

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rubia tinctorum L. (KÖK BOYA) BİTKİSİNİN KÖK DOKULARINDAN
KALLUS ÜRETİMİ

Özkan DELİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2004

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. M. Cihat TOKER danışmanlığında Özkan DELİ tarafından hazırlanan bu çalışma 23 Şubat 2004 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sevil PEHLİVAN

Üye : Prof. Dr. Işıl ÖNCEL

Üye : Prof. Dr. M. Cihat TOKER

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Metin OLGUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Rubia tinctorum L. (KÖK BOYA) BİTKİSİNİN KÖK DOKULARINDAN KALLUS ÜRETİMİ

Özkan DELİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Cihat TOKER

Rubia tinctorum L. (Kök boya) Rubiaceae familyasından çok yıllık bir bitkidir. *R. tinctorum* L. bitkisinin kökleri 20 antrakinon türevi taşımaktadır. Bu maddeler dokumacılıkta, kozmetik, besin ve ilaç endüstrilerinde boyar madde olarak kullanılmalarının yanında, bu maddelerin birçok biyolojik aktivitesi de bulunmaktadır.

Uygulamalı bitki biyoteknolojisinde sekonder metabolit üretimi için hücre ve doku kültürü önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı doku kültürü metodu ile *Rubia tinctorum* L. köklerinden kallus üretmektir. % 3 sakkaroz ve % 0.6 agar içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında 2,4-D ve Kinetin hormonları tek ve karışım halinde kullanıldı. Eksplantlar 25±1 °C’de karanlıkta 4 hafta süre ile inkübasyona bırakıldı.

Bütün ortamlarda değişik oranlarda ve renklerde kallus üretildi. Fakat 2 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L Kinetin içeren ortamda en fazla, sarı renkli kallus üretimi oldu. Bitki büyüme maddeleri olmayan ortamda ise organogenez görüldü.

2004, 44 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Rubia tinctorum* (Kök boya), kallus kültürü, antrakinon.

ABSTRACT

Master Thesis

CALLUS PRODUCTION FROM ROOTS OF *Rubia tinctorum* L.

Özkan DELİ

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. M. Cihat TOKER

Rubia tinctorum L. is a perennial plant from Rubiaceae family. Roots of *R. tinctorum* L. contains 20 anthraquinone derivatives. These derivatives are used in textile, cosmetics, food and drug industries as colorant and have many biological activities.

Cell and tissue cultures are playing a main role in applied plant biotechnology for secondary metabolites production. The aim of this study is producing callus from the roots of *R. tinctorum* L. by using tissue culture methods. 2,4-D and Kinetin hormones are used alone and mixtures in Murashige and Skoog (MS) medium that contain 3 % sucrose and 0.6 % agar. Explants were incubated at 25±1 °C in dark conditions for 4 weeks.

Different colored and ratios calli were produced from all mediums. But yellow colored and the highest callusing was achieved with the medium containing 2 mg/L 2,4-D and 2 mg/L Kinetin. Organogenesis were occurred in the medium that haven't plant growth regulators.

2004, 44 pages

Key Words: *Rubia tinctorum* L., callus culture, anthraquinone

TEŞEKKÜR

Bana araştırma olanağı sağlayan, fikirleriyle yol gösteren, çalışmalarım süresince yakın ilgi ve yardımını gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. M. Cihat TOKER (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmaları süresince yardımını gördüğüm Prof.Dr. Gülnur TOKER (G.Ü. Ezc. Fakültesi)'e, Araş. Gör. Hatice ÇÖLGEÇEN (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)'e ve Araş. Gör. Canan YAĞCI (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)'ya; her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Araş. Gör. Cemil İŞLEK (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)'e, Ahmet KARAGÖZOĞLU'na, Talip ÇETER (Ankara Sami Ulus Çocuk Hastanesi)'e ve Meral TUĞLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni maddi-manevi her alanda destekleyerek günlere gelmemi sağlayan babam Alameddin DELİ'ye, annem Nursal DELİ'ye ve sevgili kardeşlerim Yeliz, Yıldız ve Özcan DELİ'ye tüm kalbimle teşekkür ederim.

Özkan DELİ

Ankara, Şubat 2004

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Botanik Bilgiler	4
2.2. <i>Rubia</i> 'nın Kimyasal İçeriği ile İlgili Bilgiler	7
2.3. Biyolojik Aktivite ile İlgili Bilgiler	9
2.4. Doku Kültürü ile İlgili Genel Bilgiler	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.2. Yöntem	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER DİZİNİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
AK	Antrakinon
ANK	Ankara Üniversitesi Herbariumu
BAP	Benziladenin fosfat
IAA	İndolasetik asit
NAA	Naftalenasetik asit
R	<i>Rubia</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Rubia tinctorum</i> 'un genel görünüşü	1
Şekil 2.1. <i>Rubia tinctorum</i> 'un çiçekli dalları	5
Şekil 2.2. Antrakinonların genel yapısı ve karbonlarının numaralanması.....	7
Şekil 2.3. Alizarin ve ruberitrik asitin açık formülleri.....	8
Şekil 4.1. 1 nolu ortamda oluşan kallusların yüzdeler oranları	31
Şekil 4.2. 2 nolu ortamda oluşan kallusların yüzdeler oranları	32
Şekil 4.3. 3 nolu ortamda oluşan kallusların yüzdeler oranları	32
Şekil 4.4. 4 nolu ortamda oluşan kallusların yüzdeler oranları	33
Şekil 4.5. 2 mg/L 2,4-D içeren 1 nolu MS ortamında oluşan yoğun, sarı ve kahverengi kallus	33
Şekil 4.6. 2 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L Kinetin içeren 2 nolu MS ortamında oluşan yoğun kallus	34
Şekil 4.7. 2 mg/L Kinetin içeren 3 nolu MS ortamında kallus ve kök oluşumu...34	
Şekil 4.8. Hormonsuz MS ortamında kök ve zayıf gövde gelişimi	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bitki doku kültüründe en çok kullanılan temel besin ortamları	13
Çizelge 3.1. Ortamlarda bulunan hormonlar ve miktarları	26
Çizelge 4.1. Denemelerde kullanılan eksplant sayısı ve kontaminasyon oranı	29
Çizelge 4.2. Kontamine olmayan eksplantlarda kallus oluşturma, ortama renk verme ve organogenez oranları	30
Çizelge 4.3. Oluşan kallusların niteliği ve görülme oranları	31

1. GİRİŞ

Rubia tinctorum L. (Kök boya) Rubiaceae familyasından çok yıllık bir bitkidir. *Rubia tinctorum* L. bitkisi Güneybatı ve Orta Asya'dan Kuzeybatı Himalayalar'a, ayrıca Batı, Güney ve Güneydoğu Avrupa gibi geniş bir alanda yayılan (Irano-Turanien) bir türdür (Davis 1982). Türkiye'de de çok yaygın olarak bulunur. Anadolu'da çok farklı adlarla anılan kök boya bitkisinin (şekil 1.1) gövdesi kareye yakın köşeli, tüylü ve boğumludur. Her boğumda 4-6 yaprak bulunur. Yapraklar kısa saplı olup çevreleri ve altları tüylüdür. Yaprak ayası uzun veya yumurta şeklindedir ve kenarları dişlidir. Çiçekler gövde ve dalların ucunda olup stamenlerin sayısı 4-5 arasında değişir (Baytop 1983).



