıra biyotik elisitör olarak da kitosan ve maya ekstraktının kardenolid üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir diğer araştırmada, yapılan bütün uygulamaların kardenolid üretimini uyardığı, ancak en etkili uygulamanın kitosan olduğu tespit edilmiştir. En yüksek kardenolid verimi 20 gün boyunca 50 mg /l kitosan uygulanmış köklerden elde edildiği ve bu uygulama ile kontrole göre 2.7 kat daha yüksek kardenolid üretiminin sağlandığı belirlenmiştir (Sun vd., 2012).

Patlıcan bitkisine ait saçak kök kültürlerinde kök büyümesi ve solasadin birikimi üzerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan maya ekstraktı, SA ve pektinin etkilerini inceleyen Jain ve Singh (2015), 28 günlük kültür sonrasında en yüksek kök büyümesinin 1 g/l konsantrasyonunda uygulanan maya ekstraktından elde edildiğini belirlenmiştir. Bu uygulamayla kök büyümesi başlangıçtaki kök miktarına göre 70.4 kat artarken, kontrol grubunda 17.8 kat artış tespit edilmiştir. Maya ekstraktının 2 ve 3 g/l konsantrasyonları ile SA'nın 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonunda kök büyümesindeki artış kontrol grubuna göre daha yüksek olurken, en düşük değerler 500 µM SA uygulaması ile pektinin bütün uygulamalarından elde edilmiştir. Bu uygulamalarda kök büyümesindeki artış kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur. Araştırmada biyotik elisitörlerin kök büyümesi ve solasodin üretimi üzerindeki etkisinin birbirinden bağımsız olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir. Nitekim 28 günlük kültür sonrasında en yüksek solasodin miktarı 151.23 µg/g ile %1 pektin uygulanan

saçak köklerden elde edilirken; bu değerin kontrol grubu saçak köklerden 23 kat; dış koşullarda yetiştirilen bitki köklerinden de 88 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. En yüksek kök gelişiminin sağlandığı 1 g/l maya ekstraktı uygulamasından ise 2.13 µg/g ile en düşük solasadin miktarı elde edilmiştir. Araştırmada bütün pektin ve SA uygulamaları ile 1g/l konsantrasyonu dışındaki maya ekstraktı uygulamalarının solasadin üretimini kontrole göre önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir.

Gentiana dinarica türünün iki farklı saçak kök klonunda abiyotik (SA, jasmonik asit ve MeJA) ve biyotik (kitosan ve maya ekstraktı) elisitörlerin büyüme ve ksanton birikimi üzerine etkisinin incelendiği araştırmada (Krstić-Milošević vd., 2017), dominant ksanton norswertianin-1-primeverozid üretiminin, test edilen abiyotik elisitörlerin hiçbirinden önemli ölçüde etkilenmezken, kitosan uygulamasının bu metabolitin birikimini uyardığı tespit edilmiştir. Kullanılan bütün elisitörlerin en yüksek konsantrasyonlarının ksanton aglikon norswertianinin içeriğini güçlü bir şekilde arttırırken, glikozit norswertianin-1-o-primeverosit üretimini düşürdüğü tespit edilmiştir. Norswertianin üretimini arttırmada en etkili olan uygulamaların 7 gün süreyle uygulanan 200 µM SA ile 50 mg/l kitosanın olduğu ve bu uygulamalarla norswertianin içeriğinde sırasıyla 7.7 ve 24 kat artış sağlandığı saptanmıştır.

Ho vd. (2018)'de *Polygonum multiflorum* adventif kök kültürlerinde fenolik bileşiklerin üretiminin artırılması için abiyotik (metil jasmonat (MeJA) ve SA) ve biyotik (maya ekstraktı ve kitosan) elisitörlerin etkilerini incelemişlerdir. Araştırmada en yüksek yaş ve kuru kök ağırlıkları ile kök büyüme indeksi bakımından en yüksek değerler 100 mg/l konsantrasyonunda uygulanan maya ekstraktından elde edildiği belirlenmiştir. Abiyotik elisitörler uygulanan kültürlerde, diğer uygulamalara göre daha yüksek kuru ağırlık yüzdesinin elde edildiği tespit edilmiştir. Tüm elisitörlerin düşük konsantrasyonları (50 µM MeJA ve SA ve 50 mg/l maya ekstraktı), performansı kontrolden daha kötü olan kitosan dışında sekonder metabolit üretiminde en etkili konsantrasyonlar olarak saptanmıştır. Çeşitli fenolik bileşiklerin HPLC ile yapılan analizleri sonucunda kontrole kıyasla (10.35 mg/g) 50 µM MeJA uygulanan köklerde (22.08 mg/g) yaklaşık 2 kat daha yüksek bulunmuştur. Araştırmada ayrıca DPPH yöntemi ile yapılan antiradikal aktivite analizi sonucunda 50, 100 ve 200 µM MeJA uygulamaları ile 50, 100 ve 200 mg/l maya ekstraktı uygulamalarında kontrollere göre çok daha yüksek antiradikal aktivite tespit edilmiştir.

2.5. *Isatis* Türlerinde Sekonder Metabolit Verimini Artırmak Amacıyla Yapılan Çalışmalar

Bitkilerde *in vitro* koşullarda özellikle farmasötik metabolitlerin birikimini artırabilecek maliyeti düşük etkin stratejilerin araştırılması en önemli çalışma konularından birisidir. Bu amaçla *Isatis* türlerinde gerçekleştirilen araştırmalar aşağıda sunulmuştur.

Geleneksel Çin tıbbında "Banlangen" ve "Daqingye" adıyla yaygın olarak kullanılan ve kayda değer bir antiviral etkinlik gösteren *Isatis indigotica*'nın kök ve yapraklarında lignan birikimi üzerine MeJA uygulamaları ile lignan sentezi ile ilişkili gen ve AP2/ERF tipi transkripsiyon faktörleri incelenmiştir. Araştırmada MeJA uygulamalarının fenilpropanoid biyosentezinde yer alan üç genin (*IiPAL*, *IiC4H*, *Ii4CL*), lignan biyosentezinde yer alan beş genin (*IiCAD*, *IiC3H*, *IiCCR*, *IiDIR* ve *IiPLR*) ve 112 varsayılan AP2/ERF transkripsiyon faktörünün farklı ekspresyon düzeylerini ortaya çıkardığı saptanmıştır. Ek olarak, larisiresinol biyosentezinin dört ara ürününün de uyarıldığı bulunmuştur. Araştırmada anahtar gen olarak tanımlanan *IiC3H*'nin aşırı ekspresyonunun, *I. indigotica* saçak köklerde ariciresinol üretimini artırdığı belirlenmiştir (Chen vd., 2015).

Isatis tinctoria'da flavonoid üretimini artırmak için *Agrobacterium rhizogenes*'le transformasyon sonucu elde edilen saçak köklerin kullanıldığı araştırmada, V. hat en verimli hat olarak belirlenmiş ve bu hatta transformasyon *rolB*, *rolC* ve *auxI*'in PCR amplifikasyonları ile doğrulanmıştır. Saçak köklerin kültür parametreleri Box-Behnken tasarımı ile optimize edildiği araştırmada, sekiz biyoaktif flavonoid bileşeni (rutin, eohesperidin, buddleosid, liquiritigenin, quercetin, isorhamnetin, kaempferol ve isoliquiritigenin) LC MS/MS ile belirlenmiştir. Optimal koşullar altında, 24 günlük saçak köklerde toplam flavonoid birikimi 438.10 µg/g ile 2 yaşındaki tarlada yetişen bitkilerinkine (341.73 µg/g) göre önemli bir üstünlük sergilediği saptanmıştır. Ayrıca saçak köklerden elde edilen ekstraktların, tarlada yetiştirilen kök ekstraktlarına göre daha düşük IC50 değerleri ile daha iyi antioksidan aktivite gösterdikleri de belirlenmiştir (Gai vd., 2015a).

Agrobacterium rhizogenes transformasyonu sonucunda elde edilen *Isatis tinctoria* türüne ait saçak köklere Box-Behnken tasarımı ile optimize edilmiş kültür koşullarında 6 farklı alkaloidin miktarı sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile belirlenmiştir (Gai vd., 2015b). Kültür sıcaklığının 24.7°C, inokülasyon yoğunluğunun %0.75, sakkaroz konsantrasyonunun %3.14 ve başlangıç pH'sının 5.8 olarak ayarlandığı ½ MS ortamında 23 gün süreyle kültüre alınan köklerde maksimum biyokütle artışı ve toplam alkaloid içeriği 521.77 µg/g olarak tespit edilmiştir. Toplam alkaloid birikiminin 2 yaşlı tarlada yetişen bitkilerin köklerine (464.69 µg/g) kıyasla daha yüksek olduğu da tespit edilmiştir.

Abiyotik elisitör olarak immobilize edilmiş *Aspergillus niger* ve *Aspergillus oryzae*'yi *Isatis tinctoria* saçak kök kültürlerine uygulayan Jiao vd. (2018a), bu elisitörlerin flavonoidlerin sentezi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Immobilize *A. niger*'in daha iyi bir elisitör olarak belirlendiği araştırmada, 3018.31 µg/g ile en yüksek flavanoid birikimi spor konsantrasyonunun 104 spor/ml, sıcaklığın 30°C, ortamın başlangıç pH değerinin 7.0 ve uygulama süresinin 72 saat olarak ayarlandığı koşullarda elde edildiği belirlenmiştir. Bu koşullar altında kültüre alınan köklerde kontrol grubuna göre 6.83 kat daha fazla flavanoid birikiminin elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca flavonoid biyosentetik yolunda yer alan ilgili genlerin ifadesini artırarak sinyal moleküllerinin birikimini ve oksidatif stresin yoğunluğunu uyardığı da saptanmıştır. Araştırma sonucunda immobilize edilmiş *A. niger* ile saçak kök kültürlerinin 5 kez başarılı bir şekilde kullanılabileceği de ifade edilmiştir.

Farmakolojik olarak aktif flavonoidlerin üretimini arttırmak için *Isatis tinctoria* saçak kök kültürlerine kitosan uygulayan Jiao vd. (2018c), 24 günlük kültürlere 36 saat süreyle 150 mg/l konsantrasyonunda uyguladıkları kitosanın toplam flavanoidlerin miktarını kontrole göre 7.08 kat artırdığını tespit etmişlerdir. Özellikle çoklu hidroksil grupları içeren flavonoidlerin (rutin, kuersetin, isorhamnetin ve isoliquiritigenin) kitosan uygulanmış saçak köklerde önemli ölçüde arttığının belirlendiği araştırmada, aralarında *CHS* ve *F3'H*'nin bulunduğu flavonoid biyosentez yolunda ilgili genlerin transkripsiyonlarının da yükseldiği saptanmıştır. Ayrıca kitosan uygulanmış köklerden elde edilen ekstraktların, kontrol grubu köklerden elde edilen ekstraktlara göre daha düşük IC50 değerleri ile daha yüksek antioksidan aktiviteler sergiledikleri de tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda *Isatis tinctoria* saçak köklerinde katma değeri yüksek

flavonoidlerin üretimini artırmak için basit ve uygun maliyetli bir elisitör olarak kitosanın başarılı bir şekilde kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Isatis tinctoria türüne ait saçak köklerde farmakolojik olarak aktif flavonoidlerin üretimini artırmak amacıyla ultraviyole-A, ultraviyole-B ve ultraviyole-C ışınlarının kullanıldığı araştırmada, 108 kJ/m² UV-B radyasyonuna maruz bırakılan saçak köklerde flavonoid birikiminin kontrole göre 16.51 kat arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, ultraviyole-B radyasyonu uygulanmış saçak köklerde flavonoid biyosentezinde çok önemli bir rol oynayabileceği öne sürülen *CHS* ekspresyonunun da 405.84'e kadar yükseldiği belirlenmiştir. Araştırma sonucunda *I. tinctoria* saçak kök kültürlerinde, ultraviyole-B uygulamasının basit ve biyolojik olarak aktif flavonoidlerin üretimini artırmak için uygun bir yaklaşım olduğu ifade edilmiştir (Jiao vd., 2018b).

Isatis tinctoria türüne ait 24 günlük saçak kök kültürlerinde farmakolojik olarak aktif alkaloidlerin ve flavonoidlerin üretimini arttırmak için dışsal sinyal molekülleri olarak MeJA ve SA uygulamaları yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda yapılan uygulamalar arasında en yüksek toplam alkaloid miktarı 28.18 saat süreyle uygulanan 142.61 µM SA; en yüksek flavonoid miktarı da 41.87 saat uygulanan 179.54 µM MeJA uygulamasından elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca alkaloid ve flavonoid biyosentez basamaklarında yer alan genlerden *YUCCA*, *CHI* and *F3'H* genlerinin ekspresyon düzeylerinin bu uygulamalar sonucunda arttığı ve bu genlerin hedef fitokimyasalların verimini arttırmada önemli bir rol oynayabileceği de bildirilmiştir (Gai vd., 2019).

Kanser ve Alzheimer gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan ve farmakolojik olarak aktif bileşikler olan triptantrin ve indirubinün üretimini artırmak için *Isatis demiriziana* türüne ait *in vitro* bitkilere farklı konsantrasyonlarda MeJA ve putresin uygulanmıştır (Karakaş, 2019). MeJA uygulanmış bütün bitkiciklerin yapraklarında triptantrin üretiminde bir artış gözlenirken, triptantrin üretimindeki en yüksek artış 154.026 µg/g ile 1.0 mM MeJA uygulanmış yapraklardan elde edilmiştir. Bu uygulama ile triptantrin miktarı kontrole göre yaklaşık 2.85 kat daha yüksek bulunmuştur. Putresin uygulanmış bitkiciklerin yapraklarında triptantrin miktarının ise kontrole göre yaklaşık 2.56 kat azaldığı belirlenmiştir. İndirubin miktarı bakımından yapılan değerlendirmelerde en yüksek indirubin miktarının 11.274 µg/g ile 0.1 mM MeJA içeren ortamlarda kültüre

alınan bitkiciklerin yapraklarında elde edilirken, putresin uygulamalarının indirubin üretimi üzerinde herhangi bir olumlu etki göstermediği tespit edilmiştir.

