

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Hyoscyamus niger* KÖK KÜLTÜRÜNDE SEKONDER METABOLİT
ÜRETİMİ**

EMRE ERDEM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Hyoscyamus niger* KÖK KÜLTÜRÜNDE**
SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

EMRE ERDEM

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANLARI:

I. PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

II. DOÇ. DR. TİJEN TALAS OĞRAŞ

GEBZE

2019

T.C.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

SECONDARY METABOLITE PRODUCTION
IN *Hyoscyamus niger* ROOT CULTURE

EMRE ERDEM

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISORS

I. PROF. DR. YELDA OZDEN CIFTCI

ASSOC. PROF. DR. TIJEN TALAS OGRAS

GEBZE

2019

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/07/2019 tarih ve 2019/31 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06/08/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Emre ERDEM'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Mine Gül ŞEKER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Bu çalışmanın temel amacı, *Hyoscyamus niger* (banotu) bitkisinin bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak *in vitro* koşullarda kök ve sekonder metabolit üretiminin artırılmasını sağlamaktır. *H. niger* içeriğinde bulunan tropan alkaloidleri nedeniyle tıbbi açıdan öneme sahiptir.

Çalışmada, MS (Murashige and Skoog) ve yarım MS besin ortamında pH'nın 5,8 ile 6,5 olduğu, IBA (İndol bütirik asit) içeren ve içermeyen şartlarda kök kültürleri yapıldı. 21 günlük çalışma sonrası köklerin yaş ve kuru ağırlıkları alınıp büyüme yüzdeleri hesaplandı. Elde edilen köklerden alkaloid ekstraksiyonu yapıldı. İnce tabaka kromatografisi ve HPLC yöntemi ile tropan alkaloidler analiz edildi. Ayrıca, çalışma kapsamında tohum sterilizasyonu ve saflaştırma yöntemlerinin de optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Köklerin yaş ağırlık ortalaması alındığında ½ MS+0,1 IBA, pH:5,8 ortamında ortalama 1,923 gram ile diğer gruplara göre en yüksek yaş ağırlık miktarı gözlemlendi. MS+0,1 IBA, pH:5,8 ortamında ise 1,860 gram ile ikinci en yüksek ağırlık gözlemlendi. Kuru ağırlıklarda en yüksek değerler MS+0,1 IBA, pH:5,8 ortamında gelişen köklerde ortalama 0,190 gram, MS+0,1 IBA, pH:6,5 ortamında gelişen köklerde 0,183 gram olarak gözlemlendi. Bu durum, ½ MS ortamında gelişen köklerin MS ortamında gelişenlere oranla daha fazla su içerdiğini gösterdi. 2. protokol ile yapılan alkaloid saflaştırma sonuçlarına göre IBA içermeyen ortamlarda gelişen *H. niger* köklerinden elde edilen ekstraktların, IBA içeren ortamlarda gelişen köklere oranla daha saf olduğu sonucuna varıldı. HPLC analizi sonuçları her iki ekstraksiyon protokolü ile yapılan aynı örneklerde ekstre miktarı gibi *atropin* miktarının da 2. protokolde daha fazla olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak, kök oluşumu ve kütle artışı IBA içeren gruplarda içermeyenlerden yüksek olmasına karşın, alkaloid miktarları IBA'sız ortamda gelişen köklerde daha fazla tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Hyoscyamus niger*, IBA, sekonder metabolit, alkaloid, *atropin*.

SUMMARY

The main aim of this study is to increase the root and secondary metabolite production of *Hyoscyamus niger* (henbane) plant *in vitro* using plant tissue culture methods. *H. niger* is medically important due to its tropane alkaloids.

In this study, root cultures were made under conditions with and without IBA (Indol butiric acid), pH between 5.8 and 6.5 in MS0 and half MS medium. After 21 days of study, wet and dry weights of the roots were taken and growth index were calculated. Alkaloid extraction was performed from the obtained roots. The tropane alkaloids were analyzed by thin layer chromatography and HPLC. In addition, optimization of seed sterilization and purification methods were performed.

When the average wet weight of the roots was measured, half MS + 0.1 IBA, pH: 5.8 medium, and the highest wet weight were obtained with an average of 1.923 grams. The second highest weight was observed with MS + 0.1 IBA and pH: 5.8 medium with 1,860 grams. The highest values in dry weights were observed as average of 0.190 grams in roots developing in MS + 0.1 IBA pH: 5.8 and 0.183 grams in roots developing in MS + 0.1 IBA pH: 6.5.

According to the results of alkaloid purification with 2. protocol, it was concluded that extracts obtained from *H.niger* roots developed in without IBA media were more pure than roots developed in with IBA media. Two extraction protocols were applied to the same sample and HPLC analysis was performed. As a result, the amount of atropine was higher in 2 protocol.

As a result, root formation and mass increase were higher in the roots growing in nutrient medium with IBA than in nutrient medium without IBA and alkaloid levels were higher in the roots developing in nutrient medium without IBA.

Key Words: *Hyoscyamus niger*, hairy root, IBA, secondary metabolite, alkaloid, atropine.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde TÜBİTAK destekli 117H001 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans hayatım boyunca destek olan ve yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmalarında bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan ve çalışmalarına yön veren değerli danışman hocam Doç. Dr. Tijen TALAS OĞRAŞ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımıza sunduğu destek ve gösterdiği ilgi nedeniyle TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü müdür yardımcısı Doç.Dr. Selma ÖZTÜRK'e teşekkür ederim. TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarı'ndaki çalışmalarında bilgi, tecrübe ve her türlü laboratuvar imkanlarını benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Selma ONARICI, Dr. Birsen CEVHER KESKİN ve Dr. Deniz KÖM'e teşekkür ederim.

TÜBİTAK MAM Malzeme Enstitüsü'nden Dr. Elif TAHTASAKAL'a saflaştırma aşamalarında verdikleri laboratuvar desteği ve bilgi paylaşımından dolayı teşekkür ederim. TÜBİTAK MAM Kimyasal Teknoloji Enstitüsü'nden Dr. Nilüfer ERDEM'e HPLC analizi aşamasındaki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarında maddi ve manevi destek sağlayan Rahmi BÜYÜKKESKİN'e teşekkür ederim. Laboratuvarda keyifle çalıştığım, desteğine, bilgi ve tecrübesine başvurduğum değerli arkadaşım Naciye YAĞIZ'a teşekkür ederim. Çalışmalarımın saflaştırma aşamasında bilgilerini benimle paylaşan ve destek olan laboratuvar arkadaşlarım Tuğba MUTLU ve Tuğba AYDIN'a teşekkür ederim.

Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'ndeki değerli meslektaşlarıma gösterdikleri özen ve iş birliği içinde çalışma gayretlerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve eğitim hayatımda her imkanı bana sunmaya çalışan anneme ve her koşulda beni anlayışla karşılayan, yegane destekçim eşim Özlem ERDEM'e canı gönülden teşekkür ediyorum, bu tezi onlara ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği.....	2
1.2. <i>Hyoscyamus niger</i> Bitkisi.....	3
1.2.1. <i>H. niger</i> Bitkisinin Botanik Özellikleri.....	3
1.2.2. <i>H. niger</i> Bitkisinin Sınıflandırılması	5
1.2.3. <i>H. niger</i> Bitkisinin Yayılışı.....	6
1.2.4. <i>H. niger</i> Bitkisinin Önemi	7
1.2.5. <i>H. niger</i> Bitkisinin Kimyasal İçeriği.....	8
1.3. Kök Kültürleri	9
1.4. Sekonder Metabolitler	10
1.4.1. Alkaloidler	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM	17
2.1. Materyal.....	17
2.1.1. Bitki Materyali.....	17

2.1.2. Kullanılan Malzemeler	17
2.1.3. Kullanılan Cihazlar	20
2.2. YÖNTEM	21
2.2.1. <i>H. niger</i> Tohum Sterilizasyonu	21
2.2.2. <i>H. niger</i> Tohumlarının Çimlendirilmesi	23
2.2.3. Kök Kültürlerinin Kurulması	27
2.2.4. Sekonder Metabolit Ekstraksiyonları	29
2.2.5. <i>H. niger</i> Köklerinden Alkaloid Ekstraksiyonu	29
2.2.6. Tropan Alkaloidlerinin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Tespit Edilmesi	32
2.2.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile <i>Atropin</i> Analizi ...	33
3. BULGULAR	35
3.1. <i>H. niger</i> Tohum Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi	35
3.2. <i>H. niger</i> Kök Kültürü	37
3.3. <i>H. niger</i> Köklerinden Alkaloid Ekstraksiyonu	39
3.5. HPLC Yöntemiyle <i>Atropin</i> Varlığının Belirlenmesi	43
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	52
EKLER	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve

Açıklamalar

Kısaltmalar

CHCl_3 : Kloroform

% : Yüzde

$^{\circ}\text{C}$: Derece santigrat

μg : Mikrogram

μl : Mikrolitre

μM : Mikromolar

cm : Santimetre

dH_2O : Distile su

dk : Dakika

EtOH : Etil alkol

g : Gram

GI : Büyüme endeksi

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

H_2SO_4 : Sülfürik asit

HCl : Hidroklorik asit

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

IBA	:	İndol bütirik asit
İTK	:	İnce tabaka kromatografisi
L	:	Litre
M	:	Molar
m	:	Metre
MeOH	:	Metanol
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
MS	:	Murashige and Skoog
Na ₂ SO ₄	:	Sodyum sülfat
NaOCl	:	Sodyum hipoklorit
NH ₄ OH	:	Amonyum hidroksit
rpm	:	Dakika başına devir
UV	:	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
1.2.1.a:	<i>H.niger</i> tohumlarının ölçekli görüntüsü	4
1.2.1.b:	<i>H. niger</i> bitkisinin morfolojik çizimi	4
1.2.1.c:	Bitki büyütme kabiniinde toprak ve perlit ortamında büyüyen <i>H.niger</i> bitkileri	5
1.2.1.d:	Bitki büyütme kabiniinde perlit ortamında büyüyen <i>H. niger</i> bitkisinin çiçekli ve kapsüllü dallarının görüntüsü	5
1.2.3.a:	Türkiye’de <i>H.niger</i> bitkisinin doğal yayılım alanı.	7
1.4:	Sekonder metabolitlerin genel sentez yolları	13
1.4.1.a:	Tropan alkaloidlerinden bazılarının moleküler yapısı	15
1.4.1.b:	Tropan alkaloidlerinin biyosentez yolları	16
2.2.2.a:	<i>H. niger</i> tohumlarının çimlenme öncesi (solda) ve çimlendikten sonra 1 aylık (sağda) görüntüleri	26
2.2.2.b:	Çimlenme sonrası cam tüplere aktarılan <i>H. niger</i> bitkileri	26
2.2.3:	Kurulan kök kültürü erlenlerinden örnek iki tanesi	28
2.2.5:	Ekstraksiyon çalışmasının uygulama aşamaları	32
3.2.a:	<i>H. niger</i> kök kültürlerinin kütle artışı yüzdeleri	38
3.2.b:	21 günlük inkübasyon sonrası köklerin gelişimi	38

3.3:	1. ve 2. protokol ile ekstraksiyon yapılan 8 örneğin ekstre ağırlıkları	41
3.4.a:	254 nm UV ışık altında görüntülenen silika jel plaka	42
3.4.b:	366 nm UV ışık altında görüntülenen silika jel plaka	42
3.4.c:	İnce tabaka kromatografisi sonrasında Dragendorf çözeltisi püskürtülen silika jel plaka	43
3.5.a:	Standart <i>atropin</i> HPLC kromatogramı	44
3.5.b:	1. protokol 1. örnek (1.1) HPLC kromatogramı	44
3.5.c:	2. protokol 1. örnek (2.1) HPLC kromatogramı	45
3.5.d:	HPLC analizi yapılan kloroform ekstresi örneklerinin <i>atropin</i> yüzdesi	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa Numarası
1.2.2	: <i>H. niger</i> bitkisinin taksonomik hiyerarşisi	6
1.2.5	: <i>H.niger</i> bitkisinde bulunan sekonder metabolitler	9
2.1.2.a	: Tohum sterilizasyonunda kullanılan bileşenler	17
2.1.2.b	: Doku kültüründe kullanılan bileşenler	18
2.1.2.c	: Tropan alkaloidleri ekstraksiyonunda kullanılan malzemeler	19
2.1.3	: Tez çalışması sürecinde kullanılan cihazlar	20
2.2.1	: Sterilizasyon aşamasında uygulanan yöntemler	22
2.2.2	: Çimlendirmede kullanılan MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamı içeriği	24
2.2.3	: Çalışma gruplarında kullanılan besin ortamı, pH ve büyüme düzenleyiciler	27
2.2.7	: HPLC analizinde kullanılan cihaz ve kimyasal bilgileri	34
3.1	: Tohum sterilizasyonu aşamasında çalışma boyunca uygulanan yöntemler ve sonuçları	35
3.2.a	: 21 günlük çalışma sonrası köklerin yaş ağırlıkları	37

3.2.b	: Köklerin kuru ağırlık ortalamaları ve su oranı	39
3.3	: Saflaştırma yapılan <i>H. niger</i> köklerinden elde edilen ekstre miktarı	40



1. GİRİŞ

İnsanoğlu tarih boyunca gıda, ilaç ve barınma gibi amaçlarla bitkilerden faydalanmıştır. Yerleşik hayatın ve tarımın başlaması bitkilerin insanlık tarihindeki yerini daha da artırmıştır. Bitkiler insanların temel besin kaynağını oluşturur. Sadece besin kaynağı olarak değil, aynı zamanda ürettikleri sekonder metabolitler ile gıda, kozmetik, eczacılık, tekstil sanayii ve tarımsal mücadelede hayati öneme sahiptir. İnsanlığın temel ihtiyaç kaynağı olan beslenme ağırlıklı olarak tarıma dayalıdır. İnsanlık yüzyıllardır protein, yağ ve karbonhidrat kaynağı açısından doğrudan veya dolaylı yoğun olarak bitkilere bağımlıdır. Bitkiler dünyanın enerji kaynağı olan güneşi kullanarak fotosentez yoluyla organik bileşikler üretirler. Üretmiş oldukları bu organik ürünler bitkinin kendisini ve otçul (herbivor) canlıları doğrudan, etçil (karnivor) ve hem etçil-hem otçul (omnivor) canlıları dolaylı olarak ilgilendirir. Beslenme zincirinin başlangıç kademesini oluşturan bitkiler, canlılık için gerekli olan enerjinin kullanılabilir ürün olarak sentezlendiği besin zincirinin ilk kademesidir. Bitkiler, gıda ve tarım sektörünün ham maddesidir. Ülkemizde tarım sektörü büyük bir potansiyele sahip olmasına karşın, verimli tarım alanları gün geçtikçe azalmaktadır. Bu durum, biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesini ve bitkilerden yüksek verim eldesi çalışmalarını zorunlu hale getirmektedir. Bitkilerden elde edilecek sekonder metabolitlerin verim artışı sağlamak için tarım alanlarının genişletilmesi veya bitkinin ürettiği sekonder metabolitlerin artırılması gerekmektedir. Tarım alanlarının gün geçtikçe azalması nedeniyle bitki sekonder metabolit veriminin artırılması en uygun seçenek olarak görülmektedir.

Keşfedilmiş bitkilerin insan yararına kullanımı insanlık tarafından tarih boyunca araştırılmış ve araştırılması devam eden bir süreçtir. Günümüzde bilimin ve teknolojik altyapının ilerlemesiyle birlikte bitkilerin insanlık yararına kullanımı için çalışmalar hızlanmıştır. Laboratuvar şartlarında geliştirilen yöntemlerle sentetik olarak birçok bileşiğin eldesi mümkün olsa da kompleks yapıdaki bileşiklerin büyük çoğunluğu hala bitkilerden elde edilmek zorundadır. Bu durum gıda, ilaç ve kozmetik sektörünü doğrudan ilgilendirmektedir. Bitkinin içerdiği sekonder metabolit miktarının çeşitli yöntemler ile artırılması bu sektörler için gerekli olan ham maddenin daha ekonomik

hale gelmesini sağlayacaktır.

