



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇEMEN OTU (*Trigonella foenum-graecum* L.) DOKULARINDA
CYP450 GEN ANLATIMI VE DİOSGENİN ÜRETİMİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN SAPTANMASI**

Bekir Ahmet İLGAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

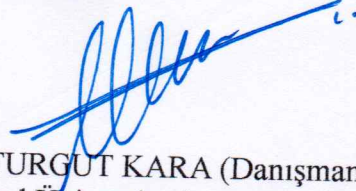
**DANIŞMAN
Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA**

Temmuz, 2019

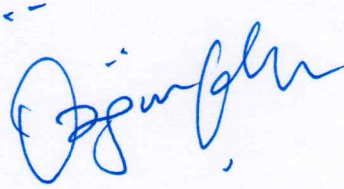
İSTANBUL

Bu çalışma, 30.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

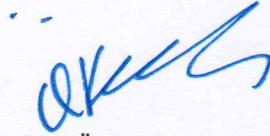
Tez Jürisi



Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Özgür ÇAKIR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Özge KARAKAŞ METİN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 31546 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenim sürecimde bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, fikirleri ile bana daima yol gösteren ve beni cesaretlendiren danışmanım Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Sayın Doç. Dr. Özgür ÇAKIR'a, Doç.Dr. Sibel ÖZDEN'e ve Öğr.Gör.Dr. Fatma Elif ÇEPNİ YÜZBAŞIOĞLU'na tezimde ve diğer çalışmalarımındaki yardım ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince birçok konuda desteğini aldığım başta Araş. Gör. Burcu ARIKAN ve İlayda GÖKTEPE olmak üzere, deneyimleri ile yanımda olan tüm ekip arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve olan, her daim yardım ve destekte kendini esirgemeyen, uzun yıllar boyu yeni maceralara atılacağımız Ayşegül YANIK'a,

Son olarak da bu günlere gelmemde en büyük emeği olan, aldığım kararlarda ve attığım adımlardaki en büyük destekçilerime; başta annem Nebahat İLGAR ve babam Yusuf İLGAR olmak üzere sevgi ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen bütün aile bireylerime tüm kalbimle teşekkür ederim.

Temmuz 2019

Bekir Ahmet İLGAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. ÇEMEN OTU (<i>TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM</i> L.)	3
2.2. DİOSGENİN	6
2.3. ELİSİTASYON	11
2.4. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ	13
2.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (“REAL TIME PCR VEYA “QUANTATİVE PCR- QPCR)	14
3. MALZEME VE YÖNTEM	17
3.1. BİTKİ MATERYALİ	17
3.2. BESİYERİ HAZIRLANMASI	17
3.3. TOHURLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ	18
3.4. KALLUS VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI	18
3.5. MAYA ÖZÜTÜNÜN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI	18
3.6. DİOSGENİN EKSTRASİYONU VE RNA İZOLASYONU İÇİN ÖRNEK TOPLANMASI	19
3.7. ÇEMEN OTUNDAN DİOSGENİN EKSTRAKSİYONU	19
3.8. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ	19
3.8.1. HPLC Kalibrasyon Eğrisi Çizimi ve Diosgenin Miktarının Ölçülmesi	20
3.9. TOTAL RNA İZOLASYONU	20
3.10. JEL ELEKTROFOREZİ	21
3.11. CDNA SENTEZİ	22

3.12. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (GERÇEK ZAMANLI PZR)	23
3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. ÇEMEN OTU KALLUS VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ	25
4.2. DİOSGENİN MİKTARINDAKİ DEĞİŞİMLER.....	26
4.3. DİOSGENİN METABOLİZMASINDA ROL OYNAYAN GENLERİN ANLATIMLARINDAKİ DEĞİŞİMLER.....	27
4.3.1. Total RNA'ların Formaldehit Agaroza Jelde Görüntülenmesi.....	27
4.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları.....	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Çemen Otu (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.) (Baldemir ve İlgün, 2015).	3
Şekil 2.2: Çemen otu tohumları (Srinivasan, 2006).	5
Şekil 2.3: Diosgenin molekülünün kimyasal yapısı (Król-Kogus ve diğ., 2018).	7
Şekil 2.4: Vaidya ve diğ. tarafından (2013) önerilen diosgenin üretim yolağı.	8
Şekil 2.5: Ciura ve diğ. tarafından (2018) önerilen diosgenin üretim yolağı.	9
Şekil 2.6: Fungal elisitör sinyal mekanizmasının şematik gösterimi (Shakya ve diğ., 2017).	12
Şekil 2.7: HPLC sisteminin çalışma prensibi (Temizkan, 2003).	14
Şekil 2.8: SYBR Green floresan boyasının kullanıldığı gerçek zamanlı PZR'nin basamakları, 1: denatürasyon; 2: primerlerin bağlanması; 3: uzama ve ışımanın oluşumu (Fraga ve diğ., 2008).	15
Şekil 2.9: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları (Page ve Stormberg, 2011).	16
Şekil 4.1: 21 günlük <i>in vitro</i> çemen otu kültürleri: A) Kallus indüklenmesi için kullanılan çemen otu, B) 21. günde çemen otu kallus dokusu (Bar: 1 cm).	25
Şekil 4.2: Elde edilen kallusları kullanılarak kurulan hücre süspansiyon kültürleri ve çalışmada kullanılan elisitör, A) 0. gün hücre süspansiyon kültürü, B) 13. gün hücre süspansiyon kültürü C) elisitör olarak maya özütü.	26
Şekil 4.3: HPLC analizinde kullanılan farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış diosgeninin standart kalibrasyon eğrisi.	26
Şekil 4.4: Maya özütü uygulamasının ardından diosgenin miktarındaki değişim.	27
Şekil 4.5: Total RNA izolasyonu ardından örneklerin formaldehit-agaroz jel görüntüsü (12K = 12 saat kontrol, 12YE = 12 saat maya özütü uygulaması, 24K = 24 saat kontrol, 24YE = 24 saat maya özütü uygulaması).	28
Şekil 4.6: Maya özütü elisitasyonu sonrası <i>CYP86A2</i> , β -glukozidaz ve <i>CAS</i> genlerinin anlatımındaki değişimlerin gösterimi. “***” PostOc Tukey HSD testi ile ANOVA ile her bir zaman noktasında karşılık gelen kontrollere göre önemli bir fark olduğunu ($p < 0.01$), “****” ise çok önemli bir fark olduğunu ($p < 0,0003$) göstermektedir, # işareti deney grupları arasındaki ilişikiyi göstermektedir.	30

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Çemen otu tohumuna (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.) ait besin değerleri (Srinivasan, 2006).....	6
Tablo 3.1: 250 mL besiyeri hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve miktarları.	17
Tablo 3.2: Diosgenin analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları.	20
Tablo 3.3: %1'lik formaldehit-agaroz jel bileşenleri.....	22
Tablo 3.4: cDNA sentez kiti bileşenleri.	22
Tablo 3.5: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerlerin dizileri.....	23
Tablo 3.6: Gerçek Zamanlı PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları.	24
Tablo 3.7: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerlerin çalışma koşulları.....	24
Tablo 4.1: <i>T. foenum-graecum</i> hücre süspansiyon kültürlerinin maya özütü ile elisitasyonundan sonra <i>CYP86A2</i> , β -glukozidaz ve <i>CAS</i> genlerinin anlatımlarında değişimler $2^{\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre hesaplanmıştır (↑: anlatımda artış; ↓: anlatımda azalış).....	29

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
g	: Gram
L	: Litre
mL	: Mililitre
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
Kg	: Kilogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
V	: Volt
Kcal	: Kilokalori
pH	: Hidrojenin Gücü, “ Power of Hydrogen”
KCl	: Potasyum Klorür
CuCl ₂	: Bakır (II) Klorür
HgCl ₂	: Cıva (II) Klorür
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit

Kısaltmalar	Açıklama
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksiasetik Asit
CAS	: Sikloartenol Sentaz
Ct	: Döngü Eşiği, “Cycle Treshold”
cDNA	: Komplementer DNA
CYP86A2	: Sitokrom 450 gen ailesi 86A2 Geni

DEPC	: Dietil pirokarbonat
dH₂O	: Saf su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtOH	: Etil Alkol
GAPDH	: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
g	: Rölatif Santrifüj Kuvveti, “RCF”
HPLC	:Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, “High Performance Liquid Chromatography”
HPTLC	: Yüksek Saflıkta İnce Kağıt Kromatografisi
LC- ESI-MS	: Likit Kromatografisi ve Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrofotometresi
Mbç	: Megabaz Çifti
MeJa	: Metil Jasmonat
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MOPS	: 3-Morfolino Propansülfonik asit, “3-Morpholino Propanesulfonic acid”
MS	: Murashige ve Skoog
MQ	: Ultra saf su
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı, ‘Rotation per minute’
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
TLC	: İnce Kağıt Kromatografisi
UV	: Mor Ötesi
qPCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu “quantitative Polymerase Chain Reactions”
YE	: Maya Özütü, “Yeast Extract”
yy	: Yüzyıl

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEMEN OTU (*Trigonella foenum-graecum* L.) DOKULARINDA CYP450 GEN ANLATIMI VE DİOSGENİN ÜRETİMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN SAPTANMASI

Bekir Ahmet İLGAR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Çemen otu sahip olduğu biyoaktif ve aromatik bileşiklerden dolayı başlıca tıp, gıda ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır. Çemen otu tohumlarında terapötik özelliğe sahip pek çok molekül bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi saponin sınıfından diosgenindir. Diosgenin ilaç endüstrisinde pek çok steroidal ilacın üretiminde temel öncü bileşiktir. Dahası diosgenin, antioksidan, antienflamatuvar, antikanser ve kandaki yağ ve şeker metabolizmasını düzenleyici pek çok biyoaktif özellik sergilemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diosgeninin lanosterolden ve/veya sikloartenolden oluştuğu hipotezleri üzerinde durmaktadır.

Bitkiler karbohidrat, protein, lipit gibi metabolitleri hayatlarını devam ettirebilmek için üretmektedir. Bunların aksine döl verimini artırmak, patojenlere karşı kendilerini savunabilmek için de sekonder metabolitleri üretirler. Sekonder metabolitler başta tıp olmak üzere, kozmetik, gıda ve tekstil gibi alanlarda da kullanılmaktadır. Bundan dolayı da fazla miktarda üretimleri önem arz etmektedir. Bu amaçla günümüzde gen transferi çalışmaları, elisitasyon çalışmaları gibi farklı biyoteknolojik stratejilere başvurulmaktadır. Bu tez çalışmasında çemen otu tohumlarından *in vitro* çimlendirilen bitkicikler eksplant olarak kullanılarak kallus kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen bu kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurulmuş ve kültürlemenin 13. gününde elisitasyon amacıyla 12 saat ve 24 saat süresince 0,01 g/mL konsantrasyonda maya özütü uygulaması gerçekleştirilmiştir. Elisitasyon uygulamasının ardından diosgenin miktarı ölçülmüş ve diosgenin üretim yolağında görevli olduğu düşünülen CYP86A2, β -glukozidaz ve sikloartenol sentaz (CAS) genlerinin anlatımları incelenmiştir.

Sonuç olarak maya özütü diosgenin üretimini 12. ve 24. saatlerde artırmıştır. Bu alışma ile maya özütünün emen otu hücre süspansiyon kültürlerinde diosgenin üretimini artırmak için elisitör olarak kullanabileceği ortaya konmuştur.

Temmuz 2019, 59 sayfa.

Anahtar kelimeler: Diosgenin, maya özütü, emen otu, elisitasyon.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF RELATIONSHIP BETWEEN CYP450 GENE EXPRESSION AND DIOSGENIN PRODUCTION IN FENUGREEK (*Trigonella foenum-graecum* L.) TISSUE

Bekir Ahmet İLGAR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Fenugreek has been used at medicine, nourishment, cosmetic because of its bioactive and aromatic compounds. Fenugreek seeds have plenty of molecules which are therapeutics. The most important one is diosgenin. Diosgenin is essential precursor for many steroidal drugs in pharmaceutical industry. Moreover, it has exhibited bioactive properties such as hyperlipidemia, hipoglisemia, anti-oxidant, anti-enflamatuar, anti-cancer and proliferative activity. Recent studies have been hypothesized that diosgenin formation from either lanosterol or cycloartenol.

Plants produce some metabolites as carbohydrates, proteins, lipids to sustain their life. Unlike these metabolites, they produce secondary metabolites as a guard against pathogens and to improve fertility. The secondary metabolites used as cosmetic, dietary, textile and primarily in medical and pharmaceutical areas. Hereby high volume production of secondary metabolites become important. Therefore nowadays, different biotechnological strategies such as gene transfer studies and elicitation studies are being used for high volume production of secondary metabolites. In this thesis, callus culture obtained via *in vitro* grown plant explants. Cell suspension cultures were established from these calli and yeast extract was applied at the concentration of 0,01 g/mL for 12 hours and 24 hours to elicitate 13th day old cultures. After elicitation, the amount of diosgenin was measured and the expression of *CYP86A2*, β -glucosidase and *cycloartenol synthasa (CAS)* genes which were thought to be has a role on the

production pathway of diosgenin were examined. As a result, yeast extract increased the diosgenin production at 12th and 24th hours. In this study, it was demonstrated that yeast extract can be used as an elicitor to increase the production of diosgenin in fenugreek cell suspension cultures.

July 2019, 59. pages.

Keywords: Diosgenin, yeast extract, fenugreek, elicitation.



1. GİRİŞ

Çemen otu bitkisi (*Trigonella foenum-graecum* L.) tıp, gıda, eczacılık ve kozmetik alanlarında yaygın olarak kullanımının yanı sıra geleneksel tıpta da kullanılmaktadır. Çemen otu bitkisinin hem tohumlarından hem de vejetatif kısımlarından yararlanılmaktadır. Çemen otu tohumlarının kendisi ve ekstreleri gıda sanayinde fırın ve et ürünlerine, alkollü içeceklere, şekerlemelere, çeşni ürünlerine, dondurmalara, soslara ve şekerli kremalara ilave edilmektedir. Halk arasında çemenden tahriş giderici, barsak yumuşatıcı, sindirimi kolaylaştırıcı, süt artırıcı, göğüs yumuşatıcı, balgam söktürücü olarak yararlanılmaktadır. Bunun yanında ateş düşürücü, boğaz ağrısını giderici, yara iyileştirici özelliklerinin yanı sıra kan şekerini düşürücü etkisinden dolayı şeker hastalığında ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

Diosgenin çemen otu dokularında bulunan biyolojik olarak aktif bir steroidal sapogenindir. Literatürde, diosgenin diyabete, hiperlipidemiye, kansere, kardiyovasküler hastalıklara, oksidatif strese ve inflamasyon gibi çeşitli patolojilere karşı etkili olduğu belirtilmektedir. Diosgenin, çemen otunun biyolojik etkilerinin pek çoğunda önemli bir etken olarak ortaya çıkmıştır ki bu da insülin sinyalizasyonunun ve glikoz homeostazının çalışması sırasında ortaya konmuştur. Diosgenin üzerine yapılan çalışmalar, bu biyoaktif bileşiğin ve çemen otunun obezitenin bir çevrede metabolik sağlığı nasıl destekleyebileceğine dair değerli bilgiler vermektedir.