Isatis constricta'daki değerli indol alkaloidlerinin birikimini artırmak için farklı konsantrasyonlardaki (0, 0.25, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg/l) gümüş nanopartiküllerini *in vitro* koşullarda uygulayan Karakaş (2020), uygulama yapılmış sürgünlerden elde ettiği yapraklarda indirubin, indigotin ve triptantrin miktarlarındaki değişimleri incelemiştir. En yüksek indigotin (1003 µg/g) ve triptantrin (4.59 µg/g) miktarları 2 mg/l konsantrasyonundaki gümüş nanopartikülleri uygulanarak 5. günde hasat edilen yapraklarda tespit edilmiştir. Bu uygulama ile indigotin ve triptantrin üretimi kontrole göre sırasıyla 1.15 ve 1.71 kat daha fazla gerçekleşmiştir. Uygulama süresinin 10 ve 15 güne uzamasının bu alkaloidlerin birikiminde azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. Araştırmada indirubin üretiminin bütün gümüş nanopartikül uygulamalarından olumsuz yönde etkilendiği ve kontrole göre daha düşük değerlerin elde edildiği belirlenmiştir.

Yapılan ayrıntılı literatür taramaları sonucunda *Isatis tinctoria*'da indol alkaloidlerin üretimi üzerine biyotik elisitörlerden maya ekstraktı, kitosan ve pektinin etkilerinin incelendiği bir çalışmanın olmadığı tespit edilmiştir. Sunulan bu tezde bu biyotik elisitörlerin çivit otu kök kültürlerinde kök gelişimi ile indol alkaloidlerinden indigotin ve indirubin birikimi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında bitkisel materyal olarak Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilen *Isatis tinctoria* (çivit otu) türüne ait tohumların *in vitro* koşullarda çimlendirilmesiyle elde edilen kökler kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohumların *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi

Çivit otuna ait tohumların (Şekil 3.1a) çimlendirilmesi için öncelikle tohumlarda yüzey sterilizasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu önce Gai vd. (2015a) tarafından, çivit otunda başarılı sonuçlar verdiği belirlenen protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tohumlar önce 45 saniye %70 etanol içinde bekletilmiş, ardından %4 (h/h)'lük ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 8 dakika boyunca yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra tohumlar 5 kez steril saf su ile iyice durulanmıştır. Tohumlara çimlendirme oranını artırmak için gibberellik asit (GA₃) uygulaması yapılmasına gerek olup olmadığını anlamak üzere bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sterilize edilen tohumlar Gai vd. (2015a) tarafından, çivit otunda başarılı sonuçlar verdiği belirlenen 6 g/l agar ve 30 g/l sakkaroz içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı ile içinde 0.5 mg/l GA₃ bulunan aynı bileşimdeki besin ortamlarına aktarılarak sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmış iklim odalarında 16 saat ışık (50 µmol/ m²s ışık şiddetinde) 8 saat karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Bu ön deneme sonucunda tohumların GA₃ içermeyen besin ortamlarında da 3-4 gün içinde başarıyla çimlendikleri tespit edilmiştir. Ancak bu sterilizasyon yöntemiyle tohumların yarıya yakınında enfeksiyon görülmüştür. Bu sonuçlara göre tohumlara hem besin ortamlarına aktarılmadan önce ön uygulama olarak hem de besin ortamlarına eklemek için GA₃ kullanımına gerek olmadığı, ancak sterilizasyon yönteminde bazı modifikasyonların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Daha etkili bir sterilizasyon işlemi gerçekleştirmek için de tohumlar önce 60 saniye %70 etanol içinde tutulmuş ve steril saf su ile yıkanmalarının ardından %15'lik sodyum

hipoklorit çözeltilisinde 10 dakika çalkalanarak sterilize edilmiştir. Ardından 5 kez steril saf su ile yıkanarak çimlendirme çalışmaları için hazır hale getirilmiştir. Bu sterilizasyon yöntemi kullanılarak sterilize edilen tohumlar, daha sonra içinde 6 g/l agar ve 30 g/l sakkaroz bulunan MS besin ortamlarına aktarılarak, sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmış iklim odalarında 16 saat ışık (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ışık şiddetinde) 8 saat karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır (Şekil 3.1b).



Şekil 3.1. Çivit otu tohumları (a), besin ortamlarına aktarılan tohumların iklim odasındaki görünüşleri (b)

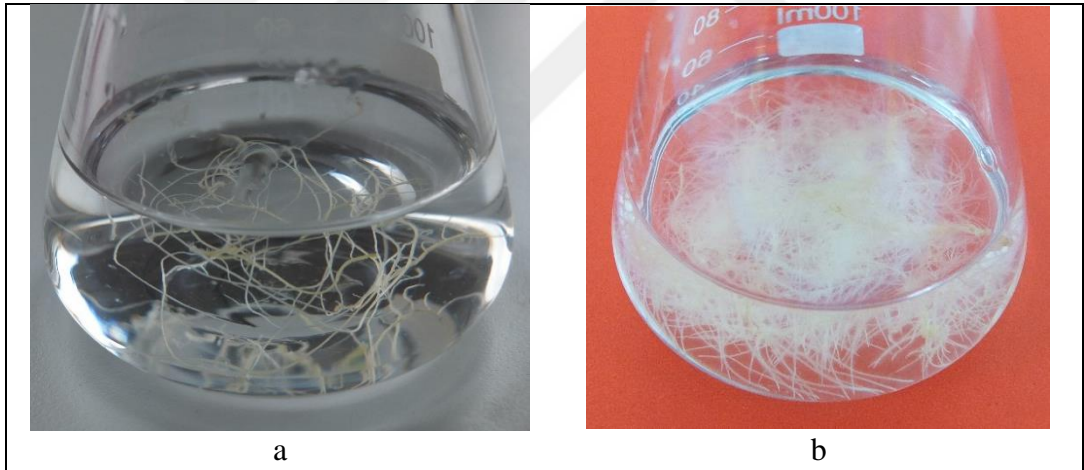
Bu koşullar altında yapılan çimlendirme çalışmaları sonucunda tohumların sağlıklı bir şekilde 3-4 gün içinde çimlendikleri görülmüştür. Bu ortamlarda 2 hafta süreyle kültüre alınarak 3-4 gerçek yapraklı hale gelen fidelerin kök kısımları daha sonra kök kültürlerinin elde edilmesinde kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Çimlenme ortamında 15 gün boyunca kültüre alınan çivit otu bitkicikleri

3.2.2. Köklerin sıvı besin ortamlarında çoğaltılması

Araştırmada tohumların çimlendirilmesi ile elde edilen kökler, inokülasyon yoğunluğu 10 g/l olacak şekilde (TÜBİTAK 120Z523 Nolu proje kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda 10 g/l çivit otu kökleri için en uygun inokülasyon yoğunluğu olarak seçilmiştir) sıvı kök kültürlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu amaçla 0.3 g kök, 30 g/l sakkaroz içeren 30 ml sıvı ½ MS besin ortamında (TÜBİTAK 120Z523 Nolu proje kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda çivit otu kökleri için 30 g/l sakkaroz içeren ½ MS ortamı en uygun besin ortamı olarak seçilmiştir) ve 100 ml'lik erlenler içinde kültüre alınmışlardır (Şekil 3.3a). Kökler daha sonra sıcaklığı 25°C±1 olarak ayarlanmış karanlık koşulların sağlandığı iklim odalarında 90 rpm çalkalama hızında 3 hafta boyunca kültüre alınmışlardır (Şekil 3.3b). Kökler aynı içeriğe sahip besin ortamlarında 2 kez alt kültüre alınarak çoğaltılmalarının ardından elisitör uygulamalarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmişlerdir.



Şekil 3.3. Çimlenen bitkiciklerden alınan köklerin sıvı besin ortamında kültüre alınması (a), sıvı ortamlarda kültüre alınan köklerin gelişme durumları (b)

3.2.3. Köklere biyotik elisitör uygulamalarının yapılması

Kök büyümesi ve indol alkaloidleri birikimine olan etkilerini belirlemek üzere, kök kültürlerine kitosan, maya ekstraktı ve pektin uygulamaları yapılmıştır. Bu amaçla 0.3 g kök, içinde 30 g/l sakkaroz bulunan 30 ml sıvı ½ MS besin ortamında 21 gün süreyle kültüre alınmışlardır. Ardından kökler, içinde farklı konsantrasyonlarda biyotik elisitör içeren taze hazırlanmış aynı içerikteki besin ortamlarına aktarılmışlardır. Kitosan 100, 150, 200 ve 250 mg/l, maya ekstraktı 1, 2, 3 ve 4 g/l ve pektin % 0.5, 1,

2 ve 3 konsantrasyonlarda besin ortamlarına ilave edilmiştir. Maya ekstraktı ve kitosanın stok çözeltileri filtre sterilizasyonu yapıldıktan sonra belirtilen konsantrasyonlarda otoklavda sterilize edilmiş ortamlara ilave edilmiştir. Kontrol grubuna ise eşit steril saf su ilave edilmiştir. Pektin ise belirtilen konsantrasyonlarda tartılarak besin ortamlarına sterilizasyon öncesi ilave edilmişlerdir. Kültürler sıcaklığı 25°C olarak hazırlanmış iklim odalarında ve karanlık koşullarda 90 rpm devir hızında çalkalanarak 7 gün süreyle kültüre alınmışlardır. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü, her tekerrürde 5 erlen olacak şekilde kurulmuştur (Şekil 3.4). Araştırmada 7 günlük kültür süresi sonunda hasat edilerek yıkanan köklerin fazla suları kurutma kâğıdına emdirildikten sonra analizlerde kullanılmışlardır.



Şekil 3.4. Biyotik elisitör uygulamalarının yapıldığı kökler

3.2.4. Köklerde yapılan incelemeler

3.2.4.1. Yaş kök ağırlığının belirlenmesi

Hasat edilen köklerin ağırlıklarının analitik terazide tartılmasıyla bulunmuştur. Değerler g/100 ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.4.2. Kök büyüme indeksinin belirlenmesi

Kök büyüme indeksi aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{Büyüme indeksi} = (\text{hasat edilen yaş kök ağırlığı (g)} - \text{inoküle edilen yaş kök ağırlığı (g)}) / \text{inoküle edilen yaş kök ağırlığı (g)} \quad (3.1)$$

3.2.4.3. Kuru kök ağırlığının belirlenmesi

Köklerin 40°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmalarının ardından analitik terazide tartılmaları ile belirlenmiştir. Değerler g/100 ml cinsinden verilmiştir (Tayoub vd., 2016).

3.2.5. Çivit otu köklerinde ekstraksiyon işleminin yapılması

Kurutularak toz haline getirilmiş 0.1 g kök (Şekil 3.5a), %80 metanol çözeltisinde (20 ml) ultrasonik su banyosunda infrared ışık altında 30 dakika boyunca ekstrakte edilmiştir (Şekil 3.5b). Ardından ekstraktlar filtre kâğıdından süzülmüştür. Rotary evaporatör yardımıyla 45°C sıcaklık ve vakum altında kuru ekstraktlar elde edilmiştir. Daha sonra kurutulmuş ekstrakt HPLC grade metanol ile çözülüp, analizlerde kullanılmıştır.



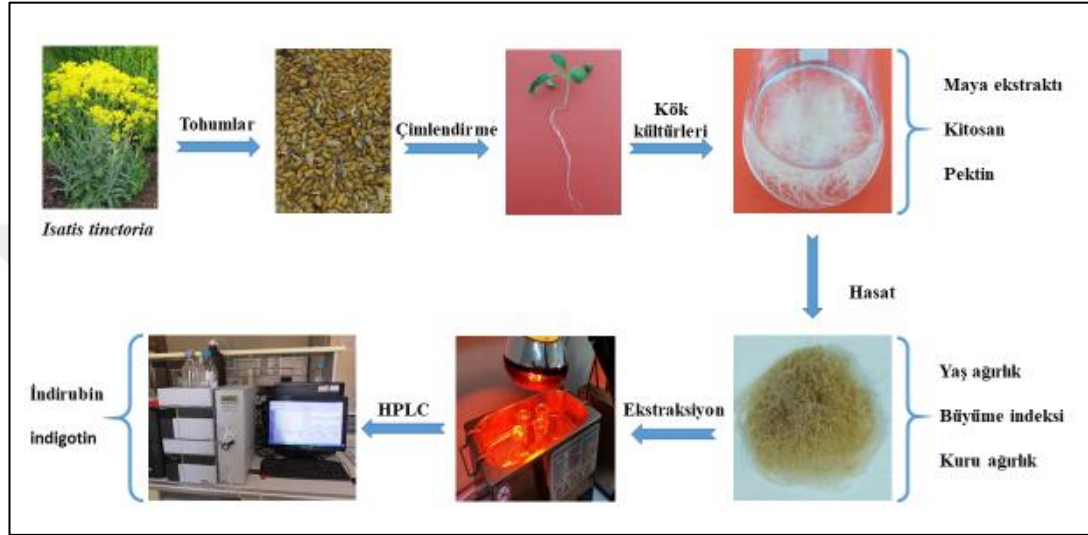
Şekil 3.5. Toz haline getirilmiş kökler (a), ultrasonik banyo ve infrared ışık altında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi (b)

3.2.6. Köklerde indigotin ve indirubin miktarlarının HPLC ile belirlenmesi

Elisitör uygulamalarının ardından köklerden elde edilen ekstraktlarda indirubin ve indigotin olmak üzere *Isatis* türlerinin en önemli iki indol alkaloidinin miktarları HPLC (SHIMADZU, Japonya) ve DAD detektörü kullanılarak belirlenmiştir. Araştırmada 0.45 µm'lik filtreden geçirilen ekstraktlar, oda sıcaklığında Agilent TC-C18 kolonu (5 µm, 250 mm x 4.60 mm) kullanılarak analiz edilmişlerdir. HPLC ile yapılan analizlerde indirubin ve indigotin 289 nm dalga boyunda okunmuştur. Mobil faz olarak HPLC grade metanol ve ultra saf su (80:20, h/h) kullanılarak izokritik olarak

gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 ml/dk, enjeksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlanmıştır (Zhang vd., 2012). Bu alkaloidlere ait standartlar metanol ile farklı konsantrasyonlarda (µg/ml) hazırlanarak HPLC’de kalibrasyonları yapılmıştır.