Şekil 1.1. *Rubia tinctorum* L.'un genel görünüşü

Doğal boya kaynağı olan *Rubia tinctorum* L.'nin köklerinden ekstre edilen etken maddeler sekonder metabolit olan Antrakınonlar, Naftokinonlar ve Naftohidrokinonlardır. Kök boya bitkisi köklerinde 20 çeşit antrakınon pigmenti bulunmaktadır. Bu antrakınonların bazıları Alizarin, Purpurin, Ksantopurpurin, Pseudopurpurin, Lucidin-etileter ve Ruberitrik asit'dir (Knorr vd 1993). Antrakınonlar bakteri, mantar, likenler ve yüksek yapılı bitkilerde bulunan önemli bir gruptur (Thomson 1987).

En az üç yaşına gelmiş kırmızı renkli kökler ilkbahar ve sonbahar aylarında toplanarak bu köklerden boyar madde elde edilir (Baytop 1983). Kök boyası bitkisi ile boyanan dokumaların renk kalitesi sentetik boyalara göre daha sabit ve estetikdir. Mordanla kullanılan kök boya kırmızı, pembe, turuncu, leylak ve kahverengi gibi değişik renklerde geniş bir boyama spektrumuna sahiptir. Kırmızı rengin tekstilde özellikle pamuk ve keten boyamasındaki kullanımı çok önemlidir. Üretimi ve kullanımı sırasında sentetik boyalar gibi kimyasal atık bırakmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı Avrupa'da olduğu gibi ülkemizde de tekrar önem kazanmaktadır.

1700'lü yıllarda Dünya kök boya ihtiyacının 2/3'si Anadolu'dan karşılanmaktaydı. Özellikle batı ve orta Anadolu'da tarımı yapılan kök boya bitkisinin 19. yy sonlarında sentetik boyaların üretilmeye başlaması ile tarımı azalmıştır. Hatta günümüzde yok denecek kadar azdır. Bugün eskiden tarımı yapılan alanlarda yabancı olarak yetişmekte ve zararlı sayılarak sökülüp atılmakta, gen erozyonuna uğramaktadır (Enez 1987). Son yıllarda ekolojik tarım, doğal boyalar, doğal katkı maddeleri ve doğal ilaçların kullanımı sentetiklere göre daha çok tercih edilmekte ve bu konularda yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Kök boya bitkisinin kökleri doğal boya kaynağı olmasının yanında içerdiği antrakinonların farmasötik etkileri de vardır (Blömeke vd 1992, Shin ve Chi 1989, Suzuki vd 1984, Talapatra vd 1981). Rubiaceae bitkilerindeki antrakinonların; antifungal (Rath vd 1995), hipotansif (tansiyon düşürücü), analjezik (ağrı giderici) (Younos vd 1990), antimalarial (sıtma giderici) (Koumaglo vd 1992, Sittie vd 1999), antioksidant (Tripathi vd 1997), antilösemik (lösemiye karşı) ve mutajenik (mutasyon yapıcı) (Chang ve Chen 1995, İsmail vd 1997) etkileri vardır. Ayrıca C vitamini eksikliğini önleyici, idrar söktürücü (diüretik), doğumu kolaylaştırıcı (Enez 1987), mesane ve böbrek taşlarını eritici, kum düşürücü (Blömeke vd 1992) etkileri vardır.

Rubia genusunda doku kültürü ile antrakinon pigmentleri biyosentez ile üretilmektedir (Sato vd 1992). *Rubia* hücrelerinin doku kültüründe kallusun kırmızı renk alması alizarinin varlığını göstermektedir (Tóth vd 1993). Rubiaceae'deki bitkilerden hücre ve doku kültürü yöntemi ile elde edilen hücrelerde büyük miktarlarda

antrakinonlar vardır ve hatta bazı durumlarda kültüre edilmiş hücrelerdeki antrakinonların miktarı ana bitkideki miktarın çok üstünde olabilmektedir (Han vd 2001, Bóka vd 2002). Rubiaceae bitkilerinde hücre kültürüyle antrakinon üretimi önemli bir avantajdır (Koblitz 1988, Schulte 1984).

Bu çalışmada, son yıllarda doğal boya kaynağı, ilaç hammaddesi ve besin katkı maddesi olarak önem kazanan kök boya (*Rubia tinctorum* L.) bitki köklerinin doku kültürü tekniğiyle değişik hormon konsantrasyonları altında kallus oluşturma yeteneği araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Botanik Bilgiler

Rubia tinctorum L., Rubiaceae familyasına ait geniş dağılım gösteren bir bitkidir. Bu bölümde *Rubia tinctorum* L.'un sınıflandırılmasına, bitkinin cins ve tür özelliklerine, yayılışına ait botanik bilgiler kendi konu başlıkları altında verilmiştir.

2.1.1. *Rubia tinctorum* L.'nin sınıflandırılması

Rubia tinctorum L. nin sistematik bilgileri (Seçmen vd 1989):

Divisio: Magnoliophyta

Classis: Magnoliopsida

Subclass : Asteridae

Ordo : Rubiales

Fam : Rubiaceae

Genus: *Rubia*

Species: *Rubia tinctorum* L.

Sinonim: *R. tinctorum* L. var. *iberica* Fischer ex DC.

R. iberica (Fischer ex DC.) C. Koch in Linnaea

2.1.2. *Rubia* L.

Bazıları sarılcı, alçak çalıl veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar bir halkada 2-7 adettir. Korolla 5 loplu ve tüpü loplarından kısadır. Ilıman ve sıcak bölgelerde yayılış gösterir ve 30-40 tür içerir. Ülkemizde 5 türü bulunur. Bunlardan *R. tinctorum* L. geniş yayılışlı olan, kökleri yün boyamada kullanılan tırmanıcı bitkilerdir (Seçmen vd 1989).

2.1.3. *Rubia tinctorum* L.

Anadolu'da; boya çili, boya kökü, boya pürçü, boya sarmaşığı, boyalık otu ,dilkanatan, kırmızı boya, kırmızı kök, yapışkan yumurta boyası, bostan otu, boyacı kökü, çubuk boya, gök boya, kızıl boya, kızıl kök gibi farklı adlarla anılan (Baytop 1983) *Rubia tinctorum* L. (kök boya) bitkisi sarılıcı veya tırmanıcı, çok yıllık, 1-2 (-5) metre boyundadır. Kök kırmızı, saçaklı, stolonsuzdur. Gövdeler otsu, köşeliden dikenimsiye, açılar üzerindeki seyrek olarak geriye yönelik tüylerden dolayı pürüzlüden pürüzsüze, nodlarda tüysüz veya bazen tüylüdür. Yapraklar yarı derimsi, 4-6'lı halkalarda yaklaşık 30-115 x 8-25 (-30) mm, mızrak şeklinde veya dikdörtgenimsi elipsten yumurtamsıya, sivri uçlu veya hemen daralan tiptedir. Genellikle saplı, petiyol 15-20 mm, orta damar veya kenarlar geriye dönük dikenli, sürgün ucundaki yapraklar sıklıkla yukarıya yönelik tüylü ve dikenlidir. Yan damarlar altta bariz olarak görülür. Çiçek durumu seyrek, çok dallanmış, çok çiçekli, piramidalden geniş piramide, çiçek durumu 30 cm'e kadar uçlarda ve yanlarda, ovalden dikdörtgenimsi ovale brakte (yaprakçık)'lidir. Yaprak sapı (0,75-) 2-8 mm dir. Taç yapraklar soluk, yeşilimsi sarı, huni şeklinde, yaklaşık 3,5-5(-6) mm çapında, loblar üçgensiz mızrak, oldukça sivri kılçıklara (dikenlere) doğru derecelenir (kılçıktan 0,7 mm'ye). Anterler dikdörtgenimsi, yaklaşık 0,5-0,6 (-0,8) mm. Meyveler yaklaşık 4-6 mm çapında olur, siyah renktedir. 5-8. aylarda çiçeklenir, çitlerde ve çalılıklarda 400-2000 metrede bulunur (şekil 2.1) (Davis 1982).