Bitki doku ve hücre kültürleri kullanılarak sekonder metabolit üretimi için en uygun şartlar araştırılmaya ve geliştirilmeye devam etmektedir [1]. Gelişmiş bitkilerde kökler bitkinin beslenmesinin yanı sıra çok çeşitli ve değerli sekonder metabolitlerin de sentezlendiği yerlerdir. Köklerin bu özelliği sekonder metabolit üretiminde cazip bir doku olmasını sağlamıştır. Genellikle elde edilen kök miktarı ile sekonder metabolit eldesi doğru orantılıdır. Bir başka ifade ile genellikle kök miktarı ne kadar fazla olursa sekonder metabolit üretimi de o kadar fazla olur. Bitki doku kültürü çalışmalarında dokunun gelişimi ve büyümesi bitki büyüme düzenleyicileri ile kontrol edilir. Kök kültürlerinde de kökün gelişimi ve büyümesi için kök gelişimine etki eden bazı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılır. Bu durumun alternatifi olarak saçak kök kültürü yöntemi vardır. Saçak kökler doğal genetik mühendisler olarak tanımlanan *Agrobacterium rhizogenes* bakterisi ile bitki dokularının enfekte edilmesi yoluyla elde edilir. Elde edilen transforme kökler bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duymadan temel besin ortamlarında oldukça hızlı gelişim gösterebilirler [2].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Tropan alkaloidler birçok hastalığın tedavisinde kullanılan tıbbi öneme sahip bileşiklerdir. Bu alkaloidlerin üretiminin sağlanması ve verim artışı, ülke ekonomisi ve dışa bağımlılıktan kurtulma açısından önemlidir.

Bu tezin amacı; doku kültürü ortamında genetik müdahale olmadan farklı büyüme düzenleyicileri ve besin ortamlarında saçak kök üretiminin artırılmasının sağlanması ve sekonder metabolit içeriğinde verim artışı elde etmektir.

Literatüre bakıldığında *Agrobacterium rhizogenes* bakterisi kullanılarak saçak kök elde etmenin yaygın bir yöntem olduğu görülmektedir. Fakat, bu çalışmada kök kültürlerinin herhangi bir genetik müdahale olmadan geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

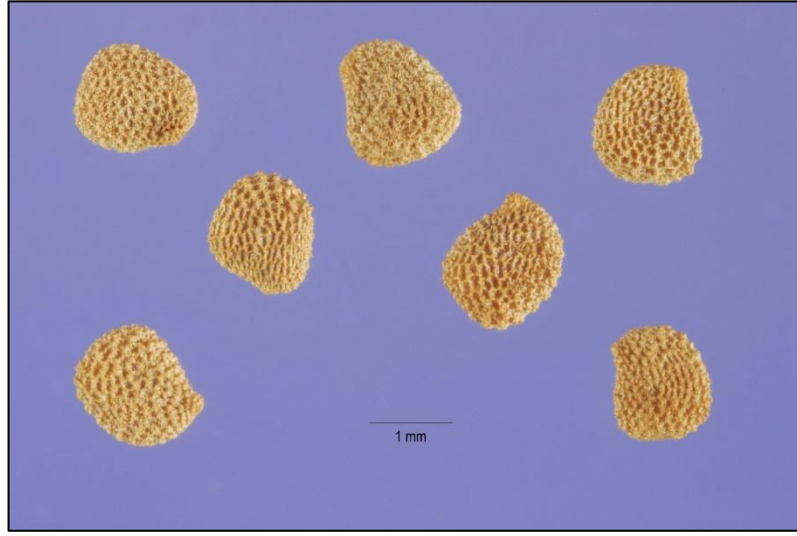
Bu tez çalışmasında bitkilerde kök gelişiminin sağlanması besin ortamındaki farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeriği ve pH farklılıkları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kök dokularından ekstraksiyon yöntemleri ile sekonder metabolitler saflaştırılmış ve HPLC analizi ile miktarları tayin edilmiştir.

1.2. *Hyoscyamus niger* Bitkisi

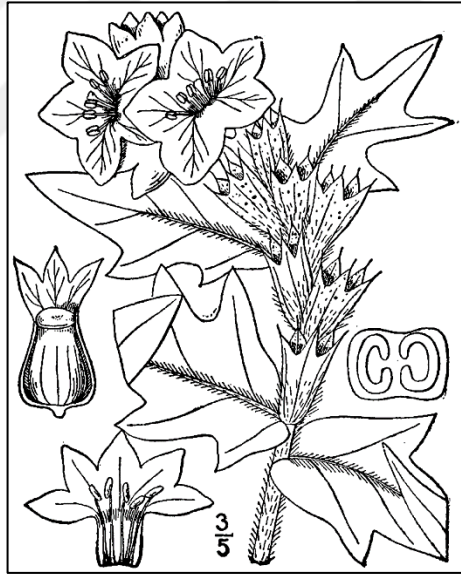
Ülkemizde Banotu (*H. niger*), Güz tohumu, Batbat otu, Tabanca kapsülü, Delibatbat, Bengildek, Gavur Haşhaşı, Konca, Bangotu, Berç, Benk, Dağdağan gibi isimlerle de bilinmektedir. Tadı acı ve kokusu kötü olan zehirli bir bitkidir. Geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılmaktadır [3].

1.2.1. *H. niger* Bitkisinin Botanik Özellikleri

H.niger, tek veya iki yıllık otsu bir bitkidir. Yapısal olarak dik gövdeli olan bitki basit veya dallanmış şekildedir. Gövde ve yaprak sapları salgı içeren yumuşak tüylerle kaplıdır. Tadı acıdır ve hoş olmayan bir kokusu vardır. Mor damarlı ve sarı renkli çiçekler, düz kenarlı beşgen yapraklar ve olgun halinde kapaklı tohum kapsüllerine sahiptir. Bitki, 20-100 cm aralığında boya ulaşır. Kapsülleri içerisinde çok sayıda gri renkli küçük tohum bulunur. Tohumlar genellikle oval şekilli ve yüzeyi çukurlarla dolu bir yapıya sahiptir. Ortalama çapı 1-1,5 mm aralığındadır. Şekil 1.2.1.a'da tohum yapısı ve büyüklüğü gösterildi [4]. Banotu yaprakları gövdeye bağlı olduklarında gövdeyi saracak şekildedir. Yaprakları sapsız veya saplı, yaprak çevresi girintili şekildedir. Çiçek sapları çok kısadır. Nisan-Ağustos ayları arasında çiçeklenen bitkinin çiçekleri salkım şeklinde görünür. Şekil 1.2.1.b'de bitkinin morfolojik çizimi gösterildi [5]. Bitki büyütme kabini ortamında perlit ve toprak içerisinde büyüyen bitkiler Şekil 1.2.1.c'de, çiçek ve yaprak yapısı ise Şekil 1.2.1.d'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2.1.a: *H. niger* tohumlarının ölçekli görüntüsü.



Şekil 1.2.1.b: *H. niger* bitkisinin morfolojik çizimi.



Şekil 1.2.1.c: Bitki Büyütme kabiniinde toprak ve perlit ortamında büyüyen *H. niger* bitkileri.



Şekil 1.2.1.d: Bitki büyütme kabiniinde perlit ortamında büyüyen *H. niger* bitkisinin çiçekli ve kapsüllü dallarının görüntüsü.

1.2.2. *H. niger* Bitkisinin Sınıflandırılması

H. niger, patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasına ait tek veya iki yıllık otsu bir bitkidir [6]. Dünya genelinde bilinen 26 türü vardır. *H.niger* bitkisinin taksonomik hiyerarşisini gösteren bilgiler Entegre Taksonomik Bilgi Sistemi web sitesi

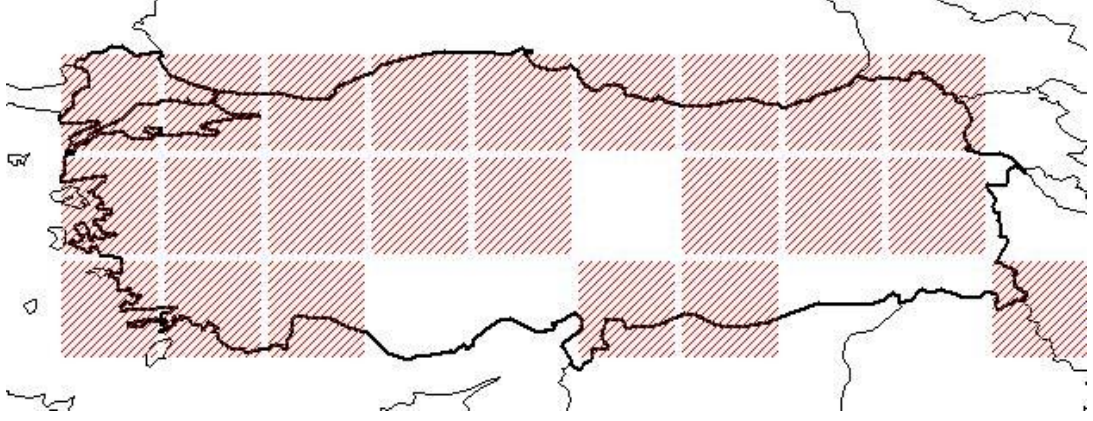
verilerinden yararlanılarak hazırlanan Tablo 1.2.2’de gösterilmiştir [7].

Tablo 1.2.2: *H. niger* bitkisinin taksonomik hiyerarşisini gösteren tablo.

Alem	Bitkiler (<i>Plantae</i>)
Şube	Damarlı Bitkiler (<i>Tracheophyta</i>)
Alt Şube	Tohumlu Bitkiler (<i>Spermatophytina</i>)
Sınıf	İki Çenekliler (<i>Magnoliopsida</i>)
Takım	Patlıcan Takımı (<i>Solanales</i>)
Aile	Patlıcangiller (<i>Solanaceae</i>)
Cins	Banotu (<i>Hyoscyamus</i>)
Tür	Kara Banotu (<i>Hyoscyamus niger</i>)

1.2.3. *H. niger* Bitkisinin Yayılışı

Taşlık ve kayalık yerlerde, yol kenarları, hububat tarlaları ve çorak yerlerde yetişir. Genellikle kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde dağılım gösteren endemik olmayan bir bitkidir [6]. Avrupa’nın tamamında, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Asya’da ve Avusturalya’da yetişmektedir. Ülkemizde Anadolunun çoğu bölgesinde ve Trakya bölgesinde yaygındır. 0-2300 m yükseklik aralığında görülür. Türkiye’de ağırlıklı olarak A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9, C1, C2, C3, C6, C7, C10 grid karelerinde yer alan Bolu, İstanbul, Ardahan, Hakkari, Batman, Kastamonu, Ağrı, Amasya, Ankara, Aydın, Çanakkale, Erzurum, Eskişehir, Isparta, Kırklareli, Kocaeli, Kütahya, Kahramanmaraş, Muğla, Ordu, Trabzon, Tunceli, Şanlıurfa, ve Aksaray illerinde dağılım gösterir. Ülkemiz genelinde dağılım haritası şekil 1.2.3.a’da gösterilmiştir [6].



Şekil 1.2.3.a: Türkiye’de Banotu bitkisinin doğal yayılım alanı.

Dünyada bulunan 26 Banotu türünden 6 tanesi ülkemizde bulunmaktadır. Beyaz Banotu (*Hyoscyamus albus*), Altı Renkli Banotu (*Hyoscyamus aureus*), Mor Çiçekli Banotu (*Hyoscyamus reticulatus*), Cüce Banotu (*Hyoscyamus pusillus*), Mardin Banotu (*Hyoscyamus leptocalyx*) ve Kara Banotu (*Hyoscyamus niger*) ülkemizde yetişen Banotu türleridir [7], [8].

1.2.4. *H. niger* Bitkisinin Önemi

Tropan alkaloidleri içeren bitkiler insanlık tarihi boyunca keyif verici madde olarak kullanılmıştır. Eski Mısır’da ameliyatlarda ağrı kesici olarak, büyücüler tarafından ise halüsinatif etkilerinden dolayı kullanılmıştır. *H. niger* içeriğinde yer alan tropan alkaloidleri, hem merkezi hem de periferik sinir sistemi üzerinde etkili antikolinerjik ilaçlardır. Bitkinin bütün kısımları alkaloid içerir ve yanlış kullanımda zehirlenmeye neden olabilir. Kan-beyin bariyerini ve lipid membranları geçebilen tropan alkaloidleri ataksi, halüsinasyon, barsak yavaşlaması, midriazis, taşikardi, cilt kuruluğu, yüksek ateş ve komaya neden olabilir. Tropan alkaloidlerinin vücuttaki etkileri periferik ve santral olmak üzere ikiye ayrılır. Periferik etkiler, salgı azalması nedeniyle hipertermi, aritmi, taşikardi, kabızlık, ağız kuruluğu ve idrar yapamama gibi antikolinerjik sorunlardır. Santral etkiler ise depresyon, deliryum, ajitasyon ve koma halidir [9].

H. niger geleneksel olarak astım, ishal, karın ağrısı ve idrar kaçırma tedavisinde kullanılır [10]. Fakat bu maddelerin modern tıptaki kullanım amacı farklıdır. Mesane spazmları, irritabl barsak hastalığı, kolik, sistit, pankreatit ve peptik ülseri tedavisinde faydalıdır. Solunum yolu salgılama aktivitesinin ve bronkodilatasyonun (bronş genişlemesi) inhibe edilmesi, kalp atış hızının değiştirilmesi (düşük dozlarda bradikardi ve yüksek dozlarda taşikardi), mide asidi salgılarının azaltılması, uyku döngüsünün düzenlenmesi ve yatıştırıcı etkisiyle stres kontrolü gibi amaçlarla kullanılabilir. İçeriğinde bulunan *hyosiyamin*, *skopolamin* ve *atropin* sebebiyle tıbbi öneme sahiptir. Banotu alkaloidlerinin Ca^{+2} kanallarını bloklama etkisi vardır. *Atropin*, organofosfor zehirlenmesi için bir panzehir olarak kullanılır. Aynı zamanda göz hastalıkları tedavisinde de göz bebeği büyütücü ilaç olarak kullanılır, çünkü kararlıdır ve küçük dozlarda verildiğinde merkezi sinir sistemini etkilemez [11].

1.2.5. *H. niger* Bitkisinin Kimyasal İçeriği

H. niger, ülkemizde yaygın olarak bulunabilen ve alkaloid oranı yüksek bitkilerden biridir. İçeriğinde yer alan tropan alkaloidleri nedeniyle uyuşturucu özelliğe sahip zehirli bir bitkidir. Genellikle hayvan zehirlenmelerine neden olan bu bitki, geleneksel tedavi amacıyla bilinçsiz kullanım durumunda bir çok klinik vakaya neden olmaktadır. Geleneksel tedavide kullanımı sebebiyle zehirlenme vakalarına özellikle Erzurum ve Van yöresinde daha sık rastlanmaktadır. Yaprak ve köklerinin tadı salatalığa benzediği için çocuklara cazip gelmektedir. Banotu türleri ağırlıklı olarak *atropin*, *skopolamin* ve *hyosiyamin* gibi tropan alkaloidlerini içermektedir. Fenolikler, gliseridler, saponinler, glikozitler, lignanlar, kumarinolignanlar, flavonidler ve vitanolidler de Banotu türlerinde yer alan alkaloid olmayan sekonder metabolitlerdir [12].

H. niger bitkisine ait sekonder metabolit içeriği Tablo 1.2.5’de detaylıca gösterilmiştir [13], [14], [15].

Tablo 1.2.5: *H. niger* bitkisinde bulunan sekonder metabolitler

Sekonder Metabolit	Bileşğin Adı
Tropan Alkaloidleri	<i>Hyosiyamin, Skopolamin, Atropine, Cuscohygrine, Tropin, Hygrin, Tropinon, Tropin</i>
Lignanlar	<i>Hyosmin, Cannabisin D, Cannabisin G, Grossamide, Hyoscyamide, Hyoscyamal, Balanophonin</i>
Kumarinolignanlar	<i>Cleomiscosin A, Cleomiscosin B, Hyosgerin, Venkatasin, Cleomiscosin A, Metil eter</i>
Vitanolitler	<i>Hyoscyamilactol</i>
Flavonoidler	<i>Rutin, Spiraeoside</i>
Flavonid glikozitler	<i>Pongamosid C, Pongamosid D</i>
Steroidall glikozitler	<i>Atroposid A, Atroposid C, Atroposid E, Atroposid L</i>
Saponinler	<i>Hyosiyamid A, B, B1, B2, B3, C, C1, C2, D, D1, E, E1, F, F1, J ve J1</i>
Fenolikler	<i>Vanilik asit, Vanilin, Pinoresinol, Tyramine</i>
Diğer bileşikler	<i>Daucosterol, β-sitosterol, 24-tetracosanediol difeulate, Riboflavin</i>

1.3. Kök Kùltürleri

Sekonder metabolitler bitkinin farklı kùsùmlarında değişik oranlarda üretilirler. Bitki dokusunun üretim miktarı sekonder metabolit üretimi ile çoğunlukla doğru orantılıdır. Fakat, bazı durumlarda bu durum tam tersi olarak görùlebilir.

