

T.C.  
ORDU ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Achillea gypsicola* TÜRÜNDE KALLUS KÜLTÜRÜ İLE  
SEKONDER METABOLİT ÜRETİM POTANSİYELİNİN  
BELİRLENMESİ

MUHAMMED AKİF AÇIKGÖZ

DOKTORA TEZİ

ORDU 2017

## TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Muhammed Akif AÇIKGÖZ tarafından hazırlanan ve Prof. Dr. Şevket Metin KARA danışmanlığında yürütülen “*Achillea gypsicola* Türünde Kallus Kültürü ile Sekonder Metabolit Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 15/12/2017 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Şevket Metin KARA

Başkan : Prof. Dr. Şevket Metin KARA  
Tarla Bitkileri, Ordu Üniversitesi İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan KURT  
Tarla Bitkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi İmza :

Üye : Prof. Dr. Nuri YILMAZ  
Tarla Bitkileri, Ordu Üniversitesi İmza :

Üye : Doç. Dr. Ahmet AYGÜN  
Biyoloji, Kocaeli Üniversitesi İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özbay DEDE  
Tarla Bitkileri, Ordu Üniversitesi İmza :

ONAY:

... / ... / ..... tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ... / ... / ..... tarih ve ..... / ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Muhammed Akif AÇIKGÖZ

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### *Achillea gypsicola* TÜRÜNDE KALLUS KÜLTÜRÜ İLE SEKONDER METABOLİT ÜRETİM POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Muhammed Akif AÇIKGÖZ

Ordu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 2017  
Doktora Tezi, 181s.

Danışman: Prof. Dr. Şevket Metin KARA

Türkiye, tıbbi ve aromatik bitki çeşitliliği ve endemizm açısından oldukça zengin bir ekolojiye sahiptir. Tıbbi ve aromatik bitkiler ülkemizde çoğunlukla doğadan toplandıkları için, doğal flora tahrip edilmekte ve endemik türler zamanla yok olma tehlikesine girmektedir. Ayrıca doğadan toplanan bitkilerden, yeterli miktarda ve istenilen kalite standartlarında sekonder metabolit üretimi çok zor, hatta mümkün değildir. Son yıllarda, tıbbi ve aromatik bitkilerden in vitro şartlarda sekonder metabolit üretiminin giderek önem kazandığı bilinmektedir. Bu çalışma, Türkiye endemiği *Achillea gypsicola* türünde, hücre süspansiyon kültürlerine çeşitli abiyotik ve biyotik elisitörler uygulanarak, sekonder metabolit birikiminin artırılması amacıyla yürütülmüştür. Doğal floradan toplanan bitki tohumlarından elde edilen in vitro bitkiler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Yaprak ve gövde eksplantları farklı büyüme düzenleyicileri (BAP, 2,4-D, NAA, IAA, IBA, KIN) içeren iki besi ortamında (MS, B5) kültüre alınmış, kallus oluşumu sağlanarak, hücre süspansiyon kültürleri elde edilmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerine, biyotik (kitosan ve maya ekstraktı) ve abiyotik (ışık, kadmiyum klorit, gümüş nitrat, metil jasmonat, sorbitol ve salisilik asit) elisitörler uygulanmış ve toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, toplam antosiyanin ve kamfor analizleri yapılmıştır.

Çalışma sonunda, *Achillea gypsicola* türünde, hücre süspansiyon kültürü çalışmaları için en uygun besi ortamının B5, besi ortamına ilave edilecek hormon kombinasyonunun 0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA ve eksplant kaynağının ise gövde segmenti olduğu belirlenmiştir. Sekonder metabolit birikiminin teşvik edilmesi kapsamında yapılan elisitör uygulamaları arasında, ışık uygulamalarının toplam fenolik madde, flavanol ve flavonol miktarını diğer uygulamalara göre daha fazla artırdığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, antosiyanin (0.0122 mg/g YHA) ve kamfor (2.4572 µg/g) birikiminin en fazla olduğu stres elisitörü olarak maya ekstraktı dikkati çekmiştir. En yüksek kamfor birikiminin gerçekleştiği 100 mg/l'lik maya ekstraktı uygulaması, başlangıç kültürüne göre, kamfor birikiminde % 831 gibi çok yüksek bir artış sağlamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Elisitör, Fenolik madde, Kamfor, Kitosan, Maya ekstraktı.

## ABSTRACT

### THE DETERMINATION OF SECONDARY METABOLITE PRODUCTION POTENTIAL WITH CALLUS CULTURE IN THE SPECIES OF *Achillea gypsicola*

Muhammed Akif AÇIKGÖZ

Ordu University  
Institute of Science and Technology  
Department of Field Crops, 2017  
PhD. Thesis, 181p.

Supervisor: Prof. Dr. Şevket Metin KARA

Turkey has a rather rich ecology in terms of medicinal and aromatic plant diversity and also endemism. Since medicinal and aromatic plants are mostly collected from nature in our country, natural flora is destroyed and endemic species are in danger of extinction over time as well. Besides, producing secondary metabolites, in sufficient quantity and with the desired quality standards, from the plants collected from nature is extremely difficult or even not possible. In recent years, it is known that in vitro production of secondary metabolites from medicinal and aromatic plants is increasingly important. This study was carried out to increase accumulation of secondary metabolites by applying various abiotic and biotic elicitors to cell suspension cultures in endemic *Achillea gypsicola* species of Turkey. In vitro plants, obtained from seeds at the plants collected from natural flora were used as explant source. Leaf and stem explants were cultured in two growing media (MS, B5) containing different growth regulators (BAP, 2,4-D, NAA, IAA, IBA, KIN) and after callus formation the cell suspension cultures were obtained. The cell suspension cultures were subjected to biotic (chitosan and yeast extract) and abiotic (light, cadmium chloride, silver nitrate, methyl jasmonate, sorbitol and salicylic acid) elicitors and total phenolic substance, total flavanol, total flavonol, total anthocyanin and camphor contents were analyzed. At the end of the study, it was determined that the most suitable medium for the cell suspension culture studies was B5, the hormone combination to be added to the medium was 0.5 mg / l BAP + 0.5 mg / l NAA, and the explant source was stem segment in *Achillea gypsicola* species. Among the elicitor applications used in the scope of promoting accumulation of secondary metabolites, it was found that the light applications increased the total amount of phenolic substance, flavanol and flavonol more than the other applications. On the other hand, yeast extract was noted as the stress elicitor with the greatest accumulation of anthocyanin (0.0122 mg/g YHA) and camphor (2.4572 µg/g). The application of a 100 mg/l yeast extract producing the highest camphor accumulation resulted in a very high increase of 831 % in camphor accumulation, compared to the initial cultures.

**Key Words:** Camphor, Chitosan, Elicitor, Fenolik compounds, Yeast extract.

## TEŞEKKÜR

Tüm çalışmalarım boyunca her zaman bilgi ve deneyimleriyle yolumu açan değerli hocam Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Şevket Metin KARA'ya, değerli vakitlerinden zaman ayırıp benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşan tez izleme komitesi üyesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Orhan KURT'a yine tez izleme komitesi üyesi değerli hocam Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Özbay DEDE'ye, ayrıca tez izleme komitesi üyesi olmayıp arka planda devamlı desteğini gördüğüm Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet AYGÜN'e en içten duygularla teşekkürlerimi sunarım.

Bitki teşhisinde yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarıma, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hayri DUMAN'a ve Ordu Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevda TÜRKİŞ'e çok teşekkür ederim.

İstatistik analizlerin yapımında yardımını esirgemeyen değerli hocam Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Yeliz KAŞKO ARICI'ya teşekkür ederim

Projenin ilk yıllarında birlikte çalıştığım Ziraat Mühendisi Duygunur DOĞRUDUR'a, arazi çalışmalarında beni yalnız bırakmayan Arş. Gör. Mehmet Muharrem ÖZCAN'a ve tez dönemi boyunca manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Andaç Kutay SAKA'ya ve Arş. Gör. Ayşegül KIRLI'ya teşekkür ederim.

Akademisyenlik hayatımın en zorlu ve en tatlı dönemlerinde her zaman yanımda olan abim Doç. Dr. A. Serdar AÇIKGÖZ'e, kıymetli ablam ve canım annem'e çok ama çok teşekkür ederim.

Ayrıca, 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında tez çalışmama, 1140565 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	V
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	VII
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b> .....	VIII
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	XIV
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	7
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Çimlendirme Çalışmaları ve İn Vitro Bitkiciklerin Elde Edilmesi.....	28
3.2.2. Gövde ve Yaprak Eksplantlarından Kallusların Elde Edilmesi.....	29
3.2.3. Hücre Süspansiyon Kültürlerine Biyotik ve Abiyotik Elisitör Uygulamaları.....	34
3.2.3.1. Işık Uygulaması.....	35
3.2.3.2. Kadmiyum Klorit Uygulaması.....	35
3.2.3.3. Gümüş Nitrat Uygulaması.....	35
3.2.3.4. Metil Jasmonat Uygulaması.....	36
3.2.3.5. Sorbitol Uygulaması.....	36
3.2.3.6. Salisilik Asit Uygulaması.....	36
3.2.3.7. Kitosan Uygulaması.....	36
3.2.3.8. Maya Elisitör Uygulaması.....	37
3.2.4. İncelenen Özellikler ve Yapılan Analizler.....	39

3.2.4.1.	Hücre Büyümesi ve Canlılığının Belirlenmesi.....	39
3.2.4.2.	Toplam Fenolik Madde Tayini.....	39
3.2.4.3.	Toplam Flavanol İçeriği.....	40
3.2.4.4.	Toplam Flavonol İçeriği.....	40
3.2.4.5.	Toplam Antosiyanin İçeriği.....	40
3.2.4.6.	Kamfor Miktarının Belirlenmesi.....	41
3.2.5.	İstatistik Değerlendirme.....	42
3.2.5.1.	İn Vitro Çimlendirme Denemelerine Ait İstatistik Analiz.....	42
3.2.5.2.	Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Uygulamalara Ait İstatistik Analizler.....	42
<b>4.</b>	<b>BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>43</b>
4.1.	İn Vitro Bitkiciklerin Elde Edilmesi.....	43
4.2.	Gövde ve Yaprak Eksplantlarından Kallusların Elde Edilmesi.....	45
4.2.1.	MS Ortamında Gövde ve Yaprak Eksplantlarından Kallus Oluşumu.....	45
4.2.2.	B5 Ortamında Gövde ve Yaprak Eksplantlarından Kallus Oluşumu.....	49
4.3.	Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Uygulamalar.....	54
4.3.1.	Işık Uygulaması.....	54
4.3.2.	Kadmium Klorit Uygulaması.....	66
4.3.3.	Gümüş Nitrat Uygulaması.....	77
4.3.4.	Metil Jasmonat Uygulaması.....	89
4.3.5.	Sorbitol Uygulaması.....	101
4.3.6.	Salisilik Asit Uygulaması.....	113
4.3.7.	Kitosan Uygulaması.....	125
4.3.8.	Maya Elisitör Uygulaması.....	137
<b>5.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>149</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>151</b>
	ÖZGEÇMİŞ.....	179



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1.	<i>Achillea gypsicola</i> türünün yetiştiği toprak yapısına ait görüntü (a), bitkinin arazideki toplu görünümü (b), laboratuvarda tohumların görüntüsü (c), zararlı kontrolüne ait görüntü (d) ve tohumların binoküler mikroskop altında görünümü (e).....	27
Şekil 3.2.	Laboratuvarda <i>Achillea gypsicola</i> türünde tohumlara yapılan ön uygulamalara ait görüntü (a) ve iklim odasında çimlenen in vitro bitkiciklerin magenta kaplarındaki görüntüleri (b, c ve d).....	29
Şekil 3.3.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde in vitro bitkiciklerin gövde segmenti ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların iklim odasında yer alan petri kaplarındaki genel görüntüleri.....	32
Şekil 3.4.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde gövde ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların puanlanmasına temel teşkil eden binoküler mikroskop altındaki görünüşleri.....	34
Şekil 3.5.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde kallusların alt kültürler sonrasında kontrollerine ait görüntüler (a), kalluslardan elde edilen hücre süspansiyon kültürlerine ait görüntü (b) ve steril kabin içerisinde filtre edilmiş örneklerin (-20 °C) derin dondurucuda muhafaza edilmesine ait görüntü (c).....	38

## ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde kallus oluşumunun teşvik edilmesinde kullanılan, başlangıç ortamına ilave edilen BAP'ın 2,4-D ve NAA ile oluşturduğu kombinasyonlar.....	30
Çizelge 3.2.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde kallus oluşumunun teşvik edilmesinde kullanılan, başlangıç ortamına ilave edilen BAP ve KIN'in IBA ile oluşturduğu kombinasyonlar.....	30
Çizelge 3.3.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde kallus oluşumunun teşvik edilmesinde kullanılan, başlangıç ortamına ilave edilen KIN'in 2,4-D ve NAA ile oluşturduğu kombinasyonlar.....	31
Çizelge 3.4.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde kallus oluşumunun teşvik edilmesinde kullanılan, başlangıç ortamına ilave edilen BAP ve KIN'in IAA ile oluşturduğu kombinasyonlar.....	31
Çizelge 3.5.	Hücrelerde kamfor miktarının tespit edilmesinde kullanılan Headspace-GC-MS cihazına ait deneysel koşullar.....	41
Çizelge 4.1.	Farklı Konsantrasyonlarda ve Sürelerde KNO <sub>3</sub> Çözeltilisinde Bekletilmiş <i>Achillea gypsicola</i> Türüne Ait Tohumların Farklı Konsantrasyonlarda GA <sub>3</sub> İçeren Ortamlardaki Çimlenme Oranları ( % )	44
Çizelge 4.2.	<i>Achillea gypsicola</i> Türünde İn Vitro Koşullar Altında MS Ortamlarında Yaprak ve Gövde Eksplantlarından Oluşan Kalluslar, Puanlama Kullanılan Kriterlere Ait Değerler ve Puanlama.....	46
Çizelge 4.3.	<i>Achillea gypsicola</i> Türünde İn Vitro Koşullar Altında B5 Ortamlarında Yaprak ve Gövde Eksplantlarından Oluşan Kalluslar, Puanlama Kullanılan Kriterlere Ait Değerler ve Puanlama.....	51
Çizelge 4.4.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	58
Çizelge 4.5.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	59
Çizelge 4.6.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	60
Çizelge4.7.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	61
Çizelge 4.8.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına (µg/g) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	62
Çizelge 4.9.	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	63

<b>Çizelge 4.10.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	64
<b>Çizelge 4.11.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına ( % ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	65
<b>Çizelge 4.12.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	69
<b>Çizelge 4.13.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	70
<b>Çizelge 4.14.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	71
<b>Çizelge 4.15.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	72
<b>Çizelge 4.16.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	73
<b>Çizelge 4.17.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	74
<b>Çizelge 4.18.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	75
<b>Çizelge 4.19.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına ( % ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	76
<b>Çizelge 4.20.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	81
<b>Çizelge 4.21.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	82
<b>Çizelge 4.22.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	83
<b>Çizelge 4.23.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam	84

	antosiyenin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	
<b>Çizelge 4.24.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	85
<b>Çizelge 4.25.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	86
<b>Çizelge 4.26.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	87
<b>Çizelge 4.27.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	88
<b>Çizelge 4.28.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	93
<b>Çizelge 4.29.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	94
<b>Çizelge 4.30.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	95
<b>Çizelge 4.31.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyenin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	96
<b>Çizelge 4.32.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	97
<b>Çizelge 4.33.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	98
<b>Çizelge 4.34.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	99
<b>Çizelge 4.35.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	100
<b>Çizelge 4.36.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	105

<b>Çizelge 4.37.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	106
<b>Çizelge 4.38.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	107
<b>Çizelge 4.39.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	108
<b>Çizelge 4.40.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	109
<b>Çizelge 4.41.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	110
<b>Çizelge 4.42.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları...	111
<b>Çizelge 4.43.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	112
<b>Çizelge 4.44.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	117
<b>Çizelge 4.45.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	118
<b>Çizelge 4.46.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	119
<b>Çizelge 4.47.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	120
<b>Çizelge 4.48.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	121
<b>Çizelge 4.49.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	122
<b>Çizelge 4.50.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları...	123
<b>Çizelge 4.51.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%)	124

	etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	
<b>Çizelge 4.52.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	129
<b>Çizelge 4.53.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	130
<b>Çizelge 4.54.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	131
<b>Çizelge 4.55.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	132
<b>Çizelge 4.56.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu$ g/g) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	133
<b>Çizelge 4.57.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	134
<b>Çizelge 4.58.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	135
<b>Çizelge 4.59.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları..	136
<b>Çizelge 4.60.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	141
<b>Çizelge 4.61.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	142
<b>Çizelge 4.62.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	143
<b>Çizelge 4.63.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	144
<b>Çizelge 4.64.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu$ g/g) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	145

<b>Çizelge 4.65.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	146
<b>Çizelge 4.66.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	147
<b>Çizelge 4.67.</b>	<i>Achillea gypsicola</i> türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına ( % ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	148

## SİMGELER ve KISALTMALAR

%	: yüzde
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: amonyum sülfat
+	: ilave
Σ	: toplam sembolü
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksi asetik asit
a	: absorbans değeri
ACC	: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic asit
Ag <sup>+</sup>	: gümüş iyonu
AgNO <sub>3</sub>	: gümüş nitrat
AlCl <sub>3</sub>	: alimünyum klorür
B5	: Gamborg ortamı
BAP	: benzyladenine
c	: her bir dikdörtgende sayılan hücre sayısı
CaCl <sub>2</sub>	: kalsiyum klorür
Cd <sup>+2</sup>	: kadmiyum iyonu
CdCl <sub>2</sub>	: kadmiyum klorit
Ce(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>	: amonyum cerium nitrat
CEO	: canlı eksplant oranı
Co <sup>+2</sup>	: kobalt iyonu
CoCl <sub>2</sub>	: kobalt klorür
CuSO <sub>4</sub>	: bakır sülfat
DMAC	: dimetil amino sinnamaldehit
g	: gram
GA <sub>3</sub>	: gibberellik asit
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GPS	: küresel konumlama sistemi
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: sülfürik asit



HCL	:	hidroklorik asit
Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	:	civa klorür
L	:	litre
IAA	:	indol-3-asetik asit
IBA	:	indol-3-butirik asit
i	:	başlangıç noktası
KCl	:	potasyum klorür
KİN	:	kinetin
kJ	:	kilojul
km	:	kilometre
KNO <sub>3</sub>	:	potasyum nitrat
KOEO	:	kallus oluşturan eksplant oranı
L.	:	Linnaeus
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	:	lityum sülfat
LS	:	Linsmaier ve Skoog ortamı
m <sup>2</sup>	:	metrekare
MeJA	:	metil jasmonat
mg	:	miligram
ml	:	mililitre
mM	:	milimolar
MnSO <sub>4</sub>	:	mangan sülfat
MS	:	Murashige ve Skoog ortamı
n	:	ortalama hücre sayısı
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	:	sodyum karbonat
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	:	sodyum sülfat
NAA	:	naftalinasetik asit
NaCl	:	sodyum klorür
NaOCl	:	sodyum hipoklorit
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	:	amonyum metavanadat

NiSO <sub>4</sub>	:	nikel sülfat
nm	:	nanometre
NN	:	Nitsch ve Nitsch ortamı
°C	:	santigrat derece
p	:	puan
pH	:	hidrojenin gücü
ppm	:	milyonda bir birim
RD	:	renk değeri
rpm	:	dakikada devir sayısı
s	:	saat
sf	:	sulandırma faktörü
SH	:	Schenk ve Hilderbrandt ortamı
TDZ	:	thidiazuron
YHA	:	yaş hücre ağırlığı
$\alpha$	:	alfa
$\beta$	:	beta
$\gamma$	:	gama
$\mu\text{g}$	:	mikrogram
$\mu\text{M}$	:	mikromolar
$\sigma$	:	sigma
$\tau$	:	taf

## 1. GİRİŞ

Türkiye florasında yer alan 12.000'den fazla bitki türünün 1/3'ü endemik (yaklaşık olarak 3 bin 720) olup, bu sayının tüm Avrupa ülkelerinin toplamından fazla olduğu bilinmektedir (Özhatay ve ark., 2017; Uludağ ve ark., 2017). Ülkemizdeki bu bitkilerden tıbbi olarak kullanılanların sayısı ise 500 civarındadır ve büyük bir kısmı Anadolu coğrafyasında doğal olarak yetişmektedir. Tıbbi ve aromatik amaçlı kullanılan bitkilerin kimyasal yapılarında bulunan ve sekonder metabolit olarak adlandırılan bazı etken maddelerin çok yönlü olarak kullanılması bu bitkileri ekonomik manada önemli hale getirmektedir. Doğal habitatta yetişen bitkilerden direk olarak elde edilen sekonder metabolitler bitkilerde çok fazla sayıda ve çeşitlilikte üretilirler. Bunun sebebi bitkilerin adaptasyon, hayatta kalma, nesillerini devam ettirme, savunma ve korunma gibi istekleridir. Bitkilerin türüne, çeşidine, bitki organına, hasat zamanı ve hasat sonrası işlemlere ve bitkilerin yetiştikleri iklim koşullarına göre değişiklik gösteren sekonder metabolitler, bitkilerdeki miktarı çok az ve bitkilerin büyüme-gelişmesindeki işlevi sınırlı olmakla birlikte, yükte hafif pahada ağır organik bileşikler olarak kabul edilirler. Bitkilerde sentezlenen bu sekonder metabolitler terpenoidler, alkaloidler ve fenolik bileşikler olmak üzere üç ana grupta toplanırlar (Bourgaud ve ark., 2001). Bitkide çeşitli fonksiyonları olan bu bileşikler; herbivor, bakteriyel ve fungal patojen saldırılarına karşı bitkileri korur, aynı ortamdaki diğer bitkilerle rekabet güçlerini artırır, tozlanmada faydalı organizmaları (özellikle böcekleri) çeker, simbiyotik ilişkilerde görev alır, bitkiyi sıcaklık değişimleri, su, ışık, ultraviyole ve mineral madde gibi abiotik stres faktörlerine karşı korur ve ayrıca hücre düzeyinde bitki büyüme düzenleyicileri, gen ekspresyon düzenleyicileri ve transdüksiyon mekanizmalarında görev alırlar (Abdin ve ark., 2007).

Günümüzde sekonder metabolitlerden elde edilen ilaç ham maddeleri, lezzet ve koku verici maddeler, boya ve pigment maddeleri, pestisitler ve gıda katkı maddeleri ticari alanda önemli bir pazar değerine sahiptir. Sahip olduğu biyolojik çeşitlilik göz önüne alındığında, ülke olarak sekonder metabolit üretiminde değerlendirilecek oldukça zengin bir potansiyelin olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu potansiyelin değerlendirilmesiyle, ilaç ve gıda gibi endüstrinin birçok alanında kullanılmak üzere doğal katkı maddelerinin elde edilmesine imkan sağlanmış olacaktır. Bugün batı

ülkelerinde kullanılan reçeteli ilaçların yaklaşık % 25'inin bitkisel kaynaklı olması, endüstrinin birçok alanında bu ürünlerin kullanım oranlarının giderek artması, sekonder metabolitlerin hayatımızda ne derece önemli bir paya sahip olduğunu gösterir niteliktedir.

Sekonder metabolitler doğada yetişen bitkilerden direkt olarak elde edilmektedir. Bitkiler ise içinde buldukları ekolojik koşullardan olumlu veya olumsuz olarak etkilenmektedir. Bu durum üretilen sekonder metabolitlerin aynı kalite ve standartta olmasını engellemektedir. Ayrıca bitkilerin doğadan bilinçsiz ve gereğinden fazla toplanarak iç ve dış piyasada pazarlanması, endüstride kullanılmak üzere sekonder metabolitlerin elde edilmesi gibi uygulamalar endemik türlerin tahrip edilmesine hatta yok olmasına sebep olmaktadır. Bu durumun devam etmesi halinde ülkemizin biyoçeşitliliğinin sürdürülebilirliği tehlikeye girecektir. Bitkisel gen kaynaklarımızın doğada tahrip edilmeden korunması, bitkilerin nesillerinin devam etmesi ve bu bitkiler üzerinde bilimsel çalışmaların yapılmasında doku kültürü uygulamaları önemli hale gelmiştir. Bitkilerin klasik yöntemlerle üretimi ve bu bitkilerden sekonder metabolitlerin elde edilmesi hücre kültürlerine göre oldukça masraflı ve zaman alıcıdır. Bu yüzden sekonder metabolit üretiminde doku kültürü teknikleri oldukça sık kullanılan bir yöntemdir.

Bu tekniklerden biri olan kallus kültürü, belirli kalitede ve standartlarda ürün elde edilmesi, genetik varyasyonun artırılması, ana bitkide olmayan yeni bileşiklerin eldesi, birim alandan ve sınırlı sayıdaki materyalden maksimum seviyede faydalanılması, açısından doku kültürü çalışmalarında oldukça sık başvurulan bir yöntemdir. Ayrıca, kallus kültürünün coğrafik, mevsimsel ve çevresel faktörlerden bağımsız olması, virüslerle bulaşık olmayan kallus hücrelerinin izole edilerek sekonder metabolitlerin üretilmesi gibi önemli avantajları vardır.

Doku kültürü yöntemleri kullanılarak ekonomik değeri olan bitkilerden şu an endüstrinin birçok alanında sekonder metabolit üretimi yapılmaktadır (Karuppusamy, 2009). Sekonder metabolitlerden bazıları ve in vitro kültürde üretim yöntemleri şu şekildedir.

Hücre süspansiyon kültürü kullanılarak üretimi yapılan fitokimyasallar; andrographolide, plumbagin, taxane slymarin, stilbene, gymnemic asit, ginseng,

paclitaxel, puerarindir ve withanolide-A (Thanh ve ark., 2005; Praveen ve Murthy, 2011; Xu ve ark., 2011; Sun ve ark., 2012; Chodiseti ve ark., 2013; Firouzi ve ark., 2013; Silja ve ark., 2014; Sara–Alsadat ve ark., 2015; Xu ve ark., 2015).

Kök tüyü kültürü kullanılarak üretimi yapılan fitokimyasallar; Atropin, kaffeik asit ve türevleri, azadirachtin, withanolide A, withanone ve tanshinonedur (Satdive ve ark., 2007; Gangopadhyay ve ark., 2011; Abbasi ve ark., 2012; Praveen ve Murthy, 2013; Sivanandhan ve ark., 2013; Arehzoo ve ark., 2015; Li ve ark., 2015a; Xiaolong ve ark., 2015; Zahra ve ark., 2015).

Hyoscyamine, saponin, sesquiterpenoid, scopolamine, withaferin A, cryptotanshinone fitokimyasallarının üretimi kök kültürü ile yapılırken (A Jungla ve ark., 2009), bacoside A, carnosol, hypericin, digitoxin, pseudohypericin, diterpenoid ve xanthotoxin üretimi sürgün kültürü ile gerçekleştirilir (Izabela ve ark., 2009; Naik ve ark., 2010; Sharma ve ark., 2013; Krac̃un–Kolarevic ve ark., 2015; Munish ve ark., 2015; Sharma ve ark., 2015a).

Steviol glycoside fitokimyasalının üretimi kallus kültürü ile yapılırken (Omer ve Bengi, 2013; Pratibha ve ark., 2015), vinblastine ve vincristine üretimi ise embriyo kültürü kullanılarak yapılmaktadır (Fatima ve ark., 2015).

Kullanım alanı bu kadar geniş ve pazar gücü oldukça yüksek olan bu ürünlerin artırılması hem ekonomik açıdan hem de bilimsel yönden büyük önem taşımaktadır. Söz konusu sekonder metabolitlerin elde edilmelerinde, bu bileşiklerin homojen ve yüksek saflıkta olmaları son derece önemli bir ölçüt olup, bu bakımdan hücre süspansiyon kültürleri büyük öneme sahiptir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Bitkilerin savunma mekanizmaları başlıca iki grup altında incelenmektedir. Bunlardan ilki bitkinin herhangi bir stres durumuna maruz kalmadan sahip olduğu korunma şeklindeki savunma durumu, diğeri ise bitkinin strese maruz kaldıktan sonraki savunma durumudur. Bitkilerin stres faktörlerine karşı aşırı hassasiyet sürecine girdiklerinde bir takım içsel sinyaller ilettikleri bilinmektedir. Bu sinyaller; salisilik asit, etilen ve jasmonatları içermektedir. Bu sinyal maddelerinin her birisi savunma mekanizmalarının başlatılmasında rol oynamaktadırlar (Hiraga ve ark., 2000).

Bir fitoaleksinin olan ve bitkinin aktif savunma mekanizmasını oluşturan jasmonik asit ile esteri olan metil jasmonatın tüm yüksek yapılı bitkilerde buldukları yakın

dönemlerde yapılan araştırmalarla tespit edilmiş olup, bitki metabolizmasında bu bileşiklerin önemli rol oynadıkları ortaya konulmuştur (Theis ve Lerdau, 2003).

Stres, özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerde kimyasal bileşiminin belirlenmesinde önemli bir faktördür. Bitkinin stres tepkisini engelleyici ya da teşvik edici olarak açığa çıkaran kimyasal reaksiyona elisitasyon denir. Bu reaksiyonu indükleyen uyarıcı veya sinyal karakterindeki biyotik ve abiyotik etmenlere ise elisitör denir. Elisitörler az miktarlarda canlı bir sisteme uygulanırsa fitokimyasalların biyosentezini indükler ve bitkilerin stresli bir ortamda adaptasyonunu geliştirir. Dolayısıyla elisitörler in vitro kültürlerde sekonder bileşiklerin üretimini arttırmak için pratik olarak kullanılan iyi bir stratejidir.

Biyotik ve Abiyotik olarak iki gruba ayrılırlar. Biyotik elisitörleri, biyolojik kaynaklı bitki hücre duvarlarından oluşan polisakkaritler (dextran, glukan, kitin, pektin ve selüloz) ve mikro organizmalar (maya ekstraktı, mantarlar ve bakteriler) oluşturur. Abiyotik elisitörler; biyolojik kökenli olmayan fiziksel, kimyasal ve hormonal faktörlerdir. Fiziksel elisitörler; ışık, ultraviyole ışık (UV, UV A, UV B ve UV C), osmotik (sorbitol, prolin ve polietilen glikol) stres, tuzluluk, kuraklık ve termal streştir.

Kimyasal elisitörleri; ağır metaller (alüminyum, bakır, civa, çinko, demir, gümüş, kadmiyum, kobalt, krom, kurşun, mangan, nikel), mineral tuzlar (fosfor, iyot, klorür, kükürt, magnezyum, potasyum, sodyum, vonadil sülfat), aroşidonik asit, linoleik asit, salisilik asit, sukroz, mannan ve zehirli gazlar (etilen, nitrit oksit, ozon) oluşturur. Hormonal elisitörler; jasmonatlar (jasmonik asit ve metil jasmonat), salisilik asit ve giberellik asitlerdir (Tumova ve ark., 2002; Commun ve ark., 2003; Oksman-Caldentey ve ark., 2004; Wu ve ark., 2007; Romero ve ark., 2009; Murthy ve ark., 2014; Li ve ark., 2016; Gehlot ve ark., 2017)

*Achillea* L. dünyada 100'den fazla tür ile temsil edilen Asteraceae familyasına ait bir cinstir. Anadolu'da "ayvadana, ayvadanası ve civanperçemi" olarak bilinen bu cins Türkiye'de 59 tür ile temsil edilir ve bunlardan 31'i endemiktir (Abdel-Rahman ve ark., 2015; Tabanca ve ark., 2016; Tuzlacı, 2011).

*Achillea gypsicola* kimyasal yapısında antikarsinojen bir bileşik bulunduran endemik bir türdür. Bitkinin uçucu yağında bulunan kamfor terpeni antimikrobiyal (antibakteriyal, antifungal, antiviral), antitüsif, antinosiseptif, antimitojenik ve

antikanserojen, kardiyovasküler gibi tıbbi etkilerinin yanında; pestisit yapımında, kozmetik yapımında, sanayide plastik yapımında ve pas önleyici kaplama olarak da kullanılmaktadır (Edris, 2007; Lin ve ark., 2007; Cheng ve ark., 2009; Zuccarini, 2009; Sherkheli ve ark., 2009; Abdel-Rahman ve ark., 2015). Kamfor bileşiğinin dünya pazarında ticaret hacmi yıllık 80-100 milyon dolar arasında olup bu terpenin elde edildiği asıl bitki kaynağı kamfor ağacı olarak bilinen ve uzak doğu ülkelerinde yetişen *Cinnamomum camphora* türüdür. Bu ağacın kimyasal yapısında yaklaşık % 68 civarında kamfor bileşiği bulunur (Frizzo ve ark., 2000). Bu ağaç türüne karşılık ülkemizde endemik bir tür olarak yetişen *Achillea gypsicola* türünde otsu formda olmasına rağmen bu oran % 40 civarındadır (Başer, 2016). Yapılan araştırmalar kamfor içeriği bakımından *Achillea gypsicola* türünün tıbbi ve aromatik amaçla kullanılan diğer bitkilere göre daha zengin bir tür olduğunu göstermektedir. Bu bitkilerden bazılarının kamfor içerikleri; % 0.6 (*Achillea filipendulina*), % 1.3 (*Achillea magnifica*) % 2.1 (*Achillea millefolium*), % 3,17 (*Achillea aleppica*), % 5.9 (*Achillea crithmifolia*), % 6.7 (*Achillea santolina*), % 7.1 (*Achillea tenuifolia*) % 8.6 (*Achillea biebersteinii*), % 15.92 (*Achillea tenuifolia*), % 16.6 (*Achillea wilhelmsii*), % 17.7 (*Achillea micrantha*), % 22.8 (*Achillea grandifolia*), % 23.21 (*Achillea magnifica*), % 24.36 (*Salvia officinalis*), % 26.6 (*Salvia aucheri* subsp. *blancoana*) % 32.65 (*Achillea cucullata*) olarak bulunmuştur (Pavlović ve ark., 2008; Smelcerovic ve ark., 2010; Toncer ve ark., 2010; Khiyari ve ark., 2014; Almadiy ve ark., 2016; Sampietro ve ark., 2016; Ahmadi-Dastgerdi ve ark., 2017; Ghasemi, 2017; Demirci ve ark., 2017). Yetiştirme süreleri de dikkate alındığında ağaç formu da dahil bitkiler aleminde *Achillea gypsicola* türünün kamfor içeriği bakımından ne derece zengin bir tür olduğu görülmektedir.

Kallus kültürleri kullanılarak sekonder metabolit birikiminin artırılması amaçlanan bu çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, *Achillea gypsicola* türünün tohumlarının in vitro koşullarda çimlendirme olanakları araştırılmıştır. İkinci aşamada, en iyi kallus oluşumu sağlayacak eksplant kaynağı (yaprak ve gövde), besi ortamı (MS ve B5) ve besi ortamına ilave edilecek hormon kombinasyonları değerlendirilmiştir. Üçüncü aşamada ise, hücre süspansiyon kültürlerine uygulanan abiyotik (ışık, gümüş nitrat, kadmiyum klorit, metil jasmonat, salisilik asit ve sorbitol) ve biyotik (kitosan

ve maya ekstraktı) elisitörlerin; toplam fenolik madde, flavonol, flavonol, antosiyanin ve kamfor miktarlarının değişimleri üzerine etkileri araştırılmıştır.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bitki doku kültürleri büyüme ve farklılaşmayı etkileyen koşulların araştırılması için idealdir ve doku kültürünün önemli uygulama alanlarından biri de sekonder metabolit üretiminin artırılmasıdır. Bitkilerin hücre, doku ve organ kültürleri çeşitli elisitörler tarafından oldukça yüksek seviyede (1 ila 2230 kat) indüklenebilirler (Giri ve Zaheer, 2016). Günümüzde çok sayıdaki biyotik ve abiyotik elisitörler hücre, doku ve organ kültürlerinde, tek tek ya da birbirleri ile kombine edilmiş şekilde, oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu konudaki güncel ve önemli çalışmalar aşağıda özetlenmektedir.

Linden ve Phisalaphong (2000), *Taxus canadensis* türünde sentezlenen ve kanser tedavisindeki kemoterapide kullanılan paklitaksel bileşiğinin birikimini artırmak için, 8 günlük hücre kültürlerine, farklı konsantrasyonlarda metil jasmonat ilave ettikleri çalışma sonunda; 0-200  $\mu$ M arasındaki metil jasmonat dozlarında paklitaksel birikiminde önemli artışların olduğunu, buna karşılık 200  $\mu$ M'dan fazla metil jasmonat uygulamalarında paklitaksel birikiminin durduğunu bildirmişlerdir.

Kuzovkina ve ark. (2001), Ballıbabagiller familyasına ait olan *Scutellaria baicalensis* türünde saçak kök kültürlerine elisitör olarak metil jasmonat ilave etmişler ve çalışma sonunda metil jasmonat'ın wogonin, baikalein ve baikalin gibi antioksidanların birikimini ortalama 2.3 kat artırdığını bildirmişlerdir.

*Lithospermum erythrorhizon* türünde shikonin biyosentezini artırmak için araştırmacılar hücre süspansiyon kültürlerine farklı ışık renkleri (kontrol-karanlık, beyaz, kırmızı, mavi ve yeşil) uygulamışlardır. Çalışma sonunda mavi ışığın shikonin biyosentezinde diğer renklerden daha etkin olduğunu tespit etmişlerdir (Yamamoto ve ark., 2002).

Bonfill ve ark. (2003), *Taxus media* türünde taxane diterpen birikimini artırmak için, hücre kültürlerine aroşidonik asit, metil jasmonat ve vonadil sülfat uygulamışlardır. Araştırma sonucunda taxane birikimi metil jasmonat uygulaması ile 3-12 kat, aroşidonik asit uygulaması ile 4 kat ve vonadil sülfat uygulaması ile 40 kat artırdıklarını bildirmişlerdir.

Kore ginsengi ya da Asya ginsengi olarak adlandırılan *Panax ginseng* türünde hücre duvarından ekstrakte edilen oligogalacturonic asit hücre süspansiyon kültürüne uygulandığında saponin içeriğini önemli artırdığı saptanmıştır (Hu ve ark., 2003).

*Plumbago rosea* türünde yapılan bir çalışmada, araştırmacılar hücre kültürlerine kitosan uygulamışlar ve çalışma sonunda kitosan uygulamasının plumbagin içeriğini önemli oranda artırdığı sonucuna ulaşmışlardır (Komaraiaha ve ark., 2003).

Wang ve ark. (2004), *Taxus chinensis* türü üzerine yaptıkları çalışmada, hücre kültürlerine *Fusarium oxysporum* inokulasyonunun taxol ve baccatin birikimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Elde edilen verilere göre, uygulama sonunda kontrol kültürüne oranla taxol birikiminin 0.011 mg/g'dan 0.14 mg/g'a çıktığını ve baccatin birikiminin de önemli derecede arttığını bildirmişlerdir.

Gala ve ark. (2005), *Arabidopsis thaliana* türü üzerine yaptıkları çalışmada, hücre kültürüne jasmonik asit ilavesinin  $\alpha$ -tokoferol birikimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Jasmonik asit uygulaması, başlangıç kültürüne oranla  $\alpha$  tokoferol miktarının % 66 gibi oldukça yüksek bir oranda artmasına yol açmıştır.

Komaraiaha ve ark. (2005), *Morinda citrifolia* türünde bulunan antrakınon aromatik bileşiğinin artırılması için hücre kültürlerine metil jasmonat, aroşidonik asit, linoleik asit, salisilik asit ve nitrit oksit uygulamalarında bulunmuşlardır. Yapılan uygulamalar sonunda, özellikle antrakınon birikiminin başlangıç kültürlerine göre, ortalama 2-5 kat arasında artış gösterdi tespit edilmiştir.

Ge ve Wu (2005), *Salvia miltiorrhiza*'da tanshinone terpen birikimini artırmak amacıyla 6 günlük kök tüyü hücre kültürlerine maya ve ağır metal ( $Ag^+$ ) elisitörü uygulamışlar ve uygulamadan 12 ve 24 saat sonra tanshinone birikimini incelemişlerdir. Ağır metal uygulamasından 12 saat sonra tanshinone terpen birikimi başlangıç kültürüne göre % 80 oranında artarken, maya elisitörünün 12-24 saatlik uygulamasının tanshinone miktarını 8-12 kat arasında artırdığı saptanmıştır.

Cheng ve ark. (2006), *Cistanche deserticola* bitkisinde hücre süspansiyon kültürleri ile yapmış oldukları çalışmada, feniletanoid glikozit birikimini artırmak için 10 günlük hücre kültürlerine kitosan elisitörleri eklemişlerdir. Araştırma sonunda feniletanoid glikozit birikiminin, kontrol kültürüne oranla, kitosan elisitörü uygulamasında, 3-4 kat ( $94.3-364.6 \text{ mg l}^{-1}$ ) daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve ark. (2006), *Ocimum basilicum* ile yaptıkları bir çalışmada, metil jasmonat'ın sekonder metabolitler üzerine etkilerini araştırmak amacıyla bu bitkide sentezlenen iki fenolik bileşiğin (rosmarinik asit ve kafeik asit) birikimindeki değişimi

incelemişlerdir. Metil jasmonatın, iki farklı konsantrasyonda (0.1 ve 0.5  $\mu\text{M}$ ) uygulandığı çalışmada, 0.5  $\mu\text{M}$  dozunun, 0.1  $\mu\text{M}$  dozuna oranla daha fazla rosmarinik asit ve kafeik asit (% 56 ve % 43, sırasıyla) birikimi sağladığını rapor etmişlerdir.

Shi ve ark. (2007), Çin'e ait geleneksel bir bitki olan *Salvia miltiorrhiza*'da kök tüyü kültürlerine tanshinone adı verilen terpeni artırmak için maya elisitörü ve sorbitol uygulamışlardır. Araştırmacılar, toplam tanshinone miktarının sorbitol ve maya elisitör uygulamaları ile birlikte 10 kat (1481.6-146.4  $\mu\text{g/g}$ ) arttığını bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2007), *Taxus chinensis* var. *Mairei*'da, süspansiyon kültürlerine mevastatin ve salisik asit uygulamışlar ve taxol birikimini incelemişlerdir. Salisilik asit uygulamasında 1.626 mg/g taxol birikimi gerçekleşirken, mevastatin uygulamasında 1.574 mg/g taxol birikiminin olduğu tespit edilmiştir.

Wu ve ark. (2007), *Echinacea purpurea* türünde chlorogenic ve cichoric birikiminin artırılması için hücre süspansiyon kültürlerine farklı ışıklandırma süreleri ile farklı sıcaklıklar uygulamışlardır. Işıklandırma süresi bakımından, en yüksek chlorogenic ve cichoric birikimi (sırasıyla 5.2-34.2 mg  $\text{g}^{-1}$ ) 3 saat ışık/21 saat karanlık koşullarda gerçekleşirken, sıcaklık uygulamasında en yüksek chlorogenic ve cichoric birikimi (sırasıyla 5.2-28.4 mg  $\text{g}^{-1}$ ) 20°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

Orlita ve ark. (2008), *Ruta graveolens* türünde yaptıkları çalışmada, kumarin ve furoquinolone alkaloidlerinin birikimini artırmak için, besi ortamına kitin ve kitosan uygulamışlardır. Çalışma sonunda, kitin uygulamasında kumarin birikiminin başlangıç kültürüne göre 3.3 kat, furoquinolone birikiminin 22.9 kat, kitosan uygulamasında ise kumarin biriminin 2.5 kat, furoquinolone birikiminin 14.6 kat arttığını bildirmişlerdir.

Prakash ve Srivastava (2008), *Azadirachta indica* türündeki çalışmalarında, bir biopestisit olan azadirachtin miktarını artırmak için, salisilik asit ve metil jasmonat elisitörlerini 8 günlük hücre süspansiyon kültürlerine uygulamışlardır. Uygulamalar neticesinde, azadirachtin miktarının kontrol (3.2 mg/g) kültüründen 5 kat (15.9 mg/g) daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. En yüksek azadirachtin miktarı 17.4 mg/g ile uygulamadan 48 saat sonra elde edilmiştir.

Ajungla ve ark. (2009), *Datura metel* L. türü üzerine yaptıkları çalışmada, kök kültürlerine biyotik (*Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Fusarium moniliforme* ve maya

ekstraktı) ve abiyotik (salisilik asit,  $AlCl_3$ ,  $CaCl_2$ ,  $NaCl$  ve  $Na_2SO_4$ ) elisitör ilavesinin hyoscyamine ve scopolamine birikimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, başlangıç kültürüne oranla en yüksek hyoscyamine (4.35 mg/g ka) ve scopolamine (0.28 mg/g ka) birikiminin salisilik asit uygulamasından elde edilmiştir. Ayrıca, maya ekstraktı uygulamasının da hyoscyamine (3.17 mg/g ka) ve scopolamine (0.16 mg/g ka) birikiminde etkin bir biyotik elisitör olduğunu bildirmişlerdir.

Roat ve Ramawat (2009), *Cayratia trifolia* L. üzerinde yaptıkları araştırmada 7 günlük hücre süspansiyon kültürlerine maya ekstraktı ve salisilik asit ilavesinin stilbene birikimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Uygulama sonunda, maya elisitörünün kontrol kültürüne oranla, stilbene birikimini  $1.829 \mu g l^{-1}$ 'den  $5.018 \mu g l^{-1}$ 'ye, salisilik asit elisitörünün de  $11.122 \mu g l^{-1}$ 'ye çıkardığını bildirmişlerdir.

Arora ve ark. (2010), *Cayratia trifolia* türü üzerinde yaptıkları bir çalışmada, hücre kültürlerine fenolik bir bileşik olan stilbene birikimini artırmak için, *Cuscuta reflexa* paraziti ekstraktı, salisilik asit ve sukroz elisitörleri ve bunların farklı kombinasyonlarını uygulamışlardır. Araştırma bulguları, stilbene birikiminin *Cuscuta reflexa* ekstraktı uygulamasında 8 kat ( $253.82-2140.45 \text{ mg l}^{-1}$ ), salisilik asit+sukroz uygulamasında yaklaşık 12 kat ( $448.2-5191.6 \text{ mg l}^{-1}$ ) ve cuscuta ekstraktı+salisilik asit+sukroz uygulamasında ise ( $448.2-6339 \text{ mg l}^{-1}$ ) yaklaşık 14 kat arttığını ortaya koymuştur.

