



**REYHAN (*Ocimum basilicum* L.) BİTKİSİNDE ADVENTİF KÖK SÜSPANSİYON
KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI VE BU KÜLTÜRLERE UYGULANAN
BAZI ELİSİTÖRLERİN ROZMARİNİK ASİT ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

ALİ İRTEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ABABİLİM DALI**

DR. ÖĞR. ÜYESİ İLHAMİ KARATAŞ

**Eylül- 2022
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

REYHAN (*Ocimum basilicum* L.) BİTKİSİNDE ADVENTİF KÖK
SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI VE BU
KÜLTÜRLERE UYGULANAN BAZI ELİSİTÖRLERİN
ROZMARİNİK ASİT ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

ALİ İRTEN

TOKAT
Eylül- 2022

Her hakkı saklıdır

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, **Dr. Öğr. Üyesi İlhami KARATAŞ** danışmanlığında hazırlamış olduğum “**Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinde Adventif Kök Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması ve Bu Kültürlere Uygulanan Bazı Elisitörlerin Rozmarinik Asit Üretimine Etkilerinin Belirlenmesi**” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

14/09/2022

Ali İRTEN



ÖZET

REYHAN (*Ocimum basilicum* L.) BİTKİSİNDE ADVENTİF KÖK SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI VE BU KÜLTÜRLERE UYGULANAN BAZI ELİSİTÖRLERİN ROZMARİNİK ASİT ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

İrten, Ali

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İlhami Karataş

Eylül 2022, xiv + 45 sayfa

Bu çalışmada, reyhan (*Ocimum basilicum* L.) adventif kök süspansiyon kültürüne uygulanan çeşitli elisitörlerin rozmarinik asit üretimi, biyomas miktarı ve antioksidan aktiviteye etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca elisitörlerin toplam fenolik bileşik içeriğine ve flavonoid miktarına etkileri de değerlendirilmiştir. Adventif kök kültürünün oluşturulmasında *in vitro* kültür koşullarda yetiştirilen bir aylık bitkilerin hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar 2 mg L⁻¹ IBA (indol-3-bütirik asit), 30 g L⁻¹ sukroz ve 2 g L⁻¹ phytagel içeren 0.75 MS (Murashige ve Skoog) besin ortamında karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Bu ortam koşullarında gelişen adventif kökler aynı içerikli 100 mL besin ortamı içeren (phytagel içermeyen) erlenmayerlerde (250 mL) 120 devir/dakika 'da çalkayıcı üzerinde kültüre alınmıştır. Kültürün 26. gününde besin ortamına elisitör olarak farklı konsantrasyonlara yeast ekstrakt (125, 250 ve 500 µg mL⁻¹), kalsiyum klorür (5 ve 10 mM) ve sodyum selenit (4 ve 8 mg L⁻¹) ilave edilmiştir. Adventif kökler süspansiyon kültürünün 30. gününde hasat edilerek yaş ağırlıkları tartılmış ve kurutulmuştur. Kurutulan adventif kök numunelerinin rozmarinik asit içeriği HPLC cihazıyla analiz edilmiştir. Serbest radikal giderme (DPPH), katyon radikali giderme (ABTS) ve indirgeme gücü (FRAP) aktiviteleri ise spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Yapılan elisitör uygulamalar içerisinde rozmarinik asit içeriğindeki artış en fazla 125 µg mL⁻¹ yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerde belirlenmiştir. Bu uygulamada rozmarinik asit miktarı kontrol grubuna göre 1.44 kat artışla 40.44 mg g⁻¹ KA olarak gerçekleşmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid

içeriği açısından da en yüksek değerler de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerde belirlenmiştir. Kalsiyum klorür ve sodyum selenit uygulamaları rozmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid içeriğini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde artırmıştır. Bu uygulamalar bakımından rozmarinik asit içeriğindeki artış en fazla 5 mM kalsiyum klorür ve 8 mg L^{-1} sodyum selenit uygulanan adventif köklerde sırasıyla 1.25 ve 1.24 kat olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca tüm elisitör uygulamaları adventif köklerin biyomas miktarlarını kontrole göre önemli ölçüde azaltmıştır. En yüksek DPPH, ABTS ve FRAP aktiviteleri $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ yeast ekstrakt, 5 mM kalsiyum klorür ve 8 mg L^{-1} sodyum selenit uygulanan adventif köklerde belirlenmiştir. Antioksidan aktivite ile metabolit miktarları arasında güçlü bir korelasyon belirlenmiştir. Sonuç olarak reyhan bitkisinden elde edilen adventif köklerin rozmarinik asit üretimi için uygun materyaller olduğu ve elde edilen bulguların büyük ölçekte üretime önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adventif kök, Antioksidan aktivite, Elisitör, Fenolik bileşik, Flavonoid, *Ocimum basilicum*, Rozmarinik asit

ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF ADVENTITIOUS ROOT SUSPENSION CULTURES IN BASIL (*Ocimum basilicum* L.) PLANT AND DETERMINATION OF THE EFFECTS OF SOME ELICITORS APPLICATIONS ON ROSMARINIC ACID PRODUCTION

İrten, Ali

Master's Thesis, Division of Bioengineering

Advisor: Asst. Prof. Dr. İlhami KARATAŞ

September 2022, xiv +45 pages

In this study, it was aimed to determine the effects of various elicitor applications on rosmarinic acid production, biomass amount and antioxidant activity in basil (*Ocimum basilicum* L.) adventitious root suspension cultures. In addition, the effects of elicitors on total phenolic compound and flavonoid content were also evaluated. Hypocotyl parts of one-month-old plants grown in *in vitro* culture conditions were used as explant source in the establishment of adventitious root culture. Explants were cultured in 0.75 MS (Murashige and Skoog) nutrient medium containing 2 mg L⁻¹ IBA (Indole-3-butyric acid), 30 g L⁻¹ sucrose and 2 g L⁻¹ phytagel in dark conditions. Adventitious roots grown in these culture conditions were cultured in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 100 mL of nutrient medium with the same content (without phytagel) at 120 rpm on a shaker. On the 26th day of suspension culture, yeast extract (125, 250 and 500 µg mL⁻¹), calcium chloride (5 and 10 mM) and sodium selenite (4 and 8 mg L⁻¹) were added to the nutrient medium as elicitors at different concentrations. Adventitious roots were harvested on the 30th day of suspension culture, their wet weights were weighed and then dried. The rosmarinic acid content of the dried adventitious root samples was analyzed by HPLC. Free radical scavenging (DPPH), cation radical scavenging (ABTS) and reducing power (FRAP) activities were determined spectrophotometrically. Among the elicitor applications, the highest increase in rosmarinic acid content was determined in adventitious roots treated with 125 µg mL⁻¹ yeast extract. In this application, the amount of rosmarinic acid increased 1.44 times compared to the control group and became 40.44 mg g⁻¹ DW. In terms of total phenolic and flavonoid content, the highest values were determined in the adventitious roots applied 125 µg mL⁻¹ yeast extract.

Calcium chloride and sodium selenite applications significantly increased rosmarinic acid, total phenolic and flavonoid content compared to the control group. In terms of these applications, the highest increase in rosmarinic acid content was 1.25 and 1.24-fold in adventitious roots treated with 5 mM calcium chloride and 8 mg L⁻¹ sodium selenite, respectively. In addition, all elicitor applications significantly reduced the biomass amount of adventitious roots compared to the control. The highest DPPH, ABTS and FRAP activities were determined in adventitious roots treated separately with 125 µg mL⁻¹ yeast extract, 5 mM calcium chloride and 8 mg L⁻¹ sodium selenite. Also, a strong correlation was determined between antioxidant activity and metabolite amounts. As a result, it is thought that the adventitious roots obtained from basil plant are suitable materials to produce rosmarinic acid and the findings obtained from this study will make an important contribution to large-scale production.

Keywords: Adventitious root, Antioxidant activity, Elicitor, Phenolic compound, Flavonoid, *Ocimum basilicum*, Rosmarinic acid

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimi boyunca, ilgi ve alakasını asla esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle her konuda destek olan, laboratuvar denemelerinde desteğini her zaman hissettiğim, maddi manevi desteklerini esirgemeyen, hakkını ödeyemeyeceğim sayın danışman hocam Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Almus Meslek Yüksekokulu Ormancılık Bölüm Başkanı Dr. Öğr. Üyesi İlhami KARATAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez kapsamında çalışmalarına destek olan Dr. Rahime KARATAŞ'a desteğinden dolayı teşekkürü borç bilirim. Ayrıca metabolit analizlerinde yaptıkları katkılardan dolayı Prof. Dr. Mahfuz ELMATAŞ'a ve Araş. Gör. Duygu MISIRLI'ya çok teşekkür ederim. Çalışmalarımı yürütmüş olduğum Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Almus Meslek Yüksekokulu müdürü Doç. Dr. Fatih POLAT'a desteklerinden dolayı teşekkür eder, minnet ve şükranlarımı sunarım. Lisansüstü eğitim sürecinde beraber yol aldığımız, ev arkadaşım Can MENEKŞEOĞLU 'na desteğinden dolayı teşekkür ederim. Maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Ali İRTEN

Eylül 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ETİK SÖZLEŞME SAYFASI	i
JÜRİ KABUL VE ONAY	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
ÖN SÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	3
2.1. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Kullanım Alanları	3
2.2. Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları	3
2.3. Sekonder Metabolitlerin Bitki Doku Kültürü Yöntemleriyle Üretimi.....	5
2.4. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak İçin Uygulanan Stratejileri	7
2.5. Adventif Kök Kültürü	9
2.6. <i>Ocimum basilicum</i> L. (Reyhan).....	10
2.7. Rozmarinik asit.....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Bitkisel materyal	12

3.1.2.	Kullanılan cihazlar	12
3.1.3.	Kullanılan kimyasallar	13
3.2.	Yöntem.....	14
3.2.1.	Eksplant kaynağı bitkilerin steril koşullarda yetiştirilmesi	14
3.2.2.	Adventif kök kültürünün oluşturulması	15
3.2.3.	Adventif kök süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve elisitör uygulamaları.....	16
3.2.4.	Adventif kök ekstraktların hazırlanması	18
3.2.5.	Rozmarinik asit analizi	18
3.2.6.	Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi.....	19
3.2.7.	Flavonoid miktarının belirlenmesi.....	20
3.2.8.	Serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH).....	20
3.2.9.	İndirgeme gücü aktivitesi (FRAP).....	20
3.3.10	Kasyon radikali giderme aktivitesi (ABTS).....	21
3.2.11	İstatistiki analizler.....	21
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA.....	22
4.1.	Yeast Ekstrakt Uygulanan Adventif Köklerin Sekonder Metabolit İçerikleri.....	22
4.2.	Yeast Ekstrakt Uygulanan Adventif Köklerin Antioksidan Aktiviteleri...	24
4.3.	Kalsiyum Klorür Uygulanan Adventif Köklerin Sekonder Metabolit İçerikleri	26
4.4.	Kalsiyum Klorür Uygulanan Adventif Köklerin Antioksidan Aktiviteleri	28
4.5.	Sodyum Selenit Uygulanan Adventif Köklerin Sekonder Metabolit İçerikleri.....	29
4.6.	Sodyum Selenit Uygulanan Adventif Köklerin Antioksidan Aktiviteleri..	31

4.7.	Elisitör Uygulamalarının Biyomas Üzerine Etkileri.....	32
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	34
	KAYNAKLAR.....	36
	EKLER.....	45
	Yazarın Özgeçmişi.....	45



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge No	Sayfa
Çizelge 2.1. Çeşitli sektörlerde kullanılan bazı sekonder metabolitler ve elde edildiği bitki türleri	5
Çizelge 2.2. Bazı bitki türlerinde doku kültürü yöntemleri ile üretilmesi hedeflenen bileşiklerin listesi ve kullanılan doku kültürü yöntemleri.	6
Çizelge 2.3. Yapılarına ve kaynaklarına göre elisitörlerin sınıflandırılması.....	9
Çizelge 3.1. Rozmarinik asit analizinde kullanılan gradiyent programı ve cihaz koşulları	18
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki korelasyon.....	26
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kalsiyum klorür uygulanan adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki korelasyon.....	29
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit uygulanan adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki korelasyon.....	32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 3.1.	Reyhan tohumlarının çimlendirilmesi ve in vitro koşullarda bitkilerin yetiştirilmesi.....	15
Şekil 3.2.	Hipokotil eksplantları, adventif kökler ve çalışmalarda kullanılan inkübatör.....	16
Şekil 3.3.	Adventif kök süspansiyon kültürünün oluşturulması	17
Şekil 3.4.	Adventif köklere (A) ve standart rozmarinik asit (B) bileşiğine ait HPLC kromatogramları.....	19
Şekil 4.1.	Yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerin toplam fenolik bileşik (A), rozmarinik asit (B) ve flavonoid içerikleri (C).....	23
Şekil 4.2.	Yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerin DPPH (A), ABTS (B) ve FRAP (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri.....	25
Şekil 4.3.	Kalsiyum klorür uygulanan adventif köklerin toplam fenolik bileşik (A), rozmarinik asit (B) ve flavonoid içerikleri (C).....	27
Şekil 4.4.	Kalsiyum klorür uygulanan adventif köklerin DPPH (A), ABTS (B) ve FRAP (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri.....	28
Şekil 4.5.	Sodyum selenit uygulanan adventif köklerin toplam fenolik bileşik (A), rozmarinik asit (B) ve flavonoid içerikleri (C).....	30
Şekil 4.6.	Sodyum selenit uygulanan adventif köklerin DPPH (A), ABTS (B) ve FRAP (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri.....	31
Şekil 4.7.	Elisitör uygulamalarının biyomas üzerine etkileri.....	33

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Simgeler

Açıklama

μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
cm	Santimetre
ϵ	Molar absorbtivite katsayısı
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

Kısaltmalar

Açıklama

ABTS $\cdot^{+}$	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyozolin-6-sülfonik asit) radikali
DPPH $\cdot$	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
FRAP	Ferrik indirgeyici antioksidan potansiyeli
TE	Troloks eşdeğer
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit

YA	Yaş ağılık
KA	Kuru ağırlık
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
Abs	Absorbans



1.GİRİŞ

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) *Lamiaceae* (Ballıbabagiller) familyasına ait ılıman ve sıcak iklim koşullarında yetişen tek yıllık tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Bitki baharat olarak kullanımının yanında aromaterapi, kozmetik ve parfümeri sanayinde de değerlendirilmektedir. İçerdiği değerli sekonder metabolitler nedeniyle ilaç sanayisinde hammadde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca gıda sanayinde besin katkı maddesi, koruyucu ve raf ömrünü artırıcı olarak da değerlendirilmektedir. Bitki fitokimyasal açıdan çok çeşitli sekonder metabolitleri bünyesinde bulundursa da ana fenolik bileşiğini rozmarinik asit oluşturmaktadır (Genç, 2016; Shahrajabian ve ark., 2020; Karataş 2022a).