Araştırmada gerçekleştirilen işlem basamaklarının şematik görünümü Şekil 3.6’da sunulmuştur.



Şekil 3.6. Araştırmada gerçekleştirilen işlem basamaklarının şematik olarak görünümü

3.2.7. İstatistik analizlerin yapılması

Araştırma sonucunda elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 26.0 istatistik programı kullanılarak yapılmış olup, uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çivit otu bitkisine ait *in vitro* koşullarda çimlenen bitkiciklerden alınan köklerin sıvı besin ortamlarında çoğaltılmasıyla elde edilen kök kültürlerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan maya ekstraktı, kitosan ve pektinden oluşan biyotik elisitörlerin, kök büyümesi ile bitkinin en önemli indol alkaloidleri olan indigotin ve indirubin birikimi üzerine olan etkilerinin incelendiği araştırmada elde edilen sonuçlar aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

4.1. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının Yaş Kök Ağırlığı Üzerine Etkileri

Araştırmada biyotik elisitörlerin çivit otu köklerinin büyümeleri üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla incelenen ilk kriter yaş kök ağırlığı olup, bu kriter bakımından elde edilen bulgular Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının yaş kök ağırlığı (YKA) üzerine etkileri

Maya ekstraktı (g/l)					
Konsantrasyon	Kontrol	1.0	2.0	3.0	4.0
YKA (g/100 ml)	4.378 c*	5.423 a	4.740 b	4.622 b	4.590 b
Kitosan (mg/l)					
Konsantrasyon	Kontrol	100	150	200	250
YKA (g/100 ml)	4.378 a	4.142 ab	3.961 bc	3.865 bc	3.652 c
Pektin (%)					
Konsantrasyon	Kontrol	0.5	1.0	2.0	3.0
YKA (g/100 ml)	4.378	4.176	4.167	4.152	4.156

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır (P<0.05).

Maya ekstraktının yaş kök ağırlığı üzerine olan etkilerine ilişkin verilerin sunulduğu Çizelge 4.1. incelendiğinde, yaş kök ağırlığı bakımından yapılan istatistiksel analizler sonucunda, maya ekstraktı uygulamalarının kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak yaş kök ağırlığını önemli derecede değiştirdiği tespit edilmiştir (P<0.05). En yüksek yaş kök ağırlığı 5.423 g/100 ml ile 1.0 g/l konsantrasyonunda maya ekstraktı uygulanan köklerden elde edilirken, bu uygulamayı sırasıyla 2.0 g/l, 3.0 g/l ve 4.0 g/l maya ekstraktı uygulamalarının takip ettiği belirlenmiştir. Maya ekstraktı uygulamalarında konsantrasyonun 1.0 g/l’den 2.0 g/l’ye çıkmasıyla yaş kök ağırlığının azaldığı, ancak 2.0 g/l, 3.0 g/l ve 4.0 g/l konsantrasyonlarındaki maya ekstraktı

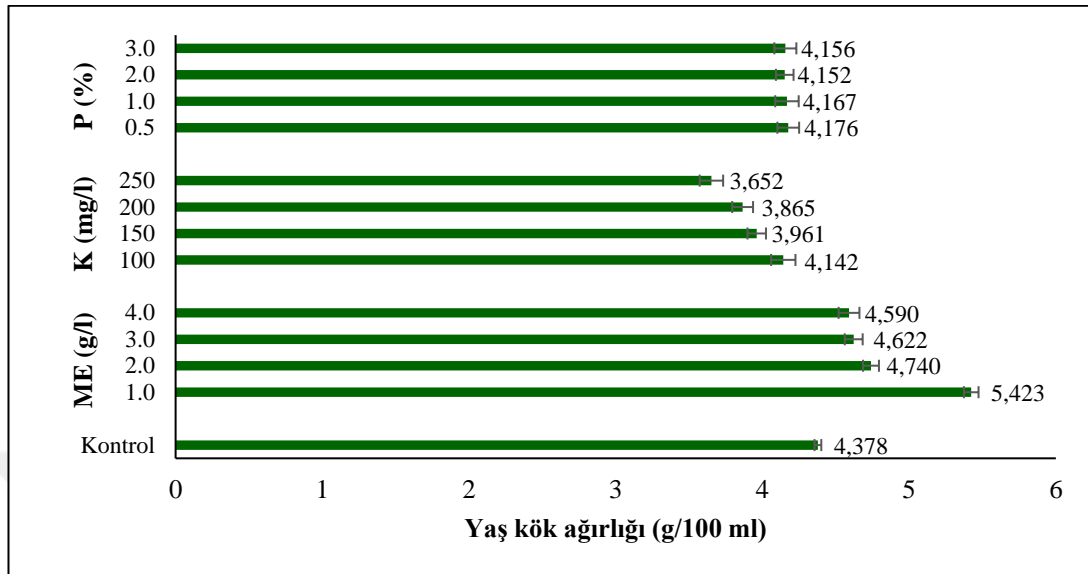
uygulamalarının yaş kök ağırlığında önemli bir farklılığa neden olmadığı saptanmıştır. Araştırmada maya ekstraktı uygulamalarının kontrole göre yaş kök ağırlığını önemli derecede artırdığı da tespit edilmiştir. Buna göre maya ekstraktının çivit otu köklerinde yaş kök ağırlığını artırdığı, ancak düşük konsantrasyonlarda çok daha yüksek olan teşvik edici etkinin, konsantrasyonun yükselmesiyle birlikte azaldığı belirlenmiştir.

Araştırmada kullanılan bir diğer biyotik elisitör de kitosan olup, kitosanın hücre yaş ağırlığı üzerine olan etkileri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Yapılan istatistik analizleri sonucunda yaş hücre ağırlığının kitosan uygulamalarına bağlı olarak önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). En yüksek yaş kök ağırlığının 4.378 g/100 ml değeri ile kontrol grubu köklerle 4.142 g/100 ml değeri ile 100 mg/l kitosan uygulanan köklerden elde edildiği belirlenmiştir. Araştırmada kitosan konsantrasyonunun 150 mg/l’ye çıkmasıyla yaş kök ağırlığının da azalmaya başladığı ve kontrole göre daha düşük değerlerin elde edildiği saptanmıştır. Yaş kök ağırlığındaki azalmanın konsantrasyon artışına paralel olarak arttığı tespit edildiği araştırmada, kitosan uygulamalarının özellikle 150 mg/l’den itibaren çivit otu kök kültürlerinde kök yaş ağırlığı üzerine engelleyici etkilerde bulunduğu belirlenmiştir.

Pektin de *in vitro* sekonder metabolit üretiminde kullanılan bir diğer biyotik kökenli elisitör olup, sunulan bu araştırmada çivit otu kök kültürlerine uygulanan pektinin yaş kök ağırlığı üzerinde önemli bir etkide bulunmadığı belirlenmiştir. Pektin uygulamaları ile 4.176 g/100 ml ile 4.152 g/100 ml arasında değişen miktarlarda yaş kök ağırlığı elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Kontrole göre pektin uygulamalarının özellikle artan konsantrasyonlarına paralel olarak yaş kök ağırlığında az da olsa bir azalmaya neden olduğu, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak önemli bulunmadığı tespit edilmiştir.

Araştırmada kullanılan biyotik elisitörlerin yaş kök ağırlığı üzerine olan etkileri bir arada incelendiğinde (Şekil 4.1), maya ekstraktının özellikle düşük konsantrasyonlarda kök gelişimini teşvik ettiği, kitosan uygulamalarının konsantrasyon artışına bağlı olarak yaş kök ağırlığını düşürdüğü, pektin uygulamalarının ise kontrole kıyaslandığında yaş kök ağırlığı üzerine önemli bir etkide bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre 1.0 g/l konsantrasyonunda

uygulanan maya ekstraktının, çivit otu köklerinde yaş kök ağırlığı bakımından en yüksek değerlerin elde edildiği uygulama olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının yaş kök ağırlığı üzerine etkileri

4.2. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının Kök Büyüme İndeksi (BI) Üzerine Etkileri

Yapılan biyotik elisitör uygulamalarının bir diğer kök büyüme kriteri olan kök büyüme indeksi üzerine olan etkilerinin de incelendiği bu araştırmada, elde edilen bulgular Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının kök büyüme indeksi (BI) üzerine etkileri

		Maya ekstraktı (g/l)			
Konsantrasyon	Kontrol	1.0	2.0	3.0	4.0
BI	3.378 c*	4.423 a	3.740 b	3.622 b	3.590 b
		Kitosan (mg/l)			
Konsantrasyon	Kontrol	100	150	200	250
BI	3.378 a	3.142 ab	2.961bc	2.865 bc	2.652 c
		Pektin (%)			
Konsantrasyon	Kontrol	0.5	1.0	2.0	3.0
BI	3.378	3.176	3.167	3.152	3.156

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır (P<0.05).

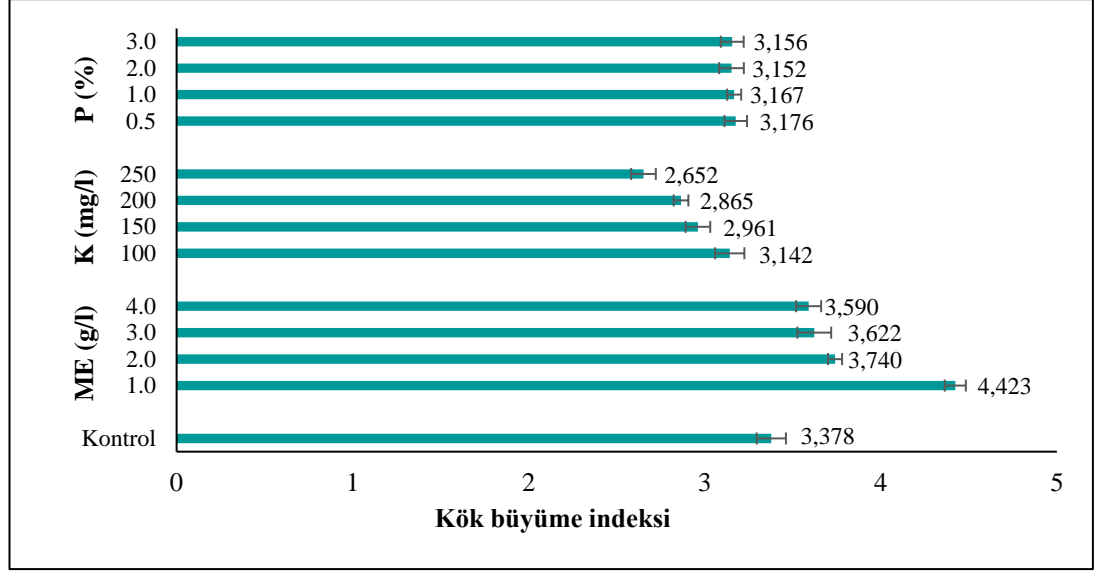
Kök büyüme indeksinin kullanılan maya ekstraktı konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli derecede değiştiğinin belirlendiği araştırmada (P<0.05), en yüksek kök

büyüme indeksi 4.423 ile 1.0 g/l konsantrasyonunda kullanılan maya ekstraktı uygulamasından elde edilmiştir. Kullanılan konsantrasyon artıkça maya ekstraktının kök büyüme indeksi üzerine olan pozitif etkisinin de azaldığı belirlenmiştir. En düşük kök büyüme indeksi ise 3.378 ile kontrol grubu köklerde saptanmıştır. Sonuç olarak maya ekstraktı uygulamalarının özellikle de düşük konsantrasyonlarda çivit otu köklerinde büyümeyi teşvik ettiği belirlenmiştir.

Kitosan uygulamalarının kök büyüme indeksi üzerine olan etkilerinin önemli bulunduğu araştırmada ($P<0.05$), 150 mg/l ve üzerindeki kitosan konsantrasyonlarının kök büyüme indeksi üzerine engelleyici bir etkide bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Kitosanın bu engelleyici etkisinin konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı da belirlenmiştir. Büyüme indeksi bakımından en yüksek değerler kontrolle birlikte 100 mg/l kitosan uygulanan köklerden elde edilirken, en düşük büyüme indeksi değeri de 250 mg/l konsantrasyonunda kitosan uygulanan köklerde tespit edilmiştir.

Araştırmada kullanılan bir diğer biyotik elisitör de pektin olup, pektin uygulamalarının kök büyüme indeksi üzerinde önemli bir etkide bulunmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Pektin uygulanan köklerde büyüme indeksi 3.176 ile 3.156 arasında değişmiştir. Her ne kadar konsantrasyon artıkça kontrole göre kök büyüme indeksinde küçük azalmalar görülse de bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Kök büyüme indeksi üzerine kullanılan biyotik elisitörlerin etkileri toplu olarak değerlendirildiğinde, maya ekstraktı uygulamalarının özellikle de düşük konsantrasyonlarda büyüme indeksi üzerinde olumlu etkide bulunurken, kitosan uygulamalarının yüksek konsantrasyonlarda kök büyüme indeksini azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.2). Pektin uygulamalarının ise kök büyüme indeksi üzerinde önemli bir etkide bulunmadığı saptanmıştır. Araştırmada en yüksek kök büyüme indeksinin 4.423 ile 1.0 g/l konsantrasyonundaki maya ekstraktı uygulamasından elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının kök büyüme indeksi (BI) üzerine etkileri

4.3. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının Kuru Kök Ağırlığı (KKA) Üzerine Etkileri

Maya ekstraktı, kitosan ve pektinden oluşan biyotik elisitörlerin farklı konsantrasyonlarda uygulandıkları çivit otu bitkisine ait kök kültürlerinde kuru kök ağırlığı üzerindeki etkileri Çizelge 4.3’de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının kuru kök ağırlığı üzerine etkileri

Maya ekstraktı (g/l)					
Konsantrasyon	Kontrol	1.0	2.0	3.0	4.0
KKA (g/100 ml)	0.324 c	0.393 a	0.364 b	0.362 b	0.369 b
Kitosan (mg/l)					
Konsantrasyon	Kontrol	100	150	200	250
KKA (g/100 ml)	0.324 a	0.316 a	0.312 ab	0.310 ab	0.287 b
Pektin (%)					
Konsantrasyon	Kontrol	0.5	1.0	2.0	3.0
KKA (g/100 ml)	0.324	0.318	0.314	0.310	0.312

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır (P<0.05).