Zhao ve ark. (2010a) tarafından, *Salvia miltiorrhiza* türünde, tanshinone birikimini artırmak için yapılan bir çalışmada; hücre kültürlerine metal iyonları ( $Co^{+2}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{+2}$ ) ve polisakkarit (maya ekstraktı ve kitosan) uygulamaları yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; en yüksek tanshinone birikimi metal iyonu uygulamasında  $Cd^{+2}$  elisitöründen ( $369.0 \mu g/g$ , 6.4 kat), polisakkarit uygulamasında ise maya elisitöründen ( $2011.4 \mu g/g$ , kontrole göre 34 kat daha fazla) elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Coste ve ark. (2011), *Hypericum hirsutum* ve *Hypericum maculatum* türlerinde yaptıkları çalışmada, sürgün kültürüne salisilik asit ve metil jasmonat uygulamalarının hypericin ve hyperforin birikimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, *Hypericum hirsutum* türünde hypericin biyosentezinde salisilik asit uygulamasının, *Hypericum maculatum* türünde hyperforin birikiminde metil jasmonat uygulamasının daha etkin olduğunu bildirmişlerdir.

Gao ve ark. (2011), *Euphorbia pekinensis* türünde yaptıkları çalışmada hücre süspansiyon kültürlerine elisitör (*Fusarium* sp.) uygulamalarının isoeuphpekinensin ve euphol birikimi üzerine etkilerini araştırmışlar ve neticede isoeuphpekinensin (5.81 kat) ve euphol (3.56 kat) birikiminin başlangıç kültürüne oranla çok önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir.

*Mentha piperita* L. ve *Mentha arvensis* L. türlerinde rosmarinik asit birikiminin artırılması için yapılan bir çalışmada besi ortamlarına ilave edilen (Tyr) ve phenylalanine (Phe) elisitörlerinin etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda rosmarinik asit birikimini tyrosine'in 1.77 kat, phenylalanine'nin ise 2.03 kat artırdığı bildirilmiştir (Roy ve Mukhopadhyay, 2012).

Hong ve ark. (2012), *Hyoscyamus niger* türünde yaptıkları çalışmada, kök kültürlerine farklı (kontrol, 0.5, 1, 2 ve 3 g/l) dozlarda maya ekstraktı uygulamışlardır. Araştırma sonunda kontrol grubuna göre en yüksek (13.26 mg/g ka) hyoscyamine ve scopolamine (30.40 mg/g ka) birikiminin 0.5 g/l maya elisitörü uygulamasından elde edildiğini bildirmişlerdir.

Sımic ve ark. (2012), *Hypericum perforatum* L. türünde fenolik bileşikler, flavanol, flavonol, antosiyanin ve hiperisin birikimini artırmak amacıyla hücre süspansiyon kültürüne *Aspergillus flavus* mantarından alınan mycelia elisitörü uygulamışlardır. Uygulama sonunda fenolik bileşiklerin, flavanollerin ve falavonollerin birikimi kontrol kültürlerine göre belirgin bir şekilde azalmıştır. Hiperisin birikiminde 7. günden itibaren çok az artışlar görülürken, antosiyanin birikiminde 2-3 kat arasında artışlar olmuştur.

Cai ve ark. (2013) tarafından *Vitis vinifera* türünde yürütülen bir çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerine ağır metal ( $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$  ve  $\text{Cd}^{+2}$ ) iyonları uygulamıştır. Araştırma sonunda resveratrol birikimi başlangıç kültürlerine göre  $\text{Co}^{+2}$  uygulamasında 152.4  $\mu\text{mol/g}$ 'dan 216.8  $\mu\text{mol/g}$ 'a,  $\text{Ag}^+$  uygulamasında 152.4  $\mu\text{mol/g}$ 'dan 233  $\mu\text{mol/g}$ 'a ve  $\text{Cd}^{+2}$  uygulamasında ise 152.4  $\mu\text{mol/g}$ 'dan 250.5  $\mu\text{mol/g}$ 'a çıktığını bildirmişlerdir.

Patil ve ark. (2013), *Digitalis purpurea* türünde yaptıkları çalışmada, kültür ortamlarına salisilik asit, mannitol, sorbitol ve KCl elisitörleri uygulamışlardır. Çalışma sonunda digitoxin birikiminin başlangıç kültürlerine göre salisilik asit

uygulamasında 53.6 µg/g'dan 117.6 µg/g'a, mannitol uygulamasında 140.1 µg/g'a, sorbitol uygulamasında 186.1 µg/g'a ve KCl uygulamasında ise 413.6 µg/g'a çıktığını bildirmişlerdir.

Yamaner ve ark. (2013), *Hypericum adenotrichum* türünde in vitro koşullarda, hiperisin ve psödohiperisin birikimini artırmak için hücre kültürlerine 0, 10, 50 ve 100 mg/l mannan ve 0, 10, 50 ve 100 mg/l pektin elisitörlerini uygulamışlardır. Çalışma sonunda, 50 mg/l mannan uygulamasının, psödohiperisin birikimini 2.8 kat ve hiperisin birikimini 1.7 kat artırdığını, 50 mg/l pektin uygulamasının psödohiperisin birikimini 4.8 kat ve hiperisin birikimini 2.7 kat artırdığını bildirmişlerdir.

Ahmed ve Baig (2014) tarafından *Psoralea corylifolia* L. türünde yapılan bir çalışmada hücre süspansiyon kültürlerine biyotik (*Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, maya ekstraktı ve kitosan) elisitör uygulamalarının psoralen birikimine etkileri incelenmiştir. Araştırma sonunda, kontrol kültüründe 945 µg/g olan psoralen biyosentezinin *Aspergillus niger* uygulamasında 8634 µg/g'a, *Penicillium notatum* uygulamasında 5812 µg/g'a, maya ekstraktı uygulamasında 1743 µg/g'a ve kitosan uygulamasında ise 7982 µg/g'a çıktığını bildirmişlerdir.

Gadzovska ve ark. (2014), *Hypericum perforatum* L. türünde yapmış oldukları çalışmada, sürgün kültürlerine uygulanan bazı polisakkarit (pektin, kitin ve kitosan) elisitörlerin fenolik madde ve flavonoid birikimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, fenolik madde biyosentezinin başlangıç kültürüne oranla, 9 mg/g'dan 17 mg/g'a, buna karşılık flavonoid biyosentezinin 1.6 mg/g'dan 2.8 mg/g'a çıktığını bildirmişlerdir.

Gupta ve ark. (2014), *Stevia rebaudiana*'da steviol glycoside birikimini artırmak için süspansiyon ve kallus kültürlerine tuz (NaCl ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) elisitörleri uygulamışlardır. Elde edilen bulgulara göre, süspansiyon kültürlerine tuz uygulaması, kontrol kültürüne göre steviol glycoside birikimini azaltmış, kallus kültürlerinde steviol glycoside birikimi NaCl uygulaması ile % 0.27'den, % 1.57'ye çıkmış fakat Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> uygulamasında ise steviol glycoside birikiminde yine bir azalma gerçekleşmiş olduğu belirlemişlerdir.

*Melissa officinalis* türünde, Nasiri-Bezenjani ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, rosmarinik asit birikiminin artırılması için, araştırmacılar kültür ortamlarına

farklı (% 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1) dozlarda maya ekstraktı ilave etmişlerdir. Araştırmacılar, maya dozlarının rosmarinik birikimini etkilediğini, % 0.1'lik uygulamada başlangıç kültürüne göre rosmarinik asit birikiminin 43 kat arttığını bildirmişlerdir.

Silja ve ark. (2014), *Plumbago rosea* L. türünde plumbagin biyosentezini artırmak için yaptıkları çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerine farklı dozlarda (0, 50, 100 ve 200 µM) jasmonik asit uygulamışlardır. Bu çalışmada, 50 µM jasmonik asit uygulamasıyla plumbagin biyosentezi 6. günde başlangıç kültürüne oranla 4.95 kat artmıştır.

Skrzypczak-Pietraszek ve ark. (2014), *Exacum affine* türünde fenolik asit birikimini artırmak için, besi ortamlarına aynı anda phenylalanine (Phe) ve metil jasmonat uygulamışlardır. Birlikte yapılan uygulamaların synapik asit miktarını 9.7 kat, kumarik asit miktarını 9.4 kat, kafeik asit miktarını 7.2 kat, vanillik asit miktarını 5.8 kat ve klorojenik asit miktarını ise 6 kat artırdıkları araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Tahsili ve ark. (2014) tarafından Keten (*Linum album*)'de yürütülen bir çalışmada hücre kültürlerine biyotik (*Fusarium graminearum*) elisitör uygulanmış ve bazı biyoaktif bileşiklerin (fenolik madde, flavonoid ve flavonol) birikimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonunda, başlangıç kültürüne göre fenolik madde, flavonoid ve flavonol birikiminde, uygulamadan 7, 5 ve 3 gün sonra, en yüksek değerlere (sırasıyla 0.9, 0.09 ve 0.08 mg/g) ulaşıldığı rapor edilmiştir.

Jalalpour ve ark. (2014), *Taxus baccata* türünde fenolik madde ve flavonoid birikimini teşvik için, hücre süspansiyon kültürüne metil jasmonat ve squalestatin uygulamışlar ve çalışma sonunda her iki uygulamanın da fenolik madde ve flavonoid birikimini önemli oranda artırdığını belirlemişlerdir.

Qin ve ark. (2014), *Anisodus luridus* türünde yaptıkları çalışmada, kök tüyü kültürlerine abiyotik (UV B ve asetilsalisilik asit) elisitör uygulamalarının tropane alkaloidinin birikimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Elde edilen bulgulara göre, asetilsalisilik asit uygulamasının tropane birikimini başlangıç kültürüne oranla önemli ölçüde (6.2 kat) arttığı, buna karşılık ultraviyole B ışınının tropane birikimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Xing ve ark. (2014), *Salvia miltiorrhiza*'da fenolik asit birikimini artırmak için kök tüyü kültürlerine gümüş iyonu ( $Ag^+$ ) uygulamışlardır. Araştırma sonunda kontrol grubuna göre rosmarinik asit, kafeik asit ve ferulik asit miktarının arttığını buna karşılık salvianolik asit, danshensu ve cinnamik asit miktarının ise azaldığını bildirmişlerdir.

Ali ve ark. (2015) tarafından *Artemisia absinthium* L. türünde yapılan bir çalışmada hücre süspansiyon kültürlerine ilave edilen farklı dozlardaki (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) metil jasmonat, jasmonik asit ve  $GA_3$  elisitörlerin fenolik madde ve flavanoid miktarına etkileri çalışılmıştır. İncelenen elisitörler arasında en etkili konsantrasyonun bütün elisitörler için 1.0 mg/l olduğu ve ayrıca fenolik madde ve flavanoid birikiminin en fazla 21 ila 24. günler arasında gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır.

Gymnemic asit biyosentezinin artırılması için *Gymnema sylvestre* türünde yapılan bir çalışmada, Chodisetti ve ark. (2015) tarafından hücre süspansiyon kültürlerine metil jasmonat ve salisilik asit elisitörleri uygulanmıştır. Metil jasmonat uygulamasında 72 ve salisilik asit uygulamasından 48 saat sonra gymnemic asit biyosentezinin sırasıyla  $135.41 \text{ mg g}^{-1}$  ve  $43.27 \text{ mg g}^{-1}$  değerlerine ulaştığı bildirilmiştir.

Gingerol-6 biyosentezinin artırılması için, *Zingiber officinale* türünde yapılan bir başka çalışmada ise kallus kültürlerine abiyotik elisitör olarak mevalonic asit (MVA), phenylalanine (Phe), Leucine (Leu) ve valine (Val) ve biyotik elisitör olarak maya ekstraktı ve *Aspergillus niger* uygulanmıştır. Araştırma sonunda abiyotik elisitörlerden mevalonic asit'in gingerol-6 biyosentezini teşvik ettiği buna karşılık diğer elisitörlerin herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca maya ekstraktı ve *Aspergillus niger* gibi biyotik elisitörlerin de gingerol-6 biyosentezini teşvik edici etkilerinin olduğu belirlenmiştir (El-Nabarawy ve ark., 2015).

Taurino ve ark. (2015), *Vitis vinifera*'da hücre süspansiyon kültürlerine kitosan elisitörü uygulamışlar ve en yüksek resveratrol birikimini  $320 \mu\text{g/g}$  ile uygulamadan 144 saat sonra elde etmişlerdir.

Bacoside biyosentezinin artırılması amacıyla, *Bacopa monnieri* türünde yürütülen bir çalışmada sürgün kültürlerine jasmonik asit ve bakır sülfat ( $CuSO_4$ ) elisitörleri



uygulanmıştır. Araştırmada, maksimum bacoside biyosentezinin (8.73 mg/g ka) 45 mg/l CuSO<sub>4</sub> uygulamasından elde edildiği rapor edilmiştir (Sharma ve ark., 2015b).

*Hypericum perforatum* türünde, Sonja ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada hücre süspansiyon kültürlerine polisakkarit (kitin, pektin ve dextran) uygulamaları yapılmış ve kontrol kültürüyle karşılaştırıldığında, çalışma sonunda fenilpropanoid ve naptodianthrone birikiminin önemli ölçüde artırıldığı belirlenmiştir.

Meier ve ark. (2015), furanocoumarin birikimini artırmak için, *Conium maculatum* L. türünde yaptıkları çalışmada hücre kültürlerine bazı elisitörler (alginic asit, sellülaz, kitosan ve bakır sülfat) uygulamışlardır. Araştırma sonunda başlangıç kültüründe hiçbir furanocoumarin bileşenine rastlanmamış olmasına karşılık, sellülaz elisitöründe isopimpinellin, columbianetin ve bergapten; alginic asit elisitöründe ise psoralen, xanthotoxin ve bergapten bileşenlerinin sentezlendiği belirlenmiştir. Benzer şekilde kitosan elisitöründe; oroselone, psoralen, xanthotoxin marmesin ve bergapten'in sentezlendiği görülmüştür. Bakır sülfat elisitöründe ise; isopimpinellin, columbianetin ve xanthotoxin furanocoumarinlerinin sentezlendiği görülmüştür.

*Melissa officinalis* L. türünde sürgün kültürü ile rosmarinik asit biyosentezinin teşvik edilmesi için yapılan bir çalışmada (Tonelli ve ark., 2015), araştırmacılar kültür ortamına ozon (200 ppb, 3 saat) gazı uygulamışlar ve araştırma sonucunda rosmarinik asit biyosentezini başlangıç kültürüne oranla 4 kat artırdıklarını bildirmişlerdir.

*Perovskia abrotanoides* türünde tanshinone birikimini artırmak için, Zaker ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada araştırmacılar kök kültürlerine gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>), maya ekstraktı ve sorbitol uygulamışlardır. Kontrol kültüründe 122.06 µg/g olan tanshinone miktarı gümüş nitrat uygulamasıyla 363.93 µg/g'a, maya elisitör uygulamasıyla 443.62 µg/g'a ve sorbitol uygulamasıyla da 226.18 µg/g'a çıktığını bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2015) tarafından, *Hypericum perforatum* türünde flavonoid birikimini artırmak için, hücre süspansiyon kültürlerine metil jasmonat (MeJA), salsilik asit (SA), amonyum metavanadat (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>) ve nikel sülfat (NiSO<sub>4</sub>) uygulaması yapılmıştır. Araştırma sonucunda; metil jasmonat, salsilik asit ve amonyum metavanadat elisitörlerinin kontrol grubuna göre flavonol birikimini önemli ölçüde artırdığı, nikel sülfat elisitörü ise flavonol birikimini azaltıcı yönde etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Anusha ve ark. (2016) tarafından *Celastrus paniculatus* türünde yapılan bir çalışmada toplam fenolik madde miktarını artırmak için hücre süspansiyon kültürlerine metil jasmonat (MeJA), salisilik asit (SA) ve bakır sülfat ilave edilmiştir. Uygulamadan 72 saat sonra metil jasmonat ve salisilik asit elisitörlerinin toplam fenolik madde miktarını sırasıyla 9.30 µg/g'dan 106.82 µg/g'a ve 6.26 µg/g'dan 99.23 µg/g'a çıkardığı rapor edilmiştir. Diğer taraftan, bakır sülfat elisitörü uygulamadan 24 saat sonra toplam fenolik madde miktarını 6.77 µg/g'dan 96.30 µg/g'a yükseltmiştir.

Hyoscyamine alkaloidinin birikiminin artırılması için, *Hyoscyamus muticus* türünde yapılan bir çalışmada (Bosila ve ark., 2016), araştırmacılar kallus kültürlerine maya ekstraktı ve phenylalanine elisitörleri uygulamışlardır. Araştırmada, maya elisitörünün alkaloid birikimine olumsuz etkide bulunduğu, phenylalanine elisitörünün ise alkaloid miktarını 1.60 mg/g'dan 3.01 mg/g'a çıkardığı rapor edilmiştir.

Deepthi ve ark. (2016), camptothecin birikiminin artırılması için *Ophiorrhiza mungos* L. türünde yaptıkları çalışmalarında, hücre süspansiyon kültürlerine gümüş nitrat ve maya ekstraktı elisitörleri uygulamışlardır. Neticede, maya elisitörünün gümüş nitrate göre camptothecin birikiminde daha etkili olduğu ve 50 mg/l maya ekstraktının başlangıç kültürüne oranla camptothecin birikimini 13.3 kat artırdığı görülmüştür.

Fazal ve ark. (2016a) tarafından yara otu (*Prunella vulgaris* L.) üzerinde yapılan bir çalışmada, araştırmacılar hücre süspansiyon kültürlerine elisitör olarak sukroz (5–50 g/l), pH (5-6) ve farklı karanlık/aydınlık rejimleri uygulamışlar ve bunların sekonder metabolit (fenolik bileşik ve flavonoid) birikimine etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonunda sukroz uygulamalarından 20–25 g/l dozlarının, pH uygulamalarından 5.3'ün ve farklı ışık rejimleri arasından ise 16 saat karanlık/8 saat aydınlık uygulamasının fenolik bileşik ve flavonoid birikimi açısından daha olumlu olduğu belirlenmiştir.

Gabr ve ark. (2016), *Milk thistle* türünde fenolik madde ve silymarin birikimini artırmak için kök tüyü kültürlerine salisilik asit ve kitosan uygulamışlardır. Elde edilen bulgular, fenolik madde birikiminin başlangıç kültürüne göre her iki uygulamada da azaldığını, silymarin birikiminin salisilik asit uygulamasında 3.70 µg/g'dan 11.24 µg/g'a, kitosan uygulamasında ise 5.77 µg/g'a çıktığını bildirmişlerdir.

Khan ve ark. (2016) tarafından *Fagonia indica* üzerinde yapılan bir çalışmada kallus (gövde ve yaprak) kültürlerine farklı dozlarda (0, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/l) TDZ elisitörü

uygulanarak, bunların fenolik madde ve flavonoid birikimi üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırma bulguları, 1 mg/l TDZ uygulamasının fenolik madde ve flavonoid birikimini önemli ölçüde artırdığını ve gövdeden elde edilen kalluslarda yaprağa oranla daha fazla fenolik madde ve flavonoid birikimi olduğunu ortaya koymuştur.

Khojasteh ve ark. (2016), rosmarinik ve kafeik asit birikimini artırmak için *Satureja khuzistanica* türü hücre kültürlerine cyclodextrin ve metil jasmonat ilave etmişlerdir. Araştırmacılar, cyclodextrin'in rosmarinik ve kafeik asit birikimine hiçbir etkisinin olmadığını, buna karşılık metil jasmonat'ın ise rosmarinik ve kafeik asit birikimini artırdığını rapor etmişlerdir.

Kumar ve ark. (2016) tarafından *Lantana camara* L. türünde yapılan bir çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerine *Piriformospora indica* elisitörü uygulanmış ve bunun pentacyclic birikimine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonunda, pentacyclic birikiminin kontrol kültürüne göre 16.9 kat artarak, 5412.02 µg/g'a çıktığı bildirilmiştir.

Kümmritz ve ark. (2016), *Salvia fruticosa* üzerinde yaptıkları çalışmalarında fungal elisitörlerden *Aspergillus niger* ve *Trichoderma virens*'i hücre süspansiyon kültürlerine uygulamışlardır. Araştırmacılar, triterpen birikimini *Aspergillus niger* uygulamasında % 57 ve *Trichoderma virens* uygulamasında % 90 oranında artırdıklarını bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2016) tarafından *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* bitkisinde tanshinone II-a birikimini artırmak için, kök tüyü kültürlerine gümüş iyonu ve maya ekstraktı uygulanmış ve çalışma sonunda gümüş iyonu uygulamasının tanshinone II a birikimini kontrole göre 1.8 kat, maya uygulamasının ise 2.77 kat artırdığı tespit edilmiştir.

Naikawadi ve ark. (2016), *Evolvulus alsinoides* L. türünde in vitro koşullarda scopoletin birikimine biyotik (*Aspergillus niger*, *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp. ve maya ekstraktı) elisitörlerin etkisini incelemişlerdir. Biyotik elisitörlerin tamamının başlangıç kültürüne göre scopoletin birikimini önemli oranda artırdığı tespit edilmiştir. Özellikle maya ekstraktı uygulamasının diğer uygulamalara göre daha etkin olduğu, başlangıç kültürüne oranla 57.98 kat daha fazla scopoletin birikimi sağladığı rapor edilmiştir.

Ooi ve ark. (2016) tarafından *Solanum mammosum*'da metil jasmonat, kolesterol ve arginine elisitörlerinin solasodine birikimine etkisi incelenmiştir. Bu elisitörlerin tek tek kullanılması yerine birlikte denendiği uygulamalarda (100 mM kolesterol+1000 µM arginine+300 µM MeJA) solasodine birikiminin başlangıç kültürüne göre 5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Ebu Cehil otu (*Calligonum polygonoides* L.) bitkisinde yürütülen bir çalışmada, araştırmacılar hücre süspansiyon kültürlerine maya ekstraktı ve salisilik asit uygulamış ve fenolik madde birikimine etkilerini incelemişlerdir (Owis ve ark., 2016). Diğer bulgulara benzer şekilde, araştırma sonunda maya ve salisilik asit uygulamalarının kontrol kültürüne göre astragalin ve catechin birikimini artırdığı tespit edilmiştir. Elisitör kullanımının kontrol kültüründe olmayan quercetin, gallic asit, kaempferol ve taxifolin gibi bileşiklerin birikimini de teşvik ettiği belirlenmiştir.

Park ve ark. (2016), *Agastache rugosa* türünde yaptıkları çalışmada hücre kültürlerine maya ekstraktı ve gümüş nitrat uygulamışlar ve maya ekstraktı uygulamasıyla rosmarinik asit birikiminin başlangıç kültürüne göre 2.86 kat, gümüş nitrat uygulaması sonucunda ise 52.31 kat arttığını tespit etmişlerdir.

Perassolo ve ark. (2016) tarafından *Morinda citrifolia* ve *Rubia tinctorum* türlerinde anthraquinone birikimini artırmak için hücre süspansiyon kültürlerine metil jasmonat ve cyclodextrin elisitörleri birlikte uygulanmış ve çalışma sonunda *Morinda citrifolia* türünde anthraquinone birikiminin, *Rubia tinctorum* türüne göre çok daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Rosmarinik asit ve biyokütle birikiminin artırılması için *Satureja khuzistanica* türünde Sahraroo ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, araştırmacılar farklı dozlarda KNO<sub>3</sub> ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nitrojen kaynaklarını hücre süspansiyon kültürlerine birlikte ilave etmişlerdir. Uygulama sonunda, rosmarinik asit ve biyokütle miktarının 21. günde maksimum değerlere (sırasıyla 180 mg/g, 19.7 g/l) ulaştığı bildirilmiştir.

Sukito ve Tachibana (2016), *Ginkgo biloba* türünde yaptıkları çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerine farklı kombinasyonlarda metil jasmonat ve salisilik asit uygulaması yapmışlardır. Çalışma sonunda; 0.1 mM MeJA+0.1 mM SA uygulamasının başlangıç kültürüne göre bilobalide birikimini 1.78 kat, ginkgolide A, B, ve C birikimini ise sırasıyla 1.95, 2.05 ve 2.95 kat artırdığını bildirmişlerdir.

Ru ve ark. (2016) tarafından *Prunella vulgaris* L. türünde rosmarinik asit birikimini artırmak için yapılan bir çalışmada, kök tüyü kültürlerine ethephon ve salisilik asit elisitörleri uygulanmıştır. Araştırmacılar, ethephon elisitörünün rosmarinik asit birikimini 1.66 kat, salisilik asit elisitörünün ise 1.48 kat artırdığını rapor etmişlerdir.

Thiruvengadam ve ark. (2016), *Polygonum multiflorum*'da yaptıkları çalışmada hücre süspansiyon kültürlerine elisitör olarak jasmonik asit (0, 50, 100 ve 150  $\mu$ M) ve salisilik asit (0, 50, 100 ve 150  $\mu$ M) uygulaması yaparak, bunların anthraquinone birikimine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda araştırmacılar, jasmonik ve salisilik asit elisitörlerinin 100  $\mu$ M'lık uygulamalarında, anthraquinone birikiminin çok daha etkin olduğunu ve başlangıç kültürüne oranla 4 kat artış tespit edildiğini rapor etmişlerdir.

*Dendrobium candidum* türünde yapılan bir çalışmada, kültür ortamına farklı dozlarda (25, 50, 75, 100 ve 125  $\mu$ M) metil jasmonat ve salisilik asit ilave edilmiş ve sekonder metabolit sentezinde artışlar tespit edilmiştir. Metil jasmonat uygulamasının 75  $\mu$ M dozunda alkaloid ve flavonoid miktarı artarken, fenolik madde birikiminde 100  $\mu$ M doz ile artış olmuştur. Salisilik asit uygulamasında 75  $\mu$ M'lık doz alkaloid miktarını, 100  $\mu$ M'lık doz ise flavonoid ve fenolik madde birikimini artırdığı rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2016).

Wu ve ark. (2016), *Salvia miltiorrhiza*'da kallus (gövde ve yaprak) kültürlerinde rosmarinik asit ve salvianolik asit B biyosentezini araştırmışlardır. Çalışma sonunda gövdeden elde edilen kalluslarda rosmarinik asit ve salvianolik asit B biyosentezinin sırasıyla % 1.27 ve % 0.87 buna karşılık yapraktan elde edilen kalluslarda ise % 0.28 ve % 0.07 olduğunu bildirmişlerdir.

*Jatropha curcas* türünde, triterpen ve biyokütle birikiminin artırılması için yapılan bir çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerine farklı dozlarda (0, 200 ve 400  $\mu$ M) jasmonik asit uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonunda 200  $\mu$ M'lık jasmonik asit uygulamasının kontrol kültürüne göre triterpen miktarını 495.62  $\mu$ g/g'dan 1185.01  $\mu$ g/g'a, biyokütle miktarını ise 10.82 g/l'den 12.56 g/l'ye çıkardığı bildirilmiştir (Zaragoza-Martínez ve ark., 2016).

Withanolide birikiminin artırılması için *Withania somnifera* türünde, Ahlawat ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerine bazı fungal

(*Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae* ve *Piriformospora indica*) elisitörler uygulanmıştır. Çalışma sonunda fungal elisitörlerin tamamının withanolide birikimini teşvik ettiği, *Piriformospora indica* elisitörünün withanolide A ve withanone birikiminde diğer elisitörlerden daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Al Khateeb ve ark. (2017), *Rumex cyprius* türünde yaptıkları bir çalışmada, hücre kültürlerine fenolik bileşiklerin birikimini artırmak için maya ekstraktı, mannitol, kitosan ve tuz uygulaması yapmışlardır. Maya ekstraktı ve tuz uygulamalarının başlangıç kültürüne göre kafeik asit, syringic asit, sinapic asit, rutin, hesperidin, rosmarinik asit, quercetin, luteolin ve epicatechin birikimini artırdığını, ancak mannitol ve kitosan uygulamalarının herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

*Lavandula angustifolia* türünde yapılan bir çalışmada, araştırmacılar kültür ortamına ilave ettikleri jasmonik asit elisitörünün uçucu yağ bileşenlerine etkisini incelemişlerdir (Andrys ve ark., 2017). Çalışma sonunda jasmonik asit uygulamasının uçucu yağ bileşenlerinde çok önemli artışlara yol açtığı tespit edilmiştir. Çalışmada,  $\sigma$ -cadinene % 17.06'dan-29.64'e, borneol % 6.66'dan-17.47'ye, caryophyllene oxide % 8.30'dan-14.01'e,  $\tau$ -cadinol % 4.87'den-9.16'ya, beta-caryophyllene % 3.54'den-6.57'ye, 1.8-cineole % 1.94'den-5.87'ye,  $\beta$ -pinene % 1.48'den-3.05'e, geranyl acetate % 0.56'dan-2.14'e ve myrtenal % 0.65'den-2.14'e yükselmiş olduğu saptanmıştır.

Anjum ve ark. (2017), keten *Linum usitatissimum* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada hücre kültürlerine elisitör olarak farklı ışıklandırma süresi ve UV C uygulamaları ve biyoaktif bileşenleri (lignan ve neolignan, fenolik madde ve flavonoid) birikimine olan etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda ultraviyole C ışığının lignan, neolignan, fenolik madde ve flavonoid birikimini, ışıklandırma süresi uygulamasına göre daha fazla artırdığını, UV C (3.6 kJ/m<sup>2</sup>)+ışıklandırma süresi (16 saat karanlık/8 saat ışık) birlikte uygulamasında en yüksek lignan ve neolignan birikiminin elde edildiğini bildirmişlerdir.

*Gynochthodes umbellata* türünde kallus (boğum arası ve yaprak) kültürleriyle anthraquinone biyosentezinin teşvik edilmesi için yapılan bir çalışmada, araştırmacılar kültür ortamına farklı oksin (2,4-D, IBA, IAA ve NAA) hormonları uygulamışlardır.

Çalışmada, en yüksek (18.1875 mg/g ka) anthraquinone biyosentezi 2,4-D kullanılan uygulamadan elde edildiği rapor edilmiştir (Anjusha ve Gangaprasad, 2017).

Chung ve ark. (2017), *Momordica dioica* türünde biyokütle, toplam fenolik madde ve flavonoid birikimini artırmak için hücre kültürlerine farklı dozlarda (0, 25, 50, 100 ve 150 µM) metil jasmonat ve salisilik asit uygulamaları yapmışlardır. Her iki uygulamada da 100 µM'lık dozlarda biyokütle artışının kontrol kültürüne göre önemli ölçüde daha fazla olduğu, toplam fenolik madde ve flavonoid birikiminde metil jasmonat uygulamasının salisilik asit uygulamasına göre daha etkin olduğunu bildirilmiştir.

Deepthi ve Satheeshkumar (2017) tarafından *Ophiorrhiza mungos* L. türünde yapılan bir çalışmada hücre süspansiyon kültürlerine camptothecin miktarını artırmak için salisilik asit, kitin ve jasmonik asit uygulaması yapılmıştır. Araştırmacılar, deneme sonunda elisitörlerin tamamının başlangıç kültürüne göre camptothecin miktarını önemli ölçüde artırdığını, metil jasmonat uygulamasında ise en yüksek camptothecin (0.08 mg g/l'den 1.12 mg g/l, 14 kat artış) birikiminin elde edildiğini bildirmişlerdir.

Rosmarinik asit, toplam fenol ve toplam flavonoid birikiminin artırılması için *Salvia virgata* türünde yapılan bir çalışmada, araştırmacılar hücre kültürlerine Ag<sup>+</sup> iyonu, metil jasmonat ve maya ekstraktı uygulamışlardır (Dowom ve ark., 2017). Çalışma sonunda elisitörlerin tamamının rosmarinik asit, toplam fenol ve toplam flavonoid birikimini kontrol grubuna göre 2-4 kat arasında artırdığını tespit edilmiştir.

*Betula pendula* türünde, Hajati ve ark. (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada ise, araştırmacılar hücre kültürlerine metil jasmonat ve salisilik asit uygulamışlar ve sekonder metabolit (betunilik asit ve betulin) birikimine etkilerini incelemişlerdir. Elde edilen bulgular, betunilik asit birikiminde salisilik asit uygulamasının, betulin birikiminde ise metil jasmonat uygulamasının daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Biyokütle ve benzyl isothiocyanate birikiminin artırılması için *Salvadora persica* L. türünde yapılan bir çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerine kitosan ve salisilik asit elisitörleri uygulanmıştır. Araştırmadan elde edilen bulgular, kitosan uygulamasının biyokütle miktarını 4.521 g'dan 5.7 g'a, benzyl isothiocyanate miktarını 1.239 µg/g'dan 4.534 µg/g'a çıkardığını ortaya koymuştur. Ayrıca, salisilik asit uygulaması

biyokütle miktarını 4.521 g'dan 5.196 g'a, benzyl isothiocyanate miktarını ise 1.239 µg/g'dan 1.690 µg/g'a çıkardığı rapor edilmiştir (Hegazi, 2017).

Hidalgo ve ark. (2017), Gotu kola (*Centella asiatica*)'da yaptıkları çalışmada hücre kültürlerine elisitör olarak metil jasmonat ve coronatinene uygulamışlar ve bunların centelloside triterpenoidlerinin birikimine etkilerini araştırmışlardır. Metil jasmonat elisitörünün uygulamadan 18 gün sonra centelloside biyosentezini 5.8 (134 µg/g ka) kat, coronatinene elisitörünün ise 5.2 kat artırdığını bildirmişlerdir.

Inácio ve ark. (2017) tarafından quinonemethide (maytenin ve 22β-hydroxy-maytenin) birikimini artırmak için *Peritassa campestris* türünde yapılan çalışmada kök kültürüne bakteriyel (*Bacillus megaterium*) elisitör uygulanmıştır. Çalışma sonunda maytenin biyosentezinin başlangıç kültürüne göre 372.65 µg/g (2.31 kat)'a çıktığını fakat 22β-hydroxy-maytenin ise 372.65 µg/g (yaklaşık 3 kat)'a çıktığını bildirmişlerdir.

*Nothapodytes nimmoniana* türünde yaptığı çalışmasında Isah (2017), kallus kültürüne maya ekstraktı ve vanadyl sülfat elisitörleri uygulamış ve camptothecin ile biyokütle birikimine etkilerini incelemiştir. Çalışma sonunda araştırmacı en yüksek camptothecin ve biyokütle birikiminin maya ekstraktı uygulamasından elde edildiğini bildirmiştir

*Scutellaria lateriflora* L. türünde biyoaktif (baicalin, baicalein, wogonin ve wogonoside) bileşiklerin artırılması için sürgün kültürleri farklı ışık renklerine (beyaz, mavi, kırmızı) ve UV ışığa maruz bırakılmıştır. Çalışma sonunda mavi ışığın diğer uygulamalardan daha etkin olduğu, mavi ışıkta biyoaktif bileşiklerin birikiminin beyaz ışığa oranla 1.5-2 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Kawka ve ark., 2017).

Khan ve ark. (2017), pyrethrin birikimini artırmak için *Chrysanthemum cinerariaefolium* türünde yaptıkları çalışmada, kültür ortamına bakteriyel (*Bacillus subtilis*) ve fungal (*Fusarium oxysporum*) elisitörler uygulamışlar ve iki elisitörün pyrethrin miktarını kontrol kültürüne göre 7.2 mg/g'dan 9.7 mg/g'a çıkardığını bildirmişlerdir.

*Panax quinquefolium* türünde ginsenoside birikimini artırmak için yapılan bir çalışmada, kök tüyü hücre kültürlerine 50 mg l<sup>-1</sup> maya elisitörü uygulanmış ve uygulamadan 36 saat sonra ginsenoside birikiminin başlangıç kültürüne göre 1.57 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Kochan ve ark., 2017).



Krstić-Milošević ve ark. (2017) tarafından *Gentiana dinarica*'da norswertianin biyosentezini artırmak için kök tüyü kültürlerine biyotik (kitosan ve maya ekstraktı) ve abiyotik (salisilik asit, jasmonik asit ve metil jasmonat) elisitörler uygulanmıştır. Araştırma sonunda, kitosan'ın kontrol kültürüne göre norswertianin biyosentezini 7.7 kat, abiyotik elisitörlerden salisilik asit'in ise 24 kat artırdığını bildirmişlerdir.

Kumar ve ark. (2017a), *Tinospora cordifolia* türünde protoberberine (jatrorrhizine ve palmatine) biyosentezini artırmak için hücre süspansiyon kültürlerine biyotik (*Piriiformospora indica*, kitosan) elisitörler uygulamışlardır. *Piriiformospora indica* elisitörü jatrorrhizine ve palmatine birikimini sırasıyla 4.2 kat (10.72 mg/g ka) ve 4 kat (4.39 mg/g ka) artırmıştır. Kitosan elisitörünün ise jatrorrhizine ve palmatine birikimini sırasıyla 1.9 kat (4.91 mg/g ka) ve 3.5 kat (3.77 mg/g ka) artırdığı bildirilmiştir.

Ma ve ark. (2017), *Helianthus tuberosus* türünde inulin birikimini artırmak için hücre süspansiyon kültürlerine bazı abiyotik ( $AgNO_3$  ve salisilik asit) ve biyotik (kitosan, *Trichoderma viride* ve maya ekstraktı) elisitörler uygulamışlardır. Çalışma sonunda kullanılan elisitörlerin inulin miktarını kontrol kültürüne göre sırasıyla; 2.05, 1.93, 1.76, 1.44 ve 1.18 kat artırdıklarını bildirmişlerdir.

*Phyllanthus debilis* türünde yapılan bir çalışmada araştırmacılar hücre süspansiyon kültürlerine farklı dozlarda (kontrol, 50, 100, 150 ve 200 mg/l) kitosan uygulamışlar ve hydrolysable tannin birikimine etkilerini incelemişlerdir. Kitosan elisitörünün 150 mg l<sup>-1</sup> dozunda kontrol kültürüne göre en yüksek (4850 µg/g) hydrolysable tannin birikiminin olduğu rapor edilmiştir (Malayaman ve ark., 2017).

Nieto-Trujillo ve ark. (2017), *Tanacetum parthenium*'da yaptıkları çalışmada farklı organ (sürgün, kök ve çiçek) kültürlerinin fenolik asitlerin sentezine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonunda, en yüksek fenolik asit birikiminin (7.153 mg g<sup>-1</sup>) sürgünden elde edilen bitkilerde, buna karşılık en düşük fenolik asit (0.448 mg g<sup>-1</sup>) birikiminin ise kökten elde edilen bitkilerde tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Ptak ve ark. (2017) tarafından *Leucojum aestivum* 'Gravety Giant' türünde yapılan bir çalışmada galanthamine ve lycorine biyosentezi için kültür ortamına salisilik asit (SA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic asit (ACC) ve ethephon uygulamışlardır. Bulgular

en yüksek galanthamin (0.8 mg/g ka) ve lycorine (1.53 mg/g ka) biyosentezinin 5  $\mu\text{M}$ 'lık salisilik asit uygulamasında gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

İn vitro koşullarda *Carum copticum* türünde yapılan bir çalışmada, araştırmacılar farklı dozlardaki (0, 25, 50, 100 ve 150 mM) tuz çözeltisini kültür ortamına ilave etmişler ve proline birikimine etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonunda proline birikiminin en fazla 150 mM'lık tuz uygulamasından elde edildiği bildirilmiştir (Razavizadeh ve ark., 2017a).

Saeed ve ark. (2017), *Ajuga bracteosa*'da yaptıkları bir çalışmada biyokütle, toplam fenolik madde ve flavonoid birikimini artırmak için kök kültürlerine metil jasmonat ve fenil asetik asit uygulamışlardır. Biyokütle artışının metil jasmonat uygulamasında 32. gün, fenil asetik asit uygulamasında ise 40. gün sonunda en yüksek (sırasıyla; 8.88, 8.24 ka g/l) değere ulaştığını, toplam fenolik madde ve flavonoid birikimini ise her iki elisitör uygulamasının da teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Silva ve ark. (2017) tarafından *Plectranthus amboinicus* türünde yapılan bir çalışmada karvakrol, p-cymene ve  $\gamma$ -terpinene birikimini artırmak amacıyla kültür ortamına farklı yoğunluklarda (26, 51, 69, 94 ve 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) uygulanan ışık kaynağının etkilerini incelemişlerdir. Karvakrol birikiminin ışığın yoğunluğuna bağlı olarak sürekli arttığını, diğer taraftan p-cymene birikiminin en fazla 69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $\gamma$ -terpinene birikiminin ise en fazla 51  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda olduğunu bildirmişlerdir.

*Adhatoda vasica* türünde pyrroloquinazoline alkaloidlerinin artırılması için yapılan bir çalışmada araştırmacılar hücre kültürlerine polisakkarit (sorbitol, dextran, kitosan ve glucan) uygulamışlar ve olumlu sonuçlara ulaşmışlardır. Polisakkarit uygulamalarının tamamının pyrroloquinazoline alkaloidlerinin sentezinde etkili olduğu, buna karşılık sorbitol uygulamasının vasicine birikimini 8.3 kat (99.44 mg/g ka), vasicinone birikimini de 10.1 kat (62.37 mg/g ka) artırdığı bildirilmiştir (Singh ve ark., 2017).

Song ve ark. (2017), *Panax ginseng*'de yaptıkları bir çalışmada ginsenoside birikimini artırmak için kök kültürlerine *Bacillus stratosphericus* elisitörü inoküle etmişlerdir. Çalışma sonunda bakteri inokülasyonunun artırıcı etki yaptığı ve kontrol grubuna göre en yüksek (2.026 mg g<sup>-1</sup>-4 kat) ginsenoside birikiminin uygulamadan 6 gün sonra gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Trong ve ark. (2017) tarafından Vietnam gingsengi (*Panax vietnamensis*)'nde yapılan bir çalışmada hücre süspansiyon kültürlerine farklı dozlarda elisitör (maya ekstraktı ve casein hydrolyzate) ilave edilmiş ve biyokütle birikimine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, maya ekstraktı uygulamasında 1.4-2.4 kat, casein hydrolyzate uygulamasında ise 1.8-2.6 kat biyokütle artışının gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

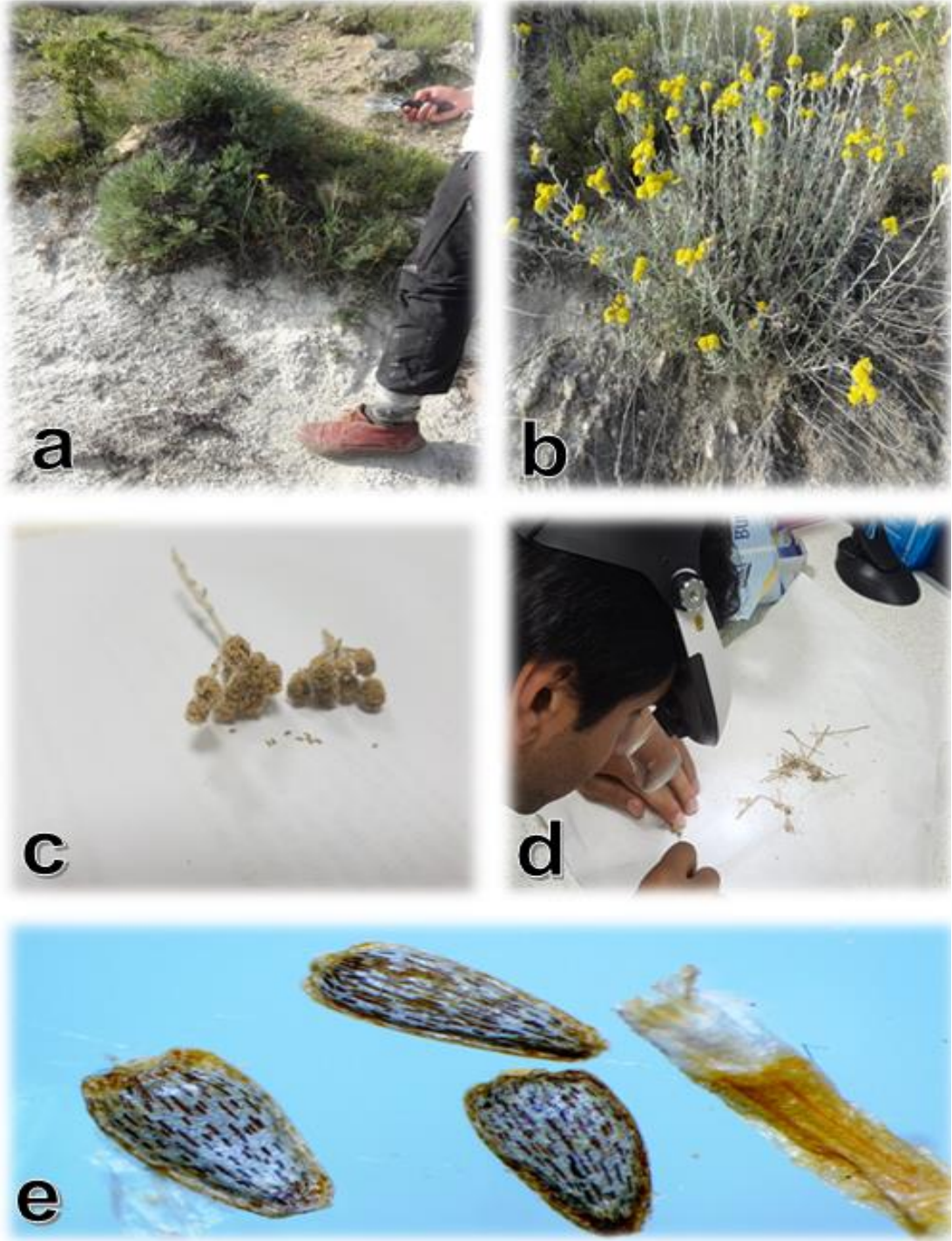
Yang ve ark. (2017), *Camptotheca acuminata* türünde camptothecin biyosentezini artırmak için yaptıkları çalışmada hücre süspansiyon kültürlerine salisilik asit, sorbitol ve metal tuzları ( $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  ve  $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ ) uygulamışlardır. Araştırmacılar çalışma sonunda, sorbitol uygulamasının diğer bütün uygulamalardan daha etkin olduğunu ve sorbitolün camptothecin biyosentezini kontrol kültürüne göre 500 kat artırdığını bildirmişlerdir.