Rozmarinik asit bitki sekonder metabolitlerinin fenolik bileşikler grubunda yer alan değerli bir bileşiktir. Rozmarinik asit anti-enflamatuar, anti-viral, anti-bakteriyel, anti-oksidan, anti-diabetik ve anti-allerjik özellikleri yanında bağışıklığı güçlendirici, kanama durdurucu ve iltihap önleyici gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu bileşiğe olan talebin karşılanabilmesi amacıyla yüksek miktarda rozmarinik asit içeren bitkilerin belirlenmesi üzerine çok sayıda çalışma yürütülmüştür. Bitkilerde bulunan değerli metabolitlerin miktarı genotip, bitkinin yetiştirildiği lokasyon, tarımsal uygulamalar, iklim ve hasat zamanı gibi çok çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca bu bileşiği üreten birçok bitki, çevresel değişiklikler, aşırı toplama ve bilimsel olmayan hasat nedeniyle biyolojik çeşitlilik kaybı ve yok olma tehdidi ile karşı karşıyadır. Konvansiyonel tarımın belirtilen bu dezavantajlarının ortadan kaldırılması ve yüksek verimde ürün elde edebilmesi için alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda değerli bileşiklerin üretiminde bitki doku kültürü yöntemleri geleneksel tarım ve kimyasal yöntemlere alternatif bir yöntem oluşturmaktadır (Kieran ve ark., 1997; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Karataş 2022b).

Değerli sekonder metabolitlerin bitki doku kültürü yöntemleri ile üretimi birçok açıdan avantaj sağlamaktadır. Bu yöntemlerle yüksek verim ve kalitede üretim sağlanabilirken, aynı zamanda iklim, çevre ve toprak şartlarının olumsuzluklarına maruz kalmadan kontrollü, hızlı ve sürekli ürün elde edilebilmektedir. Bu biyoteknolojik yöntemler bitkilerde düşük miktarda

bulunan veya birçok nedenle geleneksel yöntemlerle üretilemeyen bileşiklerin üretimine de olanak sağlayabilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Karuppusamy, 2009; Karataş, 2013; Karataş ve ark., 2016).

Bitki doku ve organ kültürleri içerisinde yer alan adventif kök kültürleri birçok değerli bileşiğin ticari boyutta üretimine olanak sağlayan biyoteknolojik bir yöntemlerdir. Adventif kökler bitkilerin kök dışındaki herhangi bir doku veya organından gelişen kökler olarak adlandırılmaktadır (Steffens ve Rasmussen, 2016). Adventif kök kültürleri değerli sekonder metabolitlerin büyük ölçekli üretiminde diğer hücre, doku ve organ kültürü yöntemlerine göre daha avantajlıdır. Adventif kök kültürlerinin başlıca avantajları arasında hızlı büyüme oranlarına sahip olması, elde edilmelerinde hiçbir genetik transformasyon gerektirmemesi ve sabit kalitede metabolit üretimine olanak sağlamaları önemli bir yer tutmaktadır (Gaosheng ve Jingming, 2012; Murthy ve ark., 2016; Karataş, 2021).

Bitki hücre, doku ve organ kültürlerinde üretilmesi istenen değerli bileşiğin üretiminin sağlanması ve miktarlarının artırılması amacıyla çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Elisitör uygulamaları en yaygın kullanılan stratejiler arasında yer almaktadır (Mulabagal ve Tsay, 2004; Shilpa ve ark., 2010, Karataş, 2013). Kullanılan elisitörler belirli genleri aktive ederek biyoaktif bileşiklerin üretimini uyarmaktadırlar. Bu amaçla kullanılan metil jasmonat, yeast ekstrakt ve salisilik asidin adventif kök kültürlerinde değerli bileşiklerin ticari amaçlı üretiminde en etkili kimyasal elisitörler olduğu ifade edilmektedir (Lee ve ark., 2015).

Reyhan (*Ocimum basilicum*) kallus kültürlerinde, hücre süspansiyon kültürlerinde, saçak kök kültürlerinde ve *in vitro* yetiştirilen bitkilerde rozmarinik asit üretimi ve elisitasyonu önceki çalışmalarda yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Ancak reyhan adventif kök kültürlerinde rozmarinik asit üretimi ve elisitasyonu üzerine çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada, reyhan adventif kök süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve bu kültüre uygulanan çeşitli elisitörlerin rozmarinik asit üretimine, biyomas miktarına ve antioksidan aktiviteye (DPPH, ABTS ve FRAP) etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca elisitörlerin toplam fenolik bileşik içeriği ve flavonoid miktarına etkileri de değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Kullanım Alanları

Bitki doku kültürü yöntemleri aseptik ve kontrollü (ışık, sıcaklık, pH vb.) koşullar altında bitkilerin doku, organ veya hücrelerinin özel besin ortamlarında büyütülmesi ve çoğaltılması tekniği olarak tanımlanmaktadır (Thorpe, 2007; Lakhera ve ark., 2018). Bu kültür yöntemleri ile kaynak bitkiden alınan kısımlar (eksplant) kullanılarak embriyo, sürgün, yaprak, kök veya ana bitkiyle benzer tam bir bitki gelişimi sağlanabilmektedir. Bazı durumlarda ise eksplantlardan farklılaşmamış hücre topluluğu olarak adlandırılan kalluslar gelişmekte ve bunlar birçok bitkinin klonal şekilde çoğalmasında kullanılabilmektedir (Babaoğlu ve ark., 2001; Onay ve ark., 2012). Bu bağlamda başlıca hücre, doku ve organ kürü doku kültürü yöntemleri arasında kallus, kök, süspansiyon kültürü, organ kültürü, protoplast kültürü, embriyo kültürü, anter-ovaryum kültürü, meristem kültürü, sürgün kültürü ve saçak kök kültürleri sayılabilmektedir. Bu yöntemlerin başlıca kullanım alanları arasında bitkilerin kolay ve hızlı çoğaltılması, hastalıksız bitki üretimi, virüssüz bitkilerin üretimi, somaklonal varyasyon oluşturma, haploid bitki üretimi, *in vitro* seleksiyon, germplazm muhafazası, somatik hibridizasyon, gen transferi, sentetik tohum üretimi ve sekonder (ikincil) metabolitlerin üretimi önemli bir yer tutmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001; Onay ve ark., 2019).

2.2. Sekonder Metabolitler ve Kullanım Alanları

Bitkilerin içerdikleri kimyasal bileşikler primer ve sekonder (ikincil) olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Primer metabolitler büyüme ve üreme gibi yaşamsal görevlerde yer alırken, sekonder metabolitler bitki büyüme, gelişimi ve çoğaltımında etkin şekilde dahil olmamakla birlikte çevre adaptasyonu, hayatta kalma, korunmada ve savunmada görevi olan bileşikleridir (Topcu ve Çölgeçen, 2015). Bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin bazıları belirli türlere özgüdür. Genel olarak bu bileşikler bitkilerin belirli organlarında veya özelleşmiş hücrelerinde bulunduğu gibi bazıları da bitkinin belirli gelişim safhalarında

üretilmektedirler (Çetin, 2006). Bu metabolitlerin bitkileri tuzluluk, UV ışınları ve kuraklık gibi streslere karşı savunmada önemli işlevleri bulunmaktadır (Vuran ve Türker 2021; Öztop, 2022) Ayrıca bitki tohumlarının dağılımında ve tozlaşmasında da fonksiyon göstermektedirler (Karaçocuk, 2019). Farklı kimyasal yapılara sahip olan sekonder metabolitler biyosentez yollarına göre fenolik bileşikler, terpenler ve alkaloidler olmak üzere üç grup altında sınıflandırılırlar (Topcu ve Çölgeçen, 2015).

Bitki sekonder metabolitlerinin belirtilen fonksiyonları yanında çok çeşitli biyolojik aktivitelerinden dolayı eczacılık (ilaç), parfümeri (tonik, krem ve maske), zirai mücadele (pestisit), kimya, tekstil (boya) ve gıda sanayisi (tatlandırıcı, gıda takviyesi, renk, kıvam ve koku) gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (Bourgaud ve ark., 2001; Hussain ve ark., 2012, Çalışkan ve ark., 2019). Son araştırmalarda, Dünya Sağlık Örgütü'nce ilan edilen 252 ana/önemli ilacın yaklaşık %11'inin doğal bitki kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Çetin, 2006). Çeşitli sektörlerde kullanılan bazı sekonder metabolitlerin kullanım alanları ve elde edildiği bitki türleri Çizelge 2.1'de verilmiştir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Karataş, 2013).

Çizelge 2.1. Çeşitli sektörlerde kullanılan bazı sekonder metabolitler ve elde edildiği bitki türleri (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Karataş, 2013)

Sektör	Sekonder Metabolit	Kullanım Alanı	Elde Edildiği Bitki
İLAC	Ajmasilin Efedrin Kamptotesin Kodein Kolşisin Digoksin Morfin Taksol Vinkristin Kinin	Antihipertansif Bronş açıcı Antitümoral Analjezik Antitümoral Kardiyonik Yatıştırıcı Antikanser Antilösemik Sıtma tedavisi	<i>Catharanthus roseus</i> <i>Ephedra sinica</i> <i>Camptotheca acuminata</i> <i>Papaver somniferum</i> <i>Colchicum autumnale</i> <i>Digitalis lanata</i> <i>Papaver somniferum</i> <i>Taxus brevifolia</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>Cinbona ledgerana</i>
GIDA	Antosiyanin Likopen Kinin Vanilin Taumatin Glisirizin Humulon	Renklendirici Renklendirici Acılaştırıcı Koku verici Tatlandırıcı Tatlandırıcı Acı ve koku verici	<i>Vitis vinifera</i> <i>Lycopersicum esculentum</i> <i>Cinchona ledgeriana</i> <i>Vanilla plenifolia</i> <i>Thaumatococcus danielli</i> <i>Glycyrrhiza glabra</i> <i>Humulus lupulus</i>
PARFÜM KOZMETİK	Yasemin yağı Gül yağı Lavanta yağı	Parfüm Parfüm Parfüm ve kozmetik	<i>Jasminum spp.</i> <i>Rosa damascena</i> <i>Lavandula officinalis</i>
ZİRAAT	Piretrin Yasmolin Nikotin Anakardik asit	İnsektisit İnsektisit İnsektisit Molluskusit	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Anacardicum occidentale</i>

2.3. Sekonder Metabolitlerin Bitki Doku Kültürü Yöntemleriyle Üretimi

Bitki hücre, doku ve organ kültürleri değerli sekonder metabolitlerin yüksek verim ve sabit kalitede üretimi için geleneksel tarım yöntemlerine ve kimyasal yöntemlere alternatif biyoteknolojik yöntemlerdir (Karataş, 2022b). Değerli metabolitlerin söz konusu

biyoteknolojik yöntemlerle üretimi pek çok açıdan avantaj sağlayabilmektedir. Bu bağlamda sekonder metabolitler iklim değişiklikleri ve toprak şartlarından bağımsız, mikrobiyolojik kontaminasyondan ve böcek saldırılarından uzak, tüm süreçleri kontrollü ve planlı bir şekilde takip edilebilen, zararlı herbisit ve pestisidlerin kullanıma gereksinim duymadan, sabit kalitede ve yüksek verimde sürekli üretilebilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Karuppusamy, 2009; Karataş 2013; Karataş ve ark., 2013). Bazı bitki türlerinde doku kültürü yöntemleri ile üretilmesi hedeflenen bileşiklerin listesi ve kullanılan doku kültürü yöntemleri Çizelge 2.2’de verilmiştir (Karuppusamy, 2009).

Çizelge 2.2. Bazı bitki türlerinde doku kültürü yöntemleri ile üretilmesi hedeflenen bileşiklerin listesi ve kullanılan doku kültürü yöntemleri (Karuppusamy, 2009).

Kullanılan doku kültürü yöntemi	Kaynak bitki	Metabolit
Kallus	<i>Aqave amaniensis</i>	Saponin
	<i>Artemisia annua</i>	Artemisin
	<i>Coffea arabica</i>	Kafein
	<i>Coscinium fenestratum</i>	Berberine
	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Flavonoidler
	<i>Papaver somniferum</i>	Alkaloidler
	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Rozmarinik asit
	<i>Salvia officinalis</i>	Terpenoidler
	<i>Scutellaria columnae</i>	Fenolikler
	<i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol
	<i>Taxus spp.</i>	Taxol
Süspansiyon	<i>Mucuna pruriens</i>	L-Dopa
	<i>Vitis vinifera</i>	Antosiyanin
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nikotin
	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypersin
	<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkosid-A
	<i>Anchusa officinalis</i>	Rozmarinik asit
	<i>Brucea javanica</i>	Alkaloidler
	<i>Catharanthus roseus</i>	Vincristine
	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Saponin
Saçak kök	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shikonin
	<i>Papaver somniferum</i>	Kodein
	<i>Silybum marianum</i>	Silymarin
	<i>Vinca major</i>	Vincamine

2.4. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak İçin Uygulanan Stratejileri

Sekonder metabolitlerin bitki doku kültürü yöntemleriyle üretiminde verim ve kalitenin artırılması amacıyla çeşitli stratejiler uygulanmaktadır (Yağcı ve ark., 2008). Bu bağlamda metabolitlerin yüksek miktarlarda üretimi için önceki birçok araştırmalarda belirtilen stratejilerin bazıları aşağıda verilmiştir.