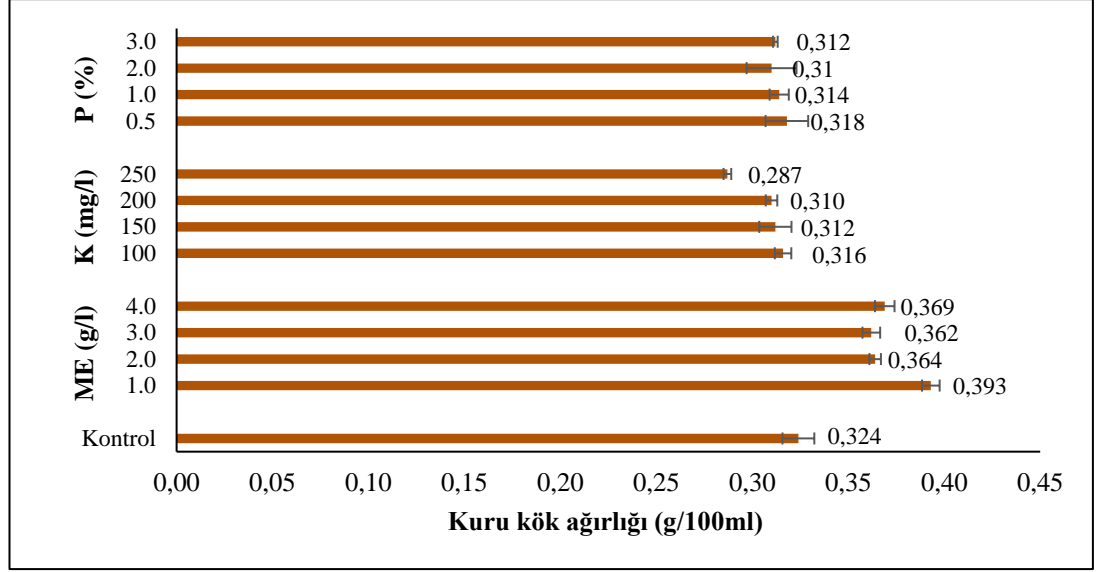
Yapılan istatistik analizler sonucunda kuru kök ağırlığının maya ekstraktı uygulamalarına bağlı olarak önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir (P<0.05). Maya ekstraktı uygulamaları arasında en yüksek kuru kök ağırlığının, yaş kök ağırlığı ve kök büyüme indeksinde olduğu gibi 1.0 g/l konsantrasyonunda yapılan uygulamadan elde edildiği belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça kuru kök ağırlığında azalmaların

meydana geldiğinin tespit edildiği araştırmada, en düşük büyüme indeksi ise 0.324 g/100 ml ile kontrol grubu köklerde saptanmıştır. Düşük konsantrasyonlarda yapılan maya ekstraktının kök gelişimi üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu, ancak bu teşvik edici etkinin konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Kitosan uygulamalarının kök kuru ağırlığı üzerine olan etkileri incelendiğinde, kontrol grubu köklerle 100 mg/l, 150 mg/l ve 200 mg/l kitosan uygulanan kökler arasında önemli bir fark bulunmadığı, ancak konsantrasyonun 250 mg/l'ye çıkmasıyla kuru kök ağırlığının önemli derecede düştüğü tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Nitekim araştırmada en düşük kuru kök ağırlığı 0.287 g/100 ml ile 250 mg/l kitosan uygulanan köklerden elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Pektin uygulamalarının ise diğer kök gelişim kriterlerinde olduğu gibi kuru kök ağırlığı üzerinde de önemli bir etkide bulunmadığı, pektin uygulanan köklerde 0.324 g/100 ml ile 0.310 g/100 ml arasında değişen değerlerde kuru kök ağırlığının elde edildiği tespit edilmiştir.

Biyotik elisitörler ve farklı konsantrasyonlarının kuru kök ağırlığı üzerine olan etkileri toplu olarak incelendiğinde (Şekil 4.3), en yüksek kuru kök ağırlığının diğer kök gelişim kriterlerinde olduğu gibi 1.0 g/l maya ekstraktı uygulamasından elde edildiği belirlenmiştir. Araştırmada kitosan özellikle yüksek konsantrasyonlarda kuru kök ağırlığı üzerinde engelleyici bir etkide bulunurken, pektin uygulamalarının kuru kök ağırlığı üzerinde önemli bir farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının kuru kök ağırlığı üzerine etkileri

4.4. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının İndigotin Birikimi Üzerine Etkileri

Çivit otu bitkisinin en önemli bileşenlerinden biri olan ve doğal mavi renk kaynağı olarak büyük önem taşıyan indigotinin köklerde birikimi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla kök kültürlerine biyotik elisitör olarak farklı konsantrasyonlarda maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının indigotin birikimi üzerine etkileri

		Maya ekstraktı (g/l)			
Konsantrasyon	Kontrol	1.0	2.0	3.0	4.0
İndigotin (µg/g)	442.596 c	1140.520 a	1258.436 a	862.318 b	815.529 b
		Kitosan (mg/l)			
Konsantrasyon	Kontrol	100	150	200	250
İndigotin (µg/g)	442.596 d	1999.472 a	1673.893 b	1315.967 c	1223.991 c
		Pektin (%)			
Konsantrasyon	Kontrol	0.5	1.0	2.0	3.0
İndigotin (µg/g)	442.596 a	267.845 b	192.551 bc	119.154 c	110.170 c

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır (P<0.05).

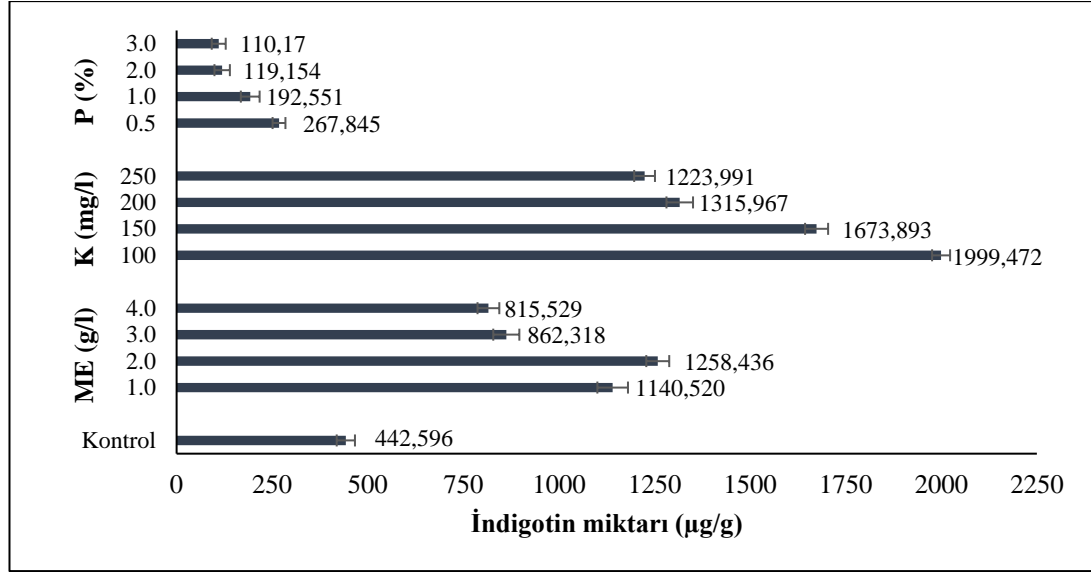
Çizelge 4.4’ün incelenmesinden de anlaşılacağı üzere maya ekstraktı uygulamalarının kullanılan konsantrasyonlara bağlı olarak köklerdeki indigotin miktarını önemli derecede değiştirdiği tespit edilmiştir (P≤0.05). En yüksek değerler 1258.436 µg/g ve

1140.520 µg/g ile sırasıyla 2.0g/l ile 1.0 g/l maya ekstraktı uygulamalarından elde edilmiştir. Ancak maya ekstraktı konsantrasyonunun 3.0 g/l'ye çıkmasıyla indigotin miktarının azalmaya başladığı ve bu azalmanın 4.0 g/l maya ekstraktı uygulamasında da devam ettiği saptanmıştır. Ancak en düşük indigotin miktarının 442.596 µg/g ile kontrol grubundan elde edildiğinin belirlendiği araştırmada, maya ekstraktı uygulamalarının kullanılan konsantrasyonlar arasında farklılıklar olmasına karşın kontrole göre köklerdeki indigotin birikimini artırdığı belirlenmiştir.

Çivit otu kök kültürlerinde indigotin birikimi üzerine etkilerinin incelendiği bir diğer biyotik elisitör de kitosan olup, indigotin birikiminin kullanılan kitosan konsantrasyonlarına bağlı olmak üzere önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ($P \leq 0.05$). Köklerde indigotin birikimini en fazla artıran uygulamanın 100 mg/l kitosan uygulaması olduğu ve bu uygulama ile 1999.472 µg/g indigotin elde edildiği; ve bu uygulamayı 1673.893 µg/g ile 150 mg/l kitosan uygulamasının takip ettiği saptanmıştır. En düşük indigotin miktarının 442.596 µg/g ile kontrol grubu köklerden elde edildiği araştırmada, bütün kitosan uygulamalarının kontrole göre köklerdeki indigotin miktarını artırdığı tespit edilmiştir.

Pektin uygulamalarının da indigotin miktarı üzerinde önemli değişikliklere neden olduğunun belirlendiği araştırmada ($P \leq 0.05$), en yüksek indigotin miktarı 442.596 µg/g ile kontrol grubu köklerde saptanırken, pektin uygulamalarının köklerde indigotin miktarını düşürdüğü tespit edilmiştir. Pektin uygulamalarının indigotin miktarı üzerindeki engelleyici etkisinin konsantrasyon artışına paralel olarak arttığı ve en düşük değer en yüksek pektin konsantrasyonu olan %3 pektin uygulamasından elde edildiği saptanmıştır.

Biyotik elisitörler ve farklı konsantrasyonlarının köklerdeki indigotin birikimi üzerine olan etkileri birarada incelendiğinde (Şekil 4.4), maya ekstraktı ve kitosan uygulamalarının kontrole göre indigotin miktarını artırdığı; pektin uygulamalarının ise düşürdüğü tespit edilmiştir. En yüksek indigotin miktarı ise 100 mg/l kitosan uygulamasından elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının indigotin miktarı üzerine etkileri

4.5. Maya Ekstraktı, Kitosan ve Pektin Uygulamalarının İndirubin Birikimi Üzerine Etkileri

Çivit otu bitkisinin en önemli indol alkaloidlerinden biri olan indirubinin kök kültürlerinde üretimini artırmak için maya ekstraktı, kitosan ve pektinden oluşan biyotik elisitörlerin kullanıldığı araştırmada elde edilen bulgular Çizelge 4.5’de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamalarının indirubin birikimi üzerine etkileri

Maya ekstraktı (g/l)					
Konsantrasyon	Kontrol	1.0	2.0	3.0	4.0
İndirubin (µg/g)	1.811 b	1.558 c	1.740 b	1.915 ab	2.152 a
Kitosan (mg/l)					
Konsantrasyon	Kontrol	100	150	200	250
İndirubin (µg/g)	1.811 c	4.220 a	3.876 a	4.019 a	3.398 b
Pektin (%)					
Konsantrasyon	Kontrol	% 0.5	% 1	% 2	% 3
İndirubin (µg/g)	1.811 c	2.779 b	3.391 a	1.530 d	1.106 e

Aynı satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık vardır (P<0.05).

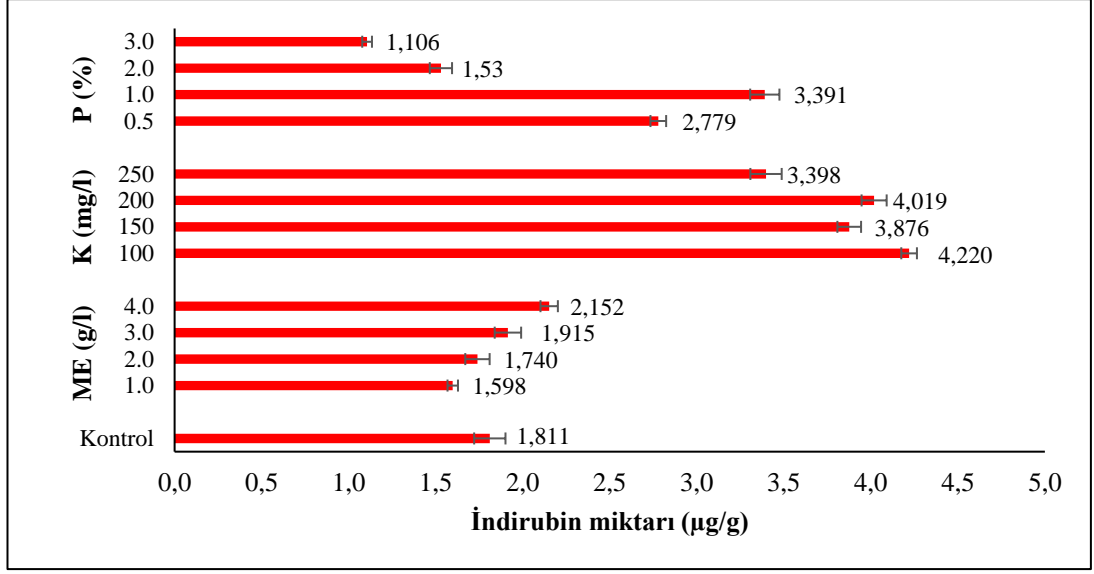
Araştırmada kullanılan biyotik elisitörlerden maya ekstraktının uygulandığı kök kültürlerinde indirubin miktarının maya ekstraktı konsantrasyonuna bağlı olarak önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir (P<0.05). Maya ekstraktı uygulamalarında en yüksek değerler 2.152 µg/g ve 1.915 µg/g ile sırasıyla 4.0 g/l ve 3.0 g/l maya

ekstraktı uygulamalarından elde edildiđi belirlenmiřtir. En dűřuk deđerin ise 1.558 $\mu\text{g/g}$ ile 1.0 g/l maya ekstraktı uygulamasından elde edildiđi tespit edilmiřtir.