Tropan alkaloidleri için kökler en yüksek verim alınan kùsùmlardır. Köklerin

daha fazla üretimi için yan kök oluşumu yapmasını sağlamak gerekir. Yan kök oluşumu yapan köklere tüylü ya da saçak kökler denir. Bitkiden saçak kök eldesi ile kökler daha fazla dallanmış yapı gösterir ve doğal haline göre daha fazla kök elde edilir. Saçak kök eldesi için iki farklı yöntem mevcuttur;

- Öncelikli olarak akla gelen yöntemlerden biri, son yıllarda doku kültürü alanında köklü değişikliklere imkan sağlayan *Agrobacterium rhizogenes* ile bitki transformasyonudur. Bir tür toprak bakterisi olan *Agrobacterium rhizogenes* ile transforme edilen bitkiler saçak (tüylü) kökler oluşturur. Bu patojen bakteri Ri-DNA (Root inducing DNA) adı verilen plazmit parçasını bitki genomuna aktarır, bitkide saçak kök fenotipi meydana getirir [16]. Bu sayede kök üretimini artıran bitki büyüme düzenleyicilere gerek kalmadan kök kendisi sürekli dallanma yapar ve doğal haline oranla daha fazla büyür.
- Bir başka yöntem ise; kök üretimini tetikleyen bitki büyüme düzenleyiciler ile yapılan kök üretimidir. Bu yöntemde bitkiye herhangi bir genetik müdahale yapılmadan köklerin bulunduğu besin ortamına yan kök oluşumunu sağlayan büyüme düzenleyiciler eklenerek uygulanır [17].

Agrobacterium rhizogenes bakterisi ile yapılan genetik manipülasyon büyüme düzenleyici olmadan daha az maliyetle üretime imkan sağlamaktadır. Fakat, bu yöntem her bitki için uygun değildir. Bazı bitkiler bakteriden gen alımını kolayca yaparken, bazıları bu konuda çok zor bitkilerdir. *Solanaceae* familyasında *Datura* ve *Nicotiana* türleri transformasyona diğer üyelerine göre daha yatkındır. Bu durum, *H. niger* için ele alındığında yapılmış örnekleri olmasına karşın kolay bir yöntem değildir. Bitki büyüme düzenleyiciler ile yapılan saçak kök kültürü süreç açısından daha kısa zamanda sonuç vermektedir [18].

1.4. Sekonder Metabolitler

Bitki kimyasalları primer ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılır. Primer metabolitler (karbonhidratlar, yağlar, proteinler) doğada yaygındır ve bitkinin fizyolojik gelişimi için gereklidir. Birincil metabolitlerin kofulda toplanan ve ihtiyaç duyulmayan son ürünleri gibi görünse de sekonder metabolitler bitkideki zararlı

ürünlerin zararsızlaştırılması yolu ile elde edilen ve bitkiye yardımcı bileşikler olarak tanımlanabilir [19].

Sekonder metabolitlerin bir organizma tarafından sentezi ve önemi şu şekilde özetlenebilir:

- Sıcaklık, kuraklık, ultraviyole mor ötesi ışınları gibi çevresel etmenlerin oluşturduğu strese karşı koyma,
- Yaralanma durumları, mikroorganizmalara (virüs, bakteri, mantar vb.) karşı savunma,
- Böcek ve sürüngenler gibi herbivorlara karşı savunma,
- Tozlaşma ve tohum dağılımı için taşıyıcı hayvanları cezbetme gibi sinyal süreçlerinde, gelişimde, savunmada ve diğer organizmalar ile etkileşimlerin kurulmasında önemli rol oynarlar [20].

Sekonder metabolitler, kimyasal yapı, bileşim, çözücülerdeki çözünürlükleri ve sentezlendikleri yola bağlı olarak sınıflandırılabilirler. Basit bir sınıflandırma ile terpenler, fenolikler ve azot içeren bileşikler olarak üç ana başlık altında gösterilirler. Bitkilerde gelişen çoğu sekonder metabolit otobur ve patojenlere karşı olumsuz ve toksik etki yapması nedeniyle daha yaygın olduğu hipotezini düşündürmektedir. Bitkiler böcekler tarafından saldırıya uğradığında bazı bileşikler havaya salınır. Bu bileşikler otçulları öldüren parazitleri ve avcılarını kendine çeker. Böylece bitki sekonder metabolitleri kullanarak dolaylı yoldan savunma yapmış olur. Bazı bitkiler rakip bitkilerin büyümesini engellemek için sekonder metabolitleri kullanabilirler. Bu olaya allelopati denir. Pigmentler yardımıyla çiçek rengi, fenolik bileşikler ile dikkat çekici kokular yayan bitkiler tozlaşma ve tohum yayılımı için sekonder metabolitleri kullanırlar [21].

Sekonder metabolitlerin genel özellikleri;

- Gerekli durumlarda sentezde ya da enerji ihtiyacında kullanılırlar.
- Üretildikleri bölgelerden farklı doku, organ ve sistemlerde depolanırlar.
- Biyosentez sürecindeki aşamalarda oluşurlar.
- Stereokimyasal varyasyonları ve moleküler yapıdaki türevleri çok çeşitlidir.
- Cins ya da türlerin kendilerine has ürünü olabilir ve türlerin biyokimyasal çeşitlilikleriyle sınırlıdır.

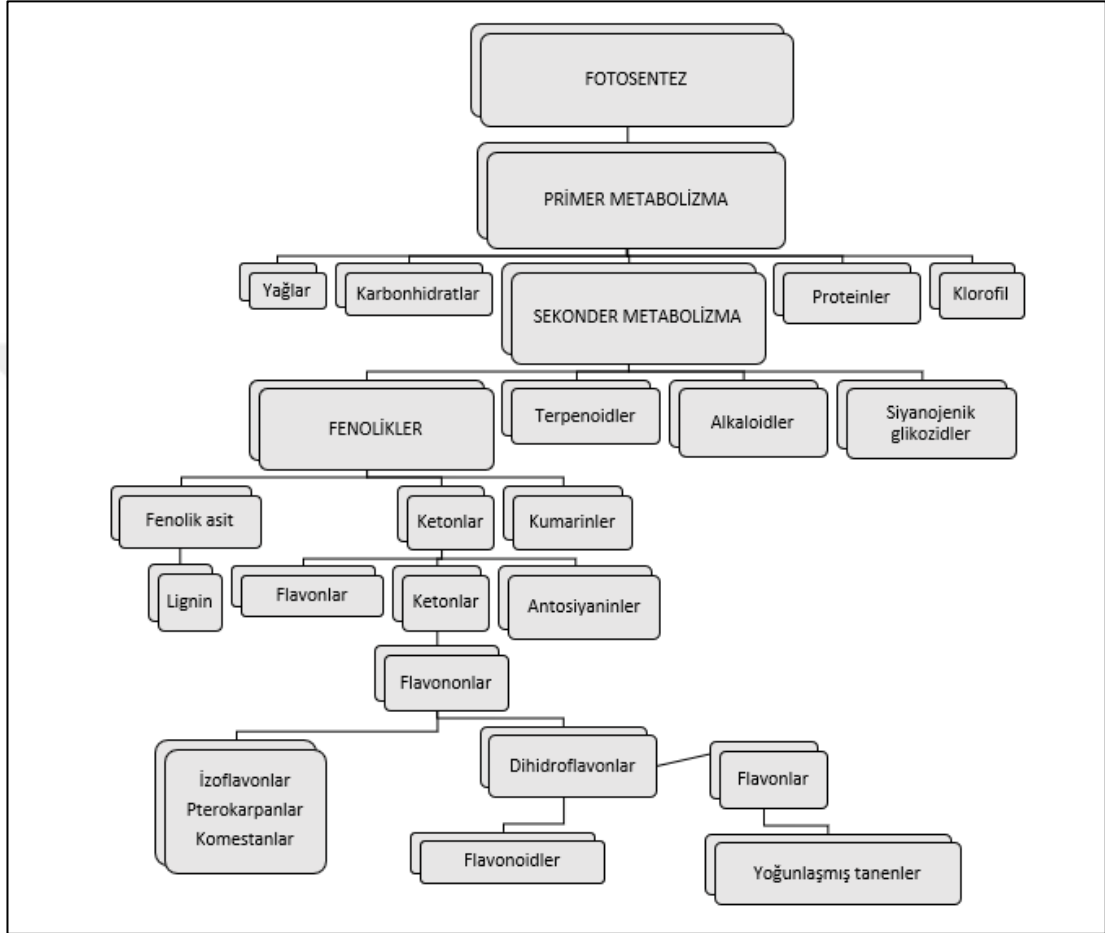
- Kimyasal varyasyonlar mutasyonlar ile metabolit oluşturabilir [19].

Üretilme ve depolanma olarak sekonder metabolitler yapılarına göre hücrede farklı konumlarda yer alırlar. Hücre düzeyinde sentezleri, plastidlerde ve sitozolde yapılırken; depolanmaları koful veya hücre duvarındadır. İzoterpenler ve fenolik bileşikler hem hücre duvarı hem kofulda depolanırken; alkaloidler ve glikozitler tuz halinde kofullarda depolanır. Doku düzeyinde baktığımızda ise sekonder metabolit dağılımı eşit değildir. Bu duruma hormonların da etkisi vardır. Doku düzeyinde sekonder metabolitler boşluklar ve kanallar aracılığı ile depolanırlar. Bu durum organ düzeyinde bakıldığında yine farklı bir dağılım gösterir. Örneğin; alkaloidler yaprak, gövde, tohum, meyve ve köklerde bulunurken, tanenler bitkinin toprak altı kısmında daha çok bulunurlar. Bitkilerin büyüme aşamaları ve günün belli saatleri de sekonder metabolitlerin üretiminde etkili bir faktördür. Çiçek tomurcuklarının oluşması ve çiçeklenme aşaması eterik yağların üretiminin en fazla olduğu aşamadır. Örneğin; Yağ gülü (*Rosa damascena*) çiçeklerinde sabah 4-6 saatleri arasında eterik yağlar en yüksek değerlerde salgılanmaktadır. İklimlerin sekonder metabolitler üzerinde etkisi olduğunu C.Darwin 1868 yılında söylemiştir. Örneğin; zehirli olduğu bilinen Kurtboğan (*Acotinum sp.*) bitkisi soğuk bölgelerde zehirsizdir [19].

Sekonder metabolitlerin oluşmasında ve yapılarında çeşitli çevresel etkenler, coğrafi konum, yükseklik, toprak, iklim ve biyolojik etmenlerin katkısı büyüktür. Soğuk bölgelerde bulunan bitkilerde genellikle tanenler ve flavonoidler, sıcak bölgelerde bulunan bitkilerde ise alkaloidler ve eterik yağlar daha çok bulunur. Nemli ve sıcak bir ortam karotenoidlerin, düşük nem flavonoidlerin, düşük sıcaklık ise glikozitlerin oluşmasına neden olur. Azot miktarı yüksek topraklarda yetişen bitkilerde tanen miktarı düşerken, alkaloid üretimi artar. Diğer yandan asitli topraklarda alkaloid üretim miktarları düşer. Glikozitler, tanenler ve flavonoidler kireçli topraklarda yetişen bitkilerde normalden daha yüksek miktarda bulunur. Sekonder metabolitlerin sentezi aşamasında bitkiler metabolite bağlı olarak farklı elementleri absorbe ederler. Glikozitler için krom, mangan ve molibden; saponinler için vanadium ve molibden; alkaloidler için kobalt ve bakır elementlerine ihtiyaç duyarlar. Yükseklik ve siklonların hareketi sekonder metabolit salgılanmasına etki eden faktörler arasındadır. Örneğin; Kanarya otu (*Senecio platyphylloides*) 1600-2000 m aralığında en yüksek alkaloid değerine; Kore ginsengi (*Panax ginseng*) ise doğu ve batı kuşağında en yüksek

biyolojik aktif bileşenlerini üretir [19].

Bitki metabolizmasında fotosentezden başlayarak ilerleyen sekonder metabolit sentez yolları Şekil 1.4’de gösterilmiştir [19].



Şekil 1.4: Sekonder metabolitlerin genel sentez yolları.

1.4.1. Alkaloidler

Alkaloidler sekonder metabolitlerin en geniş grubu olarak belirtilen azot içeren bileşiklerdir. İlk olarak alkaloid terimini 1819 yılında Meissner kullanmıştır ve ilk alkaloid izolasyonu 1830 yılında yapılmıştır. Yaklaşık olarak 12.000 tanımlanmış alkaloid vardır. Güçlü farmakolojik özelliklere sahip olan bu bileşikler amino asitlerden türevlenir ve karbon, hidrojen, azot ve çoğunlukla oksijen içerirler. Renksizdirler ve kokuları yoktur. Tatları acıdır ve kristalize haldedirler. Oksijen

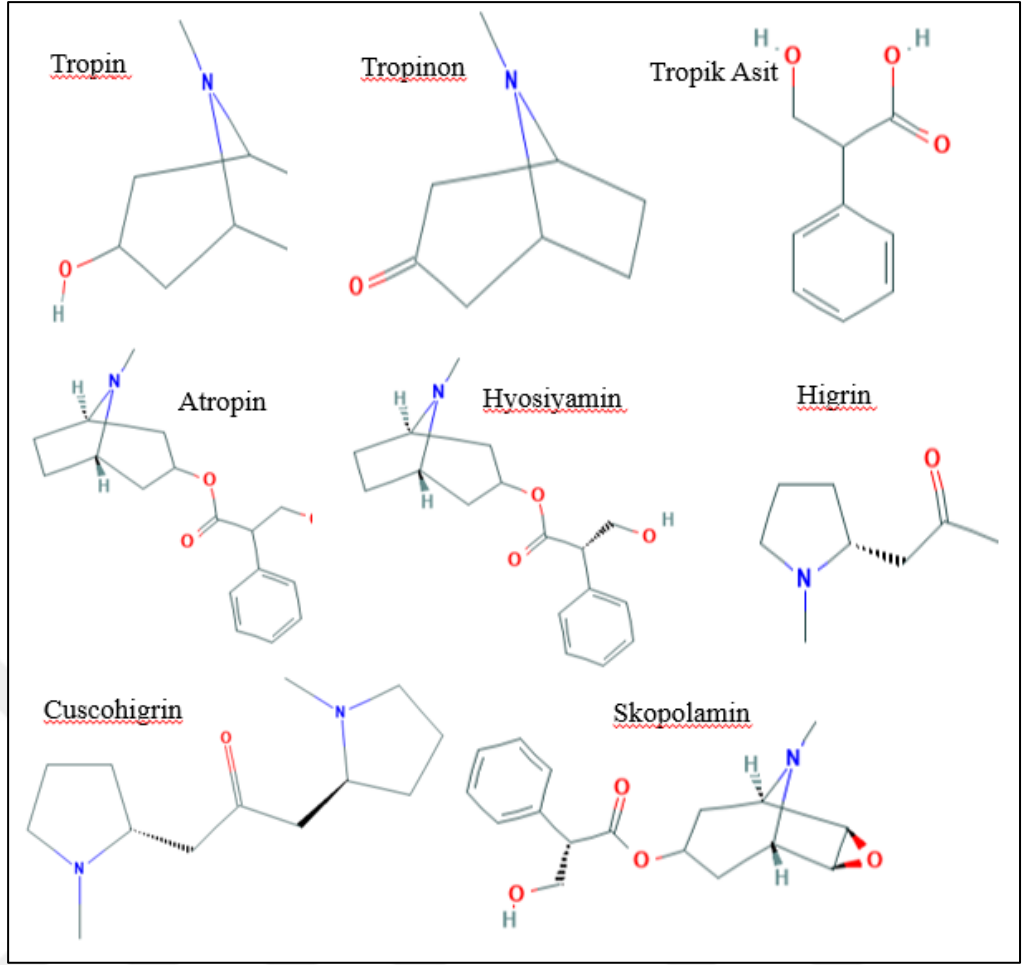
içermeyen alkaloidler uçucu sıvılar olup, oda sıcaklığında sıvı haldedir. Kendilerine has en belirgin özelliklerinden biri çok düşük derişimlerde bile acı tat vermeleridir. Alkaloidlerin geneli bitkisel olsa da hayvansal kaynaklı alkaloidler de mevcuttur.