*Rauwolfia serpentina* türünde, Zafar ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, araştırmacılar kallus kültürlerine alüminyum klorit ( $\text{AlCl}_3$ ) uygulamışlar ve reserpine biyosentezine etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonunda, alüminyum klorit uygulamasının reserpine biyosentezi üzerine etkili olduğunu ve reserpine birikiminin başlangıç kültürüne göre  $0.083 \text{ mg g}^{-1}$ 'dan  $0.129 \text{ mg g}^{-1}$ 'a çıktığını bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak, Türkiye endemiği *Achillea gypsicola* türünün doğal floradan toplanan tohumları kullanılmıştır. *Achillea gypsicola* türüne ait bitkiler, yapılan arazi çalışmaları sonucunda, “Çorum-İskilip” yolunun 26 ve 47. kilometrelerinde, yolun sağındaki tepeciklerde tespit edilmiş ve tür teşhisi için bitki örnekleri alınmıştır. Bitki örneklerinin toprak altı ve toprak üstü (kök, yaprak, dal, çiçek) aksamaları ayrıntılı olarak görünecek şekilde alınmasına özen gösterilmiş ve bitki örnekleri herbaryum yapılarak tür teşhisine kadar geçen zaman içinde oda koşullarında muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1). Tür teşhisi Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hayri DUMAN ve Ordu Üniversitesi Eğitim Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Sevda TÜRKİŞ tarafından yapılmıştır. Bitki tohumları, bölgede mevcut olan bütün bitki kümelerinden örnekleme yapılarak hasat edilmiş ve temizlenip mantar tıpalı cam kavanozlarda ekim yapılincaya kadar muhafaza altına alınmıştır. Bitkilerin toplandığı arazinin eğimi % 32.0–37.2, rakımı 743–760 metre ve bakı güney-güneybatı olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. *Achillea gypsicola* türünün yetiştiği toprak yapısına ait görüntü (a), bitkinin arazideki toplu görünümü (b), laboratuvarında tohumların görüntüsü (c), zararlı kontrolüne ait görüntü (d) ve tohumların binoküler mikroskop altında görünümü (e)

### 3.2. Yöntem

*Achillea gypsicola* türünde kallus kültürü ile sekonder metabolit üretim potansiyelinin belirlenmesine yönelik yapılan uygulamalar 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

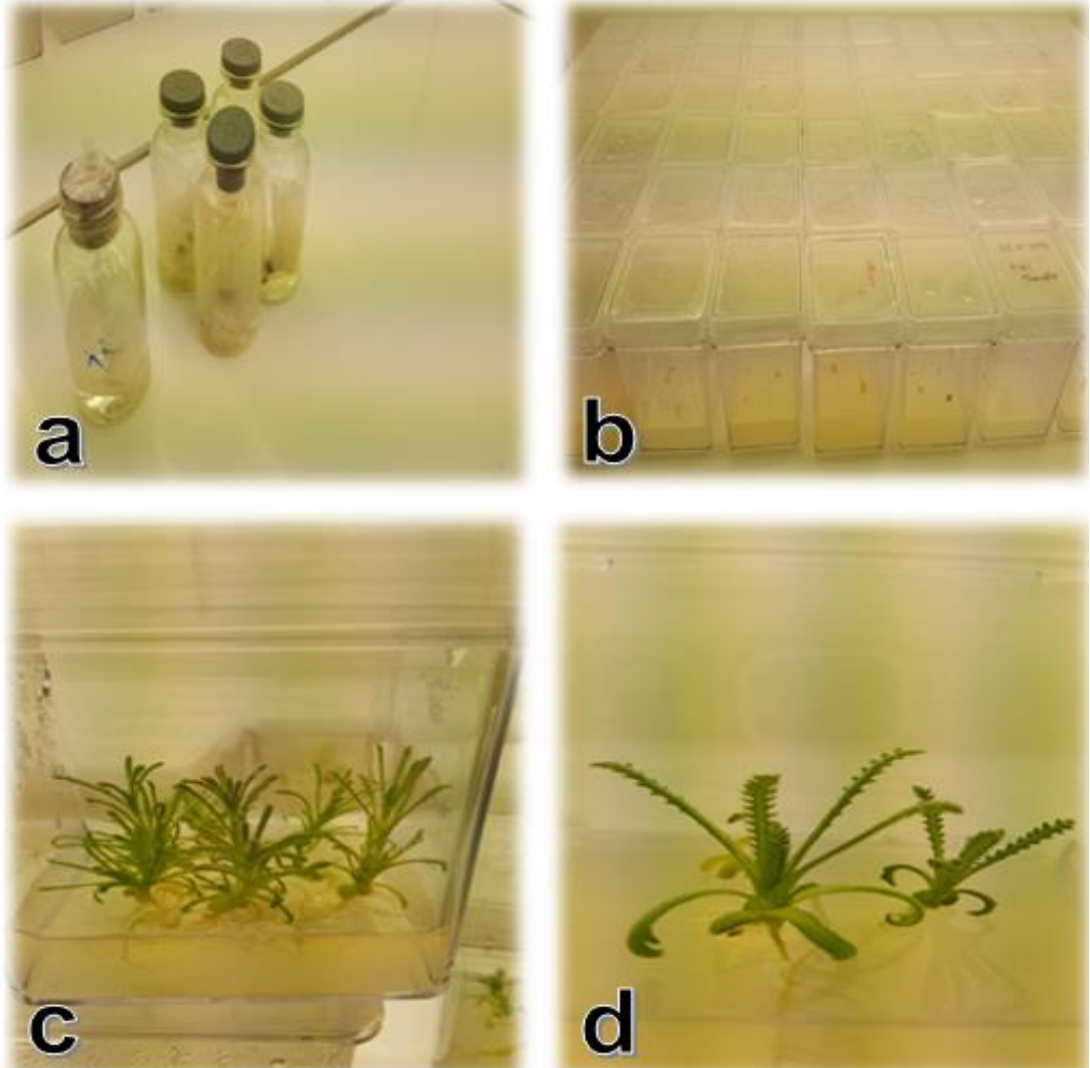
Birinci aşamada, *Achillea gypsicola* türünün tohumları in vitro koşullarda çimlendirilmiş ve in vitro bitkicikler elde edilmiştir.

İkinci aşamada, en iyi kallus oluşumu sağlayan eksplant kaynağı (yaprak ve gövde), besi ortamı (MS ve B5) ve besi ortamına ilave edilecek hormon kombinasyonları belirlenmiştir.

Üçüncü aşamada ise, hücre süspansiyon kültürlerine uygulanan abiyotik (aydınlık, gümüş nitrat, kadmiyum klorit, metil jasmonat, sorbitol ve salisilik asit) ve biyotik (kitosan ve maya ekstraktı) elisitörlerin toplam fenolik madde, flavanol, flavonol, antosiyanin ve kamfor miktarlarının değişimleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bu uygulamalara ilişkin ayrıntılı bilgiler aşağıda sunulmuştur.

#### 3.2.1 Çimlendirme Çalışmaları ve İn Vitro Bitkiciklerin Elde Edilmesi

Tohumlar; ön sterilizasyon işlemi için % 70'lik etil alkolde 2-3 saniye batırılıp çıkarıldıktan sonra steril su ile durulanmış daha sonra % 25'lik (% 13'lük NaOCl) sodyum hipoklorit çözeltisinde 45 dakika bekletilmiştir. Durulama işlemi için tohumlar distile steril sudan 4-5 kere geçirilmiştir. İn vitro koşullarda en iyi çimlenme ortamını saptayabilmek için +4 °C'de 30 gün soğuk katlamaya tabi tutulan bitki tohumları; 12, 24, 36 ve 48 saat sürelerle 3 farklı (0, 100 ve 200 mikromolar) dozdaki KNO<sub>3</sub> çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar farklı konsantrasyonlarda (0, 0.5, 1, 2 mg/l) GA<sub>3</sub> içeren MS ortamına (pH=5.8) her petride 8 tohum olacak şekilde 6 tekerrürlü olarak ekilmiştir. Ekim yapılan petri kapları 25°C ve 16/8 saat ışık/karanlık şartlarda inkübe edilmiştir. *Achillea gypsicola* türünde tohumlara yapılan ön uygulamalara ait görüntü ve in vitro bitkiciklerin magenta kaplarındaki görüntüleri Şekil 3.2'de verilmiştir. Dört hafta sonra elde edilen in vitro bitkiciklerin yaprak ve gövdelerinden 1cm uzunluğunda alınan eksplantlar kallus kaynağı olarak kullanılmıştır.



**Şekil 3.2.** Laboratuvarda *Achillea gypsicola* türünde tohumlara yapılan ön uygulamalara ait görüntü (a) ve iklim odasında çimlenen in vitro bitkiciklerin magenta kaplarındaki görüntüleri (b, c ve d)

### **3.2.2. Gövde ve Yaprak Eksplantlarından Kallusların Elde Edilmesi**

En iyi kallus oluşumu sağlayacak besi ortamı, hormon kombinasyonunu ve eksplant kaynağını belirlemek amacıyla *Achillea gypsicola* türüne ait yaprak ve gövde eksplantları sitokinin+oksin büyüme düzenleyicileri içeren MS ve B5 ortamlarına dikilmiştir. Sitokinin+oksin kombinasyonları Çizelge 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *Achillea gypsicola* türünde kallus oluşumunun teşvik edilmesinde kullanılan, başlangıç ortamına ilave edilen BAP'ın 2,4-D ve NAA ile oluşturduğu kombinasyonlar

No	BAP+2,4-D Kombinasyonları	No	BAP+NAA Kombinasyonları
1	0.0 mg/l BAP+0.0 mg/l 2,4-D	26	0.0 mg/l BAP+0.0 mg/l NAA
2	0.0 mg/l BAP+0.5 mg/l 2,4-D	27	0.0 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA
3	0.0 mg/l BAP+2.0 mg/l 2,4-D	28	0.0 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA
4	0.0 mg/l BAP+4.0 mg/l 2,4-D	29	0.0 mg/l BAP+4.0 mg/l NAA
5	0.0 mg/l BAP+5.0 mg/l 2,4-D	30	0.0 mg/l BAP+5.0 mg/l NAA
6	0.5 mg/l BAP+0.0 mg/l 2,4-D	31	0.5 mg/l BAP+0.0 mg/l NAA
7	0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l 2,4-D	32	0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA
8	0.5 mg/l BAP+2.0 mg/l 2,4-D	33	0.5 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA
9	0.5 mg/l BAP+4.0 mg/l 2,4-D	34	0.5 mg/l BAP+4.0 mg/l NAA
10	0.5 mg/l BAP+5.0 mg/l 2,4-D	35	0.5 mg/l BAP+5.0 mg/l NAA
11	1.0 mg/l BAP+0.0 mg/l 2,4-D	36	1.0 mg/l BAP+0.0 mg/l NAA
12	1.0 mg/l BAP+0.5 mg/l 2,4-D	37	1.0 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA
13	1.0 mg/l BAP+2.0 mg/l 2,4-D	38	1.0 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA
14	1.0 mg/l BAP+4.0 mg/l 2,4-D	39	1.0 mg/l BAP+4.0 mg/l NAA
15	1.0 mg/l BAP+5.0 mg/l 2,4-D	40	1.0 mg/l BAP+5.0 mg/l NAA
16	2.0 mg/l BAP+0.0 mg/l 2,4-D	41	2.0 mg/l BAP+0.0 mg/l NAA
17	2.0 mg/l BAP+0.5 mg/l 2,4-D	42	2.0 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA
18	2.0 mg/l BAP+2.0 mg/l 2,4-D	43	2.0 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA
19	2.0 mg/l BAP+4.0 mg/l 2,4-D	44	2.0 mg/l BAP+4.0 mg/l NAA
20	2.0 mg/l BAP+5.0 mg/l 2,4-D	45	2.0 mg/l BAP+5.0 mg/l NAA
21	5.0 mg/l BAP+0.0 mg/l 2,4-D	46	5.0 mg/l BAP+0.0 mg/l NAA
22	5.0 mg/l BAP+0.5 mg/l 2,4-D	47	5.0 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA
23	5.0 mg/l BAP+2.0 mg/l 2,4-D	48	5.0 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA
24	5.0 mg/l BAP+4.0 mg/l 2,4-D	49	5.0 mg/l BAP+4.0 mg/l NAA
25	5.0 mg/l BAP+5.0 mg/l 2,4-D	50	5.0 mg/l BAP+5.0 mg/l NAA

BAP: Benzyl amino pürine; NAA: Naftalinasetik Asit; 2,4D: 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit

**Çizelge 3.2.** *Achillea gypsicola* türünde kallus oluşumunun teşvik edilmesinde kullanılan, başlangıç ortamına ilave edilen BAP ve KİN'in IBA ile oluşturduğu kombinasyonlar

No	BAP+IBA Kombinasyonları	No	KİN+IBA Kombinasyonları
51	0.0 mg/l BAP+0.0 mg/l IBA	76	0.0 mg/l KİN+0.0 mg/l IBA
52	0.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IBA	77	0.0 mg/l KİN+0.5 mg/l IBA
53	0.0 mg/l BAP+1.0 mg/l IBA	78	0.0 mg/l KİN+1.0 mg/l IBA
54	0.0 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA	79	0.0 mg/l KİN+2.0 mg/l IBA
55	0.0 mg/l BAP+3.0 mg/l IBA	80	0.0 mg/l KİN+3.0 mg/l IBA
56	0.5 mg/l BAP+0.0 mg/l IBA	81	0.1 mg/l KİN+0.0 mg/l IBA
57	0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l IBA	82	0.1 mg/l KİN+0.5 mg/l IBA
58	0.5 mg/l BAP+1.0 mg/l IBA	83	0.1 mg/l KİN+1.0 mg/l IBA
59	0.5 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA	84	0.1 mg/l KİN+2.0 mg/l IBA
60	0.5 mg/l BAP+3.0 mg/l IBA	85	0.1 mg/l KİN+3.0 mg/l IBA
61	1.0 mg/l BAP+0.0 mg/l IBA	86	0.5 mg/l KİN+0.0 mg/l IBA
62	1.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IBA	87	0.5 mg/l KİN+0.5 mg/l IBA
63	1.0 mg/l BAP+1.0 mg/l IBA	88	0.5 mg/l KİN+1.0 mg/l IBA
64	1.0 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA	89	0.5 mg/l KİN+2.0 mg/l IBA
65	1.0 mg/l BAP+3.0 mg/l IBA	90	0.5 mg/l KİN+3.0 mg/l IBA
66	2.0 mg/l BAP+0.0 mg/l IBA	91	1.0 mg/l KİN+0.0 mg/l IBA
67	2.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IBA	92	1.0 mg/l KİN+0.5 mg/l IBA
68	2.0 mg/l BAP+1.0 mg/l IBA	93	1.0 mg/l KİN+1.0 mg/l IBA
69	2.0 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA	94	1.0 mg/l KİN+2.0 mg/l IBA
70	2.0 mg/l BAP+3.0 mg/l IBA	95	1.0 mg/l KİN+3.0 mg/l IBA
71	5.0 mg/l BAP+0.0 mg/l IBA	96	2.0 mg/l KİN+0.0 mg/l IBA
72	5.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IBA	97	2.0 mg/l KİN+0.5 mg/l IBA
73	5.0 mg/l BAP+1.0 mg/l IBA	98	2.0 mg/l KİN+1.0 mg/l IBA
74	5.0 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA	99	2.0 mg/l KİN+2.0 mg/l IBA
75	5.0 mg/l BAP+3.0 mg/l IBA	100	2.0 mg/l KİN+3.0 mg/l IBA

BAP: Benzyl amino pürine; KİN: Kinetin; IBA: İndol-3-Butirik Asit



**Çizelge 3.3.** *Achillea gypsicola* türünde kallus oluşumunun teşvik edilmesinde kullanılan, başlangıç ortamına ilave edilen KİN'in 2,4-D ve NAA ile oluşturduğu kombinasyonlar

No	KİN+2,4-D Kombinasyonları	No	KİN+NAA Kombinasyonları
101	0.0 mg/l KİN+0.0 mg/l 2,4-D	126	0.0 mg/l KİN+0.0 mg/l NAA
102	0.0 mg/l KİN+0.5 mg/l 2,4-D	127	0.0 mg/l KİN+0.5 mg/l NAA
103	0.0 mg/l KİN+2.0 mg/l 2,4-D	128	0.0 mg/l KİN+1.0 mg/l NAA
104	0.0 mg/l KİN+4.0 mg/l 2,4-D	129	0.0 mg/l KİN+2.0 mg/l NAA
105	0.0 mg/l KİN+5.0 mg/l 2,4-D	130	0.0 mg/l KİN+5.0 mg/l NAA
106	0.1 mg/l KİN+0.0 mg/l 2,4-D	131	0.1 mg/l KİN+0.0 mg/l NAA
107	0.1 mg/l KİN+0.5 mg/l 2,4-D	132	0.1 mg/l KİN+0.5 mg/l NAA
108	0.1 mg/l KİN+2.0 mg/l 2,4-D	133	0.1 mg/l KİN+1.0 mg/l NAA
109	0.1 mg/l KİN+4.0 mg/l 2,4-D	134	0.1 mg/l KİN+2.0 mg/l NAA
110	0.1 mg/l KİN+5.0 mg/l 2,4-D	135	0.1 mg/l KİN+5.0 mg/l NAA
111	0.5 mg/l KİN+0.0 mg/l 2,4-D	136	0.5 mg/l KİN+0.0 mg/l NAA
112	0.5 mg/l KİN+0.5 mg/l 2,4-D	137	0.5 mg/l KİN+0.5 mg/l NAA
113	0.5 mg/l KİN+2.0 mg/l 2,4-D	138	0.5 mg/l KİN+1.0 mg/l NAA
114	0.5 mg/l KİN+4.0 mg/l 2,4-D	139	0.5 mg/l KİN+2.0 mg/l NAA
115	0.5 mg/l KİN+5.0 mg/l 2,4-D	140	0.5 mg/l KİN+5.0 mg/l NAA
116	1.0 mg/l KİN+0.0 mg/l 2,4-D	141	1.0 mg/l KİN+0.0 mg/l NAA
117	1.0 mg/l KİN+0.5 mg/l 2,4-D	142	1.0 mg/l KİN+0.5 mg/l NAA
118	1.0 mg/l KİN+2.0 mg/l 2,4-D	143	1.0 mg/l KİN+1.0 mg/l NAA
119	1.0 mg/l KİN+4.0 mg/l 2,4-D	144	1.0 mg/l KİN+2.0 mg/l NAA
120	1.0 mg/l KİN+5.0 mg/l 2,4-D	145	1.0 mg/l KİN+5.0 mg/l NAA
121	2.0 mg/l KİN+0.0 mg/l 2,4-D	146	2.0 mg/l KİN+0.0 mg/l NAA
122	2.0 mg/l KİN+0.5 mg/l 2,4-D	147	2.0 mg/l KİN+0.5 mg/l NAA
123	2.0 mg/l KİN+2.0 mg/l 2,4-D	148	2.0 mg/l KİN+1.0 mg/l NAA
124	2.0 mg/l KİN+4.0 mg/l 2,4-D	149	2.0 mg/l KİN+2.0 mg/l NAA
125	2.0 mg/l KİN+5.0 mg/l 2,4-D	150	2.0 mg/l KİN+5.0 mg/l NAA

2,4D: 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit; NAA: Naftalinasetik Asit; KİN: Kinetin

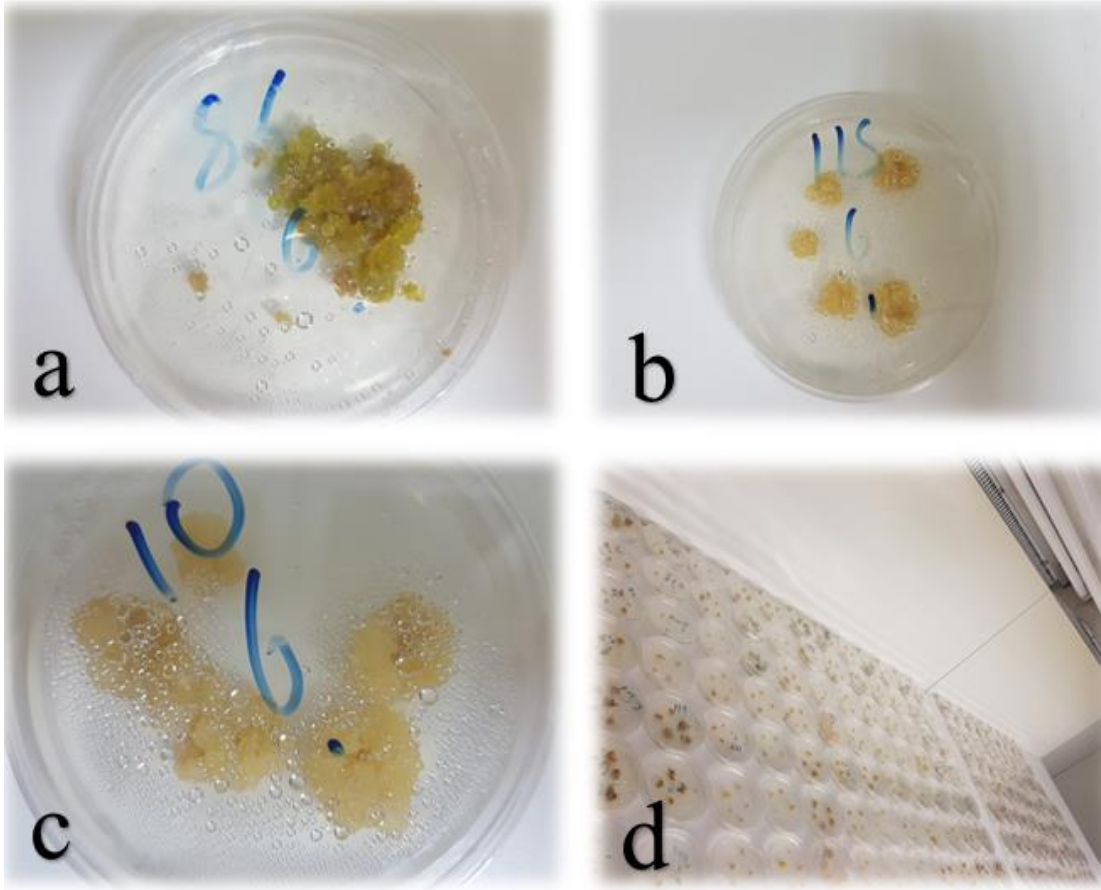
**Çizelge 3.4.** *Achillea gypsicola* türünde kallus oluşumunun teşvik edilmesinde kullanılan, başlangıç ortamına ilave edilen BAP ve KİN'in IAA ile oluşturduğu kombinasyonlar

No	BAP+IAA Kombinasyonları	No	KİN+IAA Kombinasyonları
151	0.0 mg/l BAP+0.0 mg/l IAA	166	0.0 mg/l KİN+0.0 mg/l IAA
152	0.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IAA	167	0.0 mg/l KİN+0.5 mg/l IAA
153	0.0 mg/l BAP+1.0 mg/l IAA	168	0.0 mg/l KİN+1.0 mg/l IAA
154	0.5 mg/l BAP+0.0 mg/l IAA	169	0.1 mg/l KİN+0.0 mg/l IAA
155	0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l IAA	170	0.1 mg/l KİN+0.5 mg/l IAA
156	0.5 mg/l BAP+1.0 mg/l IAA	171	0.1 mg/l KİN+1.0 mg/l IAA
157	1.0 mg/l BAP+0.0 mg/l IAA	172	0.5 mg/l KİN+0.0 mg/l IAA
158	1.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IAA	173	0.5 mg/l KİN+0.5 mg/l IAA
159	1.0 mg/l BAP+1.0 mg/l IAA	174	0.5 mg/l KİN+1.0 mg/l IAA
160	2.0 mg/l BAP+0.0 mg/l IAA	175	1.0 mg/l KİN+0.0 mg/l IAA
161	2.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IAA	176	1.0 mg/l KİN+0.5 mg/l IAA
162	2.0 mg/l BAP+1.0 mg/l IAA	177	1.0 mg/l KİN+1.0 mg/l IAA
163	5.0 mg/l BAP+0.0 mg/l IAA	178	2.0 mg/l KİN+0.0 mg/l IAA
164	5.0 mg/l BAP+0.5 mg/l IAA	179	2.0 mg/l KİN+0.5 mg/l IAA
165	5.0 mg/l BAP+1.0 mg/l IAA	180	2.0 mg/l KİN+1.0 mg/l IAA

BAP: Benzyl amino pürine; KİN: Kinetin; IAA: İndol-3-Asetik Asit

Çizelgelerde verilen her kombinasyon için 4 adet petriye, her petride 8'er tane eksplant olacak şekilde dikim yapılmıştır. Dikilen eksplantlar, sıcaklığı 25°C ve gün uzunluğu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim odasında 6 hafta kültüre alınmıştır. Daha sonra oluşan kalluslar hormonsuz besi ortamında 6 hafta süreyle olmak üzere iki kez alt kültüre alınmıştır. *Achillea gypsicola* türünde in vitro bitkiciklerin gövde segmenti

ve yaprak kesitlerinden elde edilen kallusların iklim odasında yer alan petri kaplarındaki genel görüntüleri Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. *Achillea gypsicola* türünde in vitro bitkiciklerin gövde segmenti ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların iklim odasında yer alan petri kaplarındaki genel görüntüleri (a, b, c ve d)

Alt kültürleri takip eden 12 hafta sonunda kalluslar;

- 1) Canlı eksplant oranı (CEO) (%)
- 2) Kallus oluşturan eksplant oranı (KOEO) (%)
- 3) Kallus ağırlığı gibi özellikleri dikkate alınarak gruplara ayrılmıştır.

Puanlama, 0-4 puan skalasına göre yapılmıştır. Buna göre;

0: kallus oluşumu yok,

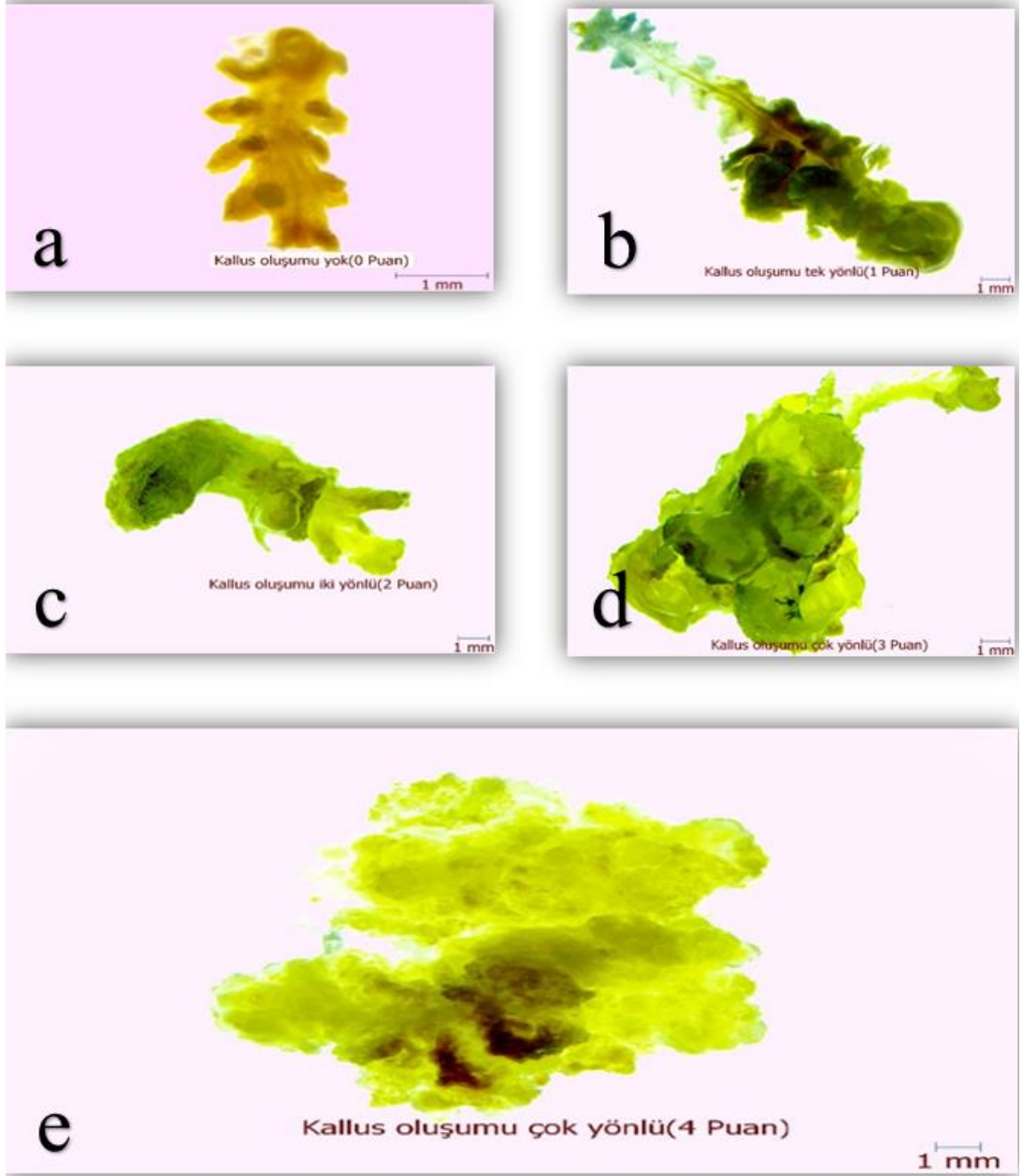
1: tek yönlü kallus oluşumu var, kallus oluşturan eksplant oranı (KOEO) (%) çok düşük, canlı eksplant oranı (CEO) (%) çok az, kallus ağırlığı çok düşük,

2: çift yönlü kallus oluşumu var, kallus oluşturan eksplant oranı (KOEO) (%) düşük, canlı eksplant oranı (CEO) (%) çok az, kallus ağırlığı düşük,

3: her yönden kallus oluşumu var, kallus oluşturan eksplant oranı (KOEO) (%) fazla, canlı eksplant oranı (CEO) (%) fazla, kallus ağırlığı yüksek.

4: her yönden kallus oluşumu var, kallus oluşturan eksplant oranı (KOEO) (%) çok fazla, canlı eksplant oranı (CEO) (%) çok fazla, kallus ağırlığı çok yüksek.

*Achillea gypsicola* türünde gövde ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların puanlanmasına temel teşkil eden binoküler mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 3.4'de verilmiştir.



**Şekil 3.4.** *Achillea gypsicola* türünde gövde ve yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların puanlanmasına temel teşkil eden binoküler mikroskop altındaki görünüşleri (a, b, c, d ve e)

### 3.2.3. Hücre Süspansiyon Kültürlerine Biyotik ve Abiyotik Elisitör Uygulamaları

Alt kültürler sonrasında yapılan incelemeler sonucunda; en iyi kallus oluşumu sağlayan eksplant kaynağı, besi ortamı ve hormon kombinasyonu hücre süspansiyon kültürlerini oluşturmak için çalışmada kullanılmıştır. Elde edilen kalluslar steril kabin içerisinde 2.5 g olacak şekilde tartılmış ve 50 ml sıvı besin ortamı içeren 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. Daha sonra ortalama 105 rpm hıza sahip çalkalayıcı üzerinde,

25°C sıcaklıkta 16 saat aydınlık/8 saat karanlık (16/8 fotoperyot koşullar) ortamda kültüre alınmıştır. İn vitro koşullarda sekonder metabolit üretiminin artırılması amaçlanan bu çalışmada, bitkilerin hücre ve dokularındaki savunma sistemlerini harekete geçiren abiyotik (aydınlık, kadmiyum klorit, gümüş nitrat, metil jasmonat, sorbitol ve salisilik asit) ve biyotik (kitosan ve maya elisitör) stres koşulları uygulanmıştır. Bu uygulamalara ilişkin bilgiler aşağıda sunulmuştur;

### **3.2.3.1. Işık Uygulaması**

Sekonder metabolit üretimi üzerine ışığın etkisini incelemek amacıyla, hücre kültürleri ortalama 105 rpm hızdaki çalkalayıcıya yerleştirildikten sonra, 25 °C’de ve ortalama 8.000 lüks’lük sürekli ışık altında farklı sürelerde tutulmuştur. Kontrol grubu 25 °C’de ve tamamen karanlıkta kültüre alınmıştır. Aydınlık uygulaması için örnek alımları 1. günden başlayarak 2, 3, 6 ve 12. gün olmak üzere toplam 5 kez yapılmış ve 1. gün örnek alımı uygulamadan 8 saat sonra yapılmıştır.

### **3.2.3.2. Kadmiyum Klorit Uygulaması**

Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamalardan biri olan kadmiyum klorit ( $CdCl_2$ ) uygulamasında 0 (kontrol), 5  $\mu M$ , 25  $\mu M$  ve 50  $\mu M$  olmak üzere dört farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Örnekler 1. günden (uygulamayı takip eden 8. saatte) itibaren 2 ve 3. gün olmak üzere, toplam 3 kez alınmıştır. Kültürler ortalama 105 rpm hıza sahip çalkalayıcı üzerinde, 25 °C sıcaklıkta 16 saat aydınlık/8 saat karanlık ortamda kültüre alınmıştır.

### **3.2.3.3. Gümüş Nitrat Uygulaması**

Gümüş nitrat ( $AgNO_3$ ) hücre süspansiyon kültürlerine 0 (kontrol), 5  $\mu M$ , 25  $\mu M$  ve 50  $\mu M$  olmak üzere dört farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Örnekler 1. günden (uygulamayı takip eden 8. saatte) itibaren 2 ve 3. gün olmak üzere toplam 3 kez alınmıştır. Kültürler ortalama 105 rpm hıza sahip çalkalayıcı üzerinde, 25 °C sıcaklıkta 16 saat aydınlık/8 saat karanlık ortamda kültüre alınmıştır.

#### **3.2.3.4. Metil Jasmonat Uygulaması**

Bu çalışmada kontrol ve 3 muamele olmak üzere dört farklı şekilde metil jasmonat uygulaması yapılmıştır. Uygulama grubu olarak 10 µM, 50 µM ve 100 µM metil jasmonate % 95 etanol içinde çözülmüş ve 0.2 µm filtre kâğıdından geçirilmiştir. Kontrole ise sadece etanol ilave edilmiştir. Kültürler ortalama 105 rpm hıza sahip çalkalayıcı üzerinde, 25 °C sıcaklıkta 16 saat aydınlık/8 saat karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Örnekler 1. günden (uygulamayı takip eden 8. saatten) itibaren 2 ve 3. gün olmak üzere toplam 3 kez alınmıştır.

#### **3.2.3.5. Sorbitol Uygulaması**

Distile edilmiş su içinde 0 (kontrol), 5 g/l<sup>-1</sup>, 25 g/l<sup>-1</sup> ve 50 g/l<sup>-1</sup> sorbitol çözüldürülmüş ve pH 5,8'e ayarlanmıştır. Uygulamaların yapıldığı kültürler ortalama 105 rpm hıza sahip çalkalayıcı üzerinde, 25 °C sıcaklıkta 16 saat aydınlık/8 saat karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Örnekler 1. günden (uygulamayı takip eden 8. saatten) itibaren 2 ve 3. gün olmak üzere toplam 3 kez alınmıştır.

#### **3.2.3.6. Salisilik Asit Uygulaması**

Distile su içerisinde 0 (kontrol), 10 µM, 50 µM ve 100 µM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda salisilik asit çözüldürülmüş ve pH 5,8'e ayarlanmıştır. Kültürler ortalama 105 rpm hıza sahip çalkalayıcı üzerinde, 25 °C sıcaklıkta 16 saat aydınlık/8 saat karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Örnekler 1. Günden (uygulamayı takip eden 8. saatten) itibaren 2 ve 3. Gün olmak üzere toplam 3 kez alınmıştır.

#### **3.2.3.7. Kitosan Uygulaması**

Bu uygulamada, 0.5 g kitosan 1 ml asetik asit içerisinde 55-60 °C'de 15 dakika çözdürülerek son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra istenilen (25 mg/l<sup>-1</sup>, 50 mg/l<sup>-1</sup> ve 100 mg/l<sup>-1</sup>) konsantrasyonlarda hazırlanıp, kontrol kültürü ile, pH 5,8'e ayarlanmıştır. Kültürler ortalama 105 rpm hıza sahip çalkalayıcı üzerinde, 25 °C sıcaklıkta 16 saat aydınlık/8 saat karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Örnekler 1. günden (uygulamayı takip eden 8. saatten) itibaren 2 ve 3. gün olmak üzere toplam 3 kez alınmıştır.

### 3.2.3.8. Maya Ekstraktı Uygulaması

Maya elisitörü 20 g/100 ml olacak şekilde istenilen konsantrasyonlarda distile su içerisinde çözülmüş ve 400 ml etanol ile karıştırılarak 4 gün buzdolabında (4 °C) bekletilmiştir. Daha sonra oluşan çökelti tekrar 100 ml distile su içinde çözdürülmüş ve 400 ml etanol ile karıştırılmıştır. Son olarak oluşan yapışkanimsi çökelti 50 ml distile suda çözdürülerek 4 farklı konsantrasyonda 0 (kontrol), 25 mg/l<sup>-1</sup>, 50 mg/l<sup>-1</sup> ve 100 mg/l<sup>-1</sup> ve pH 5,8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kültürler ortalama 105 rpm hıza sahip çalkalayıcı üzerinde, 25 °C sıcaklıkta 16 saat aydınlık/8 saat karanlık ortamda kültüre alınmıştır. Örnekler 1. günden (uygulamayı takip eden 8. saatten) itibaren 2 ve 3. gün olmak üzere toplam 3 kez alınmıştır.

Yapılan uygulamaların her biri 8 günlük hücre kültürlerinde 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulamaların tamamında örnek alımları yapıldıktan sonra her bir erlenden hücre büyümesi ve hücre canlılığının belirlenmesi için 5 ml ve ayrıca hücre kuru ağırlığının belirlenmesi için de 5 ml örnek alınmıştır. Örnek alımları tamamlanan bütün uygulamalar analizlerde kullanılmak üzere tekerrürler bazında steril kabin içerisinde filtre edilip yıkanmış ve ekstraksiyona kadar (-20 °C) derin dondurucuya konulmuştur. Şekil 3.5’de *Achillea gypsicola* türünde kallusların alt kültürler sonrasında kontrollerine ait fotoğraflara, kalluslardan elde edilen hücre süspansiyon kültürlerine ait fotoğrafa ve steril kabin içerisinde filtre edilmiş örneklerin (-20 °C) derin dondurucuda muhafaza edilmesine ait görüntüye yer verilmiştir.



**Şekil 3.5.** *Achillea gypsicola* türünde kallusların alt kültürler sonrasında kontrollerine ait görüntüler (a ve b), kalluslardan elde edilen hücre süspansiyon kültürlerine ait görüntü (c) ve steril kabin içinde filtre edilmiş örneklerin (-20 °C) derin dondurucuda muhafaza edilmesine ait görüntü (d)



### 3.2.4 İncelenen Özellikler ve Yapılan Analizler

#### 3.2.4.1. Hücre Büyümesi ve Canlılığının Belirlenmesi

Hücre büyümesi, ortalama hücre sayısı (n) ve hücre kuru ağırlıkları (g/l) ölçülerek belirlenmiştir. Hücre sayısı, Moroff ve ark. (1994)'na göre Nageotte sayma çemberi kullanılarak aşağıdaki formülle belirlenmiştir (3.1).

$$n = \sum_{i=1}^{40} c \cdot 20 \cdot sf \quad (3.1)$$

n: ortalama hücre sayısı

c: her bir dikdörtgende sayılan hücre sayısı

sf: sulandırma faktörü

Hücre kuru ağırlıkları, filtre edilmiş hücrelerin, 55 °C'de 48 saat etüvde bekletildikten sonra, tartılmasıyla elde edilmiştir.

Hücre canlılığı, Trypan mavisi boyama tekniği kullanılarak Laloue ve ark. (1980)'na göre yapılmıştır. Buna göre; örneklerin boyama işlemi için eppendorf tüpünün içerisine 50 µl hücre süspansiyon kültürü, 125 µl trypan mavisi ve hücrelerin gerek sayım aşamasında canlı kalmasını sağlamak gerekse de boyama etkinliğinin artırılması için 75 µl fosfat bafırı koyulmuştur. Daha sonra homojen olarak karıştırıldıktan sonra sayma işlemi için mikroskopta gözlem yapılmış ve hücre canlılık oranları yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

#### 3.2.4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini

Filtre edilerek analiz zamanına kadar derin dondurucuda -20 °C'de bekletilen yaş hücre örnekleri havanda iyice ezilmiştir. Ekstraksiyon, Dalar ve ark. (2012)'nin yöntemi esas alınarak yapılmıştır. Buna göre; ezilen örneklerden 2 g alınarak üzerine 10 ml % 96'lık etanol ilave edilmiş ve 2 dakikalık homojenizatörde karıştırma işleminin ardından, 1 gece 45 °C'deki su banyosunda bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler, 5 dakika süreyle 4000 rpm'de santrifüj edilmiş ve fenolik bileşikler içeren supernatant kısım alınarak 75 °C'de tamamen kuruyuncaya kadar rotary evaporatörde uçurulmuştur. Daha sonra ekstraktlar 1 ml metanolde çözülmüş ve fenolik bileşik analizlerinde kullanılmıştır.

Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesinde hazırlanan ekstraktlar kullanılmıştır. Analizler folin kolorimetrik metoduyla Slinkard ve Singleton (1977)'un kullandıkları yöntem esas alınarak yapılmıştır. Spektrofotometrede okumalar 765 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir ve standart gallik asit çözeltisinden hazırlanan körveden yararlanılarak toplam fenolik bileşik miktarları, gallik asit eşdeğeri olarak mg/g yaş hücre ağırlığı (YHA) şeklinde belirlenmiştir.

#### **3.2.4.3. Toplam Flavanol İçeriği**

Hücre süspansiyon kültürlerinde bulunan toplam flavanollerin belirlenmesi için Prior ve ark. (2010)'nın kullanmış oldukları dimetil amino sinnamaldehit (DMAC) metodu kullanılmıştır. Bu amaçla metanol, HCL (9:1) karışımı ile hazırlanan DMAC kullanılmış ve spektrofotometrede okumalar 640 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar kateşin standardından hazırlanmış olan körveden yararlanılarak, kateşin eşdeğeri olarak mg/g yaş hücre ağırlığı (YHA) şeklinde belirlenmiştir.

#### **3.2.4.4. Toplam Flavonol İçeriği**

Toplam flavonol analizi Neu solusyonu kullanılarak Dai ve ark. (1995)'nın kullandıkları metoda göre yapılmıştır. Buna göre ekstraktlara % 1'lik 2-aminoethyl diphenylborinate solüsyonu ile metanol karışımı ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra, 410 nm'deki absorban değerleri tespit edilmiştir. Toplam flavonollerin miktarı, rutin standardından hazırlanmış olan körveden yararlanılarak, rutin eşdeğeri olarak mg/g yaş hücre ağırlığı (YHA) şeklinde belirlenmiştir.

#### **3.2.4.5. Toplam Antosiyanin İçeriği**

Antosiyanin analizleri Dalar ve ark. (2012)'nin kullanmış oldukları metoda göre McIlvaine's bafırı (pH=3) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede okumalar 570 nm dalga boyunda yapılmıştır ve antosiyanin miktarları renk değeri olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanarak sonuçlar RD/g yaş hücre ağırlığı (YHA) olarak verilmiştir (3.2).

$$RD=0.1 \cdot a \cdot sf \quad (3.2)$$

RD: Renk Değeri

a: absorbans değeri

s: seyreltme faktörü

### 3.2.4.6. Kamfor Miktarının Belirlenmesi

Araştırmada kamfor bileşiği GC-MS cihazı ile tayin edilmiştir. Headspace GC-MS analizi için Shimadzu QP2010 ultra GC-MS cihaza entegre edilmiş ve Shimadzu AOC-5000 plus auto sampler kullanılmıştır. Kapiler kolon ayırma RTX-5M 30 m ile belirlenmiştir. Analiz için önce cihaza kamfor standardı verilmiştir. Bileşiğin kütle fragmentleri ve alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışmanın hassasiyetini ve doğruluğunu artırmak için majör olan 9 adet iyon piki seçilmiştir. Daha sonra kamfor bileşiğinin kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve numunenin miktarı  $\mu\text{g/g}$  olarak belirlenmiştir. Headspace-GC-MS deneysel koşulları izelge 3.5’de verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Hücrelerde kamfor miktarının tespit edilmesinde kullanılan Headspace-GC-MS cihazına ait deneysel koşullar

Sıcaklık	100°C
Isıtma süresi	10 dk.
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C
İyonizasyon voltajı	70 eV
Enjeksiyon hacmi	0.5 ml
Taşıyıcı gaz	Helyum

### **3.2.5. İstatistik Değerlendirme**

Araştırmada; biri in vitro çimlendirme denemelerine, diğeri de sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamalara ait olmak üzere iki farklı istatistik analiz yapılmıştır.

#### **3.2.5.1. İn Vitro imlendirme Denemelerine Ait İstatistik Analiz**

Çimlenme oranı, denemede kullanılan toplam tohumlar arasında imlenenlerin sayısı esas alınıp hesaplanmıştır. Varyans analizinin normallik ve varyansların homojenliği varsayımlarının geçerlilik kontrolleri sırasıyla Kolmogorov-Smirnov testi ve Levene testi ile kontrol edilmiştir. Veriler varyans analizi öncesinde açı transformasyonuna tabi tutulmuştur. Verilerin analizi 3 faktörlü varyans analizi (three-way ANOVA) yapılmıştır. Farklı ortalamaların karşılaştırılmasında Tukey oklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Tukey testi sonuçları tanıtıcı istatistik değerlerinin yanında harfli gösterim şeklinde ifade edilmiş ve yorumlamalarda % 5 önem düzeyi dikkate alınmıştır. Tüm hesaplamalar Minitab 17 istatistik paket programı ile yapılmıştır.