Kitosan uygulamalarının kűklerdeki indirubin birikimi űzerine olan etkileri incelendiđinde, indirubin miktarının kitosan uygulamalarına gűre űnemli derecede deđiřtiđi tespit edilmiřtir ($P \leq 0.05$). Arařtırmada 100, 150 ve 200 mg/l kitosan uygulamaları ile en yűksek indirubin birikimi elde edilirken, kitosan konsantrasyonunun 250 mg/l'ye çıkmasıyla indirubin miktarının azaldıđı belirlenmiřtir. En dűřuk indirubin miktarı 1.811 $\mu\text{g/g}$ ile kontrol grubu kűklerde elde edilirken, bűtűn kitosan uygulamalarının kontrole gűre indirubin miktarını artırdıđı saptanmıřtır.

Arařtırmada biyotik elisitűr olarak pektinin kullanıldıđı uygulamalarda da indirubin miktarının pektin uygulamalarına gűre űnemli derecede deđiřtiđi tespit edilmiřtir ($P \leq 0.05$). Pektin konsantrasyonunun %0.5'den %1'e yűkselmesiyle kűklerdeki indirubin miktarının yűkselerek maksimuma ulařtıđı, ancak pektin konsantrasyonun %2 ve %3'e yűkselmesiyle pektinin indirubin birikimine olan teřvik edici etkisinin azaldıđı saptanmıřtır.

Arařtırmada maya ekstraktı, kitosan ve pektinin indirubin birikimi űzerine etkileri toplu olarak incelendiđinde, indirubin birikimi bakımından en yűksek sonuçların kitosan uygulamalarından elde edildiđi belirlenmiřtir (řekil 4.5). Ancak uygun konsantrasyonlar seçildiđinde maya ekstraktı ve pektin uygulamaları ile de kontrole gűre daha yűksek indirubin birikiminin elde edilebileceđi tespit edilmiřtir.



Şekil 4.5. Maya ekstraktı (ME), kitosan (K) ve pektin (P) uygulamalarının indirubin miktarı üzerine etkileri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çivit otu bitkisine ait *in vitro* koşullarda çoğaltılan köklere farklı biyotik elisitör uygulamalarının kök büyümesi ve indol alkaloidleri birikimi üzerine olan etkilerinin incelendiği bu çalışmada, biyotik elisitör olarak farklı konsantrasyonlarda maya ekstraktı, kitosan ve pektin kullanılmıştır.

Pratik, ekonomik ve kolay uygulama özelliği taşıması nedeniyle, bu çalışmada bitkisel materyal olarak çivit otuna ait tohumların çimlendirilmesinden elde edilen kökler kullanılmıştır. *In vitro* sekonder metabolit üretiminde kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin yanı sıra kök kültürleri de hızlı büyüme oranları ve stabil metabolit üretkenlikleri nedeniyle, özellikle kök kaynaklı metabolitlerin elde edilmesinde en çok tercih edilen kültür çeşidini oluşturmaktadır (Carvalho ve Curtis, 1998). Nitekim kök kültürlerinin, birçok metabolitin *in vitro* koşullarda elde edilmesinde başarı ile kullanılan bir kültür tekniği olduğu daha önce yapılan çalışmalarla da ortaya konulmuştur (Hashimoto vd., 1986; Awad vd., 2014; Demirci vd., 2022).

Bitkiler, elisitasyon olarak bilinen ve farklı çevresel faktörlere (biyotik ve abiyotik) karşı hayatta kalma mücadelesinin bir parçası olarak gerekli bileşikleri sentezlemek üzere sekonder metabolizmayı uyarırlar (Gorelick ve Bernstein, 2014). Jasmonik asit, SA ve bunların analog türevleri, bitki hücre ve organ kültürlerinde en sık kullanılan abiyotik elisitörlerdir (Nartop, 2018). Ancak bu elisitörlerin pahalı olması ticari uygulamalar açısından önemli bir engel oluşturmaktadır (Giri ve Zaheer, 2016). Bu çalışmada çivit otuna ait köklere pratik ve ekonomik olmaları nedeniyle uygulanma potansiyeli yüksek bazı biyotik elisitörlerin (maya ekstraktı, kitosan ve pektin) kök büyümesi ve bu türün en önemli indol alkaloidlerinden olan indigotin ve indirubin birikimi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Araştırmada kullanılan biyotik kaynaklı elisitörlerden ilki maya ekstraktıdır. İncelenen bütün kök gelişim kriterleri bakımından en yüksek değerlerin 1.0 g/l konsantrasyonunda yapılan maya ekstraktı uygulamasından elde edildiği; ancak konsantrasyonun artmasıyla bu teşvik edici etkinin azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde patlıcanda saçak kök kültürlerinde en yüksek kök gelişiminin 1g/l maya

ekstraktı uygulamasından elde edildiği tespit edilmiştir (Jain ve Singh, 2015). *Azadirachta indica*'nın saçak köklerinde azadiraktin üretimini artırmak amacıyla kullanılan maya ekstraktının 10, 20 ve 50 mg/l konsantrasyonları arasında kök büyümesi bakımından önemli bir farklılık bulunmazken, konsantrasyonun 100 mg/l ye çıkmasıyla kök büyümesinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Maya ekstraktının biyokütle artışı teşvik edici etkisi belirli amino asitleri, vitaminleri ve mineralleri içeren kompleks azotlu bir bileşik olmasından kaynaklanmaktadır (Srivastava ve Srivastava, 2014). Bununla birlikte *Calotropis gigantea* saçak köklerine uygulanan maya ekstraktının kök büyümesi üzerinde önemli bir etkide bulunmadığı tespit edilmiştir (Sun vd., 2012). Bütün bu sonuçlar, maya ekstraktının biyokütle üzerine olan teşvik edici etkisinin maya ekstraktının konsantrasyonu ile bitki tür ve çeşidine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

Araştırmada hem kök gelişimi hem de metabolit verimine olan etkilerinin incelendiği diğer biyotik elisitörler de kitosan ve pektindir. Kitosanın kök gelişimini baskıladığının belirlendiği araştırma sonuçlarına benzer şekilde, kitosanın 50, 100, 250 ve 500 mg/l konsantrasyonlarında uygulandığı *Azadirachta indica*'nın saçak köklerinde özellikle artan konsantrasyonlarının kök büyümesini kontrole göre ciddi şekilde düşürdüğü belirlenmiştir (Srivastava ve Srivastava, 2014). Ayrıca *Polygonum tinctorium* saçak köklerine 50, 100, 200, 300 ve 400 mg/l konsantrasyonlarında uygulanan kitosanın kök büyümesini kontrole göre azalttığı tespit edilmiştir (Young-Am vd., 2000). Sunulan bu araştırmada, pektin uygulamalarının ise kök gelişimi üzerinde teşvik edici ya da engelleyici bir etkide bulunmadığı saptanmıştır. Kitosan ve pektinin birlikte kullanıldığı uygulamaların *Morinda citrifolia*'nın adventif kök kültürlerinde kök büyümesini inhibe ettiğini tespit eden Baque vd. (2012), bu engelleyici etkinin hücre canlılığı üzerindeki güçlü olumsuz etkiden kaynaklandığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmada özellikle 0.8 mg/ml dozlarında yapılan ikili uygulamanın %79 oranında hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. Dornenburg (1993) ise, *Morinda citrifolia* hücre süspansiyon kültürlerinde pektinin hücre canlılığı üzerinde koruyucu etkilerde bulunduğu ve bu koruyucu etkinin, kitosan ile birlikte kullanıldığı uygulamalarda da gözlemlendiğini belirlemişlerdir. Benzer şekilde kitosan uygulanmış *Chenopodium rubrum* hücre kültürlerinde pektin ilavesinin hücre büyümesini teşvik ettiği; ancak 400 µg/ml'nin üzerindeki kitosan uygulamalarının hücreler üzerinde öldürücü etkide bulunduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada artan

kitosan konsantrasyonlarının hücre ölümü ile ilişkili olarak pigment salınımının artmasına da neden olduğu saptanmıştır (Dornenburg, 1993). Hücre ölümlerinde membran iyon pompaları arızalanmakta, membran bütünlüğü kaybolmakta, hücreler arası Ca^{2+} artışı meydana gelerek sitoplazmik şişmeye ve nihayetinde hücre ölümüne yol açan çeşitli bozunma süreçlerini başlatmaktadır (Cobb vd., 1996). Hücre ölümlerinin yüksek olduğu uygulamalarda ise hücre büyümesi azalmaktadır. Bütün bu sonuçlar biyokütle artışının kullanılan elisitöre, elisitör konsantrasyonuna, kültür tipine ve bitki genotipine göre önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir.

Maya ekstraktı bitki sekonder metabolit üretimini teşvik etmek amacıyla *in vitro* kültürlerde kullanılan en yaygın biyotik kökenli doğal elisitörlerden biridir (Cheng vd., 2013; Karalija vd., 2020). Maya ekstraktı bitki savunma tepkilerinde yer alan kitin, β -glukan, glikopeptidler ve ergosterol gibi çeşitli bileşikler içerir (Baenas vd., 2014). Maya ekstraktının, *in vitro* koşullarda farklı bitkilerde rosmarinik asit (Gonçalves vd., 2019), sanguinarin (Guízar-González vd., 2016), ksanton (KrstićMilošević vd., 2017), izofavonoid (Rani vd., 2020), plumbagin (Singh vd., 2020), astragalosidler (Park vd., 2021), artemisinin (Putalun vd., 2007), tropan alkaloidleri (Pitta-Alvarez vd., 2000) ve tanshinonlar (Zhao vd., 2010) gibi bir çok metabolitin üretimini artırmada başarı ile kullanılan bir bileşik olduğu belirlenmiştir. Sunulan bu projede maya ekstraktının kullanılan konsantrasyona bağlı olarak çivit otu köklerinde indirubin ve indigotin sentezini önemli derecede etkilediği belirlenmiştir. Araştırmada köklerde en yüksek indigotin birikimi için maya ekstraktının 1 g/l ve 2 g/l gibi düşük konsantrasyonları daha uygun olurken; indirubin birikimi için 3.0 g/l ve 4.0 g/l gibi daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, en uygun maya ekstraktı konsantrasyonunun metabolite göre değiştiğini göstermektedir. Araştırmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Azadirachta indica*'nın saçak köklerinde besin ortamlarına ilave edilen 20 mg/l maya ekstraktının kontrole göre azadiraktin içeriğinde 1.6 kata kadar bir artış sağladığı; ancak konsantrasyonun 100 mg/l'ye çıkmasıyla köklerde azadiraktin üretiminin ciddi derecede azaldığı tespit edilmiştir (Srivastava ve Srivastava, 2014). Araştırmacılar, maya ekstraktının abiyotik elisitör olarak hareket edebilen çinko, kalsiyum ve kobalt gibi bazı katyonları bulundurmasının (Suzuki vd., 1985), saçak köklerde azadiraktin üretiminin artırılmasına neden olabileceği; bir başka deyimle maya ekstraktının metabolit verimini artırması abiyotik elisitör gibi hareket eden bazı mineralleri

içermesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Maya ekstraktının *Azadirachta indica* hücre süspansiyon kültürlerinde de azadiraktin (Prakash ve Srivastava, 2008), *Pueraria candollei* saçak köklerinde toplam flavonoid birikimini arttırdığı belirlenmiştir (Udomsuk vd., 2011). *Salvia miltiorrhiza* kültürlerinde ise kriptotanshinon üretiminin maya ekstraktı uygulamasıyla 34 kat arttığı tespit edilmiştir (Zhao vd., 2010). Bununla birlikte *Calotropis gigantea* saçak köklerine uygulanan maya ekstraktının kardenolid birikimi üzerinde önemli bir etkide bulunmadığı belirlenmiştir (Sun vd., 2012). *Panax quinquefolium* saçak köklerine ise 3 gün süreyle uygulanan 50 mg/l maya ekstraktının ginsenosid seviyesini kontrole göre 1.57 kat artırdığı tespit edilmiştir (Kochan vd., 2017). Diğer elisitörler gibi, kültür ortamındaki maya ekstraktı konsantrasyonunun, metabolitlerin biyosentezi üzerinde önemli bir faktör olduğunu ve en uygun konsantrasyonun her bitki türü için farklılık gösterdiğini bildiren Shinde vd. (2009), *Psoralea corylifolia*'nın saçak köklerindeki maksimum genistein ve daidzein düzeyinin 200 mg/l konsantrasyonundaki maya ekstraktı uygulamasıyla elde edildiğini belirlemişlerdir. Diğer taraftan *Pueraria candollei* ve *Hyoscyamus niger*'in transforme edilmiş köklerinde izoflavon ile skopolamin ve hiyosiyamin miktarlarının kontrole göre daha yüksek düzeyde elde edildiği maya ekstraktı konsantrasyonu 500 mg/l olarak belirlenirken (Udomsuk vd., 2011), *Leontopodium nivale*'de 2 g/l ve *Coleus blumei* kültürlerinde ise 5 g/l gibi daha yüksek maya konsantrasyonlarının sırasıyla leolignin ve rosmarinik asitte etkili verim artışı için daha uygun olduğu belirlenmiştir (Bauer vd., 2009; Wawrosch vd., 2014). Patlıcanda 3 g/l maya ekstraktı uygulamasının kontrole göre 43 kat daha yüksek solasodin birikimini sağlayarak en yüksek değerin elde edildiği uygulama olduğu saptanmıştır (Jain ve Singh, 2015). Maya ekstraktının konsantrasyon artışına bağlı olarak *Solanum hainanense* hücre kültürlerinde solasodin birikiminin de arttığı tespit edilmiştir (Loc vd., 2014). Ancak *Drosera* türlerinde plumbagin üretiminin 0.5 mg/l gibi düşük konsantrasyonlarda en yüksek değere ulaştığı; konsantrasyon arttıkça da biyoaktif bileşik konsantrasyonunun azaldığını bildiren Putalun vd. (2010)'nin bulguları ile benzer şekilde, *Panax quinquefolium*'de saponin (Kochan vd., 2017); *Scutellaria lateriflora*'da akteosid ve flavon sentezi için (Wilczańska-Barska vd., 2012) 50 mg/l gibi düşük maya ekstraktı konsantrasyonunun daha uygun olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar maya ekstraktının metabolit birikimi üzerine etkisinin genotipe, konsantrasyona ve metabolite bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Maya ekstraktı B vitamini kompleksi açısından zengin bir elisitördür. Ayrıca metabolit

sentezini tetikleyerek bitki savunma tepkilerini ortaya çıkaran kitin, N-asetil-glukozamin oligomerleri, β -glukan, glikopeptidler ve ergosterol gibi temel bileşenleri de içermektedir (Boller, 1995; Putalun vd., 2007; Cai vd., 2012). Bu özellikleri nedeni ile uygun konsantrasyon ve sürede uygulandığında, maya ekstraktın *in vitro* koşullarda metabolit verimini dikkate değer bir şekilde artırmaktadır.