Birleşmiş Milletler Çevre Programı'nda belirtildiği üzere insan sağlığı, ekonomik ve sosyal gelişimlerin iz düşümüne bağlı olarak şekillenmektedir (UNEP, 2012). Bu nedenle de doğal kaynakların araştırılması ve geliştirilmesi önem arz etmektedir. Doğa, molekülleri biyolojik ve kimyasal süreçlerle kendi kendine birleştirerek kompleks yapılar oluşturmaktadır. Biyoteknoloji bilimi, insanlığa fayda sağlamak için limitsiz potansiyele ve muazzam bir yönelime sahiptir. Biyoteknoloji ziraat, sağlık, gıda ve çevre uygulamaları için yeni ürünler oluştururken biyolojik süreçleri ve malzemeleri kullanmaktadır. İlk biyoteknolojik ürünlerden olan biraya Sümerler döneminde rastlanmaktadır. Bitki biyoteknolojisi, bitkilerin verim ve kalitesini, strese karşı dayanıklılığını artırma, sağlık, gıda, tekstil, kozmetik gibi alanlara ham madde üretmek için bitkileri kullanma ve geliştirmeyi amaçlayan çalışmaları içermektedir. Bitki moleküler çiftçiliği olarak adlandırılan yöntem özellikle endüstriyel değeri olan metabolit

ve proteinlerin bitkilerde düşük maliyet, yüksek verim ile üretilmesidir. Her geçen gün artmakla beraber bu yöntem sayesinde son 10 yılda 100'e yakın protein üretilmiştir (Fischer ve Emans, 2000; Giddings, 2001). Bitkiler hayatlarını devam ettirebilmek için ürettikleri birincil metabolitlerin dışında stres koşulları ile mücadele etmek için de sekonder metabolitleri üretmektedir. Bitkisel sekonder metabolitler dört gruba ayrılmaktadır: terpenoidler, fenolik bileşenler, alkaloidler ve sülfür içeren bileşenler. Bu fitokimyasallar anti-mikrobiyal, anti-kanser, anti-proliferatif ve biyotik-abiyotik strese karşı kullanılmaktadır. Bu sebeple sekonder metabolitlerin fazla miktarda üretimi önem arz etmektedir. Bu hedef doğrultusunda sekonder metabolitlerin miktarının artırılabilmesi için gen transferi, mutasyon ve elisitasyon uygulamalarını içeren stratejilere başvurulmaktadır. Elisitasyon, bitkinin stres mekanizmasını dış kaynaklı biyotik veya abiyotik bir kaynakla uyarak, biyoteknolojik açıdan önemli sekonder metabolitlerin üretimini artırıcı mevcut bir yöntemdir. Elisitör ise elisitasyon çalışmasında kullanılan maddeyi belirtmektedir. Yapılan çalışmalar elisitör olarak maya özütü kullanıldığında peroksidaz seviyesinin ve P450 gen ailesi üyelerinin anlatımlarının arttığı gösterilmektedir (Turgut-Kara 2007, Ciura ve diğ. 2018).

Bu tez çalışmasında, *Trigonella foenum-graecum* L. bitkisine ait tohumlar steril koşullarda çimlendirilmiş ve elde edilen bitkiciklerden kallus kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen kallus kültürleri kullanılarak hücre süspansiyon kültürleri kurulmuştur. Diosgenin miktarının biyoteknolojik yolla artırılması amacıyla, hücre süspansiyon kültürlerine 12 saat ve 24 saat boyunca elisitör olarak 0,01 g/mL maya özütü ekstresi uygulanmıştır. Aynı zamanda diosgenin molekülünün oluşumunda görevli olduğu düşünülen *CYP86A2*, β -*glikozidaz* ve *CAS* genlerinin anlatım analizi gerçek zamanlı PZR ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada tek yıllık otsu bir bitki olan *T. foenum-graecum*'de ilk kez maya özütü elisitör olarak kullanılarak terapötik özelliğe sahip olan diosgenin molekülünün artırılmasına olan etkisi araştırılmış ve daha önce önerilen diosgenin üretim yollarındaki farklı genlerin anlatımları analiz edilerek diosgenin üretimi üzerindeki rolleri ilişkilendirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ÇEMEN OTU (*TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM* L.)

Fabaceae familyasına ait olan çemen otu (*Trigonella foenum-graecum* L.) dikotil, tek yıllık otsu bir bitkidir. Varyetelerine göre farklılık göstermekte olup genellikle 30 ile 60 cm yüksekliğe erişmekte ve dallanma göstermektedir. Üçlü yapraklara, nodüllü köklere, beyaza çalan sarı çiçeklere, hilal şeklindeki baklalara ve altın sarısı tohumlara sahiptir (Şekil 2.1). Çiçeklerinin üçgen şekli nedeniyle *Trigonella* cinsine ait olup, Yunan otu manasına gelen “*foenum-graecum*” tür ismi ile taksonomide yerini almaktadır. *Trigonella* cinsi ülkemizde 45 farklı tür barındırmaktadır ve bunlardan *T. foenum-graecum*’un kültürü yapılmaktadır. Yöreye göre “çemen otu” veya “buy otu” olarak da tanımlanmaktadır (Basch ve diğ., 2003; Acharya ve diğ., 2006; Petropoulos, 2006; Moradi ve Moradi, 2013).



Şekil 2.1: Çemen Otu (*Trigonella foenum-graecum* L.) (Baldemir ve İlgin, 2015).

Çemen otu tarih boyunca farklı amaçlar doğrultusunda kullanılmıştır; örneğin, eski Mısır’da firavunların cenaze törenlerinde ayinin bir parçası olarak kullanılmıştır (Rosengarten, 1969; Miller, 1969). Hipokrat bu bitkinin tıbbi amaçlar için kullanılabileceğini belirtmiştir (Lust, 1986; Schauenberg ve Paris, 1990). Theophrastus Yunanca “Voukeras” ve “Tilis” adını vermiştir. Pers kralı Antiochus Epiphanes arenadaki oyunlara gitmeden önce çemen içeren parfüm kullanmıştır (Leyel, 1987). Millattan önce 2. yüzyılda Romalılar hayvan yemi olarak kullanmıştır (Fazli ve Hardman, 1968). Milattan sonra 60’larda Anadolu’nun Anavarza kentinde yaşamış olan Dioscorides, farmakolojinin babası, yazılarında çemen otunun merhem

olarak kullandığını belirtmiştir (Manniche, 1989). Kral Şarlmén sayesinde de çemen otu Orta Avrupa'da kültüre alınmıştır (Fazli ve Hardman, 1968). İlk belgelenmiş çemen otu Transilvanya Herbaryumu'nda 16. yy'da bulunmuştur (Melius, 1578; Petropoulos, 2006). 17. yy'da ise doğumdan sonra plasentayı atmak için çemen otu tohumlarının toz formu kullanılmıştır (Hidvegi ve diğ., 1984; Howard, 1987). Günümüzde ise çemen otu, Baharat Yolu üzerinde bulunan neredeyse her ülkede yetiştirilmekte ve ticareti yapılmaktadır.

Çemen otunun kullanım alanlarına bakıldığında yaprak ve tohumların kullanımları farklılık göstermektedir. Yapraklar genellikle salata veya hayvan yemi olarak kullanılırken tohumlar ise peynire lezzet vermek için, şurup/şerbet aroma artırıcı olarak, ekmek yapımında, kahve bileşeni olarak, tahıl ambarlarını böceklerden korunmak için ve hatta parfümeride kullanılmaktadır. Ülkemizde ise işletmenin formülasyonuna göre pastırmanın dış kısmında bulunan macun yapımında ve kahvaltılık ezme olarak kullanılmaktadır. Çemen otunun pek çok alanda karşımıza çıkmasının nedeni olarak anti-diyabetik, anti-mikrobiyal, anti-kanser, hipoglisemik ve hiperlipidemik özelliklere sahip olması gösterilmektedir (Gupta ve diğ., 2001; Rakhee ve diğ., 2004; Sadeghzadeh-Ahari ve diğ., 2009).

Buğday gibi çemen otu da toprak ve iklim konusunda toleransı yüksek olan bir bitkidir. Bu yüzden de dünya üzerinde geniş bir dağılım göstermektedir. Kuraklığa dayanıklı olan çemen otu düşük yağış dönemlerinde daha iyi bir gelişim sergilemektedir. İhtiyaç duyduğu sıcaklık en düşük 10-15 °C iken aşırı sıcak veya soğuk ortamlarda verimi düşmektedir (Talelis, 1967; Duke, 1986). Fakat farklı varyetelerinin hem kışın hem de yazın ekimi gerçekleştirilmektedir. Sıcak iklime sahip bölgelerde kışlık olarak veya kış bitimine doğru, soğuk iklime sahip bölgelerde ise yazlık olarak tarımı gerçekleştirilmektedir (Talelis, 1967; Kan ve diğ., 2006). Ülkemizde çemen otunun tarımı Konya, Çorum, Tokat, Amasya, Afyon, Nevşehir, Antalya'da gerçekleştirilirken dünyaya baktığımızda Hindistan başta olmak üzere Doğu'da, Mısır ve Etiyopya ile Afrika'da, Almanya ve Yunanistan ile de Orta Avrupa'da tarımı gerçekleştirilmektedir (Gençkan, 1983; Akgül ve diğ., 1993; Beyzi ve diğ., 2010).

Yapılan karyotip ve genom çalışmaları *Trigonella* taksasının B kromozomuyla birlikte $2n=14$, 16, 18, 28, 30 ve 32 kromozoma sahip olduğunu göstermektedir. Çemen otunun genomu 685 Mbç büyüklüğündedir. Tıbbi açıdan önemli bir bitki olmasına rağmen tüm genomu dizilenmemiştir. Çemen otu $2n=16$ kromozoma sahip olup, kromozom boyutları 3,03 ve 4,84 μm arasında değişmektedir (Martin ve diğ., 2011).

Çemen otu tohumları %45-60 karbohidrat, %20-30 protein ve %5-10 civarında lipitin yanı sıra A, B1 ve C vitaminleri ve nikotinik asit de içermektedir. Tohumlar saponinler, alkaloidler ve flavanoidler olmak üzere üç farklı sekonder metaboliti bir arada bulundurmaktadır. Bunun dışında saponinlerin hidrolizlenmesiyle meydana gelen diosgenin, neotigogenin, yamogenin, tigogenin gibi glikozitlere de sahiptir. 100 mg tohumun %35'i alkaloid, %10'u flavanoid, %4,8'i saponin ve %0,2-0,9'u da diosgenindir. İçerdiği alkaloidler g-lakton ve sotolon gibi uçucu bileşenlerle birlikte keskin bir tada ve aromatik yapıya sahiptir. İçerdiği fiber, müsilaaj ve galaktomannanlar sayesinde safra tuzu oluşmasını, nişasta absorpsiyonunu azaltırken serbest amino asitler sayesinde de insülin sekresyonunu artırmaktadır (Madar ve Shomer, 1990; Haefelé ve diğ., 1997; Faeste ve diğ., 2009; Meghwal ve Goswami, 2012) (Şekil 2.2; Tablo 2.1).



Şekil 2.2: Çemen otu tohumları (Srinivasan, 2006).

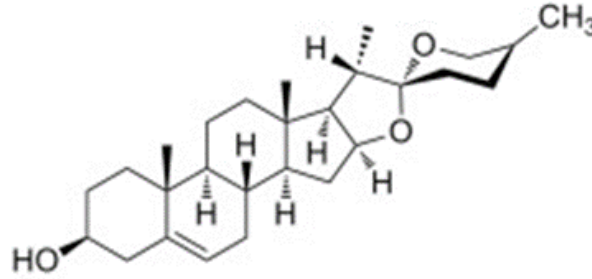
Tablo 2.1: Çemen otu tohumuna (*Trigonella foenum-graecum* L.) ait besin değerleri (Srinivasan, 2006).

100 gram Çemen Otu Tohumunun İçeriği	
Karbohidrat	58 g
Yağ	6,4 g
Protein	23 g
Enerji	323 kcal
Tiamin (B1)	0,322 mg
Riboflavin (B2)	0,366 mg
Niasin (B3)	1,64 mg
B6 Vitamini	0,6 mg
Folat (B9)	57µg
C Vitamini	3 mg
Kalsiyum	176 mg
Demir	34 mg
Magnezyum	191 mg
Manganaz	1,23 mg
Fosfor	296 mg
Potasyum	770 mg
Sodyum	67 mg
Çinko	2,5 mg

2.2. DİOSGENİN

Diosgenin, β -3 pozisyonunda -OH grubuyla spirostan, 5 ve 6. karbonlar arasında çift bağ oluşmuş, pozisyon 25'te R-konfigürasyonuna sahip bir sapogenindir (Şekil 2.3). İlaç endüstrisinde steroidal bileşenleri içeren doğal ürünlerin kaynak olarak kullanımı oldukça yaygındır. Saponinlerin aglikon kısımları olarak tanımlanan sapogeninler ve bazı steroidal saponinler antikanser özellik göstermektedir (Thakhur ve diğ., 2011; Salvador ve diğ., 2013; Jiang ve diğ., 2016). Bu bileşenler arasında olan diosgenin, saponin olan dioskinin

hidrolizlenmesiyle meydana gelen, iyi bilinen bir steroidal sapogenindir. *Dioscrea*, *Trigonella*, *Costus* ve *Smilex* cinsleri diosgenin üretmektedir (Khare, 2004; Shao ve diğ., 2007; Raju ve diğ., 2009; Chen ve diğ., 2015; Selim ve diğ., 2015). Fuji ve Matsukawa (1935) tarafından *Dioscrea tokoro*' da keşfedilen diosgenin çemen otu tohumlarında da bulunduğu ve çemen otunda kolesterolden türevlenerek oluştuğu belirtilmiştir. Çemen otunun farklı dokularının (tohum, kabuk ve kotiledon) kimyasal içeriği analiz edildiğinde saponinlerin en fazla tohumda %5,12 g bulunduğu gösterilmiştir (Naidu ve diğ., 2010). Biyoaktif bir molekül olan diosgenin, diyabet, hiperlipidemi, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, oksidatif stres ve iltihaplanmaya karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, progesteron, glukokortikoid, testosteron gibi hormon ve steroidal ilaçların üretilmesinde öncül olarak kullanılmaktadır (Son ve diğ., 2007; Pari ve diğ., 2012; Kalailingam ve diğ., 2014). Trouillas ve diğ. (2004) *in vitro* çalışmalarında diosgeninin biyolojik aktivitelerini test etmiştir. Moleküler modelleme yöntemleri ile diosgeninin ve diğer bazı sapogeninlerin yapısal özelliklerinin proliferasyon, hücre siklusu dağılımı ve apoptoz üzerine etkileri incelenmiş olup, diosgeninin antikanser aktivitesinin C5-6 çift bağıyla ve hetero-şeker parçasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Trouillas ve diğ., 2004). Bunun dışında C5 ve C25 atomlarının konformasyonunun da biyolojik aktivitesinde etkili olduğu gösterilmiştir.

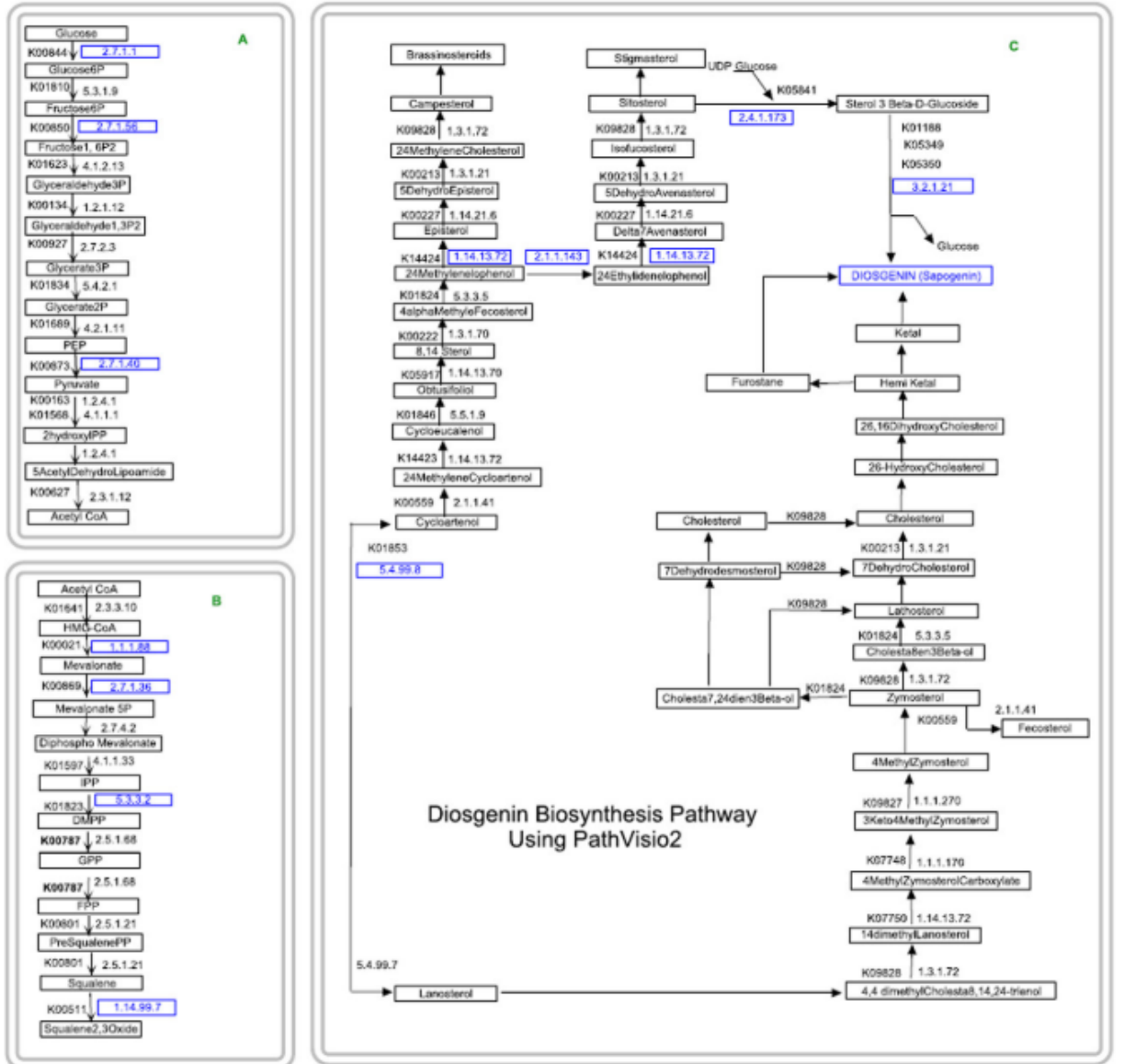


Şekil 2.3: Diosgenin molekülünün kimyasal yapısı (Król-Kogus ve diğ., 2018).