Şekil 2.1. *Rubia tinctorum* L.'un çiçekli dalları

2.1.4. *Rubia tinctorum* L. bitkisinin yayılışı

Dünya üzerinde Güneybatı ve Orta Asya'dan Kuzeybatı Himalayalar'a; Batı, Güney ve Güneydoğu Avrupa gibi geniş alanda yayılış gösteren kök boya bitkisi Türkiye'de de geniş bir yayılış gösterir. Flora of Turkey and East Aegean Islands kitabındaki verilere dayanarak bitkinin Türkiye'deki yayılışı verilmiştir (Davis 1982).

A1(E) Çanakkale: Çanakkale Boğazı, Mayıs 1867, Calvert

A2(E) İstanbul: Büyükçekmece, A. Baytop (ISTE 15605)

A2(A) İstanbul: Halki, Krause 1519

A4 Çankırı: Şabanözü, 970 m, A. Baytop (ISTE 5223)

A5 Sinop: Boyabat'ın 13 km batısı, 400 m, Sorger 69-16-32

A8 Erzurum: Tortum Gölü'nün batısı, 1070 m, Hub.-Mor. 14878

A9 Erzurum: Olur, T. Baytop (ISTE 14370)

B1 İzmir: Ilıca, Çeşme'nin 3 km doğusu, Alava 4833

B2 Kütahya: Gediz, 850 m, D. 36887

B3 Konya: Akşehir, 1000m , Bornm. 1899:4533

B4 Ankara: Kızılırmak kenarı, Ankara'dan Kayseri'ye giderken 100. km, 900 m, McNeill 353

B5 Nevşehir: Ürgüp'ün 5 km güneydoğusu, 1200 m, Roper 138

B6 Maraş: Çardak, D. 20394!

B7 Erzincan: Cimin, 1500 m, D. 31733!

B8 Muş: Muş, 1330 m, Kotschy 1859:503

B9 Van: Gevaş'ın 10 km kuzeydoğusu, 1750 m, Sorger 77- 89-1

C2 Antalya: Elmalı, Bourgeau 1860:128

C4 Konya: Konya'dan Çumra'ya, Küçük Köy, 980 m, Helbaek 2686

C5 Niğde: Niğde civarı, 22 Haziran 1927, Kadri Achmed

C6 Hatay: Belen, 450 m, D. 27010

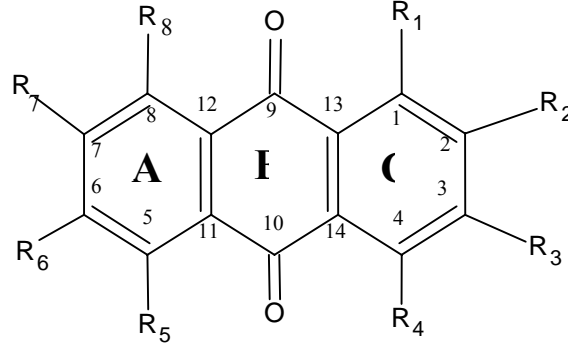
C8 Mardin: Kavs, Sint. 1888:994

C9 Siirt: Siirt civarı, Mar Jakup, 90 m, Nábëlek 4309

Ada: Khios, Platt 52

2.2. *Rubia*'nın Kimyasal İçeriği ile İlgili Bilgiler

Rubia cinsi ile yapılan çalışmalarda sekonder metabolit olan Antrakinon (AK)'lar, Naftokinonlar ve Naftohidrokinonlar izole edilmiştir. Antrakinonların genel yapısı şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Antrakinonların genel yapısı ve karbonlarının numaralanması

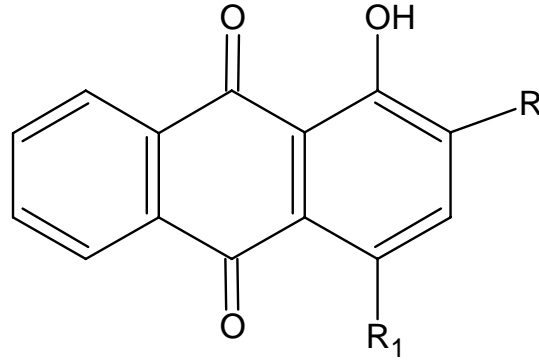
Yüksek yapıli bitkilerde antrakinonlar başlıca iki biyosentez yolu ile elde edilir. Bunlar Poliketid biyosentez yolu (Van den Berg ve Labadie 1989) ve Korizmat/o-süksinilbenzoik asit biyosentez yoludur (Leistner 1985).

Poliketid biyosentez yolunda AK'lar bir Asetil-CoA'nın oktaketid zinciri yoluyla 7 Malonil-CoA ünitesini kendine bağlaması ile oluşur.

Korizmat/o-süksinilbenzoik asit biyosentez yolunda ise A ve B halkaları o-süksinilbenzoik asit (OSB) yoluyla korizmik asit ve α -ketoglutarat'tan oluşur. C halkası ise terpenoid biyosentez yoluyla izopentil di fosfat (IPP)'dan meydana gelir. Rubiaceae familyasındaki bitkilerde antrakinonlar genellikle korizmat / o-süksinilbenzoik asit biyosentez yoluyla meydana gelir.

Rubia tinctorum L.'dan izole edilen antrakinonlar şunlardır: Alizarin (Şekil 2.3), 1-hidroksi-2-metil-AK, tektokinon, nordamnakantal, 1-hidroksi-2-metoksi-AK, 1,3-dihidroksi-2-etoksimetil-AK, scopoletin, lucidin, lucidin-3-O-primeveroside, ruberitrik asit (Şekil 2.3), rubiadin, ksantopurpurin, purpurin, pseudopurpurin, 1,3-dihidroksi-2-

metoksimetil-AK, munjistin, munjistin metilester, 7-hidroksi-2-metil-AK ve lucidin- ω -etil eter (Kawasaki vd 1992, Sato vd 1991, Sato vd 1997, El-Emary vd 1998).



1 Alizarin
2 Ruberitrik asid

R= OH; R₁= H
R= O-primaveros; R₁= H

Şekil 2.3 Alizarin ve Ruberitrik asidin açık formülleri.

Diğer türlerden elde edilen AK'ları şöyle sıralayabiliriz.

R. akane'den elde edilen AK'lar, 1-hidroksi-2-metil-AK, 2-etoksikarbonil-1-hidroksi-AK, 1,2-dihidroksi-AK, alizarin, purpurin, 2-metil-1,3,6-trihidroksi-AK ve purpuroksantin'dir (Okuyama vd 1990, Mizutani vd 1997, Endo vd 1997).

R. cardifolia ile yapılan çalışmalarda elde edilen AK'lar, 1,3-dihidroksi-2-metoksimetil-AK, 1-metoksi-2-metoksimetil-3-hidroksi-AK, 4-hidroksi-2-karboksi-AK, rubiadin, 1,4-dihidroksi-2-hidroksimetil-AK, dihidromollugin, alizarin, 1-hidroksi-2-metil-9,10-AK, 1-hidroksi-2-hidroksimetil-AK, rubimallin, 1-hidroksi-AK, 2-metil-1,3,6-trihidroksi-AK, 1,2,4-trihidroksi-9,10-AK, purpurin ve munjistin (Vidal-Tessier vd 1987, Itokawa vd 1989, Tripathi vd 1997, Mischenko vd 1999).

R. lanceolata'dan elde edilen AK'lar, mollugin, 1-hidroksi-2-metil-AK, lucidin etil eter, alizarin, 2-metilkinizarin, 3-karboksi-1-hidroksi-AK, rubiadin, ω -hidroksipaçibasin ve digiferruginol (Kuo vd 1995).