1. Ticari anlamda sekonder metabolit üretimi için hücre hatları ve klonların taranması üretimi hedeflenen bileşiğin daha yüksek seviyelerde üretimine imkanı sağlayabilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).
2. Bitki doku kültürü yöntemleriyle metabolit üretiminde verim ve kalitenin artırılması için uygun besin ortamının seçimi ve optimizasyonu temel parametrelerden birini oluşturmaktadır. Hücrelerde üretilen değerli metabolitlerin miktarları besi ortamlarının içeriği, ortama ilave edilen bitki hormonları ve kültür şartlarından önemli ölçüde etkilenmektedir. Kullanılan besin ortamının çeşidi ve içeriği hem biyomas hem de metabolitlerin yüksek miktarda elde edilmesini etkilemektedir (Shilpa ve ark., 2010). Metabolit üretiminde etkili olan kültür ortamı şartları fiziksel ve kimyasal koşullar olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Karbon kaynağı, bitki büyüme düzenleyicileri, mikro ve makro elementler ve pH kültürün kimyasal koşullarını oluşturmaktadır. Fiziksel koşulları ise ışık, sıcaklık, fotoperiyot, havalandırma ve çalkalama işlemleri gibi oluşturmaktadır (Chandran ve ark., 2020).
3. Besi ortamına ilave edilen öncül bileşikler metabolit üretiminin artırılmasında yaygın şekilde kullanılan bir stratejidir. Bitki hücrelerinde bulunan herhangi bir bileşiğin biyosentez mekanizmasının net bir şekilde bilinmesi durumunda bu mekanizma üzerinde yer alan başlangıç/ara ürünlerin kültür ortamına ilave edilmesi ile (enzimsel reaksiyonlar uyarılarak) istenilen bileşiğin üretimi artırılabilir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002)

4. Üretilmek istenen bileşiğin biyosentez mekanizmasındaki ana gen veya genlerin ekspresyonunun artırılması metabolit üretiminde kullanılan stratejiler arasında önemli bir yer tutmaktadır (Isah ve ark., 2018). Bu bağlamda *Saussurea involucrate* bitkisinin içerdiği apigenin bileşiğinin tümörögenezi inhibe ettiği bilinmektedir. Bitkide düşük miktarda bulunan bu bileşiğin artırılmasına yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla bitkide oluşturulan saçak kök kültürüne *kalkon izomeras* enziminin geni aktarılmış ve bu genin aşırı ekspresyonu neticesinde kontrole göre on iki kat daha fazla apigenin elde edildiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2006).

5. Sekonder metabolit üretimini artırmada yaygın olarak kullanılan bir diğer strateji elisitör uygulamalarıdır. Elisitörler sekonder metabolitlerin biyosentezini indükleyebilen veya artırabilen biyotik veya abiyotik faktörlerdir. Elisitör olarak tanımlanan mikrobiyal, fiziksel veya kimyasal stres faktörleri sekonder metabolitlerin üretimini artırabildiğinden değerli metabolitlerin üretiminde de bir strateji olarak yararlanılmaktadır. Elisitör uygulama stratejisinin metabolit üretimi ve biyomas üretimi üzerindeki etkinliği elisitör tipi, konsantrasyonu, maruz kalma süresi, uygulama programı, kültür tipi, hücre hattı, besiyeri kompozisyonu, kültürün yaşı ve aşaması gibi çeşitli parametrelerden önemli ölçüde etkilenmektedir (Karataş, 2013; Halder ve ark., 2019). Elisitörler bitkilerin membran reseptörüyle etkileşime girerek sekonder bileşiklerin biyosentezi ile ilgili genlerin aktivasyonuna ve ekspresyonuna yol açmaktadırlar (Zhao ve ark., 2005). Elisitörlerin yapay olarak *in vitro* kültürlerle uygulamanın temel amacı, bitkilerin doğal koşullarda stres nedeniyle meydana gelen hasarın benzeri taklit edilerek hücreleri veya dokuları olası bir biyotik/abiyotik saldırı için yanlış yönlendirmektir (Giri ve Zaheer, 2016). Elisitörler yapılarına göre biyotik (biyolojik kökenli) ve abiyotik (biyolojik olmayan) olmak üzere iki grupta incelenir. Kaynağına göre ise endojen ve egzogen olarak sınıflandırılmaktadırlar. Yapılarına ve kaynaklarına göre sınıflandırılan elisitörler Çizelge 2.3’de verilmiştir (Namdeo, 2007).

Çizelge 2.3. Yapılarına ve kaynaklarına göre elisitörlerin sınıflandırılması (Namdeo, 2007).

YAPILARINA GÖRE ELİSİTÖRLER	
Biyotik Elisitörler	Abiyotik Elisitörler
➤ Doğrudan mikroorganizmalar tarafından salınan ve bitki hücrelerince tanınanlar (enzimler, hücre duvarı parçacıkları) ➤ Mikroorganizmaların bitki hücre duvarındaki işlevi sonucu oluşanlar (pektin fragmentleri) ➤ Mikroorganizmanın üzerinde bitki enzimlerinin işlev görmesiyle oluşanlar (kitosan, glukon) ➤ Çeşitli uyarıcılara yanıt için bitki hücreleri tarafından oluşturularak ortama salınan endojen ve her zaman doğada mevcut olan bileşikler	➤ Fiziksel ve kimyasal kaynaklıdır ➤ UV ışığı ➤ Gerekli olmayan ortam bileşenleri (agaroz) ➤ Ağır metaller ➤ Kimyasallar Membran yıkıcılar (deterjanlar) Fungusitler (butylamine) Herbisitler (acifluorfen)
KAYNAKLARINA GÖRE ELİSİTÖRLER	
Egzojen Elisitörler	Endojen Elisitörler
Hücre dışı orjinlidir	Hücre içi orjinlidir
Polisakkaritler (glukon, glukomannoz, kitosan)	Aljinat oligomerler
Peptitler (monilikolin, poli-L-lisin, poliamin, glikoproteinler)	Hepta-β-glukosidaz
Enzimler (selülaz)	
Yağ asitleri (araşonik asit)	

2.5. Adventif Kök Kültürü

Adventif kökler, bitkilerin kök dışı herhangi bir dokusundan (yaprak, gövde, nod vb.) gelişen kökler olarak tanımlanmaktadır. Bu kökler olumsuz çevresel koşullarında veya streslere yanıt

olarak üretilmektedir (Rahmat ve Khan, 2019). Adventif kök kültürleri tıp, tarım, ilaç, pigment ve boya gibi çeşitli sektörlerde ihtiyaç duyulan ikincil metabolitleri üretilbileceği değerli bir yöntemdir (Nagarajan ve ark., 2011). Saçak kök kültürü ile karşılaştırıldığında adventif kökler opin benzeri bileşikler oluşturmamakta, hızlı büyümekte, bakteri DNA dizisi içermemekte ve elde edilmesinde hiçbir genetik transformasyona gereksinim duyulmamaktadır. Adventif köklerin belirtilen özellikleri nedeniyle saçak kök kültürüne tercih edilmektedir (Gaosheng ve Jingming, 2012; Murthy ve ark., 2016). Ayrıca adventif köklerin hızlı büyümeleri ve ikincil metabolitleri stabil olarak üretmeleri nedeniyle son yıllarda tıbbi ve ekonomik açıdan önemli birçok bitkide bu yöntemle metabolit üretim olanakları araştırılmıştır. Özellikle araştırmalar elisitör uygulamaları, kullanılan besin ortamları ve hormonların optimizasyonu ve biyoreaktör uygulamaları üzerine yoğunlaşmaktadır (Murthy ve ark., 2008; Khanam ve ark., 2022).

2.6. *Ocimum basilicum* L. (Reyhan)

Ocimum basilicum L. tropikal ve subtropikal iklimlerde yetişen Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait tek yıllık otsu bitkidir. Bitki dünya genelinde farklı isimlerle adlandırılmaktadır. Bilimsel olarak *Ocimum basilicum* L. olarak adlandırılan bitki, Fransızca-Basilic, Almanca-Basilikum, İspanyolca-Albahaca olarak, Farsça ve Arapçada ise sırasıyla reihan ve rehan olarak adlandırılmaktadır (Shahrajabian ve ark., 2020). Bitki Türkiye’de yaygın olarak reyhan veya fesleğen olarak bilinmektedir (Genç, 2016).

Ocimum cinsinin, Afrika, Asya ve Orta Amerika’nın ılıman ve sıcak bölgelerinde doğal olarak yetiştiği ve Dünyada 65’in üzerinde türe sahip olduğu bildirilmiştir. Bunlardan *Ocimum basilicum* L. morfolojik ve kimyasal içeriği bakımından geniş bir varyasyon göstermektedir (Makri ve Kintzios, 2008; Solmaz, 2017). Bu nedenle *Ocimum* türleri içerisinde *Ocimum basilicum* L. en fazla ekonomik öneme sahip olup, baharat, gıda, kozmetik, parfümeri ve ilaç sanayilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Genç, 2016). Bitkinin taze yaprakları sos, jöle, bal, bitkisel çay, yemek, salata, sirke ve turşularda değerlendirilmektedir (Makri ve Kintzios, 2008). Reyhan halk hekimliğinde iştah açıcı,

diabetik hastalıkların tedavisi, cilt enfeksiyonları, sindirimi kolaylaştırma, mideyi yatıştırma, idrar söktürücü ve spazm giderici olarak kullanılmaktadır (Farouk ve ark., 2016). Ayrıca bitkinin antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar, antiülser, antiviral, insektisidal, hipoglisemik, hipolipidemik, kardiyak uyarıcı ve yara iyileştirici gibi aktiviteler gösterdiği ifade edilmiştir. Bitkinin bu biyolojik özellikleri sahip olduğu fenolik, flavonoid, terpen ve alkaloid gibi farklı kimyasal gruplara ait bileşiklerden ileri gelmektedir. Bu bağlamda reyhan bitkisi yüksek miktarda fenolik bileşik içermekte ve ana fenolik bileşiklerini rosmarinik asit, sisorik asit, kaftarik asit ve kafeik asit oluşturmaktadır (Karataş 2022a, Karataş 2022b).

2.7. Rozmarinik asit

Rozmarinik asit, kafeik asit (3,4-dihidroksisinnamik asit) ve 3,4-dihidroksifenilaktik asidin esteri fenolik bileşik olup L-tirozin ve L-fenilalanin amino asitlerinden sentezlenmektedir. Rosmarinik asit antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antialerjik, antitümör, nöroprotektif ve antianjiyogenik gibi çok sayıda biyolojik ve farmakolojik aktivite göstermektedir (Petersen, 2013; Kim ve ark., 2015). Bu bileşiği üreten birçok bitki, çevresel değişiklikler, aşırı toplama ve bilimsel olmayan hasat nedeniyle biyolojik çeşitlilik kaybı ve yok olma tehdidi ile karşı karşıyadır. Ayrıca rosmarinik asidin kimyasal sentezi karmaşık ve doğal kaynakları sınırlıdır. Rosmarinik aside olan talebi karşılamak için bitki hücre, doku organ ve saçak kök kültürleri gibi biyoteknolojik yöntemlerle üretim olanakları yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Bu amaçla *Ocimum basilicum*, *Satureja hortensis*, *Satureja khuzistanica*, *Mentha × piperita*, *Salvia officinalis*, *Coleus blumei* ve *Dracocephalum moldavica* gibi birçok bitki türünde hücre, doku ve organ kültürü yöntemleri kullanılarak araştırmalar yapılmıştır (Karataş, 2022b).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel materyal

Bitkisel materyal olarak kullanılan reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinin tohumları Zengarden geleneksel tohum firmasından (İzmir, Türkiye) temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Laminer kabin	Bilser
HPLC	Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus
İnkübatör	Nüve
Hassas terazi	Precisa
Otomatik pipet	Gilson
pH metre	Hanna
Santrifüj	Hettich
Spektrofotometre	Shimadzu
Otoklav	Nüve
Magnetik karıştırıcı	Heidolph-MR
Çalkalayıcı	Memmert
Etüv	Memmert

3.1.3. Kullanılan kimyasallar

Etanol	Merck
HCl	Merck
Metanol	Sigma-Aldrich
MS besin ortamı	Duchefa
NaOH	Merck
Phytigel	Sigma
Tween-20	Sigma-Aldrich
Sukroz	Sigma
Kalsiyum klorür (CaCl_2)	Sigma
Sodyum selenit (Na_2SeO_3)	Sigma-Aldrich
Yeast ekstrakt	Duchefa
Rozmarinik asit	Sigma
İndol bütirik asit	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteus	Sigma
Asetonitril	Merck
DPPH	Sigma
ABTS	Sigma
AlCl_3	Merck
Na_2CO_3	Merck

Diklorometan	Sigma-Aldrich
Formik asit	Sigma-Aldrich
Kuersetin	Sigma
Gallik asit	Sigma
FeCl ₃	Sigma-Aldrich
K ₃ Fe(CN) ₆	Merck
CH ₃ COONa	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit	Sigma-Aldrich
K ₂ S ₂ O ₈	Sigma-Aldrich

3.2. Yöntem

3.2.1. Eksplant kaynağı bitkilerin steril koşullarda yetiştirilmesi

Eksplant kaynağı olarak kullanılan reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkileri *in vitro* kültür koşullarında yetiştirilmiştir. Aseptik bitkiler yüzey sterilizasyonu sağlanan tohumların çimlendirilmesiyle elde edilmiştir. Reyhan bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılan besin ortamı 4,4 g L⁻¹ MS (Murashige ve Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ sukroz ve 2 g L⁻¹ phytigel'den oluşmaktadır. Bu besin ortamının pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl kullanarak 5,8'e ayarlanmıştır. Besin ortamlarının sterilizasyonu 121°C, 2 atmosfer basınçta 15 dakika otoklavlanarak sağlanmıştır. Daha sonra besin ortamları laminar kabin içerisinde steril kavanozlara (50 mL) dağıtılmıştır.

Reyhan tohumlarının yüzey sterilizasyonu etil alkol (%70 v/v) içerisinde 1 dakika bekletildikten sonra sodyum hipoklorit çözeltisinde (%2 lik; 2-3 damla tween-20 içeren) 30 dakika karıştırılarak sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra tohumlar süzülerek sodyum hipoklorit

özeltisinden arındırılmıştır. Bu amaçla tohumlar steril su ile üç kez durulanmıştır. Yüzey sterilizasyonu sağlanan tohumlar kavanozlara aktararak karanlık koşullarda inkübatörde çimlenmesi sağlanmıştır. Çimlenme süreci tamamlandıktan sonra (10 gün) bitkiler 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta 20 gün yetiştirilmiştir (Şekil 3.1).