Alkaloidler řu dört önemli özelliği taşımaktadır:

- Bitkisel kaynaklı olmalı
- Heterosiklik sistemde yerleşik azot atomu olmalı
- Bileşenin moleküler yapısı kompleks olmalı
- Önemli tıbbi etkilere sahip olmalı

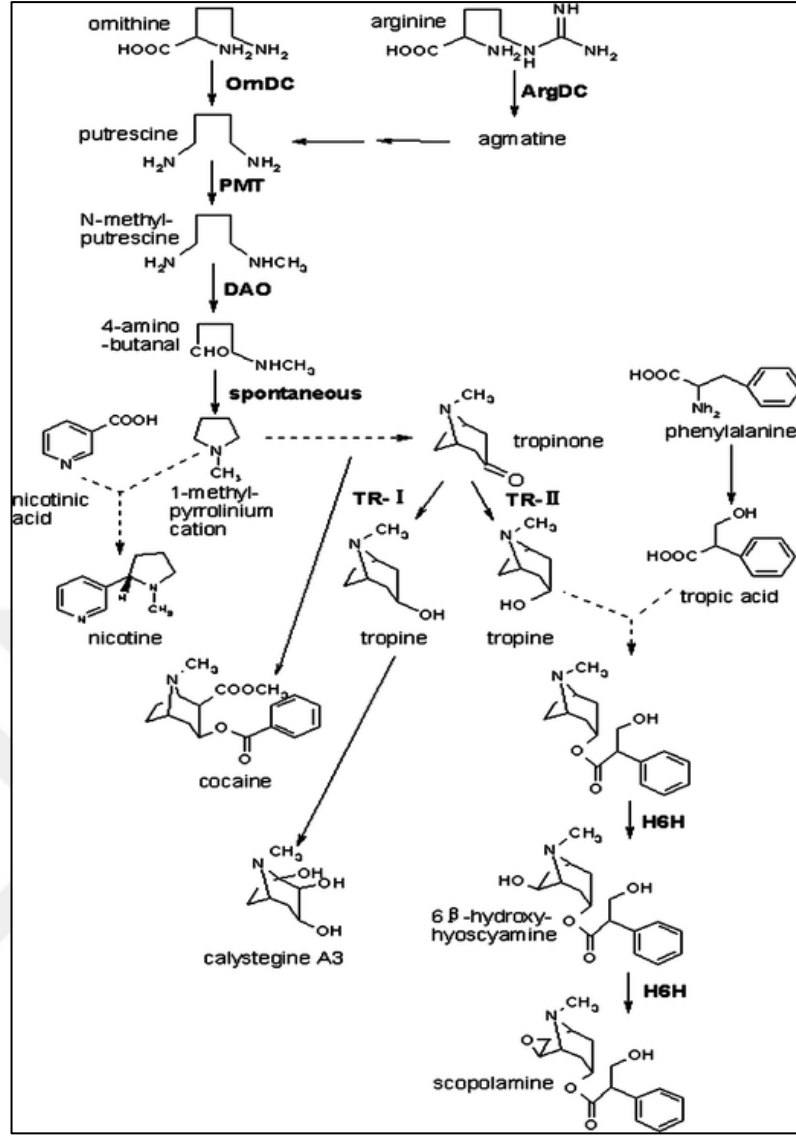
Alkaloidler için tanımlayıcı bir isim koyma tekniği sonuna ‘in’ eki getirmektir. Genellikle bulunduğu bitkinin cins veya tür adından esinlenerek isim konulurken, etken maddenin gösterdiği farmakolojik etkilerden veya araştırmacının isminden esinlenerek belirlenir. Örneğin; *Atropa* (Güzelvrat Otu)-*atropin*, *Cinchona*-*kinin*, *Hyoscyamus niger* (Banotu)-*hyosiyamin*, *Berberis vulgaris*-*berberin*, *Papaver-papaverin* gibi isimden yola çıkarak adlandırılan alkaloidler vardır. Asimetrik karbon atomuna sahip oldukları için optikçe aktif özelliğe sahiptirler. Yapılarındaki azot atomu ya lateral zincirde ya da heterosiklik halkada yer alır. Zayıf bazik özellik gösteren alkaloidler baz halinde suda çözünmez. Apolar organik çözücülerde iyi çözünürler. Alkaloidlerin hem apolar çözücü hem de suda çözünebilenleri vardır. Kafein ve ergometrin gibi alkaloidler su içerisinde de çözünen alkaloidlere birer örnektir [19].

Başlıca tropan alkaloidleri moleküler yapılarıyla Şekil 1.4.1.a’da gösterilmiştir [22].



Şekil 1.4.1.a: Tropan alkaloidlerinden bazılarının moleküler yapısı.

Tropan alkaloidlerinin biyosentez yolu Şekil 1.4.1.b’de gösterilmiştir [23].



Şekil 1.4.1.b: Tropan alkaloidlerinin biyosentez yolları.

Alkaloidlerin bitki dokularında dağılımı farklı oranlardadır. Kök, gövde, rizom, yaprak, çiçek, meyve ve tohumlarda bulunma oranları farklıdır. Örneğin; Tütün (*Nicotiana tabacum*), Melek borusu (*Datura stramonium*) ve Banotu (*Hyoscyamus niger*) türlerinde yapraklarda; Haşhaş (*Papaver somniferum*) ve Echinops sp. türlerinde meyve ve tohumlarda; Kınakına (*Cichona officinalis*) bitkisinin gövdesinde; Güzelavrat otu (*Atropa belladonna*) ve *Veratrum album* türlerinde rizom ve köklerde diğer dokulara oranla daha fazla bulunur [19].

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki Materyali

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan *H. niger* tohumları Doç. Dr. Tijen TALAS OĞRAŞ tarafından Kahramanmaraş'ın Afşin ilçesi bölgesinden temin edilmiştir. TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nda sterilizasyon işlemlerinden geçirilip, *in vitro* koşullarda çimlendirildi. Çalışmada kullanılan kökler ortalama 1 aylık bitkilerden elde edildi.

2.1.2. Kullanılan Malzemeler

Tohum sterilizasyonu aşamasında otoklavlanarak steril edilmiş distile su ve diğer kimyasallar kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar Tablo 2.1.2.a'da gösterilmiştir.

Tablo 2.1.2.a: Tohum sterilizasyonunda kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Etil alkol	ISOLAB	920.026.2500
Hidrojen peroksit	MERCK	1072091000
Sodyum hipoklorit	Domestos	0001593-(Ticari)
Tween 20	MERCK	822184

Kök kültürü ve çimlendirme aşamasında kullanılan besin ortamı, büyüme

düzenleyiciler, organik bileşenler, katılaştırıcı ajanlar ve karbon kaynağı olarak kullanılan bileşenler Tablo 2.1.2.b’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1.2.b: Doku kültüründe kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Sukroz	Duchefa	S0809.5000
Glisin	SIGMA	G5417
Nikotinik asit	SIGMA	N4126
Tiamin HCl	SIGMA	T1270
Piridoksin HCl	SIGMA	P6280
Myo-inositol	SIGMA	I5125
Agar	Duchefa	P1001.5000
IBA (İndol Butirik Asit)	SIGMA	57310
MS besin ortamı	Caisson	MSP01

H. niger bitkisinden tropan alkaloidlerinin ekstraksiyonu ve analizlerinde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler Tablo 2.1.2.c’de detaylı olarak gösterilmiştir.

Tablo 2.1.2.c: Tropan alkaloidleri ekstraksiyonunda kullanılan malzemeler.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Bizmut nitrat	SIGMA	10035-06-0
Asetik asit	ISOLAB	901.013.2500
Potasyum iyodür	Merck	1050510100
Kloroform	Merck	1.02444.2500
Metanol	ISOLAB	947.047.2501
Amonyum hidroksit	ISOLAB	903.016.2500
Sülfürik asit	ISOLAB	970.023.2500
Sodyum sülfat	ISOLAB	969.146.1000
pH kağıdı	ISOLAB	101.02.001.100
TLC silikajel plaka 60 F ₂₅₄	MERCK	1.05554.0001
<i>Atropin</i>	SIGMA	A0132-5

İnce tabaka kromatografisinden sonra tropan alkaloidlerin tespiti için kullanılan Dragendorf çözeltisini hazırlamak için A ve B stok çözeltileri hazırlandı;

- A çözeltisi: 0,8 g bizmut nitrat 10 ml glasiyal asetik asit içerisinde çözülüp distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.
- B çözeltisi: 20 g potasyum iyodür 50 ml distile su ile çözüldü.
- A ve B çözeltilerinden 1:1 oranında alınarak toplamda 10 ml Dragendorf çözeltisi elde edildi.
- Elde edilen Dragendorf çözeltisi alkaloid tespitinde kullanılmak amacıyla

karanlık ortamda saklandı [24].

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar boyunca besin ortamı hazırlığında, çimlendirmede, kök kültüründe, ve ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan tüm cihazlar, model ve markaları ile Tablo 2.1.3’de gösterildi.

Tablo 2.1.3:Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihazın Modeli	Firma
Hassas terazi	CPA 1003S	Sartorius
Hassas terazi	GR-202	AND
Otoklav	DX-150	Systec
Çalkalamalı inkübatör	AG CH-4103	INFORS HT
Etüv	EN 500	Nüve
İklim odası	PG34-3	DigiTech
pH metre	PH211	HANNA
Manyetik karıştırıcı	F20520162	VELP SCIENTIFICA
Sterilizatör	SL-250	ALC
UV lambası	D-63450	Kendro
Mikrobiyolojik korumalı kabin	Heraeus	HERA Safe
Buzdolabı (4°C)	4264 N	Arçelik

Tablo 2.1.3. Devam.

Derin dondurucu (-20°C)	CV 135	PHILCO
Buz makinesi	F 125 Compact	İNOKSAN
Mikrodalga fırın	MD 582	Arçelik
Otomatik pipet	34566975	Eppendorf Research
Otomatik pipet	4222829	Eppendorf Research
Ultrasonik su banyosu	8891	Cole-Parmer
Rotary evaporatör	I-300 Pro	BUCHI Interface
UV lamba cihazı	CAMAG	254-250
HPLC cihazı	LC-20A	Shimadzu

2.2. YÖNTEM

2.2.1. *H. niger* Tohum Sterilizasyonu

H.niger tohumlarının çimlenme oranları düşüktür. Çimlenmenin gerçekleşmediği durumlarda dormansinin kırılarak ve çimlenme yüzdesinin artırılabilmesi için 48 saatlik 250 mg/L giberellik asit (GA₃) uygulaması, %1'lik sülfürik asit (H₂SO₄) içerisinde 5 dakika bekletme, 0,01 M potasyumnitrat (KNO₃) uygulaması, +4°C'de 2 ay bekletme, musluk suyunda bekletme ve sıcak suda 30 dakika bekletme gibi uygulamalar yapıldı [25] [26] [27].

Sterilizasyon için öncelikli olarak çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Bu yöntemlerde farklı oranlarda kimyasallar ve uygulama süreleri denenmiştir. Yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasallar, oranlar ve süreler Tablo 2.2.1'de gösterildi.

Tablo 2.2.1: Sterilizasyon aşamasında uygulanan yöntemler.

Yöntemler	Konsantrasyon-Kimyasal-Uygulama Süresi
1.Yöntem	• %70 EtOH (2dk) • %10 Domestos+Tween 20 (20 dk)
2.Yöntem	• %70 EtOH (2dk) • %10 Domestos+Tween 20 (30 dk)
3.Yöntem	• %70 EtOH (2dk) • %15 Domestos+Tween 20 (20 dk)
4.Yöntem	• %70 EtOH (2dk) • %20 Domestos+Tween 20 (15 dk)
5.Yöntem	• %70 EtOH (2dk) • %25 Domestos+Tween 20 (10 dk)
6.Yöntem	• %70 EtOH (2dk) • %50 Domestos+Tween 20 (20 dk)
7.Yöntem	• %70 EtOH (2dk) • %20 Domestos+Tween 20 (20 dk)
8.Yöntem	• %70 EtOH (2dk) • %15 H₂O₂ (2 dk) • %20 Domestos+Tween 20 (10 dk)
9.Yöntem	• Zımpara (5 dk) • %70 EtOH (2dk) • %15 H₂O₂ (2 dk) • %20 Domestos+Tween 20 (10 dk)

Uygulanan yöntemler içerisinde kontaminasyon oranı en düşük olan ve

çimlenme süresi en kısa olan 9. yöntem ile çalışmaya devam edildi.

Banotu tohum sterilizasyonu;

- Tohumlar geniş bir kap içerisinde zımpara kağıdı (Atlas Brand, P180C) ile 5 dakika zımparalandı.
- %70'lik etil alkol ile 2 dakika çalkalanarak muamele edildi.
- Steril distile su ile 2 dk durulandı.
- %15'lik hidrojen peroksit ile 2 dakika çalkalandı.
- Yeniden steril distile su ile yıkanan tohumlar Tween 20 eklenmiş %20'lik ticari çamaşır suyu Domestos (%4,6 Sodyumhipoklorit) ile 10 dakika muamele edildi [28].
- Son aşamada 3 defa steril distile su ile yıkandı.
- Sterilizasyon işlemi tamamlanan tohumlar kurutulmak amacıyla steril filtre kağıdı üzerine alındı.
- Laminar akımlı steril kabin ortamında ortalama 30 dakika kurutuldu [29].

2.2.2. *H. niger* Tohumlarının Çimlendirilmesi

Çalışma kapsamında kullanılan tüm bitki tohumları MS0 ortamında çimlendirildi. Kullanılan MS0 besin ortamı hazırlığı aşağıda anlatılmıştır.

MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı (Tablo 2.2.2) hazırlığı;

- Vitaminleri ve mikro-makro elementlerini içeren karışım (4,4 g/L) ve sükroz (30 g/L) distile su içerisinde çözüldü.
- Çözelti pH metre yardımıyla pH 5,7-5,8 aralığına ayarlandı.
- %0,6 (w/v) agar ilave edildi.
- Otoklav cihazında 121°C sıcaklıkta 20 dk boyunca steril edildi.
- Steril MS besin ortamı, steril petri tabakları ve magenta kaplarına dökülüp kabin ortamında katılaştırıldı.

Tohumların çimlendirildiği ve kök kültürünün kurulduğu MS besin ortamının

kimyasal içeriği ve miktarları detaylı olarak Tablo 2.2.2’de verilmiştir

Tablo 2.2.2: Çimlendirmede kullanılan MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamı içeriği.

Makro Elementler	mg/L
CaCl ₂	332,02
KH ₂ PO ₄	170.00
KNO ₃	1900.00
MgSO ₄	180.54
NH ₄ NO ₃	1650,00
Mikro Elementler	mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60

Tablo 2.2.2.Devam.

Organik Bileşenler	mg/L
Glisin	2,00
Myo-inositol	100,00
Nikotinik asit	0,50
Pridoksin-HCl	0,50
Tiamin-HCl	0,10
Sükroz	30.000
Plant Agar	6.000

Steril edilmiş tohumlar mikrobiyolojik korumalı kabin ortamında alevden geçirilerek steril edilmiş pens yardımıyla MS0 besin ortamı içeren magenta kaplarına ve petrilere aktarıldı. Fotoperiyot (16 saat karanlık / 8 saat aydınlık, 2000-3000 lux) günışığı floresan lamba ışığında, 25°C sıcaklıkta bitki büyütme kabininde inkübasyona bırakıldı. 15 gün sonunda çimlenen ve çimlenmeyen tohumların toplam sayısı alınarak çimlenme yüzdesi;

$$\text{Denklem 1: } (\text{Çimlenen Tohum Sayısı} / \text{Toplam Tohum Sayısı}) \times 100$$

formülü ile hesaplandı.

Çimlenme öncesi ve sonrası Şekil 2.2.2.a'da gösterildi. Çimlenme sonrasında gelişen bitkilerin besin ortamı içeren tüplere alınıp kültürlenmesi Şekil 2.2.2.b'de gösterildi.



Şekil 2.2.2.a: *H. niger* tohumlarının çimlenme öncesi (solda) ve çimlendikten sonra 1 aylık (sağda) görüntüleri.



Şekil 2.2.2.b: Çimlenme sonrası cam tüplere aktarılan *H. niger* bitkileri.

2.2.3. Kök Kùltürlerinin Kurulması

H. niger kök kùltürü; pH, büyüme düzenleyici (İndol bütirik asit) ve sıvı besin ortamı ($\frac{1}{2}$ MS ve MS) etmenlerinin farklı kullanımlarına bağılı olarak yapıldı. Her besin ortamı ve kontrol grupları için 2 tekerrür kullanıldı. Değışen etmenler olarak pH:5,8 ve pH:6,5; 0,1 mg/L IBA ve MS0; $\frac{1}{2}$ MS ve tam MS kullanıldı.