R. oncotricha köklerinden elde edilen AK'lar, 3-karbometoksi-1-hidroksi-9,10-AK, 1-hidroksi-2-metil-AK, ksantopurpurin, 2-metil-1,3,6-trihidroksi-AK, tektokinon ve alizarin 2-metil eter'dir (Itokawa vd 1991).

Ayrıca *R. peregrina*'nın kültüründe oluşturulan saçak köklerden alizarin ekstre edilmiştir (Lodhi ve Charlwood 1996).

Yukarıda adı geçen antrakininler arasında en çok bilinen ve yaygın olarak kullanılan alizarindir. *R. tinctorum* L. bitkisinin köklerinde bulunan AK pigmentlerinden biri olan alizarin İ.Ö. 2000 yılından beri Akdeniz bölgesinde tekstil boyanmasında kullanılmaktadır (Angelini vd 1997). *Rubia* bitkisinden elde edilen doğal boyalar ile boyanan dokumaların renk kalitesi sentetik boyalara göre daha sabit ve estetikdir. Doğal boyaların üretimi ve kullanımı sırasında sentetik boyalar gibi kimyasal atık bırakmamalarından dolayı giderek önem kazanmaktadırlar. Tekstil ürünlerinin insan derisi ile doğrudan temasta olmasından dolayı da, bunların alerjiden kansere kadar risklerinin en alt düzeyde olması için, özellikle gelişmiş ülkelerde gerekli kurallar konmuştur. Üretim denetlenmektedir. Bunun sonucunda tekstil sanayiinde bitkilerden elde edilen pigmentlerin üretimi ve kullanılması önem kazanmıştır.

Itokawa vd (1991) *R. oncotricha* ile yaptıkları çalışmada AK'lar dışında 2 Naftokinon (2-karbometoksi-2,3-epoksi-3-prenil-1,4-Naftokinon, 3-karbometoksi-4-hidroksi-1,2-Naftokinon) ve 3 Naftohidrokinon (2-karbometoksifuromollugin, 2-karbometoksi-3-prenil-1,4-Naftohidrokinon-4-O-β-D-glukozit ve 2-karbometoksi-3-prenil-1,4-Naftohidrokinon-4-O-D-apiozid) ekstre ettiklerini belirtmektedirler.

Yapılan çalışmalarda yukarıda adı geçen Antrakinin, Naftokinon ve Naftohidrokinonların dışında ayrıca çok sayıda glukozitler de elde edilmiştir.

2.3. Biyolojik Aktivite ile İlgili Bilgiler

Koumaglo vd (1992) *Morinda lucida* ile yaptıkları çalışmada, ekstre ettikleri 3 antrakininun (rubiadin-1-metil eter, digitolutein, damnakantal) antimalarial etkisini

araştırmış ve bu AK'ların *Plasmodium falciparum*'un gelişmesini engellediğini bulmuşlardır. Ayrıca bu bitkinin batı Afrika'da yaygın şekilde geleneksel halk ilacı olarak kullanıldığını belirtmişlerdir.

Sittie vd (1999), AK'ların antimalarial ve antileishmanial aktivitesini araştırmış ve AK'ların 2. karbondaki aldehit grubu ile 3. karbonlarındaki fenolik hidroksi grubun laboratuvar ortamında *Leishmania major*'un promastigot formlarının ve *Plasmodium falciparum*'un gelişimini inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Tripathi vd (1997) *Rubia cordifolia*'dan ekstre ettikleri Rubiadin'in antioksidant özellik gösterdiğini belirtmektedirler.

Blömeke vd (1992) kök boya bitkisinden ekstrakte edilen maddelerin mesane ve böbrek taşlarını eritici, kum düşürücü özellikte olduğunu belirtmişlerdir.

Kawasaki vd (1992) yaptıkları çalışmada, *Rubia tinctorum* L.'dan elde edilen mollugin, 1-hidroksi-2-metil-AK, rubiadin, 7-hidroksi-2-metil-AK, 2-etoksümetil-AK, 1-metoksümetil-AK, 1,3-dihidroksi-AK, lucidin, ve lucidin-3-O-primeveroside'nin *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA 98 üzerinde mutajenik etki yaptığını bulmuşlardır. Chang ve Chen (1995) ile İsmail vd (1997) tarafından yapılan çalışmalarda da mutajenik ve antilösemik etki rapor edilmiştir. Marec vd (2001) *Rubia tinctorum* L' daki tabii antrakininonların mutajenik aktivitelerini çalışmışlar ve molluginin hem mutajenik hem de rekombinagenik aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir.

Itokawa vd (1993) *Rubia cordifolia* köklerindeki antrakininonları, naftohidrokinonları, naftohidrokinon dimerleri ve bunların sitotoksik ve antitümör aktivitelerini araştırmışlardır. Abdullah vd (2003) *Rubia cordifolia* köklerinden AK eldesi çalışmalarında, AK'ların antioksidan, hepatotoksik, antineoplastik, antiallerjik, antibakteriyal gibi pek çok tıbbi etkileri bulunduğunu bildirmişlerdir.

Rubiaceae familyasından elde edilen AK'ların bildirilen diğer biyolojik aktiviteleri, antifungal (Rath vd 1995), hipotansif, analjezik (Younos vd 1990), C vitamini eksikliğini önleyici, idrar söktürücü, doğumu kolaylaştırıcı (Enez 1987) etkilerdir.

2.4. Doku Kültürü ile İlgili Genel Bilgiler

2.4.1. Bitki doku kültürü kavramı

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, hücre süspansiyonu veya kallus hücreleri), doku veya organ (apikal meristem, kök, gövde, yaprak vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir (Babaoğlu 2001).

Bu metod için 'Doku Kültürü' teriminin kullanılmasının nedeni, başlangıçta yapılan çalışmaların genellikle dokular üzerinde olması sebebiyledir. Bitkiden izole edilen çeşitli bitki kısımlarına 'eksplant' denir. Ancak bugün 'doku kültürü' terimi yetersiz kalmaktadır. Bu başlık altında hücre ve süspansiyon, kallus, embriyo, protoplast, meristem, anter (polen) kültürleri de çalışılmaktadır (Kyte 1987).

Doku kültürüne neden olan ana fikir 'Totipotensi' kavramıdır. Totipotensi, somatik hücrelerde görülen tam bir bitki oluşturma kabiliyetidir. Birçok bitkide bir organın izole edilmesi veya bitkiden çelik alınması gibi durumlar bitkideki bu kabiliyetin aktif hale geçmesine neden olmaktadır (Kyte 1987). Kültürü yapılan hücreler özellikleri bakımından üç kısımda incelenebilir.

- 1) Organize olmuş meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan rejenerasyon,
- 2) Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve
- 3) Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon (Babaoğlu 2001).

Yöntemin temelinde mikro seviyede bir üretim söz konusudur. Bu nedenle doku kültürüne 'mikro üretim' veya 'aseptik kültür' de denilmektedir (Kyte 1987).

Bitki doku kültürü, Bitki Genetik Mühendisliği ile birlikte Bitki Biyoteknolojisi'ni oluşturan ana unsurlardan birisidir (Babaoğlu 2001).

2.4.2. Bitki doku kültüründe kullanılan bazı besin ortamları ve bileşenleri

Doku kültürü için çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilmiş olan ve onların adlarıyla anılan bazı besin ortamları şunlardır: Murashige ve Skoog (MS) (1962), White (W) (1963), Morel ve Müller (M) (1964), Linsmaier ve Skoog (LS) (1965), Gamborg (B5) (1968), Nitsch ve Nitsch (NN) (1969), Schenk ve Hildebrandt (SH) (1972), Chu (N6) (1978), Lloyd ve McCown (WPM) (1980), Driver ve Kuniyuki (DKW) (1984) vb. Çizelge 2.1'de bitki doku kültüründe en çok kullanılan temel besin ortamları ve bileşimleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bitki doku kültüründe en çok kullanılan temel besin ortamları (Kurnaz 2002).