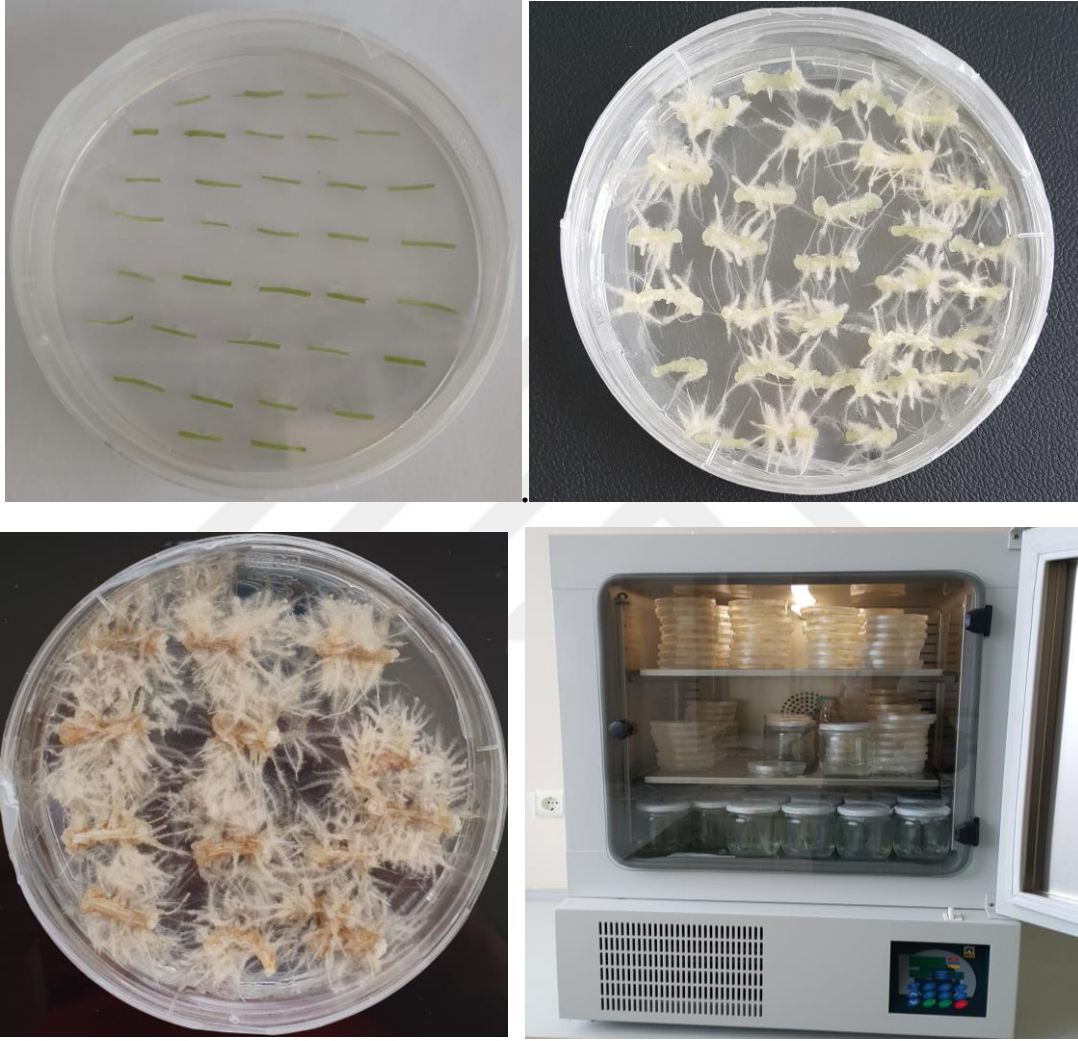


Şekil 3.1. Reyhan tohumlarının çimlendirilmesi ve *in vitro* koşullarda bitkilerin yetiştirilmesi

3.2.2. Adventif kök kültürünün oluşturulması

Adventif köklerin elde edilmesinde aseptik koşullarda yetiştirilen reyhan bitkilerinin hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2). Adventif kök kültürünün oluşturulmasında kullanılan besin ortamı 3.3 g L⁻¹ MS temel besin ortamına, 30 g L⁻¹ sukroz, 2 mg L⁻¹ IBA (indol-3-bütirik asit) ve 2 g L⁻¹ phytigel ilave edilerek hazırlanmıştır. Bu besin ortamının pH' sının ayarlanması ve sterilizasyonu eksplant kaynağı bitkilerin yetiştirilmesinde (Bölüm 3.2.1.) belirtilen koşullara göre gerçekleştirilmiştir. Hipokotil eksplantları bu besin ortamını içeren petri kaplarında karanlık koşullarda (inkübatörde) kültüre alınmıştır. Bu koşullarda gelişen adventif kökler kültürün 15. günde aynı besin içerikli petri kaplarına aktararak alt kültüre alınmıştır. Elde edilen adventif kökler

kültürün 30. gününde eksplant kaynaklarından ayırarak süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır.

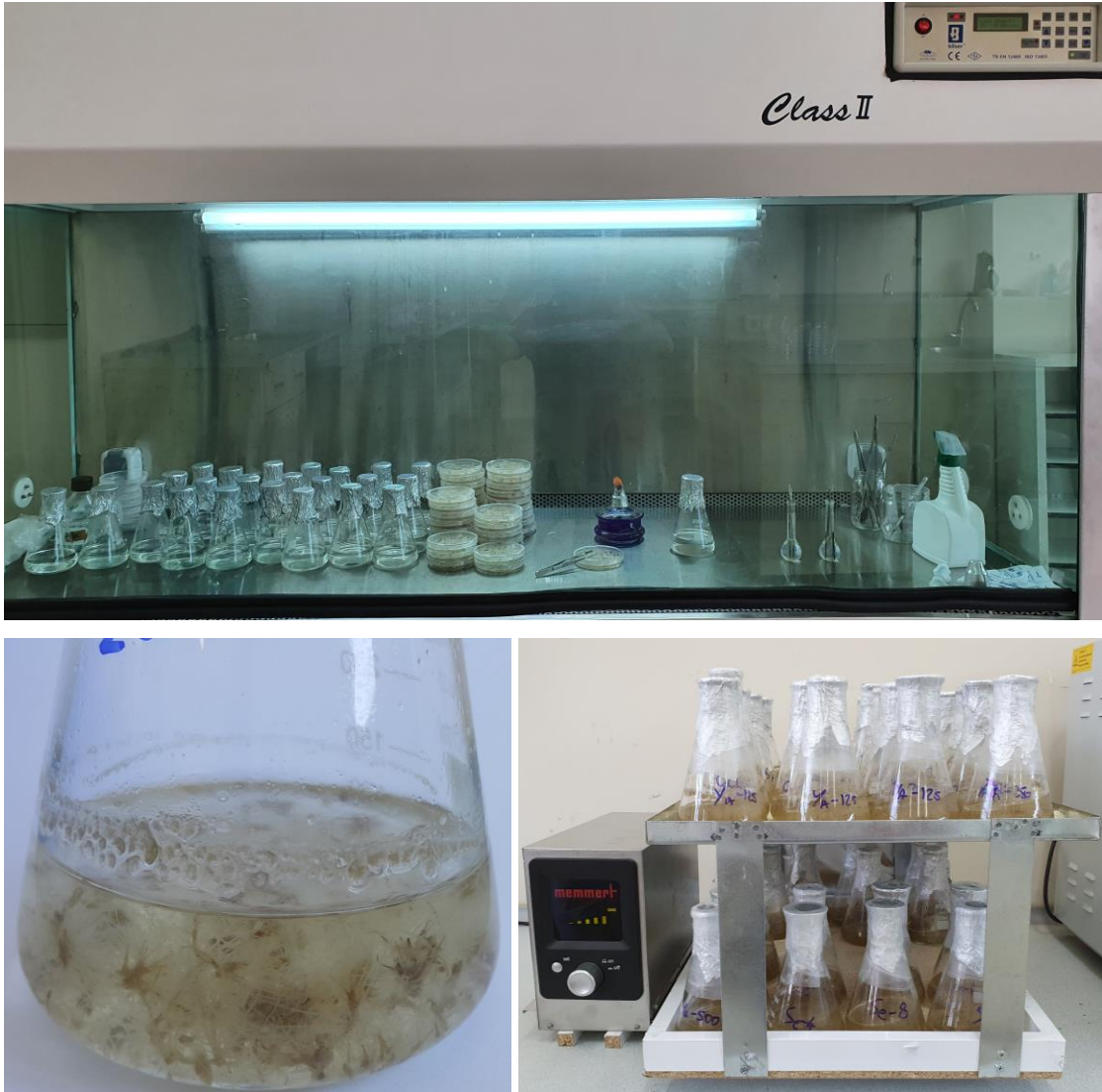


Şekil 3.2. Hipokotil eksplantları, adventif kökler ve çalışmalarda kullanılan inkübatör

3.2.3. Adventif kök süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve elisitör uygulamaları

Katı besin ortamından elde edilen adventif kökler adventif kök süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Sıvı kültürlerin oluşturulmasında kullanılan besin ortamı katı kültürden farklı olarak phytigel içermemektedir. Adventif kökler (10 g) 100 mL besin ortamı içeren 250 mL'lik erlenmayerlerde çalkalayıcı (120 devir/dakika)

üzerinde kültüre alınmıştır. Erlenmayerler karanlık ortam koşullarında 25 ± 2 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Kültürün 26. gününde besin ortamına elisitör olarak farklı konsantrasyonlarda yeast ekstrakt ($125, 250$ ve $500 \mu\text{g mL}^{-1}$), kalsiyum klorür (5 ve 10 mM CaCl_2) ve sodyum selenit (4 ve $8 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SeO}_3$) ilave edilmiştir. Adventif kökler süspansiyon kültürünün 30. gününde hasat edilerek yaş ağırlıkları tartılmış ve diğer analizlerde kullanmak üzere kurutulmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Adventif kök süspansiyon kültürünün oluşturulması

3.2.4. Adventif kök ekstraktların hazırlanması

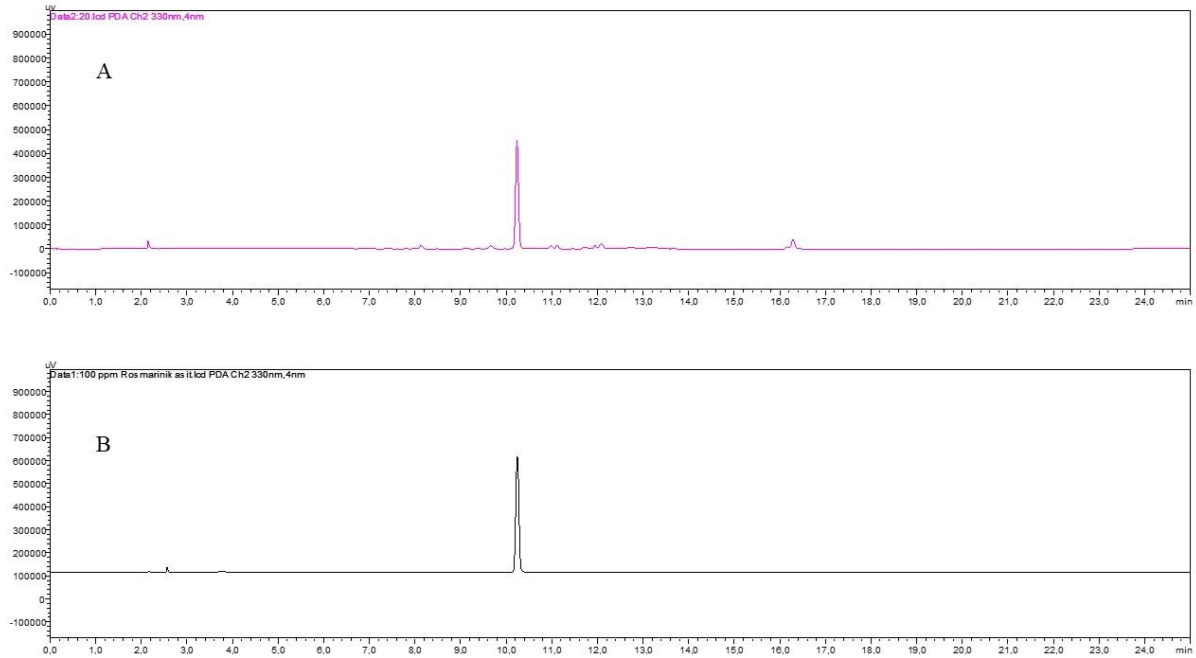
Sekonder metabolit miktarı (rozmarinik asit, toplam fenolik bileşik, flavonoid) ve antioksidan aktivitenin (DPPH, ABTS ve FRAP) analizi için adventif kökler metanol-diklorometan (4:1) çözeltisinde ekstrakte edilmiştir. Bu bağlamda kurutulmuş adventif kök numuneleri (0.2 g) 10 mL çözeltide ekstrakte edildikten sonra filtre (0.22 µm) edilmiştir. Ekstraktlar analiz sürecinin sonuna kadar koyu renkli cam şişelerde +4 °C’de depolanmıştır (Karataş, 2022a).

3.2.5. Rozmarinik asit analizi

Adventif köklerin rozmarinik asit içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı ile Karataş (2022a)’ın belirttiği yöntemle göre yapılmıştır. Analiz aşamasında kullanılan gradient programı ve cihaz koşulları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Adventif köklerin rozmarinik asit miktarları kalibrasyon grafiği kullanarak belirlenmiştir. Standart rozmarinik asit bileşiğine ve adventif köklere ait kromatogramlar Şekil 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Rozmarinik asit analizinde kullanılan gradiyent programı ve cihaz koşulları

Özellik	Koşullar
Kolon	Phenylhexyl (4.6 x 150 mm) kolon (GL Sciences InterSustain, Japan)
Detektör	Photodiode Array Detector (PDA)
Akış hızı	1 mL dak ⁻¹
Kolon sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Dalga boyu	330 nm
Mobil faz	Çözücü A : deiyonize suda % 0.1 formik asit Çözücü B: asetonitril
Gradiyent programı	0 dak, % 100 A ve % 0 B 5 dak, % 80 A ve % 20 B 10 dak,% 50 A ve % 50; 15 dak, % 30 A ve % 70 B 20 dak, % 100 A ve % 0 B 25 dak, % 100 A ve % 0 B



Şekil 3.4 Adventif köklere (A) ve standart rozmarinik asit (B) bileşiğine ait HPLC kromatogramları

3.2.6. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi

Reyhan adventif köklerinin toplam fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesinde Slinkard ve Singleton (1977)'un metodu kullanılmıştır. Deney tüplerine 100 µL numune ekstraktları ilave edildikten sonra üzerine 4.5 mL saf su ve Folin-Ciocalteus (100 µL) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 300 µL Na₂CO₃ (%2) eklenmiştir. Deney tüpleri oda koşullarında 2 saat bekletildikten sonra 760 nm dalga boyundaki absorbansları spektrofotometrede okunmuştur. Adventif köklerin toplam fenolik madde içerikleri kalibrasyon grafiği kullanarak gallik aside eş değer olarak belirlenmiştir.