#### **3.2.5.2. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Uygulamalara Ait İstatistik Analiz**

Verilerin değerlendirilmesinde; aydınlık uygulamasındaki değişkenler için tek faktörlü varyans analizi (one-way ANOVA), diğer uygulamalara ait değişkenler için ise iki-yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) kullanılmıştır. Farklı ortalamalar Tukey testi ile belirlenmiş ve sonuçları harfli gösterim şeklinde ortalamaların yanında ifade edilmiştir. Hesaplamalarda ve yorumlamalarda % 5 önem düzeyi kullanılmıştır. Tüm hesaplamalar Minitab 17 istatistik paket programı ile kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

*Achillea gypsicola* türünde, in vitro şartlarda çeşitli stres faktörleri uygulanarak, sekonder metabolit birikiminin artırılması amacıyla yürütülen bu çalışma esas olarak 3 aşamadan oluşmaktadır.

İlk aşamada, *Achillea gypsicola* türünün doğal floradan toplanan tohumları in vitro koşullarda çimlendirilerek, in vitro bitkicikler elde edilmiştir.

İkinci aşamada, en iyi kallus oluşumunu sağlayacak olan eksplant kaynağı (yaprak ve gövde), besi ortamı (MS ve B5) ve besi ortamına ilave edilecek uygun hormon kombinasyonları belirlenmiştir.

Üçüncü aşamada ise, hücre süspansiyon kültürlerine uygulanan abiyotik (ışık, gümüş nitrat, kadmiyum klorit, metil jasmonat, salisilik asit ve sorbitol) ve biyotik (kitosan ve maya ekstraktı) elisitörlerin toplam fenolik madde, flavanol, flavonol, antosiyanin ve kamfor miktarı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu nedenle, araştırma bulguları ve tartışma bölümünün yazımında, yukarıda belirtilen bu 3 aşamaya uygun bir sıralama esas alınmıştır.

##### 4.1. İn Vitro Bitkiciklerin Elde Edilmesi

KNO<sub>3</sub> faktörünün 3, GA<sub>3</sub> ve bekletme süresi faktörlerinin ise 4'er seviyesinin birlikte denendiği 3 faktörlü çimlendirme denemesinde, her tekerrür için çimlenen tohum sayıları % 'ye dönüştürülmüş ve çimlenme oranı değişkeni elde edilmiştir. Çimlenme oranı (%) için yapılan varyans analizi sonucunda, KNO<sub>3</sub> x GA<sub>3</sub> x bekletme süresi üçlü interaksyonu istatistiki olarak çok önemli bulunmuştur (p<0.01). Buna uygun olarak yapılan Tukey testi sonuçları, harflendirme şeklinde, Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre KNO<sub>3</sub> çözeltilisinde bekletilen tohumların çimlenme oranları bekletme süresine, çözeltilinin konsantrasyonuna ve GA<sub>3</sub> hormonunun dozuna bağlı olarak artış göstermiştir. 48 saat süreyle ön işlem uygulanan tohumların çimlenme oranları daha yüksek olduğu, 12 saat ön işlem uygulanan tohumlarda çimlenme oranlarının ise düşük olduğu belirlenmiştir. KNO<sub>3</sub> çözeltilisinin konsantrasyonuna bağlı olarak çimlenme oranları incelendiğinde, en yüksek çimlenme oranı kontrol grubunda % 54.17 olarak gerçekleşmiş, 100 µM'lık konsantrasyonda % 89.58 ve 200 µM'lık konsantrasyonda % 100 olduğu tespit edilmiştir. Giberellik asit çözeltilisinin dozlarına

bağlı olarak yapılan değerlendirmeye göre, genel olarak 2 mg/l GA<sub>3</sub> içeren ortamlarda diğer dozlara göre daha yüksek çimlenme oranları elde edilmiştir.

Tohumlarda görülen dormansinin kırılarak çimlenme oranlarının artırılması için; GA<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub> ve soğukta katlama uygulamalarının tek tek uygulandığı gibi birlikte denendiği birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar, tohuma yapılan ön uygulamalar birlikte denendiğinde çimlenme oranlarının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Nadjafi ve ark., 2006; Rouhi ve ark., 2010; Bhardwaj ve ark., 2016). Örneğin bir çalışmada, soğukta katlama ve GA<sub>3</sub> uygulamaları tek tek denediklerinde çimlenme oranları en fazla % 68 olmasına karşın, birlikte denediklerinde % 91.66 olduğu bildirilmiştir (Zare ve ark., 2011). *Echinacea purpurea* tohumlarında yapılan bir çalışmada GA<sub>3</sub> ve soğukta katlama uygulamaları tek tek denendiğinde en yüksek çimlenme oranı % 37.90 olmasına karşın, birlikte denediklerinde bu oranın % 90.02 olduğu belirlenmiştir (Zadeh ve ark., 2015). Yapılan diğer bir araştırma KNO<sub>3</sub> ve soğukta katlamanın ayrı ayrı denendiğinde en yüksek çimlenme oranının % 32 olmasına karşın, birlikte denediklerinde bu oranın % 76'ya çıktığını ortaya koymuştur (Raisi ve ark., 2013).

**Çizelge 4.1.** Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde KNO<sub>3</sub> çözeltisinde bekletilmiş *achillea gypsicola* türüne ait tohumların farklı konsantrasyonlarda GA<sub>3</sub> içeren ortamlardaki çimlenme oranları (% ).

KNO <sub>3</sub> dozu	GA <sub>3</sub> dozu	Bekletme süresi (saat)			
		12 s	24 s	36 s	48 s
kontrol	kontrol	0.00Ca1**	12.50ABb1	12.50Bb1	29.17Ac2
	0.5 mg/l	0.00Ca1	14.58Bb2	16.67Bb2	52.08Ab2
	1 mg/l	2.08Ca2	22.92Bab2	25.00Bab3	52.08Ab2
	2 mg/l	6.25Ca2	31.25Ba2	35.42Ba3	54.17Ab2
100 µM	kontrol	4.17Ca1	18.75Bb1	20.83Bc1	81.25Ab2
	0.5 mg/l	4.17Ca12	20.83Bb12	29.17Bbc1	89.58Aa2
	1 mg/l	8.33Ca2	29.17Bab2	33.33Bb2	89.58Aa2
	2 mg/l	8.33Ca2	35.42Ba2	52.08Ba2	89.58Aa2
200 µM	kontrol	4.17Cc1	16.67B1	22.92Bc1	85.42Ab1
	0.5 mg/l	10.42Cbc1	27.08B1	35.42Bb1	85.42Ab1
	1 mg/l	18.75Dab1	56.25C1	70.83Ba1	89.58Aab1
	2 mg/l	25.00Da1	68.75C1	81.25Ba1	100.00Aa1

\*\*, (p<0.01); KNO<sub>3</sub>: Potasyum Nitrat; GA<sub>3</sub>: Gibberellik Asit; s: saat

Yatay olarak, ortak bir büyük harfi olmayan zaman ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Aynı KNO<sub>3</sub> ve GA<sub>3</sub> dozlarında dikey olarak ortak bir küçük harfi olmayan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Aynı GA<sub>3</sub> ve KNO<sub>3</sub> dozlarında dikey olarak ortak bir sayı olmayan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

## **4.2. Gövde ve Yaprak Eksplantlarından Kallusların Elde Edilmesi**

İlk dikim ortamı ile alt kültürler sonrasında yapılan incelemeler sonucunda, eksplant kaynağı olarak gövde eksplantının kullanıldığı hormon kombinasyonlarında kallus oluşum yüzdesi ve kallus ağırlığı yaprak eksplantlarına göre daha iyi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.3).

### **4.2.1. MS Ortamında Gövde ve Yaprak Eksplantlarından Kallus Oluşumu**

Araştırmada kullanılan hormon kombinasyonları ve eksplant kaynakları ile ilgili puanlamalar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

İlgili Çizelgelere göre, gövde eksplantının kullanıldığı hormon kombinasyonlarında en yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) ve kallus ağırlığı (756 mg) 0.0 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA (54 numaralı) kullanılan hormon kombinasyonundan elde edilmiştir. Yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) gösteren 88 (0.5 mg/l KİN+1.0 mg/l IBA), 55 (0.0 mg/l BAP+3.0 mg/l IBA) ve 30 (0.0 mg/l BAP+5.0 mg/l NAA) numaralı hormon kombinasyonlarında kallus ağırlığı sırasıyla 720, 714 ve 700 mg olmuştur.

Yaprak eksplantının kullanıldığı hormon kombinasyonlarında en yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) ve kallus ağırlığı (500 mg) 0.5 mg/l KİN+2.0 mg/l 2,4 D (113 numaralı) kullanılan hormon kombinasyonundan elde edilmiştir. Yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) gösteren 150 (2.0 mg/l KİN+5.0 mg/l NAA), 54 (0.0 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA) ve 89 (0.5 mg/l KİN+2 mg/l IBA) numaralı hormon kombinasyonlarında kallus ağırlığı sırasıyla 496, 456 ve 447 mg olarak tespit edilmiştir.

Her iki eksplant kaynağında da Kinetin ve IBA’nın 81-85 nolu hormon kombinasyonları ile Kinetin ve IAA’nın 166-171 nolu hormon kombinasyonlarında kallus oluşumu gözlemlenmemiştir.

**Çizelge 4.2.** *Achillea gypsicola* türünde in vitro koşullar altında MS ortamlarında yaprak ve gövde eksplantlarından oluşan kalluslar, puanlamada kullanılan kriterlere ait değerler ve puanlama

No	Yaprak			Gövde		
	KOEO (%)	Kallus A. (mg)	Yaprak P. (0-4)	KOEO (%)	Kallus A. (mg)	Gövde P. (0-4)
1	100	230	2	100	530	3
2	90	198	2	90	450	3
3	100	350	2	100	675	4
4	70	356	3	70	500	3
5	80	220	2	80	440	3
6	60	450	3	70	450	3
7	60	124	1	60	290	2
8	80	218	2	80	320	3
9	40	122	1	50	250	2
10	30	125	1	30	200	3
11	60	140	1	60	240	2
12	100	200	2	100	500	3
13	100	324	2	100	514	3
14	80	156	1	80	356	2
15	80	141	2	80	248	2
16	0	0	0	30	140	2
17	100	412	3	100	412	3
18	80	170	1	80	260	2
19	90	242	2	90	474	3
20	60	198	2	80	295	2
21	40	127	1	50	224	2
22	30	132	2	50	270	2
23	40	100	1	40	175	2
24	70	196	2	70	270	2
25	60	128	2	60	255	2
26	60	312	3	60	397	3
27	80	174	2	80	480	3
28	10	50	2	10	144	3
29	90	386	3	100	656	4
30	100	270	2	100	700	4
31	60	74	1	60	461	3
32	50	41	1	50	415	4
33	60	141	2	80	300	2
34	80	125	2	80	310	2
35	60	154	2	60	254	2
36	40	118	2	40	180	2
37	10	18	1	20	110	2
38	90	374	3	90	472	3
39	80	256	2	90	378	2
40	80	171	2	80	257	2
41	10	50	2	10	75	2
42	10	14	1	10	80	2
43	10	17	1	10	64	2
44	60	175	2	60	210	2
45	0	0	0	40	140	2
46	20	47	1	30	100	2
47	80	132	2	80	304	2
48	50	047	1	50	140	2
49	50	142	2	50	142	2
50	10	28	1	10	54	2



**Çizelge 4.2.** *Achillea gypsicola* türünde in vitro koşullar altında MS ortamlarında yaprak ve gövde eksplantlarından oluşan kalluslar, puanlamada kullanılan kriterlere ait değerler ve puanlama (devamı).

51	60	140	2	60	190	2
52	10	035	1	20	100	2
53	10	284	3	30	200	3
54	100	456	3	100	756	4
55	100	400	3	100	714	4
56	30	178	2	30	178	2
57	70	263	2	70	278	2
58	60	249	2	60	245	2
59	100	294	2	100	541	3
60	100	377	3	100	682	4
61	40	54	1	40	156	2
62	80	102	1	80	413	3
63	50	75	1	60	176	2
64	60	81	1	60	165	2
65	70	141	2	70	200	2
61	40	54	1	40	156	2
62	80	102	1	80	413	3
63	50	75	1	60	176	2
64	60	81	1	60	165	2
65	70	141	2	70	200	2
66	10	43	1	10	50	2
67	0	0	0	10	42	2
68	60	87	1	60	347	3
69	10	29	1	10	68	3
70	20	43	1	20	120	3
71	60	137	2	60	250	2
72	50	52	1	60	294	2
73	20	32	1	50	273	2
74	100	294	2	100	621	3
75	60	164	2	70	300	2
76	60	200	2	60	224	2
77	60	120	1	70	325	2
78	10	35	1	20	70	2
79	10	28	1	20	50	2
80	70	220	2	70	270	2
81	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0
83	0	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0	0
86	80	140	1	80	257	2
87	50	100	1	50	190	2
88	100	434	3	100	720	4
89	100	447	3	100	649	4
90	90	241	2	90	277	2
91	0	0	0	20	105	2
92	0	0	0	30	97	2
93	60	170	2	60	240	2
94	50	67	1	50	185	2
95	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0
97	0	0	0	0	0	0
98	0	0	0	0	0	0
99	10	43	1	20	90	2
100	10	124	2	20	75	2
101	0	0	0	0	0	0
102	100	300	2	100	400	2
103	70	288	2	80	351	2
104	80	250	2	80	305	2
105	90	316	3	90	457	3
106	70	220	2	70	309	3
107	50	150	2	60	255	2
108	60	144	2	70	344	2
109	50	27	1	50	200	2
110	60	223	3	70	250	2

**Çizelge 4.2.** *Achillea gypsicola* türünde in vitro koşullar altında MS ortamlarında yaprak ve gövde eksplantlarından oluşan kalluslar, puanlamada kullanılan kriterlere ait değerler ve puanlama (devamı).

111	90	214	2	90	300	2
112	60	140	2	60	195	2
113	100	500	3	100	620	3
114	60	198	2	60	200	2
115	60	156	2	80	190	2
116	20	40	1	70	201	2
117	90	247	2	90	300	2
118	80	254	2	90	302	2
119	80	200	2	80	260	2
120	100	237	2	100	324	2
121	100	198	1	100	358	2
122	100	256	2	100	295	2
123	100	242	2	100	514	3
124	80	175	2	80	200	2
125	70	100	1	80	198	2
126	20	51	1	20	81	2
127	30	54	1	40	144	2
128	20	39	1	20	89	2
129	80	98	1	80	332	2
130	70	195	2	70	212	2
131	40	48	1	40	157	2
132	20	34	1	30	105	2
133	30	52	2	30	095	2
134	30	37	1	30	117	2
135	50	58	2	50	215	2
136	60	82	1	60	227	2
137	100	440	3	100	600	3
138	100	251	2	100	675	3
139	100	248	2	100	463	2
140	80	418	3	80	374	3
141	60	74	1	60	184	2
142	100	257	2	100	304	2
143	80	212	2	80	247	2
144	100	370	3	100	704	4
145	100	442	3	100	676	4
146	80	188	2	80	557	3
147	70	137	2	70	203	2
148	100	235	2	100	635	3
149	100	186	2	100	614	3
150	100	496	3	100	578	3
151	0	0	0	30	0	2
152	0	0	0	40	140	2
153	0	0	0	30	102	2
154	20	40	1	20	79	2
155	80	321	3	30	110	3
156	10	27	1	10	46	2
157	80	190	2	80	468	3
158	40	60	1	40	164	2
159	60	185	2	60	306	2
160	60	118	1	60	273	2
161	80	218	2	80	400	3
162	10	20	1	10	60	2
163	20	65	1	20	120	2
164	0	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0
166	0	0	0	0	0	0
167	0	0	0	0	0	0
168	0	0	0	0	0	0
169	0	0	0	0	0	0
170	0	0	0	0	0	0
171	0	0	0	0	0	0
172	40	120	2	70	254	2
173	10	10	1	20	158	2
174	60	127	2	80	346	2

**Çizelge 4.2.** *Achillea gypsicola* türünde in vitro koşullar altında MS ortamlarında yaprak ve gövde eksplantlarından oluşan kalluslar, puanlamada kullanılan kriterlere ait değerler ve puanlama (devamı).

175	10	28	1	20	94	2
176	10	20	1	30	117	2
177	20	30	1	30	150	2
178	50	128	2	50	243	2
179	40	21	1	50	200	2
180	30	30	1	50	184	2

KOEO: Kallus Oluşturan Eksplant Oranı; A: Ağırlık; P: Puan

#### 4.2.2. B5 Ortamında Gövde ve Yaprak Eksplantlarından Kallus Oluşumu

Araştırmada B5 ortamında kullanılan hormon kombinasyonları ve eksplant kaynakları ile ilgili puanlamalar Çizelge 4.3’de verilmiştir. Buna göre, gövde eksplantının kullanıldığı hormon kombinasyonlarında en yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) ve kallus ağırlığı (1600 mg) 0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA (32 numaralı) kullanılan hormon kombinasyonundan elde edilmiştir. Yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) gösteren 35 (0.5 mg/l BAP+5.0 mg/l NAA), 34 (0.5 mg/l BAP+2.0 mg/l NAA) ve 33 (0.5 mg/l BAP+1 mg/l NAA) numaralı hormon kombinasyonlarında kallus ağırlığı sırasıyla 1540, 1526 ve 1510 mg olarak tespit edilmiştir.

Yaprak eksplantının kullanıldığı hormon kombinasyonlarında en yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) ve kallus ağırlığı (937 mg) 0.0 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA (54 numaralı) kullanılan hormon kombinasyonundan elde edilmiştir. Yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) gösteren 55 (0.0 mg/l BAP+3.0 mg/l IBA), 128 (0 mg/l KİN+1.0 mg/l NAA) ve 60 (0.5 mg/l BAP+3.0 mg/l IBA) numaralı hormon kombinasyonlarında kallus ağırlığı sırasıyla 850, 754 ve 742 mg olarak tespit edilmiştir.

Her iki eksplant kaynağında da Kinetin ve IAA’nın 169-180 nolu hormon kombinasyonlarında kallus oluşumu gözlemlenmemiştir.

Araştırmada kullanılan iki temel besi ortamından (MS ve B5) en yüksek kallus oluşum yüzdesi (% 100) ve kallus ağırlığı 1600 mg ile eksplant kaynağı olarak gövde segmenti kullanılan B5 ortamından elde edilmiştir. Aynı besi ortamında eksplant kaynağı olarak yaprak kullanılan uygulamada ise en yüksek kallus ağırlığı (54 numaralı hormon kombinasyonu) 937 mg ile tespit edilmiştir.

Konuyla ilgili daha önce yapılan birçok araştırma sonucu kullanılan besi ortamının, hormon ya da hormon kombinasyonunun ve eksplant kaynağının kallus oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir (Kumar ve ark., 2014; Hariprasath ve ark., 2015; Vinothkumar ve Senthilkumar, 2015; Dhas ve ark., 2016; Gehlot ve ark., 2017; Jin ve ark., 2017a; Krishnan ve Siril, 2017; Kumari ve ark., 2017; Purak ve ark., 2017; Thakur ve Kanwar, 2017). İn vitro koşullarda eksplant kaynaklarından optimum kallus oluşumu türlere göre en uygun eksplant (kök, gövde, yaprak, hipokotil ve epikotilon) kaynağının seçilmesiyle, uygun besi (MS, B5, SH, LS ve NN) ortamının kullanılmasıyla ve son olarak ta doğru hormon ya da hormon kombinasyonlarıyla (sitokinin+oksin) sağlanır.

Bugüne kadar birçok türde kallus oluşumunun indüklenmesi için pek çok araştırma yürütülmüştür. Bu çalışmaların çoğunda gövde eksplantları kallus oluşumunu yaprağa göre daha fazla indüklerken, bazılarında yaprak eksplantlarının daha fazla kallus oluşumunu indüklediği rapor edilmiştir (Sahu ve ark., 2012; Bakar ve ark., 2014; Khanpour-Ardestani ve ark., 2015; Kumari ve ark., 2015; Zinhari ve ark., 2016; Asakura ve Hoshino, 2017; Dilaver ve ark., 2017; Elangomathavan ve ark., 2017; Farvardin ve ark., 2017; Hosseini ve ark., 2017; Thokchom ve Maitra, 2017).

**Çizelge 4.3.** *Achillea gypsicola* türünde in vitro koşullar altında B5 ortamlarında yaprak ve gövde eksplantlarından oluşan kalluslar, puanlamada kullanılan kriterlere ait değerler ve puanlama

No	Yaprak			Gövde		
	KOEO (%)	Kallus A. (mg)	Yaprak P. (0-4)	KOEO (%)	Kallus A. (mg)	Gövde P. (0-4)
1	90	260	2	100	574	3
2	90	247	2	90	557	3
3	80	220	2	100	362	2
4	70	217	2	70	500	3
5	80	209	2	80	554	3
6	50	160	2	100	905	4
7	60	90	1	100	952	4
8	90	300	2	100	990	4
9	90	47	1	100	1.000	4
10	90	85	1	100	1.008	4
11	60	40	1	90	732	3
12	100	312	2	100	653	3
13	100	324	2	100	743	3
14	80	148	1	80	300	2
15	80	347	2	80	276	2
16	70	100	1	30	143	2
17	100	379	2	100	768	3
18	80	173	1	80	203	2
19	90	325	2	90	690	3
20	60	190	2	80	335	2
21	50	113	1	50	258	2
22	60	200	2	50	220	2
23	50	136	1	40	196	2
24	70	264	2	70	260	2
25	60	220	2	60	277	2
26	60	258	2	60	500	3
27	80	204	2	80	593	3
28	80	167	2	100	796	3
29	90	512	3	100	951	4
30	100	277	2	100	674	3
31	100	548	3	100	1.030	4
32	100	600	4	100	1.600	4
33	100	632	4	100	1.510	4
34	100	700	4	100	1.526	4
35	100	576	3	100	1.540	4
36	40	133	2	80	345	2
37	40	76	1	80	400	2
38	90	698	3	90	760	3
39	80	247	2	90	300	2
40	80	280	2	80	264	2
41	50	103	2	60	225	2
42	40	70	1	50	72	2
43	40	80	1	70	190	2
44	60	200	2	60	204	2
45	40	79	1	80	327	2
46	20	65	1	70	268	2
47	80	320	2	80	330	2
48	50	192	1	70	200	2
49	50	170	2	60	275	2
50	50	60	1	60	180	2
51	60	92	2	60	240	2
52	70	118	1	80	400	2
53	70	468	3	80	684	3
54	100	937	3	100	1.100	4
55	100	850	3	100	1.084	4
56	100	351	2	100	800	3
57	100	257	2	100	745	3
58	100	300	2	100	778	3
59	100	302	2	100	900	3
60	100	742	3	100	1.000	4

**Çizelge 4.3.** *Achillea gypsicola* türünde in vitro koşullar altında B5 ortamlarında yaprak ve gövde eksplantlarından oluşan kalluslar, puanlamada kullanılan kriterlere ait değerler ve puanlama (devamı).

61	40	50	1	70	194	2
62	80	123	1	80	523	3
63	50	72	1	60	158	2
64	60	93	1	60	179	2
65	70	236	2	70	200	2
66	50	49	1	50	106	2
67	50	80	1	50	152	2
68	60	98	1	60	362	3
69	60	74	1	70	400	3
70	70	100	1	70	410	3
71	60	194	2	60	270	2
72	50	103	1	60	245	2
73	20	42	1	90	368	2
74	100	304	2	100	621	3
75	60	166	2	80	273	2
76	60	200	2	60	200	2
77	60	100	1	70	332	2
78	70	90	1	60	194	2
79	70	90	1	70	250	2
80	70	208	2	70	200	2
81	60	73	1	70	263	2
82	70	164	2	80	200	2
83	50	92	1	80	174	2
84	50	100	1	80	280	2
85	60	73	1	70	255	3
86	80	82	1	80	257	2
87	50	57	1	90	240	2
88	100	553	3	100	734	3
89	100	600	3	100	650	3
90	90	270	2	90	208	2
91	60	104	1	70	114	2
92	70	116	1	60	200	2
93	70	100	1	70	203	2
94	70	206	2	70	197	2
95	60	84	1	80	300	2
96	60	72	1	70	314	2
97	60	70	1	70	281	2
98	70	63	1	90	246	2
99	70	100	1	90	182	2
100	70	362	3	100	649	3
101	60	200	2	60	185	2
102	60	267	2	80	264	2
103	60	105	1	70	300	2
104	80	252	2	90	300	2
105	80	300	2	90	248	2
106	80	198	2	80	142	2
107	80	176	2	100	304	2
108	80	100	1	100	257	2
109	100	220	2	100	300	2
110	100	255	2	100	493	3
111	100	438	3	80	574	3
112	100	400	3	80	500	3
113	100	480	3	90	430	2
114	100	520	3	100	800	3
115	100	536	3	100	394	2
116	80	134	1	80	335	2
117	50	223	2	70	317	2
118	40	134	1	60	202	2
119	20	77	1	60	245	2
120	30	108	2	70	250	2
121	30	80	1	80	200	2
122	50	170	2	80	270	2
123	100	543	3	100	826	3
124	60	184	2	70	191	2
125	60	200	2	80	170	2

**Çizelge 4.3.** *Achillea gypsicola* türünde in vitro koşullar altında B5 ortamlarında yaprak ve gövde eksplantlarından oluşan kalluslar, puanlamada kullanılan kriterlere ait değerler ve puanlama (devamı).

126	70	257	2	100	1.200	4
127	70	300	2	100	1.081	4
128	80	754	3	100	1.175	4
129	100	479	2	100	1.000	4
130	80	556	3	100	1.080	4
131	100	120	1	100	324	2
132	100	205	2	100	284	2
133	100	241	2	100	412	3
134	80	236	2	80	308	2
135	70	99	1	80	208	2
136	100	315	2	100	570	3
137	100	306	2	100	990	4
138	90	272	2	100	1.114	4
139	90	204	2	100	912	3
140	90	287	2	100	845	3
141	40	66	1	40	180	2
142	20	44	1	30	104	2
143	30	100	2	30	85	2
144	30	89	1	30	106	2
145	50	194	2	50	200	2
146	100	500	3	100	600	3
147	60	207	2	90	334	2
148	60	228	2	80	307	2
149	20	60	1	90	274	2
150	90	253	2	90	300	2
151	80	300	2	90	290	2
152	80	271	2	80	240	2
153	70	209	2	90	510	3
154	100	300	2	80	302	2
155	100	104	1	90	300	2
156	100	178	2	100	293	2
157	100	254	2	100	578	3
158	80	200	2	80	193	2
159	70	93	1	80	230	2
160	20	78	1	20	100	2
161	30	90	1	40	162	2
162	20	47	1	20	73	2
163	80	120	1	80	320	2
164	70	276	2	70	271	2
165	60	87	1	60	238	2
166	20	84	1	30	105	2
167	30	130	2	30	178	2
168	30	44	1	30	146	2
169	0	0	0	0	0	0
170	0	0	0	0	0	0
171	0	0	0	0	0	0
172	0	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0	0	0
174	0	0	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0	0
176	0	0	0	0	0	0
177	0	0	0	0	0	0
178	0	0	0	0	0	0
179	0	0	0	0	0	0
180	0	0	0	0	0	0

KOEO: Kallus Oluşturan Eksplant Oranı; A: Ağırlık; P: Puan

### 4.3. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Uygulamalar

*Achillea gypsicola* türünde hücrelerde sekonder metabolit birikimini artırmaya yönelik olarak ışık, kadmiyum klorit, gümüş nitrat, metil jasmonat, sorbitol, salisilik asit, kitosan ve maya gibi farklı stres elisitörleri kullanılmıştır. Bu uygulamaların, toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve kamfor miktarı, hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine olan etkilerine ilişkin bulgular, istatistik analiz sonuçları ve bunların tartışması alt başlıklar halinde sunulmuştur.

#### 4.3.1. Işık Uygulaması

Işık uygulamasının toplam fenolik madde (mg/g YHA), toplam flavanol (mg/g YHA), toplam flavonol (mg/g YHA), toplam antosiyanin (RD/g YHA), kamfor miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ), hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığı (g/l) üzerine etkisinin istatistiki olarak önemli olduğu ( $p < 0.01$ ) tespit edilmiştir. Buna uygun olarak hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, ilgili Çizelgelerde (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7, Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10) ayrıntılı şekilde verilmiştir. Buna karşılık aydınlık uygulamasının hücre canlılığı (%) üzerine etki göstermediği ve farklı aydınlık uygulama süreleri arasında hücre canlılığı açısından önemli farklılıkların olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.11).

Toplam fenolik madde miktarı (mg/g YHA), uygulama periyodu süresine bağlı olarak, hem karanlık koşullarda hem de aydınlık ortamda düzenli olarak artış göstermiştir. Karanlık ortamda başlangıç kültüründe toplam fenolik madde miktarı ortalama 0.7720 mg/g iken, 12. gün sonunda 0.9543 mg/g'a çıkmıştır. Işık uygulamasında ise başlangıç kültüründe 0.7744 mg/g olan fenolik madde birikimi 6. gün sonunda 0.9743 mg/g'a ve 12. gün sonunda ise % 29.25 artarak 0.9978 mg/g'a yükselmiştir. Karanlık ve aydınlık ortamlarda en yüksek fenolik madde birikimi 12. gün sonunda görülürken, aydınlık ortamda biriken fenolik madde miktarının karanlık ortama göre 0.0435 mg/g daha fazla olduğu belirlenmiştir. Aydınlık ve karanlık uygulamaları arasında fenolik madde birikiminin en fazla olduğu zaman dilimini, 0.1607 mg/g'lık artış ile, 3. ve 6. gün arasındaki aydınlık dönem oluşturmuştur (Çizelge 4.4).

Aydınlık ve karanlık ortamlar kıyaslandığında, flavanol birikimi (mg/g YHA)'nin en fazla aydınlık ortamlarda olduğu ve flavanol birikiminin 1. günden başlayarak önemli ölçüde artışlar gösterdiği belirlenmiştir. Aydınlık koşullarda başlangıç kültüründe



0.0160 mg/g olan flavanol miktarı, 12. gün sonunda 4.9 kat artarak, 0.0725 mg/g'a yükselmiştir. Karanlık koşullarda başlangıç kültüründe 0.0123 mg/g olan flavanol miktarı, 12. gün sonunda 3,35 kat artarak 0.0535 mg/g'a ulaşmıştır. Aydınlik ve karanlık uygulamaları arasında flavanol birikiminin en fazla olduğu zaman diliminin 0.0213 mg/g'lık artış ile 3. ile 6. gün arasındaki aydınlık dönem olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Toplam flavonol birikimi (mg/g YHA), örnekleme zamanına bağlı olarak, karanlık ve aydınlık ortamlarda genel olarak artış göstermiştir. Karanlık ortamda başlangıç kültüründe toplam flavonol miktarı 0.0417 mg/g iken, 3. gün sonunda 0.0488 mg/g'a, ve 12. gün sonunda ise 0.0654 mg/g'a ulaşmıştır. Işık uygulamasında başlangıç kültüründe 0.0434 mg/g olan flavonol miktarı, 3. gün sonunda 0.0564 mg/g'a, ve 12. gün sonunda ise 0.0814 mg/g'a çıkmıştır. Aydınlik ve karanlık ortamlar mukayese edildiğinde; flavonol birikiminde ışık uygulamalarının % 53.24 daha etkin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.7'de verilen toplam antosiyanin birikimi ile ilgili sonuçlar incelendiğinde, karanlık ortamlarda örnek alım zamanlarının antosiyanin miktarı üzerine önemli bir etki oluşturmadığı belirlenmiştir. Aydınlik ve karanlık ortamlar kıyaslandığında antosiyanin birikiminin 0.0097 RD/g ile en fazla aydınlıkta, en düşük değerin ise 0.0058 RD/g ile karanlıkta inkübe edilen hücrelerde gerçekleştiği belirlenmiştir.

Aydınlık ortamda kültüre edilen hücrelerde, başlangıç kültüründen itibaren kamfor miktarının önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Başlangıç kültüründe 0.7162 µg/g olan kamfor miktarı, uygulamadan 3 gün sonra 0.9693 µg/g'a, 6 gün sonra 1.1173 µg/g'a ve 12 gün sonrasında ise % 111.77 artarak 1.5167 µg/g'a yükselmiştir. Karanlıkta inkübe edilen hücrelerde ise en yüksek kamfor birikimi 12. gün sonunda 1.1153 µg/g olarak gerçekleşmiştir. Bu değer aydınlık koşullarda 6. gün sonunda hasat edilen hücrelerdeki kamfor miktarına (1.1173 µg/g) yakın olup aynı istatistikî önemlilik derecesine sahiptir. Aydınlik ve karanlık uygulamaları arasında kamfor birikiminin en fazla olduğu zaman dilimini ise 0.3994 mg/g'lık artış ile 6. ile 12. gün arasındaki aydınlık koşullardaki dönem oluşturmuştur.

Hücre sayısı bakımından aydınlık ve karanlık ortamların karşılaştırılmasına göre, en fazla hücre sayısının aydınlık ortamlarda olduğu ve bu sayının 1. günden başlayarak

önemli ölçüde artışlar gösterdiği tespit edilmiştir. Aydınlik koşullarda, başlangıç kültüründe 85300 olan ortalama hücre sayısı, 3. gün sonunda 94100'e, 6. gün sonunda 99100'e ve 12. gün sonunda da 104300'e ulaştığı belirlenmiştir. En düşük hücre sayısı ise, aynı istatistiki grupta yer alan, karanlık ve aydınlık uygulamalarının başlangıç kültürlerinden (sırasıyla, 84100 ve 85300) elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Hücre kuru ağırlığının (g/l), örnek alma zamanına bağlı olarak, aydınlık ve karanlık koşulların her ikisinde de artış gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek hücre kuru ağırlığı (sırasıyla; 13.7219 g/l ve 13.3981 g/l) 6 ve 12 gün aydınlıkta inkübe edilen hücrelerden elde edilirken, karanlıkta inkübe edilen hücrelerde bu değer en fazla 12.128 g/l ile 12. günde belirlenmiştir. Işık ve karanlık uygulamaları arasında hücre kuru ağırlığının en fazla olduğu zaman dilimini 1.3374 mg/g'lık artış ile 1. ile 2. gün aydınlık dönemleri arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Hücre süspansiyon kültürleri, mevsimsel ve çevresel faktörlerden bağımsız olarak, ekonomik değeri yüksek olan fitokimyasalların ticari üretimi açısından oldukça basit ve etkin bir sistem sunarlar (Srivastava ve ark., 2011). Işık, bitkilerin büyüme, gelişme ve metabolizmasını düzenleyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Işık, kırmızı ve kırmızı ötesi ışık algılayan çeşitli fotoreseptörler yoluyla bitkiler tarafından algılanır (Demarsy ve Fankhauser, 2009; Nagatani, 2010; Chaves ve ark., 2011; Heijde ve Ulm, 2012). Bitki hücrelerinin ışığa tepkileri ise PAP proteinleri ile bağlantılı olan COP1/SPA proteinlerinin etkileşimleri gerçekleşir. Karanlıkta ise bu iki protein ubiquitin ligaz tarafından baskılanır. Işıklı ortamlarda SPA proteinlerinden olan SPA1 ve SPA2 istikrarsızlaşmasına dolayısıyla COP1 proteininin daha etkin olmasına neden olur (Shalitin ve ark., 2002; Seo ve ark., 2004; Hoecker, 2005; Yi ve Deng, 2005; Lillo ve ark., 2008; Shi ve Xie, 2010; Chen ve ark., 2010; Jang ve ark., 2010; Balcerowicz ve ark., 2011; Lian ve ark., 2011; Liu ve ark., 2011; Zuo ve ark., 2011; Weidler ve ark., 2012). Bu durum fototropizma ve çiçeklenme indüksiyonu gibi gelişme ve büyüme tepkilerinin yanı sıra klorofil ve antosiyaninlerin biyosentezi gibi çeşitli metabolizma faaliyetlerine neden olur (Kami ve ark., 2010). Işık sadece fotosentez, büyüme ve gelişmede etkili değildir, aynı zamanda hücre kültürlerinde PAL aktivitesini artırarak primer ve sekonder metabolitlerin biyosentezinde önemli bir işleve sahiptir (Liu ve ark., 2002; Halliday ve Fankhauser, 2003; Hemm ve ark., 2004; Abbasi ve ark., 2007; Khan ve ark., 2013; Murthy ve ark., 2014).

Bitkilerdeki birçok fenolik bileşik, kafeik asit, sinnamik asit, flavonoidler, antosiyaninler ve kafeik asit türevleri (cichoric asit, caftaric asit, chlorogenic asit ve caffeic asit) PAL tarafından başlatılan fenilpropanoid yolla üretilir (Boudet, 2000; Winkel-Shirley, 2001; Jenkins ve ark., 2001; Zhao ve ark., 2001; Reyes ve Cisneros-Zevallos, 2003; Hemm ve ark., 2004; Liu ve ark., 2006; Shohael ve ark., 2006; Sreelakshmi ve Sharma, 2008). Konuyla ilgili daha önce yapılan çalışmalarda (Zhao ve ark., 2010b; Ali ve Abbasi, 2014; Tariq ve ark., 2014; Georgieva ve ark., 2015; Ahmad ve ark., 2016) aydınlık koşulların karanlık koşullara göre hücre kuru ağırlığını, toplam fenolik madde, toplam antosiyanin, toplam flavanol, toplam flavonol ve diğer aktif bileşenlerin miktarını artırdığı ortaya konmuştur.

**Çizelge 4.4.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Işık Uygulamaları ve Örnek Alma Z.	Tanıtıcı İstatistikler				
	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Minumum	Maksimum
1.gün (karanlık)	0.7720f**	0.0007	0.0012	0.7710	0.7734
2.gün (karanlık)	0.7744f	0.0023	0.0036	0.7719	0.7785
3.gün (karanlık)	0.7863ef	0.0017	0.0025	0.7839	0.7919
6.gün (karanlık)	0.9187c	0.0005	0.0004	0.9100	0.9346
12.gün (karanlık)	0.9543b	0.0117	0.0208	0.9440	0.9660
1.gün (aydınlık)	0.7744f	0.0036	0.0067	0.7719	0.7785
2.gün (aydınlık)	0.8021d	0.0013	0.0023	0.8000	0.8046
3.gün (aydınlık)	0.8136b	0.0003	0.0006	0.8130	0.8142
6.gün (aydınlık)	0.9743ab	0.0119	0.0206	0.9530	0.9940
12.gün (aydınlık)	0.9978a	0.0036	0.0063	0.9914	1.0040

\*\* , Ortak harfi olmayan ortalamala değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

**Çizelge 4.5.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıttıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Işık Uygulamaları ve Örnek Alma Z.	Tanıtıcı İstatistikler				
	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Minumum	Maksimum
1.gün (karanlık)	0.0123f**	0.0015	0.0025	0.0100	0.0150
2.gün (karanlık)	0.0160f	0.0010	0.0022	0.0140	0.0200
3.gün (karanlık)	0.0210ef	0.0018	0.0025	0.0204	0.0227
6.gün (karanlık)	0.0333cd	0.0005	0.0010	0.0310	0.0350
12.gün (karanlık)	0.0535b	0.0005	0.0008	0.0437	0.0590
1.gün (aydınlık)	0.0160f	0.0004	0.0015	0.0140	0.0200
2.gün (aydınlık)	0.0267de	0.0022	0.0038	0.0240	0.0310
3.gün (aydınlık)	0.0380c	0.0006	0.0010	0.0370	0.0390
6.gün (aydınlık)	0.0593b	0.0005	0.0009	0.0584	0.0601
12.gün (aydınlık)	0.0725a	0.0008	0.0015	0.0712	0.0741

\*\* , Ortak harfi olmayan ortalamala değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

**Çizelge 4.6.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıttıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Işık Uygulamaları ve Örnek Alma Z.	Tanıtıcı İstatistikler				
	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Minumum	Maksimum
1.gün (karanlık)	0.0417e**	0.0004	0.0008	0.0410	0.0425
2.gün (karanlık)	0.0434de	0.0002	0.0004	0.0430	0.0438
3.gün (karanlık)	0.0488d	0.0003	0.0007	0.0454	0.0543
6.gün (karanlık)	0.0485de	0.0003	0.0004	0.0453	0.0548
12.gün (karanlık)	0.0654b	0.0005	0.0004	0.0640	0.0657
1.gün (aydınlık)	0.0434e	0.0005	0.0009	0.0430	0.0438
2.gün (aydınlık)	0.0448de	0.0003	0.0006	0.0443	0.0454
3.gün (aydınlık)	0.0564d	0.0004	0.0007	0.0557	0.0571
6.gün (aydınlık)	0.0610bc	0.0002	0.0004	0.0607	0.0614
12.gün (aydınlık)	0.0814a	0.0005	0.0009	0.0806	0.0823

\*\* , Ortak harfi olmayan ortalamala değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

**Çizelge 4.7.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Işık Uygulamaları ve Örnek Alma Z.	Tanıtıcı İstatistikler				
	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
1.gün (karanlık)	0.0058c**	0.0002	0.0003	0.0055	0.0061
2.gün (karanlık)	0.0059c	0.0003	0.0005	0.0051	0.0068
3.gün (karanlık)	0.0063bc	0.0001	0.0002	0.0055	0.0070
6.gün (karanlık)	0.0073bc	0.0004	0.0004	0.0078	0.0066
12.gün (karanlık)	0.0074bc	0.0001	0.0002	0.0070	0.0078
1.gün (aydınlık)	0.0059c	0.0001	0.0003	0.0051	0.0068
2.gün (aydınlık)	0.0067bc	0.0001	0.0001	0.0066	0.0068
3.gün (aydınlık)	0.0073bc	0.0002	0.0004	0.0069	0.0077
6.gün (aydınlık)	0.0080ab	0.0002	0.0004	0.0077	0.0084
12.gün (aydınlık)	0.0097a	0.0001	0.0003	0.0094	0.0099

\*\* , Ortak harfi olmayan ortalamala değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

**Çizelge 4.8.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına (µg/g) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Işık Uygulamaları ve Örnek Alma Z.	Tanıtıcı İstatistikler				
	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Minumum	Maksimum
1.gün (karanlık)	0.7108e**	0.0006	0.0010	0.7100	0.7120
2.gün (karanlık)	0.7162e	0.0020	0.0054	0.7103	0.7184
3.gün (karanlık)	0.7841De	0.0030	0.0036	0.7183	0.8540
6.gün (karanlık)	0.9955c	0.0024	0.0044	0.9902	0.9983
12.gün (karanlık)	1.1153b	0.0054	0.0160	1.1020	1.1240
1.gün (aydınlık)	0.7162e	0.0418	0.0725	0.7103	0.7200
2.gün (aydınlık)	0.8269d	0.0025	0.0043	0.8220	0.8300
3.gün (aydınlık)	0.9693c	0.0028	0.0049	0.9640	0.9735
6.gün (aydınlık)	1.1173b	0.0087	0.0151	1.1000	1.1280
12.gün (aydınlık)	1.5167a	0.0418	0.0725	1.4540	1.5960

\*\* , Ortak harfi olmayan ortalamala değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).



**Çizelge 4.9.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Işık Uygulamaları ve Örnek Alma Z.	Tanıtıcı İstatistikler				
	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Minumum	Maksimum
1.gün (karanlık)	84100f**	176.40	305.50	83800	84400
2.gün (karanlık)	85350f	529.30	740.20	85360	85340
3.gün (karanlık)	86120f	540.50	848.30	86100	86140
6.gün (karanlık)	92560de	544.10	831.50	92400	92720
12.gün (karanlık)	96920bc	166.20	355.20	96440	97400
1.gün (aydınlık)	85300f	569.60	986.60	84400	85860
2.gün (aydınlık)	89900e	541.90	938.50	89400	91000
3.gün (aydınlık)	94100cd	503.30	871.80	93100	94600
6.gün (aydınlık)	99100b	176.40	305.50	98800	99400
12.gün (aydınlık)	104300a	569.60	986.60	103200	105000

\*\* , Ortak harfi olmayan ortalamala değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0.01$ ).