Komponentler	Kültür Ortamlarındaki Konsantrasyon (mg/l)									
	MS	B5	SH	LS	White S-3	NN	Nitsch's H	KM	LM	SH
KNO ₃	1900	2500	2500	1900	80	950	950	1900	1900	-
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	1650	-	720	720	600	1650	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	300	-	-	-	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ .7 H ₂ O	370	250	400	370	720	185	185	300	1850	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	200	440	-	220	166	600	22	440
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	-	-	300	-	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	65	-	-	300	-	1400
KH ₂ PO ₄	170	-	-	170	68	68	68	170	340	170
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	-	150	-	-	-	-	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	-	16,5	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-
MnSO ₄ . H ₂ O	-	10	10	16,89	-	-	-	10	21	-
MnSO ₄ .4 H ₂ O	22,3	-	-	-	7	25	25	-	-	22,3
KI	0,83	0,75	1	0,83	0,75	-	-	0,75	4,15	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	3	5	6,2	1,5	10	10	3	31	6,2
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8,6	2	1	10,58	3	10	10	2	43	8,6
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0025	0,025	0,2	0,025	-	0,025	0,025	0,025	0,5	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,25	0,25	0,1	0,25	-	0,25	0,25	0,25	1,25	0,25
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,0025	0,025	0,1	0,025	-	-	-	0,025	0,125	0,025
FeSO ₄ .7 H ₂ O	27,8	27,8	15	27,85	-	27,8	-	-	27,8	27,8
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-
Sequestrene 330	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-
Fe NaEDTA	37,3	37,3	20	-	-	37,3	-	-	37,3	37,3
Nikotinik asit	0,5	1	5	-	-	5	-	-	0,5	0,5
Pridoksin-HCl	0,5	1	0,5	-	-	0,5	-	1	0,1	0,5
Thiamin-HCl	0,1	10	5	0,4	-	0,5	-	1	0,1	0,1
Biotin	-	-	-	-	-	0,05	-	0,01	-	-
Folik asit	-	-	-	-	-	0,5	-	0,4	-	-
myo-inositol	100	100	1000	-	-	100	-	100	100	100
1-inositol	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-
Glisin	2	-	-	-	-	2	-	0,1	-	2
Glutamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1462
Sakkaroz	30000	20000	30000	-	-	20000	-	20000	30000	10000

2.4.3. Bitki doku kültürlerinin uygulama alanları

2.4.3.1. Bitki ıslahındaki uygulama alanları

Türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü: Zigot oluşumundan sonra ortaya çıkan uyumsuzluklar nedeniyle embriyo oluşumu veya gelişimi engellenebilir. Bu embriyolar ‘embriyo kurtarma tekniği’ ile özel besin ortamlarında kültüre edilip yeni melez bitkiler elde edilebilir (Babaoğlu 2001).

Haploid bitki üretiminde anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü: Mayoz bölünme geçirmiş haploid sayıda kromozoma sahip hücrelerde veya bu hücreleri içeren bitki kısımlarının (anter veya yumurtalık) doku kültürü yoluyla elde edilen hücrelerinden veya rejenerantlarından yapılan kromozom katlanması sonucu % 100 homozigot bitkiler elde edilebilmektedir (Maheswari vd 1995).

Somaklonal varyasyon: Yeni çeşit geliştirme ve iyileştirmelerde ıslahçılar tarafından kullanılan bu varyasyonlar, uzun süreli kültürlerde veya yüksek bitki büyüme düzenleyicileri olan ortamlarda kallus oluşturan veya totipotent olup yeni bitkiler meydana getirebilen hücrelerin bu yeteneklerini kaybetmeleri sonucu bu hücrelerden oluşan yeni bitkilerde gen veya kromozom bozuklukları sonucu kalıtsal ve fenotipik varyasyonların ortaya çıkmasıdır. Sonucunda çiçek renginin, yaprak ve çiçek morfolojisinin, tohum veriminin, bitki canlılığı ve iriliğinin, uçucu yağ kompozisyonu ve hastalıklara tolerans veya dayanıklılığının değişmesi sağlanabilir (Brown ve Thorpe 1995).

In vitro seleksiyon: Tuz, herbisitler, patojenler, vb. faktörlere karşı dayanıklı tek bir hücre seçildikten sonra bu hücrelerden bitkilerle ilgili faktörlere dayanıklı veya toleransı yüksek bitkiler elde edilebilmektedir (Babaoğlu 2001).

In vitro dölleme: Özellikle dış ortama alıştırılmayan bitkilerden tohum almak gibi bazı durumlarda kültürle elde edilen bitkiler laboratuvar ortamında tozlaştırılmaktadır (Babaoğlu 2001).

***In vitro* germlazm muhafazası:** Totipotent hücrelerin belirli aralıklarla yenilenen kültürlerle veya oluşan yeni meristemler veya elde edilen minyatür bitkilerin düşük sıcaklıklarda saklanmasıyla muhafaza edilen bitki hücreleri gerektiği zaman yeniden canlandırılıp üretilebilmektedir. Bu muhafaza şekli günümüzde gen ve tohum bankalarına alternatif oluşturmaktadır (Brown ve Thorpe 1995).

Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu): Klasik melezleme ile elde edilemeyen hibritlerin elde edilmesinde kimyasal ve fiziksel metodlar kullanılarak yapılan bir tekniktir. Elde edilen somatik melez hücrelerden kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu yoluyla yeni bitki elde edilmesidir. Genel anlamda genetik kopyalamadır (Ochatt ve Power 1992).

Gen transferi: Doku kültürlerinin bitkileri iyileştirmede en önemli ve yaygın olarak kullanılan uygulamalarından birisi de, gen veya genlerin bitkilere aktarılmasıdır (Baboğlu 2001).

2.4.3.2. Bitki çoğaltım ve üretim amaçlı kullanım alanları

Hastaliksız bitki elde edilmesinde meristem kültürü: Çok az miktarda bitki büyüme düzenleyicisi ilave edildiğinde uç ve yan meristemlerden bir çok yeni bitkicikler elde edilebilmektedir. Bu metodla elde edilen bitkiler her bakımdan birbirinin benzeridirler. Virüsten arı meristemlerden elde edilen bu bitkiler virüssüzdür (Babaoğlu 2001).

Mikroçoğaltım: Organize meristemlerden, henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden direkt veya indirekt yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemine mikroçoğaltım denilmektedir. Ticari pazarda çok önemli bir yere sahiptir (Brown ve Thorpe 1995).

Sentetik tohum üretimi (somatik embriyolar): Somatik embriyoların çeşitli metodlarla kaplanması sonucu sentetik (yapay) tohumlar elde edilmektedir. Günümüzde sentetik tohumların, hibritlerin somatik çoğaltımında, erkısır ve ebeveyn hatların

muhafazasında ve odunsu bitkilerin elit genotiplerinin elde tutulmasında kullanımı konusunda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır (Babaoğlu 2001).

Kimeralar: Özellikle süs bitkilerinde çeşitli uygulamalar sonucu bir bitkiyi oluşturan bütün hücrelerin ilgili gen veya genleri taşınamaması durumlarında elde edilebilmektedir (Babaoğlu 2001).

2.4.3.3. Sekonder metabolit üretimi (Kallus-hücre süspansiyonları)

In vitro hücre kültürleri sekonder metabolit üretiminde de önemli bir kaynak olarak görülmektedir. Bitki sekonder metabolitleri, bitki büyüme ve gelişmesinde doğrudan kullanılmayan maddelerdir. Işık mikroskobu ile görülebilen sekonder metabolitlerin (tanenler, antosiyaninler, karotenoidler) yanında ultraviyole ışığı ile görülebilenler (alkoloidler) de vardır (Babaoğlu 2001).