Diosgenin, yamogenin ve tigogenin gibi sapogeninler genellikle D-glukoz başta olmak üzere şeker ünitelerine glikozidik bağlarla bağlanarak sapogenil glikozitleri oluşturmaktadırlar. Diosgenil glikozitler spirostanol saponinler arasında önemli bir gruptur. Diosgenin spirostanol iskeletindeki C5 ve C6 atomları arasındaki çift bağ sayesinde farklı şekerlerle birlikte kombinasyonları bulunabilmektedir (Yang ve diğ., 1999; Thakur ve diğ., 2011).

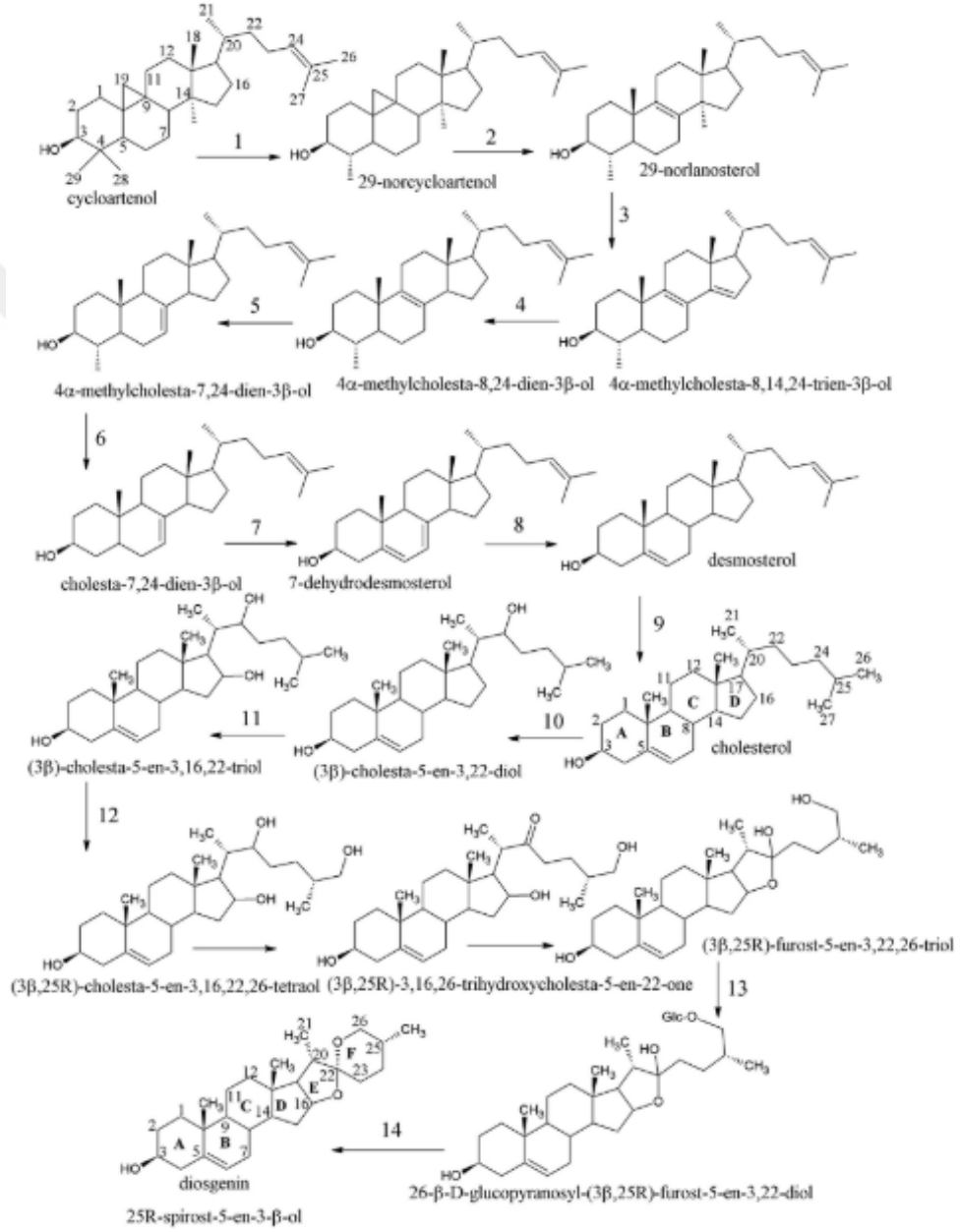
Steroidil ilaçların öncül ham maddelerinden biri olan diosgeninin oluşum mekanizmasının ortaya konması farmasötik açıdan önemlidir. Bu konu ile ilgili olarak son 10 yılda pek çok

çalışma yapılmıştır. Diosgeninin oluşum mekanizmasını öngören ilk grup Vaidya ve arkadaşlarıdır (2013) (Şekil 2.4). Buna göre asetil koenzim A ile başlayan mevalonat yolu sikloartenol sentazı veya lanosterol sentazı kullanarak diosgenini oluşturmaktadır. Daha sonrasında Chaudhary ve diğ. (2015) yürüttükleri çalışmada, lanosterol sentazın kullanılmadığını, sikloartenol sentazın kullanıldığı yolu ve bu yolda çalışan sterol-3- β -glukosil transferaz enzimini ortaya koymuştur. Son iki yılda diosgenin metabolizması üzerine yapılan kapsamlı transkriptomik çalışmalarda ise (Ciura ve diğ., 2017), lanosterol sentazı kodlayan bir transkripte rastlanılmamış ancak pek çok aşamayı sitokrom P450 gen ailesinin katalize ettiği belirtilmiştir.



Şekil 2.4: Vaidya ve diğ. tarafından (2013) önerilen diosgenin üretim yolu.

Bu bağlamda, Ciura ve diğ.'nin (2017 ve 2018) elde ettiği sonuçlar diosgenin oluşum yolağının daha da netleşmesine yardımcı olmuştur. Bu çalışmaya göre, mevalonat yolağı sonucunda oluşan skualen-2,3-oksit sikloartenole sonrasında kolesterole ve kolesterolden de sitokrom P450 gen ailesi üyesi enzimler vasıtasıyla diosgenin dönüşmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Ciura ve diğ. tarafından (2018) önerilen diosgenin üretim yolağı.

Diosgeninin anti-kanser, anti-diyabetik, hiperlipidemik, anti-inflamuar, etkilerini göstermek için pek çok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir. Kansere karşı diosgeninin anjiyogenez, hücre göçü, epitel-mezanşimal değişim, apoptoz ve tümör proliferasyonu gibi

yollarda etkin olduğu belirlenmiştir. Zhou ve diğ. (2019) diosgeninin Cdc20 geninin inhibitörü olduğunu ve hücre büyümesini inhibe ederek apoptozu indüklediğini göstermiştir. Diosgeninin insan hepatoselüler karsinomu üzerine etkilerini araştırdıklarında, hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini, G2/M fazının süresini artırdığını, DBP3 ('Dead Box Polypeptide' 3) geninin anlatımında artış gerçekleştiğini, hücre, bölünmesini ve istilasını baskıladığını göstermiştir (Yu ve diğ., 2019). Diosgenin *in vivo* tümör hücrelerinde morfolojik değişikliğe neden olmasının yanı sıra B16F10 melanoma hücrelerinin gelişimini inhibe etmektedir. Ayrıca C57BL/6 farelerine diosgenin verildikten sonra, CD4+/ CD8+ T-hücreleri sızıntısı ve IFN- γ anlatımı artmakta ve bağışıklık sistemi aktive olmaktadır (Dong ve diğ., 2018). Bunun dışında diosgeninin barsak mikrobiyotası üzerine etkisi incelendiğinde, immün sistemi destekleyici *Lactobacillus* ve *Sutterella* genuslarının çoğalmasına aksine *Bacteroides* genusunun azalmasına neden olduğu rapor edilmektedir. Dahası diosgenin bazı mevcut ilaçların aktivitesini de artırmaktadır. Marin-Madina ve diğ. (2019) diosgenin ile atorvastatin, diosgenin ile ezetimibe ve sadece diosgeninin lipid metabolizmasını düzenlediğini, diosgenin ile ezetimibenin kolesterolün ve glukozun barsaktan emilimini artırırken, atorvastatinin ise omurilikte kolesterol dağılımını artırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca Li ve diğ. (2019) mevcut anti-kanser ilaçlarının aktivitesini artırmak ve toksisitesini düşürmek için gerçekleştirdiği çalışmalarda diosgenin ve hidroksikampototesinin birlikte kullanılmasının, tek kullanımına göre daha etkin sonuçlar doğurduğunu göstermişlerdir. Anti-enflamatuvar ajan olarak kullanılan bromelain organizma tarafından yüzde yüz verimle kullanılamamaktadır. Bu yüzden Shameli ve diğ. (2018) bromelain ve bazı bitkisel kökenli kimyasal maddelerin birlikte veya bir bütün olarak kullanılmasının verimi artıracağını düşünerek gerçekleştirdikleri çalışmada, bromelain-amenthoflavone ikilisi Pla2 ile rakip olurken bromelian-asiatikozid ve bromelain-diosgenin ikilisi ise sinerjik etki göstermiştir.

Kato ve diğ. (1995) steroidal glukozidlerden diosgeninin (10 ve 50 mg/kg) kan şekeri üzerine etkilerini diyabetik fare modellerinde incelediğinde 4 saatlik uygulama sonrasında kan şekeri seviyelerinde herhangi bir iyileşme belirlememişlerdir. Ancak, Khosravi ve diğ. (2019), uzun süreli (4-8 hafta) diosgenin (40 mg/kg/gün) uygulamasının serum glukozunu düşürdüğünü belirtmektedir. Aynı ekip, diosgeninin testosteron seviyesini artırdığını, Tnf- α ve Il-6'da ise azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca, apoptoz belirteçleri olan kaspaz-3, anneksin V ve DNA fragmentasyonunda düşüş gözlenmiş olup sperm sayısı, hareketliliği ve yaşam süresinin arttığı gösterilmiştir. Wu ve diğ. (2018) çalışmalarında diosgenin glikositleri kullanarak diyabetik

farelerde etkilerini araştırmışlardır. Bunun sonucunda uzun süre boyunca diosgenin glikositleri uygulamasının glukoz toleransını ve lipid profilini artırdığını belirlemişlerdir. Bunun aksine $Il-1\beta$, $Il-6$, ve $Tnf-\alpha$ üretimleri azaltmıştır.

Diosgenin, yumurtalığı alınmış sıçanlarda lipid peroksidasyonu ile ilişkili olan malondealdehidin konsantrasyonunu azaltmasının yanı sıra glutatyon, süperoksit dismutaz ve nitrik oksit seviyelerini önemli ölçüde artırmaktadır. Dahası fenilefrinin neden olduğu kasılmaları da azaltarak damar ve kas gevşetici olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Oliveira ve diğ., 2019). Ayrıca menopoza giren kadınların yaşadıkları kemik erimesi problemi ile ilişkili olarak yumurtası alınmış sıçanlarda diosgeninin etkisi çalışılmıştır. On iki hafta boyunca vücut kitlesine göre günlük 100 mg/kg diosgenin yumurtası alınmış sıçanlara oral yolla verilmiş ve sonuç olarak alveolar kemik oluşum mekanizmasında görevli genlerden *Ctnnb1*, *Tcf2*, *Smad4* ve *Tcf2'nin* anlatımlarını artırdığı; *Tnf*, *Il1b*, *Il1r1*, *Tnfrsf1a'nın* anlatımlarının ise azaldığı gösterilmiş ve bu genlerin düzenlenmesinde görevli olabilecek 6 tane uzun kodlama yapmayan RNA'nın (lncRNA) varlığı gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2018).

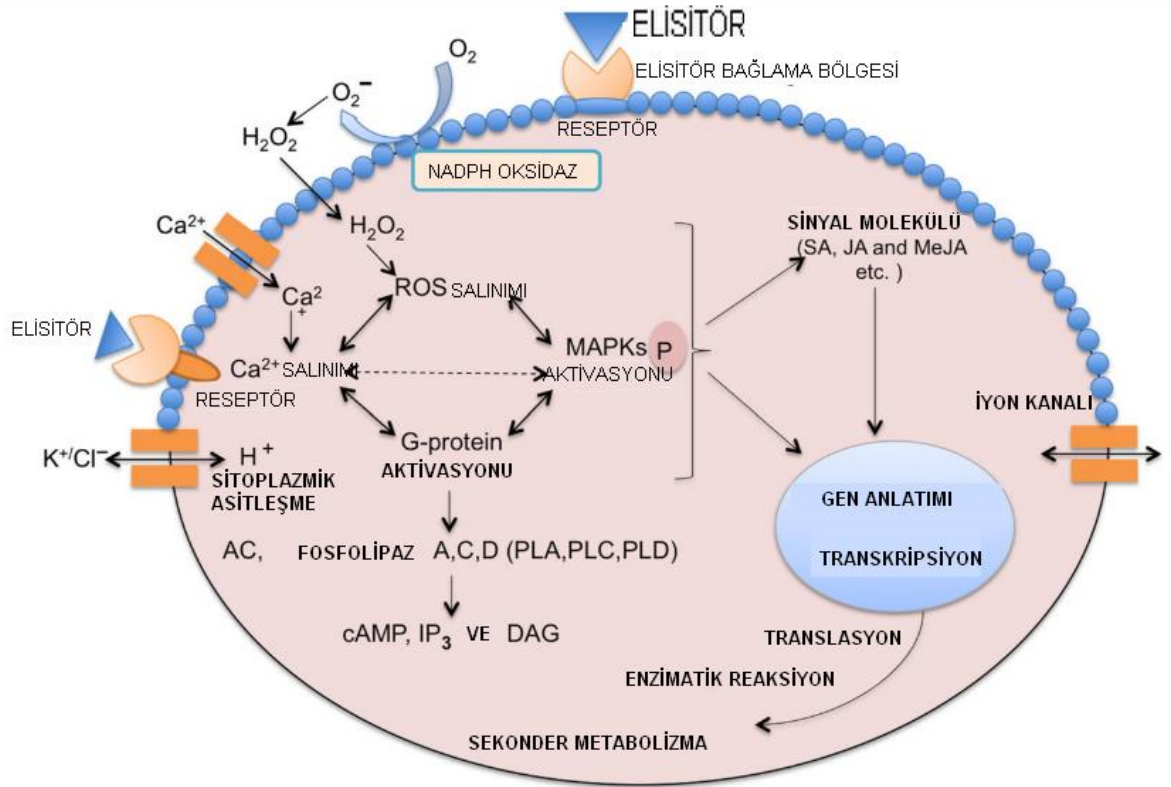
Ayrıca diosgenin diyabetten kaynaklı katarakta da olumlu etkisinin olduğu bildirilmiştir. Ji ve diğ. (2017), katı ve sıvı olarak oral yolla verilen diosgeninin, aldoz redüktazın güçlü bir inhibitörü olduğunu, lens epitel hücrelerinde bulunan aldoz redüktaz aktivitesini azalttığını, lens ağırlığını ve küçük vakuollerin oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir.