**Çizelge 4.10.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Işık Uygulamaları ve Örnek Alma Z.	Tanıtıcı İstatistikler				
	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Minumum	Maksimum
1.gün (karanlık)	10.2406d**	0.0015	0.0026	10.2384	10.2435
2.gün (karanlık)	10.2468d	0.0023	0.0040	10.2443	10.2514
3.gün (karanlık)	10.5972d	0.1339	0.2319	10.4346	10.7140
6.gün (karanlık)	11.7550bc	0.0622	0.1077	11.4700	12.3002
12.gün (karanlık)	12.1280b	0.0471	0.0815	12.0840	12.2000
1.gün (aydınlık)	10.2468c	0.0827	0.1164	10.2443	10.2514
2.gün (aydınlık)	11.5842c	0.1127	0.1345	11.4500	11.8520
3.gün (aydınlık)	12.2083b	0.0622	0.0901	12.0840	12.2730
6.gün (aydınlık)	13.3981a	0.0442	0.0623	13.3040	13.4453
12.gün (aydınlık)	13.7219a	0.0801	0.1387	13.6389	13.8820

\*\* , Ortak harfi olmayan ortalamala değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

**Çizelge 4.11.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde ışık uygulamalarının (karanlık ve aydınlık) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına ( % ) etkileri için tanımcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Işık Uygulamaları ve Örnek Alma Z.	Tanımcı İstatistikler				
	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Minumum	Maksimum
1.gün (karanlık)	98.370	0.0670	0.1150	98.2400	98.4600
2.gün (karanlık)	97.673	0.6240	1.1360	96.4500	98.7500
3.gün (karanlık)	97.337	0.6820	1.1820	98.0200	98.8600
6.gün (karanlık)	97.443	0.3400	0.2230	96.4400	98.8200
12.gün (karanlık)	98.407	0.5270	1.2620	96.7400	98.6400
1.gün (aydınlık)	97.673	0.6070	1.1160	96.2500	98.4700
2.gün (aydınlık)	97.443	0.5420	1.2200	96.4500	98.7500
3.gün (aydınlık)	98.407	0.2450	0.4240	98.0200	98.8600
6.gün (aydınlık)	97.873	0.7290	1.2620	96.4400	98.8200
12.gün (aydınlık)	97.950	0.6070	1.0510	96.7400	98.6400

#### 4.2.2. Kadmiyum Klorit Uygulaması

Kadmiyum klorit uygulamasının toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve kamfor miktarı ile hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığı üzerine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuş ( $p < 0.01$ ), fakat örnek alım zamanlarının etkisi önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.12, Çizelge 4.13, Çizelge 4.14, Çizelge 4.15, Çizelge 4.16, Çizelge 4.17 ve Çizelge 18). Hücre canlılığı için yapılan varyans analizi sonucunda ise, kadmiyum klorit dozu x örnek alım zamanı (doz x süre) interaksyonu önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.19 verilmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı açısından, kadmiyum klorit uygulamasının 5  $\mu\text{M}$  (0.6390 mg/g) dozu ile kontrol (0.6390 mg/g) uygulaması arasında önemli bir değişiklik olmamıştır. Ancak, 25  $\mu\text{M}$  (0.6866 mg/g) ve 50  $\mu\text{M}$  (0.6507 mg/g) kadmiyum klorit dozlarında fenolik madde birikiminde önemli artışlar görülmüştür. Kadmiyum klorit uygulamasının 25  $\mu\text{M}$  dozunda fenolik madde birikimi kontrol kültürüne göre 0.0476 mg/g artmasına karşın, 50  $\mu\text{M}$  dozunda bu artış daha az olup 0.0117 mg/g olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.13'de verilen bulgular, kadmiyum klorit uygulanmayan kontrol (0.0108 mg/g) grubu ile 5  $\mu\text{M}$  (0.0115 mg/g) ve 50  $\mu\text{M}$  (0.0117 mg/g) dozları arasında toplam flavanol birikimi açısından istatistiki olarak önemli bir değişiklik oluşmadığını ortaya koymaktadır. Kadmiyum klorit'in 25  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ise istatistiksel olarak önemli bir artış sağlamış ve toplam flavanol miktarını kontrol kültürüne göre 0.0036 mg/g artırarak 0.0144 mg/g'a çıktığı tespit edilmiştir.

Toplam flavonol birikimi yönünden, kadmiyum klorit uygulamasının 5  $\mu\text{M}$  (0.0433 mg/g) ve 50  $\mu\text{M}$  (0.0421 mg/g) dozları ile kontrol (0.0430 mg/g) uygulaması arasında istatistiki olarak önemli farklılığın olmadığı her üç uygulamanın aynı istatistiki grup içerisinde yer almış olduğu belirlenmiştir. Kadmiyum klorit'in 25  $\mu\text{M}$ 'lık dozu ise istatistiksel olarak önemli bir artış sağlamış ve toplam flavonol miktarını kontrol kültürüne göre 0.0031 mg/g artırarak 0.0461 mg/g'a çıkarmış olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Bundan önceki özelliklerde olduğu gibi, Kadmiyum klorit uygulamasının kontrol (0.0056 RD/g) grubu ile 5  $\mu$ M (0.0054 RD/g) ve 50  $\mu$ M (0.045 RD/g) dozları toplam antosiyanin birikiminde istatistiki olarak önemli bir değişiklik oluşturmadığı ve aynı istatistiki grup içerisinde yer almış olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Ancak Kadmiyum klorit'in 25  $\mu$ M'lık dozu ise toplam antosiyanin bakımından istatistiksel olarak önemli bir artış sağlamış olduğu, toplam antosiyanin miktarının kontrol kültürüne göre 0.0022 RD/g artarak 0.0078 RD/g'a çıktığı belirlenmiştir.

Buraya kadar ele alınan özelliklerden farklı olarak, kadmiyum klorit uygulamasının bütün dozları kamfor miktarını önemli derecede artırmıştır (Çizelge 4.16). Başlangıç kültüründe 0.2642  $\mu$ g/g olan kamfor miktarı, 5  $\mu$ M dozunda 0.4710  $\mu$ g/g'a ve 50  $\mu$ M dozunda 0.9490  $\mu$ g/g'a çıkmıştır. En yüksek kamfor birikimi 1.8186  $\mu$ g/g ile 25  $\mu$ M'lık kadmiyum klorit dozundan elde edilmiştir. Kamfor miktarının, kontrol kültürü ile kıyaslamaya göre, 5  $\mu$ M'lık dozda % 78'lik, 25  $\mu$ M'lık dozda % 588'lik ve 50  $\mu$ M'lık dozda ise % 259'luk bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Kontrol uygulamasında 83867 adet olan hücre sayısı, 5  $\mu$ M kadmiyum klorit dozunda 84267 adete çıkmış olmasına rağmen bu artış istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Ancak 25  $\mu$ M (108567 adet) ve 50  $\mu$ M (97600 adet) dozlarda hücre sayısında önemli artışlar görülmüştür. Kadmiyum klorit uygulamasının 25  $\mu$ M dozunda hücre sayısı başlangıç kültürüne göre 25700 adet, 50  $\mu$ M dozunda ise 14733 adet artış göstermiştir.

Çizelge 4.18 incelendiğinde, kadmiyum klorit uygulamasının 0  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M'lık dozlarında hücre kuru ağırlığında istatistiki olarak önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Ancak 25  $\mu$ M (9.5336 g/l) ve 50  $\mu$ M (9.4481 g/l) dozlarda hücre kuru ağırlığında önemli artışların olduğu tespit edilmiştir. En yüksek (9.5336 g/l) hücre kuru ağırlığı 25  $\mu$ M'lık kadmiyum klorit uygulamasından, en düşük (9.2497 g/l) hücre kuru ağırlığı ise 0  $\mu$ M'lık başlangıç kültüründen elde edilmiştir. Diğer taraftan, Çizelge 4.19'a göre, kadmiyum klorit uygulamasının 0, 5  $\mu$ M ve 25  $\mu$ M'lık dozları ve örnek alma zamanının hücre canlılığında önemli bir değişiklik meydana getirmediği görülmektedir. Buna karşılık, 50  $\mu$ M'lık kadmiyum klorit uygulamasında örnek alma zamanı uzadıkça hücre canlılığında önemli bir azalmanın meydana geldiği tespit edilmiştir.

Farklı büyüme evresinde olan hücreler m RNA ve proteinlerin çeşitli seviyelerine sahiptir ve bu durum hücrelerin elisitörlere karşı farklı tepkiler vermesine neden olur. Sekonder metabolitlerin hücrelerde farklı miktarlarda sentezlenmesinin nedeni budur. Bu yüzden sinyal moleküllerinin tetiklenmesinde elisitör uygulamalarının dozlarının iyi ayarlanması ve uygulama süresi çok önemlidir (Chong ve ark., 2005; Kang ve ark., 2009; Baldi ve ark., 2010; Exposito ve ark., 2010; Wiktorowska ve ark., 2010; Sivanandhan ve ark., 2013; Chodisetti ve ark., 2015; Hashemi ve Naghavi, 2016; Chu ve ark., 2017). Bu çalışmada, elisitör uygulamaları yapılmadan önce, doz ve uygulama süresi önceki çalışmalar kapsamlı bir şekilde taranarak belirlenmiş, toksik etki sınırları fazla zorlanmamıştır.

Kadmiyum, proteinlerin sülfidril gruplarına kuvvetli bir şekilde bağlanma eğiliminde olduğu için, birçok hücresel döngüde önemli rol oynar. Aynı zamanda birçok farklı hücresel fonksiyonu etkileyen, çok sayıda farklı protein hedefine bağlanabilen ve kalsiyum bağlayıcı bir protein olan Calmodulin (CaM)'a bağlanarak fitokimyasalların biyosentezinde önemli bir işlev görür (Powlin ve ark., 1997; Stohs ve ark., 2000; Hall, 2002). Konuyla ilgili daha önce yapılan çalışmalar, bu araştırmadan elde edilen bulgular ile benzer bir şekilde, Kadmiyum klorit uygulamasının hücre kuru ağırlığını, toplam fenolik madde, toplam antosiyanin, toplam flavanoid, toplam flavonoid ve diğer aktif bileşenlerin miktarını artırdığını ortaya koymuştur (Dixit ve ark., 2001; Lavid ve ark., 2001; Schützendübel ve ark., 2001; Beaulieu ve ark., 2002; Dai ve ark., 2006; Zhao ve ark., 2010a; Popova ve ark., 2009; Gandi ve ark., 2012; Cai ve ark., 2013; Cetin ve ark., 2014; Sivanandhan ve ark., 2014; Urdová ve ark., 2015; Çetin ve Baydar, 2016). Ancak, bazı araştırmacılar kadmiyum kloritin her ne kadar sekonder metabolitlerin birikimini teşvik ettiğini bildirseler de, hücrelerde toksik etki yaparak, hücre büyümesi ve hücre canlılığını azalttığını da bildirmişlerdir (Popova ve ark., 2009; Xu ve ark., 2009; Çetin ve Baydar, 2016).

**Çizelge 4.12.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.6369	0.0023	0.0039
	2	0.6382	0.0013	0.0023
	3	0.6418	0.0013	0.0023
	Ortalama	0.6390C**	0.0011	0.0034
5	1	0.6371	0.0021	0.0036
	2	0.6388	0.0023	0.0039
	3	0.6410	0.0018	0.0032
	Ortalama	0.6390C	0.0012	0.0036
25	1	0.6807	0.0025	0.0044
	2	0.6870	0.0021	0.0036
	3	0.6921	0.0045	0.0078
	Ortalama	0.6866A	0.0023	0.0069
50	1	0.6562	0.0018	0.0032
	2	0.6503	0.0027	0.0047
	3	0.6455	0.0082	0.0142
	Ortalama	0.6507B	0.0030	0.0089
Doz: 0.000**, Gün: 0.597; DozXGün: 0.101				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

Z: Zaman

**Çizelge 4.13.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.0099	0.0003	0.0006
	2	0.0111	0.0006	0.0011
	3	0.0115	0.0010	0.0017
	Ortalama	0.0108B**	0.0004	0.0013
5	1	0.0111	0.0008	0.0015
	2	0.0113	0.0007	0.0012
	3	0.0121	0.0005	0.0009
	Ortalama	0.0115B	0.0004	0.0012
25	1	0.0136	0.0006	0.0011
	2	0.0140	0.0004	0.0006
	3	0.0156	0.0005	0.0009
	Ortalama	0.0144A	0.0004	0.0012
50	1	0.0120	0.0003	0.0006
	2	0.0118	0.0006	0.0010
	3	0.0114	0.0004	0.0007
	Ortalama	0.0117B	0.0002	0.0007
Doz: 0.000**; Gün: 0.067; DozXGün: 0.371				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

Z: Zaman



**Çizelge 4.14.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.0426	0.0002	0.0004
	2	0.0436	0.0003	0.0005
	3	0.0429	0.0007	0.0012
	Ortalama	0.0430B**	0.0003	0.0008
5	1	0.0427	0.0009	0.0015
	2	0.0429	0.0011	0.0019
	3	0.0443	0.0005	0.0009
	Ortalama	0.0433B	0.0005	0.0015
25	1	0.0448	0.0003	0.0006
	2	0.0459	0.0006	0.0011
	3	0.0476	0.0004	0.0008
	Ortalama	0.0461A	0.0005	0.0014
50	1	0.0415	0.0004	0.0007
	2	0.0431	0.0014	0.0024
	3	0.0416	0.0007	0.0012
	Ortalama	0.0421B	0.0005	0.0016
Doz: 0.000**; Gün: 0.058; DozXGün: 0.229				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

Z: Zaman

**Çizelge 4.15.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.0053	0.0001	0.0002
	2	0.0058	0.0002	0.0004
	3	0.0055	0.0002	0.0004
	Ortalama	0.0056B**	0.0001	0.0004
5	1	0.0062	0.0003	0.0005
	2	0.0045	0.0003	0.0004
	3	0.0055	0.0008	0.0014
	Ortalama	0.0054B	0.0004	0.0011
25	1	0.0081	0.0002	0.0004
	2	0.0078	0.0011	0.0020
	3	0.0074	0.0004	0.0007
	Ortalama	0.0078A	0.0004	0.0011
50	1	0.0053	0.0006	0.0011
	2	0.0043	0.0005	0.0008
	3	0.0038	0.0006	0.0010
	Ortalama	0.0045B	0.0004	0.0011
Doz: 0.000**; Gün: 0.158; DozXGün: 0.394				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

RD: Renk Değeri

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

Z: Zaman

**Çizelge 4.16.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.2561	0.0081	0.0140
	2	0.2624	0.0089	0.0155
	3	0.2740	0.0069	0.0120
	Ortalama	0.2642D**	0.0048	0.0144
5	1	0.4708	0.0099	0.0171
	2	0.4757	0.0078	0.0136
	3	0.4666	0.0065	0.0112
	Ortalama	0.4710C	0.0043	0.0129
25	1	1.7890	0.0279	0.0483
	2	1.8154	0.0443	0.0767
	3	1.8515	0.0753	0.1304
	Ortalama	1.8186A	0.0280	0.0839
50	1	0.9535	0.0044	0.0076
	2	0.9488	0.0007	0.0012
	3	0.9446	0.0037	0.0064
	Ortalama	0.9490B	0.0021	0.0063
Doz: 0.000**; Gün: 0.684; DozXGün: 0.889				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

Z: Zaman

**Çizelge 4.17.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	82800	240.30	416.30
	2	82700	202.70	351.20
	3	83100	635.90	1101.50
	Ortalama	82867C**	211.986	635.960
5	1	84000	176.40	305.50
	2	83800	384.40	665.80
	3	85000	264.60	458.30
	Ortalama	84267C	226.350	679.052
25	1	108000	1006.60	1743.60
	2	108700	1553.40	2690.50
	3	109000	2036.60	3527.50
	Ortalama	108567A	808.880	2426.640
50	1	96600	536.50	929.20
	2	97500	321.50	556.80
	3	98700	437.20	757.20
	Ortalama	97600B	387.099	1161.298
Doz: 0.000**; Gün: 0.197; DozXGün: 0.945				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

Z: Zaman

**Çizelge 4.18.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	9.2462	0.0032	0.0055
	2	9.2452	0.0026	0.0046
	3	9.2578	0.0138	0.0239
	Ortalama	9.2497C**	0.0046	0.0139
5	1	9.3378	0.0017	0.0029
	2	9.3390	0.0016	0.0028
	3	9.3443	0.0014	0.0025
	Ortalama	9.3403C	0.0013	0.0038
25	1	9.5253	0.0090	0.0155
	2	9.5294	0.0146	0.0253
	3	9.5461	0.0314	0.0544
	Ortalama	9.5336A	0.0108	0.0324
50	1	9.4612	0.0402	0.0697
	2	9.4405	0.0037	0.0064
	3	9.4427	0.0037	0.0063
	Ortalama	9.4481B	0.0122	0.0365
Doz: 0.000**; Gün: 0.725; DozXGün: 0.937				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

Z: Zaman

**Çizelge 4.19.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	97.9733Aa*	0.2167	0.3754
	2	97.7467Aa	0.3176	0.5500
	3	97.3467Aa	0.3467	0.6004
5	1	98.4200Aa	0.1970	0.3412
	2	98.3433Aa	0.3017	0.5225
	3	97.8267Aa	0.1937	0.3355
25	1	98.0500Aa	0.2651	0.4592
	2	98.2333Aa	0.4296	0.7441
	3	97.6600Aa	0.3625	0.6279
50	1	96.7567Aa	0.2860	0.4954
	2	94.5567Bb	0.7812	1.3530
	3	93.6767Bb	0.8475	1.4679

Doz: 0.000; Gün: 0.003; DozXGün: 0.046\*

\*, Ortak harfi olmayan doz x gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ )

Z: Zaman

### 4.3.3. Gümüş Nitrat Uygulaması

Toplam fenolik madde miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi sonucunda, gümüş nitrat dozları ile örnek alma zamanları arasındaki interaksiyonun (doz x gün) önemli olduğu ( $p<0.01$ ) bulunmuştur. Buna uygun olarak hesaplanan tanıtıcı istatistik verileri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.20'de verilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı 5  $\mu\text{M}$ 'lık gümüş nitrat uygulamasında başlangıç kültürü ile kıyaslandığında önemli bir değişim göstermezken, 25  $\mu\text{M}$ 'lık doz uygulamasında en yüksek (0.6925 mg/g) fenolik madde birikimi 3. gün sonunda hasat edilen örneklerden elde edilmiştir. Uygulamada kullanılan 50  $\mu\text{M}$ 'lık gümüş nitrat dozunda kontrol kültürüne göre 1. ve 2. gün sonunda fenolik madde birikiminde istatistiki olarak önemli artışlar görülmüş olmakla birlikte, 3. gün sonunda meydana gelen artış istatistiki olarak önemli çıkmamıştır (Çizelge 4.20).

Toplam flavanol miktarı (mg/g YHA) verilerinin varyans analizi gümüş nitrat dozları arasındaki farklılıkların önemli ( $p<0.01$ ), ancak örnek alma zamanları arasındaki farklılığın ise önemsiz olduğunu ortaya koymuştur. Toplam flavanol miktarı için elde edilen tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.21'de verilmiştir. Kontrol kültürü ile istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer alan 5 ve 50  $\mu\text{M}$ 'lık gümüş nitrat dozları toplam flavanol birikiminde etkili olmamıştır. Buna karşılık, kontrol kültüründe 0.0108 mg/g olan toplam flavanol miktarı, 25  $\mu\text{M}$ 'lık gümüş nitrat uygulamasıyla 0.0034 mg/g artarak 0.0142 mg/g'a çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.21).

Toplam flavonol miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizine göre, gümüş nitrat dozları arasındaki farklılıkların önemli ( $p<0.05$ ), örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Toplam flavonol miktarına ilişkin tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.22'de verilmiştir. Buradan, gümüş nitratın 0  $\mu\text{M}$  ve 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarının toplam flavonol miktarını etkilemediği, fakat 5  $\mu\text{M}$ 'lık gümüş nitrat uygulamasının flavonol birikimini önemli ölçüde artırdığı görülmektedir.

Toplam antosiyanin miktarı (RD/g YHA) değerlerinin varyans analizi, artan dozlarda gümüş nitrat uygulamaları arasındaki farklılıkların önemli ( $p<0.01$ ), örnek alma zamanları arasındaki farklılıkların ise önemsiz olduğunu ortaya koymuştur. Toplam

antosiyenin miktarına ilişkin olarak hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.23'de verilmiştir. Kontrol kültürü ile istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer alan 5 µM'lık gümüş nitrat uygulaması toplam antosiyenin miktarında önemli bir değişiklik meydana getirmemiştir. Diğer taraftan, gümüş nitratın; 25 µM'lık dozunda en yüksek (0.0080 RD/g) antosiyenin birikimi görülürken, 50 µM'lık gümüş nitrat dozu toksik etki göstermiştir. Dolayısıyla toplam antosiyenin miktarında kontrol kültürüne göre 0.0012 RD/g gibi önemli bir azalma gerçekleşmiştir (Çizelge 4.23).

Kamfor miktarı (µg/g) için yapılan varyans analizi sonucuna göre, gümüş nitrat dozları arasındaki farklılık önemli ( $p<0.01$ ), örnek alım zamanları arasındaki farklılık ise önemsiz bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.24'de verilmiştir. Çizelge 4.24 incelendiğinde, kamfor miktarının uygulanan gümüş nitrat dozları ile önemli miktarda artış gösterdiği açıkça görülmektedir. Kamfor miktarında, 5 µM'lık dozda % 41, 25 µM'lık dozda % 533 ve 50 µM'lık dozda ise % 217'lik bir artış sağlanmıştır. Kontrol kültürü ile kıyaslandığında, en yüksek (1.6711 µg/g) kamfor birikimi 25 µM'lık gümüş nitrat uygulamasından elde edilirken, bunu 0.8373 µg/g ile 50 µM'lık gümüş nitrat dozu takip etmiştir. En düşük kamfor birikimi ise 0.02642 µg/g ile gümüş nitrat uygulanmayan kontrol (başlangıç) kültüründen elde edilmiştir.

Hücre sayısı verilerinin varyans analizi artan gümüş nitrat dozları arasındaki farklılığın önemli ( $p<0.01$ ), buna karşılık örnek alma zamanları arasındaki farklılığın önemsiz olduğunu ortaya koymuştur. Hücre sayısı için hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.25'de verilmiştir. Buna göre, hücre sayısı uygulanan gümüş nitrat dozlarına bağlı olarak önemli miktarda artış göstermiştir. Başlangıç kültüründe ortalama 82906 adet olan hücre sayısı 5 µM'lık dozda 93453 adet'e, 25 µM'lık dozda 107980 adet'e ve 50 µM'lık dozda ise 84927 adet'e ulaşmıştır. Başlangıç kültürü ile kıyaslandığında 50 µM'lık dozda hücre sayısında önemli bir artış görülse de, özellikle 5 µM ve 25 µM'lık gümüş nitrat dozları uygulandığında hücre sayısındaki artışın daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Hücre kuru ağırlığı (g/l) için yapılan varyans analizine göre, gümüş nitrat dozları arasındaki farklılık önemli ( $p<0.01$ ), örnek alma zamanları arasındaki farklılık ise



önemsiz bulunmuştur. Hücre kuru ağırlığı için hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.26'da verilmiştir. Çizelge 4.26 incelendiğinde, hücre kuru ağırlığında uygulanan gümüş nitrat dozları ile önemli miktarda artış gerçekleştiği görülmektedir. Kontrol kültüründe 9.2497 g/l olan hücre kuru ağırlığı, 5 µM'lık dozda 9.4481 g/l'ye, 25 µM'lık dozda 9.5316 g/l'ye ve 50 µM'lık dozda ise 9.3403 g/l'ye çıktığı belirlenmiştir. Hücre sayısında olduğu gibi hücre kuru ağırlığında da 50 µM'lık dozda önemli bir artış görülse de 5 ve 25 µM'lık gümüş nitrat dozlarının çok daha etkin olduğu görülmektedir.

Hücre canlılığı (%) için yapılan varyans analizi sonucunda, gümüş nitrat dozları arasındaki farklılık önemli ( $p < 0.01$ ), örnek alma zamanları arasındaki farklılık ise önemsiz bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.27'de verilmiştir. Araştırma sonucu incelendiğinde, 5 µM ve 25 µM gümüş nitrat dozlarının, kontrol kültürüyle aynı grupta yer aldıkları ve hücre canlılığını istatistiki anlamda önemli düzeyde etkilemedikleri görülmüştür. Ancak 50 µM'lık dozun başlangıçta toksik etki yaparak hücreleri öldürdüğü ve canlı hücre sayısını istatistiki anlamda önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

Basit iki karbonlu bir bileşik olan etilen hormonu, tohum çimlenmesi de dahil olmak üzere kök gelişimi, nodülasyonu, çiçeklenme, yaşlanma, ve meyve olgunlaşması gibi bitki yaşam döngüsünün birçok alanında aktif rol oynamaktadır (Kende, 1993; Ecker, 1995; Johnson ve Ecker, 1998). Etilen biyosentezi çeşitli stres (mekanik yaralar, kuraklık, aşırı sıcaklık ve patojen enfeksiyonu) faktörleri ile indüklenir ve hücrelerde birikimi artar. Yapılan çalışmalar etilenin hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda birikiminin sekonder metabolitlerin üretimini ve biyokütle artışını azalttığını ortaya koymuştur (Shibli ve ark., 1997; Pitta-Alvarez ve ark., 2000; Ptak ve ark., 2010; Chae ve ark., 2012; McDaniel ve Binder, 2012; Park ve ark., 2012; Sgamma ve ark., 2015) İsobutyric asit (AIB), acetylsalicylic asit (ASA), 2-aminoethoxyvinyl glycine (AVG), 1-methylcyclopropene (1-MCP), kobalt klorür ( $\text{CoCl}_2$ ), nikel klorür ( $\text{NiCl}_2$ ) ve gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) bileşiklerinin ise etilen birikimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Chi ve Pua, 1989; Biddington, 1992; Bais ve ark., 2001; Chae ve Park., 2012; Tamimi, 2015; Würschum ve ark., 2015; Harathi ve Naidu, 2016; Saiprasad ve Raghuvver, 2016; Sarropoulou ve ark., 2016; Basso ve ark., 2017; Hegde ve ark., 2017; Jin ve ark.,

2017b; Iqbal ve ark., 2017; Kumar ve ark., 2017a; Schaller ve Binder, 2017; Papani ve Naidu, 2017; Sarropoulou ve Maloupa, 2017; Yau ve ark., 2017). Dolayısıyla gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) uygun konsantrasyonlarda hücre kültürlerine ilave edildiğinde sekonder metabolit üretimini ve hücre büyümesini teşvik eder. Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışma sonuçları da bunu desteklemektedir (Zhao ve ark., 2010b; Parimalan ve ark., 2011; Ch ve ark., 2012; Cai ve ark., 2013; Kubeš ve ark., 2014; Xing ve ark., 2014; Zaker ve ark., 2015; Deepthi ve Satheeshkumar, 2016; Fazal ve ark., 2016b; Li ve ark., 2016; Park ve ark., 2016; Vildová ve ark., 2016; Dowom ve ark., 2017; Ma ve ark., 2017; Lee ve ark., 2017; Yang ve ark., 2017).

**Çizelge 4.20.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.6369Abc**	0.0023	0.0039
	2	0.6382Abc	0.0013	0.0023
	3	0.6418Ab	0.0013	0.0023
5	1	0.6396Ab	0.0007	0.0013
	2	0.6452Ab	0.0029	0.0050
	3	0.6548Ab	0.0064	0.0111
25	1	0.6774Aa	0.0035	0.0060
	2	0.6851Aa	0.0001	0.0002
	3	0.6925Aa	0.0048	0.0083
50	1	0.6659Aa	0.0023	0.0040
	2	0.6558Ab	0.0035	0.0060
	3	0.6536Ab	0.0022	0.0038

Doz: 0.000; Gün: 0.036; DozXGün: 0.004\*\*

\*\* , Ortak harfi olmayan doz x gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

Z: Zaman

**Çizelge 4.21.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.0099	0.0003	0.0006
	2	0.0111	0.0006	0.0011
	3	0.0115	0.0010	0.0017
Genel Ortalama		0.0108B**	0.0004	0.0013
5	1	0.0117	0.0002	0.0003
	2	0.0123	0.0010	0.0017
	3	0.0123	0.0011	0.0019
Genel Ortalama		0.0121B	0.0004	0.0013
25	1	0.0136	0.0005	0.0008
	2	0.0141	0.0005	0.0008
	3	0.0150	0.0007	0.0012
Genel Ortalama		0.0142A	0.0003	0.0010
50	1	0.0111	0.0007	0.0012
	2	0.0106	0.0007	0.0012
	3	0.0111	0.0007	0.0012
Genel Ortalama		0.0109B	0.0004	0.0011

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.222; DozXGün: 0.877

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

Z: Zaman

**Çizelge 4.22.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.0426	0.0002	0.0004
	2	0.0436	0.0003	0.0005
	3	0.0429	0.0007	0.0012
	Ortalama	0.0430B*	0.0003	0.0008
5	1	0.0448	0.0003	0.0006
	2	0.0459	0.0006	0.0011
	3	0.0476	0.0004	0.0008
	Ortalama	0.0461A	0.0005	0.0014
25	1	0.0437	0.0004	0.0007
	2	0.0419	0.0025	0.0043
	3	0.0458	0.0008	0.0015
	Ortalama	0.0438AB	0.0009	0.0028
50	1	0.0453	0.0026	0.0046
	2	0.0422	0.0008	0.0015
	3	0.0428	0.0007	0.0013
	Ortalama	0.0434B	0.0010	0.0029
		Doz: 0.015*; Gün: 0.282; DozXGün: 0.165		

\*, Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

Z: Zaman

**Çizelge 4.23.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.0053	0.0001	0.0002
	2	0.0058	0.0002	0.0004
	3	0.0055	0.0002	0.0004
	Ortalama	0.0056B**	0.0001	0.0004
5	1	0.0059	0.0005	0.0008
	2	0.0062	0.0008	0.0014
	3	0.0059	0.0004	0.0007
	Ortalama	0.0060B	0.0003	0.0009
25	1	0.0075	0.0004	0.0006
	2	0.0080	0.0006	0.0011
	3	0.0086	0.0002	0.0004
	Ortalama	0.0080A	0.0003	0.0008
50	1	0.0041	0.0006	0.0010
	2	0.0039	0.0007	0.0012
	3	0.0052	0.0004	0.0007
	Ortalama	0.0044C	0.0003	0.0010
		Doz: 0.000**, Gün:0.207; DozXGün: 0.589		

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

RD: Renk Değeri

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

**Çizelge 4.24.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.2561	0.0081	0.0140
	2	0.2624	0.0089	0.0155
	3	0.2740	0.0069	0.0120
	Ortalama	0.2642D**	0.0048	0.0144
5	1	0.3707	0.0100	0.0172
	2	0.3768	0.0067	0.0116
	3	0.3676	0.0061	0.0105
	Ortalama	0.3717C	0.0041	0.0123
25	1	1.6661	0.0069	0.0120
	2	1.6710	0.0014	0.0025
	3	1.6760	0.0039	0.0067
	Ortalama	1.6711A	0.0027	0.0082
50	1	0.8497	0.0053	0.0093
	2	0.8349	0.0065	0.0113
	3	0.8273	0.0083	0.0143
	Ortalama	0.8373B	0.0047	0.0142
		Doz: 0.000**; Gün: 0.991; DozXGün: 0.144		

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

Z: Zaman

**Çizelge 4.25.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	82840	240.3700	416.3330
	2	82760	202.7590	351.1890
	3	83120	635.9600	1101.5140
	Ortalama	82906D**	211.9870	635.9600
5	1	92920	442.4180	766.2900
	2	93240	166.6670	288.6750
	3	94200	218.5810	378.5940
	Ortalama	93453B	306.3850	919.1540
25	1	106300	352.7670	611.0100
	2	108640	1553.3760	2690.5270
	3	109000	2036.6090	3527.5110
	Ortalama	107980A	858.6680	2576.0050
50	1	84640	466.6670	808.2900
	2	84500	693.6220	1201.3880
	3	85640	425.5720	737.1120
	Ortalama	84927C	324.5130	973.5390
		Doz: 0.000**; Gün: 0.071; DozXGün: 0.679		

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

Z: Zaman



**Çizelge 4.26.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	9.2462	0.0032	0.0055
	2	9.2452	0.0026	0.0046
	3	9.2578	0.0138	0.0239
	Ortalama	9.2497D**	0.0046	0.0139
5	1	9.4612	0.0402	0.0697
	2	9.4405	0.0037	0.0064
	3	9.4427	0.0037	0.0063
	Ortalama	9.4481B	0.0122	0.0365
25	1	9.5192	0.0088	0.0152
	2	9.5294	0.0146	0.0253
	3	9.5461	0.0314	0.0544
	Ortalama	9.5316A	0.0110	0.0331
50	1	9.3378	0.0017	0.0029
	2	9.3390	0.0016	0.0028
	3	9.3443	0.0014	0.0025
	Ortalama	9.3403C	0.0013	0.0038
		Doz: 0.000**; Gün: 0.710; DozXGün: 0.895		

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

Z: Zaman

**Çizelge 4.27.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde gümüş nitrat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Dozlar ( $\mu\text{M}$ )	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	97.9733	0.2167	0.3754
	2	97.7467	0.3176	0.5500
	3	97.3467	0.3467	0.6004
	Ortalama	97.6889A**	0.1753	0.5258
5	1	97.5400	0.4908	0.8502
	2	98.0667	0.1590	0.2754
	3	98.1400	0.0872	0.1510
	Ortalama	97.9156A	0.1782	0.5345
25	1	98.2067	0.3163	0.5478
	2	97.3467	0.3994	0.6918
	3	98.2167	0.2351	0.4072
	Ortalama	97.9233A	0.2168	0.6505
50	1	95.6800	0.3765	0.6521
	2	94.7000	0.7550	1.3077
	3	95.3000	0.4933	0.8544
	Ortalama	95.2267B	0.3161	0.9484
Doz: 0.000**; Gün: 0.363; DozXGün: 0.342				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ )

Z: Zaman

#### 4.3.4. Metil Jasmonat Uygulaması

Toplam fenolik madde miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi sonucunda, metil jasmonat dozları arasındaki farklılık ( $p<0.01$ ) ve örnek alma zamanları arasındaki farklılığın ( $p<0.05$ ) önemli olduğu görülmüştür. Toplam fenolik madde miktarına ilişkin tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.28’de verilmiştir.

Çizelge 4.28 incelendiğinde, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ ’lık metil jasmonat konsantrasyonlarının başlangıç kültürüne göre fenolik madde miktarını artırdıkları, 10  $\mu\text{M}$ ’lık metil jasmonat konsantrasyonunun ise fenolik madde miktarına istatistiki anlamda etkisinin olmadığı görülmektedir. Başlangıç kültüründe ortalama 0.6390 mg/g olan fenolik madde miktarı, 50  $\mu\text{M}$ ’lık metil jasmonat dozunda 0.6529 mg/g’a ve 100  $\mu\text{M}$ ’lık metil jasmonat dozunda ise 0.6598 mg/g’a çıkmıştır. En yüksek fenolik madde birikimi ise 0.6598 mg/g ile 100  $\mu\text{M}$ ’lık metil jasmonat uygulamasından elde edilmiştir. Diğer taraftan, ilgili çizelgeden, örnek alım zamanlarının fenolik madde birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.6452 mg/g olan fenolik madde miktarı, 2. gün sonunda 0.6469 mg/g’a, 3. gün sonunda da 0.6510 mg/g’a çıkmıştır.

Toplam flavanol miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizine göre; metil jasmonat dozları arasındaki farklılık önemsiz, örnek alım zamanları ( $p<0.01$ ) arasındaki farklılık istatistiki olarak önemlidir. Toplam flavanol miktarı için hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.29’da verilmiştir.

Çizelge 4.29 incelendiğinde, örnek alım zamanlarının flavanol birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.0102 mg/g olan flavanol miktarı, 2. gün sonunda 0.0011 mg/g artarak 0.0113 mg/g’a ve 3. gün sonunda da 0.0005 mg/g artarak 0.0118 mg/g’a çıktığı görülmüştür.

Toplam flavonol miktarı (mg/g YHA) verileri için yapılan varyans analizi, artan metil jasmonat dozları arasında önemli ( $p<0.01$ ) farklılıklar bulunduğunu, örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların ise önemsiz olduğunu ortaya koymuştur. Toplam

flavonol miktarı hakkında bilgi veren tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.30'da verilmiştir.

Kontrol kültürü ile metil jasmonat uygulamasının 10 ve 50  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonları kıyaslandığında, toplam flavonol miktarının istatistiki olarak önemli miktarda azaldığı dikkati çekmektedir. Metil jasmonat uygulamasının 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonunda ise kontrol kültürüyle aynı (0.0035 mg/g) miktarda flavonol birikiminin olduğu görülmektedir (Çizelge 4.30).

Toplam antosiyanin miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi sonucunda, metil jasmonat uygulama dozları arasında farklılıkların ( $p<0.01$ ) önemli, örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların istatistiki olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Toplam antosiyanin verileri üzerinden hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.31'de verilmiştir.

Çizelge 4.31 incelendiğinde 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık metil jasmonat konsantrasyonlarının başlangıç kültürüne göre antosiyanin miktarını genel olarak azalttıkları ve antosiyanin birikimi üzerine nispeten benzer bir etkiye sahip oldukları görülmektedir. Başlangıç kültüründe 0.0056 RD/g olan antosiyanin miktarı; 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarda sırasıyla 0.0035, 0.0029 ve 0.0025 RD/g'a inmiş olduğu belirlenmiştir.

Kamfor miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ) için yapılan varyans analizine göre, metil jasmonat dozları arasındaki farklılık ( $p<0.01$ ) ve örnek alma zamanları arasındaki farklılığın ( $p<0.05$ ) önemli olduğu bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.32'de verilmiştir.

Kamfor miktarı metil jasmonat uygulamasının 50 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlarında çok önemli oranda artış göstermiştir. Başlangıç kültüründe 0.2642  $\mu\text{g/g}$  olan kamfor miktarı, 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozda % 17 artarak 0.3085  $\mu\text{g/g}$ 'a, 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozda ise % 29 artarak 0.3403  $\mu\text{g/g}$ 'a çıktığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, ilgili çizelgeden, örnek alım zamanlarının kamfor birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.2889  $\mu\text{g/g}$  olan kamfor miktarı, 2. gün sonunda 0.2940  $\mu\text{g/g}$ 'a, 3. gün sonunda da 0.3009  $\mu\text{g/g}$ 'a çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.32).

Hücre sayısı için yapılan varyans analizi sonucunda, metil jasmonat uygulama dozları ve örnek alım zamanları arasında önemli ( $p<0.01$ ) farklılıkların olduğu saptanmıştır. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.33'de verilmiştir.

Bu sonuçlara göre, Metil jasmonat uygulamasının 10 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlarının başlangıç kültürüne göre hücre sayısını önemli ölçüde artırmış olup bu iki dozun hücre sayısı üzerine benzer bir etki gösterdiği görülmüştür. Başlangıç kültüründe 82900 adet olan ortalama hücre sayısı, 10 ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozda sırasıyla 83960 ve 84160'a çıkmıştır. İlgili çizelgeye göre, örnek alım zamanlarının hücre sayısı üzerine önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. İlk iki gün sonunda alınan örneklerde hücre sayısında (sırasıyla 83340 ve 83475 adet) istatistiki olarak önemli bir değişiklik görülmezken, 3. gün sonunda alınan örneklerde hücre sayısı (84360 adet) önemli ölçüde artış göstermiştir.

Hücre kuru ağırlığı (g/l) için yapılan varyans analizi sonucunda metil jasmonat dozları ( $p<0.01$ ) ve örnek alım zamanları ( $p<0.05$ ) arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.34'de verilmiştir.

Başlangıç kültürüyle kıyaslandığında 10 ve 50  $\mu\text{M}$ 'lık metil jasmonat dozlarının hücre kuru ağırlığına istatistiki olarak önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Diğer taraftan 100  $\mu\text{M}$ 'lık metil jasmonat uygulamasından 9.3400 g/l ile en yüksek hücre kuru ağırlığı elde edilmiştir. İlgili çizelgeye göre, örnek alım zamanlarının hücre kuru ağırlığını istatistiki olarak önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 9.2715 g/l olan hücre kuru ağırlığı, 2. gün sonunda 9.2747 g/l'ye, 3. gün sonunda da 9.2847 g/l'ye çıkmıştır (Çizelge 4.34).

Hücre canlılığı (%) için yapılan varyans analizi sonucunda, metil jasmonat dozları ve örnek alım zamanları arasındaki farklılığın istatistiki olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.35).

Metil jasmonat (MeJA), biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı hücrelerin savunma süreçlerine aracılık eden hayati bir hücre sel düzenleyicidir (Wasternack ve Hause, 2002; Lorenzo ve ark., 2003; Devoto ve ark., 2005). Yakın zamanda yapılan pek çok araştırma bir takım metil jasmonat'a duyarlı genlerin olduğunu ortaya koymuştur

(Memelink ve ark., 2001; Orozco-Cárdenas ve ark., 2001; Goossens ve ark., 2003; Oksman-Caldentey ve Inzé, 2004; Jost ve ark., 2005; Shohael ve ark., 2007; Pauwels ve ark., 2008; Shohael ve ark., 2008; Pauwels ve ark., 2009). Bu genler bitki hücrelerinde kısa ve uzun mesafeli sinyal sistemlerini kullanarak dokularda, organlarda ve bitkide sekonder metabolitlerin verimliliğini artırır. Dolayısıyla MeJA hücrel sinyal yollarını manipüle etmek için kullanılan ideal bir araçtır (León ve ark., 2001; Cheong ve Do Choi, 2003; Theis ve Lerda, 2003). Bugüne kadar metil jasmonat elisitörünün hücre kültürlerinde sekonder metabolit birikimini ve hücre büyümesini teşvik ettiğini bildiren pek çok araştırma yapılmıştır (Komaraiaha ve ark., 2005; Kim ve ark., 2006; Prakash ve Srivastava, 2008; Coste ve ark., 2011; Jalalpour ve ark., 2014; Ali ve ark., 2015; Chodisetti ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015; Anusha ve ark., 2016; Khojasteh ve ark., 2016; Ooi ve ark., 2016; Perassolo ve ark., 2016; Sukito ve Tachibana, 2016; Wang ve ark., 2016; Chung ve ark., 2017; Deepthi ve Satheeshkumar, 2017; Dowom ve ark., 2017; Hajati ve ark., 2017; Hidalgo ve ark., 2017; Krstić-Milošević ve ark., 2017; Saeed ve ark., 2017). Bu çalışmalarda olduğu gibi, yapmış olduğumuz bu çalışmada da kullanılan metil jasmonat dozları; kamfor, toplam fenolik madde ve toplam flavanol birikimini ve hücre büyümesini olumlu yönde teşvik ederek artırmıştır. Ancak antosiyanin ve flavanol birikimi metil jasmonat uygulamasıyla önemli ölçüde azalmıştır. Fitokimyasalların biyosentezinde meydana gelen bu azalış MeJA'tın, hücrelerde biyolojik veya abiyotik stres yaratan reaktif oksijen türlerini (ROS) artırmasından kaynaklı olabilir. ROS stresinin artmasıyla birlikte hücrelerde; redoks tamponları, askorbat ve glutatyon (GSH), askorbik asit, karotenoidler, tokoferol, flavonoidler ve alkaloidlerin azaldığı bilinmektedir (Conklin ve ark., 1996; Creiisen ve ark., 1999; Vanacker ve ark., 2000; Noctor ve ark., 2002; Kim ve ark., 2004; Berteau ve ark., 2005; Li ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2008). Dolayısıyla, MeJA tedavisinden sonra hücrelerde ROS stresinin oluştuğu, flavanol ve antosiyanin gibi bazı fitokimyasalların birikimini azalttığı düşünülebilir.

**Çizelge 4.28.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.6369	0.0023	0.0039	0.6382	0.0013	0.0023	0.6418	0.0013	0.0023	0.6390C**	0.0011	0.0034
10	0.6408	0.0030	0.0052	0.6332	0.0021	0.0036	0.6435	0.0031	0.0053	0.6392C	0.0021	0.0062
50	0.6502	0.0032	0.0055	0.6539	0.0022	0.0038	0.6546	0.0031	0.0053	0.6529B	0.0016	0.0047
100	0.6530	0.0022	0.0039	0.6624	0.0039	0.0068	0.6641	0.0031	0.0053	0.6598A	0.0023	0.0070
G. Ort.	0.6452b*	0.0023	0.0079	0.6469ab	0.0037	0.0129	0.6510a	0.0030	0.0102			

Doz:0.000\*\*; Gün:0.016\*; DozXGün: 0.116

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.29.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0099	0.0003	0.0006	0.0111	0.0006	0.0011	0.0115	0.0010	0.0017	0.0108	0.0004	0.0013
10	0.0102	0.0003	0.0006	0.0127	0.0009	0.0016	0.0124	0.0015	0.0027	0.0118	0.0007	0.0020
50	0.0104	0.0006	0.0010	0.0099	0.0008	0.0013	0.0114	0.0001	0.0002	0.0106	0.0004	0.0011
100	0.0104	0.0002	0.0004	0.0115	0.0004	0.0006	0.0120	0.0004	0.0007	0.0113	0.0003	0.0009
G. Ort.	0.0102b*	0.0002	0.0006	0.0113ab	0.0004	0.0015	0.0118a	0.0004	0.0014			

Doz: 0.211; Gün:0.011\*; DozXGün: 0.596

\*, Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma



**Çizelge 4.30.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0039	0.0002	0.0004	0.0030	0.0004	0.0007	0.0037	0.0007	0.0011	0.0035A**	0.0003	0.0008
10	0.0026	0.0004	0.0007	0.0027	0.0001	0.0003	0.0032	0.0011	0.0020	0.0028B	0.0006	0.0019
50	0.0029	0.0001	0.0001	0.0025	0.0002	0.0004	0.0022	0.0010	0.0017	0.0025B	0.0009	0.0028
100	0.0039	0.0002	0.0004	0.0030	0.0004	0.0007	0.0037	0.0007	0.0011	0.0035A	0.0026	0.0079
G. Ort.	0.0033	0.0022	0.0076	0.0028	0.0031	0.0106	0.0032	0.0038	0.0131			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.223; DozXGün: 0.074

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.31.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0053	0.0001	0.0002	0.0058	0.0002	0.0004	0.0055	0.0002	0.0004	0.0056A**	0.0001	0.0004
10	0.0039	0.0002	0.0004	0.0030	0.0004	0.0007	0.0037	0.0007	0.0011	0.0035B	0.0003	0.0008
50	0.0026	0.0004	0.0007	0.0027	0.0001	0.0003	0.0032	0.0011	0.0020	0.0029B	0.0004	0.0011
100	0.0029	0.0001	0.0001	0.0025	0.0002	0.0004	0.0022	0.0010	0.0017	0.0025B	0.0003	0.0009
G. Ort.	0.0037	0.0003	0.0012	0.0035	0.0004	0.0015	0.0037	0.0005	0.0017			
Doz: 0.000**; Gün: 0.858; DozXGün: 0.754												

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

RD: Renk Değeri

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.32.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün					
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.2561	0.0081	0.0140	0.2624	0.0089	0.0155	0.2740	0.0069	0.0120	0.2642C**	0.0048	0.0144
10	0.2592	0.0073	0.0127	0.2630	0.0092	0.0159	0.2742	0.0103	0.0179	0.2654C	0.0050	0.0151
50	0.3057	0.0025	0.0043	0.3091	0.0021	0.0037	0.3107	0.0007	0.0012	0.3085B	0.0012	0.0036
100	0.3346	0.0014	0.0025	0.3413	0.0018	0.0031	0.3449	0.0022	0.0038	0.3403A	0.0018	0.0053
G. Ort.	0.2889b*	0.0102	0.0353	0.2940ab	0.0104	0.0361	0.3009a	0.0093	0.0322			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.036\*; DozXGün: 0.947

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.33.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	82840	240.40	416.30	82760	202.80	351.20	83120	636	1101.50	82900B**	212	636
10	83400	529.20	916.50	83500	152.80	264.60	85000	549	950.90	83960A	351.9	1056
50	83320	582.90	1009.6	83840	433.30	750.60	84440	541.80	938.40	83860AB	308.6	926
100	83800	176.40	305.50	83800	435.90	755	84880	192.20	332.90	84160A	228.1	684
G. Ort.	83340b**	208.90	723.70	83475b	191.90	664.90	84360a	314.90	1090.80			

Doz: 0.007\*\*; Gün:0.004\*\*; DozXGün: 0.699

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0.01$ ).