3.2.7. Flavonoid miktarının belirlenmesi

Reyhan adventif köklerinin flavonoid içeriklerinin belirlenmesinde Pekal ve Pyrzynska (2014)'ın metodu kullanılmıştır. Deney tüplerine 100 µL numune ekstraktları ilave edildikten sonra üzerine 1.5 mL etanol ve 100 µL AlCl₃ (%10) eklenmiştir. Daha sonra deney tüplerine 100 µL 1 M NaCH₃COO ilave edilerek toplam hacim saf su ile 5 mL tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımları oda koşullarında 30 dakika bekletildikten sonra 427 nm dalga boyundaki absorbansları spektrofotometrede okunmuştur. Adventif köklerin flavonoid içerikleri kalibrasyon grafiği kullanarak kuersetine eş değer olarak belirlenmiştir.

3.2.8. Serbest radikal giderme aktivitesi (DPPH)

Serbest radikal (DPPH•) giderme aktivitesi Blois (1958) metoduna göre yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda numune ekstraktları bulunan deney tüplerinin hacimleri etanol ile 3 mL'ye ayarlanmıştır. Daha sonra bu tüplere 1 mL 0.26 mM DPPH• ilave edilerek vortekslenmiştir. Deney tüpleri oda koşullarında 30 dakika (karanlık) inkübe edildikten sonra 517 nm'deki absorbansları spektrofotometrede okunmuştur. Adventif köklerin IC₅₀ değerleri derişim/aktivite (% aktivite) grafiği kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{DPPH giderme aktivitesi (\%)} = [(Abs_{\text{kontrol}} - Abs_{\text{numune}}) / Abs_{\text{kontrol}}] \times 100$$

3.2.9. İndirgeme gücü aktivitesi (FRAP)

Numunelerin indirgeme gücü aktivitelerinin belirlenmesinde Oyaizu (1986) metodu kullanılmıştır. Farklı miktarlarda numune ekstraktları bulunan deney tüplerinin hacimleri fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ile 1.25 mL'ye ayarlanmıştır. Deney tüplerinin üzerine 1.25 mL K₃Fe(CN)₆ (%1) eklendikten sonra etüvde (50 °C) 20 dakika bekletilmiştir. Bu süre tamamladıktan sonra tüplere sırasıyla 1.25 mL trikloroasetik asit (%10) ve 0.25 mL FeCl₃ (%0.1) eklenilmiştir. Deney tüplerinin 700 nm absorbansları spektrofotometrede

okunmuştur. Adventif köklerin indirgeme gücü aktiviteleri kalibrasyon grafiği kullanarak troloks eş değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.10. Katyon radikali giderme aktivitesi (ABTS)

Numunelerin katyon radikali giderme aktivitelerinin belirlenmesinde Re ve ark., (1999)'ın metodu kullanılmıştır. Farklı miktarlarda numune ekstraktları bulunan deney tüplerinin hacimleri fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.4) ile 3 mL'ye ayarlanmıştır. Daha sonra bu tüplere 1 mL ABTS-K₂S₂O₈ çözeltisi eklenerek vortekslenmiştir. ABTS-K₂S₂O₈ çözeltisi 2 mM ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) çözeltisi ile 2.45 mM potasyum persülfat (K₂S₂O₈) çözeltisinin 1:2 oranında karıştırıldıktan sonra karanlıkta 6 saat bekletilerek hazırlanmıştır. Deney tüpleri oda koşullarında (karanlıkta) 30 dakika bekletildikten sonra 734 nm dalga boyundaki absorbansları spektrofotometrede okunmuştur. Adventif köklerin IC₅₀ değerleri derişim/aktivite (% aktivite) grafiği kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{ABTS giderme aktivitesi (\%)} = [(Abs_{\text{kontrol}} - Abs_{\text{numune}}) / Abs_{\text{kontrol}}] \times 100$$

3.2.11. İstatistiki analizler

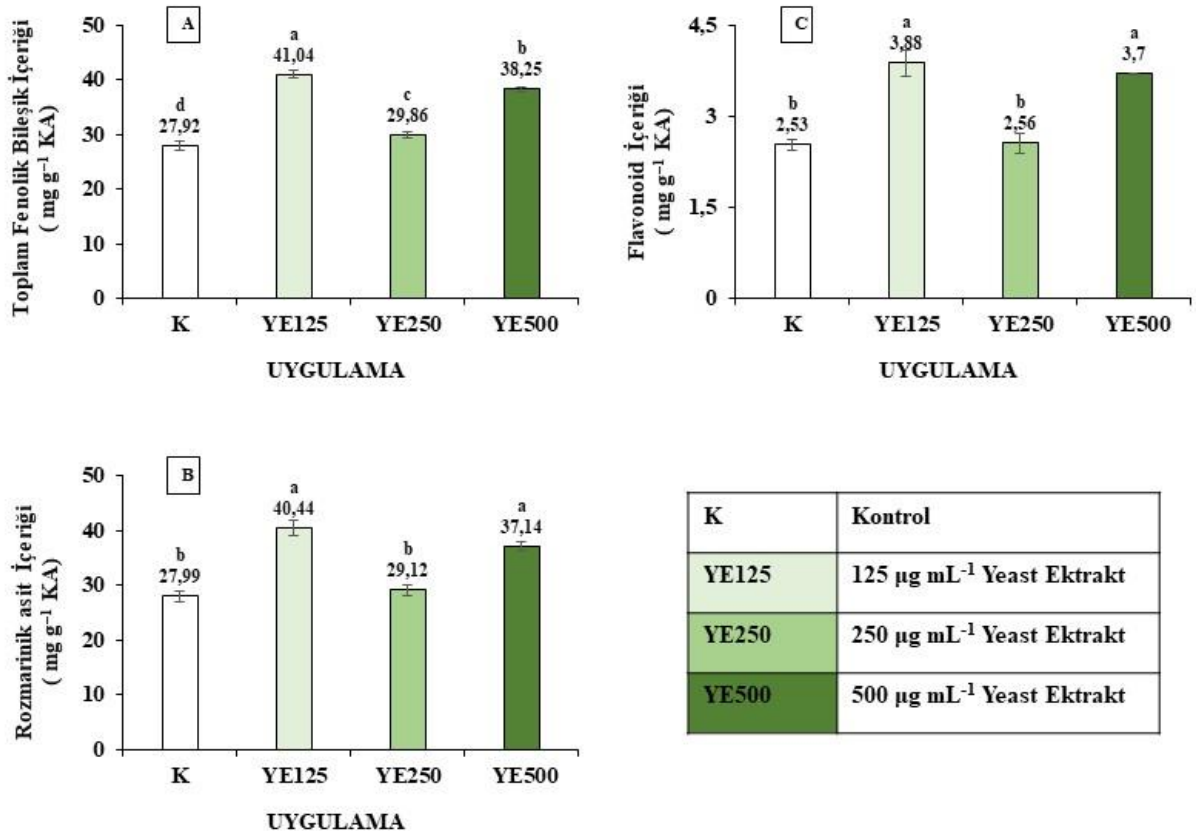
Tüm uygulama ve analizler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 20 (Armonk, NY: IBM Corp.) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu aralık testine göre belirlenmiştir (Duncan, 1955). Korelasyon analizleri ise Pearson's korelasyon testine göre yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada *Ocimum basilicum* L. (reyhan) bitkisinden elde edilen adventif köklerin metabolit içeriklerine ve antioksidan aktivitelerine çeşitli elisitörlerin etkileri incelenmiştir. Adventif köklerin elde edilmesinde *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkilerin hipokotil kısımları eksplantları kaynağı olarak kullanılmıştır. Katı kültür koşullarında elde edilen adventif kökler sıvı (süspansiyon) kültür koşullarına aktararak 26 gün boyunca çoğaltılmıştır. Bu sürenin sonunda adventif köklere 4 gün süreyle süspansiyon kültür koşullarında yeast ekstrakt, kalsiyum klorür ve sodyum selenit'in farklı konsantrasyonları elisitör olarak uygulanmıştır. Elisitör uygulamaları tamamlandıktan sonra adventif kökler hasat edilerek kurutulmuştur. Bu köklerin toplam fenolik bileşik, flavonoid ve rozmarinik asit içerikleri analiz edilmiştir. Antioksidan aktiviteleri ise serbest radikal (DPPH[•]) giderme aktivitesi, indirgeme gücü aktivitesi (FRAP) ve katyon radikali giderme aktivitesi (ABTS^{•+}) yöntemleri ile belirlenmiştir. Adventif kökleri rozmarinik asit içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Diğer metabolitlerin miktarları ve antioksidan aktiviteleri ise spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmiştir.

4.1. Yeast Ekstrakt Uygulanan Adventif Köklerin Sekonder Metabolit İçerikleri

Reyhan (*O. basilicum*) adventif kök süspansiyon kültüründe metabolit üretimine yeast ekstrakt'ın etkilerinin belirlenmesi amacıyla kültüre 125 µg mL⁻¹ (YE125), 250 µg mL⁻¹ (YE250) ve 500 µg mL⁻¹ (YE500) olmak üzere üç farklı konsantrasyonda yeast ekstrakt uygulanmıştır. Bu uygulamaların adventif köklerin toplam fenolik bileşik, flavonoid ve rozmarinik asit içeriğine etkileri Şekil 4.1.'de verilmiştir.



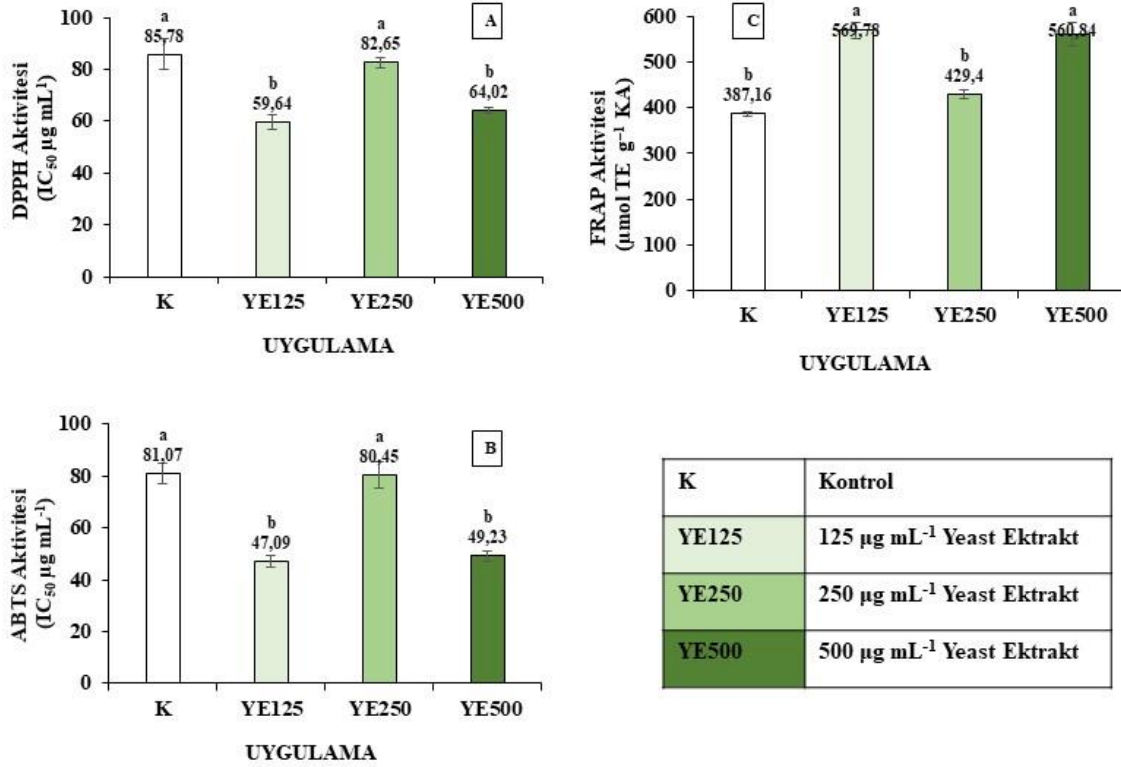
Şekil 4.1. Yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerin toplam fenolik bileşik (A), rozmarinik asit (B) ve flavonoid içerikleri (C)

Yeast ekstrakt uygulamaları adventif köklerin sekonder metabolit içeriğinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar meydana getirmiştir. Bu uygulamalar metabolit içeriğini kontrol grubuna göre artırmıştır. Bu bağlamda en yüksek rozmarinik asit, fenolik bileşik ve flavonoid içeriği 125 µg mL⁻¹ yeast ekstrakt (YE125) uygulanan adventif köklerde sırasıyla 40.44 mg g⁻¹ KA, 41.04 mg g⁻¹ KA ve 3.88 mg g⁻¹ kuru ağırlık (KA) olarak belirlenmiştir. YE250 uygulaması rozmarinik asit içeriğini artırsa da bu artış kontrol grubuyla istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturmamıştır. Bu çalışmaya benzer önceki bir çalışmada *Ocimum basilicum* L. hücre süspansiyon kültürüne uygulanan farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının (5, 25, 50, 100 ve 200 mg L⁻¹) rozmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriğini artırdığını bildirmiştir. Söz konusu bu çalışmada en yüksek rozmarinik

asit, toplam fenolik bileşik içeriği ve flavonoid içeriği 200 mg L⁻¹ yeast ekstrakt konsantrasyonunda belirlenmiştir (Açıkgöz, 2020). Yürütülen bu çalışmanın sonuçları mor reyhan bitkisinin kallus kültürüne yeast ekstrakt uygulamanın metabolit üretimine etkilerinin incelendiği çalışmanın sonuçlarıyla örtüşmektedir. Söz konusu çalışmada kallus kültürüne yeast ekstrakt 1, 10, 25, 50, 100 200 ve 400 mg L⁻¹ olmak üzere farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Bu çalışmanın neticesinde en yüksek rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriğinin 100 mg L⁻¹ yeast ekstrakt uygulanan kalluslar da belirlendiği bildirilmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmada metabolit içeriği 100 mg L⁻¹ yeast ekstrakt konsantrasyonuna kadar artarken bu konsantrasyondan sonra metabolit içeriğinin azaldığı ifade edilmiştir (Zaman ve ark., 2022). Benzer şekilde yürütülen bu çalışmada da metabolitlerin miktarları 125 µg mL⁻¹ yeast ekstrakt konsantrasyonundan sonra azalmıştır. Ancak *Agastache rugosa* hücre süspansiyon kültüründe maksimum rosmarinik asit içeriği 750 mg L⁻¹ gibi yüksek yeast ekstrakt konsantrasyonun da belirlenmiştir. Söz konu çalışmada da rosmarinik asit içeriği 750 mg L⁻¹ yeast ekstrakt konsantrasyonuna kadar artan yeast ekstrakt konsantrasyonu ile artarken bu noktadan sonra belirgin bir şekilde azaldığı ifade edilmiştir (Park ve ark., 2016). Bu bağlamda bitki doku ve organ kültürü yöntemleriyle metabolit üretiminde optimum elisitör konsantrasyonunun belirlenmesi kritik önem taşımakta ve optimum konsantrasyon bitki türüne ve kullanılan *in vitro* yöntemine göre farklılıklar gösterebilmektedir.