Sekonder metabolit üretimi için kullanılan kültürlerden bir tanesi kallus kültürleridir. Kallus kültürleri ana bitkiden kesilip çıkartılan ve bölünme özelliğini yitirmemiş organ veya doku parçalarının karbon kaynağı (genellikle sakkaroz) ve bitki büyüme düzenleyicileri (genellikle bir oksin ve bir sitokinin) içeren yarı katı besi ortamında büyütülmesi sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip kütleler olarak tarif edilebilir. Bir diğer kültür tekniği ise, tek hücrelerin veya küçük çapta hücre gruplarının sıvı büyüme ortamında dağılım gösterdiği hücre süspansiyon kültürü teknikleridir (Babaoğlu 2001).

Bu yolla istenilen miktarda ve kalitede sekonder metabolit elde edilirken, doğal yollarla üretiminde görülen biyotik ve abiyotik faktörlerden kaynaklanan dezavantajlar ortadan kaldırılabilmektedir. Yeni maddelerin keşfine olanak sağlaması da doku kültürünü bu konuda oldukça cazip bir yöntem durumuna getirmektedir (Babaoğlu 2001).

2.4.3.4. Bitki doku kültürlerinin temel araştırmalardaki uygulamaları

Doku kültürü, protoplast izolasyonu ve füzyonu, hücre, doku ve bitki beslenmesi, sitogenetik çalışmalar, morfogenezis çalışmalarını ve biyolojik azot fiksasyonu gibi temel araştırmalarda da kullanılmaktadır. Bu tür araştırmalar genellikle sistem geliştirmede faydalı olmaktadır (Babaoğlu 2001).

2.4.4. Doku kültürü metodunun avantajları ve dezavantajları

2.4.4.1. Avantajlar

1) Sekonder bitki metabolitlerinin üretimi, bitki içinde içsel bir ritim dahilinde gerçekteşmektedir. Hastalık etmenleri ve zararlılar, bu mekanizmayı etkilediğinden ürün sentezi her zaman aynı miktarda olmamakta hatta gelişimi tamamen durabilmektedir. Doku kültürü ile mikroorganizmalardan izole edilmiş bitkiden devamlı ve aynı miktarda ürün elde edilebilmektedir.

2) Bitkide sadece belli doku ve organda üretilen bir madde, doku kültürü kullanılarak bitkinin diğer kısımlarında da kolayca üretilebilmektedir.

3) Sekonder bitki metabolitlerinin bitki bünyesinde sentezi ve birikimi oldukça yavaş olmasına karşın, doku kültürü ile hızlı üretim yapılabilir.

4) Doku kültüründe bazı biyosentez yollarını canlı bitkide olduğu gibi yürümektedir. Bu nedenle bilinen maddelerin yanında çeşitli biyolojik aktivitelere sahip yeni bileşiklerin izolasyonu sağlanabilmektedir.

5) İklimsel özellikler, coğrafi yerleşim, mevsimler, gün uzunluğu gibi üretimi etkileyen faktörler arazideki yetiştiriciliği sınırlandırmakta ve dolayısıyla bitkisel materyal kaynağını kısıtlamaktadır. Doku kültürü kullanılarak tamamen kontrollü ve optimum koşullarda bitki üretimi ile bu tip dezavantajlar ortadan kaldırılmaktadır.

6) Politik nedenlerle üretimi engellenen, tıbbi değeri olan bir takım maddeleri içeren bitkiler, doku kültürü ile üretilebilmekte ve dolayısıyla bu maddelerin izolasyonu yasal çerçevede gerçekleştirilebilmektedir.

7) Özellikle hücre ve süspansiyon kültürü kullanılarak yapay tohum oluşturma, organogenesis ve gen transferi yapılabilmektedir.

8) Kültür şartlarında patojen mikroorganizmalarından arındırılmış bitkilerin uluslararası alanda taşınması kolay ve ucuzdur. Karantina işlemlerine gerek duyulmaması ve buna bağlı gecikmelerin azalması, ticari bakımdan bu metodun önemini arttırmaktadır (Memişoğlu 2000).

2.4.4.2. Dezavantajlar

1) Şimdiye kadar her bitki türünün doku kültürü ile üretimi gerçekleştirilememiştir.

2) Saklama sırasında kültürde bir takım genetik değişiklikler olabilir ve bu mutasyonların saptanması oldukça güçtür.

3) Yangın, elektrik arıza gibi kontrol edilemeyen dış etkenler sonucu tüm kültürün kaybolma riski mevcuttur.

4) Kültürlerin, transfer sırasında çeşitli mikroorganizmalarla kontamine olma olasılığı vardır.

5) Mikroorganizma kültürü ile karşılaştırıldığında kültürdeki bitki hücrelerinin büyüme düzeyi yavaştır (Memişoğlu 2000).

2.4.5. *Rubia* ile yapılan doku kültürü çalışmaları

Sato vd (1991) tarafından *Rubia tinctorum* L. doku kültüründe *Agrobacterium rhizogenes*' le enfeksiyon sonucu oluşan saçak köklerde NAA, IAA, 2,4-D ve Kinetin

fitohormonları ile sükröz konsantrasyonunun etkisi araştırılmış, 0,5 veya 5 µM IAA içeren ortamda saçak kök oluşumunun 19 kat daha fazla arttığı, 5 µM NAA içeren kinetinsiz ortamda saçak köklerin geliştiği ve kinetin varlığının gelişimi yavaşlattığı belirtilmiştir. Ayrıca 2,4-D ilave edilmiş ortamda kök kültürü gelişiminin az olduğu ve 0,5 µM NAA ile kinetin veya 2,4-D (kinetlinli veya kinetinsiz) kombinasyonu eklenince kallustan oluşan saçak köklerin sarıdan kıvımsız kahverengiye doğru bir renk değişikliği gösterdiği bildirilmektedir. Saçak köklerin yaş ağırlığı 23 gün sonra hormonsuz sıvı MS ortamında yaklaşık 7,5 katına çıkmış, 5 µM NAA ve kinetin veya 2,4-D eklenince saçak köklerde alizarin daha fazla miktarda biriktirilmiştir.

Strobel vd (1991), Rubiaceae familyası bitkilerinden hücre süspansiyon kültürü ile antrakinon üretiminin önemli bir avantaj olduğunu, antrakinonların hücre içinde vakuollerde biriktiğini ve antrakinon üretim limitini etkileyen faktörlerden birinin de depolama kapasitesi olduğunu bildirmektedirler.

Tóth vd (1993) *R. tinctorum* L. ve *Dermacybe sanguinea* hücre kültürlerinde oluşan alizarin ve emodin'i HPLC ile tayin etmişler ve *R. tinctorum* L. hücre kültürlerinde serbest alizarin tespit etmişlerdir.

Ercan (1996), *Rubia tinctorum* L.'un farklı hormon konsantrasyonlarında rejenerasyon yeteneğini incelediği çalışmada eksplant olarak yaprak, boğum, boğum arası ve hipokotil kullanmış, boğum ve hipokotilden kallus oluşturamamıştır. Yaprak ve boğum arasından alınan eksplantlarda ise NAA'nın artışı kallus ve kök oluşumunu teşvik etmiş, BAP artışı ise inhibe edici etki yaratmıştır. Sürgün gelişimi teşvik edilememiştir.