2.3. ELİSİTASYON

Bitkilere dışarıdan verilen biyotik veya abiyotik uyaranla stres mekanizmasının aktifleştirilmesi ve bu sayede sekonder metabolitlerin üretiminin artırılması tekniğine elisitasyon denilmektedir. Bitkilerde stres mekanizmasını tetikleyerek sekonder metabolitlerin üretimini artıran bu maddelere elisitör denmektedir. Elisitörleri biyotik ve abiyotik, kimyasal ve fiziksel, olacak şekilde ikiye ayırmak mümkündür. Abiyotik elisitörlere ısı, ışık, UV, çevresel koşullar ve $CuCl_2$, $HgCl_2$, KCl , $MgSO_4$ gibi kimyasallar örnek verilebilirken biyotik elisitörlere ise karbohidratlar, proteinler, lipidler, hücre duvarı bileşenleri ve hatta hücrenin kendisi örnek olarak verilebilmektedir (Zhao ve diğ., 2005; Wang ve diğ., 2015; Ramirez-Estrada ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2017). Fungal elisitörler, bitkilerde hiper sensitif cevabı indükleyerek defans mekanizmasını çalıştırmakta ve sonuç olarak fitoaleksinlerin oluşmasını sağlamaktadır (Baldi ve diğ., 2009). Biyotik elisitör maya özütü, sahip olduğu kitin, N-asetilglukozamin

oligomerleri, β -glukan, glukopeptit ve ergosterol ile bitkilerde sinyal mekanizmasını uyarmakta, bu sayede sekonder metabolitlerin üretimi gerçekleşmektedir. Mu ve diğ.'nin (2009) yürüttükleri çalışmada, *Lycoris chinensis*'e uyguladıkları maya özütü ile galantamin miktarının 1,68 kat arttığını bildirmişlerdir. *Aureobasidium pullulans* ekstraktı ise *Vitis vinifera* kalluslarında stilben fitoaleksinin birikimini artırmıştır (Rühmann ve diğ., 2013).

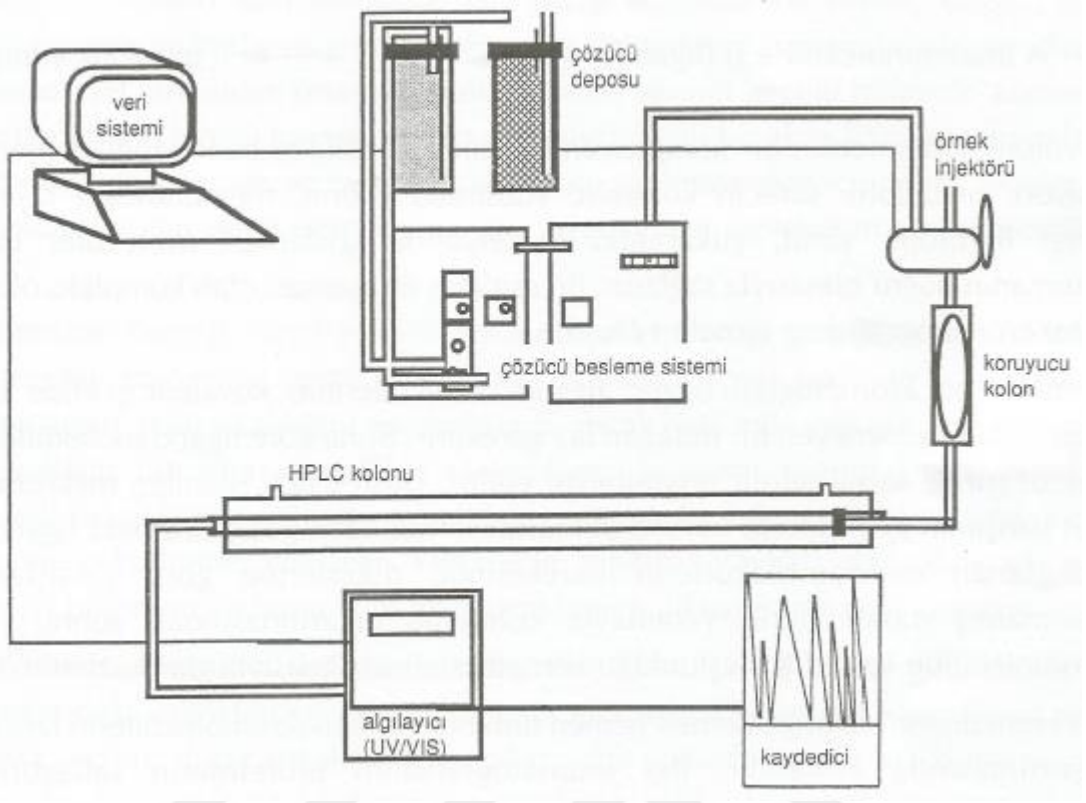
Maya özütünün sinyal yolağını nasıl etkinleştirdiğine bakıldığında; ilk olarak hücre membranındaki ilgili tanıma reseptörüne bağlandığı belirlenmiştir. Bu etkileşimden dolayı membranda iyon akışı gerçekleşir. Hücre içine Ca^{2+} pompalanır. Reaktif oksijen türleri oluşur. Protein kinazlarda, mitojenle aktiveleşen protein kinazlarda, G-proteini ve protein fosforilasyonunda uyarılmalar ve değişimler başlar. Bunun sonucunda ikincil haberciler sentezlenir ve sitoplazmanın asiditesi artar ve membran geçirgenliği azalır. Jasmonik asit, salisilik asit, H_2O_2 gibi ikincil mesajcılar savunma genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu başlatır. Maya özütü bu şekilde sekonder metabolitlerin oluşum yolağını aktifleştirerek üretimlerine neden olabilmektedir (Şekil 2.6) (Radman ve diğ., 2003; Shakya ve diğ., 2017; Zhai ve diğ., 2017).



Şekil 2.6: Fungal elisitör sinyal mekanizmasının şematik gösterimi (Shakya ve diğ., 2017).

2.4. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ

Primer ve sekonder metabolitlerin tanımlanması ve kantitasyonunda, kolon dolgu maddeleri sayesinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (“High Performance Liquid Chromatography”-HPLC) yöntemi geniş ölçekte kullanılmaktadır. Bu sayede pek çok maddenin fonksiyonel ve yapısal analizinin gerçekleştirilmesinde zamandan tasarruf edilerek etkin sonuçlar elde edilmektedir. Sistemdeki yüksek atmosfer basıncı sayesinde kolona uygulanmış olan örneğin yüksek bir hızla geçişi sağlanarak analizi kısa sürede gerçekleştirilebilir (Şekil 2.7) (Temizkan, 2003). Günümüze kadar diosgeninin tanımlanmasında ve belirlenmesinde farklı analitik metodlar geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları, gravimetrik metot (Morris ve diğ., 1958), TLC (Brain ve Hardman, 1968), gaz kromatografisi (Šavikin-Fodulović ve diğ., 1998), HPLC (Huang ve diğ., 2008), ELISA (Wang ve diğ., 2010), spektrometrik metotlar (Chen ve diğ., 2011), HPTLC (Nagore ve diğ., 2013) ve LC ESI-MS’dir (Taketani ve diğ., 2015). En etkin sonuçlar LC ESI-MS yönteminde elde edilmesine rağmen sistemin gerekliliği ve kullanım zorluğu nedeniyle spektrofotometrik yöntemler ve HPLC daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhang ve Miller, 1992). Diosgenin metaboliti özelinde bakıldığında, bütün bu yöntemler uzun zaman alan saflaştırma basamakları içerirken Chaundray ve diğ. (2018) diosgenin için daha düşük maliyetli ve kısa süreli bir ekstraksiyon yöntemi geliştirerek HPLC’de etkin sonuçlar almışlardır.

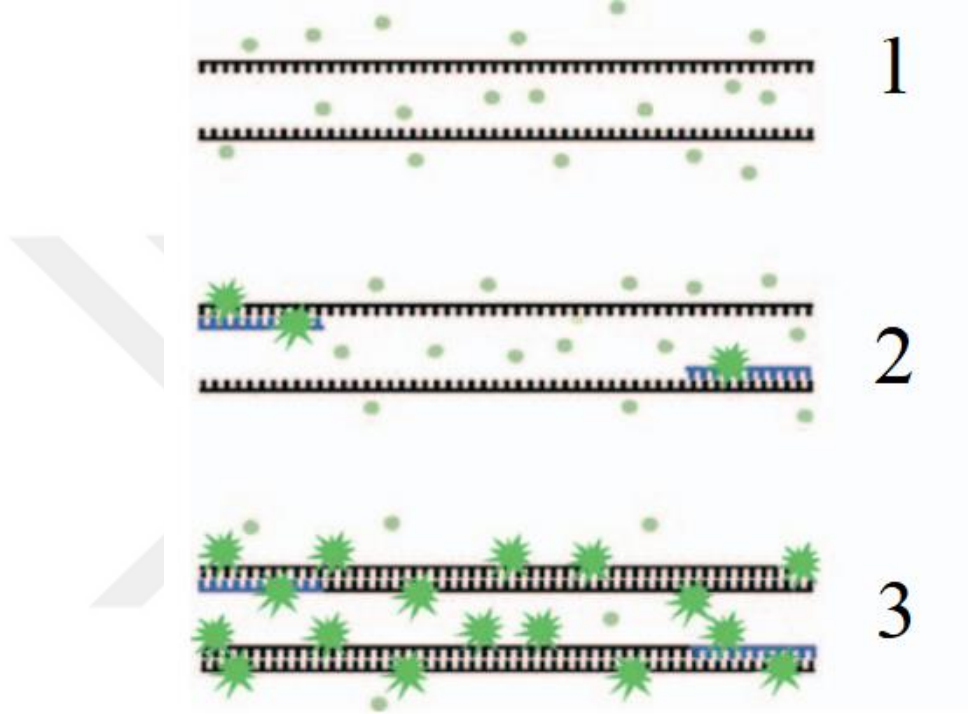


Şekil 2.7: HPLC sisteminin çalışma prensibi (Temizkan, 2003).

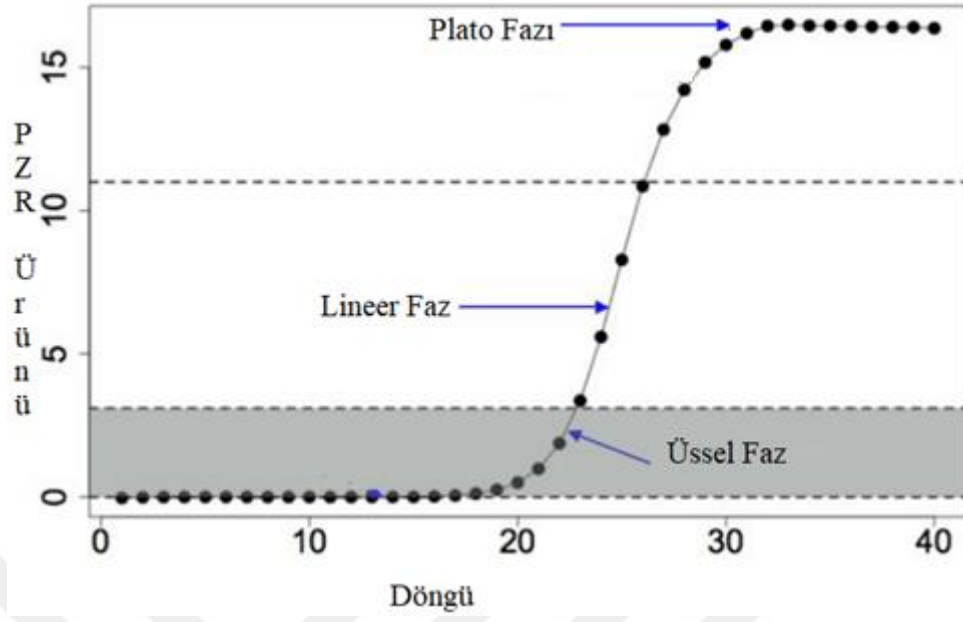
2.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (“real time PCR veya “quantative PCR- qPCR)

Belirli koşullarda bir genin anlatım analizi, ilgili genin mRNA’sının elde edilmesini ve miktarının belirlenmesini kapsamaktadır. RNA temelli ilk anlatım analizi çalışmaları “Northern blotlama” ile başlamıştır (Alwine ve diğ., 1977). 1990’larda geliştirilen gerçek zamanlı PZR yaşam bilimleri ve klinik çalışmalarda hızlı, doğru ve hassas bir yöntem olarak kabul görmektedir. Gerçek zamanlı PZR bileşenleri klasik PZR ile neredeyse aynı olmakla beraber, SYBR Green gibi ışığa yapabilen boyalar veya reaksiyonu daha da özgünleştiren problardan oluşmaktadır (Şekil 2.8). Bu sayede anlatımın kantitatif analizi gerçekleştirilebilmektedir. Verilerin analizi, reaksiyon sonucunda elde edilen ürün miktarı ve buna bağlı olarak döngü grafiğindeki değerlerden oluşmaktadır. Oluşan grafikte üç farklı faz bulunmaktadır: üssel, doğrusal ve durağan faz (Şekil 2.9). Oluşan ürünün üssel faza geçtiği döngü Ct (“Cycle Treshold”) değerini vermektedir (Van Guilder ve diğ., 2008). Anlatımın kantitatif analizinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu yaygın olarak kullanılmaktadır (Pfaffl, 2001). Bu yöntemin prensibi reaksiyondaki DNA’nın ikiye katlanarak %100 verim elde edildiğini varsayımına

dayanmaktadır. Yalnız referans genin Ct değerinin test genlerinden daha düşük olması gerekmektedir. Fakat bazı durumlarda test edilen genle referans genin Ct değerleri yakın olmaktadır. Bu durumlarda referans genin Ct değerinin $15 < Ct < 30$ olmasına dikkat edilmelidir. Referans genler olarak genellikle 18S rRNA, GAPDH, siklofilin veya β -aktin tercih edilmektedir (Vandesompele ve diğ., 2002; Bustin, 2002; Kozera ve Rapacz, 2013).



Şekil 2.8: SYBR Green floresan boyasının kullanıldığı gerçek zamanlı PZR'nin basamakları, 1: denatürasyon; 2: primerlerin bağlanması; 3: uzama ve ışımının oluşumu (Fraga ve diğ., 2008).



Şekil 2.9: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları (Page ve Stormberg, 2011).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu tez çalışmasında ticari olarak satın alınan *Trigonella foenum-graecum* L. bitki tohumları çimlendirilip, meyveleri elde edilene kadar yetiştirildikten sonra İstanbul Üniversitesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Farmasötik Botanik Ana Bilim Dalı'nda öğretim üyesi Doç. Dr. İbrahim Sırrı Yüzbaşıoğlu tarafından tanımlanmıştır (ISTE no: 116455).

3.2. BESİYERİ HAZIRLANMASI

T. foenum-graecum bitki ve kalluslarının doku kültürü çalışmalarında Murashige ve Skoog (MS) katı besiyeri kullanıldı (Murashige ve Skoog, 1962). Besiyerleri Tablo 3.1'de miktarları belirtilen bileşenler kullanılarak hazırlandı ve otoklavda (Nüve, OT 012) (121°C'de, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dakika) steril edildi. Besiyerleri elle tutulur sıcaklığa (50-60 °C) geldiği zaman MS vitamini ve etanolde (Sigma, 32221) çözündürülerek 0,22 µm çapındaki filtreden [Millipore (Millex-GS)] geçirilen 2,4-D (1 mg/mL) bitki büyüme düzenleyicisi eklendi.

Tablo 3.1: 250 mL besiyeri hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve miktarları.

Besiyeri	Miktar	Marka
Bileşenleri		
MS Temel Tuz Karışımı	1,1 gram	Sigma, M5519
Sukroz	7,5 gram	Sigma, 84097
Agar (katı besiyeri hazırlanırken kullanıldı)	2,25 gram	Sigma, A1296
NaOH (1N ve 5N)	pH 5,6-5,8	Merck, 1.06462.1000
MS Vitamin	250 µL	Sigma, M3900
2,4-D (1 mg/mL)	125 µL	Sigma, D-4517

3.3. TOHUMLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ

Tohumlar yüzey sterilizasyonu amacıyla 3 kez 1 ml %70'lik etil alkol ile 15 saniye inkübe edildi. Ardından 5 dakika boyunca %20'lik çamaşır suyunda (Domestos) bekletildi. Çamaşır suyunu durulamak için 3 defa 5 dakika steril suda bekletildi. Steril edilen tohumlar, laminar hava akımlı steril kabinde 15-20 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan steril tohumlar, MS katı besiyeri içeren 9 cm çaplı Petri kaplarına ekilerek parafilm ile sarıldı ve hava alması engellendi. MS besiyerine ekimi yapılan tohumlar bitki büyütme kabininde çimlenmeye bırakıldı [$25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux (Sanyo, MLR-352H)]. Bölüm 3.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan besiyeri cam tüplere döküldü. Beş günün sonunda Petri kaplarındaki çimlenen tohumlar cam tüplere aktarılarak dikey olarak kültürlendi.