4.2. Yeast Ekstrakt Uygulanan Adventif Köklerin Antioksidan Aktiviteleri

Adventif kök süspansiyon kültürüne yeast ekstrakt uygulamanın antioksidan aktiviteye etkileri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Adventif köklerin ABTS ve DPPH sonuçları radikalın başlangıç konsantrasyonunun %50'sini gideren numune miktarı olarak (IC₅₀) ifade edilmiştir. Bu bağlamda düşük IC₅₀ değerine sahip numuneler daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedirler. FRAP aktivitesinin sonuçları ise standart antioksidan bileşik olan troloks'a eşdeğer olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerin DPPH (A), ABTS (B) ve FRAP (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri

Yeast ekstrakt uygulamaları adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar meydana getirmiştir. Yeast ekstrakt uygulamaları adventif köklerin antioksidan aktivitelerini üç metoda göre de artırmıştır. En yüksek DPPH, ABTS ve FRAP aktivitesi 125 µg mL⁻¹ yeast ekstrakt (YE125) uygulanan adventif köklerde sırasıyla 59.64 µg mL⁻¹, 47.09 µg mL⁻¹ ve 569.78 µmol TE g⁻¹ KA olarak belirlenmiştir. Ayrıca, adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktiviteleri ile rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içerikleri arasında güçlü bir korelasyon belirlenmiştir. Korelasyon tablosu Çizelge 4.1’de verilmiştir. DPPH ve ABTS aktiveleri ile sekonder metabolit miktarları arasında belirlenen korelasyon yönünün negatif olmasının nedeni bu analizlerin sonuçlarının IC₅₀ olarak belirlenmesinden kaynaklanmaktadır. IC₅₀ radikalın başlangıç konsantrasyonunu %50 oranında azaltan numune miktarı olarak tanımlanmaktadır.

IC₅₀ değerleri ile antioksidan aktivite arasında ters orantı bulunmaktadır. Farklı bir ifadeyle örneklerin IC₅₀ değerleri düştükçe antioksidan kapasiteleri artmaktadır. Çalışmamızda ABTS ve DPPH için en düşük IC₅₀ değerleri, yani en yüksek antioksidan aktivite, metabolit içeriklerinin en yüksek olduğu ortam koşullarında belirlenmiştir. Bu bağlamda numunelerin sekonder metabolit içerikleri arttıkça IC₅₀ değerleri düşmekte ve antioksidan aktiviteleri artmaktadır. Mor reyhan bitkisinin kallus kültüründe yürütülen benzer bir çalışmada en yüksek DPPH, ABTS ve FRAP aktivitelerinin 100 mg L⁻¹ yeast ekstrakt uygulanan kalluslarda belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada kallusların antioksidan aktiviteleri ile metabolit içerikleri (toplam fenolik bileşik ve flavonoid) arasında pozitif bir korelasyon olduğu ifade edilmiştir (Zaman ve ark., 2022). Benzer bir çalışmada ise en yüksek DPPH aktivitesinin maksimum toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriğinin elde edildiği 200 mg L⁻¹ yeast ekstrakt uygulanan reyhan hücre süspansiyon kültürlerinde olduğu bildirilmiştir (Açıkgöz, 2020).

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki korelasyon

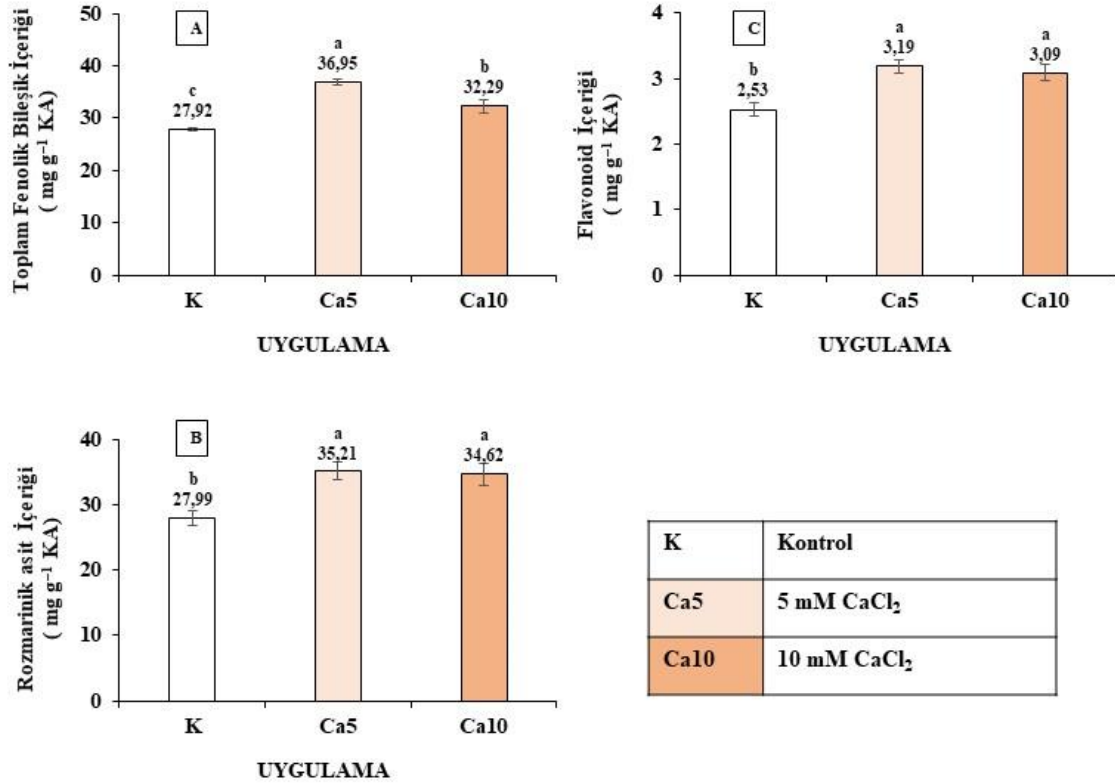
	FRAP ($\mu\text{mol TE}$)	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (IC ₅₀)
Rozmarinik asit	0.848**	-0.794**	-0.726**
Toplam fenolik bileşik	0.951**	-0.896**	-0.758**
Flavonoid	0.926**	-0.969**	-0.822**

** Korelasyon 0.01 düzeyinde önemlidir (2-tailed)

4.3. Kalsiyum Klorür Uygulanan Adventif Köklerin Sekonder Metabolit İçerikleri

Reyhan (*O. basilicum*) adventif kök süspansiyon kültüründe rozmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid üretimine kalsiyum klorürün etkilerin belirlenmesi amacıyla kültüre 5 mM (Ca5) ve 10 mM (Ca10) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda kalsiyum klorür

uygulanmıştır. Kalsiyum klorür uygulanan adventif köklerin metabolit içerikleri Şekil 4.3.'de verilmiştir.



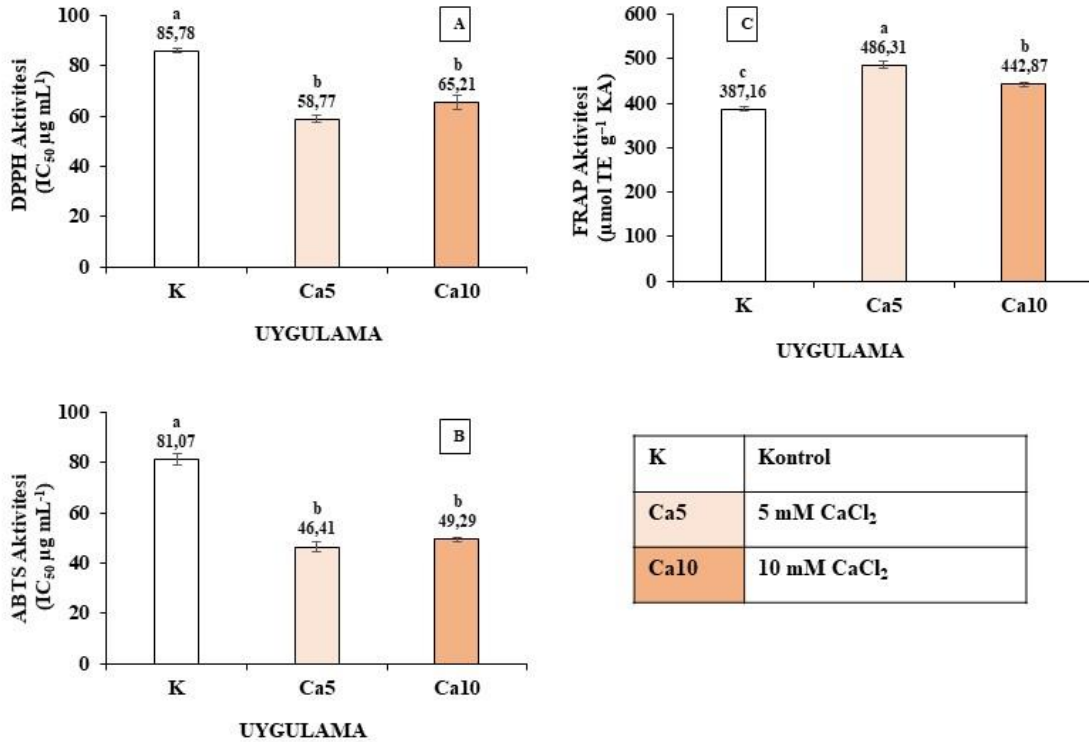
Şekil 4.3. Kalsiyum klorür uygulanan adventif köklerin toplam fenolik bileşik (A), rozmarinik asit (B) ve flavonoid içerikleri (C)

Kalsiyum (Ca) hücre zarlarının yapısında ve geçirgenliğinde, bitki hücrelerinin bölünmesinde ve uzamasında, karbonhidrat translokasyonunda ve N metabolizmasında önemli rol oynayan iki değerli bir katyon ve temel bir elementtir. Ayrıca kalsiyum bitkilerin hücre metabolizmalarında, sinyal iletimlerinde ve besin maddelerinin hücre zarlarından geçişlerinde de düzenleyici rol oynamaktadır (Ahmad ve ark., 2016). Yürütülen bu çalışmada adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri kalsiyum klorür (CaCl₂) uygulamasıyla kontrol grubuna göre önemli ölçüde artmıştır. En yüksek rozmarinik asit, fenolik bileşik ve flavonoid içeriği 5 mM CaCl₂ uygulanan adventif köklerde sırasıyla 35.21 mg g⁻¹ KA, 36.95

mg g⁻¹ KA ve 3.19 mg g⁻¹ kuru ağırlık (KA) olarak belirlenmiştir. Ca10 uygulaması metabolit üretimini kontrole göre artırsa da bu artış Ca5 uygulamasından düşük kalmıştır. Benzer şekilde *Dracocephalum kotschy* bitkisinin yapraklarına 5 mM CaCl₂ ve 10 mM CaCl₂ uygulamaları toplam fenolik ve flavonoid içeriğini kontrol grubuna göre artırmıştır. Söz konusu çalışmada metabolit miktarlarındaki artış en fazla 5 mM CaCl₂ uygulanan yapraklarda olduğu ifade edilmiştir (Vafadara ve ark., 2020).

4.4. Kalsiyum Klorür Uygulanan Adventif Köklerin Antioksidan Aktiviteleri

Adventif kök süspansiyon kültürlerine kalsiyum klorür uygulamanın antioksidan aktiviteye olan etkileri Şekil 4.4 'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Kalsiyum klorür uygulanan adventif köklerin DPPH (A), ABTS (B) ve FRAP (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri

Kalsiyum klorür uygulamaları adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktivitelerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde artırmıştır. En yüksek DPPH, ABTS ve FRAP aktivitesi 5 mM CaCl₂ (Ca5) uygulanan adventif köklerde sırasıyla 58.77 µg mL⁻¹, 46.41 µg mL⁻¹ ve 486.31 µmol TE g⁻¹ KA olarak belirlenmiştir. Ancak uygulanan farklı kalsiyum klorür konsantrasyonları arasında DPPH ve ABTS aktivitelerinde önemli bir farklılık meydana gelmemiştir. Adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktiviteleri rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içerikleri arasında güçlü bir korelasyon belirlenmiştir. Korelasyon tablosu Çizelge 4.2’de verilmiştir. DPPH ve ABTS aktiveleri ile sekonder metabolit miktarları arasında belirlenen korelasyon yönünün negatif olmasının nedeni Bölüm 4.2’de ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Vafadara ve ark., (2020)’nın belirttiği sonuçlarla örtüşmektedir. Söz konusu çalışmada *Dracocephalum kotschyi* bitkisinin yapraklarına 5 mM CaCl₂ uygulanması yaprakların DPPH kapasitesini artırdığı ifade edilmiştir (Vafadara ve ark., 2020).