\*\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0.01$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.34.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	9.2462	0.0032	0.0055	9.2452	0.0026	0.0046	9.2578	0.0138	0.0239	9.2497B**	0.0046	0.0139
10	9.2520	0.0049	0.0086	9.2568	0.0069	0.0120	9.2660	0.0088	0.0152	9.2583B	0.0041	0.0123
50	9.2503	0.0058	0.0101	9.2590	0.0058	0.0101	9.2699	0.0081	0.0140	9.2598B	0.0044	0.0131
100	9.3375	0.0013	0.0023	9.3377	0.0017	0.0029	9.3449	0.0025	0.0043	9.3400A	0.0015	0.0046
G. Ort.	9.2715b*	0.0116	0.0403	9.2747ab	0.0113	0.0390	9.2847a	0.0113	0.0391		0.0046	0.0139

Doz: 0.000\*\*, Gün: 0.021\*, DozXGün: 0.973

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.35.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	97.9733	0.2167	0.3754	97.7467	0.3176	0.5500	97.3467	0.3467	0,6004	97,6889	0,1753	0,5258
10	97.7467	0.3176	0.5500	98.6300	0.1012	0.1752	97.8267	0.1937	0,3355	98,0678	0,1796	0,5389
50	98.0500	0.2651	0.4592	98.2333	0.4296	0.7441	97.6600	0.3625	0,6279	97,9811	0,1983	0,5950
100	97.5400	0.4908	0.8502	98.0667	0.1590	0.2754	98.1400	0.0872	0,1510	97,9156	0,1782	0,5345
G. Ort.	97.8275	0.1565	0.5422	98.1692	0.1543	0.5345	97.7433	0.1448	0,5015			
Doz: 0.466; Gün: 0.125; DozXGün: 0.330												

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

#### 4.3.5. Sorbitol Uygulaması

Toplam fenolik madde miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi sonucunda, sorbitol dozları arasındaki farklılık önemli ( $p < 0.01$ ) olduğu, buna karşılık örnek alma zamanları arasındaki farklılığın ise önemsiz ( $p > 0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarına ilişkin tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.36'da verilmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı, uygulanan sorbitol dozları ile doğru orantılı olarak artış göstermiştir. Başlangıç kültüründe 0.6390 mg/g olan fenolik madde miktarı, 5 g/l'lik sorbitol dozunda 0.6492 mg/g'a ve 25 g/l'lik sorbitol dozunda ise 0.6675 mg/g'a çıkmıştır. En yüksek fenolik madde birikimi ise 0.6955 mg/g ile 50 g/l'lik sorbitol uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.36).

Toplam flavanol miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizine göre; sorbitol dozları ile örnek alım zamanları ( $p < 0.01$ ) arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir. Toplam flavanol miktarı için hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.37'de verilmiştir.

Çizelge 4.37 incelendiğinde, 0, 5 g/l ve 25 g/l'lik sorbitol konsantrasyonlarında flavanol miktarında istatistiki olarak önemli bir değişimin olmadığı görülmektedir. Buna karşılık, sorbitol uygulamasının 50 g/l'lik dozunda en yüksek (0.0131 mg/g) flavanol birikimi gerçekleşmiştir. Diğer taraftan, ilgili çizelgeden, örnek alım zamanlarının flavanol birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.0108 mg/g olan flavanol miktarı, 2. gün sonunda 0.0008 mg/g artarak 0.0116 mg/g'a ve 3. gün sonunda da 0.0013 mg/g artarak 0.0129 mg/g'a çıkmıştır.

Benzer şekilde, toplam flavonol miktarı (mg/g YHA) verileri için yapılan varyans analizi, artan sorbitol dozları ( $p < 0.01$ ) ve örnek alım zamanları ( $p < 0.05$ ) arasında farklılıklar bulunduğunu ortaya koymuştur. Toplam flavonol miktarı hakkında bilgi veren tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.38'de verilmiştir.

Kontrol kültürü ile sorbitol uygulamasının 5 g/l ve 25 g/l'lik konsantrasyonları kıyaslandığında, toplam flavonol miktarı açısından istatistiki olarak önemli bir

değişimin olmadığı dikkati çekmektedir. Sorbitol uygulamasının 50 g/l'lik konsantrasyonunda ise, 0.0478 mg/g ile en yüksek flavonol birikimi gerçekleşmiştir. İlgili çizelge incelendiğinde, hasat zamanlarının flavonol birikimi üzerine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.0430 mg/g olan flavonol miktarı, 2. gün sonunda 0.0442 mg/g'a, 3. gün sonunda da 0.0448 mg/g'a çıkmıştır (Çizelge 4.38).

Toplam antosiyanin miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi sonucunda, sorbitol uygulama dozları ( $p<0.01$ ) ve örnek alım zamanları ( $p<0.05$ ) arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Toplam antosiyanin verileri üzerinden hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.39'da verilmiştir.

Çizelge 4.39 incelendiğinde, 5, 25 ve 50 g/l'lik sorbitol konsantrasyonlarının başlangıç kültürüne göre antosiyanin miktarını artırdıkları ve antosiyanin birikimi üzerine nispeten benzer bir etkiye sahip oldukları görülmektedir. Başlangıç kültüründe 0.0056 RD/g olan antosiyanin miktarı; 5, 25 ve 50 g/l'lik dozlarda sırasıyla 0.0068, 0.0068 ve 0.0070 RD/g olmuştur. İlgili çizelgeye göre, örnek alım zamanlarının antosiyanin birikimine önemli etkisinin olduğu anlaşılmaktadır. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.0062 RD/g olan antosiyanin miktarı 2. gün sonunda 0.0066 RD/g'a ve 3. gün sonunda da 0.0068 RD/g'a çıkmıştır.

Kamfor miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ) için yapılan varyans analizine göre, sorbitol dozları arasındaki farklılık ( $p<0.01$ ) önemli olmasına karşılık, örnek alım zamanları arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.40'da verilmiştir. Kamfor miktarı (mg/g YHA) artan sorbitol dozları ile doğru orantılı olarak çok önemli oranda artış göstermiştir. Başlangıç kültüründe 0.2642  $\mu\text{g/g}$  olan kamfor miktarı, 5 g/l'lik dozda % 40 artarak 0.3703  $\mu\text{g/g}$ 'a, 25 g/l'lik dozda % 82 artarak 0.4810  $\mu\text{g/g}$ 'a ve 50 g/l'lik dozda ise % 154 artarak 0.6704  $\mu\text{g/g}$ 'a ulaştığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.40).

Hücre sayısı için yapılan varyans analizi sonucunda, sorbitol uygulama dozları ve örnek alım zamanları arasında önemli ( $p<0.01$ ) farklılıklar saptanmıştır. Buna uygun



olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.41'de verilmiştir.

Buna göre, Sorbitol uygulamasının 5 g/l ve 25 g/l'lik konsantrasyonlarının başlangıç kültürüne göre hücre sayısını önemli ölçüde artırdıkları ancak bu iki dozun hücre sayısı üzerine benzer bir etki gösterdiği görülmüştür. Başlangıç kültüründe 82910 adet olan ortalama hücre sayısı, 5 g/l'lik dozda 84390'a çıkmış fakat 25 g/l'lik dozda bunun üzerinde bir artış gerçekleşmemiştir. Diğer taraftan, 50 g/l'lik sorbitol uygulamasında ise 90.010 ile en yüksek ortalama hücre sayısına ulaşılmıştır. İlgili çizelgeye göre, örnek alım zamanlarının hücre sayısı üzerine önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. İlk iki gün sonunda alınan örneklerde hücre sayısında (sırasıyla 84865 ve 85350 adet) istatistiki olarak önemli bir değişiklik görülmezken, 3. gün sonunda alınan örneklerde hücre sayısı (86060 adet) önemli ölçüde artış göstermiştir.

Hücre kuru ağırlığı (g/l) için yapılan varyans analizi sonucunda sorbitol dozları ( $p<0.01$ ) ve örnek alım zamanları ( $p<0.05$ ) arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.42'de verilmiştir.

Başlangıç kültürüne göre 5, 25 ve 50 g/l'lik sorbitol dozlarının hücre kuru ağırlığını artırdıkları, ancak bu üç dozun hücre kuru ağırlığına benzer bir etki gösterdiği görülmüştür. Başlangıç kültüründe 9.2497 g/l olan hücre kuru ağırlığı 5, 25 ve 50 g/l'lik dozlarda sırasıyla 9.3383, 9.3383 ve 9.3455 g/l değerlerini almıştır. Diğer taraftan, örnek alım zamanlarının hücre kuru ağırlığını önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 9.3143 g/l olan hücre kuru ağırlığı, 2. gün sonunda 9.3152 g/l'ye ve 3. gün sonunda da 9.3243 g/l'ye çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.42).

Hücre canlılığı (%) için yapılan varyans analizi sonucunda, sorbitol dozları ve örnek alım zamanları arasındaki farklılığın istatistiki anlamda önemli olduğu ( $p<0.05$ ) görülmüştür. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.43'de verilmiştir. Çizelge 4.43 incelendiğinde anlaşılacağı gibi, 5 ve 25 g/l'lik sorbitol konsantrasyonlarında canlı hücre sayısında, başlangıç kültürüyle kıyaslandığında, önemli bir artışın olduğu ve her iki dozun canlı hücre sayısındaki artış üzerine benzer

bir etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, 50 g/l'lik sorbitol uygulamasında ise, ortalama canlı hücre sayısının başlangıç kültürüne oranla (% 97.69'dan % 97.41'e) azaldığı tespit edilmiştir. İlgili çizelge incelendiğinde örnek alım zamanlarının ortalama canlı hücre sayısında önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün sonunda % 97.618 olan canlı hücre sayısı, 2. gün sonunda % 98.140'a, 3. gün sonunda da % 97.666'ya çıkmıştır.

Hücre kültürlerinde ozmolalitenin yükseltilmesinde kullanılan sorbitol önemli bir abiyotik stres kaynağıdır. Hücrelerin stres durumunda savunma amaçlı süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POD) antioksidan enzimlerini artırdığı bilinmektedir (Bhattacharya ve ark., 1997; Todorova ve ark., 2005; Shah ve Nahakpam, 2012; Sytar ve ark., 2013; Fariduddin ve ark., 2014; Gratão ve ark., 2015; Vuleta ve ark., 2016; Azarabadi ve ark., 2017). Sorbitol'ün, hücrelerde bu enzimlerin uyarılmasında ve fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesinin artırılmasında önemli bir rolü olduğu bugüne kadar yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Zhang ve ark., 1995; Godoy-Hernández ve ark., 2000; Xiong ve Zhu, 2002; Wu ve ark., 2005; Shi ve ark., 2007; Li ve ark., 2015b). Başta PAL olmak üzere bu enzimler hücrelerde sekonder metabolitlerin üretiminde en çok çalışan enzimlerdir.

Bugüne kadar sorbitol elisitörünün hücre kültürlerinde sekonder metabolit birikimini ve hücre büyümesini teşvik ettiğini bildiren pek çok araştırma yapılmıştır (Shi ve ark., 2007; Ling ve ark., 2008; Wu ve Shi, 2008; Zhao ve ark., 2010a; Patil ve ark., 2013; Valayıl ve ark., 2015; Zaker ve ark., 2015; Razavizadeh ve Adabavazeh, 2017b; Sing ve ark., 2017; Yang ve ark., 2017). Bu çalışmalarda olduğu gibi, yapmış olduğumuz bu araştırma sonucunda kullanılan sorbitol dozları sekonder metabolit birikimini ve hücre büyümesini olumlu yönde teşvik ederek hücre kültürlerinde önemli bir osmotik stres kaynağı olduğunu ortaya koymuştur.

**Çizelge 4.36.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (g/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.6369	0.0023	0.0039	0.6382	0.0013	0.0023	0.6418	0.0013	0.0023	0.6390D**	0.0011	0.0034
5	0.6484	0.0037	0.0063	0.6499	0.0040	0.0069	0.6492	0.0021	0.0037	0.6492C	0.0017	0.0051
25	0.6651	0.0021	0.0037	0.6658	0.0015	0.0026	0.6717	0.0069	0.0119	0.6675B	0.0024	0.0071
50	0.6906	0.0041	0.0071	0.6948	0.0059	0.0102	0.7010	0.0016	0.0028	0.6955A	0.0026	0.0078
G. Ort	0.6603	0.0062	0.0216	0.6622	0.0066	0.0228	0.6659	0.0071	0.0247			
Doz: 0.000**; Gün:0.094; DozXGün: 0.885												

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.37.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (g/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0099	0.0003	0.0006	0.0111	0.0006	0.0011	0.0115	0.0010	0.0017	0.0108B**	0.0004	0.0013
5	0.0104	0.0006	0.0010	0.0109	0.0003	0.0006	0.0114	0.0001	0.0002	0.0109B	0.0002	0.0007
25	0.0104	0.0006	0.0010	0.0109	0.0003	0.0006	0.0114	0.0001	0.0002	0.0109B	0.0002	0.0007
50	0.0124	0.0004	0.0007	0.0133	0.0006	0.0010	0.0136	0.0006	0.0011	0.0131A	0.0003	0.0010
G. Ort	0.0108b**	0.0004	0.0012	0.0116ab	0.0004	0.0013	0.0120a	0.0004	0.0013			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.009\*\*; DozXGün: 0.996

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\*\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.38.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (g/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0426	0.0002	0.0004	0.0436	0.0003	0.0005	0.0429	0.0007	0.0012	0.0430B**	0.0003	0.0008
5	0.0415	0.0010	0.0017	0.0427	0.0013	0.0022	0.0436	0.0002	0.0004	0.0426B	0.0006	0.0017
25	0.0415	0.0010	0.0017	0.0427	0.0013	0.0022	0.0436	0.0002	0.0004	0.0426B	0.0006	0.0017
50	0.0466	0.0006	0.0010	0.0478	0.0007	0.0012	0.0491	0.0003	0.0005	0.0478A	0.0005	0.0014
G. Ort	0.0430b*	0.0007	0.0025	0.0442ab	0.0008	0.0026	0.0448a	0.0008	0.0027			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.010\*; DozXGün: 0.770

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.39.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (g/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0053	0.0001	0.0002	0.0058	0.0002	0.0004	0.0055	0.0002	0.0004	0.0056B**	0.0001	0.0004
5	0.0064	0.0002	0.0004	0.0069	0.0003	0.0005	0.0071	0.0004	0.0007	0.0068A	0.0002	0.0005
25	0.0064	0.0002	0.0004	0.0069	0.0003	0.0005	0.0071	0.0004	0.0007	0.0068A	0.0002	0.0005
50	0.0067	0.0003	0.0005	0.0070	0.0002	0.0003	0.0074	0.0001	0.0002	0.0070A	0.0001	0.0004
G. Ort	0.0062b*	0.0002	0.0006	0.0066ab	0.0002	0.0006	0.0068a	0.0003	0.0009			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.012\*; DozXGün: 0.838

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

RD: Renk Değeri

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.40.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına (µg/g) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (g/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.2561	0.0081	0.0140	0.2624	0.0089	0.0155	0.2740	0.0069	0.0120	0.2642D**	0.0048	0.0144
5	0.3613	0.0069	0.0120	0.3680	0.0023	0.0040	0.3816	0.0041	0.0072	0.3703C	0.0038	0.0115
25	0.4613	0.0069	0.0120	0.4780	0.0121	0.0209	0.5038	0.0646	0.1119	0.4810B	0.0201	0.0602
50	0.6613	0.0066	0.0114	0.6684	0.0024	0.0041	0.6814	0.0039	0.0068	0.6704A	0.0037	0.0112
G. Ort	0.4350	0.0452	0.1565	0.4442	0.0454	0.1573	0.4602	0.0477	0.1653			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.211; DozXGün: 0.997

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.41.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (g/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	82860	240.40	416.30	82760	202.80	351.20	83120	636	1102	82910C**	212	636
5	83640	176.40	305.50	84200	230.90	400.00	85320	280	484.9	84390B	270	810
25	83640	176.40	305.50	84200	230.90	400.00	85320	280	484.9	84390B	270	810
50	89320	463.10	802.10	90240	433.30	750.60	90480	249	430.9	90010A	263	790
G. Ort	84865b**	790.60	2738.6	85350b	876.90	3037.80	86060a	833	2884			
Doz: 0.000**; Gün: 0.000**; DozXGün: 0.308												

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\*\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma



**Çizelge 4.42.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (g/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	9.2462	0.0032	0.0055	9.2452	0.0026	0.0046	9.2578	0.0138	0.0239	9.2497B**	0.0046	0.0139
5	9.3333	0.0032	0.0055	9.3351	0.0027	0.0046	9.3465	0.0049	0.0084	9.3383A	0.0028	0.0083
25	9.3333	0.0032	0.0055	9.3351	0.0027	0.0046	9.3465	0.0049	0.0084	9.3383A	0.0028	0.0083
50	9.3444	0.0046	0.0081	9.3455	0.0030	0.0051	9.3465	0.0032	0.0055	9.3455A	0.0019	0.0056
G. Ort	9.3143b*	0.0120	0.0417	9.3152ab	0.0123	0.0426	9.3243a	0.0121	0.0418			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.022\*; DozXGün: 0.989

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.43.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde sorbitol dozlarının (g/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (g/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	97.973	0.2167	0.3754	97.747	0.3176	0.5500	97.3467	0.347	0.6004	97.69AB*	0.1753	0.5258
5	97.747	0.3176	0.5500	98.630	0.1012	0.1752	97.8267	0.194	0.3355	98.07A	0.1796	0.5389
25	97.747	0.3176	0.5500	98.630	0.1012	0.1752	97.8267	0.194	0.3355	98.07A	0.1796	0.5389
50	97.007	0.2557	0.4429	97.553	0.4872	0.8439	97.6640	0.468	0.8110	97.41B	0.2320	0.6960
G. Ort	97.618b*	0.1625	0.5628	98.140a	0.1964	0.6802	97.6660b	0.149	0.5176			

Doz: 0.034\*; Gün: 0.041\*; DozXGün: 0.271

\*, Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

\*, Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

#### 4.3.6. Salisilik Asit Uygulaması

Toplam fenolik madde miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi sonucunda salisilik asit dozları ve örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.44). Diğer bir ifade ile artan dozlarda salisilik asit uygulamalarının toplam fenolik madde birikimi üzerine istatistiki anlamda önemli bir etkisi olmamıştır.

Buna karşılık, toplam flavanol miktarında (mg/g YHA) yapılan varyans analizine göre, salisilik asit dozları arasındaki farklılık önemsiz çıkarken, örnek alım zamanları arasındaki farklılık ( $p<0.05$ ) önemli bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.45'de verilmiştir. Buna göre, örnek alım zamanlarının flavanol birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.0105 mg/g olan flavanol miktarı, 2. gün sonunda 0.0118 mg/g'a çıkmıştır. En yüksek (0.0119 mg/g) flavanol birikimi ise 3. gün sonunda hasat edilen hücrelerden elde edilmiştir.

Toplam flavonol miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi salisilik asit dozları arasındaki farklılıkların çok önemli ( $p<0.01$ ), fakat örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların ise önemsiz olduğunu ortaya koymuştur. Toplam flavonol miktarı için hesaplanan tanıtıcı istatistik parametreleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.46'da verilmiştir. Toplam flavonol miktarı bakımından, salisilik asit uygulamasının 10  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M'lık konsantrasyonları kontrol kültürü ile kıyaslandığında istatistiki olarak önemli bir değişimin söz konusu olmadığı görülmektedir. Salisilik asit uygulamasının 100  $\mu$ M'lık konsantrasyonunda ise 0.0461 mg/g ile en yüksek flavonol birikimi gerçekleşmiştir (Çizelge 4.46).

Toplam antosiyanin miktarı (mg/g YHA) verilerine uygulanan varyans analizine göre, salisilik asit dozları arasındaki farklılık önemli olmasına karşılık ( $p<0.01$ ), örnek alım zamanları arasındaki farklılıklar ise önemsizdir. Toplam antosiyanin miktarı için elde edilen tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.47'de verilmiştir. Çizelge 4.47'ye göre, salisilik asit uygulamasının 50  $\mu$ M'lık dozunda en yüksek (0.0068 RD/g) antosiyanin birikimi gerçekleşirken, en düşük antosiyanin birikimi kontrol uygulaması ile 10  $\mu$ M'lık dozda gerçekleşmiştir.

Kamfor miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ) esas alınarak yapılan varyans analiz sonuçları, hem salisilik asit dozları ( $p<0.01$ ) ve hem de örnek alma zamanları ( $p<0.05$ ) arasındaki farklılığın istatistiki olarak önemli olduğunu ortaya koymuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.48'de verilmiştir. Kamfor miktarı salisilik asit uygulamasının  $50 \mu\text{M}$  ve  $100 \mu\text{M}$ 'lık dozlarında artış gösterirken, en yüksek kamfor birikimi kontrol kültürüne göre % 40'lık bir artışla  $50 \mu\text{M}$ 'lık salisilik asit uygulamasından elde edilmiştir. Salisilik asidin  $10 \mu\text{M}$ 'lık dozu ise, kontrol kültürüne göre, kamfor miktarında önemli bir değişikliğe yol açmamıştır. Diğer taraftan, örnek alma zamanlarının kamfor miktarının değişiminde önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. İlk iki gün sonunda alınan örneklerde kamfor miktarı (sırasıyla  $0.3052$  ve  $0.3078 \mu\text{g/g}$ ) bakımından istatistiki olarak önemli bir değişiklik görülmezken, 3. gün sonunda alınan örneklerde kamfor miktarı ( $0.3210 \mu\text{g/g}$ ) önemli miktarda artış göstermiştir (Çizelge 4.48).

Hücre sayısı verilerine uygulanan varyans analizi sonucunda, gerek salisilik asit dozları ve gerekse örnek alma zamanları arasında önemli farklılıkların ( $p<0.01$ ) olduğu tespit edilmiştir. Diğer özelliklerde olduğu gibi, hücre sayısı için bulunan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.49'da verilmiştir. Çizelge 4.49'dan görüldüğü gibi, salisilik asit uygulamasının bütün dozları başlangıç kültürüne göre hücre sayısını önemli ölçüde artırmıştır. Başlangıç kültüründe  $82900$  adet olan ortalama hücre sayısı,  $10 \mu\text{M}$ 'lık dozda  $84000$ 'e,  $50 \mu\text{M}$ 'lık dozda  $84386$ 'ya ve  $100 \mu\text{M}$ 'lık salisilik asit uygulamasında ise en yüksek değer olan  $93600$ 'e ulaşmıştır. Ayrıca, örnek alma zamanlarının hücre sayısında önemli bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. İlk iki gün sonunda alınan örneklerde hücre sayısı (sırasıyla  $85705$  adet ve  $85915$  adet) istatistiki olarak önemli bir değişiklik göstermezken, 3. gün sonunda alınan örneklerde hücre sayısı ( $87045$  adet) önemli ölçüde artış göstermiştir.

Hücre kuru ağırlığı ( $\text{g/l}$ ) için yapılan varyans analizi sonuçlarına göre, salisilik asit dozları arasında önemli ( $p<0.01$ ) farklılıkların olduğu, buna karşılık örnek alma zamanları arasındaki farklılıkların ise istatistiki anlamda önemsiz olduğu belirlenmiştir. Buna göre hesaplanan tanıtıcı istatistikler ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.50'de verilmiştir. Hücre kuru ağırlığı salisilik asit uygulamasının  $50$  ve  $100 \mu\text{M}$ 'lık dozlarında artış gösterirken, en yüksek hücre ağırlığı

9.4481 g/l ile 100 µM'lık salisilik asit uygulamasından elde edilmiştir. Salisilik asidin 10 µM'lık dozu ise hücre ağırlığında önemli bir artış oluşturmamış ve kontrol kültürü ile aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır (Çizelge 4.50).

Hücre canlılığı (%) verilerine uygulanan varyans analizi sonuçlarına göre, artan salisilik asit dozları arasındaki farklılık istatistiki anlamda önemsiz olduğu, örnek alma zamanları arasındaki farklılığın ise istatistiki anlamda önemli ( $p < 0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir. Hücre canlılığına ilişkin olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.51'de verilmiştir. Buna göre, hücre canlılığı 1. gün sonunda % 97.918 iken, 2. gün sonunda % 98.2683'e çıkmış ve üçüncü gün sonunda azalarak % 97.7850'ye düşmüştür.

Salisilik asit (SA) bitkilerin büyüme-gelişme ve savunma sistemlerinde anahtar rol oynayan, hücrelerde koruyucu bazı sinyal iletim enzimlerinin indüklenmesinde ve fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir işlevi olan kimyasal elisitördür (Thulke ve Conrath, 1998; Sgarbi ve ark., 2003; Shim ve ark., 2003; Solecka ve Kacperska, 2003; Zhao ve ark., 2005; Chen ve ark., 2006; Shi ve Zhu, 2008; Mutlu ve ark., 2009). Bu enzimler hücrelerde sekonder metabolitlerin üretiminde en çok çalışan enzimler arasındadır. Bugüne kadar salisilik asit elisitörünün hücre kültürlerinde başta sekonder metabolit birikimi olmak üzere hücre büyümesini teşvik ettiği pek çok çalışma yapılmıştır (Komaraiah ve ark., 2005; Wang ve ark., 2007; Prakash ve Srivastava, 2008; Ajungla ve ark., 2009; Roat ve Ramawat, 2009; Arora ve ark., 2010; Dong ve ark., 2010; Coste ve ark., 2011; Patil ve ark., 2013; Qin ve ark., 2014; Chodisetti ve ark., 2015; Wang ve ark., 2015; Anusha ve ark., 2016; Gabr ve ark., 2016; Owis ve ark., 2016; Ru ve ark., 2016; Thiruvengadam ve ark., 2016; Chung ve ark., 2017; Deepthi ve Satheeshkumar, 2017; Hajati ve ark., 2017; Hegazi, 2017; Krstić-Milošević ve ark., 2017; Ma ve ark., 2017; Ptak ve ark., 2017; Yang ve ark., 2017). Bu çalışmada salisilik asit uygulamasının sekonder metabolit birikimi ve hücre büyümesinde etkin bir elisitör olduğu belirlenmiştir.

Ancak, toplam fenolik madde miktarında salisilik asit uygulamasının herhangi bir etkisinin olmadığı da saptanmıştır. Bu durumun uygulama süresinin kısa olması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Nitekim bazı araştırmacılar (Ali ve ark., 2007; Gadzovska ve ark., 2013) sekonder metabolit birikiminin hücrelerde farklı

olabileceğini, fitokimyasallardan bazılarının elisitörlere karşı tepkilerinin hızlı (8 saat), bazılarının ise yavaş olduğunu (7 gün ve üzeri) bildirmişlerdir.

**Çizelge 4.44.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.6369	0.0023	0.0039	0.6382	0.0013	0.0023	0.6418	0.0013	0.0023	0.6390	0.0011	0.0034
10	0.6318	0.0007	0.0013	0.6314	0.0013	0.0022	0.6363	0.0012	0.0020	0.6332	0.0009	0.0028
50	0.6351	0.0021	0.0037	0.6364	0.0021	0.0036	0.6383	0.0021	0.0037	0.6366	0.0012	0.0035
100	0.6363	0.0032	0.0056	0.6318	0.0051	0.0089	0.6348	0.0055	0.0096	0.6343	0.0025	0.0074
G. Ort.	0.6350	0.0011	0.0039	0.6345	0.0015	0.0053	0.6378	0.0015	0.0053			
Doz: 0.080; Gün: 0.212; DozXGün: 0.888												

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.45.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0099	0.0003	0.0006	0.0111	0.0006	0.0011	0.0115	0.0010	0.0017	0.0108	0.0004	0.0013
10	0.0102	0.0003	0.0006	0.0127	0.0009	0.0016	0.0124	0.0015	0.0027	0.0118	0.0007	0.0020
50	0.0104	0.0006	0.0010	0.0109	0.0003	0.0006	0.0114	0.0001	0.0002	0.0109	0.0002	0.0007
100	0.0117	0.0002	0.0003	0.0123	0.0010	0.0017	0.0123	0.0011	0.0019	0.0121	0.0004	0.0013
G. Ort.	0.0105b*	0.0003	0.0009	0.0118a	0.0004	0.0014	0.0119a	0.0005	0.0016			
Doz: 0.149; Gün: 0.042*; DozXGün: 0.865												

\*, Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma



**Çizelge 4.46.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0426	0.0002	0.0004	0.0436	0.0003	0.0005	0.0429	0.0007	0.0012	0.0430B**	0.0003	0.0008
10	0.0427	0.0012	0.0020	0.0428	0.0008	0.0014	0.0423	0.0017	0.0029	0.0426B	0.0006	0.0019
50	0.0415	0.0010	0.0017	0.0427	0.0013	0.0022	0.0436	0.0002	0.0004	0.0426B	0.0006	0.0017
100	0.0448	0.0003	0.0006	0.0459	0.0006	0.0011	0.0476	0.0004	0.0008	0.0461A	0.0005	0.0014
G. Ort.	0.0429	0.0005	0.0017	0.0437	0.0005	0.0018	0.0441	0.0007	0.0026			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.152; DozXGün: 0.517

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.47.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)									G. Ort.		
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0053	0.0001	0.0002	0.0058	0.0002	0.0004	0.0055	0.0002	0.0004	0.0056B**	0.0001	0.0004
10	0.0055	0.0002	0.0004	0.0054	0.0004	0.0007	0.0056	0.0007	0.0011	0.0055B	0.0003	0.0008
50	0.0064	0.0002	0.0004	0.0069	0.0003	0.0005	0.0071	0.0004	0.0007	0.0068A	0.0002	0.0005
100	0.0059	0.0005	0.0008	0.0062	0.0008	0.0014	0.0059	0.0004	0.0007	0.0060AB	0.0003	0.0009
G. Ort.	0.0058	0.0003	0.0011	0.0061	0.0005	0.0017	0.0060	0.0004	0.0014			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.822; DozXGün: 0.577

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

RD: Renk Değeri

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.48.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.2561	0.0081	0.0140	0.2624	0.0089	0.0155	0.2740	0.0069	0.0120	0.2642C**	0.0048	0.2642
10	0.2592	0.0073	0.0127	0.2630	0.0092	0.0159	0.2742	0.0103	0.0179	0.2654C	0.0050	0.2654
50	0.3613	0.0069	0.0120	0.3680	0.0023	0.0040	0.3816	0.0041	0.0072	0.3703A	0.0038	0.3703
100	0.3440	0.0070	0.0122	0.3378	0.0040	0.0070	0.3542	0.0074	0.0129	0.3454B	0.0040	0.3454
G. Ort.	0.3052b*	0.0148	0.0512	0.3078b	0.0143	0.0495	0.3210a	0.0148	0.0512			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.011\*; DozXGün: 0.975

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.49.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std.H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	82860	240.40	416.30	82720	202.8	351.2	83120	635.96	1102	82900C**	211.99	635.96
10	83400	529.20	916.50	83500	152.8	264.6	85100	548.98	950.9	84000B	351.85	1055.6
50	83640	176.40	305.50	84200	230.9	400	85320	280.00	484.97	84386B	270.02	810.05
100	92920	442.40	766.30	93240	166.7	288.7	94640	218.58	378.6	93600A	306.38	919.15
G. Ort.	85705b**	1267.7	4391.4	85915b	1288.0	4462.6	87045a	1364.5	4726.7			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.000\*\*; DozXGün: 0.376

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

\*\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.50.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	9.2462	0.0032	0.0055	9.2452	0.0026	0.0046	9.2452	0.0026	0.0046	9.2497C**	0.0046	0.0139
10	9.2520	0.0049	0.0086	9.2568	0.0069	0.0120	9.2568	0.0069	0.0120	9.2583C	0.0041	0.0123
50	9.3333	0.0032	0.0055	9.3351	0.0027	0.0046	9.3351	0.0027	0.0046	9.3383B	0.0028	0.0083
100	9.4612	0.0402	0.0697	9.4405	0.0037	0.0064	9.4405	0.0037	0.0064	9.4481A	0.0122	0.0365
G. Ort.	9.3232	0.0276	0.0955	9.3194	0.0236	0.0817	9.3283	0.0228	0.0790			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.634; DozXGün: 0.876

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.51.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde salisilik asit dozlarının ( $\mu\text{M}$ ) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz ( $\mu\text{M}$ )	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	97.973	0.2167	0.3754	97.7467	0.3176	0.5500	97.3467	0.3467	0.6004	97.6889	0.1753	0.5258
10	97.747	0.3176	0.5500	98.6300	0.1012	0.1752	97.8267	0.1937	0.3355	98.0678	0.1796	0.5389
50	97.747	0.3176	0.5500	98.6300	0.1012	0.1752	97.8267	0.1937	0.3355	98.0678	0.1796	0.5389
100	98.207	0.3541	0.6133	98.0667	0.1590	0.2754	98.1400	0.0872	0.1510	98.1378	0.1166	0.3498
G. Ort.	97.918ab*	0.1425	0.4936	98.2683a	0.1404	0.4864	97.7850b	0.1286	0.4453			
Doz: 0.131; Gün: 0.029*; DozXGün: 0.131												

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

#### 4.3.7. Kitosan Uygulaması

Toplam fenolik madde miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi sonucunda kitosan uygulamasının dozları ile örnek alma zamanları arasındaki interaksiyonun (doz x gün) önemli olduğu bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Buna uygun olarak hesaplanan tanıtıcı istatistik verileri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.52'de verilmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı kitosan uygulamasının 25 ve 100 mg/l'lık konsantrasyonları kontrol kültürü ile kıyaslandığında istatistiki olarak önemli bir değişim göstermemiştir. Kitosan uygulamasının 50 mg/l'lık konsantrasyonunda ise ilk günden başlayarak 3. gün sonuna kadar en yüksek (sırasıyla; 0.6949, 0.6989 ve 0.7080 mg/g) fenolik madde birikimi gerçekleşmiştir (Çizelge 4.52).

Toplam flavanol miktarı (mg/g YHA) verilerinin varyans analizi kitosan uygulamasının dozları arasındaki farklılıkların ve örnek alım zamanları ( $p<0.01$ ) arasındaki farklılığın önemli olduğunu ortaya koymuştur. Toplam flavanol miktarı için elde edilen tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.53'de verilmiştir.

Çizelge 4.53 incelendiğinde toplam flavanol miktarı kitosan uygulamasının 50 ve 100 mg/l'lık konsantrasyonları kontrol kültürü ile kıyaslandığında istatistiki olarak önemli bir değişim gösterirken, 25 mg/l'lık konsantrasyon flavanol birikiminde istatistiki anlamda önemli bir etkisi olmamış ve kontrol kültürü ile aynı istatistiki grupta yer almıştır. En yüksek flavanol miktarı 0.0148 mg/g ile 50 mg/l'lık, en düşük (0.0108 ve 0.0109 mg/g) flavanol birikimi ise kontrol kültürü ile 25 mg/l'lık doz uygulamasından elde edilmiştir. İlgili çizelge incelendiğinde örnek alım zamanlarının flavanol birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.0112 mg/g olan flavanol miktarı 2. gün sonunda önemli miktarda artarak 0.0124 mg/g'a, 3. gün sonunda da 0.0130 mg/g'a ile maksimum düzeye ulaşmıştır.

Toplam flavonol miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizine göre kitosan uygulamasının dozları arasındaki farklılıkların ve örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların önemli ( $p<0.01$ ) olduğu tespit edilmiştir. Toplam flavonol miktarına

ilişkin tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgede harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.54'de verilmiştir.

Kitosan uygulamasının 50 mg/l'lik konsantrasyonunda toplam flavonol miktarı en fazla (0.0477 mg/g) birikim gösterirken, diğer konsantrasyonların flavonol birikiminde istatistiki olarak önemli bir değişim göstermediği ve kontrol kültürü ile aynı grupta yer aldığı görülmüştür. İlgili çizelge incelendiğinde örnek alım zamanlarının flavonol birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.0433 mg/g olan flavonol miktarı 2. gün sonunda önemli miktarda artarak 0.0443 mg/g'a ve 3. gün sonunda da 0.0455 mg/g'a çıkmıştır (Çizelge 4.54).

Toplam antosiyanin miktarı (mg/g YHA) değerlerinin varyans analiz sonuçları, kitosan uygulamasının dozları arasındaki farklılıkların ( $p < 0.01$ ) önemli, örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların ise önemsiz olduğunu ortaya koymuştur. Toplam antosiyanin miktarına ilişkin olarak hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.55'de verilmiştir.

Çizelge 4.55 incelendiğinde kitosan uygulamasının bütün konsantrasyonlarında toplam antosiyanin önemli miktarlarda değişim göstermiştir. En yüksek (0.0079 RD/g) antosiyanin birikimi 50 mg/l'lik kitosan uygulamasında görülürken, 100 mg/l'lik kitosan uygulamasında antosiyanin birikimi kontrol dozuna göre daha da azalarak en düşük (0.0038 RD/g) antosiyanin birikimi gerçekleşmiştir.

Kamfor miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ) için yapılan varyans analizi sonucuna göre, kitosan uygulamasının dozları arasındaki farklılık ( $p < 0.01$ ) önemli, örnek alım zamanları arasındaki farklılık ise önemsiz bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.56'da verilmiştir.

Kamfor miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ) kitosan uygulamasının bütün dozlarında önemli miktarlarda değişim göstermiştir. Başlangıç kültüründe 0.2642  $\mu\text{g/g}$  olan kamfor birikimi 25 mg/l'lik dozda % 15'lik bir artışla 0.6625  $\mu\text{g/g}$ 'a, 100 mg/l'lik dozda ise % 81'lik bir artışla 0.4795  $\mu\text{g/g}$ 'a çıkmıştır. En yüksek kamfor miktarı ise 0.9731  $\mu\text{g/g}$ 'a ile (% 268'lik artış) 50 mg/l'lik doz uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.56).



Hücre sayısı (adet) verilerinin varyans analizi, kitosan uygulamasının dozları arasındaki farklılıkların ve örnek alım zamanları arasındaki farklılığın ( $p<0.01$ ) önemli olduğunu ortaya koymuştur. Hücre sayısı için hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.57’de verilmiştir.

Çizelge 4.57 incelendiğinde kitosan uygulamasının 50 ve 100 mg/l’lik dozları başlangıç kültürüne göre hücre sayısını önemli ölçüde artırmıştır. Başlangıç kültüründe 83906 adet olan ortalama hücre sayısı 25 mg/l’lik dozda 84373 adet’e çıkmış ancak bu artış istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Kitosan uygulamasının 50 mg/l’lik dozunda en yüksek (106740 adet) hücre sayısı tespit edilirken, 100 mg/l’lik dozda 88826 adet hücre tespit edilmiştir. İlgili çizelge incelendiğinde örnek alım zamanlarının hücre sayısında önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. İlk gün sonunda alınan örneklerde 89905 adet olan hücre sayısı, 2. gün sonunda 90495 adet’e, 3. gün sonunda da 91735 adet’e çıktığı tespit edilmiştir.

Hücre kuru ağırlığı için yapılan varyans analizine göre kitosan uygulamasının dozları arasındaki farklılıkların ( $p<0.01$ ) önemli, örnek alım zamanları arasındaki farklılık ise önemsiz bulunmuştur. Hücre kuru ağırlığı için hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.58’de verilmiştir.

Hücre kuru ağırlığı (g/l) kitosan uygulamasının bütün dozlarında önemi ölçüde artış göstermiştir. En yüksek hücre ağırlığı 9.4316 g/l ile 50 mg/l’lik kitosan uygulamasından elde edilmiştir. Kitosan’ın 25 ve 100 mg/l’lik dozlarında ise sırasıyla 9.3383 ve 9.3403 g/l hücre kuru ağırlığı elde edilmiştir (Çizelge 4.58).

Hücre canlılığı (%) için yapılan varyans analizi sonucunda kitosan uygulamasının dozları arasındaki farklılık ( $p<0.01$ ) önemli, örnek alım zamanları ise önemsiz bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları ilgili çizelgelerde harfli gösterim şeklinde Çizelge 4.59’da verilmiştir.

Çizelge 4.59 incelendiğinde kitosan elisitörünün 25 ve 50 mg/l’lik konsantrasyonları hücre canlılığına önemli bir etkide bulunmazken, 100 mg/l’lik konsantrasyon toksik etki göstererek canlı hücre sayısını önemli ölçüde azaltarak % 93.455’e düşürmüştür.

Hücreler, biyotik ve abiyotik elisitörlere maruz kaldıklarında fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri oldukça değişkendir (Sircar and Mitra, 2008). Kitin’in

deasetillenmiş biçimi olan kitosan, bazı mantar türlerinin hücre duvarlarının ana bileşenidir (Agrawal ve ark., 2002; Chakraborty ve ark., 2008). Aynı zamanda doğal, biyouyumlu, katyonik bir biyopolimer olan kitosan, bitkilerde savunma ile ilgili sekonder metabolitleri sentezlemek için bazı patojenik mikroorganizmaların etkilerini taklit ederek fitokimyasalların biyosentezi teşvik eder. Bugüne kadar kitosan elisitörünün hücre kültürlerinde başta sekonder metabolit birikimi olmak üzere hücre büyümesini teşvik ettiği pek çok araştırma yapılmıştır (Komaraiaha ve ark., 2003; Cheng ve ark., 2006; Orlita ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2010b; Ahmed ve Baig, 2014; Gadzovska ve ark., 2014; Taurino ve ark., 2015; Meier ve ark., 2015; Gabr ve ark., 2016; Al Khateb ve ark., 2017; Hegazi, 2017; Krstić-Milošević ve ark., 2017; Kumar ve ark., 2017b; Ma ve ark., 2017; Malayaman ve ark., 2017; Singh ve ark., 2017). Daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi, yapılan bu çalışmada kullanılan kitosan dozları sekonder metabolit birikimini ve hücre büyümesini olumlu yönde teşvik ederek hücre kültürlerinde önemli bir biyotik stres kaynağı olduğunu ortaya koymuştur.