3.4. KALLUS VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

In vitro çimlendirilen bitkilere ait gövde ve yaprak dokuları 1 cm uzunluğunda kesilerek kallus kültürlerinin oluşturulacağı petri kaplarına dökülen 0,5 mg/mL 2,4-D içeren MS katı besiyerine yatay olarak yerleştirildi. Kallus dokusunun oluşmasının ardından aynı koşullarda alt kültürlemeler yapılarak kallus dokusunun miktarı artırıldı. Daha sonra yaklaşık 1 g kadarı 3 saat boyunca Pasteur fırınında (180°C) steril edilen 250 mL'lik Erlen Mayer'lere aktarıldı ve hafifçe ezildi. Üzerlerine 50 mL 0,5 mg/mL 2,4-D içeren sıvı MS besiyerine eklendi. Hücre süspansiyon kültürleri çalkalamalı etüvde (120 devir/dak) 21 gün boyunca kültürlendi. Üç hafta boyunca yeterli gelişim gösteren kültürler steril mezürlerde ölçülerek miktarları belirlendi. Steril Erlen Mayer'lere eşit hacimlerde paylaştırıldı ve 50 mL'ye tamamlanacak şekilde 0,5 mg/mL 2,4-D içeren sıvı MS besiyerine eklenerek alt kültürü gerçekleştirildi. Her üç hafta sonunda alt kültürleme tekrarlandı.

3.5. MAYA ÖZÜTÜNÜN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

Elisitasyon amacıyla kullanılmak üzere 2 gram maya özütü 10 mL distile suda çözüldü ve üzerine 40 mL EtOH (%100) eklenerek 4 gün boyunca 4°C 'de bekletildi. 4 günün sonunda üst sıvı atıldı ve aynı işlem tekrar uygulandı. İkinci 4 günün sonunda çözelti tartıldı ve derişimi 0,2 g/mL olacak şekilde distile suda çözündürüldü ve 0.22 μm filtreden geçirilerek 4°C 'de kullanılabilecek kadar saklandı. Çakır ve Arı'nın (2009) belirttiği gibi hazırlanan maya özütü, hücre

süspansiyon kültürlerine 13. günde 0,01 g /mL olacak şekilde eklendi ve aynı miktarda steril distile su da kontrol gruplarına eklendi. 12 saat ve 24 saat boyunca çalkamalı etüvde kültür devam ettirildi.

3.6. DİOSGENİN EKSTRASİYONU VE RNA İZOLASYONU İÇİN ÖRNEK TOPLANMASI

Maya özütü uygulanmış gruplar ve kontrol grupları 12 saat ve 24 saatin sonunda 15 mL Falcon tüplere eşit hacimlerde aktarıldı. Tüpler 5000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet sıvı azotta dondurularak -80°C’de izolasyon ve ekstraksiyon için saklandı.

3.7. ÇEMEN OTUNDAN DİOSGENİN EKSTRAKSİYONU

Maya özütü uygulamasından sonra -80°C’de saklanan örneklerden 0,2 gram tartılarak alındı ve havanda sıvı azot ile toz haline getirildi. Üzerine 40 mL %96’lık etanol eklendi ve 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonrasında karışımın üzerine 40 mL 1 mol/L H₂SO₄ eklenerek 2 saat boyunca 100°C’de kaynatıldı. Karışım 50-60°C’ye geldiğinde üzerine 8 mL NaOH eklendi. Yeteri kadar distile su ile 3 defa yıkama gerçekleştikten sonra faz ayrımı için 2-3 dakika beklendi ve üst faz alındı. Üst faz evaporaterde (Heidolph, Hei-VAP Advantage) uçurulduktan sonra kalan kısım 1 mL asetonitrilde çözündürülerek +4°C’de saklandı (Li ve diğ., 2012).

3.8. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ

Maya özütünün diosgeninin üretimi üzerine etkisinin analizi OchraTest WBTM (Vicam) test protokolüne uygun olarak ‘photodiode array’ dedektör (DAD) donanımlı HPLC cihazında gerçekleştirildi. Diosgenin analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Diosgenin analizi için optimum kromatografik çalışma koşulları.

Kolon	Phenomenex, Synergi, 5 µm, Polar-RP, 80 A, C ₁₈ , 250 mm x 4,6 mm
Koruyucu kolon	-
Mobil Faz	Su: asetonitril (30:70, hacim/hacim), izokratik sistem
Akış Hızı	1 mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Kolon sıcaklığı:	25°C
Basınç	Minimum 0 bar, Maksimum 300 bar
Detektör dalgaboyu:	UV-DAD (204 nm)
Alınma Zamanı	9,95,5-10,05 dak

Ekstraksiyon sonucu elde edilen diosgenin çözeltisi 2 mL’lik enjektöre “Set inject” aktarıldı. Daha sonra örnekler şırınga ucu filtresinden (Lubitech, SN01345) geçirilerek vidalı insertli cam vial (Finneran, 30209-1232) aktarıldı ve vialden 10 µL alınarak HPLC cihazına yüklendi.

3.8.1. HPLC Kalibrasyon Eğrisi Çizimi ve Diosgenin Miktarının Ölçülmesi

Diosgenin standart çözeltilerine karşı dedektörün cevabının belli konsantrasyon aralığındaki doğrusallığını belirlemek amacıyla 0,3125; 0,625; 1,25; 6,25; 12,5 µg/mL’lik konsantrasyonlarda diosgenin standart çözeltilerinden 4’er adet hazırlandı. Her çözeltiden 3’er kez enjekte edildi ve kromatogramlarda standartlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Denklem 3.1’e göre de ekstrelerdeki diosgenin miktarı hesaplandı.

$$y = 6868x + 373,31$$

(Denklem: 3.1)

3.9. TOTAL RNA İZOLASYONU

Hücre süspansiyon kültüründen elde edilen örneklerden Qiagen Rneasy Mini Kiti (74904) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. 50-100 mg örnek, sıvı nitrojen ile havanda toz haline getirildi, ardından her 1 mL RLT tamponu için 10 µL β-merkaptoetanol eklenmiş 450 µL RLT tamponunda homojenize edilerek parçalandı. Karışım steril 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı. 3 dakika 56°C’de inkübe edildi. Karışım lila renkli QIAshredder mini spin tüpe aktarıldı. 23°C’de 13.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı steril 2 ml’lik yeni tüpe aktarıldı. 350 µL %100’lük etanol eklendi. Pipetaj yapılarak hafifçe karıştırıldı. Örnek daha sonra pembe renkli RNeasy mini spin tüpüne aktarıldı. 23°C’de, 10.000 rpm’de 15 saniye santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı. 350 µL RW1 solüsyonu eklendi. 23°C’de, 10.000 rpm’de 15 saniye santrifüj

edildi. 10 µL DNase I stok (1500 Kunitz ünite) ve 70 µL RDD tamponu hafifçe karıştırıldı. 80 µL'lik bu karışım RNeasy mini spin tüpüne eklendi. 30 °C'de 15 dakika enzim aktivasyonu gerçekleştirildi. 350 µL RW1 eklenir. 23°C'de, 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. 500 µL RPE eklendi ve tekrardan 23°C'de, 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü ve sıvı kısım atıldı. Mini spin tüpü yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı. 500 µL RPE eklendi, 23°C'de, 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü ve sıvı kısım atıldı. Mini spin tüpü yeni bir 1,5 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı. Kolonun filtresinde bulunan RNA'ları almak için 60 µL RNaz içermeyen su eklenerek 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj yapıldı. RNA'lar -80°C' de saklandı.

3.10. RNA miktarının ve saflığının belirlenmesi

RNA örneklerinin RNaz içermeyen suda çözündürüldükten sonra nanodrop spektrofotometre cihazı (Thermo scientific, nanodrop 2000) ile konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. RNA konsantrasyonları µg/mL cinsinde denklem 3.2' e göre hesaplandı. İzole edilen RNA örneklerinin saflıkları için ise A_{260}/A_{280} oranları hesaplandı ve 1.8-2.00 olan değerler saf kabul edildi.

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım katsayısı} \times 40$$

(Denklem: 3.2)

3.11. JEL ELEKTROFOREZİ

Jel hazırlanırken 0,4 g agaroz DEPC'li MQ suda ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Ardından yaklaşık 50°C'ye gelene kadar soğutulup 20X MOPS solüsyonu ve çeker ocakta formaldehit eklenerek karıştırıldı. Daha sonra 3 µL SYBR safe gel boyası (Hibrigen, 0117-KK-240) eklendi ve homojen olarak dağılması sağlandı. Jel tankına uygun tarak yerleştirildi ve jel kasete döküldü. Jele yüklenecek RNA örneklerinden beşer µL alınarak ve üzerine beşer µL denatürasyon tamponu eklendi, karışım 10 dakika boyunca 65°C'de su banyosunda bekletildi. Denatürasyonun sonunda 2 dakika boyunca buzda bekletildikten sonra 2 µL RNA yükleme boyası eklendi. Toplamda 12 µL olan karışım jel kuyularına yüklendi ve jel 2 saat boyunca 40 V'de yürütüldü. Süre sonunda UV jel görüntüleme sistemi (Avegene) aracılığıyla bant profilleri analiz edildi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: %1’lik formaldehit-agaroz jel bileşenleri.

Formaldehit-Agaroz Jeli		20X MOPS (100 mL, pH=7)		Yürütme Tamponu		RNA Denatürasyon Tamponu	
Agaroz (INVITROGEN, 16500-500)	0,4 g	MOPS (SIGMA, 11K5420)	8,3704 g	10x MOPS	30 mL	Formamid (SIGMA, 75127)	10 mL
DEPC’li MQ	29,6 mL	EDTA (TITRIPLEX 3, K03559321)	0,744 g	Formaldehit (SIGMA, 086K3472)	5,4 mL	Formaldehit	3,5 mL
20X MOPS	2 mL	NaAc (SIGMA, 38F0277)	2,1776 g	DEPC’li MQ	264,6 mL	10x MOPS	1,5 mL
Formaldehit (%37)	7 mL	DEPC’Lİ MQ	80 +20 mL	-	-	-	-

3.12. cDNA SENTEZİ

İzole edilen RNA’lardan “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits” kiti (Applied Biosystems, 00709629) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. PZR cihazında (Biorad, T100) 25 °C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5 dakika olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: cDNA sentez kiti bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
10× RT Buffer	4 µL X
25× dNTP Mix (100 mM)	1,6 µL X
10× RT Random Primers	4 µL X
MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U/µL	2 µL 2,5 U/µL
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	40 µL’ye tamamlanır
RNA	2000 ng
Toplam Reaksiyon Hacmi	40 µL

3.13. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Gerçek zamanlı PZR)

Diosgenin metabolizmasında görevli olduğu düşünülen *CYP86A2*, *β-glukozidaz* ve *CAS* genlerinin anlatımlarını inceleyebilmek amacıyla öncelikle Primer3 (v.0.4.0) programı kullanılarak bu genlere uygun primerler tasarlandı (Tablo 3.5). Yine *CYP86A2*, *β-glukozidaz* ve *CAS* genlerinin anlatım profillerinin analizi için izole edilen 3 µL revers transkriptaz ürünü (cDNA) kalıp olarak kullanılarak toplam reaksiyon hacmi 25 µL olacak şekilde polimeraz zincir reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 3.6). Amplifikasyon koşulları 94°C’de 30 s, 52-60°C’de 30 s ve 72°C’de 30-60 s olmak üzere 40 döngü olacak şekilde tasarlandı (Tablo 3.7). İç standart gen olarak aktin geni kullanıldı. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile analiz edildi ve anlatım katsayıları belirlendi. Kullanılan primerlerin özgünlüğü PZR erime eğrisi ile test edildi. Bu amaçla 47°C’den 95°C’ye kadar 0,1°C/s’de bir alınan veriler ile *CYP86A2* için, 52°C’den 95°C’ye kadar 0,1°C/s’de bir alınan veriler ile *β-glukozidaz* için, 55°C’den 95°C’ye kadar 0,1°C/s’de bir alınan veriler ile *CAS* için ve 47°C’den 95°C’ye kadar 0,1°C/s’de bir alınan veriler ile aktin geni için eğri grafikleri oluşturuldu (Roche, LightCycler®Nano).

Tablo 3.5: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerlerin dizileri.

Primer	Primer Dizisi	İleri/Geri Primer
<i>AKTİN</i>	5’ – GAGACAGCCAGGACAAGCTC -3’	İleri
	5’- TTGGAACAGGACCTCTGGAC- 3’	Geri
<i>CYP86A2</i>	5’- CATCCTAGCTGGACGTGACA -3’	İleri
	5’- TGCAAATCTCGCGTAAAATC- 3’	Geri
<i>β-GLUKOSİDAZ</i>	5’- GAGAAAAGCCTTATGCTGAAAC -3’	İleri
	5’- AACTACACATTGAACTGAGCC- 3’	Geri
<i>CAS</i>	5’- GGTAAAAGGGCTGATTGCTG -3’	İleri
	5’- ATAACCTCTCTCCCAACCAC- 3’	Geri

Tablo 3.6: Gerçek Zamanlı PZR’de kullanılan bileşenler ve miktarları.

qPCR Bileşenleri	Miktar
SybrGreen Master Mix (2X)	X
cDNA	3 ul
İleri Primer (10 µM)	1,2 µM
Geri Primer (10 µM)	1,2 µM
dH ₂ O	8,5 µL
TOPLAM	25 µL

Tablo 3.7: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerlerin çalışma koşulları.

	<i>Aktin</i>		<i>CYP86A2</i>		<i>β-glukozidaz</i>		<i>CAS</i>	
Bekleme	50°C	1 dk	50°C	1 dk	50°C	1 dk	50°C	1 dk
Denatürasyon	94°C	30 s	94°C	30 s	94°C	30 s	94°C	30 s
Primer bağlanma	56°C	30 s	52°C	30 s	57°C	30 s	60°C	30 s
Uzama	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	30 s
Bekleme	40°C	30 s	40°C	30 s	40°C	30 s	40°C	30 s
40 DÖNGÜ								

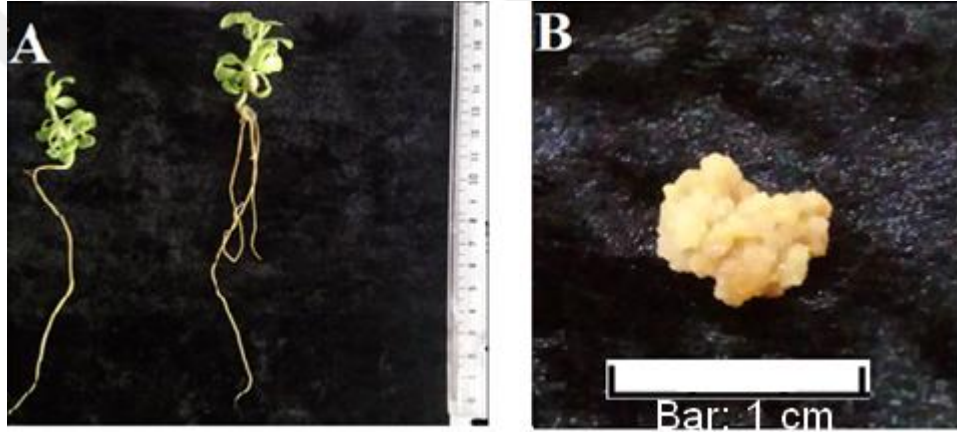
3.14. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Diosgenin miktarının belirlenmesi için gerçekleştirilirken HPLC analizleri ile elde edilen sonuçlar ve gen anlatım analizleri, GraphPad Prism® 5.01 uygulamasında Tukey testi ve çift yönlü ANOVA analizleri ile yorumlandı. *P* değeri 0.05’ten küçük olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi. HPLC sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS-17 paket programı kullanılarak ANOVA post hoc testlerinden ‘Dunnet’s multiple comparison’ testi uygulandı. Diosgenin miktar tayini için 3 biyolojik tekrar uygulandı. Gen anlatım analizleri ise 2 teknik ve 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

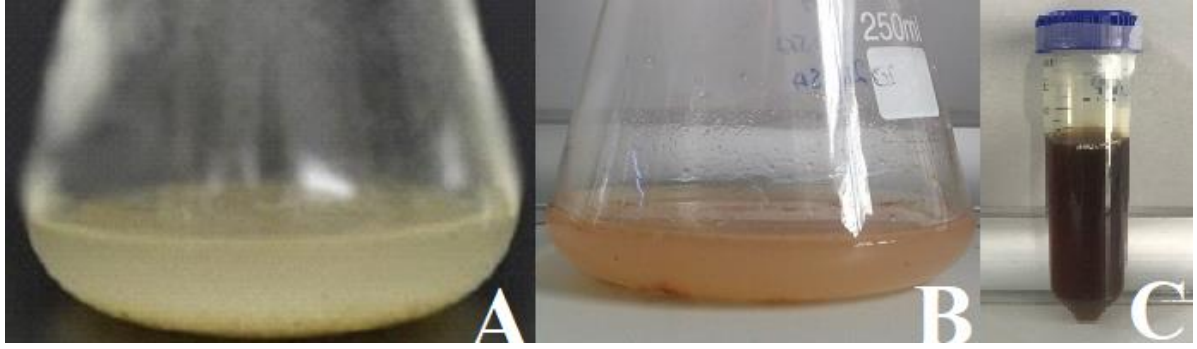
4.1. ÇEMEN OTU KALLUS VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ

Cam tüplere aktarılan ve 3 haftanın sonunda yaklaşık 15 cm boyuna ulaşan bitkiler kallus oluşturmak için eksplant olarak kullanıldı. Gövde ve yaprak kısımları ayrılarak bistüri ile kesilen eksplantlar 0,5 mg/mL 2,4-D içeren MS besiyerlerine yerleştirildi ve 3 hafta sonra kallus oluşumu gözlemlendi. Üç haftanın sonunda gövde ve yaprak üzerinde oluşan kalluslar eksplantlar üzerinden ayrılarak 0,5 mg/mL 2,4-D içeren yeni MS katı besiyerlerine aktarıldı. Elde edilen kalluslar 4 haftada bir yeni besi yerlerine aktarılarak alt kültürleri gerçekleştirildi.