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda kalsiyum klorür uygulanan adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki korelasyon

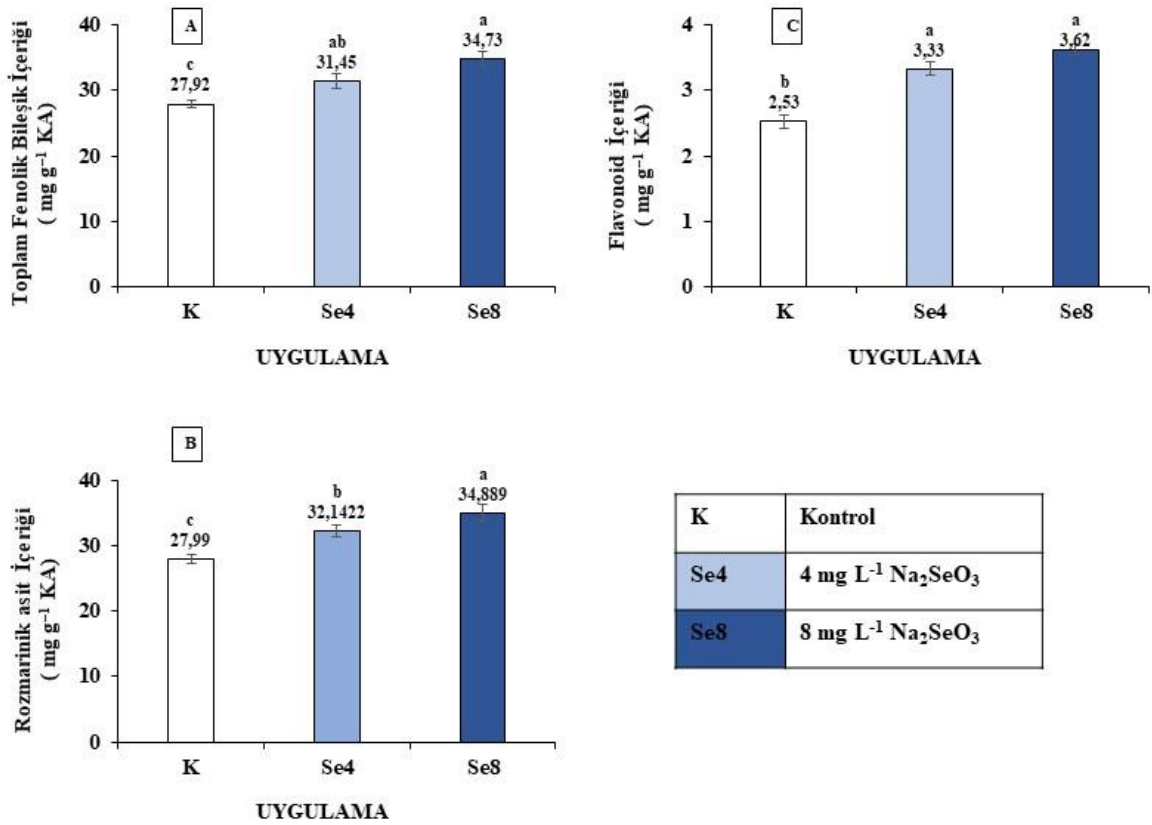
	FRAP (µmol TE)	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (IC ₅₀)
Rosmarinik asit	0.820**	-0.861**	-0.886**
Toplam fenolik bileşik	0.936**	-0.934**	-0.830**
Flavonoid	0.813**	-0.854**	-0.854**

** Korelasyon 0.01 düzeyinde önemlidir (2-tailed)

4.5. Sodyum Selenit Uygulanan Adventif Köklerin Sekonder Metabolit İçerikleri

Sodyum selenit uygulanan *O. basilicum* adventif köklerinin rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içerikleri Şekil 4.5.’de verilmiştir. Adventif köklere sodyum selenit

(Na₂SeO₃) 4 mg L⁻¹ (Se4) ve 8 mg L⁻¹ (Se8) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda uygulanmıştır.

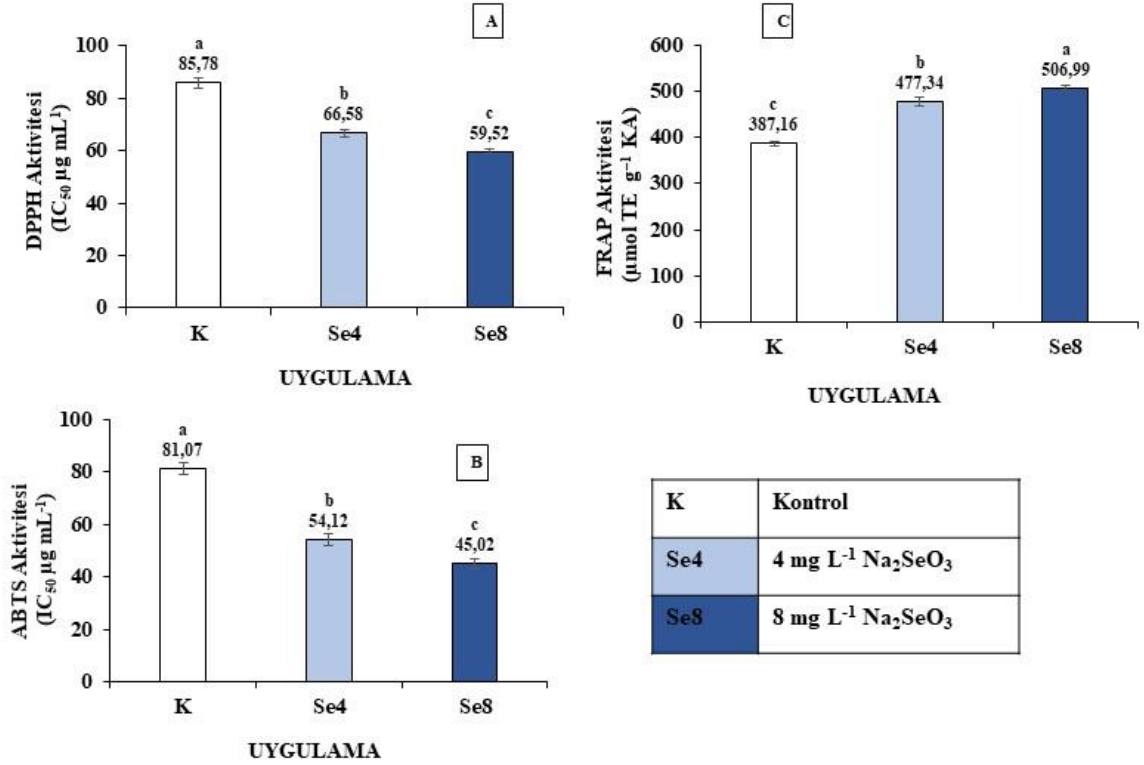


Şekil 4.5. Sodyum selenit uygulanan adventif köklerin toplam fenolik bileşik (A), rozmarinik asit (B) ve flavonoid içerikleri (C)

Sodyum selenit uygulamaları adventif köklerin sekonder metabolit içeriğinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar meydana getirmiştir. Adventif köklere sodyum selenit uygulamaları sekonder metabolit içeriğini kontrol grubuna göre önemli ölçüde artırmıştır. En yüksek metabolit içeriği 8 mg L⁻¹ Na₂SeO₃ (Se8) uygulanan adventif köklerde belirlenmiştir. Bu adventif köklerin rozmarinik asit, fenolik bileşik ve flavonoid içeriği sırasıyla 34.88 mg g⁻¹ KA, 34.73 mg g⁻¹ KA ve 3.62 mg g⁻¹ kuru ağırlık (KA) olarak belirlenmiştir.

4.6. Sodyum Selenit Uygulanan Adventif Köklerin Antioksidan Aktiviteleri

Adventif kök süspansiyon kültürlerine sodyum selenit uygulamanın antioksidan aktiviteye olan etkileri Şekil 4.6 'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Sodyum selenit uygulanan adventif köklerin DPPH (A), ABTS (B) ve FRAP (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri

Sodyum selenit uygulamaları adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktivitelerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde artırmıştır. En yüksek DPPH, ABTS ve FRAP aktivitesi 8 mg L⁻¹ Na₂SeO₃ (Se8) uygulanan adventif köklerde sırasıyla 59.52 $\mu g mL^{-1}$, 45.02 $\mu g mL^{-1}$ ve 506.99 $\mu mol TE g^{-1} KA$ olarak belirlenmiştir. Adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktiviteleri rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içerikleri arasında güçlü bir korelasyon belirlenmiştir. Korelasyon tablosu Çizelge 4.3'de verilmiştir.

DPPH ve ABTS aktiveleri ile sekonder metabolit miktarları arasında belirlenen korelasyonun yönünün negatif olmasının nedeni Bölüm 4.2’de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

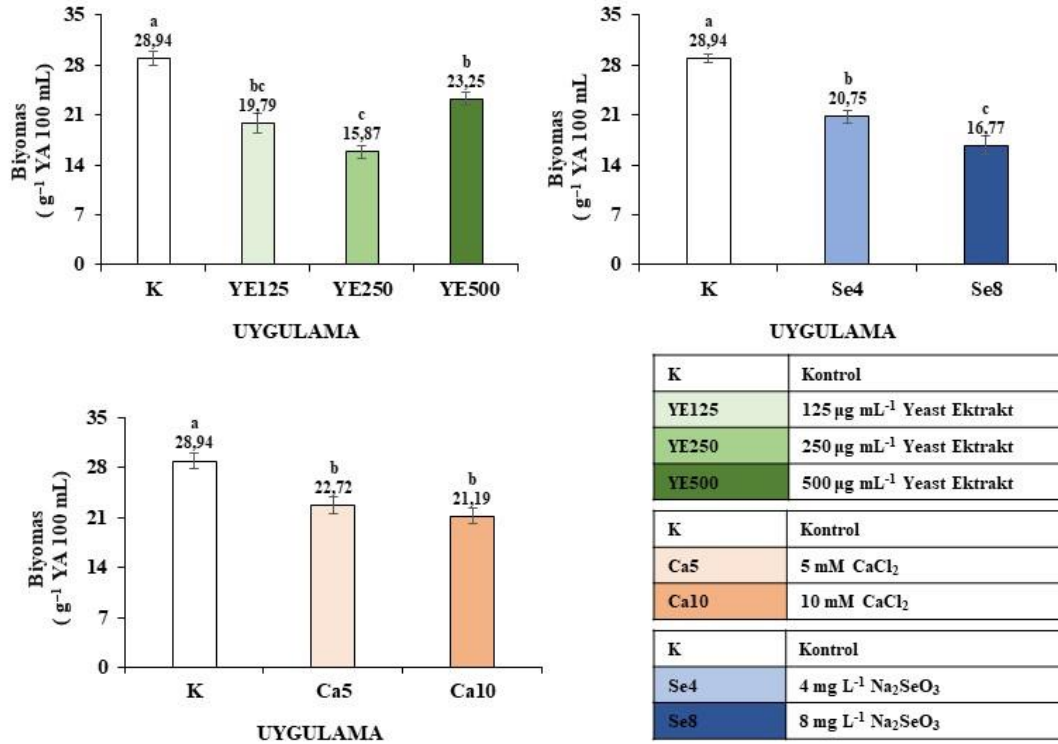
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit uygulanan adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki korelasyon

	FRAP ($\mu\text{mol TE}$)	DPPH (IC_{50})	ABTS (IC_{50})
Rozmarinik asit	0.937**	-0.924**	-0.939**
Toplam fenolik bileşik	0.859**	-0.861**	-0.862**
Flavonoid	0.903**	-0.909**	-0.859**

** Korelasyon 0.01 düzeyinde önemlidir (2-tailed)

4.7. Elisitör Uygulamalarının Biyomas Üzerine Etkileri

Adventif kök süspansiyon kültürüne uygulanan elisitörlerin biyomas [yaş ağırlığa (YA)] üzerine etkileri Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Elisitör uygulamalarının biyomas üzerine etkileri

Elisitör uygulamaları adventif köklerin biyomas değerlerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde azaltmıştır. Biyomas değerlerindeki düşüş en fazla 250 µg mL⁻¹ yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerde belirlenmiştir. Bu uygulamadan elde edilen adventif kök miktarı kontrol grubundan 1.82 kat daha az olarak belirlenmiştir. Kalsiyum klorür ve sodyum selenitin yüksek konsantrasyonları biyomasta daha fazla bir düşüşe neden olmuştur. Ancak kalsiyum klorür konsantrasyonları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Önceki bir araştırmada, Açıkgöz (2020) *Ocimum basilicum* L. hücre süspansiyon kültürüne uygulanan farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarının hücre kuru ağırlığı, hücre sayısı ve hücre canlılığını azalttığını ifade etmiştir. Benzer bir çalışmada ise *Changium smyrnioides* hücre süspansiyon kültürüne kalsiyum klorür uygulanması hücre büyümesini baskıladığı belirtilmiştir (Cai ve ark., 2017).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bitki doku ve organ kültürü yöntemleri değerli biyoaktif bileşiklerin üretimi için alternatif biyoteknolojik yöntemlerdir (Karataş ve ark., 2013; Jakovljević ve ark., 2022). Bu metotlar aracılığı ile değerli metabolitlerin üretiminde hedeflenen bileşiğin üretimini artırmak ve maliyeti azaltmak için çeşitli stratejiler uygulanmaktadır. Bu stratejiler arasında üretim gücü yüksek hücre hatlarının kullanılması, besin ortam bileşenlerinin optimizasyonu, hedef bileşiğin biyosentez yolundaki öncül ve ara bileşiklerin besin ortamına eklenmesi, uygun bitki hücre, organ ve doku kültürü yönteminin seçilmesi, üretilmesi istenen bileşiğin biyosentez yolundaki genlerin ekspresyonun artırılması ve çeşitli elisitörlerin uygulanması önemli bir yer tutmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Karataş ve ark., 2016; Karataş, 2021). Elisitasyon, sekonder metabolitlerin biyosentezini artırılması ve yeni bileşiklerin indüksiyonu için bitki doku ve organ kültürlerine uygulanan en etkili stratejilerden biridir. Elisitörler sekonder metabolitlerin biyosentezini indükleyebilen veya artırabilen biyotik veya abiyotik faktörlerdir. Elisitör uygulama stratejisinin metabolit üretimi ve biyomas üretimi üzerindeki etkinliği elisitör tipi, konsantrasyonu, maruz kalma süresi, uygulama programı, kültür tipi, hücre hattı, besiyeri kompozisyonu, kültürün yaşı ve aşaması gibi çeşitli parametrelerden önemli ölçüde etkilenmektedir (Karataş, 2013; Halder ve ark., 2019).