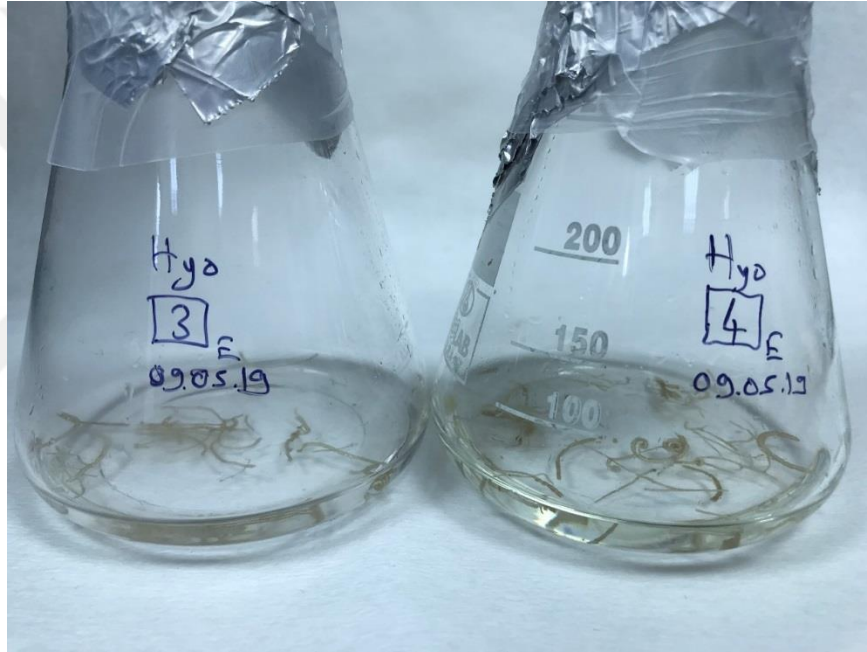
Çalışmada 250 ml hacimli otoklavlanarak steril edilmiş erlenler kullanıldı. Her erlen için 30 ml steril sıvı besin ortamı eklendi. Çalışma grupları 1-8 arası numaralar verilerek kodlandı. Çalışma kapsamında kullanılan besin ortamları, kodlamalar, büyüme düzenleyiciler ve pH durumları Tablo 2.2.3’de detaylı olarak gösterildi.

Tablo 2.2.3: Çalışma gruplarında kullanılan besin ortamı, pH ve büyüme düzenleyiciler.

Grup Adı	Besin ortamı	Büyüme Düzenleyiciler	pH
1	$\frac{1}{2}$ MS	Kontrol	5,8
2	$\frac{1}{2}$ MS	Kontrol	6,5
3	$\frac{1}{2}$ MS	0,1 mg/L IBA	5,8
4	$\frac{1}{2}$ MS	0,1 mg/L IBA	6,5
5	MS	Kontrol	5,8
6	MS	Kontrol	6,5
7	MS	0,1 mg/L IBA	5,8
8	MS	0,1 mg/L IBA	6,5

Çimlenen tohumlardan elde edilen bitkiler ortalama 1 aylık aşamaya geldiklerinde kökleri steril kabin içinde agarlı besin ortamı parçalarından temizlenerek pens yardımıyla steril distile su bulunan beher içine alındı.

- Besin ortamı parçalarından tamamen arındırılıp steril petri tabağı içinde 2 cm uzunluklarda kesildi.
- Her deney grubu için hassas terazide 2 cm uzunlukta ve 0,25 gram ağırlıklarda hazırlanan Banotu kökleri besin ortamı ve büyüme düzenleyici içeren steril ortamlara aktarıldı. Steril kalması amacıyla parafilm ile kapatıldı.



Şekil 2.2.3: Kurulan kök kültürü erlenlerinden örnek iki tanesi.

- Hazırlanan çalışma grubu erlenleri çalkalamalı inkübatörde kültürlendi.
- İnkübatör içerisi 25°C karanlık ve dönme hızı 100 rpm olarak ayarlandı.

21 günlük inkübasyon sonrasında kökler fotoğraflanıp, filtre kağıdında süzülerek besin ortamından çıkarıldı. Son (yaş) ağırlıkları hassas terazide tartıldı. Etüvde 40°C sıcaklıkta 48 saat kurutuldu. Kuru ağırlıkları da tartılan kökler gruplarına göre pakettendi.

Elde edilen veriler (ilk ağırlık ve son ağırlık) kullanılarak köklerin büyüme yüzdesi hesaplandı. Yüzde oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Denklem 2: } [(\text{Son ağırlık} - \text{İlk Ağırlık}) / \text{ilk Ağırlık}] \times 100]$$

Çalışma 3 defa aynı şartlarda tekrarlandı. Çalışmanın tüm tekrarlarının ortalaması alınarak Tablo 3.2 ve Şekil 3.2’de gösterildi.

2.2.4. Sekonder Metabolit Ekstraksiyonları

Bu tez çalışmasında literatürde yer alan çalışmalardan örnek alınarak farklı çözücü oranları ve farklı bekleme zamanları denendi. Çalışma protokollerinin ilk aşamasında kullanılan çözücü ve bekleme süresi haricindeki tüm aşamaları aynı şekilde uygulandı. Kloroform:metanol:amonyumhidroksit (15:5:1) karışımı, metanol: amonyumhidroksit:kloroform (15:5:1) karışımı ve sadece metanol kullanılarak 1 saat, 24 saat ve 12 günlük ekstraksiyon denemeleri yapıldı [30][16].

Elde edilen değerlere göre en yüksek ekstre ağırlığı kloroform:metanol: amonyumhidroksit (15:5:1) karışımıyla yapılan çalışmada görüldü. İnce Tabaka Kromatografisi yapıldığında ise metanol : amonyumhidroksit : kloroform (15:5:1) ile uygulanan ekstraksiyon örnekleri diğer çalışmalardan daha iyi sonuç verdi. Çalışmanın ekstraksiyon aşaması kloroform:metanol:amonyumhidroksit (15:5:1) ve metanol: amonyumhidroksit:kloroform (15:5:1) içeren iki karışım ile yapıldı.

2.2.5. *H. niger* Köklerinden Alkaloid Ekstraksiyonu

H. niger köklerinden alkaloid ekstraksiyonu yapmak için kloroform (CHCl_3), metanol (MeOH) ve amonyumhidroksit (NH_4OH_2) karışımı hazırlandı. Kök ekstraksiyonu için iki farklı ekstraksiyon karışımı kullanıldı: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}_2$ (15:5:1) ve $\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}_2:\text{CHCl}_3$ (15:5:1). Çalışma kapsamında elde edilen kurutulmuş kökler havan içinde sıvı azot eklenerek toz haline getirildi. Alınan 200 mg toz haldeki kökler hassas terazide tartılarak ayrı ayrı beherlere alındı. Her örnek için

uygulanan 1. protokol şu şekildedir:

- 200 mg kök materyali üzerine 20 ml CHCl_3 : MeOH : NH_4OH_2 (15:5:1) karışımı eklendi.
- Elde edilen bu karışım 10 dakika sonikasyon yapıldı.
- 1 saat karanlık ortamda bekletilen karışım tekrar 10 dakika sonikasyon yapıldı.
- Pamuk ile kapatılmış hunide süzülerek 100 ml'lik cam balona alındı.
- Sıcaklığı 42°C ve dönme hızı 30 rpm olarak ayarlanan rotary evaporatör cihazına ekstre karışımı bulunan balon takıldı. Basıncı kademeli olarak düşürülmesiyle çözücüler uzaklaştırıldı.
- Cam balon içerisine 10 ml kloroform ve 4 ml 1 N sülfürik asit eklendi.
- Ayırma hunisine alınıp alt faz (koyu renkli) cam balona alındı.
- Cam balona alınan karışım %25'lik NH_4OH_2 ile pH: 10'a ayarlandı.

Not: Bu aşamada ekzotermik asit-baz reaksiyonundan ötürü yüksek ısı açığa çıkar ve patlama yapabilir. Çalışmanın bu kısmında %25'lik NH_4OH_2 pastör pipeti ile yavaşça damlatılmalı ve bu işlem buz içinde çeker ocakta yapılmalıdır.

- Karışım ayırma hunisine alınıp 1 defa 4 ml ve 2 defa 2 ml CHCl_3 ile ekstraksiyon yapıldı.
- Alt faz (kloroformlu) yeni bir behere alınıp 1 ml kloroform eklendi.
- 1-2 gram Na_2SO_4 eklendi ve spatül ile iyice karıştırıldı.
- Süzgeç kağıdı ile süzülüp evaporasyon yapıldı.
- Elde edilen ekstre 1 ml kloroform ile çözülüp daralı viyale alındı.
- Rotary evaporatörde çözücüler uçuruldu ve hassas terazide ağırlığı alındı.
- Toplam ağırlıktan viyal darası çıkarılarak ekstre ağırlığı hesaplandı.

Her örnek için uygulanan 2. Protokol ise şu şekildedir:

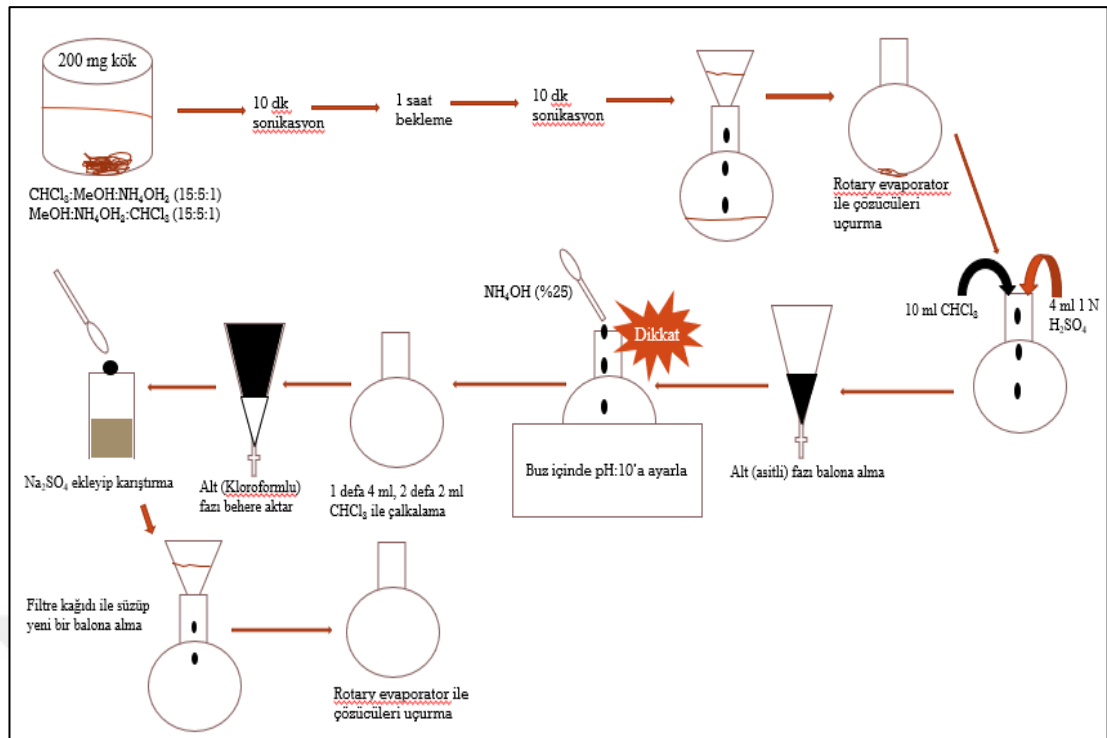
- 200 mg kök materyali üzerine 20 ml $\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}_2:\text{CHCl}_3$ (15:5:1) karışımı eklendi.
- Elde edilen bu karışım 10 dakika sonikasyon yapıldı.
- 1 saat karanlık ortamda bekletilen karışım tekrar 10 dakika sonikasyon yapıldı.
- Pamuk ile kapatılmış hunide süzülerek 100'lik cam balona alındı.

- Sıcaklığı 42°C ve dönme hızı 30 rpm olarak ayarlanan rotary evaporatör cihazına ekstre karışımı bulunan balon takıldı. Basıncı kademeli olarak düşürülmesiyle çözücüler uzaklaştırıldı.
- Cam balon içerisine 10 ml kloroform ve 4 ml 1 N sülfürik asit eklendi.
- Ayırma hunisine alınıp alt faz (koyu renkli) cam balona alındı.
- Cam balona alınan karışım %25'lik NH_4OH_2 ile pH: 10'a ayarlandı.

Not: Bu aşamada ekzotermik asit-baz reaksiyonundan ötürü yüksek ısı açığa çıkar ve patlama yapabilir. Çalışmanın bu kısmında %25'lik NH_4OH_2 pastör pipeti ile yavaşça damlatılmalı ve bu işlem buz içinde çeker ocakta yapılmalıdır.

- Karışım ayırma hunisine alınıp 1 defa 4 ml ve 2 defa 2 ml CHCl_3 ile ekstraksiyon yapıldı.
- Alt faz (kloroformlu) yeni bir behere alınıp 1 ml kloroform eklendi.
- 1-2 gram Na_2SO_4 eklendi ve üzerindeki yağlı kısımlar ile kirliliklerin çökmesi için spatül ile iyice karıştırıldı.
- Süzgeç kağıdı ile süzülüp evaporasyon yapıldı.
- Elde edilen ekstre 1 ml kloroform ile çözülüp daralı viyale alındı.
- Rotary evaporatörde çözücüler uçuruldu ve hassas terazide ağırlığı alındı.
- Toplam ağırlıktan viyal darası çıkarılarak ekstre ağırlığı hesaplandı.

1. ve 2. protokolün uygulama şekli Şekil 2.2.5'de gösterildi.



İki çalışma arasındaki tek fark çözücü oranlarının farklı olmasıdır. Uygulanan yöntemler tamamen aynıdır.

Elde edilen ekstreler ince tabaka kromatografisi ve HPLC analizlerinde kullanılmak üzere 4°C buzdolabında, karanlıkta saklandı.

2.2.6. Tropan Alkaloidlerinin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Tespit Edilmesi

İnce tabaka kromatografisi için öncelikli olarak yürütme tankı içerisine 5:4:1 oranında kloroform : aseton : amonyum-MeOH (3:17) karışımını ekleyip 30 dakika tankın çözücü ile doyması sağlandı.

- Silika jel plaka (60 F₂₅₄, MERCK) alt kısmından 1 cm yükseklikte kurşun kalem ile yatay çizgi çekilip, 1 cm arayla alkaloid standartları (*tropin*, *atropin*, *tropik asit*) ve örneklerin kısaltmaları yazıldı.

- Kloroform ekstreleri 0,5 ml kloroform ile çözüldü.
- Her örnek için silika jel plakada belirlenen noktalara kapiler tüp yardımıyla 3 damla eklendi.
- Silika jel plaka yürütme tankına düzgün bir şekilde yerleştirildi.
- Ortalama 60-90 dk içinde mobil fazın (çözücü) yeterince ilerlemesi sağlandı.
- Tankın içinden alınan silikajel plaka 20 dk çeker ocak altında kurutuldu.
- UV görüntüleme cihazında 254 nm ve 366 nm dalga boyunda görüntüleri alındı.
- Çeker ocakta bir kap içinde silika jel plaka üzerine Dragendorf çözeltisi püskürtülerek tropan alkaloidlerinin tespiti yapıldı.

2.2.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile *Atropin* Analizi

H. niger köklerinden elde edilen kloroform ekstrelerinin tüm fraksiyonları *atropin* standardı kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile ayrıldı. Dragendorf çözeltisi ile turuncu renk verecek şekilde kontrol edilen ekstreler *atropin* standardı referans alınarak HPLC cihazı ile analiz edildi.

Numune Hazırlama:

Hassas terazide tartılan 3,0 mg *atropin* ekstraktı ve 25 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Metanol ile çözülüp, tampon çözeltisi ile hacmi tamamlandı. Elle çalkalanarak çözüldü. 0,45 µm PTFE filtre ile süzüldü. Viale alındı ve enjeksiyon yapıldı.

Daralı viyallerde saklanan kloroform ekstreleri metanol ile çözüldü. 0,45 µm PTFE filtre ile süzüldü. Yeniden viyale alındı ve enjeksiyon yapıldı.

Tablo 2.2.7: HPLC analizinde kullanılan cihaz ve kimyasal bilgileri.

Cihaz	HPLC Shimadzu
Dedektör	UV-VIS, DAD
Kolon	Zorbax Extend C18, 100x4,6 mm, 3,6 µm
Dalga Boyu	210 nm
Akış Hızı	1,0 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	10 µl
Analiz Süresi	5 dk
Kolon Sıcaklığı	40 °C
Alıkonma Zamanı	~2,0 dk
Mobil Faz	%82 A, %18 B

Mobil faz olarak kullanılan çözelti %82 A ve %18 B çözücüsünden oluşmaktadır. A çözücüsünün hazırlanışı ve B çözücüsünün içeriği ise şu şekildedir;

A: 7 g potasyum dihidrojen fosfat 606 ml su eklenerek çözüldü. İçine 3,5 g sodyum dodesil sülfat eklendi ve seyreltik fosforik asit çözeltisi ile pH 3,50' ye ayarlandı. 320 ml asetonytril eklendi, süzüldü ve degaze edildi.