Şekil 4.1: 21 günlük *in vitro* çemen otu kültürleri: A) Kallus indüklenmesi için kullanılan çemen otu, B) 21. günde çemen otu kallus dokusu (Bar: 1 cm).

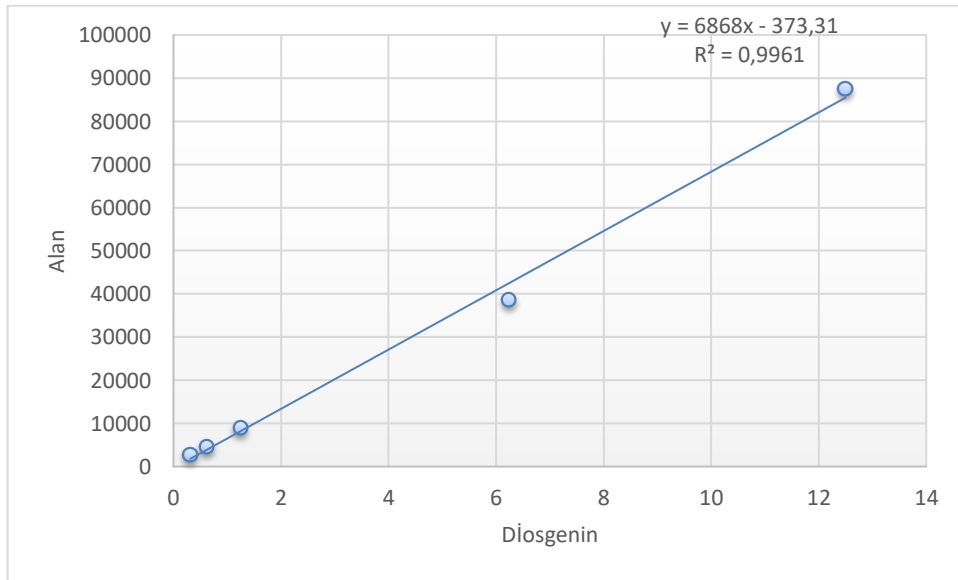
Kırılğan yapıdaki kalluslardan hazırlanan süspansiyon kültürleri Şekil 4.2'deki gibidir. Her 3 haftada bir 25 mL süspansiyon kültür steril edilmiş yeni Erlen Mayer'lere aktarıldı ve 25 mL taze MS sıvı besiyeri ile 0,5 mg/mL 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi eklenerek alt kültürü gerçekleştirildi. Üçüncü alt kültürün başladığı gün 0. gün kabul edildi ve 13. günde maya özütü eklendi.



Şekil 4.2: Elde edilen kallusları kullanarak kurulan hücre süspansiyon kültürleri ve çalışmada kullanılan elisitör, A) 0. gün hücre süspansiyon kültürü, B) 13. gün hücre süspansiyon kültürü C) elisitör olarak maya özütü.

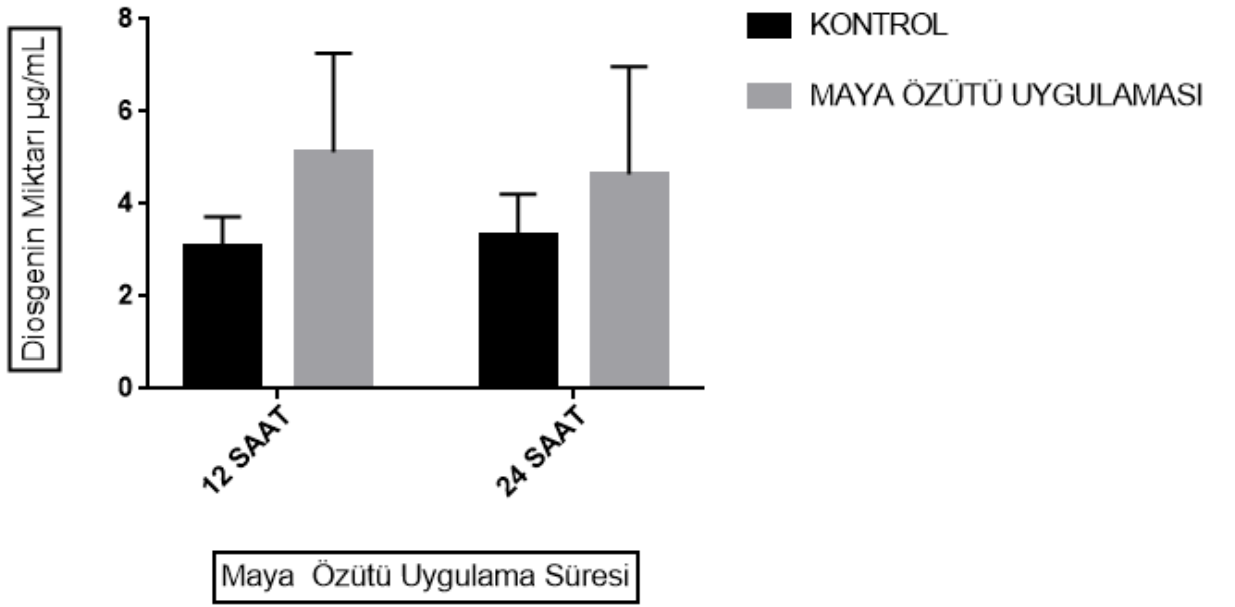
4.2. DİOSGENİN MİKTARINDAKİ DEĞİŞİMLER

HPLC analizleri sonucunda elde edilen veriler $\pm$ standart sapma şeklinde gösterildi. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS-17 paket programı kullanılarak ANOVA post hoc testlerinden ‘Dunnet’s multiple comparison’ testi uygulandı. HPLC analizinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış R^2 değeri 0,9961 olan diosgeninin standart kalibrasyon eğrisi kullanıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: HPLC analizinde kullanılan farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış diosgeninin standart kalibrasyon eğrisi.

Maya özütü uygulamasının diosgenin artışı üzerine etkisi 12 saat ve 24 saat uygulama yapılmış örneklerde araştırıldı. HPLC sonuçlarına göre 12 saat maya özütü ile elisite edilen çemen otu hücre süspansiyon kültürlerinin diosgenin miktarında yaklaşık 1,66 katlık bir artış gözlemlendi. 24 saat süre ile elisitasyon ise 1,40 katlık bir artışa sebep oldu.



Şekil 4.4: Maya özütü uygulamasının ardından diosgenin miktarındaki değişim.

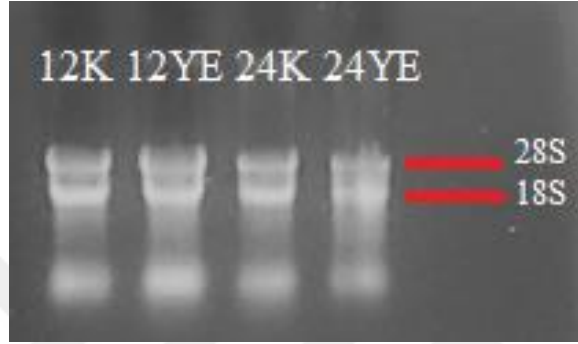
4.3. DİOSGENİN METABOLİZMASINDA ROL OYNAYAN GENLERİN ANLATIMLARINDAKİ DEĞİŞİMLER

T. foenum-graecum'da diosgenin metabolizmasında rol oynadığı düşünülen genlerden *CYP86A2*, β -glukozidaz ve *CAS* anlatımlarındaki değişimler diosgenin miktarına paralel olarak araştırıldı.

4.3.1. Total RNA'ların Formaldehit Agaroza Jelde Görüntülenmesi

Maya özütünün diosgenin metabolizmasına etkisini incelemek ve bu yolla bulunan *CYP86A2*, β -glukozidaz ve *CAS* genlerinin anlatımlarını analiz etmek için maya özütü

uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol grubu) hücre süspansiyon kültürlerinden RNA izole edildi. İzole edilen RNA'ların kantitatif analizi spektrofotometrik ölçüm ile belirlendi. A_{260}/A_{280} oranları ≈ 2.00 olan örnekler seçilerek saf kabul edildi ve cDNA sentezinde kullanıldı. RNA'ların kalitatif analizleri ise formaldehit-agaroz jel elektroforezi yöntemi ile belirlendi. Yapılan formaldehit-agaroz jel elektroforezi sonucunda 28S ve 18S RNA'ların bütün olarak görüntülenmesi izolasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Total RNA izolasyonu ardından örneklerin formaldehit-agaroz jel görüntüsü (12K = 12 saat kontrol, 12YE = 12 saat maya özütü uygulaması, 24K = 24 saat kontrol, 24YE = 24 saat maya özütü uygulaması).

4.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

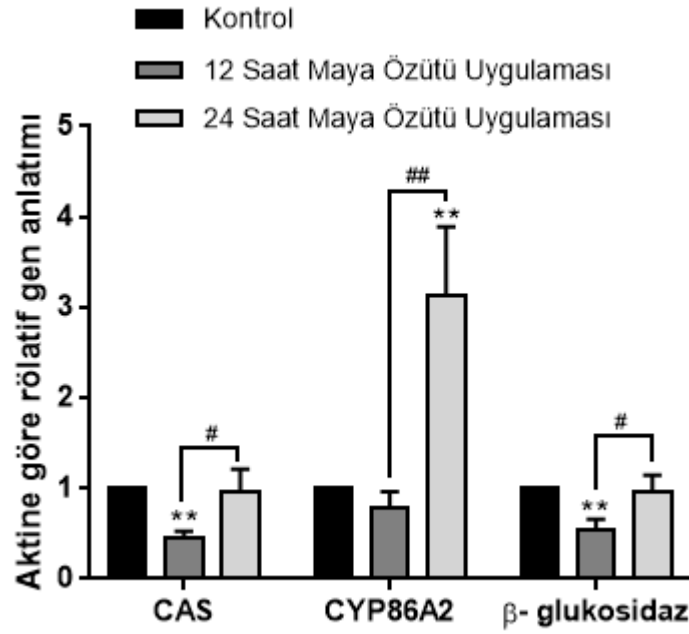
HPLC analizleri sonucunda diosgenin miktarında 12 saat maya özütü uygulamasında kontrole göre yaklaşık 1,66 katlık bir artış; 24 saat maya özütü uygulamasında ise 1,40 katlık bir artış belirlendiğinden, diosgenin metabolizması ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülen *CYP86A2*, β -glukozidaz ve *CAS* genlerinin anlatım seviyelerindeki değişimi de incelendi. Bu amaçla, maya özütü uygulanmış hücre süspansiyon kültürlerinde seçilen *CYP86A2*, β -glukozidaz ve *CAS* genlerinin anlatımlarındaki değişimler gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: *T. foenum-graecum* hücre süspansiyon kültürlerinin maya özütü ile elisitasyonundan sonra CYP86A2, β -glukozidaz ve CAS genlerinin anlatımlarında değişimler $2^{\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre hesaplanmıştır (↑: anlatımda artış; ↓: anlatımda azalış).

Genler	12 saat maya özütü	24 saat maya özütü
CYP86A2	0,79↓	3,13↑
β- GLUKOSİDAZ	0,53↓	0,97↓
CAS	0,45↓	0,96↓

Gerçek zamanlı PZR analizleri sonucunda, 24 saatlik maya özütü stresinin CYP86A2 geninin anlatımını 3,13 kat artırdığı, 12 saat süreli uygulamanın ise CYP86A2 geninin anlatımını 0,79 kat azalttığı gözlemlendi. 24 saat uygulama sonucunda ise 12 saat uygulamaya kıyasla 3,96 katlık bir artış kaydedildi. Yine 24 saat süren uygulamada β -glukozidaz geninin anlatımında anlamlı bir değişikliğe rastlanmazken, 12 saat süreli uygulamada β -glukozidaz geninin anlatımında 0,53 katlık bir azalış gözlemlendi. 24 saat uygulama sonucunda ise 12 saat uygulamaya kıyasla 1,83 kat artış elde edilmiş oldu. CAS geninin 12 ve 24 saat maya özütü uygulamasına verdiği tepkide ise 24 saat uygulamada CAS anlatımında bir değişiklik kaydedilmezken, 12 saat uygulamada gen anlatımında 0,45 katlık bir azalış gözlemlendi. 24 saat uygulama sonucunda ise 12 saat uygulamaya kıyasla 2,13 kat artış gözlemlendi.

Sonuç olarak, her iki uygulama zamanında da incelenen genler açısından diosgenin miktarı ve gen anlatımı seviyeleri arasında aynı oranda bir artış belirlenmese bile, 24 saat uygulama sonucunda tüm genlerin ve diosgenin miktarının 12 saat uygulamaya göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu açıdan bakıldığında incelenen üç genin de diosgenin metabolizması ile doğrudan ilişkili olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.6: Maya özütü elisitasyonu sonrası *CYP86A2*, *β -glukosidaz* ve *CAS* genlerinin anlatımındaki değişimlerin gösterimi. “***” PostOc Tukey HSD testi ile ANOVA ile her bir zaman noktasında karşılık gelen kontrollere göre önemli bir fark olduğunu ($p < 0.01$), “****” ise çok önemli bir fark olduğunu ($p < 0,0003$) göstermektedir, # işareti deney grupları arasındaki ilişikiyi göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çemen otu (*Trigonella foenum-graecum* L.) dünyanın pek çok yerinde iyi bilinen bir baharattır. Sahip olduğu biyoaktif maddeler sayesinde modern tıp ve biyoteknolojide hiperlipidemi, hipoglisemi tedavisinde, anti-oksidan, anti-enflamatuvar, anti-proliferatif ve anti-kanser ajan olarak kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, tahriş önleyici, barsak yumuşatıcı, gaz giderici, sindirimi kolaylaştırıcı, süt artırıcı, göğüs yumuşatıcı, balgam söktürücü özellikleri nedeniyle de geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanım bulmaktadır. Çemen otu tohumlarında terapötik özelliğe sahip pek çok biyoaktif molekül bulunmaktadır. Bunların en önemlileri saponinlerdir. Diosgenin, yamogenin, tigogenin, neotigogenin ve gitogenin *T. foenum-graecum* saponinlerine örnek gösterilebilir.