Mizutani vd (1997) *Rubia akane* NAKAI'nin hücre süspansiyon kültüründen antrakinon üretimine çeşitli büyüme düzenleyiciler ve besinlerin etkisini araştırdıkları çalışmada, optimize edilmiş besiyerlerinde antrakinon içeriğinin iki katına çıktığı, ancak sadece gövde kültüründen kallus sağlandığı belirtilmektedir.

Angelini vd (1997) yaptıkları çalışmada İ.Ö. 2000 yılından beri *R. tinctorum* L.'un köklerinden boya elde edildiğini, sentetik boyaların çıkması ile değerlerini

kaybettiklerini, fakat son yıllarda sentetik boyaların zararlı etkilerinin ortaya çıkması ile yeniden önem kazandığını belirtmişlerdir. Bu amaçla bitki köklerinde 5 ile 30. ay arasında oluşan AK miktarlarını araştırmışlar ve 30 aylık köklerde miktarın çok daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Elde ettikleri boya ile endüstriyel şartlarda boyama yaptıklarında çok iyi sonuçlar almışlardır.

van Tegelen vd (1999) *Rubia tinctorum* L. hücre kültürlerinde uyarıcılarla izokorizmat sentezinin etkileşimini incelemişlerdir. Uyarıcı olarak kullanılan ve bir mantar türü olan *Pythium aphanidermatum* ile kültürde antrakinon miktarının iki katına çıktığını bulmuşlardır.

Mischenko vd (1999) *R. cardifolia* kallus kültüründe antrakinon üretimini araştırmışlar ve kallusta köktekinden 9 misli daha fazla antrakinon oluştuğunu bulmuşlardır. Ayrıca yaprak sapı ve gövde eksplantlarından oluşan kallusun apikal meristem (gövde ucu) ve yaprak eksplantlarından oluşan kalluslardan daha fazla antrakinon biriktirdiğini dolayısı ile antrakinon üretiminde eksplantın kaynağının etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Shim vd (1999) *R. akane* süspansiyon kültüründe çeper geçirgenliğini arttıran maddelerle antrakinon üretiminin arttığını bildirmişlerdir. Çeper geçirgenliğini arttırmak için tween 80 kullanmışlar, sonuçta çözeltide ve hücrelerdeki antrakinon miktarı 1,6 misli artmıştır.

Han vd (2001) Rubiaceae bitkilerinde hücre kültüründe antrakinon biyosentez yollarını inceleyen literatürleri derlemişler ve sonuçta yüksek bitkilerde antrakinon biyosentezinin biri poliketid, diğerinin ise korizmat/o-süksinilbenzoik asit yolu olmak üzere iki yolla olduğunu bildirmişlerdir.

Bóka vd (2002) yaptıkları çalışmada üç farklı mantar türünden hazırlanan iki uyarıcının *R. tinctorum* L. hücrelerinde, alizarin miktarı ve ince yapı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Uyarıcı tatbikinin ilk gününde alizarin miktarı artmış, ardından madde ortama geçmiştir. Uyarıcı tatbikinden sonraki 24 saatte canlı hücre sayısında artış olmamış fakat 96 saatten sonra sayıda düşüş olmuştur. Mantar uyarıcılar hücrelerin ince

yapılarında değişikliklere sebep olmuşlardır. Uyarıcı olarak kullanılan *Phytium* en az, *Botrylis* ise en fazla etkiyi yapmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma, 2002-2003 yılları arasında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan bitki materyali Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi bahçesinden 2002 yılı güz ve 2003 yılı bahar aylarında toplanmıştır. Bitkinin teşhisi için Ankara Üniversitesi Herbariumu (ANK)'ndan yararlanılmıştır.

3.2. Yöntem

Besin ortamı olarak Murashige ve Skoog'un 1962 yılında önermiş oldukları MS ortamı kullanılmıştır.

Besin ortamları hazırlanırken kullanılan maddelerin miktarları hassas terazi ile tartılmıştır. Tartılacak madde çeşidinin çok sayıda ve tartılacak madde miktarlarının az olması nedeniyle her çalışma anında maddelerin tek tek tartılması hem zor hem de çok zaman kaybına yol açacağından çeşitli konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlanmış ve besin ortamı hazırlanırken bu stok çözeltilerinin ortamın gerektirdiği konsantrasyonu içerecek miktarları kullanılmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, bozulmalarını önlemek için renkli cam şişelere konulup ağzuları dışarıdan hava girişini önleyecek biçimde sıkıca kapatılmış ve üzerlerine kullanılan madde, formülü, konsantrasyonu ve hazırlama tarihi yazılı etiketler yapıştırılarak +4 C'de buzdolabında saklanmıştır.

Hazırlanan besin ortamlarına ayrıca % 3 sakkaroz (30 g/l) ve % 0,6 agar (6 g/l) ilave edilmiştir. Agarın katılmasından önce pH'ı ayarlanan bu besin ortamları otoklavda steril edilerek steril petri kaplarına dökülmüş ve steril edilmiş olan bitki eksplantı sterilizasyonu bozmadan steril bir kabin içinde bu besiyerlerine ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1. Stok çözeltilerinin hazırlanması

3.2.1.1. Makro tuz stoğu (10x)

<u>Madde</u>	<u>Miktarı (g)</u>
Amonyum nitrat (NH_4NO_3)	16,5
Potasyum nitrat (KNO_3)	19,0
Kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4,4
Magnezyum sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3,7
Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4)	1,7

1 litrelik balonjojeye yaklaşık 700 ml distile su kondu. Daha sonra yukarıdaki kimyasallar sırayla tartılarak ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla maddelerin çözünmesi sağlanmıştır. Maddeler çözüldükten sonra karışımın hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Bu çözelti 10 misli konsantredir (10x), 1000 ml besiyeri hazırlamak için bu çözeltinin 100 ml.'si kullanılmıştır.

Makro tuz stoğu içerisindeki kimyasallar çökelti oluşturma eğilimindedirler. Bu yüzden bu stok oldukça dayanıksızdır. Besin ortamının kalitesi için makro tuz stoğu sık sık, az miktarlarda hazırlanmış ve kullanılırken içerisinde çökelti oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.1.2. Mikro tuz stoğu

Mikro tuz stoğu, hazırlanan iki ayrı stoğun karışımı şeklinde hazırlanmıştır. Önce aşağıdaki listede bulunan kimyasallardan sodyum molibdat'a kadar olan kısmın 1 L'lik balonjojede yaklaşık 700 ml su içinde çözünmesi sağlanmıştır.

<u>Madde</u>	<u>Miktar</u>
Borikasit (H_3BO_3)	620
Manganez Sülfat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1680
Çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	860

Potasyumiyodür (KI)	83
Sodyum molibdat (NaMoO ₄ .2H ₂ O)	25
.....	
Bakır sülfat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	2,5
Kobalt klorür (CoCl ₂ .6H ₂ O)	2,5

Bakır sülfat ve Kobalt klorür miktarları çok düşük olduğundan daha konsantre ayrı bir stok şeklinde hazırlanmış ve bu ortama katılmıştır. Bunun için 25 mg bakır sülfat ve 25 mg kobalt klorür tartılarak 100 ml distile su içinde çözünmesi sağlanmış ve bu çözeltilerden 10 ml alınıp (bu stoğun 10 ml.'sinde 2,5 mg bakır sülfat ve 2,5 mg kobalt klorür vardır) hazırlanan diğer çözeltilere eklenmiştir. Daha sonra hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Bu stok 100 misli konsantredir (100x), 1 litre besiyeri için sadece 10 ml kullanılmıştır.

3.2.1.3. Demir Stoğu (100x)

<u>Madde</u>	<u>Miktarı</u>
Demir sülfat (FeSO ₄ .7H ₂ O)	2,78
Sodyum EDTA (Na EDTA)	3,72

Diğer stokların hazırlanmasına benzer bir şekilde bu kimyasal maddelerin 1 litre distile su içinde çözünmesi sağlanmıştır. Eğer bu bileşenlerden biri kolayca çözünmezse sıcak yüzey üzerinde ısıtılır ve karıştırılarak çözünmesi sağlanır.