Kitosan, fitokimyasal biyosentezindeki eşzamanlı artışla birlikte bitki savunma tepkilerini tetikleyebilen doğal, düşük maliyetli ve toksik olmayan bir sinyal molekülüdür (Jiao vd., 2018c). Kitosanın *Withania somnifera*'da withanolid (Sivanandhan vd., 2012), *Artemisia annua*'da artemisinin (Lei vd., 2011), *Curcuma longa*'da kurkumin (Sathiyabama vd., 2016), *Scrophularia striata*'da ekinokosid (Kamalipourazad vd., 2016), *Pueraria candollei*'de izoflavonoid (Udomsuk vd., 2011), *Hypericum perforatum*'da ksanton (Tocci vd., 2010, 2011), *Stevia rebaudiana*'da steviosid (Bayraktar vd., 2016) birikimini önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Sunulan bu çalışmada çivit otu kök kültürlerine uygulanan kitosanın hem indigotin hem de indirubin miktarını kontrole göre artırdığı; en yüksek indigotin miktarının 100 mg/l; indirubin miktarının da 100, 150 ve 200 mg/l kitosan uygulanan köklerden elde edildiği belirlenmiştir. Young-Am vd. (2000), *Polygonum tinctorium* saçak köklerine 100, 200 ve 300 mg/l kitosan uygulamalarının indigotin miktarını artırdığı, daha düşük ve yüksek konsantrasyonların ise indigotin miktarını inhibe ettiğini belirlenmişlerdir. Sauerwein vd. (1991) ise, *Lippia dulcis* türüne ait saçak köklerde 0.2–10.0 mg/l arasındaki düşük konsantrasyonlardaki kitosanın hernandulsin miktarını kontrole göre 5 kat artırdığını tespit etmişlerdir. *Calotropis gigantea* saçak köklerine 20 gün boyunca uygulanan 50 mg/l konsantrasyonundaki kitosanın en yüksek kardenolid birikimini sağladığı, ancak bu konsantrasyonun üzerine çıkıldığında kardenolid birikiminin azaldığı saptanmıştır (Sun vd., 2012). Elisitörlerin etkisi metabolite göre büyük değişiklik göstermektedir. Nitekim *Salvia miltiorrhiza* kültürlerinde kriptomanshinon üretiminin maya ekstraktı uygulamasıyla, tanshinon I üretiminin ise kitosan uygulamaları ile en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir (Zhao vd., 2010). Yine kitosanın *Gentiana dinarica*'ya ait saçak kök kültürlerinde ksanton içeriğinin artırılmasında maya ekstraktına göre daha etkili bulunduğu tespit edilmiştir (Krstić-Milošević vd., 2017). Kitosanın metabolit birikiminde teşvik edici etkinin kitosanın neden olduğu bitki savunma tepkileri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Iriti ve Faoro, 2007). Bununla birlikte kitosanın 50, 100, 250 ve 500 mg/l

konsantrasyonlarında uygulandığı *Azadirachta indica*'nın saçak köklerinde özellikle artan konsantrasyonlarının azadiraktin üretimini kontrole göre ciddi şekilde düşürdüğü belirlenmiştir (Srivastava ve Srivastava, 2014). Genel olarak, hafif elisitör uygulamaları bitkilerin kendilerini korumak için savunma amaçlı sekonder metabolit üretiminin aktivasyonuna katkıda bulunan iyi yönde bir stresin oluşmasına neden olurken, tolerans sınırlarının üzerine çıkıldığında sekonder metabolit üretiminin azalmasına yol açan metabolik hasar veya hücre ölümü ile karakterize edilen zararlı strese maruz kalmalarına neden olmaktadır (Kranner vd., 2010). Ayrıca dokular sentezleyebildikleri sekonder metabolitler için belirli bir eşik seviyesine sahiptir. Bu eşik seviyesi aşıldığında, bitkiler geri besleme düzenlemesi yoluyla fazla sentezlenen metabolitin bozulması için gerekli enzimleri üretmeleri için uyarılırlar (Malik vd., 2013). Kitosan uygulanmış çivit otu saçak köklerinin kontrolle kıyaslandığında kahverengi renge dönüşmelerinin artan oksidatif stresin göstergesi olduğu bildirilmiştir (Jiao vd., 2018c). Nitekim kitosan uygulamalarının *Scrophularia striata* hücre kültürlerinde aşırı ROS üretimini indükleyebileceği, hücre içi redoks dengesini bozabildiği ve nihayetinde oksidatif strese yol açabildiği bildirilmektedir (Kamalipourazad vd., 2016). Kitosan, bitki hücre zarlarında lokalize olan immün reseptörler tarafından mantar patojenlerinin saldırısı olarak tanınabilmekte, bu da çeşitli sinyal moleküllerini uyararak fitoaleksin biyosentezi ile bağlantılı genlerin aktivasyonunu sağlayarak bitkinin savunma tepkilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Bueter vd., 2013; Hadwiger, 2013). Bu nedenle kitosanın, uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında, *in vitro* koşullarda sekonder metabolitlerin üretimini artıran kolay, uygun maliyetli ve başarılı bir biyotik elisitör olduğu saptanmıştır (Jiao vd., 2018c).

Galakturonik asit bakımından zengin bir bileşik olan pektin, bitki sekonder metabolitlerinin elde edilmesinde sıklıkla kullanılan bir diğer biyotik elisitördür. Sunulan bu araştırmada, pektin uygulamalarının indigotin birikimini kontrole göre düşürdüğü; ancak indirubin birikimini %0.5 ve %1 gibi düşük konsantrasyonlarda kontrole göre artırdığı belirlenmiştir. Pektin uygulamaları içinde en yüksek indirubin birikimi %1 konsantrasyonunda yapılan uygulamadan elde edilirken, konsantrasyon artıkça indirubin birikiminin azaldığı saptanmıştır. Benzer şekilde patlıcanda en yüksek solasodin miktarının %1 pektin uygulamasında elde edildiği tespit edilmiştir (Jain ve Singh, 2015). *Hypericum perforatum* sürgünlerine 21 gün süreyle 100 mg/l

konsantrasyonunda uygulanan pektinin kontrollere kıyasla total fenolik miktarını yaklaşık 3 kat düşürdüğü saptanmıştır (Gadzovska vd., 2014). Aynı araştırmada pektinin stres koşullarını taklit edebilmesi sonucu, naftodiantronlardan hiperisin ve pseudohiperisin üretimini 14. ve 21. günlerde artırdığı belirlenmiştir. Artan naftodiantronların birikiminin PAL (fenilalanin amonyum liyaz) aktivitesinin artışıyla ilişkili olduğu da ifade edilmiştir. Ayrıca POD (peroksidaz) aktivitesinin de flavonoid ve hiperisin içerikleri ile önemli ölçüde pozitif korelasyon gösterdiği, bunun da pektin gibi polisakkaritlerle tetiklenen sürgün kültürlerinde hücre redoks sisteminde güçlü bir bozulmayı ve savunma tepkilerinin aktivasyonunu ortaya çıkardığı belirlenmiştir (Gadzovska vd., 2014). Benzer şekilde pektinin *Calendula officinalis* hücre süspansiyon kültürlerinde oleanolik asit birikimini (Wiktorowska vd., 2010), asma hücre süspansiyon kültürlerinde de antosiyanin ve fenolik madde miktarını (Cai vd., 2012) artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca pektinin kitosan uygulanmış *Chenopodium rubrum* hücre kültürlerinde amaranthin birikimi üzerinde pozitif etkilerde bulunduğu da tespit edilmiştir (Dornenburg, 1993). Bütün bu sonuçlar, pektin uygulamalarının bitki tür ve çeşidine, pektin konsantrasyonuna, metabolite ve birlikte kullanıldığı diğer elisitörlere bağlı olarak metabolit verimini farklı şekillerde etkilediğini göstermektedir.

Elisitörler, reaktif oksijen türleri (ROS), fitoaleksin, antimikrobiyal özellikteki sekonder metabolitler ile savunma sistemini oluşturan diğer bileşiklerin sentezi üzerinde uyarıcı etkide bulunan bileşiklerdir (Montesano vd., 2003). Ancak elisitörlerin belirli bitki dokuları üzerindeki etkisi, elisitör tipine ve konsantrasyonuna, bitki tür ve çeşidine, kültürün büyüme devresine, metabolite, uygulama zamanına ve süresine, ortam ve kültür koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Bhagwath ve Hjortsø, 2000; Cai vd., 2012; Ramirez-Estrada vd., 2016). Özellikle elisitörlerin konsantrasyonu ve uygulama süresi dokuların göstermiş olduğu tepkinin yoğunluğunu en çok etkileyen faktörlerdir (Vasconsuelo ve Boland, 2007). Bu da farklı bitki türleri ve hedef biyoaktif bileşenlere göre en uygun protokollerin araştırılması ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır.

Sonuç olarak çivit otu kök kültürlerine uygulanan biyolojik kökenli elisitörler olan maya ekstraktı, kitosan ve pektinin kök büyümesi ile köklerdeki indigotin ve indirubin birikimi üzerinde farklı etkilerde bulunduğu belirlenmiştir. Buna göre:

- Kök büyümesinin maya ekstraktı uygulamalarıyla arttığı, kitosan uygulamalarıyla azaldığı, pektin uygulamalarından ise etkilenmediği,
- Kök büyümesini en fazla teşvik eden uygulamanın 1 g/l maya ekstraktı uygulaması olduğu,
- Maya ekstraktı uygulamalarında köklerdeki en yüksek indigotin birikiminin 1g/l ve 2g/l; indirubin birikiminin ise 3 g/l ve 4 g/l maya ekstraktı uygulamalarından elde edildiği,
- Kitosan uygulamaları içinde en yüksek indigotin birikiminin 100 mg/l; indirubin birikiminin de 100, 150 ve 200 mg/l kitosan uygulamalarında belirlendiği,
- Pektin uygulamalarının indigotin birikimini kontrole göre düŐürürken, %0.5 ile %1 konsantrasyonlardaki uygulamaların indirubin birikimini artırdığı,
- Bütün uygulamalar içinde en yüksek indigotin ve indirubin birikiminin 100 mg/l kitosan uygulanan köklerden elde edildiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, çivit otu kök kültürlerine farklı konsantrasyonlarda yapılan maya ekstraktı, kitosan ve pektin uygulamaları içinde kök gelişimi için en uygun uygulama 1 g/l maya ekstraktı; indigotin ve indirubin birikimi için de 100 mg/l kitosan uygulamasının olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Akeroid, J.R. (2002). *Isatis Linnaeus*. In *The European Garden Flora* (pp. 135). Cambridge University Press.
- Angelova, Z., Georgiev, S. & Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(2), 8.
- Anonim, (1979). Chinese Academy of Medical Sciences Clinical studies of Dang Gui Lu Hui Wan in the treatment of CML. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 15, 86-88.
- Anonim, (1998). Cultivation and extraction of natural dyes for industrial use in natural textile use. NF-2000 Online Database Information Items. Proposal No: AIR2-CT94-0981. First Project Progress Report. Summary. 1-4.
- Anonim, (2011). *Isatis* root (*Isatidis radix*). In European Pharmacopoeia, 7th Edition Supply 7.3 (2566); European Directorate for the Quality of Medicines: Strasburg, Germany, 3866–3867.
- Arora, J., Roat, C., Goyal, S. & Ramawat, K.G. (2009). High stilbenes accumulation in root cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin grown in shake flasks. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(6), 1307-1312. doi: 10.1007/s11738-009-0359-3
- Awad, V., Kuvalekar, A. & Harsulkar, A. (2014). Microbial elicitation in root cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. for elevated glycyrrhizic acid production. *Industrial Crops and Products*, 54, 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.036>
- Baenas, N., García-Viguera, C. & Moreno, D.A. (2014). Elicitation: a tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19(9), 13541-13563. <https://doi.org/10.3390/molecules190913541>
- Balfour-Paul, J. (2006). Indigo—a unique dye with a colourful story. *Indirubin, the red shade of indigo*. (pp. 1-6)
- Baque, M.A., Shiragi, M.H.K., Lee, E.J. & Paek, K.Y. (2012). Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Australian Journal of Crop Science*, 6(9), 1349-1355.
- Bauer, N., Kiseljak, D. & Jelaska, S. (2009). The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots. *Biologia Plantarum*, 53(4), 650-656.
- Bayraktar, M., Naziri, E., Akgün, I. H., Karabey, F., İlhan, E., Akyol, B., Bedir, E. & Gurel, A. (2016). Elicitor induced stevioside production, *in vitro* shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2), 289-300. doi: 10.1007/s11240-016-1049-7