Bitkiler karbohidrat, protein, lipid gibi primer metabolitleri hayatlarının devam ettirebilmek için üretmektedir. Bunların aksine döl verimini artırmak, patojenlere karşı kendilerini savunabilmek için de sekonder metabolitleri üretmektedir. Sekonder metabolitler tıp başta olmak üzere, kozmetik, gıda, tekstil gibi alanlarında kullanım bulmaktadır. Yoğun kullanım alanları nedeniyle sekonder metabolitlerin fazla miktarda üretimi önem arz etmektedir. Bitkilerde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla farklı stratejiler kullanılmaktadır. Bunlardan biri de elisitasyondur. Elisitasyon, bitkide biyotik ya da abiyotik stres koşullarının taklit edilmesi ile istenilen metabolitlerin daha fazla üretilmesini hedeflemektedir. Elisitörler biyotik ve abiyotik olmak üzere iki gruba ayrılarak farklılıklar göstermektedir. Protein, peptit, polisakkarit, glikoprotein, fungal-bakteriyal- bitki hücre duvarı parçaları gibi biyolojik temelli maddeler biyotik elisitörlerdir. Maya özütünün elisitör olarak bitkilerde kullanıldığı bilinmektedir (Hamza, 2013; Ahmed ve Baig, 2014; Rahimi ve diğ., 2014; Maqsood ve Abdul, 2017). Kochan ve diğ. (2017) farklı konsatrasyondaki maya özütü uygulamasının saponin yapıdaki ginsenoit biyosentezine etkisini incelenmiştir. Bunun sonucunda 3 gün süren maya özütü muamelesi (50 mg/L) biyoreaktör kültürlerinde 1,57 katlık ginsenoit artışını sağlamıştır. Złotek (2017) farklı konsantrasyonlarda maya özütünün *Origanum majorana* L. bitkisinin yapraklarında askorbik asit miktarını 1,8 ve 2,5 kat artırdığını göstermiştir. Başka bir çalışmada maya özütü elisitasyonunun *Helianthus tuberosus* L. hücre süspansiyon kültüründe inulin miktarını diğer elisitörlere göre daha az azaltmıştır (Ma ve diğ., 2017).

Khanna ve diğ. (1975), çemen otunda yaptığı çalışmada süspansiyon kültürüne eklenen kolesterolün diosgenin üretimini artırdığını göstermiştir. Öncül madde eklenmesiyle son ürün

miktarının artırılması çalışması diosgeninin kolesterolden türevlendiğini düşündürmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diosgeninin lanosterolden (kolesterol) veya sikloartenolden (sitosterol) oluştuğunu göstermektedir (Vaidya ve diğ., 2013). Steroidal saponin yapısında bulunan diosgenin üzerine pek çok çalışma yürütülmüş olup çok çeşitli özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu maddenin en önemli özelliklerinde biri de ilaç endüstrisinde pek çok steroidal ilacın üretiminde öncü bileşiklerden biri olmasıdır. Bu yüzden de diosgenin üretim yollarının aydınlatılması ve artırılması her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Diosgeninin oluşum mekanizmasını ilk olarak öne süren Vaidya ve diğ. (2013) glikolizden sonra mevalonat yolu ve oradan 2 farklı yolu takip ederek diosgeninin oluşabileceğini önermişlerdir. Bu yollardan birincisinde skualen-2,3-oksit sikloartenol sentaz ile reaksiyona girerek sikloartenole dönüşmektedir ve sitosterolden β -glukozidaz enziminin şeker bakiyelerini ayırması ile de diosgenin oluşmaktadır. Diğer yol ise skualen-2,3-oksitin lanosterol sentaz ile reaksiyona girmesinin ardından lanosterol oluşumunu ve daha sonra da kolesterolden diosgeninin oluşabileceğini göstermektedir. Chaudhary ve diğ. (2015), çemen otu bitkilerine metil jasmonat uygulaması yaparak hem diosgenin üretimini hem de oluşum yolunda olabilecek muhtemel genlerin anlatımlarını incelemiştir. Yapılan çalışma, 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA redüktaz ve sterol-3- β -glukozil transferaz enzimlerinin görev aldığını göstermiştir. Uyguladıkları farklı konsantrasyonlarda metil jasmonatın da doku kültüründe bu çalışmada olduğu gibi diosgenin miktarını artırdığını göstermiştir. Ciura ve diğ.'nin (2017 ve 2018) diosgenin oluşum yoluna dair elde ettiği veriler metabolizmanın daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bu grubun elde ettiği transkriptomik analiz sonuçlarında çemen otunda lanosterol sentaz genine dair herhangi bir transkripte rastlanılmamıştır. Buna göre, elde edilen tüm veriler göz önüne alındığında, mevalonat yolu sonucunda oluşan skualen-2,3-oksit sikloartenole sonrasında da kolestrole dönüşmektedir. Kolesterolden de diosgenin oluşumunda sitokrom P450 gen ailesi üyelerinin görev aldığı düşünülmektedir. Zhou ve diğ. (2019), yürüttükleri çalışmada metil jasmonat uygulanan çemen otunda diosgenin miktarının analizini gerçekleştirmişlerdir. Bunun sonucunda 48 saat ve 72 saat boyunca MeJA'ya maruz kalan bitkilerde diosgenin miktarı neredeyse aynı oranda olmak üzere yaklaşık 2 kat artırmıştır. Dahası diosgenin yolunda görev alan transkripsiyon faktörlerinin MeJA uygulaması ile indüklenen NAC, WRKY, bHLH, TIFY, HD-ZIP, AP2/ERF ve BTB/POZ transkripsiyon faktörü ailelerine ait olabileceğini öngörmüştür. Benzer şekilde bu çalışmada da HPLC analizleri sonucunda diosgenin miktarında 12 saat maya özütü uygulamasında kontrole göre

yaklaşık 1,66 katlık bir artış; 24 saat maya özütü uygulamasında ise 1,40 katlık bir artış belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar MeJa gibi maya özütünün de diosgenin miktarında artışa sebep olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu tez çalışmasında, diosgenin metabolizmasında görevli olduğu literatürde öne sürülen genlerin anlatımlarının maya özütü etkisi ile nasıl bir değişim gösterdiği ve dolayısıyla diosgenin artışı ile bağlantısı incelenmiştir. Buna göre 12 saat ve 24 saat maya özütü uygulamasının diosgenin üretim yolağında yer alan *CYP86A2* geninin anlatımında artışa sebep olduğu, β -glukozidaz ve *CAS* genlerinde ise 12 saat uygulama sonrasında azalmaya sebep olduğu, 24 saat uygulamanın ise anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Hayashi ve diğ. (2003), 0,1 w/v maya özütünün *Glycyrrhiza glabra* bitkisinde etkisini araştırdıkları çalışmada bu konsantrasyondaki maya özütünün 24 saat uygulanmasında *CAS* geninin anlatımını azalttığını belirtmişlerdir. Ciura ve diğ. (2017 ve 2018), diosgenin metabolizmasında görevli genleri belirleyebilmek için yeni nesil RNA dizileme analizi gerçekleştirmiştir. Verileri anlamlı hale getirmek için bitkilere diosgenin oluşumunu etkilediği bilinen elisitör ve öncül maddeler olan metil jasmonat, skualen ve kolesterol uygulamışlardır. Bunun sonucunda diosgenin biyosentezinde görevli olabilecek sitokrom P450 genlerini de içeren bazı genlerin varlığını ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak öncül madde olarak kullandıkları kolesterolün *CYP86A2* geninin anlatımı üzerine etkisi metil jasmonat ve skualene göre daha fazla olmasına rağmen metil jasmonatın β -glukozidaz geninin anlatımı üzerine etkili bir artış sergilemediğini belirtmişlerdir. Ciura ve diğ. (2018), önerdikleri diosgenin yolağında sterol zincirindeki C-26 atomunun oksitlenmesinde *CYP86A2* geni görev almakta ve daha sonrasında glikozit bakiyesinin uzaklaştırılmasıyla F halkasının kapanmasını da β -glukozidaz gerçekleştirmektedir. O halde bu genlerin elisitasyonunun da birbiriyle ilişkisi olmalıdır. Fakat bu çalışmada yapılan maya özütü muamelesi sonucu çalışılan genlerin birbirlerine göre paralel bir şekilde değişime uğradıkları belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında çemen otu kallusları kullanılarak kurulan hücre süspansiyon kültürlerine 0,01 g/mL konsantrasyonda maya özütü uygulaması yapıldı. Uygulama 12 saat ve 24 saat sonunda sona erdirildi. Bu örnekler kullanılarak yapılan analizlerde diosgenin oluşum mekanizmasında görevli olduğu düşünülen *CYP86A2*, β -glukozidaz ve *CAS* genlerinin anlatım düzeyleri ve diosgenin miktarı değişimleri incelendi. Sonuç olarak, her iki uygulama zamanında da incelenen genler açısından diosgenin miktarı ve gen anlatımı seviyeleri arasında aynı oranda bir artış belirlenmese bile, 24 saat uygulama sonucunda tüm genlerin anlatımının ve diosgenin

miktarının artış gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu açıdan bakıldığında incelenen üç genin de diosgenin metabolizması ile doğrudan ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen verilerin, ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde yaygın kullanım bulan ve ekonomik değeri yüksek sekonder metabolit diosgeninin *in vitro* üretiminin artırılması için elisitör temelli uygun bir biyoteknolojik yöntemin geliştirilmesine katkı sağlayacağını düşündürmektedir.



KAYNAKLAR

- Acharya, S.N., Thomas, J.E., Basu, S.K., 2006, Fenugreek: an “old world” crop for the “new world”, *Biodiversity*, 7 (3-4), 27-30.
- Ahmed, S.A., Baig, M.M.V., 2014, Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea Corylifolia* L., *Saudi journal of biological sciences*, 21 (5), 499–504.
- Akgül, A., 1993, *Baharat bilim ve teknolojisi*, Gıda Teknolojisi Derneği yayınları, Ankara, No.15.
- Alwine, J. C., Kemp D. J., Stark, G. R., 1977, Method for detection of specific rnas in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with dna probes, *Proceedings of the national academy of sciences*, 74 (12), 5350–54.
- Baldemir A., İlğün S., 2015, Geçmişte ve günümüzde çemenotunun kullanım alanları: *Trigonella foenum-graecum* L., *Lokman hekim journal*, 5(1):1-4
- Baldi A., Srivastava A. K., Bisaria V. S., 2009, *Fungal elicitors for enhanced production of secondary metabolites in plant cell suspension cultures*, Symbiotic Fungi, IN: Varma A., Kharkwal A. C., Bölüm no 23, Springer, Berlin, Heidelberg, ISBN: 978-3-540-95893-2, 373-375.
- Basch, E., Ulbricht, C., Kuo, G., Szapary, P., Smith, M., 2003, Therapeutic applications of fenugreek, *Alternative medicine review*, 8 (1), 20-27.
- Basu, S.K., 2006, Seed production technology for fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) in the Canadian, Thesis (Msc), Department of Biological Sciences University of Lethbridge.
- Beyzi, E., İlbaş, A.İ., Gürbüz, B. 2010, Çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.) ve genel özellikleri, *Erciyes üniversitesi fen bilimleri enstitüsü dergisi*, 26(4), 316-322.
- Brain, K. R., and Hardman R., 1968, An Improved method of densitometric thin layer chromatography as applied to the determination of sapogenin in *Dioscorea* Tubers, *Journal of chromatography*, 38 (3), 355–63.
- Boller, T., 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and plant molecular biology*, 46, 189–214.
- Bustin, S. A., 2002, Quantification of MRNA Using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *Journal of molecular endocrinology*, 29 (1), 23–39.
- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D., Smetanska, I., 2012, Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspensioncultures of *Vitis vinifera*, *Plant cell, tissue organ culture*, 108, 401–409.

- Chaudhary, S. A., Chaudhary P. S., Syed B.A., Misra, R., Bagali P.G., Vitalini S., and Iriti M., 2018, Validation of a method for diosgenin extraction from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), *Acta scientiarum polonorum, technologia alimentaria*, 17 (4), 377–85.
- Chen, H. G., Jin, F. Y., Zhao, C., Zhou, X., Gong, X. J., 2010, Content determination of total saponins in *Trigonella foenum-graecum* L., *Chinese journal of spectroscopy laboratory*, 27, 580–582.
- Ciura, J., Szeliga, M., Grzesik, M., Tyrka, M., 2018, Changes in fenugreek transcriptome induced by methyl jasmonate and steroid precursors revealed by RNA-Seq', *Genomics*, 110 (4), pp. 267–276.
- Ciura, J., Szeliga, M., Grzesik, M., Tyrka, M., 2017, Next-generation sequencing of representational difference analysis products for identification of genes involved in diosgenin biosynthesis in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*), *Planta*, 1–15.
- Chen, Y., Tang, Y.M., Yu, S.L., Han, Y.W., Kou, J.P., Liu, B.L., Yu, B., 2015, Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin, *Chinese journal of natural medicines*, 13(8), 578-87.
- Çakır Ö., Arı Ş., 2009, Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor, *Journal of environmental biology*, 30(1):51-5
- Das, S., Dey, K.K., Dey, G., Pal, I., Majumder, A., Maiti, C. S., Kundu, S. C., Mandal, M., 2012, Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma, *Plos one*, 7, (10), e46641.
- Dong, M., Meng, Z., Kuerban, K., Qi, F., Liu, J., Wei, Y., Wang Q., Jian S., Feng M., Ye, L., 2018, Diosgenin promotes antitumor immunity and PD-1 antibody efficacy against melanoma by regulating intestinal microbiota. *Cell death and disease*, 9(10).
- Duke, A. J., 1986, *Handbook of legumes of world economic importance*, 1st edition, New York and London: Plenum Press.
- Fazli, F.R.Y. and Hardman, R., 1968, The spice fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), Its commercial varieties of seed as a source of diosgenin, *Tropical science*, 10, 66–78.
- Faeste, C.K., Namork, E., Lindvik, H., 2009, Allergenicity and antigenicity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) proteins in foods. *Journal of allergy and clinical immunology*, 123(1), 187-194.
- Fischer, R., Emans, N., 2000, Molecular Farming of Pharmaceutical Proteins, *Transgenic research*, 9, 279–299.
- Fujii, K. & T. Matsukawa. 1936. Saponins and sterols. 8. Saponin of *Dioscorea tokoro* Makino. (In Japanese), *Pharmaceutical society of Japan*, 56: 408–414.

- Fraga, D., Meulia, T. ve Fenster, S, 2007, Real-Time PCR in: current protocols in cell biology, *Current protocols essential laboratory techniques*, 10.3.1-10.3.33.
- Gençkan, M.S., 1983, *Yem bitkileri tarımı*, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, No.467, İzmir.
- Giddings, G., 2001, Transgenic plants as protein factories. *Current opinion in biotechnology*, 12, 450–454.
- Gupta, A., Gupta, R., Lal, B., 2001, Effect of *Trigonella foenum-graecum* seeds on glycemic control and insulin resistance in type 2 Diabetes mellitus, *Alternative medicine*, 49, 1057-1061.
- Haefele, C., Bonfils, C., Sauvaire, Y., 1997, Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4- hydroxyisoleucine biosynthesis, *Phytochemistry*, 44 (4), 563-6.
- Hamza, M., A., 2013, Effect of Yeast Extract (biotic elicitor) and incubation periods on selection of *Lupinus Termis* Explant in Vitro, *Journal of applied sciences research*, 9 (7), 4186–92.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., & Ahmad, A., 2010, Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review, *Environmental and experimental botany*, 68 (1), 14–25.
- Hayashi, H., Huang, P. and Inoue, K., 2003, Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*, *Plant and cell physiology*, 44 (4), 404–411.
- Hidvegi, M., El-Kady, A., Lásztity, R., Bekes, F., Simon, S.L., 1984, Contribution to the nutritional characterization of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), *Acta alimentaria*, 13(4), 315-24.
- Hirai, S., Uemura, T., Mizoguchi, N., Lee, J.Y., Taketani, K., Nakano, Y., Hoshino, S., Tsuge, N., Narukami, T., Yu, R., 2010, Diosgenin attenuates inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages, *Molecular nutrition & food research*, 54, 797–804.
- Huang, W., Zhao, H., Ni, J., Zuo, H., Qiu, L., Li, H., Li, H., 2008, The best utilization of *D. Zingiberensis* C.H. Wright by an eco-friendly process, *Bioresource technology*, 99 (15), 7407–11.
- Howard, M., 1987, *Traditional folk remedies: A comprehensive herbal*, London, ISBN-10: 9780712617314.
- Jani, R., Udipi, S.A., Ghugre, P.S., 2009, Mineral content of complementary foods. *The Indian journal of pediatrics*, 76 (1), 37- 44.
- Ji, L., Cheng, L., Yang, Z., 2017, Diosgenin, a novel aldose reductase inhibitor, attenuates the galactosemic cataract in rats, *Journal of diabetes research*, 2017:7309816.