**Çizelge 4.52.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Örnek Alma Z. (gün)	Tanıtıcı İstatistikler		
		Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma
0	1	0.6369Ac**	0.0023	0.0039
	2	0.6382Ab	0.0013	0.0023
	3	0.6418Ab	0.0013	0.0023
25	1	0.6481Abc	0.0034	0.0059
	2	0.6487Ab	0.0047	0.0081
	3	0.6481Ab	0.0027	0.0047
50	1	0.6949Aa	0.0033	0.0057
	2	0.6989Aa	0.0034	0.0059
	3	0.7080Aa	0.0017	0.0030
100	1	0.6580Ab	0.0021	0.0036
	2	0.6477Ab	0.0030	0.0051
	3	0.6445Ab	0.0025	0.0043
Doz: 0.000; Gün: 0.540; DozXGün: 0.006**				

\*\* , Ortak harfi olmayan doz x gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

Z: Zaman

**Çizelge 4.53.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0099	0.0003	0.0006	0.0111	0.0006	0.0011	0.0115	0.0010	0.0017	0.0108C**	0.0004	0.0013
25	0.0104	0.0006	0.0010	0.0109	0.0003	0.0006	0.0114	0.0001	0.0002	0.0109C	0.0002	0.0007
50	0.0141	0.0004	0.0007	0.0150	0.0002	0.0004	0.0152	0.0006	0.0011	0.0148A	0.0003	0.0009
100	0.0104	0.0006	0.0010	0.0126	0.0005	0.0009	0.0138	0.0007	0.0013	0.0122B	0.0006	0.0018
G. Ort.	0.0112b**	0.0005	0.0019	0.0124a	0.0005	0.0018	0.0130a	0.0006	0.0019			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.000\*\*; DozXGün: 0.432

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\*\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.54.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0426	0.0002	0.0004	0.0436	0.0003	0.0005	0.0429	0.0007	0.0012	0.0430B**	0.0003	0.0008
25	0.0415	0.0010	0.0017	0.0427	0.0013	0.0022	0.0436	0.0002	0.0004	0.0426B	0.0006	0.0017
50	0.0464	0.0008	0.0014	0.0470	0.0009	0.0016	0.0498	0.0001	0.0003	0.0477A	0.0006	0.0019
100	0.0426	0.0009	0.0015	0.0437	0.0008	0.0014	0.0460	0.0012	0.0021	0.0441B	0.0007	0.0021
G. Ort.	0.0433b**	0.0006	0.0022	0.0443ab	0.0006	0.0022	0.0455a	0.0009	0.0030			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.002\*\*; DozXGün: 0334

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

\*\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.55.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0053	0.0001	0.0002	0.0058	0.0002	0.0004	0.0055	0.0002	0.0004	0.0056C**	0.0001	0.0004
25	0.0064	0.0002	0.0004	0.0069	0.0003	0.0005	0.0071	0.0004	0.0007	0.0068B	0.0002	0.0005
50	0.0079	0.0001	0.0002	0.0079	0.0005	0.0009	0.0080	0.0004	0.0006	0.0079A	0.0002	0.0006
100	0.0038	0.0006	0.0011	0.0035	0.0008	0.0013	0.0041	0.0007	0.0012	0.0038D	0.0004	0.0011
G. Ort.	0.0059	0.0005	0.0016	0.0060	0.0005	0.0019	0.0062	0.0005	0.0017			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.543; DozXGün: 0.946

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

RD: Renk Değeri

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.56.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına (µg/g) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.2561	0.0081	0.0140	0.2624	0.0089	0.0155	0.2740	0.0069	0.0120	0.2642D**	0.0048	0.0144
25	0.6512	0.0135	0.0234	0.6617	0.0072	0.0124	0.6746	0.0105	0.0181	0.6625B	0.0063	0.0190
50	0.9613	0.0066	0.0114	0.9684	0.0024	0.0041	0.9895	0.0031	0.0053	0.9731A	0.0048	0.0143
100	0.4573	0.0101	0.0175	0.4773	0.0123	0.0214	0.5037	0.0647	0.1121	0.4795C	0.0204	0.0611
G. Ort.	0.5815	0.0785	0.2720	0.5925	0.0782	0.2708	0.6105	0.0799	0.2769			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.152; DozXGün: 0.996

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.57.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	82840	240.4	416.3	82760	202.8	351	83120	636	1101.5	83906C**	211.9	635.9
25	83600	176.4	305.5	84200	230.9	400	85320	280	484.9	84373C	270.0	810.0
50	104520	1073	1858.3	106500	288.7	500	109200	2037	3528	106740A	934.1	2802.4
100	88660	466.7	808.3	88520	693.6	1201	89300	120	208.2	88826B	273.4	820.2
G. Ort.	89905b**	2641	9148	90495ab	2863	9919	91735a	3124	10822			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.009\*\*; DozXGün: 0.184

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\*\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma



**Çizelge 4.58.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	9.2462	0.0032	0.0055	9.2452	0.0026	0.0046	9.2578	0.0138	0.0239	9.2497C**	0.0046	0.0139
25	9.3333	0.0032	0.0055	9.3351	0.0027	0.0046	9.3465	0.0049	0.0084	9.3383B	0.0028	0.0083
50	9.4192	0.0088	0.0152	9.4294	0.0146	0.0253	9.4461	0.0266	0.0460	9.4316A	0.0099	0.0298
100	9.3378	0.0017	0.0029	9.3390	0.0016	0.0028	9.3443	0.0014	0.0025	9.3403B	0.0013	0.0038
G. Ort.	9.3341	0.0186	0.0644	9.3372	0.0199	0.0689	9.3487	0.0211	0.0732			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.126; DozXGün: 0.975

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.59.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde kitosan dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	97.9733	0.2167	0.3754	97.7467	0.3176	0.5500	97.3467	0.3467	0.6004	97.6889A**	0.1753	0.5258
25	97.7467	0.3176	0.5500	98.6300	0.1012	0.1752	97.8267	0.1937	0.3355	98.0678A	0.1796	0.5389
50	97.8373	0.2314	0.4007	97.3467	0.3994	0.6918	97.6733	0.7134	1.2356	97.6191A	0.2557	0.7670
100	93.2333	0.4978	0.8622	93.8333	0.3180	0.5508	93.3000	0.6658	1.1533	93.4556B	0.2739	0.8218
G. Ort.	96.6977	0.6202	2.1486	96.8892	0.5652	1.9580	96.5367	0.6088	2.1089			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.472; DozXGün: 0.581

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

#### 4.3.8. Maya Ekstraktı Uygulaması

Toplam fenolik madde miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizi sonucunda, maya dozları ile örnek alma zamanları arasındaki farklılığın önemli olduğu ( $p<0.01$ ) bulunmuştur. Buna uygun olarak hesaplanan tanıtıcı istatistik verileri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.60'da verilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı 25 ve 50 mg/l'lik maya uygulamalarında başlangıç kültürü ile kıyaslandığında istatistiki anlamda önemli bir değişim göstermezken, 100 mg/l'lik doz uygulamasında en yüksek (0.7018 mg/g) fenolik madde birikimi tespit edilmiştir (Çizelge 4.60).

Toplam flavanol miktarı (mg/g YHA) verilerinin varyans analizi maya dozları arasındaki farklılıkların ( $p<0.01$ ) ve örnek alma zamanları arasındaki farklılığın ( $p<0.05$ ) önemli olduğunu ortaya koymuştur. Toplam flavanol miktarı için elde edilen tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.61'de verilmiştir. Kontrol kültürü ile istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer alan 25 mg/l'lik maya dozu toplam flavanol birikiminde etkili olmamıştır. Buna karşılık; kontrol kültüründe 0.0108 mg/g olan toplam flavanol miktarı, 50 mg/l'lik maya uygulamasıyla 0.0030 mg/g artarak 0.0138 mg/g'a, 100 mg/l'lik maya uygulamasıyla da 0.0069 mg/g artarak 0.0177 mg/g'a çıkmıştır. Diğer taraftan, ilgili çizelgeden, örnek alım zamanlarının flavanol birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.0126 mg/g olan flavanol miktarı, 2. gün sonunda 0.0133 mg/g'a, 3. gün sonunda da 0.0139 mg/g'a çıkmıştır (Çizelge 4.61).

Toplam flavonol miktarı (mg/g YHA) için yapılan varyans analizine göre, maya dozları arasındaki farklılıkların önemli ( $p<0.01$ ), örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Toplam flavonol miktarına ilişkin tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.62'de verilmiştir. Buradan, maya ekstraktının 25 ve 50 mg/l'lik dozlarının toplam flavonol miktarını etkilemediği, fakat 100 mg/l'lik maya uygulamasının flavonol birikimini önemli ölçüde artırdığı görülmektedir.

Toplam antosiyanin miktarı (RD/g YHA) değerlerinin varyans analizi, artan dozlarda maya uygulamaları arasındaki farklılıkların ( $p<0.01$ ) ve örnek alım zamanları arasındaki farklılığın önemli ( $p<0.05$ ) olduğunu ortaya koymuştur. Toplam

antosiyenin miktarına ilişkin olarak hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.63'de verilmiştir. Kontrol kültürü ile istatistiki olarak aynı grup içerisinde yer alan 25 mg/l'lik maya uygulaması toplam antosiyenin miktarında herhangi önemli bir değişiklik meydana getirmemiştir. Diğer taraftan, mayanın; 50 mg/l'lik dozunda 0.0080 RD/g antosiyenin birikimi görülürken, 100 mg/l'lik maya dozunda ise 0.0122 RD/g ile en yüksek antosiyenin miktarı tespit edilmiştir. İlgili çizelge incelendiğinde, örnek alım zamanlarının antosiyenin birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 0.073 RD/g olan antosiyenin miktarı, 2. gün sonunda 0.080 RD/g'a, 3. gün sonunda da 0.0084 RD/g'a çıkmıştır (Çizelge 4.63).

Kamfor miktarı ( $\mu\text{g/g}$ ) için yapılan varyans analizi sonucuna göre, maya dozları arasındaki farklılığın ( $p<0.01$ ) ve örnek alım zamanları arasındaki farklılıkların önemli olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ) Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.64'de verilmiştir. Çizelge 4.64 incelendiğinde, kamfor miktarının uygulanan maya dozları ile önemli miktarda artış gösterdiği açıkça görülmektedir. Kamfor miktarında, 25 mg/l'lik dozda % 255, 50 mg/l'lik % 570 ve 100 mg/l'lik dozda ise % 831'lik bir artış sağlanmıştır Kontrol kültürü ile kıyaslandığında, en yüksek (2.4572  $\mu\text{g/g}$ ) kamfor birikimi 100 mg/l'lik maya uygulamasından elde edilirken, bunu 1.7702  $\mu\text{g/g}$  ile 50 mg/l'lik maya dozu takip etmiştir. En düşük kamfor birikimi ise 0.02642  $\mu\text{g/g}$  ile maya uygulanmayan kontrol (başlangıç) kültüründen elde edilmiştir. Diğer taraftan, ilgili çizelgeden, örnek alım zamanlarının kamfor birikimine önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün (uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 1.3507  $\mu\text{g/g}$  olan kamfor miktarı, 2. gün sonunda 1.3575  $\mu\text{g/g}$ 'a ve 3. gün sonunda da 1.3631  $\mu\text{g/g}$ 'a çıktığı belirlenmiştir.

Hücre sayısı verilerinin varyans analizi artan maya dozları arasındaki farklılığın ve örnek alma zamanları arasındaki farklılıkların ( $p<0.01$ ) önemli olduğunu ortaya koymuştur. Hücre sayısı için hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.65'de verilmiştir. Buna göre, hücre sayısı uygulanan maya dozları ile önemli miktarda artış göstermiştir. Başlangıç kültüründe 82906 adet olan hücre sayısı 25 mg/l'lik dozda 84386, 50 mg/l'lik dozda 106593 ve 100 mg/l'lik dozda ise 113260 adet'e ulaşmıştır. İlgili çizelge incelendiğinde, örnek alım zamanlarının hücre sayısında önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir. İlk gün

(uygulamadan 8 saat sonra) alınan örneklerde 96145 adet hücre sayısı, 2. gün sonunda 96880'e ve 3. gün sonunda da 97335 adet'e ulaşmıştır.

Hücre kuru ağırlığı (g/l) için yapılan varyans analizine göre, maya dozları arasındaki farklılık önemli ( $p < 0.01$ ), örnek alma zamanları arasındaki farklılık ise önemsiz bulunmuştur. Hücre kuru ağırlığı için hesaplanan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.66'da verilmiştir. Çizelge 4.66 incelendiğinde, hücre kuru ağırlığında uygulanan maya dozları ile önemli miktarda artış gerçekleştiği görülmektedir. Kontrol kültüründe 9.2497 g/l olan hücre kuru ağırlığı, 25 mg/l'lik dozda 9.4481 g/l'ye, 50 mg/l'lik dozda 9.5264 g/l'ye ve 100 mg/l'lik dozda ise 9.6358 g/l'ye çıkmıştır.

Hücre canlılığı (%) için yapılan varyans analizi sonucunda, maya dozları arasındaki farklılık önemli ( $p < 0.01$ ), örnek alma zamanları arasındaki farklılık ise önemsiz bulunmuştur. Buna uygun olarak yapılan tanıtıcı istatistik değerleri ve Tukey testi sonuçları, harfli gösterim şeklinde, Çizelge 4.67'de verilmiştir. Buna göre, 50 ve 100 mg/l'lik maya dozlarının, kontrol kültürüyle kıyaslandığında hücre canlılığını önemli ölçüde artırdığı, 25 mg/l'lik maya dozunun ise ortalama canlı hücre sayısında önemli bir artış sağlamadığı tespit edilmiştir.

Endofitik mantarlardan biri olan maya; bitki hücrelerinde sekonder metabolitlerin birikimini artırarak bitkiyi fitopatogenik mikroorganizmalara karşı korumakla birlikte, bitkinin abiyotik stres faktörlerine karşı toleransını da artırdığı yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Redman ve ark., 2002; Arnold ve ark., 2003; Waller ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2006; Akello ve ark., 2007; Bae ve ark., 2009; Giordano ve ark., 2009). Son yıllarda endofitik mantarların hücre kültürlerinde sekonder metabolitlerin birikimini ve hücre büyümesini teşvik ettiğini bildiren pekçok çalışma yapılmıştır (Ge ve ark., 2005; Shi ve ark., 2007; Ajungla ve ark., 2009; Roat ve Ramawat, 2009; Zhao ve ark., 2010a; Hong ve ark., 2012; Ahmed ve Baig, 2014; Nasiri-Bezenjani ve ark., 2014; El-Nabarawy ve ark., 2015; Zaker ve ark., 2015; Bosila ve ark., 2016; Deepthi ve ark., 2016; Li ve ark., 2016; Naikawadi ve ark., 2016; Owis ve ark., 2016; Park ve ark., 2016; Al Khateb ve ark., 2017; Dowom ve ark., 2017; Isah, 2017; Kochan ve ark., 2017; Krstić-Milošević ve ark., 2017; Ma ve ark., 2017; Sing ve ark., 2017; Trong ve ark., 2017). Bu çalışma sonuçları da daha önce hücre kültürlerinde farklı bitki türleri

üzerinde yapılan maya elisitör uygulamalarının sonuçlarını destekler yönde sekonder metabolitlerin birikimini ve hücre büyümesini artırmıştır.

**Çizelge 4.60.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam fenolik madde miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.6369	0.0023	0.0039	0.6382	0.0013	0.0023	0.6418	0.0013	0.0023	0.6390B**	0.0011	0.0034
25	0.6481	0.0031	0.0053	0.6487	0.0037	0.0064	0.6482	0.0026	0.0044	0.6483B	0.0016	0.0047
50	0.6374	0.0265	0.0460	0.6451	0.0299	0.0518	0.6525	0.0255	0.0442	0.6450B	0.0139	0.0416
100	0.6955	0.0024	0.0041	0.7008	0.0018	0.0031	0.7091	0.0007	0.0011	0.7018A	0.0022	0.0065
G. Ort.	0.6545	0.0093	0.0321	0.6582	0.0099	0.0343	0.6629	0.0098	0.0339			
Doz: 0.000**; Gün: 0.694; DozXGün: 0.998												

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.61.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavanol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0099	0.0003	0.0006	0.0111	0.0006	0.0011	0.0115	0.0010	0.0017	0.0108C**	0.0004	0.0013
25	0.0103	0.0006	0.0010	0.0106	0.0002	0.0004	0.0111	0.0003	0.0004	0.0107C	0.0002	0.0007
50	0.0132	0.0008	0.0013	0.0138	0.0008	0.0014	0.0145	0.0012	0.0020	0.0138B	0.0005	0.0015
100	0.0170	0.0002	0.0004	0.0177	0.0002	0.0004	0.0185	0.0002	0.0004	0.0177A	0.0002	0.0007
G. Ort.	0.0126b*	0.0009	0.0031	0.0133ab	0.0009	0.0030	0.0139a	0.0010	0.0033			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.023\*; DozXGün: 0.990

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma



**Çizelge 4.62.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam flavonol miktarına (mg/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0426	0.0002	0.0004	0.0436	0.0003	0.0005	0.0429	0.0007	0.0012	0.0430B**	0.0003	0.0008
25	0.0408	0.0004	0.0007	0.0420	0.0007	0.0012	0.0429	0.0007	0.0012	0.0419B	0.0004	0.0013
50	0.0437	0.0004	0.0007	0.0419	0.0025	0.0043	0.0458	0.0008	0.0015	0.0438B	0.0009	0.0028
100	0.0467	0.0007	0.0012	0.0483	0.0013	0.0022	0.0491	0.0007	0.0011	0.0480A	0.0006	0.0017
G. Ort.	0.0434	0.0007	0.0023	0.0439	0.0010	0.0034	0.0452	0.0008	0.0029			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.051; DozXGün: 0.314

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.63.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) toplam antosiyanin miktarına (RD/g YHA) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.0053	0.0001	0.0002	0.0058	0.0002	0.0004	0.0055	0.0002	0.0004	0.0056C**	0.0001	0.0004
25	0.0054	0.0012	0.0020	0.0059	0.0007	0.0013	0.0061	0.0008	0.0013	0.0058C	0.0005	0.0014
50	0.0075	0.0004	0.0006	0.0080	0.0006	0.0011	0.0086	0.0002	0.0004	0.0080B	0.0003	0.0008
100	0.0108	0.0002	0.0004	0.0124	0.0003	0.0006	0.0134	0.0006	0.0010	0.0122A	0.0004	0.0013
G. Ort.	0.0073b*	0.0007	0.0025	0.0080ab	0.0008	0.0029	0.0084a	0.0010	0.0033			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.021\*; DozXGün: 0.478

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

RD: Renk Değeri

YHA: Yaş Hücre Ağırlığı

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.64.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) kamfor miktarına ( $\mu\text{g/g}$ ) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	0.2561	0.0081	0.0140	0.2624	0.0089	0.0155	0.2740	0.0069	0.0120	0.2642D**	0.0048	0.0144
25	0.9401	0.0082	0.0142	0.9388	0.0055	0.0095	0.9313	0.0078	0.0135	0.9368C	0.0039	0.0116
50	1.7641	0.0029	0.0051	1.7708	0.0016	0.0028	1.7757	0.0038	0.0066	1.7702B	0.0022	0.0067
100	2.4425	0.0038	0.0067	2.4580	0.0053	0.0092	2.4713	0.0021	0.0036	2.4572A	0.0046	0.0138
G. Ort.	1.3507b*	0.2491	0.8628	1.3575ab	0.2503	0.8671	1.3631a	0.2510	0.8693			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.025\*; DozXGün: 0.137

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.65.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre sayısına (adet) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün			G. Ort.		
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	82840	240.4	416.3	82760	202.8	351	83120	636	1101.5	83906D**	211.9	635.9
25	83640	176.4	305.5	84200	230.9	400	85320	280	484.9	84386C	270.1	810
50	105220	308.1	533.6	107200	885.7	1534	107360	384	665.8	106593B	442.2	1327
100	112880	176.4	305.5	113360	260.3	451	113540	260	450.9	113260A	157.2	471.7
G. Ort.	96145b**	3973	13763	96880ab	4091.7	14174	97335a	4021	13930.5			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.001\*\*; DozXGün: 0.174

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

\*\* , Ortak harfi olmayan gün ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.66.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre kuru ağırlığına (g/l) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün					
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	9.2462	0.0032	0.0055	9.2452	0.0026	0.0046	9.2578	0.0138	0.0239	9.2497D**	0.0046	0.0139
25	9.4612	0.0402	0.0697	9.4405	0.0037	0.0064	9.4427	0.0037	0.0063	9.4481C	0.0122	0.0365
50	9.5192	0.0088	0.0152	9.5387	0.0055	0.0095	9.5212	0.0147	0.0255	9.5264B	0.0061	0.0182
100	9.6342	0.0008	0.0015	9.6364	0.0010	0.0018	9.6368	0.0008	0.0014	9.6358A	0.0006	0.0018
G. Ort.	9.4652	0.0434	0.1503	9.4652	0.0436	0.1512	9.4646	0.0418	0.1449			

Doz: 0.000\*\*; Gün: 0.998; DozXGün: 0.772

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.01$ ).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

**Çizelge 4.67.** *Achillea gypsicola* türünde hücre süspansiyon kültürlerinde maya ekstraktı dozlarının (mg/l) ve örnek alma zamanlarının (gün) hücre canlılığına (%) etkileri için tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

Doz (mg/l)	Tanıtıcı İstatistikler											
	Örnek Alma Zamanları (gün)											G. Ort.
	1.gün			2.gün			3.gün					
	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.	Ort.	Std. H.	Std. S.
0	97.9733	0.2167	0.3754	97.7467	0.3176	0.5500	97.3467	0.3467	0.6004	97.69C**	0.1753	0.5258
25	97.5373	0.4876	0.8446	98.0567	0.1690	0.2926	98.0333	0.0333	0.0577	97.88BC	0.1716	0.5149
50	98.2067	0.3163	0.5478	98.3533	0.1947	0.3372	98.4500	0.1607	0.2784	98.34AB	0.1221	0.3662
100	98.5040	0.1021	0.1768	98.9633	0.2477	0.4290	98.9877	0.1085	0.1879	98.82A	0.1147	0.3440
G. Ort.	98.0553	0.1712	0.5931	98.2800	0.1695	0.5871	98.2044	0.1998	0.6921			
Doz: 0.000**; Gün: 0.460; DozXGün: 0.368												

\*\* , Ortak harfi olmayan doz ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.01).

G. Ort. :Genel Ortalama

Ort: Ortalama

Std. H. : Standart Hata

Std. S. : Standart Sapma

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

*Achillea gypsicola* türünde kallus kültürü ile sekonder metabolit üretim potansiyelinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen bu araştırma projesinde aşağıda sunulan sonuçlar elde edilmiştir.

*Achillea gypsicola* türüne ait tohumlarda; in vitro koşullarda çimlenme sorunu çözülmüştür. Buna göre, en yüksek çimlenme oranı (% 100) 48 saat potasyum nitrat çözeltisinde bekletilmiş ve 2 mg/l GA<sub>3</sub> içeren besi (MS) ortamında kültüre alınan tohumlardan elde edilmiştir.

*Achillea gypsicola* türünde; en iyi kallus oluşumu sağlayan besi ortamı (MS ve B5), hormon kombinasyonu (sitokinin+oksin) ve eksplant kaynağı (gövde segmenti ve yaprak diski) belirlenmiştir. Buna göre; MS ortamında en iyi kallus oluşumu (756 mg kallus ağırlığı ve % 100 kallus) eksplant kaynağı olarak gövde segmentinin kullanıldığı 0.0 mg/l BAP+2.0 mg/l IBA içeren hormon kombinasyonundan, B5 ortamında ise en iyi kallus oluşumu (1600 mg kallus ağırlığı ve % 100 kallus oluşumu), eksplant kaynağı olarak gövde segmentinin kullanıldığı 0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA içeren hormon kombinasyonundan elde edilmiştir.

*Achillea gypsicola* türünde, hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kullanılacak besi ortamı (B5), besi ortamına ilave edilecek hormon kombinasyonu (0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA) ve eksplant kaynağı (gövde segmenti) belirlenmiştir.

Genel olarak elisitör uygulamalarında örnek alım zamanlarının sekonder metabolit birikimi ve hücre büyümesinde çok etkili olmadığı görülmüştür. Ancak dozların çok etkili olduğu görülmüştür

Işık uygulamalarının, karanlık uygulamalarına göre sekonder metabolit (toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, toplam antosiyanin ve kamfor) birikimini ve hücre büyümesini (hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığı) daha fazla teşvik ettiği tespit edilmiştir.

Kadmiyum klorit ve gümüş nitrat uygulamaları arasında 25 µM'lık konsantrasyonun sekonder metabolit birikiminde ve hücre büyümesinde en etkili doz olduğu, 50 µM'lık konsantrasyonun ise her iki uygulamada da hücrelerde toksik etki yaptığı ve canlı hücre sayısını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Metil jasmonat uygulamalarının genel olarak sekonder metabolit birikimini ve hücre büyümesini teşvik ettiği, ancak toplam antosiyanin ve flavonol miktarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Sorbitol uygulamaları arasında 50 g/l'lik dozun sekonder metabolit birikiminde ve hücre büyümesinde en etkili doz olduğu tespit edilmiştir.

Salisilik asit, kitosan ve maya ekstraktı uygulamalarının sekonder metabolit birikimini ve hücre büyümesini artırdığı tespit edilmiştir.

Toplam fenolik madde, flavanol ve flavonol miktarını ışık uygulamalarının diğer uygulamalara göre daha fazla artırdığı belirlenmiştir.

Toplam antosiyanin birikiminin en fazla (0.0122 mg/g YHA) olduğu elisitör uygulaması maya ekstraktı olmuştur.

Uygulamalar arasında en yüksek kamfor birikimi (2.4572 µg/g) maya ekstraktı uygulamasının 100 mg/l'lik dozunda gerçekleşmiş ve başlangıç kültürüne göre kamfor miktarında % 831'lik bir artış sağlanmıştır.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar, *Achillea gypsicola* türünün hücre kültürlerine uygulanan elisitörlere karşı olumlu tepki vererek sekonder metabolit üretiminde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Başta kamfor terpeni olmak üzere diğer sekonder metabolitlerin üretim protokolleri belirlenmiştir. Bu protokoller kullanılarak antikarsinojen bir bileşik olan kamfor terpeninin biyoreaktörlerle yüksek miktarlarda üretimi söz konusu olabilir. Özellikle kamfor gibi değerli olan bu fitokimyasalların hücre kültürleri kullanılarak biyoreaktörlerde yüksek saflıkta üretilmeleri başta tıp ve eczacılık olmak üzere endüstrinin diğer alanlarında da etkin bir şekilde kullanılmasına imkan tanıyacaktır.

Büyük bir ticari pazara sahip olan bu fitokimyasallar özellikle ülke olarak sahip olduğumuz biyolojik zenginliklerimizin ekonomik çıkarlara dönüştürülmesi konusunda katkılar sağlayabilir.



## KAYNAKLAR

- Abbasi, B.H., Stiles, A.R., Saxena, P.K., Liu, C.Z. 2012. Gibberellic acid increases secondary metabolite production in *Echinacea purpurea* hairy roots. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(7): 2057–2066.
- Abbasi, B.H., Tian, C.L., Murch, S.J., Saxena, P.K., Liu, C.Z. 2007. Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Plant cell reports*, 26(8): 1367-1372.
- Abdel-Rahman, R., Alqasoumi, S., El-Desoky, A., Soliman, G., Paré, G., Hegazy, M.E. 2015. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and anti-ulcerogenic potentials of *Achillea fragrantissima* (Forssk.). *South African Journal of Botany*, 98: 122-127.
- Abdin, M.Z., Zhu, Y., Tan, B., Bay, B., Liu, C. 2007. Enhancing bioactive molecules in medicinal plants. *Natural Products*, 3: 45-57.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A., Saji, H. 2002. Chitosan activates defense/stress response (s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(12): 1061-1069.
- Ahlawat, S., Saxena, P., Ali, A., Khan, S., Abdin, M.Z. 2017. Comparative study of withanolide production and the related transcriptional responses of biosynthetic genes in fungi elicited cell suspension culture of *Withania somnifera* in shake flask and bioreactor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 114: 19-28.
- Ahmad, N., Rab, A., Ahmad, N. 2016. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 154: 51-56.
- Ahmadi-Dastgerdi, A., Ezzatpanah, H., Asgary, S., Dokhani, S., Rahimi, E. 2017. Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Flowers and Leaves of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(2): 395-409.
- 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.
- Ajungla, L., Patil, P.P., Barmukh, R.B., Nikam, T.D. 2009. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* (L.). *Indian Journal of Biotechnology*, 8(3): 317-322.
- Akello, J., Dubois, T., Gold, C.S., Coyne, D., Nakavuma, J., Paparu, P. 2007. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of invertebrate pathology*, 96(1): 34-42.
- Al Khateeb, W., Alu'datt, M., Al Zghoul, H., Kanaan, R., El-Oqlah, A., Lahham, J. 2017. Enhancement of phenolic compounds production in in vitro grown *Rumex cyprius* Murb. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(1): 14.

- Ali, M. B., Hahn, E. J., Paek, K. Y. 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12(3): 607-621.
- Ali, M., Abbasi, B.H. 2014. Light-induced fluctuations in biomass accumulation, secondary metabolites production and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 140: 223-227.
- Ali, M., Abbasi, B.H., Ali, G. S. 2015. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(3): 1099-1106.
- Almadiy, A.A., Nenaah, G.E., Al Assiuty, B.A., Moussa, E.A., Mira, N.M. 2016. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four *Achillea species* and their nanoemulsions against foodborne bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 69: 529-537.
- Andrys, D., Adaszyńska-Skwirzyńska, M., Kulpa, D. 2017. Jasmonic acid changes the composition of essential oil isolated from narrow-leaved lavender propagated in *in vitro* cultures. *Natural Product Research*, 1-6.
- Anjum, S., Abbasi, B.H., Doussot, J., Favre-Réguillon, A., Hano, C. 2017. Effects of photoperiod regimes and ultraviolet-C radiations on biosynthesis of industrially important lignans and neolignans in cell cultures of *Linum usitatissimum* L.(Flax). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167: 216-227.
- Anjusha, S., Gangaprasad, A. 2017. Callus culture and *in vitro* production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* L. Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae). *Industrial Crops and Products*, 95: 608-614.
- Anusha, T.S., Joseph, M.V., Elyas, K.K. 2016. Callus Induction and Elicitation of Total Phenolics in Callus Cell Suspension Culture of *Celastrus paniculatus*–willd, an Endangered Medicinal Plant in India. *Pharmacognosy Journal*, 8(5): 471-475.
- Arehzoo, Z., Christina, S., Florian, G., Parvaneh, A., Javad, A., Seyed, H.M., Christoph, W. 2015. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. *Industrial Crops and Products*, 67: 97–102.
- Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26): 15649-15654.
- Arora, J., Goyal, S., Ramawat, G.K. 2010. Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 46: 430–436.
- Asakura, I., Hoshino, Y. 2017. Evaluation of plant regeneration ability of different explants and establishment of an efficient regeneration system using immature seeds in *Actinidia kolomikta*, a cold-hardy kiwifruit relative. *Scientia Horticulturae*, 220: 275-282.

- Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z., Nasiri, J. 2017. ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). *European Journal of Plant Pathology*, 147(2): 279-294.
- Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.H., Strem, M.D., Melnick, R.L., Bailey, B.A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11): 3279-3295.
- Bais, H. P., Sudha, G., Ravishankar, G.A. 2001. Influence of putrescinesilver nitrate and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissues of *Cichorium intybus* regenerants. *Plant Cell Report*, 20: 547-555.
- Bakar, D.A., Ahmed, B.A., Taha, R.M. 2014. In vitro callus induction and plant regeneration of *Celosia argentea*-an important medicinal plant. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(6): 860-866.
- Balcerowicz, M., Fittinghoff, K., Wirthmueller, L., Maier, A., Fackendahl, P., Fiene, G., Koncz, C. and Hoecker, U. 2011 Light exposure of Arabidopsis seedlings causes rapid de-stabilization as well as selective post-translational inactivation of the repressor of photomorphogenesis SPA2. *Plant Journal*. 65: 712–723.
- Baldi, A., Farkya, S., Jain, A., Gupta, N., Mehra, R., Datta, V., Bisaria, V.S. 2010. Enhanced production of podophyllotoxins by co-culture of transformed *Linum album* cells with plant growth-promoting fungi. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1): 227-241.
- Basso, M.F., Cunha, B.A.D.B., Ribeiro, A.P., Martins, P.K., de Souza, W.R., de Oliveira, N. G., Cançado, L.J. 2017. Improved Genetic Transformation of Sugarcane (*Saccharum* spp.) Embryogenic Callus Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Protocols in Plant Biology*, 221-239.
- Başer, K.H.C. 2016. Essential Oils of Achillea Species of Turkey. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 3(1).
- Beaulieu M, Aprano G.D, Lacroix M. 2002. Effect of dose rate of gamma irradiation on biochemical quality and browning of mushrooms *Agaricus bisporus*. *Radiation Physics and Chemistry*, 63: 311–315.
- Berteau, C.M., Freije, J.R., Van der Woude, H., Verstappen, F.W.A., Perk, L., Marquez, V., Franssen, M.C.R. 2005. Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Planta medica*, 71(01): 40-47.
- Bhardwaj, A.K., Kapoor, S., Naryal, A., Bhardwaj, P., Warghat, A.R., Kumar, B., Chaurasia, O.P. 2016. Effect of various dormancy breaking treatments on seed germination, seedling growth and seed vigour of medicinal plants. *Tropical Plant Research*, 3(3): 508–516.

- Bhattacharya, S.K., Satyan, K.S., Ghosal, S. 1997. Antioxidant activity of glycowithanolides from *Withania somnifera*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35: 236-239.
- Biddington, N.L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*, 11: 173–87.
- Bonfill, M.J., Palazon, R.M., Joly, S.C., Morales, M.T. 2003. Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Taxus media* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 91–96.
- Bosila, H., Hamza, M.A., El-Ateeq, A.A.E.F. 2016. Enhancement of callus growth and hyoscyamine alkaloid production in *Hyoscyamus muticus* by nanotechnology, biotic elicitor and precursor. *International Journal of Chemtech Research*, 9(7): 135-142.
- Boudet, A.M. 2000. Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1): 81-96.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 5: 839-851.
- Cai, Z., Kastell, A., Speiser, C., Smetanska, I. 2013. Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171: 330–340.
- Cetin, E.S., Babalik, Z., Hallac-Turk, F., Gokturk-Baydar, N. 2014. The effects of cadmium chloride on secondary metabolite production in *Vitis vinifera* cv. cell suspension cultures. *Biological research*, 47(1): 47.
- Ch, B., Rao, K., Gandi, S., Giri, A. 2012. Abiotic elicitation of gymnemic acid in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2): 741-747.
- Chae, S.C., Park, S.U. 2012. Improved shoot organogenesis of *Echinacea angustifolia* DC treated with ethylene inhibitors. *Life Science Journal*, 9(4): 1725-1728.
- Chakraborty, D., Sircar, D., Mitra, A. 2008. Phenylalanine ammonia-lyase-mediated biosynthesis of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde in roots of *Hemidesmus indicus*. *Journal of plant physiology*, 165(10): 1033-1040.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Ahmad, M. 2011. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual review of plant biology*, 62: 335-364.
- Chen, H., Huang, X., Gusmaroli, G., Terzaghi, W., Lau, O.S., Yanagawa, Y., Deng, X. W. 2010. Arabidopsis CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with Constitutively Photomorphogenic1-Suppressor of PhyA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *The Plant Cell*, 22(1): 108-123.
- Chen, J.Y., Wen, P.F., Kong, W.F., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Li, J.M., Huang, W.D. 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, 40(1): 64-72.

- Cheng, L.H., Eugene, I.C.W., Yu, C.S. 2009. Essential Oil Compositions and Bioactivities of the Various Parts of *Cinnamomum camphora* Sieb.var, *Linaloolifera* Fujuta, *Journal of Forestry Research*, 2: 77-96.
- Cheng, X.Y., Zhou, H.Y., Cui, X., Ni, W., Liu, C.Z. 2006. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology*, 121: 253–260.
- Cheong, J.J., Do Choi, Y. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *TRENDS in Genetics*, 19(7): 409-413.
- Chi, C.L., Pua, E.C. 1989. Ethylene inhibitor enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *B. campestris* spp *chinensis* (Chinese cabbage) in vitro. *Plant Science*, 64: 243-250.
- Chodiseti, B., Rao, K., Gandi, S., Giri, A. 2013. Improved gymnemic acid production in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* through biotic elicitation. *Plant Biotechnology Reports*, 7: 519–525.
- Chodiseti, B., Rao, K., Gandi, S., Giri, A. 2015. Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* by using the signaling molecules-methyl jasmonate and salicylic acid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51(1): 88-92.
- Chong T.M, Abdullah M.A, Lai Q.M, Nor’Aini F.M, Lajis N.H. 2005. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochemistry*, 40: 3397–3405
- Chu, M., Pedreño, M.A., Albuquerque, N., Faize, L., Burgos, L., Almagro, L. 2017. A new strategy to enhance the biosynthesis of trans-resveratrol by overexpressing stilbene synthase gene in elicited *Vitis vinifera* cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 113: 141-148.
- Chung, I.M., Rekha, K., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M. 2017. Jasmonic and salicylic acids enhanced phytochemical production and biological activities in cell suspension cultures of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb). *Acta Biologica Hungarica*, 68(1): 88-100.
- Commun, K., Mauro, M.C., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M., Jeandet, P. 2003. Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 317-323.
- Conklin, P.L., Williams, E.H., Last, R.L. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18): 9970-9974.
- Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C., Coldea, G. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2): 279-288.
- Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Mullineaux, P. 1999. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant Cell*, 11(7): 1277-1291.

- Çetin E.S, Baydar N.G. 2016. Elicitor applications to cell suspension culture for production of phenolic compounds in grapevine. *Tarım Bilimleri Dergisi* 22: 42–53.
- Dai, G.H., Andary, C., Mondolot, L., Boubals, D. 1995. Involment of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *European Journal of Plant Pathology*, 101: 541-547.
- Dai, L.P., Xiong, Z.T., Huang, Y., Li, M.J. 2006. Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata*. *Environmental Toxicology*, 21(5): 505-512.
- Dalar, A., Türker, M., Konczak, I. 2012. Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Journal of Herbal Medicine*, 2: 42–51.
- Deepthi, S., Satheeshkumar, K. 2016. Enhanced camptothecin production induced by elicitors in the cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* Linn. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3): 483-493.
- Deepthi, S., Satheeshkumar, K. 2017. Cell line selection combined with jasmonic acid elicitation enhance camptothecin production in cell suspension cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(2): 545-558.
- Demarsy, E., Fankhauser, C. 2009. Higher plants use LOV to perceive blue light. *Current opinion in plant biology*, 12(1): 69-74.
- Demirci, B., Başer, K.H.C., Aytaç, Z., Khan, S.I., Jacob, M.R., Tabanca, N. 2017. Comparative Study of Three Achillea Essential Oils from Eastern Part of Turkey and their Biological Activities.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T., Turner, J.G. 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound-and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant molecular biology*, 58(4): 497.
- Dhas, B.C., Simon, N.S., Austin, P., Selvan, S., Rajaram, S.K., Alexander, R.A. 2016. Comparative effects of plant growth regulators on callus induction in leaf explants of *Wedelia chinensis*. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(2): 320-325.
- Dilaver, Z., Mirzapour, M., Kendir, H. 2017. Breaking Seed Dormancy and Micropropagation of Perennial Vulneraria Milkvetch (*Astragalus vulnerariae* DC.). *ACTA Scientiarum Polonorum Horticulture*, 16(4): 79–88.
- Dixit V, Pandey V, Shyam R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52: 1101–1109.
- Dong, J., Wan, G., Liang, Z. 2010. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Jornal of Biotechnology*, 148: 99–104.

- Dowom, S.A., Abrishamchi, P., Radjabian, T., Salami, S.A. 2017. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag<sup>+</sup> ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Industrial Crops and Products*, 103: 81-88.
- Ecker, J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268: 667–675.
- Edris, A.E. 2007. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents. *Phytotherapy Research*, 4: 308-323.
- Elangomathavan, R., Kalaiivanan, P., Hariharan, P., Nancy Beaulah, S. 2017. High efficient protocol for Callus induction and Regeneration of a medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(1): 113-122.
- El-Nabarawy, M.A., El-Kafafi, S.H., Hamza, M.A., Omar, M.A. 2015. The effect of some factors on stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1): 1-9.
- Exposito, O., Syklovska-Baranek, K., Moyano, E., Onrubia, M., Bonfill, M., Palazon, J., Cusido, R.M. 2010. Metabolic responses of *Taxus media* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. *Biotechnology Progress*, 26(4): 1145-1153.
- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Ahmad, I., Ahmad, A. 2014. Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. *Biologia Plantarum*, 58(1): 9-17.
- Farvardin, A., Ebrahimi, A., Hosseinpour, B., Khosrowshahli, M. 2017. Effects of growth regulators on callus induction and secondary metabolite production in *Cuminum cyminum*. *Natural product research*, 1-8.
- Fatima, S., Mujib, A., Dipti, T. 2015. NaCl amendment improves vinblastine and vincristine synthesis in *Catharanthus roseus*: a case of stress signalling as evidenced by antioxidant enzymes activities *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 121: 445–458.
- Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, M. 2016b. Elicitation of Medicinally Important Antioxidant Secondary Metabolites with Silver and Gold Nanoparticles in Callus Cultures of *Prunella vulgaris* L. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180(6): 1076-1092.
- Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, M., Ali, S. 2016a. Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124(3): 573-581.
- Firouzi, A., Mohammadi, S.A., Khosrowchahli, M., Movafeghi, A., Hasanloo, T. 2013. Enhancement of silymarin production in cell culture of *Silybum marianum* L. Gaertn by elicitation and precursor feeding. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 19(3): 262–274.
- Frizzo, C.D., Santos, A.C., Paraul, N., Serafini, L.A., Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P. 2000. Essential Oils of Camphor Tree (*Cinnamomum camphora* Nees

- and Eberm) Cultivated in Southern Brazil. *Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43(3): 313-316.
- Gabr, A.M., Ghareeb, H., El Shabrawi, H.M., Smetanska, I., Bekheet, S.A. 2016. Enhancement of silymarin and phenolic compound accumulation in tissue culture of Milk thistle using elicitor feeding and hairy root cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(2): 327-333.
- Gadzovska S, S., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C., Hagège, D. 2014. Effects of polysaccharide elicitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. *The Scientific World Journal*.
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Hagège, D., Courtois, D., Joseph, C. 2013. The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113(1): 25-39.
- Gala, R., Mita, G., Caretto, S. 2005. Improving alpha-tocopherol production in plant cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, 162: 782-784.
- Gandi S, Rao K, Chodiseti B, Giri, A. 2012 Elicitation of andrographolide in the suspension cultures of *Andrographis paniculata*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 168: 1729–1738.
- Gangopadhyay, M., Dewanjee, S., Bhattacharya, S. 2011. Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111: 706–710.
- Gao, F.K., Yong, Y.H., Dai, C.C. 2011. Effects of endophytic fungal elicitor on two kinds of terpenoids production and physiological indexes in *Euphorbia pekinensis* suspension cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18): 4418-4425.
- Ge, X., Wu, J. 2005. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag<sup>+</sup> and yeast elicitor. *Plant Science*, 168: 487–491.
- Gehlot, A., Arya, I.D., Arya, S. 2017. Regeneration of Complete Plantlets from Callus Culture of *Azadirachta indica* A. Juss using Immature Flower Buds. *Advances in Forestry Science*, 4(1): 71-76.
- Georgieva, L., Ivanov, I., Marchev, A., Aneva, I., Denev, P., Georgiev, V., Pavlov, A. 2015. Protopine production by *Fumaria* cell suspension cultures: effect of light. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(1): 287-300.
- Ghasemi Pirbalouti, A. 2017. Chemical Composition of the Essential Oils from the Leaves and Flowers of Two *Achillea* species from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(1): 205-214.
- Giordano, L., Gonthier, P., Varese, G.C., Miserere, L., Nicolotti, G. 2009. Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. *Fungal Diversity*, 38(69): e83.



- Giri, C.C., Zaheer, M. 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126:1–18.
- Godoy-Hernández, G.C., Vázquez-Flota, F.A., Loyola-Vargas, V.M. 2000. The exposure to trans-cinnamic acid of osmotically stressed *Catharanthus roseus* cells cultured in a 14-L bioreactor increases alkaloid accumulation. *Biotechnology Letters*, 22(11): 921-925.
- Goossens, A., Häkkinen, S. T., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Inzé, D. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14): 8595-8600.
- Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Tezotto, T., Carvalho, R.F., Alves, L.R., Peters, L.P., Azevedo, R.A. 2015. Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. *Biometals*, 28(5): 803-816.
- Gupta, P., Sharma, S., Saxena, S. 2014. Effect of salts (NaCl and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6): 2894-2906.
- Hajati, R.J., Payamnoor, V., Bezdi, K.G., Chashmi, N.A. 2017. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on production of betulin and betulinic acid in cell suspension of birch (*Betula pendula* Roth.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32(6): 1032-1046.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, 53(366): 1-11.
- Halliday, K.J., Fankhauser, C. 2003. Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phytologist*, 157(3): 449-463.
- Harathi, K., Naidu, C.V. 2016. Influence of Ethylene Inhibitor Silver Nitrate on Direct Shoot Regeneration from in Vitro Raised Shoot Tip Explants of *Sphaeranthus indicus* Linn-An Important Anti-jaundice Medicinal Plant. *American Journal of Plant Sciences*, 7(03): 525.
- Hariprasath, L., Jegadeesh, R., Arjun, P., Raaman, N. 2015. In vitro propagation of *Senecio candicans* DC and comparative antioxidant properties of aqueous extracts of the in vivo plant and in vitro-derived callus. *South African Journal of Botany*, 98: 134-141.
- Hashemi, S.M, Naghavi M.R. 2016. Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 125: 31–41.
- Hegazi, G.A.E.M. Establishment of suspension cultures of *Salvadora persica* L. for benzyl isothiocyanate production. 2017. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12: 72-78.
- Hegde, V., Partap, P.S., Yadav, R.C., Baswana, K.S. 2017. In vitro Androgenesis in Capsicum (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5): 925-933.

- Heijde, M., Ulm, R. 2012. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in plant science*, 17(4): 230-237.
- Hemm, M.R., Rider, S.D., Ogas, J., Murry, D.J., Chapple, C. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 38(5): 765-778.
- Hidalgo, D., Steinmetz, V., Brossat, M., Tournier-Couturier, L., Cusido, R.M., Corchete, P., Palazon, J. 2017. An optimized biotechnological system for the production of centellosides based on elicitation and bioconversion of *Centella asiatica* cell cultures. *Engineering in Life Sciences*, 17(4): 413-419.
- Hiraga, S.I.H., Yamakawa, H., Ohtsubo, N., Seo, S., Mitsuhashi, I., Matsui, H., Honma, M., Ohashi, Y. 2000. An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate and ethephon. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13: 210-216.
- Hoecker, U. 2005. Regulated proteolysis in light signaling. *Current opinion in plant biology*, 8(5): 469-476.
- Hong, M.L.K., Bhatt, A.R.V.I.N.D., Ping, N.S., Keng, C.L. 2012. Detection of elicitation effect on *Hyoscyamus niger* L. root cultures for the root growth and production of tropane alkaloids. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(3): 7341.
- Hosseini, Z., Ghasempour, H.R., Kahrizi, D., Akbari, L. 2017. In vitro Callus Induction and Shoot Regeneration in Hollyhocks (*Althaea digitata*). *Biological, Environmental and Agricultural Sciences*, 2(1): 34-40.
- Hu, X., Neill, S., Cai, W., Tang, Z. 2003. Hydrogen peroxide and jasmonic acid mediate oligogalacturonic acid-induced saponin accumulation in suspension-cultured cells of *Panax ginseng*. *Physiologia Plantarum*, 118: 414-421.
- Inácio, M.C., Paz, T.A., Pereira, A.M.S., Furlan, M. 2017. Endophytic *Bacillus megaterium* and exogenous stimuli affect the quinonemethide triterpenes production in adventitious roots of *Peritassa campestris* (Celastraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-12.
- Iqbal, N., Umar, S., Per, T. S., Khan, N. A. 2017. Ethephon increases photosynthetic-nitrogen use efficiency, proline and antioxidant metabolism to alleviate decrease in photosynthesis under salinity stress in mustard. *Plant signaling & behavior*, (just-accepted).
- Isah, T. 2017. Production of camptothecin in the elicited callus cultures of *Nothapodytes nimmoniana* (J. Graham) Mabblerly. *Chemical Papers*, 71(6): 1091-1106.
- Izabela, G., Halina, W. 2009. The effect of methyl jasmonate on production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. *Herba Polonica*, 55: 238-243.
- Jalalpour, Z., Shabani, L., Afghani, L., Sharifi-Tehrani, M., Amini, S.A. 2014. Stimulatory effect of methyl jasmonate and squalenstatin on phenolic metabolism through induction of LOX activity in cell suspension culture of yew. *Turkish Journal of Biology*, 38(1): 76-82.