- Baytop, T. (1984). Çiviotu (*Isatis tinctoria*). In *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi*. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, (pp. 520).
- Bhagwath, S.G. & Hjortsø, M.A. (2000). Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubrine A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. *Journal of Biotechnology*, 80(2), 159-167. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00256-X)
- Blackburn, R.S., Bechtold, T. & John, P. (2009). The development of indigo reduction methods and pre-reduced indigo products. *Coloration Technology*, 125(4), 193-207. <https://doi.org/10.1111/j.1478-4408.2009.00197.x>
- Boller, T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, 46(1), 189-214.
- Bown, D. (1995). *Encyclopaedia of Herbs and their Uses Dorling*. Kindersley. London. ISBN, 7513, 20-31.
- Branca, F. (2015). *Isatis tinctoria* L.: An ancient dye plant of interest as a multifunctional crop: *Chronica Horticulturae*, 55, 20-24.
- Bueter, C.L., Specht, C.A. & Levitz, S.M. (2013). Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003080>
- Buhner, S.H. (2013). Natural Remedies for Emerging, Resistant and Epidemic Viral Infection. In *Herbal Antivirals*. (pp. 192–208).
- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D. & Smetanska, I. (2012). Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108(3), 401-409. doi: 10.1007/s11240-011-0051-3
- Callihan, R.H., Dewey, S.A., Patton, J.E. & Thill, D.C. (1984). Distribution, biology and habitat of dyers woad (*Isatis tinctoria* L.). *Idaho Academy of Science and Engineering*, 20(1-2), 18-32.
- Carvalho, E.B. & Curtis, W.R. (1998). Characterization of fluid-flow resistance in root cultures with a convective flow tubular bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(3), 375-384. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981105\)60:3<375::AID-BIT15>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<375::AID-BIT15>3.0.CO;2-L)
- Chandra, S. & Chandra, R. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 371-395. Doi:10.1007/s11101-011-9210-8
- Chen, R., Li, Q., Tan, H., Chen, J., Xiao, Y., Ma, R., Gao, S., Zerbe, P., Chen, W. & Zhang, L. (2015). Gene-to-metabolite network for biosynthesis of lignans in MeJA-elicited *Isatis indigotica* hairy root cultures. *Frontiers in Plant Science*, 6, 952. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00952>

- 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. <https://doi.org/10.3390/molecules18077473>
- Cobb, J.P., Hotchkiss, R.S., Karl, I.E. & Buchman, T.G. (1996). Mechanisms of cell injury and death. *British Journal of Anaesthesia*, 77(1), 3-10.
- Condurso, C., Verzera, A., Romeo, V., Ziino, M., Trozzi, A. & Ragusa, S. (2006). The leaf volatile constituents of *Isatis tinctoria* by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Planta Medica*, 72(10), 924-928. doi: 10.1055/s-2006-946679
- Cordis, (2020). *Sustainable production of plant-derived indigo*. <https://cordis.europa.eu/project/id/QLK5-CT-2000-30962/fr> (Son erişim tarihi: 15.03.2020)
- Cui, X.H., Murthy, H.N., Wu, C.H. & Paek, K.Y. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(1), 7-14. doi: 10.1007/s11240-010-9747-z
- Çömlekçioğlu, N. (2011). *Kahramanmaraş'ta Yayılış Gösteren Bazı Isatis spp. (Çivit otu) Türlerinde Farklı Ekim Zamanlarının Verim Unsurlarına Etkisi ile Boyama Özelliklerinin ve Boyarmadde Miktarının Saptanması*. (Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Çömlekçioğlu, N., Efe, L. & Karaman, Ş. (2014). Kahramanmaraş koşullarında farklı ekim zamanlarının *Isatis tinctoria* ve *Isatis buschiana* türlerinin verim ve bazı agronomik özellikleri üzerine etkileri. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1), 67-78.
- Çömlekçioğlu, N., Efe, L. & Karaman, Ş. (2017). Effect of Different Sowing Times on Leaf Characteristics and Indican Content of Some *Isatis* Specie. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 26(1), 1-10. <https://doi.org/10.21566/tarbitderg.323555>
- Çömlekçioğlu, N. (2019). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Leaves of Endemic and Native *Isatis spp* in Turkey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180330>
- Davies, K.M. & Deroles, S.C. (2014). Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.010>
- De Melo, J.S.S., Rondão, R., Burrows, H.D., Melo, M.J., Navaratnam, S., Edge, R. & Voss, G. (2006). Spectral and photophysical studies of substituted indigo derivatives in their keto forms. *Chem Phys Chem*, 7(11), 2303-2311. <https://doi.org/10.1002/cphc.200600203>

- Demirci, T., Akçay, U.Ç. & Göktürk Baydar, N. (2020). Physical and biochemical differences in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root lines of *Echinacea purpurea*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56(6), 875-881. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10090-z>
- Demirci, T., Albayrak, İ. & Göktürk Baydar, N. (2022). L-phenylalanine applications and culture duration affect root growth and production of tropane alkaloids and phenolics in adventitious root cultures of *Hyoscyamus niger* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149(1), 295-311. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02173-5>
- Demirci, T., Aras Asçı, Ö. & Göktürk Baydar, N. (2021). Influence of salicylic acid and L-phenylalanine on the accumulation of anthraquinone and phenolic compounds in adventitious root cultures of madder (*Rubia tinctorum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144(2), 313-324.
- Dornenburg, H. & Knorr, D. (1997). Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. *Food technology*, 51(11), 47-54.
- Dörnenburg, H. (1993). *Einfluß von Elicitation, Permeabilisierung und Immobilisierung auf die Biosynthese von Sekundärmetaboliten und deren Exkretion bei Chenopodium rubrum-und Morinda citrifolia-Zellkulturen* (Doctoral dissertation)
- Dörnenburg, H. & Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(8), 674-684. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00108-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00108-4)
- Eisenbrand, G., Hippe, F., Jakobs, S. & Muehlbeyer, S. (2004). Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 130(11), 627-635. doi 10.1007/s00432-004-0579-2
- Fazili, M.A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U. & Geelani, S.N. (2022). *In vitro* strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00717-z>
- Gadzovska Simic, S., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C. & Hagège, D. (2014). Effects of polysaccharide elicitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2014/609649>
- Gai, Q.Y., Jiao, J., Luo, M., Wei, Z.F., Zu, Y.G., Ma, W. & Fu, Y.J. (2015a). Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. *PLoS One*, 10(3), e0119022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119022>

- Gai, Q.Y., Jiao, J., Luo, M., Wang, W., Ma, W., Zu, Y.G. & Fu, Y.J. (2015b). Establishment of high-productive *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures: a promising approach for efficient production of bioactive alkaloids. *Biochemical Engineering Journal*, 95, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.12.006>
- Gai, Q.Y., Jiao, J., Wang, X., Zang, Y.P., Niu, L.L. & Fu, Y.J. (2019). Elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures by salicylic acid and methyl jasmonate for the enhanced production of pharmacologically active alkaloids and flavonoids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(1), 77-86. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01553-8>
- Garland, S. (1988). *Il Giardino Delle Aromatiche*. Milano, Italy, Centro Botanico.
- Giri, C.C. & Zaheer, M. (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(1), 1-18. doi: 10.1007/s11240-016-0985-6
- Gonçalves, S., Mansinhos, I., Rodríguez-Solana, R., Pérez-Santín, E., Coelho, N. & Romano, A. (2019). Elicitation improves rosmarinic acid content and antioxidant activity in *Thymus lotocephalus* shoot cultures. *Industrial Crops and Products*, 137, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.071>
- Gorelick, J. & Bernstein, N. (2014). Elicitation: an underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Advances in Agronomy*, 124, 201-230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00005-X>
- Grayer, R.J. & Kokubun, T. (2001). Plant–fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56(3), 253-263.
- Guarino, C., Casoria, P. & Menale, B. (2000). Cultivation and use of *Isatis tinctoria* L.(*Brassicaceae*) in Southern Italy. *Economic botany*, 54(3), 395-400.
- Guízar-González, C., Monforte-González, M. & Vázquez-Flota, F. (2016). Yeast extract induction of sanguinarine biosynthesis is partially dependent on the octadecanoic acid pathway in cell cultures of *Argemone mexicana* L., the Mexican poppy. *Biotechnology Letters*, 38(7), 1237-1242. doi: 10.1007/s10529-016-2095-2
- Hadwiger, L.A. (2013). Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant science*, 208, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.007>
- Hamburger, M. (2002). *Isatis tinctoria*—From the rediscovery of an ancient medicinal plant towards a novel anti-inflammatory phytopharmaceutical. *Phytochemistry Reviews*, 1(3), 333-344.

- Han J., Jiang X. & Zhang L., (2011). Optimisation of extraction conditions for polysaccharides from the roots of *Isatis tinctoria* L. by response surface methodology and their in vitro free radicals scavenging activities and effects on IL-4 and IFN- γ mRNA expression in chicken lymphocytes. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1320-1326
- Hashimoto, T., Yukimune, Y. & Yamada, Y. (1986). Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. *Journal of Plant Physiology*, 124(1-2), 61-75. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80178-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80178-X)
- Ho, T.T., Lee, J.D., Jeong, C.S., Paek, K.Y. & Park, S.Y. (2018). Improvement of biosynthesis and accumulation of bioactive compounds by elicitation in adventitious root cultures of *Polygonum multiflorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 199-209. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8629-2>
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G. & Meijer, L. (1999). Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology*, 1(1), 60-67.
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M.P., Rajasekharan, P.E., Zafar, N. & Fruk, A. (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant *in vitro* cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(2), 239-265.
- Iriti, M. & Faoro, F. (2007). Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia*, 164(2), 57-64. doi: 10.1007/s11046-007-9026-7
- Jain, A. & Singh, S. (2015). Effect of growth regulators and elicitors for the enhanced production of solasodine in hairy root culture of *Solanum melongena* (L.). *The Journal of Indian Botanical Society*, 94(2), 23-39.
- Jaisi, A. & Panichayupakaranant, P. (2017). Chitosan elicitation and sequential Diaion® HP-20 addition a powerful approach for enhanced plumbagin production in *Plumbago indica* root cultures. *Process Biochemistry*, 53, 210-215. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.027>
- Jiao, J., Gai, Q.Y., Wang, W., Zang, Y.P., Niu, L.L., Fu, Y.J. & Wang, X. (2018a). Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *Aspergillus niger*. *Industrial Crops and Products*, 112, 252-261.
- Jiao, J., Gai, Q.Y., Yao, L.P., Niu, L.L., Zang, Y.P. & Fu, Y.J. (2018b). Ultraviolet radiation for flavonoid augmentation in *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures mediated by oxidative stress and biosynthetic gene expression. *Industrial Crops and Products*, 118, 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.046>

- Jiao, J., Gai, Q.Y., Wang, X., Qin, Q.P., Wang, Z.Y., Liu, J. & Fu, Y.J. (2018c). Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 124, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.056>
- Kamalipourazad, M., Sharifi, M., Maivan, H.Z., Behmanesh, M. & Chashmi, N.A. (2016). Induction of aromatic amino acids and phenylpropanoid compounds in *Scrophularia striata* Boiss. cell culture in response to chitosan-induced oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 374-384. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.034>
- Karakaş, Ö. (2019). Effects of methyl jasmonate and putrescine on tryptanthrin and indirubin production in in vitro cultures of *Isatis demiriziana* Mısırdalı. *International Journal of Secondary Metabolite*, 6(3), 241-250. <https://doi.org/10.21448/ijsm.521498>
- Karakaş, Ö. (2020). Effect of silver nanoparticles on production of indole alkaloids in *Isatis constricta*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 44(3), 621-627. <https://doi.org/10.1007/s40995-020-00878-4>
- Karagüzel, O. & Taşcıoğlu, S.G. (2007). Effect of temperature on germination characteristics of *Consolida orientalis*, *Isatis tinctoria* and *Silene armeria* native populations. *Bahçe*, 36(1/2), 19-28.
- Karalija, E., Zeljković, S.Ć. & Parić, A. (2020). Harvest time-related changes in biomass, phenolics and antioxidant potential in *Knautia sarajevensis* shoot cultures after elicitation with salicylic acid and yeast. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56(2), 177-183. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10028-0>
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A. & Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(1), 1-9. doi: 10.1007/s40502-015-0139-6
- Kızıl, S. (2000). *Research On Frequency Of Appropriate Planting Of Some Woad (Isatis Tinctoria L., Isatis Constricta Davis) Species And Establishment Of Dyeing Properties Thereof*. (Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Bilim Enstitüsü)
- Kızıl, S. & Arslan, N. (2001). Bazı çivit otu *Isatis tinctoria* L., *Isatis constricta* davis türleri ile yün halı ipliklerinin boyanması ve elde edilen renklerin bazı haslık değerlerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Journal of Agricultural Sciences*, 7(03), 42-47. https://doi.org/10.1501/Tarimbil_0000000645
- Kızıl, S., Türk, M., Cakmak, O., Özgüven, M. & Khawar, K.M. (2009). Microelement contents and fatty acid compositions of some *Isatis* species seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1), 175-178. <https://doi.org/10.15835/nbha3713115>

- Kochan, E., Szymczyk, P., Kuźma, Ł., Lipert, A. & Szymańska, G. (2017). Yeast extract stimulates ginsenoside production in hairy root cultures of American ginseng cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactors. *Molecules*, 22(6), 880. <https://doi.org/10.3390/molecules22060880>
- Kranner, I., Minibayeva, F.V., Beckett, R.P. & Seal, C.E. (2010). What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, 188(3), 655-673. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>
- Krstić-Milošević, D., Janković, T., Uzelac, B., Vinterhalter, D. & Vinterhalter, B. (2017). Effect of elicitors on xanthone accumulation and biomass production in hairy root cultures of *Gentiana dinarica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130(3), 631-640. doi: 10.1007/s11240-017-1252-1
- Lei, C., Ma, D., Pu, G., Qiu, X., Du, Z., Wang, H., Li, G., Ye, H. & Liu, B. (2011). Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 176-182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.001>
- Lim, F.L., Yam, M.F., Asmawi, M.Z. & Chan, L.K. (2013). Elicitation of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 50, 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.046>
- Lin, C.W., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Lai, C.C., Wan, L., Ho, T.Y. & Chao, P.D.L. (2005). Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of *Isatis indigotica* root and plant-derived phenolic compounds. *Antiviral Research*, 68(1), 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.07.002>
- Loc, N.H., Anh, N.H.T., Khuyen, L.T.M. & An, T.N.T. (2014). Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of *Solanum hainanense* Hance. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 3(1), 1-6.
- Malayaman, V., Sisubalan, N., Senthilkumar, R.P. & Ranjithkumar, R. (2017). Chitosan mediated enhancement of hydrolysable tannin in *Phyllanthus debilis* Klein ex Willd via plant cell suspension culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1656-1663. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.138>
- Malik, S., Hossein Mirjalili, M., Fett-Neto, A.G., Mazzafera, P. & Bonfill, M. (2013). Living between two worlds: two-phase culture systems for producing plant secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(1), 1-22. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.659173>
- Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P. & Legoy, M.D. (2001). Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry*, 58(6), 897-904. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00335-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00335-1)