Tıbbi ve aromatik bir bitki olan reyhan bitkisinin (*Ocimum basilicum* L.) temel fenilpropanoid bileşiğini rozmarinik asit oluşturmaktadır. Bu bileşiğin gösterdiği çok çeşitli biyolojik aktiviteler nedeniyle yoğun ilgi görmektedir. Rozmarinik asidin doğal kaynaklarının sınırlı olması ve kimyasal sentezinin kompleksliği nedeni ile bu bileşiğin bitki hücre, doku ve organ kültürü yöntemleri ile üretimi üzerine çok sayıda çalışma yürütülmüştür (Karataş, 2022b). Bu bağlamda rozmarinik asit üretimi *O. basilicum*'un kallus kültüründe (Nazir ve ark., 2019), hücre süspansiyon kültürlerinde (Açıkgöz, 2020), saçak kök kültüründe (Srivastava ve ark., 2016) ve *in vitro* çoğaltılan bitkilerde (Verma ve ark., 2016) yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Ayrıca reyhan kallus ve süspansiyon kültüründe yürütülen çok sayıda

çalışmada melatonin, bakır oksit nanoparçacıkları, UV-C radyasyonu, metil jasmonate, sorbitol, maya özütü, kadmiyum klorür ve gümüş nitrat gibi çeşitli elisitörlerin rozmarinik asit üretimini etkileri araştırılmıştır (Duran ve ark., 2019; Pandey ve ark., 2019; Nazir ve ark., 2020; Açıkgöz, 2020; Nazir ve ark., 2021; Açıkgöz, 2021). Ancak reyhan adventif kök kültürlerinde rozmarinik asit üretimi ve elisitasyonu üzerine çalışmalar sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada reyhan adventif kök süspansiyon kültürüne uygulanan çeşitli elisitörlerin biyomas, rozmarinik asit, toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan aktiviteye (DPPH, ABTS ve FRAP) etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda reyhan adventif kök süspansiyon kültürüne yeast ekstrakt ($125, 250$ ve $500 \mu\text{g mL}^{-1}$), kalsiyum klorür (5 ve 10 mM) ve sodyum selenit (4 ve 8 mg L^{-1}) elisitör olarak uygulanmıştır. Yapılan uygulamalar içerisinde en yüksek rozmarinik asit içeriği $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ yeast ekstrakt uygulanan adventif köklerde 40.44 mg g^{-1} KA olarak belirlenmiştir. Diğer uygulanan elisitörler açısından bunu sırasıyla 5 mM kalsiyum klorür (35.21 mg g^{-1} KA) ve 8 mg L^{-1} sodyum selenit (34.88 mg g^{-1} KA) uygulamaları takip etmiştir. Benzer durum toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriği açısından da belirlenmiştir. En yüksek fenolik bileşik ve flavonoid içeriği sırasıyla $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ yeast ekstrakt, 5 mM kalsiyum klorür ve 8 mg L^{-1} sodyum selenit uygulanan adventif köklerde belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktiviteler $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ yeast ekstrakt, 5 mM kalsiyum klorür ve 8 mg L^{-1} sodyum selenit uygulanan adventif köklerde belirlenmiştir. Ayrıca tüm elisitör uygulamaları adventif köklerin biyomas miktarlarını kontrole göre önemli ölçüde azaltmıştır. Sonuç olarak reyhan adventif köklerinin rozmarinik asit üretimi için uygun materyal olduğu ve metabolit üretimini artırmak için en uygun elisitörün $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ yeast ekstrakt olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda büyük ölçekte metabolit üretimi için biyoreaktör koşullarında optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz, M. A., 2020. Establishment of cell suspension cultures of *Ocimum basilicum* L. and enhanced production of pharmaceutical active ingredients. *Ind Crops Prod* 148:112278. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112278>
- Açıkgöz, M.A., 2021. Effects of sorbitol on the production of phenolic compounds and terpenoids in the cell suspension cultures of *Ocimum basilicum* L. *Biologia* 76:395–409. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00581-0>
- Ahmad, P., Abdel Latef A.A., Abd Allah E. F., Hashem, A., Sarwat, M., Anjum, N.A., ve Gucl, S., 2016. Calcium and potassium supplementation enhanced growth, osmolyte secondary metabolite production, and enzymatic antioxidant machinery in cadmium-exposed chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Front. Plant Sci.* 7:513. doi: 10.3389/fpls.2016.00513.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.1-35.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* (181) 1199-1200.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, (161) 839-851.
- Cai, J., Ma, Y., Hu, P., Zhang, Y., Chen, J., Li, X., 2017. Elicitation of furanocoumarins in *Changium smyrnioides* suspension cells. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 130, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1199-2>
- Çalışkan, T., Hatipoğlu, R., Kırıcı, S., 2019. Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under In vitro Conditions. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(7): 971-980.

- Çetin, B., 2006. *Rubia tinctorum*. Bitkisinde *Agrobacterium rhizogenes* Aracılığıyla Transforme Saçaklı Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Sekonder Metabolit Üretimi. (Doktora Tezi), Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., Sharma, K., 2020. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*-26.
- Duncan, D. B., 1955. Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics* (11) 1-42.
- Duran, R.E., Kilic, S., Coskun, Y., 2019. Melatonin influence on in vitro callus induction and phenolic compound production in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 55: 468–475. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10006-6>
- Farouk, A., Fikry, R., & Mohsen, M., 2016. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Ocimum basilicum* L. Essential Oil Cultivated in Madinah Monawara, Saudi Arabia and its Comparison to the Egyptian Chemotype. *Teop* 19 (5), 1119 – 1128.
- Gaosheng, H., Jingmimg, J., 2012. Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants, *Recent Advances In Plant In Vitro Culture*, Edited Leva, A., and Rinaldi, L. M. R. Chapter, 11.
- Genç, N., 2016. Tokat ekolojik koşullarında yetiştirilen farklı orijinli reyhan (*Ocimum basilicum* L.) genotiplerinin fenolik bileşik kompozisyonları ve antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi. (Doktora Tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Tokat.
- Giri, C.C., and Zaheer, M., 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 126:1–18.

- Halder, M., Sarkar, S., Jha, S., 2019. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci.*; 19: 880–895. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900058>
- Hussain, Md. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, Md. A., Ahmad, I. Z., and Saeed, M., 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(1)/10–20.
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M. P., Rajasekharan, P. E., Zafar, N., Fruk, A., 2018. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 132:239–265.
- Jakovljević, D., Stanković, M., Warchoń, M., Skrzypek, E., 2022. Basil (*Ocimum L.*) cell and organ culture for the secondary metabolites production: a review. *Plant Cell Tissue Organ Cult* (149) 61–79. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02286-5>
- Karaçocuk, M., 2019. Melatonin ve Spermin Uygulamalarının Tuz Stresi Altındaki Fesleğen (*Ocimum basilicum L.*) Bitkisinin Fenolik Bileşiklere ve Antioksidan Aktivitesine Etkisi. (Yüksek Lisans Tezi), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Kahramanmaraş.
- Karataş, İ., 2013. Siyah havuç (*Daucus carota*) kallus ve hücre süspansiyon kültüründe antosiyanin üretimine UV-C stresinin ve riboflavinin etkilerinin belirlenmesi. (Doktra tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Karataş, İ., 2021. Effects of hormone and explant sources on secondary metabolite production and antioxidant activities in *in vitro* root cultures of *Rubia tinctorum L.* (Madder). *KSU J. Agric Nat* 24 (5): 939-947.
- Karataş, İ., 2022a. Investigation of rosmarinic acid production possibilities and antioxidant capacities in adventitious root cultures of basil (*Ocimum basilicum L.*). *KSU J. Agric Nat* 25 (3): 459-466. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.947605>

- Karataş, İ., 2022b. Production of rosmarinic acid and biomass from adventitious root cultures of *Ocimum basilicum* by optimization of medium components in airlift bioreactors. Plant Cell Tiss Organ Cult <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02347-9>
- Karataş, İ., Elmastaş, M. ve Karataş, R., 2013. Siyah havuç (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef) kallus kültüründe antosiyanin üretimine bazı uygulamaların etkisi. Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi, (7) 30-41.
- Karataş, İ., Karataş, R. ve Elmastaş, M. 2016. Antosiyaninlerin kallus ve hücre süspansiyon kültürüyle üretimi. Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi (12), 80-91. <https://dergipark.org.tr/en/pub/gbad/issue/29707/319637>
- Karuppusamy, S., 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(13), 1222-1239.
- Khanam, M. N., Anis, M., Javed, S. B., Javad, M., and Csupor, D., 2022. Adventitious Root Culture-An Alternative Strategy for Secondary Metabolite Production: A Review. Agronomy, 12, 1178.
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P.F., Malone, D.M., 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. Journal of Biotechnology, (59) 39-52.
- Kim, G. D., Park, Y. S., & Jin, Y. H., & Park, C. S., 2015. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. Appl Microbiol Biotechnol. 99/2083–2092.
- Lakhera, K., Kumar, A., Rani, A., Dixit, R., Rana, S., 2018. Plant Tissue culture and its Application, Bulletin of Pure & Applied Sciences- Botany 37-1:32.
- Lee, E. J., Park, S.Y., Paek, K.Y., 2015. Enhancement strategies of bioactive compound production in adventitious root cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai subjected to methyl jasmonate and salicylic acid elicitation through airlift bioreactors. Plant Cell Tiss Organ Cult 120:1-10.

- Li, F-X., Jin, Z-P., Zhao, D-X., Cheng, L-Q., Fu, C-X., Ma, F., 2006. Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucrata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin. *Phytochemistry* (67) 553-560.
- Makri, O., Kintzios, S., 2008. *Ocimum* sp. (Basil): Botany, Cultivation, Pharmaceutical Properties, and Biotechnology. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, Vol. 13(3)
- Mulabagal, V., Tsay, H.S., 2004. Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International journal of Applied Science and Engineering*, 2 (1) 29-48.
- Murashige, T., Skoog, F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY 2008. Adventitious Roots and Secondary Metabolism. *Chinese Journal of Biotechnology* 24,5:711-716.
- Murthy, H. N., Dandin, V.S., Paek, K.Y., 2016. Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. *Phytochem Rev.* 15/129–145.
- Nagarajan, A., Arivalaganb, U., Rajaguru, P., 2011. In vitro root induction and studies on antibacterial activity of root extract of *Costus igneus* on clinically important human pathogens. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 1 (4)/67-76.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacognosy Reviews*, (1) 1.
- Nazir, M., Tungmunthum, D., Bose, S., Drouet, S., Garros, L., Giglioli-Guivarc'h, N., Abbasi, B.H., Hano, C., 2019. Differential production of phenylpropanoid metabolites in callus cultures of *Ocimum basilicum* L. with distinct in vitro antioxidant activities and in vivo protective effects against UV stress. *J Agric Food Chem* 67:1847–1859. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05647>.

- Nazir, M., Ullah, M.A., Mumtaz, S., Siddiquah, A., Shah, M., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B.H., 2020. Interactive effect of melatonin and UV-C on phenylpropanoid metabolite production and antioxidant potential in callus cultures of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var *purpurascens*). *Molecules* 25(5):1072. <https://doi.org/10.3390/molecules25051072>
- Nazir, S., Jan, H., Zaman, G., Khan, T., Ashraf, H., Meer, B., Zia, M., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B.H., 2021. Copper oxide (CuO) and manganese oxide (MnO) nanoparticles induced biomass accumulation, antioxidants biosynthesis and abiotic elicitation of bioactive compounds in callus cultures of *Ocimum basilicum* (Thai basil). *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 49 (1) 625-633. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1984935>
- Onay, A., Kılınç, F.M., Yıldırım, H. 2019. Bitki Doku Kültürü. Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Yaklaşımlar. Bölüm 5 Sayfa: 73-94 Editör Çiftçi, Y.Ö., Uncuoğlu, A. A., Palme Yayınevi.
- Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E, Çiftçi, Ö.Y., Akdemir, H., 2012. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum. *Yaşam Bilimleri Dergisi*, Cilt 1, Sayı 2.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44:307-315.
- Öztop, H., 2022. *Centella asiatica* (L.) Urban Hücre Kültüründe Elisitör Uygulamalarının Sekonder Metabolit Üretimi ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı. İstanbul.
- Pandey, P., Singh, S., Banerjee, S., 2019. *Ocimum basilicum* suspension culture as resource for bioactive triterpenoids: yield enrichment by elicitation and bioreactor cultivation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 137:65–75. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01552-9>

- Park, Woo T., Mariadhas V. Arasu, Naif A. Al-Dhabi, Sun K. Yeo, Jin Jeon, Jong S. Park, Sook Y. Lee, and Sang U. Park. 2016. Yeast extract and silver nitrate induce the expression of phenylpropanoid biosynthetic genes and induce the accumulation of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* cell culture. *Molecules* 21, no. 4: 426.
- Pekal, A., Pyrzynska, K., 2014. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal Methods* 7:1776–1782.
- Petersen, M., 2013. Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochem Rev.*12:207–227.
- Rahmat, E., Kang, Y., 2019. Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: A Review. *J Plant Biotechnol.* 46:143–157.
- Ramachandra, R. S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, (20) 101-153.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26 (9- 10) 1231-1237.
- Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q., 2020. Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. *International Journal Of Food Properties*, Vol. 23, No. 1, 1961–1970.
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B.S., 2010. An alternate method of natural drug production: Elciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, 5(3) 222-247.
- Slinkard, K., Singleton, V. L.,1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticulture* 28:49-55.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Sekonder metabolit üretimi, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.211-261.

- Solmaz, S., 2017. Tuz Stresinin Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinde Flavonoid Grubu Bileşikler, Antioksidan Aktivite ve Stres Parametrelerine Etkisi. (Yüksek Lisans Tezi). Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı. Tokat.
- SPSS 20. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2011.
- Srivastava, S., Conlan, X.A., Adholeya, A., Cahill, D.M., 2016. Elite hairy roots of *Ocimum basilicum* as a new source of rosmarinic acid and antioxidants. Plant Cell Tissue Organ Cult 126:19–32. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0973-x>
- Steffens, B., Rasmussen, A., 2016. The Physiology of Adventitious Roots, Topical Review on Adventitious Root Physiology, Plant Physiology, Vol. 170, pp. 603-617.
- Thorpe, T. A., 2007. History of plant tissue culture, Mol Biotechnol . 37/169–180.
- Topcu, Ş., ve Çölgeçen, H., 2015. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 8 (2): 09-29.
- Vafadara, F., Amooaghaie, R., Ehsanzadeh, P., Ghanadian, M., Talebi, M., Ghanati, F., 2020. Melatonin and calcium modulate the production of rosmarinic acid, luteolin, and apigenin in *Dracocephalum kotschy* under salinity stress. Phytochemistry,177: 112422.
- Verma, S.K., Sahin, G., Das A.K., Gurel, E., 2016. *In vitro* plant regeneration of *Ocimum basilicum* L. is accelerated by zinc sulfate. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 52:20–27. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9739-0>
- Vuran, N. E., Türker, M., 2021. Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Miktarını Arttırmaya Yönelik Uygulamalar. Int. J. Adv. Eng. Pure Sci. 2021, 33(3):487-498.
- Yağcı, C., Toker, M.C., Toker, G., 2008. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 1 (1) 47-58.

- Zaman, G., Farooq, U., Bajwa, MN., Jan, H., Shah, M., Ahmad, R., Andleeb, A., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, BH., 2022. Effects of yeast extract on the production of phenylpropanoid metabolites in callus culture of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var *purpurascens*) and their in-vitro evaluation for antioxidant potential. Plant Cell Tissue Organ Cult. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02303-7>
- Zhao, J., Davis, L. C., ve Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology advances, 23(4), 283–333.