- Jang, I.C., Henriques, R., Seo, H.S., Nagatani, A., Chua, N.H. 2010 Arabidopsis phytochrome interacting factor Proteins Promote Phytochrome B Polyubiquitination by COP1 E3 Ligase in the Nucleus. *Plant Cell*, 22: 2370–2383.
- Jenkins, G.I., Long, J.C., Wade, H.K., Shenton, M.R., Bibikova, T.N. 2001. UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. *New Phytologist*, 151(1): 121-131.
- Jin, L., Yang, Y., Gao, W., Gong, M., Wang, J., Anderson, N.O., He, M. 2017a. Establishment of Callus Induction and Cell Suspension Cultures of *Dendrathera indicum* var. Aromaticum a Scented Chrysanthemum. *Journal of Plant Studies*, 6(2): 38.
- Jin, Q., Wang, Y., Li, X., Wu, S., Wang, Y., Luo, J., Xu, Y. 2017b. Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid in regulating submergence induced petiole elongation in *Nelumbo nucifera*. *Aquatic Botany*, 137: 9-15.
- Johnson, P.R., Ecker, J.R. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annual Review of Genetics*, 32: 227-254.
- Jost, R., Altschmied, L., Bloem, E., Bogs, J., Gershenzon, J., Hähnel, U., Mendel, R.R. 2005. Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, 86(3): 491-508.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., Fankhauser, C. 2010. Chapter two-light-regulated plant growth and development. *Current topics in developmental biology*, 91: 29-66.
- Kang, S.M., Min, J.Y., Kim, Y.D., Karigar, C.S., Kim, S.W., Goo, G.H., Choi, M.S. 2009. Effect of biotic elicitors on the accumulation of bilobalide and ginkgolides in *Ginkgo biloba* cell cultures. *Journal of Biotechnology*, 139(1): 84-88.
- 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*, 3: 1222-39.
- Kawka, B., Kwiecień, I., Ekiert, H. 2017. Influence of Culture Medium Composition and Light Conditions on the Accumulation of Bioactive Compounds in Shoot Cultures of *Scutellaria lateriflora* L.(American Skullcap) Grown In Vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-12.
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44: 283–307.
- Khan, M.A., Abbasi, B.H., Ahmed, N., Ali, H. 2013. Effects of light regimes on in vitro seed germination and silymarin content in *Silybum marianum*. *Industrial Crops and Products*, 46: 105-110.
- Khan, S.A., Verma, P., Banerjee, S., Chatterjee, A., Tandon, S., Kalra, A., ur Rahman, L. 2017. Pyrethrin accumulation in elicited hairy root cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Plant Growth Regulation*, 81(3): 365-376.

- Khan, T., Abbasi, B.H., Khan, M.A., Shinwari, Z.K. 2016. Differential effects of thidiazuron on production of anticancer phenolic compounds in callus cultures of *Fagonia indica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(1): 46-58.
- Khanpour-Ardestani, N., Sharifi, M., Behmanesh, M. 2015. Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: an in vitro approach for acteoside production. *Cytotechnology*, 67(3): 475-485.
- Khiyari, M.E.A., Kasrati, A., Jamali, C.A., Zeroual, S., Markouk, M., Bekkouche, K., Abbad, A. 2014. Chemical composition, antioxidant and insecticidal properties of essential oils from wild and cultivated *Salvia aucheri* subsp. *blancoana* (Webb. & Helder), an endemic, threatened medicinal plant in Morocco. *Industrial Crops and Products*, 57: 106-109.
- Khojasteh, A., Mirjalili, M.H., Palazon, J., Eibl, R., Cusido, R.M. 2016. Methyl jasmonate enhanced production of rosmarinic acid in cell cultures of *Satureja khuzistanica* in a bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 16(8): 740-749.
- Kim, J.H., Chen, F., Wang, X., Rajapakse, N.C. 2006. Effect of Methyl Jasmonate on Secondary Metabolites of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2327–2332.
- Kim, Y.S., Hahn, E.J., Murthy, H.N., Paek, K.Y. 2004. Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotechnol. Lett.*, 26: 1619–1622.
- Kochan, E., Szymczyk, P., Kuźma, Ł., Lipert, A., Szymańska, G. 2017. Yeast Extract Stimulates Ginsenoside Production in Hairy Root Cultures of American Ginseng Cultivated in Shake Flasks and Nutrient Sprinkle Bioreactors. *Molecules*, 22(6): 880.
- Komaraiaha, P., Kishorb, P.B.K., Carlssona, M., Magnussonc, E.K., Mandenius, F.C. 2005. Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Science*, 168(5): 1337–1344.
- Komaraiaha, P., Ramakrishna, S.V., Reddanna, P., Kavi Kishor, P.B. 2003. Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption. *Journal of Biotechnology*, 101: 181–187.
- Krac̃un–Kolarevic, M., Dmitrovic, S., Filipovic, B., Peric, M., Mistic, D., Simonovic, A., Todorovic, S. 2015. Influence of sodium salicylate on rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid accumulation by *Salvia officinalis* L. shoots grown in vitro. *Biotechnology Letters*, 37(8): 1693–1701.
- Krishnan, S.S., Siril, E.A. 2017. Enhanced in vitro shoot regeneration in *Oldenlandia umbellata* L. by using quercetin: A naturally occurring auxin-transport Inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(3): 899-904.
- Krstić-Milošević, D., Janković, T., Uzelac, B., Vinterhalter, D., Vinterhalter, B. 2017. Effect of elicitors on xanthone accumulation and biomass production in hairy root cultures of *Gentiana dinarica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 130(3): 631-640.

- Kubeš, J., Tůmová, L., Martin, J., Vildová, A., Hendrychová, H., Sojková, K. 2014. The production of isoflavonoids in *Genista tinctoria* L. cell suspension culture after abiotic stressors treatment. *Natural product research*, 28(24): 2253-2263.
- Kumar, A., Kaushal, S., Sharma, S., Sood, H. 2014. In Vitro Callus Induction and Plantlet Regeneration of *Swertia chirayita*: A Critically Endangered Medicinal Plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 27: 94-96.
- Kumar, P., Chaturvedi, R., Sundar, D., Bisaria, V.S. 2016. Piriformospora indica enhances the production of pentacyclic triterpenoids in *Lantana camara* L. suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125(1): 23-29.
- Kumar, P., Srivastava, V., Chaturvedi, R., Sundar, D., Bisaria, V.S. 2017a. Elicitor enhanced production of protoberberine alkaloids from in vitro cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers ex Hook. F. & Thoms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-10.
- Kumar, V., Teotia, P., Prasad, R., Varma, A., Sarin, N., Kumar, M. 2017b. Regeneration from Nodal Explants of Field-Grown Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Fruit Trees. In *The Lychee Biotechnology*, 313-331.
- Kumari, P., Kumar, A., Priyadarshni, M., Kumari, R., Kumari, P., Shukla, L.N. 2017. Impact of different growth regulators supplemented in MS medium on induction of callus from leaf explants of natural sweetener, *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *International Journal of Research in Biosciences*, 6(1): 14-18.
- Kumari, S., Pandey, R.K., Kumar, U. 2015. In vitro callus induction from two different explants stem and leaf in *Carthamus tinctorius* Linn. *European Journal of Experimental Biology*, 5(2): 1-4.
- Kuzovkina, I.N., Guseva, A.V., Alterman, I.E., Karnachuk, R.A. 2001. Flavonoid Production in Transformed *Scutellaria baicalensis* Roots and Ways of Its Regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4): 448-452.
- Kümmritz, S., Louis, M., Haas, C., Oehmichen, F., Gantz, S., Delenk, H., Steingroewer, J. 2016. "Fungal elicitors combined with a sucrose feed significantly enhance triterpene production of a *Salvia fruticosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(16): 7071-7082.
- Laloue, M., Courtois, D., Manigault, P. 1980. Convenient and rapid fluorescent staining of plant cell nuclei with "33258" Hoechst. *Plant Science Letter*, 17: 175-179.
- Lavid N, Schwartz A, Lewinsohn E, Tel-Or E. 2001. Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae) and *Nymphaeae* (Nymphaeaceae). *Planta* 214: 189-195.
- Lee, S. H., Park, Y.J., Park, S.U., Lee, S.W., Kim, S.C., Jung, C.S., Kim, Y.B. 2017. Expression of Genes Related to Phenylpropanoid Biosynthesis in Different Organs of *Ixeris dentata* var. *albiflora*. *Molecules*, 22(6): 901.
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J. 2001. Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(354): 1-9.

- Li, B., Wang, B., Li, H., Peng, L., Ru, M., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y. 2015a. Establishment of *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib. hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag<sup>+</sup>, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation. *Protoplasma*, 253(1): 87-100.
- Li, B., Wang, B., Li, H., Peng, L., Ru, M., Liang, Z., Zhu, Y. 2016. Establishment of *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib. hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag<sup>+</sup>, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation. *Protoplasma*, 253(1): 87-100.
- Li, X., Hao, C., Zhong, J., Liu, F., Cai, J., Wang, X., Jiang, D. 2015b. Mechano-stimulated modifications in the chloroplast antioxidant system and proteome changes are associated with cold response in wheat. *Plant Biology*, 15(1): 219.
- Li, Z., Wang, X., Chen, F., Kim, H.J. 2007. Chemical changes and overexpressed genes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) upon methyl jasmonate treatment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3): 706-713.
- Lian, H.L., He, S.B., Zhang, Y.C., Zhu, D.M., Zhang, J.Y., Jia, K.P., Sun, S.X., Li, L., Yang, H.Q. 2011 Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes Development*, 25: 1023–1028.
- Lillo, C., Lea, U.S., Ruoff, P. 2008. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, cell & environment*, 31(5): 587-601.
- Lin, T.C., Chu, F.H., Tseng, Y.H., Tsai, J.B., Chang, S.T., Wang, S.Y. 2007. Bioactivity Investigation of Lauraceae Trees Grown in Taiwan. *Pharmaceutical Biology*, 8: 638-644.
- Linden, C.J., Phisalaphong, M. 2000. Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. *Plant Science*, 158: 41–51.
- Ling, O.S., Kiong, A.L.P., Hussein, S. 2008. Establishment and optimisation of growth parameters for cell suspension cultures of *Ficus deltoidea*. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2(1): 38-49.
- Liu, B., Zuo, Z., Liu, H., Liu, X., Lin, C. 2011 Arabidopsis cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Development*, 25: 1029–1034.
- Liu, C.Z., Abbasi, B.H., Gao, M., Murch, S.J., Saxena, P.K. 2006. Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(22): 8456-8460.
- Liu, C.Z., Guo, C., Wang, Y.C., Ouyang, F. 2002. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochemistry*, 38(4): 581-585.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R. 2003. Ethylene Response Factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell Online*, 15(1): 165-178.
- 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.
- Malayaman, V., Sisubalan, N., Senthilkumar, R.P., Ranjithkumar, R. 2017. Chitosan mediated enhancement of hydrolysable tannin in *Phyllanthus debilis* Klein ex Willd via plant cell suspension culture. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- McDaniel, B.K., Binder, B.M. 2012. Ethylene receptor 1 (ETR1) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by silver in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31): 26094-26103.
- Meier, P., Hotti, H., Rischer, H. 2015. Elicitation of furanocoumarins in poison hemlock (*Conium maculatum* L.) cell culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(3): 443-453.
- Memelink, J., Verpoorte, R., Kijne, J.W. 2001. Organization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in plant science*, 6(5): 212-219.
- Moroff, G., Eich, J., Dabay, M. 1994. Validation of use of the nageotte: hemocytometer to count low levels of white cells in white cell reduced platelet components. *Transfusion*, 34: 35-38.
- Munish, S., Ashok, A., Rajinder, G., Sharada, M. 2015. Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. *Natural Product Researches*, 29(8): 745-749.
- Murthy, H. N., Dandin, V.S., Zhong, J.J., Paek, K.Y. 2014. Strategies for enhanced production of plant secondary metabolites from cell and organ cultures. In *Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology*. Springer Netherlands, 471-508.
- Mutlu, S., Atici, Ö., Nalbantoglu, B. 2009. Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53(2): 334-338.
- Nadjafi, F., Bannayan, M., Tabrizi, L., Rastgoo, M. 2006. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *Journal of Arid Environments*, 64(3): 542-547.
- Nagatani, A. 2010. Phytochrome: structural basis for its functions. *Current opinion in plant biology*, 13(5): 565-570.
- Naik, P.M., Manohar, S.H., Praveen, N., Murthy, H.N. 2010. Effects of sucrose and pH levels on in vitro shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100: 235-239.
- Naikawadi, V.B., Ahire, M.L., Lahiri, A., Nikam, T.D. 2016. In vitro propagation and cell cultures of memory tonic herb *Evolvulus alsinoides*: a best source for elicited production of scopoletin. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(8): 3463-3476.
- Nasiri-Bezenjani, M.A., Riahi-Madvar, A., Baghizadeh, A., Ahmadi, A.R. 2014. Rosmarinic Acid Production and Expression of Tyrosine Aminotransferase Gene

- in *Melissa officinalis* Seedlings in Response to Yeast Extract. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16(4): 921-930.
- Nieto-Trujillo, A., Buendía-González, L., García-Morales, C., Román-Guerrero, A., Cruz-Sosa, F., Estrada-Zúñiga, M.E. 2017. Phenolic compounds and parthenolide production from in vitro cultures of *tanacetum parthenium*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(2): 371-383.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of experimental botany*, 53(372): 1283-1304.
- Oksman-Caldentey, K.M., Inzé, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in plant science*, 9(9): 433-440.
- Omer, Y., Bengi, E. 2013. Effects of sucrose and polyethylene glycol on hypericins content in *Hypericum adenotrichum*. *Eurasian Journal of Biosciences*, 7: 101–110.
- Ooi, C.T., Syahida, A., Stanslas, J., Maziah, M. 2016. The influence of methyl jasmonate, cholesterol and l-arginine on solasodine production in hairy root culture of *Solanum mammosum*. *Engineering in Life Sciences*, 16(5): 432-442.
- Orlita, A., Sikaa–Gorycka, M., Paszkiewicz, M., Malinski, E., Kumirska, J., Siedlecka, E.M., Łojkowska, E., Stepnowski, P. 2008. Application of chitin and chitosan as elicitors of coumarins and fluoroquinolone alkaloids in *Ruta graveolens* L. (common rue). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51: 91–96.
- Orozco-Cárdenas, M.L., Narváez-Vásquez, J., Ryan, C.A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 13(1): 179-191.
- Owis, A.I., Abdelwahab, N.S., Abul-Soad, A.A. 2016. Elicitation of phenolics from the micropropagated endangered medicinal plant *Calligonum polygonoides* L. (Polygonoaceae). *Pharmacognosy magazine*, 12(4): 465-470.
- Özhatay, N., Kültür, Ş., Gürdal, B. 2017. Check-list of additional taxa to the supplement flora of Turkey VIII. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 47(1): 30-44.
- Papani, S., Naidu, C.V. 2017. Does the Silver Nitrate Influence the Various Energy Sources in Micropropagation of *Solanum viarum* Dunal–An Important Anti Cancer Medicinal Plant?. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(8): 1084-1095.
- Parimalan, R., Giridhar, P., Ravishankar, G.A. 2011. Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(3): 285-290.
- Park, E.H., Bae, H., Park, W.T., Kim, Y.B., Chae, S.C., Park, S.U. 2012. Improved shoot organogenesis of gloxinia (*'Sinningia speciosa'*) using silver nitrate and putrescine treatment. *Plant Omics*, 5(1): 6.



- Park, W.T., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., Yeo, S.K., Jeon, J., Park, J.S., Park, S.U. 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(4): 426.
- Patil, J.G., Ahire, M.L., Nitnaware, K.M., Panda, S., Bhatt, V.P., Kishor Kavi, P.B., Nikam, T.D. 2013. In vitro propagation and production of cardiogenic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6): 2379-2393.
- Pauwels, L., Inzé, D., Goossens, A. 2009. Jasmonate-inducible gene: what does it mean?. *Trends in plant science*, 14(2): 87-91.
- Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan, W., Goossens, A. 2008. Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(4): 1380-1385.
- Pavlović, M., Petrović, S., Milenković, M., Kukić, J., Couladis, M., Tzakou, O., Niketić, M. 2008. Composition and antiradical capacity of *Achillea grandifolia* essential oil from Serbia. *Planta Medica*, 74(9): 1191-1191.
- Perassolo, M., Smith, M.E., Giulietti, A.M., Talou, J.R. 2016. Synergistic effect of methyl jasmonate and cyclodextrins on anthraquinone accumulation in cell suspension cultures of *Morinda citrifolia* and *Rubia tinctorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124(2): 319-330.
- Pitta-Alvarez, S.I., Spollansky, T.C., Giulietti, A.M. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2): 252-258.
- Popova, L.P., Maslenkova, L.T., Yordanova, R.Y., Ivanova, A.P., Krantev, A.P., Szalai, G., Janda, T. 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(3): 224-231.
- Powlin S.S, Keng P.C, Miller R.K. 1997. Toxicity of cadmium in human trophoblast cells (JAR choriocarcinoma): role of calmodulin and the calmodulin inhibitor, zaldaride maleate. *Toxicology Applied Pharmacology*, 144: 225–234
- Prakash, G., Srivastava, A.K. 2008. Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 40: 218–226.
- Pratibha, G., Satyawati, S., Sanjay, S. 2015. Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(3): 863-874.
- Praveen, N., Murthy, H.N. 2011. Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension

- cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 104: 119–124.
- Praveen, N., Murthy, H.N. 2013. Withanolide A production form *Withania somnifera* hairy root cultures with improved growth by altering the concentrations of macro elements and nitrogen source in the medium. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3): 811–816.
- Prior, R.L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M.J., Reed, J. (2010). Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1473-1478.
- Ptak, A., Morańska, E., Saliba, S., Zieliński, A., Simlat, M., Laurain-Mattar, D. 2017. Elicitation of galanthamine and lycorine biosynthesis by *Leucojum aestivum* L. and *L. aestivum* ‘Gravety Giant’ plants cultured in bioreactor RITA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(2): 335-345.
- Ptak, A., Tahchy, A.E., Wyzgolik, G., Henry, M., Laurain-Mattar, D. 2010. Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(1): 61-67.
- Purak, I., Singh, A., Guru, S.D. 2017. Studies on Callus Induction and Regeneration Potential of *Cleome spinosa* Jacq. and *Cleome gynandra* Linn. of Cleomaceae. *An International Journal of Plant Research*, 30(special): 293-301.
- Qin, B., Ma, L., Wang, Y., Chen, M., Lan, X., Wu, N., Liao, Z. 2014. Effects of acetylsalicylic acid and UV-B on gene expression and tropane alkaloid biosynthesis in hairy root cultures of *Anisodus luridus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(3): 483-490.
- Raisi, A., Kalat, S.N., Darban, A.S. 2013. The Study Effects of Stratification, Temperature and Potassium Nitrate on Seed Dormancy Breaking. *World Applied Sciences Journal*, 21(3): 379-383.
- Ramachandra, R.S., Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101-153.
- Razavizadeh, R., Adabavazeh, F. 2017a. Effects of sorbitol on essential oil of *Carum copticum* L. under in vitro culture. *Romanian Biotechnological Letters*, 22(1): 12281-12289.
- Razavizadeh, R., Adabavazeh, F., Chermahini, M.R. 2017b. Adaptive Responses of *Carum copticum* to in vitro Salt Stress. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 11(1): 37-42.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J., Henson, J. M. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298(5598): 1581-1581.
- Reyes, L.F., Cisneros-Zevallos, L. 2003. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18): 5296-5300.

- Roat, C., Ramawat, K.G. 2009. Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. *Plant Biotechnology Reports*, 3(2): 135-138.
- Romero, F.R., Delate, K., Kraus, G.A., Solco, A.K., Murphy, P.A., Hannapel, D.J. 2009. Alkamide production from hairy root cultures of Echinacea. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(5): 599.
- Rouhi, H.R., Shakarami, K., Afshari, R. 2010. Seed Treatments to Overcome Dormancy of Waterlily Tulip ('*Tulipa kaufmanniana*'Regel.). *Australian Journal of Crop Science*, 4(9): 718.
- Roy, D., Mukhopadhyay, S. 2012. Enhanced rosmarinic acid production in cultured plants of two species of *Mentha*.
- Ru, M., An, Y., Wang, K., Peng, L., Li, B., Bai, Z., Liang, Z. 2016. *Prunella vulgaris* L. hairy roots: Culture, growth, and elicitation by ethephon and salicylic acid. *Engineering in Life Sciences*, 16(5): 494-502.
- Saeed, S., Ali, H., Khan, T., Kayani, W., Khan, M.A. 2017. Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth., a high valued endangered medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(1): 229-237.
- Sahraroo, A., Mirjalili, M.H., Corchete, P., Babalar, M., Moghadam, M.R.F. 2016. Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new in vitro source of rosmarinic acid. *Cytotechnology*, 68(4): 1415-1424.
- Sahu, P.R., Khalkho, A.S. 2012. Callus induction and in vitro multiplication of *Boerhaavia diffusa* milestone medicinal plant of Jharkhand. *Biogeosciences*, 7: 123-127.
- Saiprasad, G.V.S., Raghuvver, P. 2016. Influence of Ethylene Inhibitors and Ethrel on Production of Protocorm Like Bodies in Orchid-*Dendrobium'sonia*'. *Journal of Horticultural Science*, 2(1): 13-18.
- Sampietro, D.A., Lizarraga, E.F., Ibatayev, Z.A., Omarova, A.B., Suleimen, Y.M., Catalán, C.A. 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Acantholippia deserticola*, *Artemisia proceriformis*, *Achillea micrantha* and *Libanotis buchtormensis* against phytopathogenic bacteria and fungi. *Natural product research*, 30(17): 1950-1955.
- Sara–Alsadat, R., Ahmad, M., Mokhtar, J.J. 2015. Paclitaxel production is enhanced in suspension cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells by using a combination of sugar, precursor, and elicitor. *Engineering in Life Sciences*, 15: 234–242.
- Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I. 2016. Effect of the ethylene inhibitors silver nitrate, silver sulfate, and cobalt chloride on micropropagation and biochemical parameters in the cherryrootstocks CAB-6P and Gisela 6. *Turkish Journal of Biology*, 40(3): 670-683.
- Sarropoulou, V., Maloupa, E. 2017. Effect of the NO donor “sodium nitroprusside”(SNP), the ethylene inhibitor “cobalt chloride”(CoCl<sub>2</sub>) and the

- antioxidant vitamin E “ $\alpha$ -tocopherol” on in vitro shoot proliferation of *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3): 619-629.
- Satdive, R.K., Fulzele, D.P., Eapen, S. 2007. Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. *Journal of Biotechnology*, 128: 281–289.
- Schaller, G.E., Binder, B.M. 2017. Inhibitors of Ethylene Biosynthesis and Signaling. *Ethylene Signaling. Methods and Protocols*, 223-235.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Heyser R.L, Godbold D.L, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology*, 127: 887–898.
- Seo, H.S., Watanabe, E., Tokutomi, S., Nagatani, A., Chua, N.H. 2004. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes & development*, 18(6): 617-622.
- Sgamma, T., Thomas, B., Muleo, R. 2015. Ethylene inhibitor silver nitrate enhances regeneration and genetic transformation of *Prunus avium* (L.) cv Stella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(1): 79-88.
- Sgarbi, E., Fornasiero, R.B., Lins, A.P., Bonatti, P.M. 2003. Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant science*, 165(5): 951-957.
- Shah, K., Nahakpam, S. 2012. Heat exposure alters the expression of SOD, POD, APX and CAT isozymes and mitigates low cadmium toxicity in seedlings of sensitive and tolerant rice cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 106-113.
- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C., Lin, C. 2002. Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature*, 417(6890): 763-767.
- Sharma, M., Ahuja, A., Gupta, R., Mallubhotla, S. 2015a. Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. *Natural product research*, 29(8): 745-749.
- Sharma, P., Yadav, S., Srivastava, A., Shrivastava, N. 2013. Methyl jasmonate mediates upregulation of bacoside A production in shoot cultures of *Bacopa monnieri*. *Biotechnology Letters*, 35: 1121–1125.
- Sharma, S.N., Jha, Z., Sinhab, R.K., Gedac, A.K. 2015b. Jasmonate–induced biosynthesis of andrographolide in *Andrographis paniculata*. *Acta Physiologia Plantarum*, 153: 221–229.
- Sherkheli, M.A., Benecke, H., Doerner, J.F. 2009. Monoterpenoids induce agonist-specific desensitization of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) ion channels, *Journal Pharmacology Science*, 12: 116-128.
- Shi, M., Kwok, K.W., Wu, J.Y. 2007. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. *Biotechnology and applied biochemistry*, 46(4): 191-196.

- Shi, M.Z., Xie, D.Y. 2010 Features of anthocyanin biosynthesis in pap1-D and wild-type *Arabidopsis thaliana* plants grown in different light intensity and culture media conditions. *Planta*, 231:1385–1400.
- Shi, Q., Zhu, Z. 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1): 317-326.
- Shibli, R.A., Smith, M.A.L., Kushad, M. 1997. Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture. *Plant Growth Regulation*, 23(3): 201-205.
- Shim, I.S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D.W., Usui, K. 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 39(3): 285-292.
- Shohael, A.M., Ali, M.B., Yu, K.W., Hahn, E.J., Islam, R., Paek, K.Y. 2006. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. *Process Biochemistry*, 41(5): 1179-1185.
- Shohael, A.M., Murthy, H.N., Lee, H.L., Hahn, E.J., Paek, K.Y. 2007. Methyl jasmonate induced overproduction of eleutherosides in somatic embryos of *Eleutherococcus senticosus* cultures in bioreactors. *Electron Journal of Biotechnology*, 10: 633–637.
- Shohael, A.M., Murthy, H.N., Lee, H.L., Hahn, E.J., Paek, K.Y. 2008. Increased eleutheroside production in *Eleutherococcus sessiliflorus* embryogenic suspension cultures with methyl jasmonate treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38: 270–273.
- Simić, G.S., Tusevski, O., Antevski, S., Pancevska, A.N., Petreska, J., Stefova, M., Kungulovski, D., Spasenoski, M. 2012. Secondary Metabolite Production In *Hypericum perforatum* L. Cell Suspensions Upon Elicitation With Fungal Mycelia from *Aspergillus flavus*. *Archives of Biological Sciences*, 64(1): 113-121.
- Silja, P.K., Gisha, G.P., Satheeshkumar, K. 2014. Enhanced plumbagin accumulation in embryogenic cell suspension cultures of *Plumbago rosea* L. following elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119(3): 469-477.
- Silva, S.T., Bertolucci, S.K.V., da Cunha, S.H.B., Lazzarini, L.E.S., Tavares, M.C., Pinto, J.E.B.P. 2017. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the in vitro cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(3): 501-510.
- Singh, B., Sahu, P.M., Sharma, R.A. 2017. Effect of elicitors on the production of pyrroloquinazoline alkaloids by stimulating anthranilate synthase activity in *Adhatoda vasica* Nees cell cultures. *Planta*, 1-13.
- Sircar, D., Mitra, A. 2008. Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. *Journal of plant physiology*, 165(4): 407-414.

- Sivanandhan, G., Dev, G.K., Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arjunan, A., Muthuselvam, M., Manickavasagam, M., Selvaraj, N., Ganapathi, A. 2013. Increased production of withanolide A, withanone, and withaferin A in hairy root cultures of *Withania somnifera* L. Dunal elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 114: 121-129.
- Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A., Manickavasagam, M. 2014. Enhanced biosynthesis of withanolides by elicitation and precursor feeding in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in shake-flask culture and bioreactor. *PloS one*, 9(8): e104005.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Słota, J., Pietraszek, J. 2014. The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. *Acta Biochimica Polonica*, 61(1): 47-53.
- Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses, Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49-55.
- Smelcerovic, A., Lamshoeft, M., Radulovic, N., Ilic, D., Palic, R. 2010. LC–MS Analysis of the Essential Oils of *Achillea millefolium* and *Achillea crithmifolia*. *Chromatographia*, 71(1-2): 113-116.
- Solecka, D., Kacperska, A. 2003. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiologia Plantarum*, 119(2): 253-262.
- Song, X., Wu, H., Yin, Z., Lian, M., Yin, C. 2017. Endophytic Bacteria Isolated from *Panax ginseng* Improves Ginsenoside Accumulation in Adventitious Ginseng Root Culture. *Molecules*, 22(6): 837.
- Sonja, G.S., Oliver, T., Stéphane, M., Alain, D., Eric, L., Claude, J., Daniel, H. 2015. Polysaccharide elicitors enhance phenylpropanoid and naphthodianthrone production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122(3): 649-663.
- Sreelakshmi, Y., Sharma, R. 2008. Differential regulation of phenylalanine ammonia lyase activity and protein level by light in tomato seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4): 444-451.
- Srivastava, P., Sisodia, V., Chaturvedi, R. 2011. Effect of culture conditions on synthesis of triterpenoids in suspension cultures of *Lantana camara* L. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(1): 75-80.
- Stohs S.J, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 19: 201–213.
- Sukito, A., Tachibana, S. 2016. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid synergism on enhancement of bilobalide and ginkgolide production by immobilized cell cultures of *Ginkgo biloba*. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1): 24.

- Sun, L., Su, H., Zhu, Y., Xu, M. 2012. Involvement of abscisic acid in ozone induced puerarin production of *Pueraria thomsonii* Benth. suspension cell cultures. *Plant Cell Reports*, 31: 179–185.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., Prasad, M.N.V. 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4): 985-999.
- Tabanca, N., Demirci, B., Aytaç, Z., Başer, K.H.C. 2016. Chemical composition of *Achillea schischkinii* Sosn., an endemic species from Turkey. *National Volatiles Essentail Oils*. 3: 24-28.
- Tahsili, J., Sharifi, M., Safaie, N., Esmaeilzadeh-Bahabadi, S., Behmanesh, M. 2014. Induction of lignans and phenolic compounds in cell culture of *Linum album* by culture filtrate of *Fusarium graminearum*. *Journal of plant interactions*, 9(1): 412-417.
- Tamimi, S.M. 2015. Effects of ethylene inhibitors, silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>), cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) and aminooxyacetic acid (AOA), on in vitro shoot induction and rooting of banana (*Musa acuminata* L.). *African Journal of Biotechnology*, 14(32): 2511-2516.
- Tariq, U., Ali, M., Abbasi, B.H. 2014. Morphogenic and biochemical variations under different spectral lights in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 130: 264-271.
- Taurino, M., Ingrosso, I., D'amico, L., Domenico1, S.D., Nicoletti, I., Corradini, D., Santino, A., Giovanazzo, G. 2015. Jasmonates elicit different sets of stilbenes in *Vitis vinifera* cv. Negramaro cell cultures. *SpringerPlus*, 4(1): 49.
- Thakur, K., Kanwar, K. 2017. In Vitro Plant Regeneration by Organogenesis from Leaf Callus of Carnation, *Dianthus caryophyllus* L. cv. 'Master'. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1-9.
- Thanh, N.T., Murthy, H.N., Yu, K.W., Hahn, E.J., Paek, K.Y. 2005. Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2): 197–201.
- Theis, N., Lerda, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal Plant Science*. 164: 93-102.
- Thiruvengadam, M., Rekha, K., Rajakumar, G., Lee, T.J., Kim, S.H., Chung, I.M. 2016. Enhanced Production of Anthraquinones and Phenolic Compounds and Biological Activities in the Cell Suspension Cultures of *Polygonum multiflorum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11): 1912.
- Thokchom, R., Maitra, S. 2017. Micropropagation of *Anthurium andreaeanum* cv. Jewel from leaf explants. *Journal of Crop and Weed*, 13(1): 23-27.
- Thulke, O., Conrath, U. 1998. Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *The Plant Journal*, 14(1): 35-42.
- Todorova, I., Simeonova, G., Kyuchukova, D., Dinev, D., Gadjeva, V. 2005. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comparative Clinical Pathology*, 13(4): 190-194.

- Toncer, O., Basbağ, S., Karaman, S., Diraz, E., Basbağ, M. 2010. Chemical composition of the essential oils of some *Achillea* species growing wild in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(4): 527-530.
- Tonelli, M., Pellegrini, E., D'Angiolillo, F., Petersen, M., Nali, C., Pistelli, L., Lorenzini, G. 2015. Ozone-elicited secondary metabolites in shoot cultures of *Melissa officinalis* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(2): 617-629.
- Trong, T.T., Truong, D.H., Nguyen, H.C., Tran, D.T., Thi, H.T.N., Do Dang, G., Huu, H.N. 2017. Biomass accumulation of *Panax vietnamensis* in cell suspension cultures varies with addition of plant growth regulators and organic additives. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.
- Tumova, L., Gallova, K., Tuma, J., Dolejsova, J. 2002. Arachidonic acid as elicitor of flavonoid accumulation in *Ononis arvensis* L. culture in vitro. *Acta Pharmaceutica*, 52: 299-304.
- Tuzlacı, E. 2011. Türkiye Bitkileri Sözlüğü. Alfa Yayınları, İstanbul, 1294s.
- Uludağ, A., Aksoy, N., Yazlık, A., Arslan, Z.F., Yazmış, E., Üremiş, I., Brundu, G. 2017. Alien flora of Turkey: checklist, taxonomic composition and ecological attributes. *NeoBiota* 35: 61-85.
- Urdová, J., Rexová, M., Mučaji, P., Balažová, A. 2015. Elicitation—a tool to improve secondary metabolites production in *Melissa Officinalis* L. Suspension cultures/Elicitácia ako nástroj na zlepšenie produkcie sekundárnych metabolitov v suspenzných kultúrach *Melissa Officinalis* L. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 62(9): 46-50.
- Valayil, J.M., Kuriakose, G.C., Jayabaskaran, C. 2015. Modulating the biosynthesis of a bioactive steroidal saponin, cholestanol glucoside by *Lasiodiplodia theobromae* using abiotic stress factors. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7: 114-117.
- Vanacker, H., Carver, T.L., Foyer, C.H. 2000. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant physiology*, 123(4): 1289-1300.
- Vildová, A., Hendrychová, H., Kubeš, J., Tůmová, L. 2016. Influence of AgNO<sub>3</sub> Treatment on the Flavonolignan Production in Cell Suspension Culture of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8(8): 959-962.
- Vinothkumar, D., Senthilkumar, M. 2015. In vitro callus induction and plants from leaf explants of *Wattakaka volubilis* L.(Staf. Arn)-An vulnerable medicinal plant. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 3(6): 12-16.
- Vuleta, A., Jovanović, S.M., Tucić, B. 2016. Adaptive flexibility of enzymatic antioxidants SOD, APX and CAT to high light stress: The clonal perennial monocot *Iris pumila* as a study case. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100: 166-173.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Franken, P. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-



- stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(38): 13386-13391.
- Wang, D.Y., Chuan, W.J., Jin, Y. 2007. Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. Mairei. Cell Biology International, 31(10): 1179–1183.
- Wang, H.Q., Jin, M.Y., Paek, K.Y., Piao, X.C., Lian, M.L. 2016. An efficient strategy for enhancement of bioactive compounds by protocorm-like body culture of *Dendrobium candidum*. Industrial Crops and Products, 84: 121-130.
- 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, J.W., Wu, J.Y. 2004. Involvement of nitric oxide in elicitor-induced defense responses and secondary metabolism of *Taxus chinensis* cells. Nitric Oxide, 11(4): 298-306.
- Wasternack, C., Hause, B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. Progress in nucleic acid research and molecular biology, 72: 165-221.
- Weidler, G., Zur Oven-Krockhaus, S., Heunemann, M., Orth, C., Schleifenbaum, F., Harter, K., Hoecker, U. and Batschauer, A. 2012 Degradation of Arabidopsis CRY2 is regulated by SPA proteins and phytochrome A. Plant Cell, 24: 2610–2623.
- Wiktorowska E, Długosz M, Janiszowska W. 2010. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. Enzyme and Microbial Technology, 46: 14–20.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant physiology, 126(2): 485-493.
- Wu, C.F., Karioti, A., Rohr, D., Bilia, A.R., Efferth, T. 2016. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells. Food chemistry, 201: 292-297.
- Wu, H.C., Murthy, N.H., Hahna, J.E., Paek, Y.K. 2007. Enhanced production of caftaric acid, chlorogenic acid and cichoric acid in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by the manipulation of incubation temperature and photoperiod. Biochemical Engineering Journal, 36: 301–303.
- Wu, J.Y., Shi, M. 2008. Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Applied Microbiology and Biotechnology, 78(3): 441-448.
- Wu, J.Y., Wong, K., Ho, K.P., Zhou, L.G. 2005. Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. Enzyme and Microbial Technology, 36(1): 133-138.

- Würschum, T., Tucker, M.R., Maurer, H.P., Leiser, W.L. 2015. Ethylene inhibitors improve efficiency of microspore embryogenesis in hexaploid triticale. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3): 751-757.
- Xiaolong, H., Min, S., Lijie, C., Chao, X., Yanjie, Z., Guoyin, K. 2015. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62(1): 24–31.
- Xing, B., Yang, D., Guo, W., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y., Liu, Y. 2014. Ag+ as a more effective elicitor for production of tanshinones than phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Molecules*, 20(1): 309-324.
- Xiong, L., Zhu, J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2): 131-139.
- Xu J, Yin H. X, Li X. 2009. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Reports*, 28: 325-333.
- Xu, A., Zhan, J.C., Huang, W.D. 2015. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122(1): 197–211.
- Xu, M., Yang, B., Dong, J., Lu, D., Jin, H., Sun, L., Zhu, Y., Xu, X. 2011. Enhancing hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension culture by ozone exposure. *Biotechnology Progress*, 27(4): 1101–1106.
- Yamamoto, H., Zhao, P., Yazaki, K., Inoue, K. 2002. Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 50(8): 1086-1090.
- Yamaner, Ö., Erdağ, B., Gökbulut, C. 2013. Stimulation of the production of hypericins in in vitro seedlings of *Hypericum adenotrichum* by some biotic elicitors. *Turkish Journal of Botany*, 37: 153-159.
- Yang, Y., Pu, X., Qu, X., Chen, F., Zhang, G., Luo, Y. 2017. Enhanced production of camptothecin and biological preparation of N1-acetylkynuramine in *Camptotheca acuminata* cell suspension cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(10): 4053-4062.
- Yau, Y.H., Richardson, T.B., Abys, J.A., Wengenroth, K.F., Fiore, A., Xu, C., Fudala, J. 2017. U.S. Patent No. 9,730,321. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Yi, C., Deng, X.W. 2005. COP1—from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends in cell biology*, 15(11): 618-625.
- Zadeh, S.Y., Ramin, A. A., Baninasab, B. 2015. Effect of gibberellic acid, stratification and salinity on seed germination of *Echinacea purpurea* cv. Magnus. *Herba Polonica*, 61(3): 13-22.
- Zafar, N., Mujib, A., Ali, M., Tonk, D., Gulzar, B. 2017. Aluminum chloride elicitation (amendment) improves callus biomass growth and reserpine yield in *Rauwolfia serpentina* leaf callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-12.

- Zahra, S., Mehrnaz, K., Gholamreza, A., Mustafa, G. 2015. Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. Turkish Journal of Biology, 39(1): 111–118.
- Zaker, A., Sykora, C., Gössnitzer, F., Abrishamchi, P., Asili, J., Mousavi, S.H., Wawrosch, C. 2015. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. Industrial Crops and Products, 67: 97-102.
- Zaragoza-Martínez, F., Lucho-Constantino, G.G., Ponce-Noyola, T., Esparza-García, F., Poggi-Varaldo, H., Cerda-García-Rojas, C.M., Ramos-Valdivia, A.C. 2016. Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 127(1): 47-56.
- Zare, A.R., Solouki, M., Omid, M., Irvani, N., Abasabadi, A.O., Nezhad, N.M. 2011. Effect of Various Treatments on Seed Germination and Dormancy Breaking in *Ferula assa foetida* L.(Asafetida), a Threatened Medicinal Herb. Trakia journal of sciences, 9(2): 57-61.
- Zhang, H.W., Song, Y.C., Tan, R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. Natural product reports, 23(5): 753-771.
- Zhang, Y., Teoh, K.H., Reed, D.W., Maes, L., Goossens, A., Olson, D. J., Covello, P. S. 2008. The molecular cloning of artemisinic aldehyde  $\Delta 11$  (13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*. Journal of Biological Chemistry, 283(31): 21501-21508.
- Zhang, Y.H., Zhong, J.J., Yu, J.T. 1995. Effect of osmotic pressure on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*. Biotechnology Letters, 17(12): 1347-1350.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology advances, 23(4): 283-333.
- Zhao, J., Zhu, W.H., Hu, Q. 2001. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. Plant Growth Regulation, 33(1): 43-49.
- Zhao, J.L., Zhou, L.G., Wu, J.Y. 2010a. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(1): 137-144.
- Zhao, S.Z., Sun, H.Z., Chen, M., Wang, B.S. 2010b. Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 102(1): 99-107.
- Zinhari, Z., Pourseyedi, S., Zolala, J. 2016. Callus induction and direct shoot regeneration in *Lepidium draba* L. explants. Journal of Agricultural Biotechnology, 8(2): 31-51.
- Zuccarini, P. 2009. Camphor: Risks and Benefits of a Widely Used Natural Product. Journal Applied Science Environmental Management, 2: 69-74.

Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X., Lin, C. 2011. Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in Arabidopsis. *Current Biology*, 21(10): 841-847.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Muhammed Akif AÇIKGÖZ  
**Doğum Yeri** : Kayseri  
**Doğum Tarihi** : 1982  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-mail** : makifacikgoz@gmail.com  
**İletişim Bilgileri** : Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü

### Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Ondokuz Mayıs Ü.	2001-2005
Y. Lisans	Toprak Bilimi ve Bitki Besleme	Ordu Ü.	2007-2010

### İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
Araş. Gör.	Ordu Ü., Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü	2009-2010
Araş. Gör.	Ordu Ü., Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü	2012-...

## Yayınlar:

**A1. Açıkgöz, M A;** Kara, Ş M; Aruç, C; Ay, E, 2017. Morphogenetic, Ontogenetic and Diurnal Variability in in Antimicrobial Activity of Bitter Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare*) Essential Oil. 2017. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 51(3), S190-S194

**A2. Açıkgöz, M A;** Kara, Ş M; Kayacı, M, 2017. Determining the Effect of Various Pre-treatments on Germination of *Achillea gypsicola* Seeds under in Vivo and in Vitro Conditions. Fresenius Environmental Bulletin (Basımda).

**A3. Ay, E; Gül, M; Açıkgöz, M A;** Yarılgaç, T; Kara, Ş M, 2017. Assessment of Antioxidant of Giant Snowdrop (*Galanthus elwesii* Hook) Extracts with Their Total Phenol and Flavonoid Contents. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research (Basımda)

**A4. Açıkgöz, M A;** Yarılgaç, T; Kara, Ş M, 2017. Enhancement of Phytochemical Compounds Using Biotic and Abiotic Elicitors in Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, (Basımda)

**C1. Açıkgöz, M A.** and Özenç, D. B, 2012. Effects Of Hazelnut Husk Compost and Bacteria Inoculation on Soybean Growth and Nodule Formation. The 8th International Soil Science Congress on “Land Degradation and Challenges in Soil Management, 15-17 May, İzmir, Turkey (Oral Presentation).

**C2. Açıkgöz, M A;** Karnak E E, 2013. Micro Nutrient Composition of Some Medicinal and Aromatic Plants Commonly Used in Turkey, The international Conference of The University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest, Agriculture For Life, Life For Agriculture, June 5-8, Bucharest, Romania (Poster Presentation).

**C3. Kara, Ş M; Özkutlu, F; Açıkgöz, M A;** Batı, E, 2014. Essential Macro Nutrient Profiles of Selected Medicinal and Aromatic Plants From The Family of Lamiaceae. 8 Th. Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, May 19-23, Durnes, Albania (Poster Presentation).

**C4. Açıkgöz, M A;** Kara, Ş M; Kırılı, A; Aruç, C, 2017. Morphogenetic, Ontogenetic and Diurnal Variability in in Antimicrobial Activity of Bitter Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare*) Essential Oil, “The Third Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants”, 13-16 April, Kyrenia, Cyprus (Oral Presentation).

**C5. Açıkgöz, M A;** Kara, Ş M; Kırılı, A; Kayacı, M, 2017. Morphogenetic, Ontogenetic and Diurnal Variability in Content and Constituents of Purple Coneflower Essential Oil, International Conference On Advances in Natural And Applied Sciences, 18-21 April, Antalya, Turkey (Oral Presentation).

**C6. Açıkgöz, M A;** Kara, Ş M; Kayacı, M, 2017. Determining the Effect of Various Pre-treatments on Germination of *Achillea gypsicola* Seeds under in Vivo and in Vitro

Conditions, International Conference On Advances in Natural And Applied Sciences, 18-21 April, Antalya, Turkey (Oral Presentation).

**C7. Açıkgöz, M A;** Kara, Ş M; Ceylan, Ö; Kayacı, M, 2017. Morphogenetic, Ontogenetic and Diurnal Variability in Antimicrobial Activity of Purple Coneflower Essential Oil, 1st International Congress on Medical and Aromatic Plants, 10-12 May, Konya, Turkey (Oral Presentation).

**C8. Açıkgöz, M A;** Kara, Ş M; Kırılı, A; Kayacı, M, 2017. Morphogenetic, Ontogenetic and Diurnal Variability in Content and Constituents of Bitter Fennel Essential Oil, International Conference on Agriculture Forest Food, 15-17 May, Cappadocia, Turkey (Oral Presentation).

**C9. Açıkgöz, M A;** Kara, Ş M, 2017. Enhancement of Phytochemical Compounds Using Biotic and Abiotic Elicitors in Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.), “The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences”, 11-12 September, Trabzon, Turkey (Oral Presentation).

**C10. Ay, E; Açıkgöz, M A;** Gül, M; Kara, Ş M, 2017. Assessment of Antioxidant of Giant Snowdrop (*Galanthus elwesii* Hook) Extracts with Their Total Phenol and Flavonoid Contents, “The Second Japan-Turkey International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences”, 11-12 September, Trabzon, Turkey (Oral Presentation).