- Meijer, L., Shearer, J., Bettayeb, K. & Ferandin, Y. (2007). Diversity of the intracellular mechanisms underlying the anti-tumor properties of indirubins. *International Congress Series*, 1304, 60-74. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2007.07.041>
- Min, J.Y., Jung, H.Y., Kang, S.M., Kim, Y.D., Kang, Y.M., Park, D.J., Prasad D.T. & Choi, M.S. (2007). Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots. *Bioresource Technology*, 98(9), 1748-1753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.033>
- Mohn, T., Plitzko, I. & Hamburger, M. (2009). A comprehensive metabolite profiling of *Isatis tinctoria* leaf extracts. *Phytochemistry*, 70(7), 924-934. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.019>
- Mohn, T., Suter, K. & Hamburger, M. (2008). Seasonal changes and effect of harvest on glucosinolates in *Isatis* leaves. *Planta Medica*, 74(05), 582-587. doi: 10.1055/s-2008-1074504
- Montesano, M., Brader, G. & Palva, E. T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 73-79. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00150.x>
- Murthy, H.N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D.A., Davey, M.R., Power, J.B. & Paek, K.Y. (2008). Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8), 975-981. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00680.x>
- Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J.Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K.H. & Jove, R. (2005). Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17), 5998-6003.
- Nam, S., Scuto, A., Yang, F., Chen, W., Park, S., Yoo, H.S., Konig, H., Bhatia, R., Cheng, X., Merz, K.H., Eisenbrand, G. & Jove, R. (2012). Indirubin derivatives induce apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells involving inhibition of Stat5 signaling. *Molecular Oncology*, 6(3), 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.02.002>
- Namdeo, A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 69-79.
- Nartop, P. (2018). Engineering of biomass accumulation and secondary metabolite production in plant cell and tissue cultures. In *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress* (pp. 169-194). Academic press.
- Ni, Y., Song, R. & Kokot, S. (2012). Discrimination of *Radix Isatidis* and Rhizoma et *Radix Baphicacanthis* Cusia samples by near infrared spectroscopy with the aid of chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and*

- Özdamar Biçer, P., Demirci, T., Aşçı, Ö.A. & Baydar, N.G. (2017). Effects of methyl jasmonate and caffeic acid applications on secondary metabolite production in madder (*Rubia tinctorum*) root cultures. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51, 508-512. doi: 10.5530/ijper.51.3s.76
- Palma, L. (1964). SEI. In *Le Piante Medicinali d'Italia* (pp. 226)
- Park, Y.J., Kim, J.K. & Park, S.U. (2021). Yeast extract improved biosynthesis of astragalosides in hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(5), 467-474.
- Peppler, H.J. (1983). Ventures in yeast utilization. In *Annual Reports on Fermentation Processes* (pp. 237-251). Elsevier.
- Peppler, H. (1986). *Ventures in Yeast Utilization*. Jerald ve Sons Ltd., London. 370-381.
- Perry, L.M. & Metzger, J. (1980). *Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses*. MIT press.
- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C. & Giulietti, A.M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 252-258.
- Prakash, G. & Srivastava, A.K. (2008). Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 40(2), 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.12.017>
- Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H. & Shoyama, Y. (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters*, 9(7), 1143-1146. doi: 10.1007/s10529-007-9368-8
- Putalun, W., Udomsin, O., Yusakul, G., Juengwatanatrakul, T., Sakamoto, S. & Tanaka, H. (2010). Enhanced plumbagin production from in vitro cultures of *Drosera burmanii* using elicitation. *Biotechnology Letters*, 32(5), 721-724. Doi: 10.1007/s10529-010-0202-3
- Qi, T., Li, H. & Li, S. (2017). Indirubin improves antioxidant and anti-inflammatory functions in lipopolysaccharide-challenged mice. *Oncotarget*, 8(22), 36658. doi: 10.18632/oncotarget.17560
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C. & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(1), 91-102. <https://doi.org/10.1042/BA20020118>

- Ramawat, K.G. (2007). *Biotechnology: Secondary Metabolites*. CRC Press, Enfield, New Hampshire, USA.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M. & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, *21*(2), 182. <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
- Rani, D., Meelaph, T., De-Eknamkul, W. & Vimolmangkang, S. (2020). Yeast extract elicited isoflavonoid accumulation and biosynthetic gene expression in *Pueraria candollei* var. *mirifica* cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *141*(3), 661-667. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01809-2>
- Recio, M.C., Cerdá-Nicolás, M., Potterat, O., Hamburger, M. & Ríos, J.L. (2006). Anti-inflammatory and antiallergic activity in vivo of lipophilic *Isatis tinctoria* extracts and tryptanthrin. *Planta Medica*, *72*(06), 539-546. doi: 10.1055/s-2006-931562
- Sathiyabama, M., Bernstein, N. & Anusuya, S. (2016). Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). *Industrial Crops and Products*, *89*, 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.007>
- Sauerwein, M., Yamazaki, T. & Shimomura, K. (1991). Hernandulcin in hairy root cultures of *Lippia dulcis*. *Plant Cell Reports*, *9*(10), 579-581.
- 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*(3), 288-294. doi/10.1007/s12257-008-0238-6
- Sıralı, R., Uğur, A., Zambı, O., Dikmen, A. & Çağlar, S. (2013). Turpgiller (*Brassicaceae*) familyasına ait bazı türlerin arıcılık açısından önemi. *Akademik Ziraat Dergisi*, *2*(2), 107-115.
- Singh, T., Sharma, U. & Agrawal, V. (2020). Isolation and optimization of plumbagin production in root callus of *Plumbago zeylanica* L. augmented with chitosan and yeast extract. *Industrial Crops and Products*, *151*, 112446. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112446>
- Singla, A.K. & Chawla, M. (2001). Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *53*(8), 1047-1067. <https://doi.org/10.1211/0022357011776441>
- Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T.S., Manickavasagam, M., Selvaraj, N. & Ganapathi, A. (2012). Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera*

- (L.) Dunal. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.022>
- Song, Z., Johansen, H.K., Moser, C. & Høiby, N. (1996). Effects of Chinese medicinal herbs on a rat model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Apmis*, 104(1-6), 350-354.
- Song, X.Y., Kong, L.L. & Chen, N.H. (2018). Indirubin. In *Natural Small Molecule Drugs from Plants* (pp. 529-532). Springer.
- Spataro, G. & Negri, V. (2008). Adaptability and variation in *Isatis tinctoria* L.: a new crop for Europe. *Euphytica*, 163(1), 89-102. doi: 10.1007/s10681-007-9604-2
- Spataro, G., Taviani, P. & Negri, V. (2007). Genetic variation and population structure in a Eurasian collection of *Isatis tinctoria* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(3), 573-584. doi: 10.1007/s10722-006-0014-4
- Speranza, J., Miceli, N., Taviano, M.F., Ragusa, S., Kwiecień, I., Szopa, A. & Ekiert, H. (2020). *Isatis tinctoria* L.(Woad): A review of its botany, ethnobotanical uses, phytochemistry, biological activities, and biotechnological studies. *Plants*, 9(3), 298. <https://doi.org/10.3390/plants9030298>
- Srivastava, S. & Srivastava, A.K. (2014). Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 2286-2297. doi: 10.1007/s12010-013-0664-6
- Sun, J., Xiao, J., Wang, X., Yuan, X. & Zhao, B. (2012). Improved cardenolide production in *Calotropis gigantea* hairy roots using mechanical wounding and elicitation. *Biotechnology Letters*, 34(3), 563-569. doi: 10.1007/s10529-011-0804-4
- Suzuki, T., Mori, H., Yamané, T. & Shimizu, S. (1985). Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(2), 192-201. <https://doi.org/10.1002/bit.260270215>
- Tansı, S. (1998). The research on plant performance of woad (*Isatis tinctoria* L.) under the Cukurova conditions. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 7(1), 38-43.
- Taviano, M.F., Filocamo, A., Ragusa, S., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., Paterniti Mastrazzo, G., De Rose, R.F., Celano, M., Lombardo, G.E. & Miceli, N. (2018). Phenolic profile, antioxidant and cytotoxic properties of polar extracts from leaves and flowers of *Isatis tinctoria* L. (*Brassicaceae*) growing in Sicily. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 152(4), 795-803. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1338629>

- Tayoub, G., Sulaiman, H. & Alborzi, M. (2016). Quantitative identification of Atropine and Scopolamine in wild datura (*Datura metel*) using HPLC. *Journal of Natural Products*, 9, 21-28.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A.K. & Rao, M.A. (1997). Chemistry and uses of pectin—a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(1), 47-73. <https://doi.org/10.1080/10408399709527767>
- Tocci, N., Ferrari, F., Santamaria, A.R., Valletta, A., Rovardi, I. & Pasqua, G. (2010). Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* cell cultures. *Natural Product Research*, 24(3), 286-293. <https://doi.org/10.1080/14786410903006353>
- Tocci, N., Simonetti, G., D'Auria, F.D., Panella, S., Palamara, A.T., Valletta, A. & Pasqua, G. (2011). Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 977-987. doi: 10.1007/s00253-011-3303-6
- Udomsuk, L., Jarukamjorn, K., Tanaka, H. & Putalun, W. (2011). Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnology Letters*, 33(2), 369-374. doi: 10.1007/s10529-010-0417-3
- Ullah, I., Wakeel, A., Shinwari, Z.K., Jan, S.A., Khalil, A.T. & Ali, M. (2017). Antibacterial and antifungal activity of *Isatis tinctoria* L. (*Brassicaceae*) using the micro-plate method. *Pakistan Journal of Botany*, 49(5), 1949-1957.
- Varga, W.A. & Evans, J.O. (1978). Dyer's woad: from cultivated to cursed. *Utah Science*, 39(3), 87-89.
- Vasconsuelo, A. & Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5), 861-875. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.006>
- Verpoorte, R., Contin, A. & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1), 13-25.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2-20.
- Wang, Y.T., Yang, Z.F., Zhan, H.S., Qin, S. & Guan, W.D. (2011). Screening of anti-H1N1 active constituents from *Radix Isatidis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 28, 419-422.
- Ward, J.L., Forcat, S., Beckmann, M., Bennett, M., Miller, S.J., Baker, J.M., Hawkins, N.D., Vermeer, C.P., Lu, C., Lin, W., Truman, W.M., Beale, M.H., Draper, J., Mansfield, J.W. & Grant, M. (2010). The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *The Plant Journal*, 63(3), 443-457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04254.x>

- Wawrosch, C., Schwaiger, S., Stuppner, H. & Kopp, B. (2014). Lignan formation in hairy root cultures of Edelweiss (*Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter). *Fitoterapia*, 97, 219-223.
- Weathers, P.J., Towler, M.J. & Xu, J. (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1339-1351. doi: 10.1007/s00253-009-2354-4
- Wiktorowska, E., Długosz, M. & Janiszowska, W. (2010). Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1), 14-20. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.002
- Wilczańska-Barska, A., Królicka, A., Głód, D., Majdan, M., Kawiak, A. & Krauze-Baranowska, M. (2012). Enhanced accumulation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* following elicitation. *Biotechnology Letters*, 34(9), 1757-1763. doi: 10.1007/s10529-012-0963-y
- Wilson, S.A. & Roberts, S.C. (2014). Metabolic engineering approaches for production of biochemicals in food and medicinal plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 174-182. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.006
- Wu, C.H., Dewir, Y.H., Hahn, E.J. & Paek, K.Y. (2008). Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology*, 49(3), 193-199.
- Xiao, Y., Ji, Q., Gao, S., Tan, H., Chen, R., Li, Q., Chen, J., Yang, Y., Zhang, L., Wang, Z., Chen, W. & Hu, Z. (2015). Combined transcriptome and metabolite profiling reveals that Ii PLR1 plays an important role in lariciresinol accumulation in *Isatis indigotica*. *Journal of Experimental Botany*, 66(20), 6259-6271. https://doi.org/10.1093/jxb/erv333
- Yang, C.H., Chang, H.W., Lin, H.Y. & Chuang, L.Y. (2013). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities from 28 Chinese herbal medicines. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(1), 294-305.
- Yıldırım, S. (1988). Türkiye'nin batı yarısı ve kuzeyindeki *Isatis* L. (*Cruciferae*) cinsinin revizyonu. *Doğa Türk Botanik Dergisi*, 12(3), 332-400.
- Young-Am, C., Yu, H.S., Song, J.S., Chun, H.K. & Park, S.U. (2000). Indigo production in hairy root cultures of *Polygonum tinctorium* Lour. *Biotechnology Letters*, 22(19), 1527-1530.
- Zech-Matterne, V. & Leconte, L. (2010). New archaeobotanical finds of *Isatis tinctoria* L.(woad) from Iron Age Gaul and a discussion of the importance of woad in ancient time. *Vegetation History and Archaeobotany*, 19(2), 137-142. doi:10.1007/s00334-009-0229-3
- Zhang, Y., Smuts, J.P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J.C. & Armstrong, D.W. (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and

rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9305-9314. <https://doi.org/10.1021/jf302179c>

Zhao, J., Davis, L.C. & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>

Zhao, J.L., Zhou, L.G. & Wu, J.Y. (2010). Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 137-144. doi: 10.1007/s00253-010-2443-4

Zhou, W. & Zhang, X.Y. (2013). Research progress of Chinese herbal medicine *Radix isatidis* (banlangen). *The American Journal of Chinese Medicine*, 41(04), 743-764. <https://doi.org/10.1142/S0192415X1350050X>



ÖZGEÇMİŞ