B: Asetonytril

3. BULGULAR

3.1. *H. niger* Tohum Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi

Sterilizasyon aşamasında tohumlara uygulanan yöntemler sırasıyla ele alınıp sonuçları Tablo 3.1’de yazıldı. Çimlenmeye başlama günleri belirtilen Tablo 3.1’de yöntemlerin çimlenme hızına olan etkisi gösterilmiş oldu.

Tablo 3.1: Tohum sterilizasyonu aşamasında çalışma kapsamında uygulanan yöntemler ve sonuçları.

Yöntemler	Sonuç
1.Yöntem %70 EtOH (2dk) %10 Domestos+Tween 20 (20 dk)	Kontaminasyon oranı: %100
2.Yöntem %70 EtOH (2dk) %10 Domestos+Tween 20 (30 dk)	Kontaminasyon oranı: %100
3.Yöntem %70 EtOH (2dk) %15 Domestos+Tween 20 (20 dk)	Kontaminasyon oranı: %100
4.Yöntem %70 EtOH (2dk) %20 Domestos+Tween 20 (15 dk)	Kontaminasyon oranı: %100

Tablo 3.1.Devam.

5.Yöntem %70 EtOH (2dk) %25 Domestos+Tween 20 (10 dk)	Kontaminasyon oranı: %100
6.Yöntem %70 EtOH (2dk) %50 Domestos+Tween 20 (20 dk)	Çimlenme oranı: % 0 Kontaminasyon oranı: % 0
7.Yöntem %70 EtOH (2dk) %20 Domestos+Tween 20 (20 dk)	- Çimlenme süresi: 22 gün - Kontaminasyon oranı: %40 Çimlenme Yüzdesi: %76
8.Yöntem %70 EtOH (2dk) %15 H ₂ O ₂ (2 dk) %20 Domestos+Tween 20 (10 dk)	- Çimlenme süresi: 9 gün - Kontaminasyon oranı: % 0 Çimlenme Yüzdesi %82
9.Yöntem Zımpara (5 dk) %70 EtOH (2dk) %15 H ₂ O ₂ (2 dk) %20 Domestos+Tween 20 (10 dk)	- Çimlenme Süresi: 2 gün - Kontaminasyon oranı: % 0 Çimlenme yüzdesi : %92

8. ve 9. yönteme göre yapılan sterilizasyon denemesinde kontaminasyon görülmedi. 9. yöntemde tohumlar ilk 48 saat içinde çimlenmeye başladı. 1 hafta sonunda 3 adet magenta kabına ekim yapılan 570 adet tohumdan 527'sinin çimlendiği görüldü. Yüzde hesaplama formülüne göre tohumların %92 oranında çimlendiği hesaplandı.

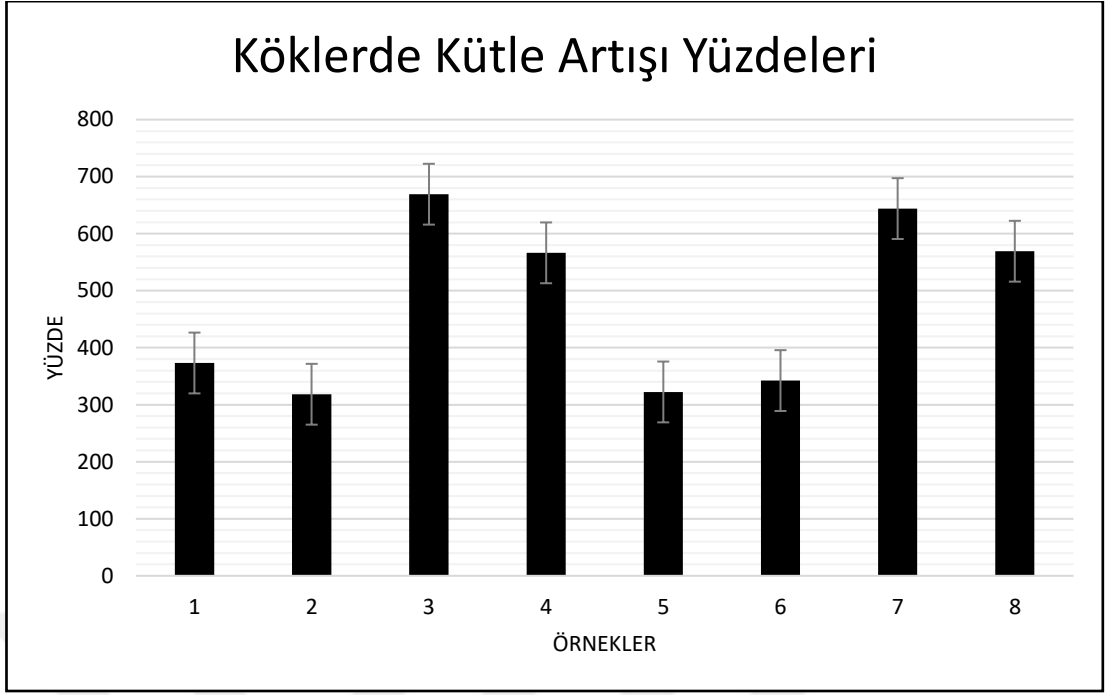
3.2. *H. niger* Kök Kültürü

Kök kültürlerinin 3 hafta büyümesinden sonra yaş/son ağırlıkları alındı. Kütle artışı Tablo 3.2.a’da gösterildi.

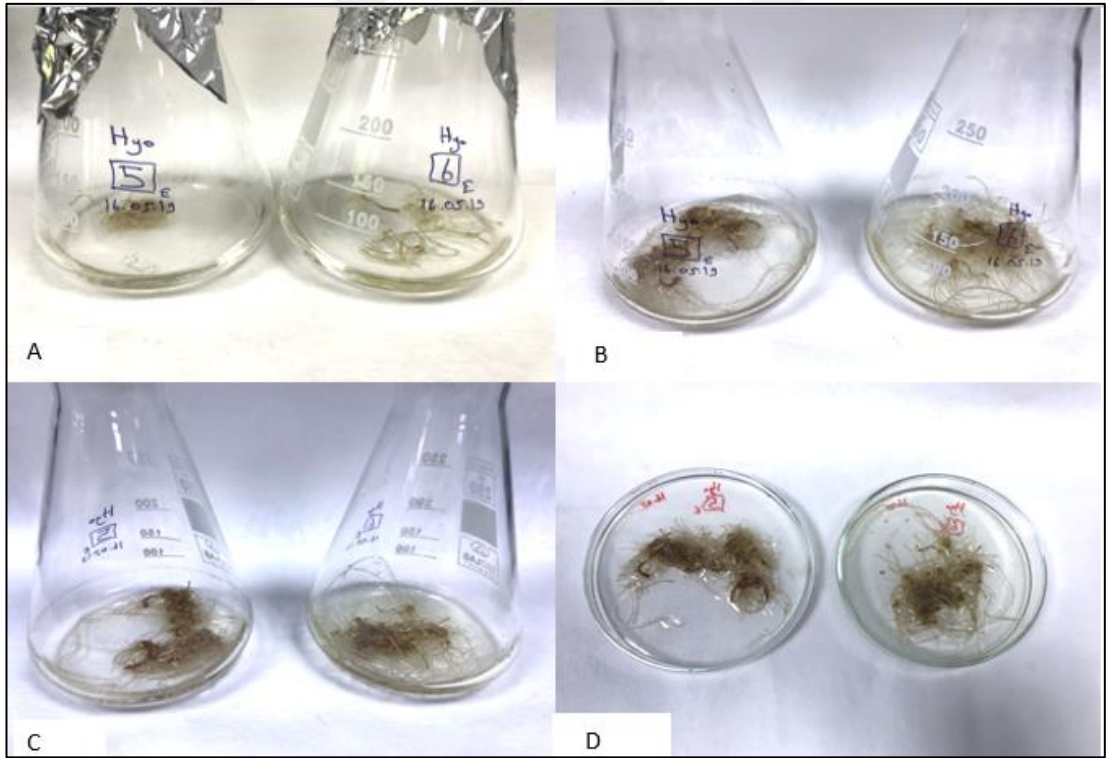
Tablo 3.2.a: 21 günlük çalışma sonrası köklerin yaş ağırlıkları.

Grup Kodu	İlk Ağırlık (g)	Yaş/Son Ağırlık (g)
1-(1/2 MS, pH:5,8, Kontrol)	0,25	1,183
2-(1/2 MS, pH:6,5, Kontrol)	0,25	1,046
3-(1/2 MS, pH:5,8, 0,1 mg/L IBA)	0,25	1,923
4-(1/2 MS, pH:6,5, 0,1 mg/LIBA)	0,25	1,666
5-(MS, pH:5,8, Kontrol)	0,25	1,076
6-(MS, pH:6,5, Kontrol)	0,25	1,106
7-(MS, pH:5,8, 0,1 mg/L IBA)	0,25	1,860
8-(MS, pH:6,5, 0,1 mg/L IBA)	0,25	1,673

Büyüme yüzdesi formülüne göre kütle artış yüzdesi hesaplandı. Kök kültürlerinin kütle artış yüzdeleri grafik olarak Şekil 3.2.a’ da gösterildi. Kök kültürlerinin başlangıç ve son durumları fotoğraflanarak Şekil 3.2.b’ de gösterildi.



Şekil 3.2.a: *H. niger* kök kültürlerinin kütle artışı yüzdeleri



Şekil: 3.2.b: Kök kültürlerinin 1. günü (A), 21. Günü (B ve C) ve kurutma öncesi fotoğrafları (D).

Her grup için kuru ağırlık ortalamaları ve dokuların su yüzdesi hesaplanarak Tablo 3.2.b’de verildi.

Tablo 3.2.b: Köklerin kuru ağırlık ortalamaları ve su oranı.

Grup Kodu	Kuru Ağırlık (g)	Su Oranı(%)
1-(1/2 MS, pH:5,8, Kontrol)	0,096	75,5
2-(1/2 MS, pH:6,5, Kontrol)	0,106	69,4
3-(1/2 MS, pH:5,8, 0,1 mg/L IBA)	0,140	78,2
4-(1/2 MS, pH:6,5, 0,1 mg/L IBA)	0,143	78,2
5-(MS, pH:5,8, Kontrol)	0,126	79,5
6-(MS, pH:6,5, Kontrol)	0,116	68,4
7-(MS, pH:5,8, 0,1 mg/L IBA)	0,190	69,4
8-(MS, pH:6,5, 0,1 mg/L IBA)	0,183	67,1

3.3. *H. niger* Köklerinden Alkaloid Ekstraksiyonu

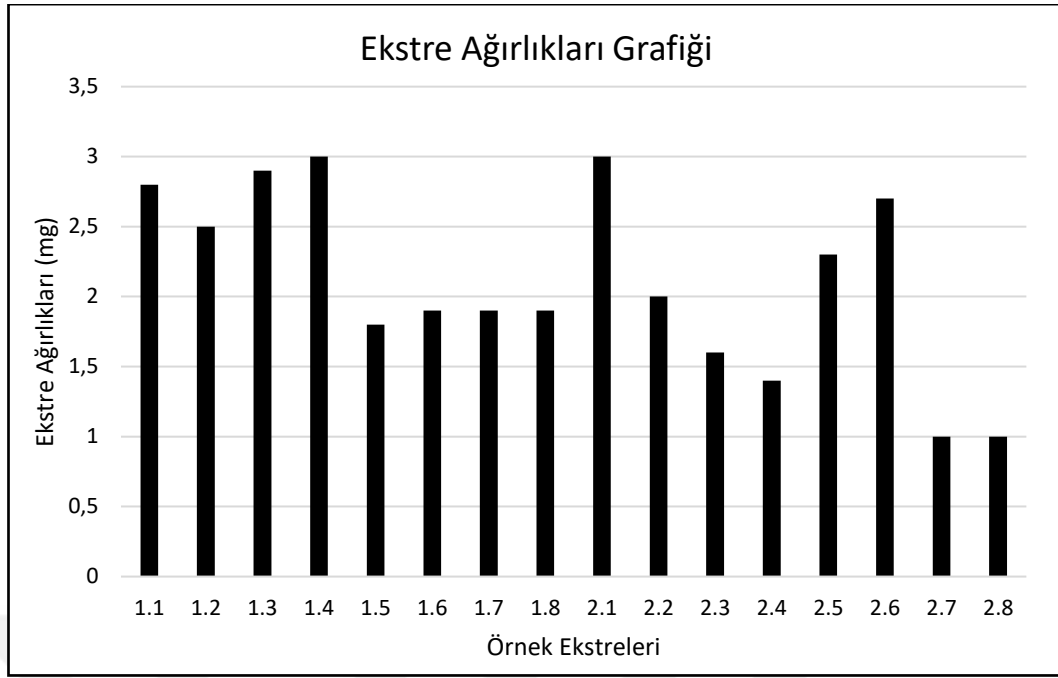
Kamada ve arkadaşları tarafından geliştirilen ekstraksiyon protokolü 1. protokol olarak uygulandı [16]. Uygulanan bu protokole göre, ½ MS besin ortamında büyüyen köklerden MS besin ortamında büyüyen köklere oranla daha fazla kloroform ekstresi elde edildi. 1. protokol (1.1, 1.2 vb. şeklinde kodlanmıştır) ile elde edilen ekstre ağırlıkları Tablo 3.3’de gösterildi.

Bahmanzadegan ve arkadaşları tarafından geliştirilen ekstraksiyon yöntemi ise 2. protokol (2.1, 2.2 şeklinde kodlanmıştır) olarak uygulandı [30]. Bu çalışma sonucunda ise büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS ve MS ortamlarında büyüyen

köklerden elde edilen kloroform ekstre miktarları, büyüme düzenleyicisi içeren ortamların kloroform ekstresi miktarlarından daha yüksek sonuç verdi. 2. protokol ile elde edilen ekstre ağırlıkları da Tablo 3.3’de gösterildi. 1. ve 2. protokol ile elde edilen ekstre ağırlıkları Şekil 3.3’de grafik olarak gösterildi.

Tablo 3.3: Alkaloid ekstraksiyonu yapılan *H. niger* köklerinden elde edilen kloroform ekstresi miktarları.