- Jiang, S., Fan, J., Wang, Q., Ju, D., Feng, M., Li, J., Ye, L., 2016, Diosgenin induces ROS-dependent autophagy and cytotoxicity via mTOR signaling pathway in chronic myeloid leukemia cells, *Phytomedicine*, 23 (3), 243–252.
- Kalailingam, P., Kannaian, B., Tamilmani, E., Kaliaperumal, R., 2014, Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats, *Phytomedicine*, 21, 1154–61.
- Kan, Y., Mülayim, M., 2006, Organik ve inorganik gübrelerin çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.)’in bazı tarımsal karakterleri üzerine etkileri, *Bitkisel araştırma dergisi*, 1: 6-15.
- Kato, A., Miura, T., Fukunaga, T., 1995, Effects of steroidal glycosides on blood glucose in normal and diabetic mice, *Biological and pharmaceutical bulletin*, 18 (1), 167-8.
- Khanna, S.C. Jain, R. Bansal, 1975, Effect of cholesterol on growth and production of diosgenin, gitogenin, tigogenin and sterols in suspension cultures, *The indian journal of experimental biology*, 13 (2), 211–213.
- Khare, C.P., 2004, *Indian herbal remedies: rational western therapy, ayurvedic and other traditional usages*, Botany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, ISBN 978-3-540-01026-5.
- Khosravi, Z., Sedaghat, R., Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., 2019, Diosgenin ameliorates testicular damage in streptozotocin-diabetic rats through attenuation of apoptosis, oxidative stress, and inflammation, *International immunopharmacology*, 70, 37–46.
- 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).
- Kozera, B., and Marcin R., 2013, Reference genes in Real-Time PCR, *Journal of applied genetics*, 54 (4), 391–406.
- Król-Kogus B., Lamine, K.M., Migas P., Boudjeniba M., Krauze-Baranowska M., 2018, HPTLC determination of diosgenin in fenugreek seeds, *Acta pharmaceutica*, 1, 68 (1) 97-107.
- Kumar, P., Kale, R.K., McLean, P., Baquer, N.Z., 2012, Antidiabetic and neuroprotective effects of *Trigonella foenum-graecum* seed powder in diabetic rat brain, *Prague medical report*, 113 (1), 33-43.
- Leyel, C.F., 1987, *Elixirs of life*, Faber & Faber, London.
- Li, C., Dai, J., Zheng, D., Zhao, J., Tao, Y., Lei, J., Xi, X., Liu, J., 2019, An efficient prodrug-based nanoscale delivery platform constructed by water soluble eight-arm-polyethylene glycol-diosgenin conjugate, *Materials science and engineering C: materials for biological applications*, 98:153-160.

- Lima, C.M., Lima, A.K., Melo, M.G., Serafini, M.R., Oliveira, D.L., de Almeida, E.B., Barreto, R.S., Nogueira, P.C., Moraes, V.R., Oliveira, E.R., et al., 2013, Bioassay guided evaluation of *Dioscorea villosa* an acute and subchronic toxicity, antinociceptive and anti-inflammatory approach, *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 195.
- Liu, W., Yu, Z., Lu, F., He, C., Cao, L., Zhu, M., Yin, D., 2017, Therapeutic effects of diosgenin in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Journal of neuroimmunology*, 313, 152–160.
- Liu, J., Zhou, X., Jiang, J., 2011, A validated HPLC method for the determination of levobupivacaine in plasma and its application to pharmacokinetic studies in Chinese people, *African journal of pharmacy and pharmacology*, 5 (20), 2232–2237.
- Lust, J.B., 1986, *The herb book*, Bantam Books Inc., New York.
- Ma C, Zhou D, Wang H, Han D, Wang Y, Yan X., 2017, Elicitation of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) cell suspension culture for enhancement of inulin production and altered degree of polymerisation, *Journal of the science of food and agriculture*, 97 (1), 88-94.
- Madar, Z., Shomer, I., 1990, Polysaccharide composition of a gel fraction derived from fenugreek and its effect on starch digestion and bile acid absorption in rats, *Journal of agricultural and food chemistry*, 38 (7), 1535-1539.
- Manniche, L., 1989, *An ancient egyptian herbal*, British Museum Publ. Ltd., London.
- Marin-Medina, A., Ruiz-Hidalgo, G., Ble-Castillo, J. L., Zetina-Esquivel, A. M., Zamora, R. M., Juarez-Rojop, I. E., & Diaz-Zagoya, J. C., 2019, Combined effect of diosgenin along with ezetimibe or atorvastatin on the fate of labelled bile acid and cholesterol in hypercholesterolemic rats, *International journal of environmental research and public health*, 16(4).
- Martin, E., Akan, H., Ekici, M., Aytac, Z., 2011, Karyotype analyses of ten sections of *Trigonella* (Fabaceae), *Comparative cytogenetics* 1, 5 (2), 105-21.
- Maqsood, M., & Abdul, M., 2017, Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in *catharanthus roseus*, *Brazilian journal of pharmacognosy*, 27 (5), 549–556.
- Meghwal, M., Goswami, T.K., 2012, A review on the functional properties, nutritional content, medicinal utilization and potential application of fenugreek, *Journal of food processing and technology*, 3 (9), 181.
- Melius, P., 1578, *Herbarium*, Heltai Gásparne Könyvnyomdája, Kolozsvár.
- Miller, J.I., 1969, *The spice trade of the roman empire 29 B.C. to A.D. 641*, Clarendon Press, Oxford.

- Moradi, N., Moradi, K., 2013, Physiological and pharmaceutical effects of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a multipurpose and valuable medicinal plant, *Global journal of medicinal plant research*, 1 (2), 199-206.
- Morris, M. P., B. A. Roark, and Cancel, B., 1958, Tuber analysis, simple procedure for the routine assay of *Dioscorea* tubers, *Journal of agricultural and food chemistry*, 6 (11), 856-58.
- Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E., & Zenk, M. H., 1993, Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 90 (16), 7490-4.
- Muhammad H., 2011, Reverse phase high performance liquid chromatographic (HPLC) method for nimesulide tablets dosage form prepared for *in vivo in vitro* correlation (IVIVC) studies, *African journal of pharmacy and pharmacology*, 5 (20).
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Naidu, M.M., Shymala, B.N., Naik, P. J., Sulochanamma, G., Srinivas, P., 2010, Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds, *Food science and technology*, 44, 451-456.
- Nagore, D., Patil, P., & Kuber, V., 2013, Comparison between high performance liquid chromatography and high performance thin layer chromatography determination of diosgenin from fenugreek seeds, *International journal of green pharmacy*, 6 (4), 315.
- Oliveira, R. de C. M., Lima, S. G. de, Oliveira, A. P. de, Silva-Filho, J. C., da Nicolau, L. A. D., Souza, F. de M., Medeiros, J. V. R., 2019, Cardiovascular effect of diosgenin in ovariectomized rats, *Journal of medicinal food*, 00 (1000), 1-9.
- Page R.B., Stromberg A. J., 2011, Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments, *The Scientific world journal*, 11:1383-93.
- Pari, L., Monisha, P., Jalaludeen, A.M., 2012, Beneficial role of diosgenin on oxidative stress in aorta of streptozotocin induced diabetic rats. *The European journal of pharmacology*, 691, 143-50.
- Petropoulos, G.A., 2006, Fenugreek, the genus *Trigonella*, Medicinal and aromatic plants industrial profiles, Hardman R. (ed), Volume 11, Taylor and Francis, ISBN 0-203-21747-0, 1-9.
- Pfaffl M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids research*, 29(9): e45.
- 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*, *Biotechnology letters*, 29, 1143-1146.

- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T, 2003, Elicitation of plants and microbial cell systems, *Biotechnology and applied biochemistry*, 37(1), 91.
- Raju, J., and Mehta, R., 2009, Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin, *Nutrition and cancer*, 61, 1, 27–35.
- Rahnamaie-Tajadod, R., Loke, K.K., Goh, H.H., Noor, N.M., 2017, Differential gene expression analysis in *Polygonum minus* leaf upon 24 h of methyl jasmonate elicitation, *Frontiers in plant science*, 8, 109.
- Rahimi, S., B. S. R. Devi, A. Khorolragchaa, Y. J. Kim, J. H. Kim, S. K. Jung, and D. C. Yang. 2014, Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots, *Russian journal of plant physiology*, 61 (6), 811–17
- Rakhee, S.D., Meena, D.L., Lal, B.C., Prabhakar, K.R., Vidya, S.G., 2004, Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers, *BMC plant biology*, 4, 13.
- 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
- Rosengarten, F., 1969, *The book of spices*, Livingston, Wynnewood, Penns., USA.
- Rühmann, S., Pfeiffer, J., Brunner, P., Szankowski, I., Fischer, T. C., Forkmann, G., & Treutter, D., 2013, Induction of stilbene phytoalexins in grapevine (*Vitis vinifera*) and transgenic stilbene synthase-apple plants (*Malus domestica*) by a culture filtrate of *Aureobasidium pullulans*, *Plant physiology and biochemistry*, 72, 62–71.
- Sadeghzadeh-Ahari, D., Kashi, A.K., Hassandokht, M.R., Amri, A. and Alizadeh, Kh., 2009, Assessment of drought tolerance in Iranian fenugreek landraces, *Journal of food, agriculture & environment*, 7 (3-4), 414- 419.
- Salvador, J. A., Carvalho, J.F., Neves, M.A., Silvestre, S.M., Leitão, A.J., Silva, M.M., Sá e Melo, M.L., 2013, Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds, *Natural product reports*, 30 (2), 324–374.
- Šavikin-Fodulović, K., Grubišić, D., Čulafić, L., Menković, N., & Ristić, M, 1998, Diosgenin and phytosterols content in five callus lines of *Dioscorea balcanica*, *Plant science*, 135 (1), 63–67.
- Schauenberg, P. and Paris, F., 1990, *Guide to medicinal plants*, Lutterworth Press, Cambridge, UK.
- Selim, S., & Al Jaouni, S., 2015, Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen.) Sm, *BMC complementary and alternative medicine*, 15 (1), 1–7.

- Shakya P., Marslinb G., Siramc K., Beerhuesd L., Franklina G., 2017, Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71 (1), 70-82.
- Shameli, K., Ismail, H., Wong, T., Miyake, M., Ahmad Khairudin, N., Mohamed Tap, F., & Abd Majid, F., 2018, *In silico* and *in vitro* study of the bromelain-phytochemical complex inhibition of phospholipase A2 (Pla2), *Molecules*, 23 (1), 73.
- Sharma, R.D., Raghuram, T.C., Rao, N.S., 1990, Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes, *European journal of clinical nutrition* 44 (4), 301-306.
- Shao, B., Guo H., Cui, Y., Ye, M., Han, J., Guo, D., 2007, Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities, *Phytochemistry*, 68, (5), 623–630,
- Srinivasan, K., 2007, Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*): A review of health beneficial physiological effects, *Food reviews international*, 22:203-224.
- Son, I.S., Kim, J.H., Sohn, H.Y., Son, K.H., Kim, J.S., Kwon, C.S., 2007, Antioxidative and hy- polipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71, 3063–71.
- Taketani, K., Hoshino, S., Uemura, T., Goto, T., Takahashi, N., Tsuge, N., Kawada, T., 2015, An efficient purification method for quantitative determinations of protodioscin, dioscin and diosgenin in plasma of fenugreek-fed mice, *Journal of nutritional science and vitaminology*, 61 (6), 465–70.
- Talelis D., 1967, *Cultivation of legumes*, Agric. College of Athens, Athens (in Greek), 101-5.
- Temizkan G., 2003, *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler: genel bakış*, *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler*, IN: Arda N., Temizkan G., Bölüm 1, Nobel Tıp Kitabevi, 28-29.
- Thakur, M.F., Weng, A., Melzig, H., Fuchs, A., 2011, Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties, *Botanics: targets and therapy*, 1:19.
- Trouillas, P., Corbiè, C., Liagre, B., Duroux, J. L., & Beneytout, J. L., 2004, Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13 (4), 1141-9.
- Turgut-Kara N., 2007, *Astragalus chrysochlorus*'da fenilpropanoid metabolik yoluna ilişkin genomik analizler, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- UNEP (United Nations Environment Programme), 2012, Building inclusive green economy for all; joint agency paper, UNEP: Geneva, Switzerland.
- Vaidya, K., Ghosh, A., Kumar, V., Chaudhary, S., Srivastava, N., Katudia, K., Tiwari, T., Chikara, S.K., 2013, *De novo* transcriptome sequencing in L. to identify genes involved in the biosynthesis of diosgenin, *The plant genome*, 6 (2), 1-11.

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F., 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome biology*, 3 (7), RESEARCH0034.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M., 2008, Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *Biotechniques*, 44 (5), 619–626.
- Qin, Y., Wu, X., Huang, W., Gong, G., Li, D., He, Y., Zhao, Y., 2009, Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright in rodents, *The journal of ethnopharmacology*, 126, 543–50.
- Quan, J., Wang, R., Mu, H., Xia, B., Li, X., Jiang, Y., Peng, F., 2009, Effect of abiotic and biotic elicitors on growth and alkaloid accumulation of *Lycoris chinensis* seedlings, *Zeitschrift für naturforschung, C*, 64 (7–8), 541–550.
- Wang, J., Qian, J., Yao, L., & Lu, Y., 2015, Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*, *Bioresources and Bioprocessing*, 2 (1), 5.
- Wang, L., Zhang, Y., Gao, X., Duan, Z., & Wang, S., 2010, Determination of chloramphenicol residues in milk by enzyme-linked immunosorbent assay: improvement by biotin–streptavidin-amplified system, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (6), 3265–3270.
- Wu, Y., Ye, F., Lu, Y., Yong, H., Yin, R., Chen, B., & Yong, Y., 2018, Diosgenin glucoside protects against myocardial injury in diabetic mice by inhibiting RIP140 signaling, *American journal of translational research*, 10(11), 3742–3749.
- Yamada, T., Hoshino, M., Hayakawa, T., Ohhara, H., Yamada, H., Nakazawa, T., Inagaki, T., Iida, M., Ogasawara, T., Uchida, A., et al., 1997, Dietary diosgenin attenuates subacute intestinal inflammation associated with indomethacin in rats, *The american physiological*, 273, G 355–64.
- Yang, C.R. and Tanaka, O., 1999, *Advances in plant glycosides*, Chemistry and Biology; Elsevier: Amsterdam.
- Yu, H., Liu, Y., Niu, C., & Cheng, Y., 2018, Diosgenin increased DDX3 expression in hepatocellular carcinoma, *American journal of translational research*, 10 (11), 3590–3599.
- Yu, Z.Y., Guo, L., Wang, B., Kang, L.P., Zhao, Z.H., Shan, Y.J., Xiao, H., Chen, J.P., Ma, B.P., Cong, Y.W., 2010, Structural requirement of spirostanol glycosides for rat uterine contractility and mode of their synergism, *The journal of pharmacy and pharmacology*, 62, 521–529.
- Zhai, X., Jia, M., Chen, L., Zheng, C. J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L. P., 2017, The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants, *Critical reviews in microbiology*, 43 (2), 238–261.

- Zhang, Y., & Miller, R. M., 1992, Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant), *Applied and environmental microbiology*, 58 (10), 3276–3282.
- Zhang, Z., Chen, Y., Xiang, L., Wang, Z., Xiao, G. G., & Ju, D., 2018, Diosgenin protects against alveolar bone loss in ovariectomized rats via regulating long non-coding RNAs. *Experimental and therapeutic medicine*, 16 (5), 3939–3950.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R., 2005, Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, *Biotechnology advances*, 23 (4), 283–333.
- Zhou, H., Liu, P., Chen, J., Duan, H., Long, C., Jiang, T., Hou, D., 2019, Diosgenin exerts its tumor suppressive function via inhibition of Cdc20 in osteosarcoma cells, *Cell cycle*, 0(0), 1–13.
- Złotek, U., and Michał Ś., 2016, Elicitation effect of *saccharomyces cerevisiae* yeast extract on main health-promoting compounds and antioxidant and anti-inflammatory potential of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.), *Journal of the science of food and agriculture*, 96 (7), 2565–72.
- Złotek U., 2017, Effect of jasmonic acid and yeast extract elicitation on low-molecular antioxidants and antioxidant activity of marjoram (*Origanum majorana* L.), *Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria*, 16 (4), 371-377.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Bekir Ahmet İLGAR
Doğum Yeri	Afyonkarahisar
Doğum Tarihi	26.11.1995
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05064178824
E-Posta Adresi	ilgarbekir@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik, Tezli Yüksek Lisans Programı (Örgün Öğretim)