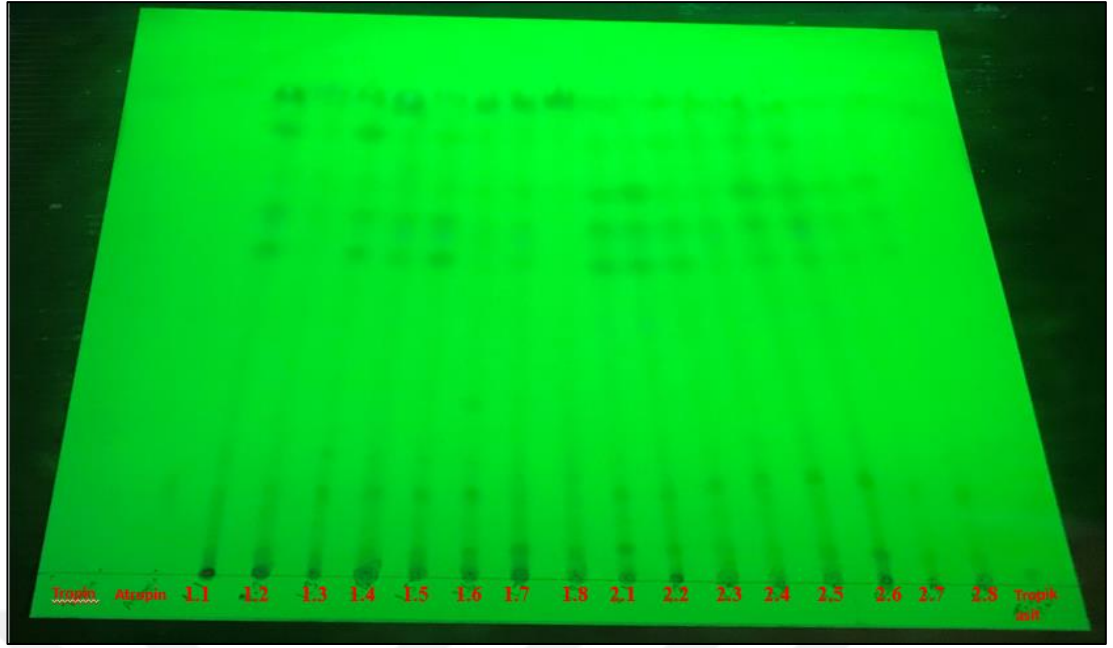
1.Protokol/Örnek/İçerik	Ağırlık (mg)	2.Protokol/Örnek/İçerik	Ağırlık (mg)
1.1 -(1/2 MS, pH:5,8, Kontrol)	2,8	2.1 -(1/2 MS, pH:5,8, Kontrol)	3,0
1.2 -(1/2 MS, pH:6,5, Kontrol)	2,5	2.2 -(1/2 MS, pH:6,5, Kontrol)	2,0
1.3 -(1/2 MS, pH:5,8, 0,1 mg/L IBA)	2,9	2.3 -(1/2 MS, pH:5,8, 0,1 mg/L IBA)	1,6
1.4 -(1/2 MS, pH:6,5, 0,1 mg/L IBA)	3,0	2.4 -(1/2 MS, pH:6,5, 0,1 mg/L IBA)	1,4
1.5 -(MS, pH:5,8, Kontrol)	1,8	2.5 -(MS, pH:5,8, Kontrol)	2,3
1.6 -(MS, pH:6,5, Kontrol)	1,9	2.6 -(MS, pH:6,5, Kontrol)	2,7
1.7 -(MS, pH:5,8, 0,1 mg/L IBA)	1,9	2.7 -(MS, pH:5,8, 0,1 mg/L IBA)	1,0
1.8 -(MS, pH:6,5, 0,1 mg/L IBA)	1,9	2.8 -(MS, pH:6,5, 0,1 mg/L IBA)	1,0



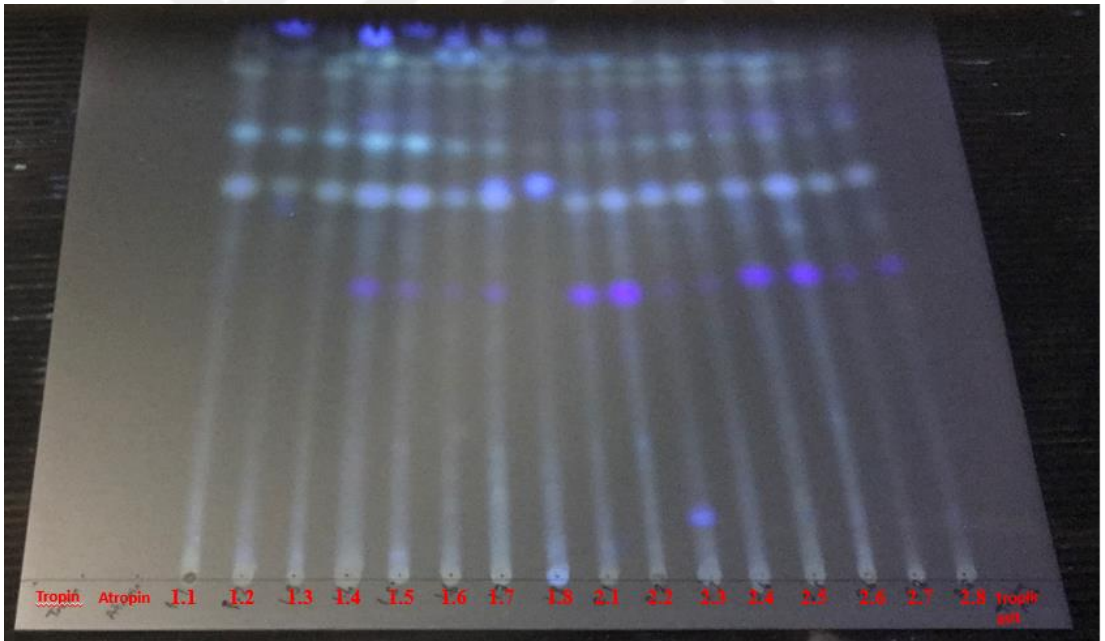
Şekil 3.3: 1. ve 2. protokol ile ekstraksiyon yapılan 8 örneğin ekstre ağırlıkları.

3.4. İnce Tabaka Kromatografisi ile Tropan Alkaloidlerinin Belirlenmesi

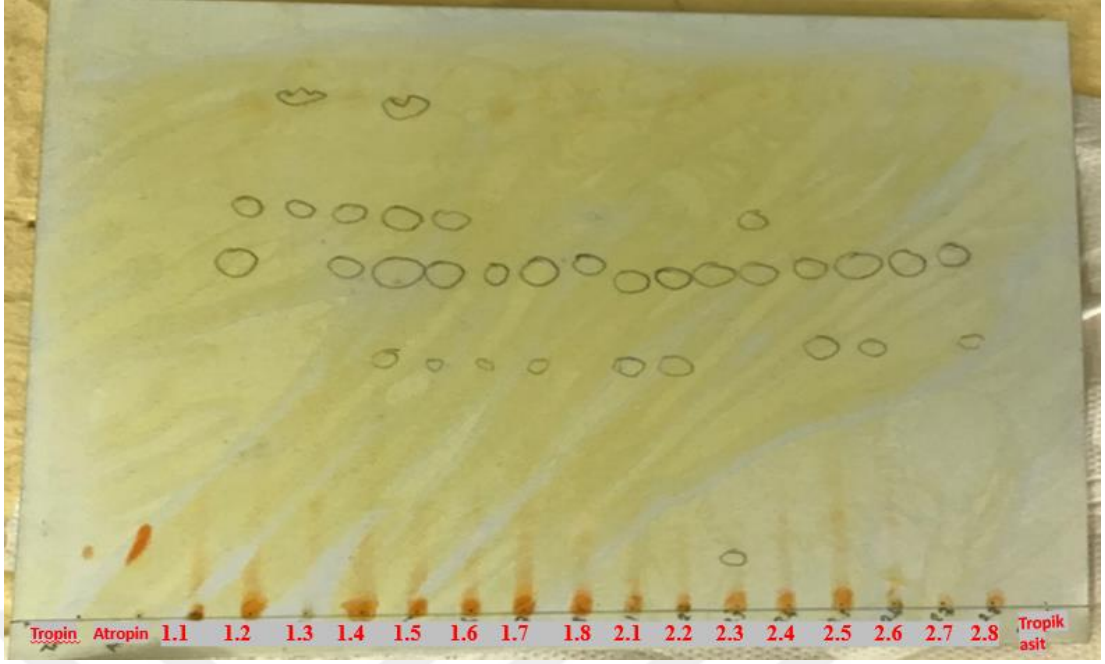
3 standart (*atropin*, *tropin*, *tropik asit*) ile ince tabaka kromatografisi yapılan toplam 16 kloroform ekstresinde Şekil 3.4.a'da 254 nm UV ışığı altında *atropin* standardı hizasında tüm ekstre örneklerinde leke görülmektedir. Şekil 3.4.b'de 366 nm UV ışığı altında bakıldığında sadece kloroform ekstrelerinde 8 farklı düzeyde leke görüldü. Şekil 3.4.c'de Dragendorf çözeltisi uygulanan silika jel plakada oluşan lekelerin *tropin* ve *atropin* varlığını doğruladığı görüldü. Şekil 3.4.a ve Şekil 3.4.c'de *tropik asit* standardı silika jel plakada görülmediği için sonuca dahil edilmedi.



Şekil 3.4.a: 254 nm UV ışık altında görüntülenen silika jel plaka.



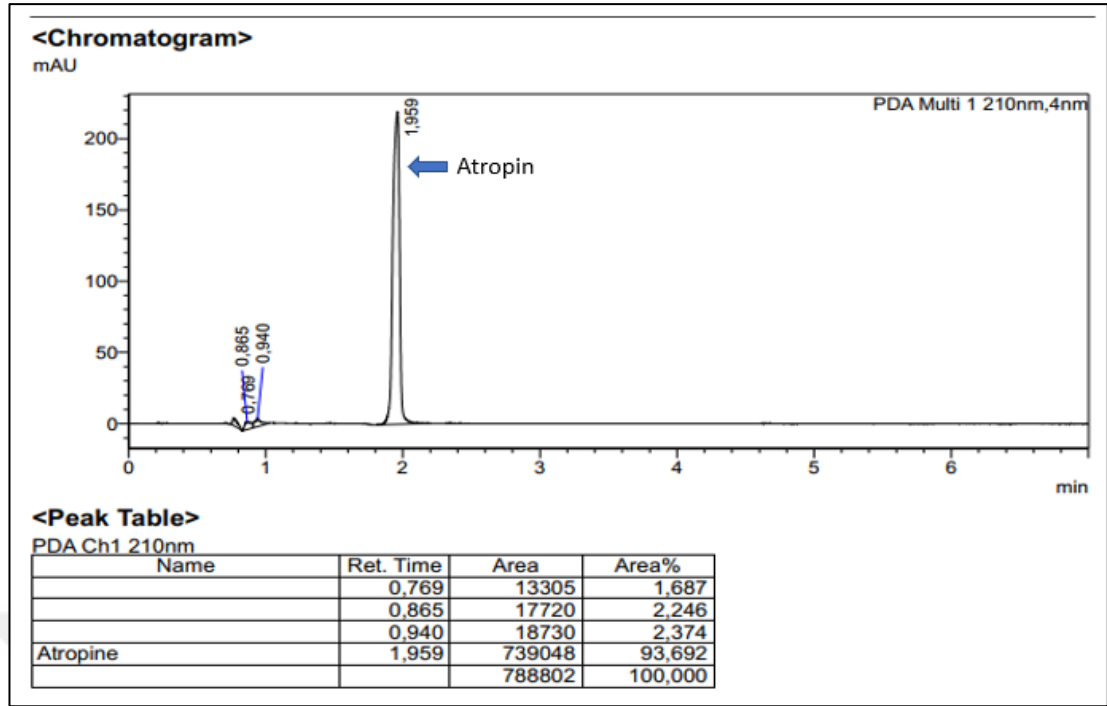
Şekil 3.4.b: 366 nm UV ışık altında görüntülenen silika jel plaka.



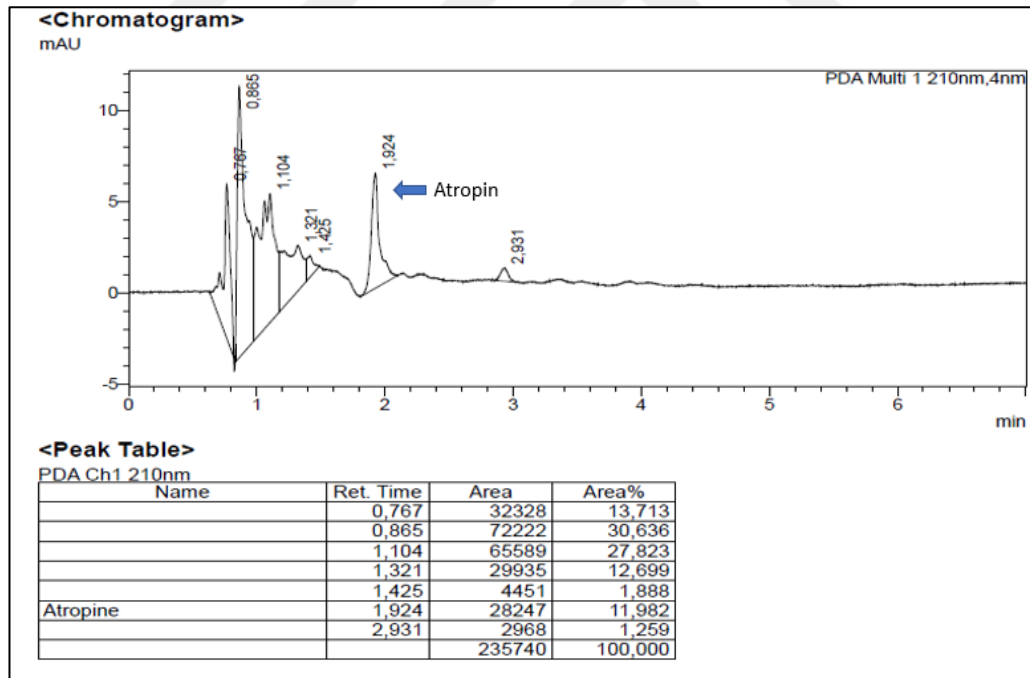
Şekil 3.4.c: İnce tabaka kromatografisi sonrasında Dragendorf çözeltisi püskürtülen silika jel plaka.

3.5. HPLC Yöntemiyle *Atropin* Varlığının Belirlenmesi

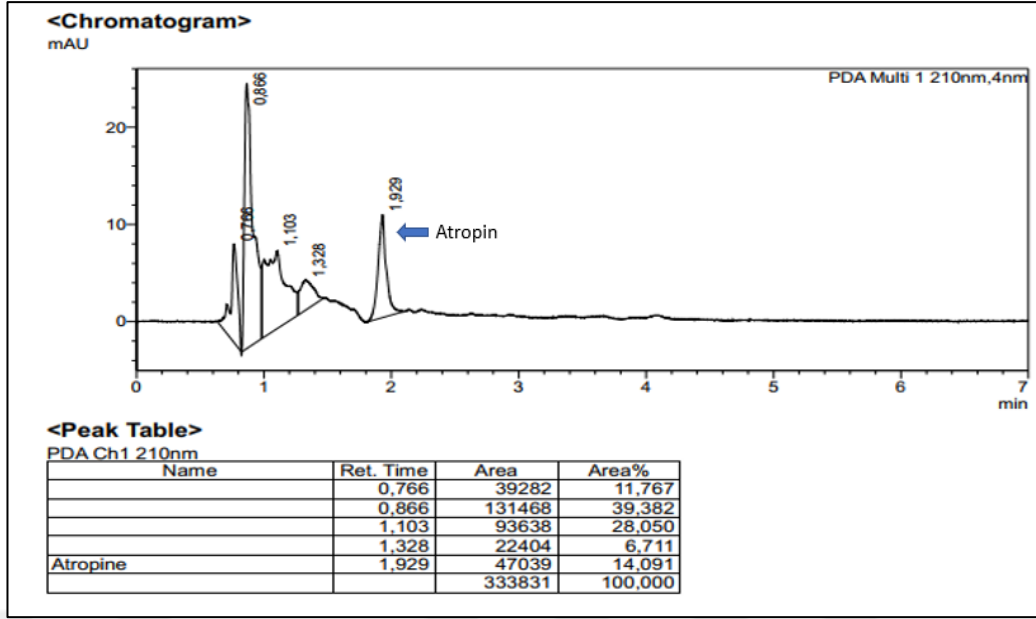
HPLC analizleri kapsamında, standart *atropin* (Sigma), 1.1 (1. protokol 1. örnek) ve 2.1 (2. protokol 1. örnek) kodlu kloroform ekstraları HPLC ile analiz edildi. Standart *atropin* (Şekil 3.5.a) 1,959 dk'da pik verdi. Bu sonuç referans alınarak 1.1 kodlu ekstreden (Şekil 3.5.b) 1,924 dk'da pik verirken, 2.1 kodlu ekstrenin 1,929 dk'da (Şekil 3.5.c) yakın pik verdiği görüldü. Yüzde olarak karşılaştırdığımızda 1.1 kodlu ekstreden %11,982 (Şekil 3.5.b), 2.1 kodlu ekstreden %14,091 (Şekil 3.5.c) *atropin* tespit edildi.



Şekil 3.5.a: Standart *atropin* HPLC kromatogramı.

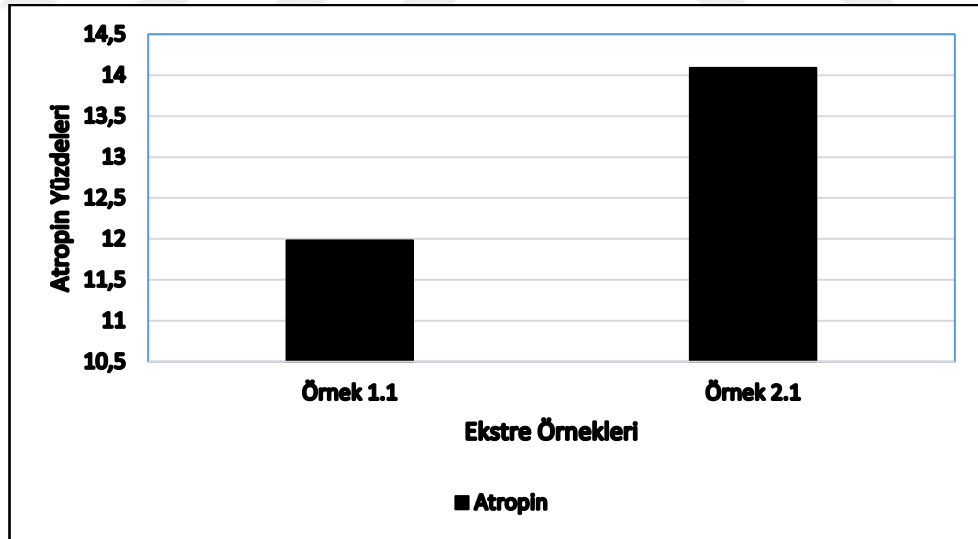


Şekil 3.5.b: 1. protokol 1. örnek (1.1) HPLC kromatogramı.



Şekil 3.5.c: 2. protokol 1. örnek (2.1) HPLC kromatogramı.

Şekil 3.5.d'de 1. ve 2. protokol ile elde edilen ekstrelerin HPLC analizinde elde edilen miktarları grafik olarak gösterildi.



Şekil 3.5.d: 1. örneğin her iki protokol ile elde edilen ekstrelerindeki *atropin* yüzdesinin HPLC analizi ile miktar tayini.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda farklı kültür ortamlarında gelişen *H. niger* köklerinin kütle artışına ve içerdiği alkaloid miktarlarına bakılmıştır. Çalışmada kullanılan kökler tohum sterilizasyonu yapıldıktan sonra yine steril ortamda çimlendirilen bitkilerden alınmıştır. Çalışmanın steril ortam gerektiren tüm aşamaları Laminar Hava Akımlı kabinde, kabin içi etil alkol ile silinip, UV lambası ile steril edilerek yapılmıştır.

Sterilizasyon çalışmaları kapsamında *H. niger* tohumlarına uygulanan yöntemler literatürden referans alınan protokollerin dışında kendi denemelerimizi de içermektedir. Özellikle tohum yüzeyinin girintili olması uygulanan kimyasalların sterilizasyon aşamasında yeterince etkin olmamasına neden olmuştur. Bu pürüzlü yapı mikroorganizmaların sterilizasyon uygulamalarından korunabilmesi için uygun ortam oluşturmuş olabilir. Etil alkol yüzdesi her denemede sabit tutulduğundan, etil alkole bağlı bir durumdan kaynaklandığı söylenemez.

Uygulanan farklı yöntemler sonucunda ortamların çoğunda kontaminasyon görülmesi tohum yüzeyine ve kullanılan kimyasal oranının yetersizliğine bağlı olabilir. Ticari sodyum hipoklorit (Domestos) oranının %20'den düşük kullanıldığı tüm sterilizasyon çalışmalarının sonrasında kontrol olarak bırakılan besin ortamları steril kalırken, tohum içeren kültürlerin tamamında 48 saat içinde beyaz renkli, hifli yapıda küf kontaminasyonu görüldü. Kontaminasyonlar tohumların bulunduğu yerlerde ve etrafında oluştu. Bu durum Sodyum hipoklorit konsantrasyonunun artırılmasıyla çözülürken uygulama süresinin 20 dk'dan az olduğu durumlarda kontaminasyon görülmeye devam etti. Yaklaşık 2000 tohum kullanılarak %50 oranında Sodyum hipokloritin 20 dk uygulaması ile yapılan sterilizasyon çalışmasında hiç kontaminasyon görülmedi. 45 gün sonunda tohumların çoğu çimlenmezken, çimlenme gösteren 4 adet tohumda ise morfolojik olarak şekil bozukluğu olan ve kök oluşturamayan bitki gelişimi gözlemlendi. Oluşan bu bitkiler 1 cm uzunluktan daha fazla büyüyemedi. Bu durum %50 domestos uygulanan tohumların istisnalar haricinde çimlenme özelliğini kaybettiğini gösterdi. Yapılan denemeler 1, 2, 3, 4 ve 5. yöntemlerin *H. niger* tohum sterilizasyonunu tam olarak sağlamadığını; 6.yöntemin

ise tohumlarda ağır hasar bıraktığını gösterdi.

Süre olarak 20 dk, %20 Domestos uygulanan tohumlarda kontaminasyon görülmedi. Çimlenme 22 gün sonra başladı. 7. yöntem sterilizasyonu sağladı, fakat çimlenme süresi 22 gün olarak belirlendi. Sterilizasyon çalışmalarında kullanılan kimyasallardan biri olan hidrojenperoksit, Domestos ile birlikte 8. yöntemde kullanıldı. 2 dk'lık hidrojen peroksit (%10) ve 10 dk'lık Domestos (%20) ile yapılan sterilizasyon sonucu çimlenme süresi 9 güne düştü. Kontaminasyon görülmedi. Çimlenme süresini kısaltmak amacıyla 8. yönteme ek olarak zımpara kağıdı ile 5 dk boyunca tohumlar zımparalandı. Sonuç olarak, çimlenme süresi 48 saat sonra başladı. Bu yöntem 9. yöntem olarak belirlendi. Çalışma kapsamında tohum sterilizasyonu için bu yöntem ile devam edildi.

Ortalama 1 aylık bitkilerle kurulan kök kültürlerinden 21 günlük köklerin yaş ağırlıkları dikkate alındığında büyüme düzenleyici bulunan besin ortamlarında gelişen köklerin yaş ağırlıklarının, MS0 besin ortamında gelişen köklerin yaş ağırlıklarından daha fazla olduğu gözlemlendi. IBA (İndol bütirik asit) içeren ortamlarda kökler yan kök oluşumu gösterdi ve kütleye IBA içermeyenlerden daha fazla oranda kök oluşturdu. Besin ortamlarına göre kök gelişimini kütleye karşılaştırdığımızda yaklaşık olarak çok yakın değerler gözlemlendi. Besin ortamının $\frac{1}{2}$ MS veya MS olmasının köklerin yaş ağırlık olarak kütleli artışında önemli bir fark göstermediği sonucu elde edildi.

Kuru ağırlık değerlerine göre IBA faktörünün kuru ağırlık üzerinde etkili olduğu, MS ortamında büyüyen köklerin kuru ağırlık olarak $\frac{1}{2}$ MS ortamında büyüyen köklerden daha fazla kuru ağırlığa sahip olduğu gözlemlendi. pH faktörünün önemsenecek boyutta fark oluşturmadığı, köklerin su yüzdeleri hesaplandığında ise anlamlı farklar oluşmadığı görüldü.

Saflaştırma aşamasında uygulanan 1. protokol çalışması sonucunda $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg/L IBA içeren ortamda gelişen köklerden elde edilen kloroform ekstraktları 2,9 mg ve 3 mg ağırlık ile MS ortamındaki köklerden daha yüksek sonuç verdi. MS ortamında büyüyen köklerin kloroform ekstraktları yaklaşık 1,9 mg olarak aynı değerleri gösterdi.

2. protokol ile yapılan saflaştırma sonucunda pH farkına bağlı anlamlı bir sonuç görülmedi. Büyüme düzenleyicisi açısından bakıldığında IBA içermeyen ortamlarda gelişen köklerin kloroform ekstraktlarının, IBA içeren ortamlardan ağırlık olarak

daha yüksek sonuç verdiği görüldü.

İnce tabaka kromatografisi her iki ekstraksiyon protokolü ile elde edilen tüm örneklerle aynı silika jel plaka üzerinde yapıldı. 254 nm dalga boyu UV ışığı ile bakıldığında *atropin* varlığı tüm örneklerde görülmektedir. Yükleme konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği düşünülen hafif kaymalar görüldü. Fakat, referans olarak eklenen *tropin*, *atropin* ve *tropik asite* bakıldığında *atropin* varlığı tüm örneklerde görüldü. 366 nm UV ışık altında bakıldığında plakanın üst kısımlarında her örnek için tutarlı olarak aynı hizada bulunan iki farklı metabolit gözlemlendi. Yapısal olarak daha küçük moleküllerin kromatografi yöntemlerinde boyutu sebebiyle daha hızlı hareket ettiği bilinmektedir. Bu bilgiye dayanarak plakanın üst kısmında bulunan metabolitlerin *atropin* molekülünden daha küçük moleküller olduğu düşünülmektedir. Dragendorff çözeltisi püskürtülerek tespiti yapılan tropan alkaloidleri 2.7 ve 2.8 numaralı örneklerde gözle görülmedi. Bu durumun nedeni olarak silikajel plakaya yüklenen ekstredeki *atropin* miktarının düşük olması ihtimali gösterilebilir.

HPLC analizi ile gözlemlenen *atropin* varlığı 2. protokol sonuçlarında, 1. protokol'de elde edilen sonuçlara göre daha yüksek gözlemlendi. Bu durum ekstre içerisinde bulunan *atropin* miktarının 2. protokolde daha saf ve yüksek miktarda elde edildiğini gösterdi. Böylece, saflaştırma aşamasında kullanılan 2. protokolün 1. protokole göre daha verimli sonuçlar verdiği kloroform ekstresi ağırlıkları ve HPLC analizi sonucuna göre doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, IBA bitki büyüme düzenleyicisinin köklerin kütsel artışında kontrol gruplarına göre önemli gelişim sağladığı bu çalışmada gösterilmiştir. Bu köklerden saflaştırma yöntemleri ile elde edilen kloroform ekstreleri 1. protokol ile elde edildiğinde daha yüksek sonuçlar vermesine karşın, HPLC analizi sonuçlarında 2. protokol ile yapılan ekstreden pik sayısının daha fazla olması ve *atropin* yüzdesinin daha düşük olması nedeniyle 2. protokolün saflaştırma için daha uygun bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra, IBA büyüme düzenleyicisinin kök miktarını artırırken alkaloid miktarının aynı oranda artmadığı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 2014, 25 (3), 77-80

- [1] Ramachandra Rao S. ve Ravishankar G. A., (2002), “Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites”, *Biotechnol. Adv.*, c. 20, sayı 2, ss. 101–153.
- [2] ÇETİN B., (2006), “*Rubia tinctorum* Bitkisinde *Agrobacterium rhizogenes* Aracılığıyla Transforme Saçaklı Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Sekonder Metabolit Üretimi”, Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi.
- [3] Yiğenoğlu A., (2007), “Eser Element Tayini İle Ban Otu Bitkisinin Yetiştigi Bölgenin Tahmini”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi.
- [4] Web 1, (2019), <https://plants.usda.gov>, (Erişim Tarihi: 07-Haz-2019).
- [5] Web 2, <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=HYNI>, (Erişim Tarihi: 07-Haz-2019).
- [6] Web 3, (2019) <http://www.tubives.com/>, (Erişim Tarihi: 20-Şub-2019).
- [7] Web 4, (2010) https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=30523#null, (Erişim Tarihi: 06-Haz-2019).
- [8] Mercan Yücel U. ve Yılmaz O., (2014), “Van Yöresinde Yetişen İki *Hyoscyamus* (Banotu) Türünün Total Alkaloid Miktarları”, YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 2014, 25 (3), 77-80.
- [9] Atay I. M. ve Seckin D., (2012), “A Case Of Delirium Due To *Hyoscyamus niger* With Warfarin”, *J. Acad. Emerg. Med. Case Reports*, c. 2, sayı 3, ss. 48–50.
- [10] Kaya F. S. A. ve Aslan M., (2016), “SEED MORPHOLOGY OF THE GENUS *HYOSCYAMUS* L. IN TURKEY AND ITS SYSTEMATIC SIGNIFICANCE”, *Acta Microscopica* Vol. 25, No.2, pp. 48- 55.
- [11] S. V R, (2016), “Pharmacological profile of tropane alkaloids”, *J. Chem. Pharm. Res.*, c. 7, sayı 5, ss. 117–119.
- [12] YÜCEL U. M. ve YILMAZ O., (2014), “Van Yöresinde Yetişen İki *Hyoscyamus* (Banotu) Türünün Total Alkaloid Miktarları”, *Van Vet. J.*, c. 25, sayı 3, ss. 77–80.
- [13] Begum A. S., (2010), “Bioactive Non-alkaloidal Secondary Metabolites of *Hyoscyamus niger* Linn. Seeds: A Review”, *Res. J. Seed Sci.*, c. 3, sayı 4, ss. 210–217.

- [14] Li J., Shi J., YU XW S. J. K., Men Q. M., ve Kang T. G., (2011) “Chemical and pharmacological researches on *Hyoscyamus niger*”, *Chin Herb Med*, c. 3, sayı 2, ss. 117–126.
- [15] Zhang L. vd., (2004), “Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, c. 101, sayı 17, ss. 6786–91.
- [16] Kamada H., Okamura N., Satake M., Harada H., ve Shimomura K., (1986), “Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*”, *Plant Cell Rep.*, c. 5, sayı 4, ss. 239–242.
- [17] Marvin L. K. H., Arvind B., Ning S., ve Chan L. K., (2010), “Optimization of root proliferation medium for *Hyoscyamus niger* L.”, *J. Med. Plants Res.*, c. 4, sayı 24, ss. 2710–2718.
- [18] S. Ö. Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel, Ed., (2002), "*Bitki Biyoteknolojisi 1*", Mehmet Bab.
- [19] Prof. Dr. Mammadov Ramazan, (2014), *TOHURLU BİTKİLERDE SEKONDER METABOLİTLER*, ss. 287-337.
- [20] Monfil V. O. ve Casas-Flores S., (2014), “Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture”, içinde *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, ss. 429–453.
- [21] Web 5, (2019), <http://www.biologyreference.com/Re-Se/Secondary-Metabolites-in-Plants.html>, (Erişim Tarihi: 23-May-2019).
- [22] Web 6, (2019), <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>. (Erişim Tarihi: 22-Tem-2019).
- [23] Zhang L. ve ark., (2004), “Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures” vol 101 (17), ss. 67-91.
- [24] Jia Z. ve Tian C., (2009), “Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method”, *Desalination*, c. 247, sayı 1–3, ss. 423–429.
- [25] Ghorbanpour M., Omidi M., Etminan A., Hatami M., ve Shoostari L., (2013), “in Vitro Hyoscyamine and Scopolamine Production of Black Henbane (*Hyoscyamus niger*) From Shoot Tip Culture Under Various Plant Growth Regulators and Culture Media”, *Trakia J. Sci.*, c. 11, sayı 2, ss. 125–134.
- [26] Cirak C., Kevseroglu K., ve Sağlam B., (2004), “Physical and physiological dormancy in black henbane (*Hyoscyamus niger* L.) seeds”, *J. Plant Biol.*, c. 47, sayı 4, ss. 391–395.
- [27] GHORBANPOUR M., HATAMI M., ve HATAMI M., (2015), “Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of

Hyoscyamus niger L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application”, *Acta Agric. Slov.*, c. 105, sayı 1, ss. 23–32.

- [28] Lu D. Y., Pental D., ve Cocking E. C., (2013), “Plant Regeneration from Seedling Cotyledon Protoplasts”, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, c. 107, sayı 1, ss. 59–63.
- [29] Jasim Aljibouri A. M., Whaybed Al-samarraei K., Shanan Abd A., Muasar Mageed D., ve Abass Ali A. J., (2012), “Alkaloids Production from Callus of *Hyoscyamus niger* L. *in Vitro*”, *Journal of Life Sciences* 6, 874-882.
- [30] Bahmanzadegana A., Sefidkona F. ve Sonbolib A., (2009), “Determination of hyoscyamine and scopolamine in four *Hyoscyamus* species from Iran”, *Iran. J. Pharm. Res.*, c. 8, sayı 1, ss. 65–70.



ÖZGEÇMİŞ

Emre ERDEM, 28.05.1991 tarihinde Kahramanmaraş'ta doğdu. İlk ve Ortaöğretimini Kahramanmaraş'ta tamamladı. 2010 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans eğitime başladı. 2016 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında ve Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'nin danışmanlığında yüksek lisans eğitime başladı. Tez çalışmalarını 2017-2019 yılları arasında TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarı'nda Tijen TALAS OĞRAŞ eş danışmanlığında tamamladı.



EKLER

ERDEM, E., YAĞIZ, N., TALAS OĞRAŞ, T., ÖZDEN ÇİFTÇİ, Y., ÖZTÜRK, S. (2019) Büyüme Düzenleyicilerin *Hyoscyamus niger* (Banotu) Bitkisinde Kallus Gelişimine Etkisi. Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu ve Tanıtım Günleri, Gebze Teknik Üniversitesi

YAĞIZ, N., ERDEM, E., TALAS OĞRAŞ, T., ÖZDEMİR, F. İ., ÖZTÜRK, S. (2019) *Atropa belladonna* (Güzelavrat otu) Bitkisinde *In Vitro* Koşullarda Çeşitli Değişkenlerin Kallus Gelişimine Etkisi. Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu ve Tanıtım Günleri, Gebze Teknik Üniversitesi