Oluşan çözelti 100 defa konsantredir (100x), bu stoğun 10 ml'si 1 litre ortam hazırlamak için kullanılmıştır.

Hazırlanan stok renkli şişelerde ve buzdolabında saklanmıştır. Demir stoğunun ışık karşısında dayanıksız olması nedeniyle karanlıkta kalmasına dikkat edilmiştir.

3.2.1.4. Vitamin stoğu

<u>Madde</u>	<u>Miktarı</u>
Inositol	10 g
Tiyamin	0,01 g
Pridoksin	0,01 g
Nikotinik asit	0,005 g

Stoğu oluşturan maddelerin yaklaşık 700 ml suda çözünmeleri sağlanarak hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Stoğun 10 ml'si 1 litre çözeltili için kullanılmıştır.

3.2.1.5. Hormon stokları

2,4-D

25 mg 2,4-D tartılmış ve bir behere konmuştur. Üzerine 5 ml damıtık su eklenmiştir. Çözünene kadar 1 M NaOH damlatılarak karıştırılmıştır. Damıtık su eklenerek 250 ml'ye tamamlanmıştır. Bu stok her ml'sinde 0,1 mg 2,4-D içermektedir.

Kinetin

Kinetin stoğu da 2,4-D'ye benzer bir şekilde hazırlanmıştır. Önce 25 mg kinetin tartılarak bir behere konmuş ve üzerine 5 ml distile su eklenmiştir. 2,4-D'den farklı olarak hormon kristallerinin çözünmelerini sağlamak için 1 M NaOH yerine damla damla 1 M HCl eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra distile su eklenerek 250 ml'ye tamamlanmıştır. Bu stok her mililitresinde 0,1 mg kinetin içermektedir.

3.2.2. Besi ortamı karışımının hazırlanması

<u>Madde</u>	<u>Miktarı</u>
Sakkaroz	30 g
Makro stok	100 ml

Mikro stok	10 ml
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,221 g
Vitamin stok	10 ml
Demir stok	10 ml

İçlerinde yaklaşık 700 ml distile su bulunan balonjokelere yukarıdaki listede bulunan maddelerin belirtilen miktarları konularak çözünmeleri sağlanmıştır. Etkisi araştırılmak istenen hormonlar literatürde (Mizutani vd 1997, Shim vd 1999, Mischenko vd 1999, van Tegelen vd 1999) en çok kullanılan miktarlarda tek veya birlikte (çizelge 3.1) eklendikten sonra karışım distile su eklenerek 1 litreye tamamlanmıştır. pH ayarı yapıldıktan sonra 6 gram agar ilave edilmiş ve otoklavda sterilizasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Ortamlarda bulunan hormonlar ve miktarları

Ortam	2,4-D	Kinetin
1	2 mg/L	–
2	2 mg/L	2 mg/L
3	–	2 mg/L
4	–	–

3.2.3. pH Ayarı

PH Ayarı besin ortamına agar ilave edilmesinden önce yapılmıştır. Ölçüm öncesi pH-metrenin kalibrasyonu yapılmıştır. Besin ortamlarının pH'ı taranan literatürlere uygun olarak 5,7 - 5,8 aralığına ayarlanmıştır. Bunun için önce ortamın pH'ı ölçülmüştür. Eğer istenilen değerden daha asidik ise 1 M NaOH, eğer istenilen değerden daha bazik ise 1 M HCl damlatılarak pH ayarı yapılmıştır.

3.2.4. Sterilizasyon

3.2.4.1. Eksplantın sterilizasyonu

- 1) Kök parçalarının üzerindeki toprak temizlenmiştir.
- 2) Kökün üzerini saran  l  kabuk tabakası soyulmuş ve kökler yaklaşık 3-4 cm uzunluğunda parçalara kesilmiştir.
- 3) Kökler eşme suyuyla yıkanmıştır.
- 4) Kökler, içinde deterjan bulunan distile suda yıkanmıştır.
- 5) Eksplantlar üzerlerindeki deterjandan arındırılmak için distile su ile yıkanmıştır.
- 6) % 70'lik etil alkolde 1 dakika tutulmuştur.
- 7) Alkolden sonra tekrar distile sudan geirilmifitir
- 8) Ağzı sıkıca kapatılmış cam kaplar içinde % 15'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika çalkalanmıştır.
- 9) Daha sonraki işlemler laminar flow kabin içerisinde gerekleştirilmifitir. Burada eksplantlar 3 kez steril distile su ile iyice yıkanmış ve su s z lm şt r.

3.2.4.2. Besin ortamı sterilizasyonu

Agar ilavesinden sonra sterilizasyon için besin ortamlarının bulunduğu cam kapların ağızları pamuk tıkala kapatılarak üzeri alüminyum folyo ile sarılmış ve otoklavda 121  C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.2.4.3. Diğer malzemelerin sterilizasyonu

Ekim alışmaları sırasında kullanılan kurutma kağıtları küçük parçalar halinde (petriye sığabilecek boyutta) kesilmiş ve bir petri kabına konularak dış yüzeyi alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Kullanılan diğer cam (petri kapları) ve metal malzemeler de (bistüri, pens, vb.) alüminyum folyo ile sarılarak steril edilmiştir. Cam malzemelere etüvde 150  C'de 2 saat kuru sterilizasyon uygulanmıştır. Metal malzemeler ise otoklavda (15 dakika, 121  C) steril edilmiştir.

3.2.4.4. Ekim odasının sterilizasyonu

Ekim odasının tabanı % 5'lik sodyum hipoklorit, kabin ise % 5'lik zefiran ile silinmiştir. Daha sonra kabin için uv-c lambası ile 24 saat süre ile sterilizasyona devam edilmiştir.

3.2.5. Eksplantların besin ortamlarına ekimi

Otoklavda sterilizasyonu yapılan besin ortamlarının sıcaklıklarının vücut sıcaklığına (36-37 °C) kadar düşmesi için beklenmiştir. Daha sonra laminar flow kabinde sterilizasyonu bozmamaya dikkat ederek besin ortamı steril petrilere dökülmüştür. Petrilerin üzerine ortamın adı, ekim tarihi yazılmıştır.

Besin ortamları soğuyup katılaştıktan sonra eksplant olarak kullanılacak steril edilmiş bitki kökleri steril kurutma kağıtları üzerine alınarak alkol ve alevden geçirilmiş pens ve bistüri kullanılarak trimlenmiştir. Trimleme sonucu istenmeyen doku parçaları ve ölü kısımları uzaklaştırılmış 0,5-1 cm³ büyüklüğündeki eksplantlar her petri kabına 3-4 adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Her ortam için 10-12 petriye ekim yapıldı ve denemeler 3'er defa tekrarlandı.

3.2.6. İnkübasyon

Kallus oluşumu için ekimi tamamlanan petriler 25±1 °C ve sürekli karanlık periyoda ayarlanmış inkübatöre alınmıştır. Belirli sürelerde petriler kontrol edilerek kontamine olanlar inkübatörden çıkarılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Doku kültürü yoluyla *Rubia tinctorum* L. bitkisinden kallus elde etme çalışmalarında literatür bilgileri dikkate alınarak besin ortamı olarak MS ortamı kullanıldı. Eksplant olarak ise bitkinin kökleri kullanıldı. Eksplantın kök olmasından dolayı sterilizasyonda zorluklar yaşandı. İlk denemelerde tüm örnekler kontaminasyona uğradı. Yapılan denemelerde sterilizasyonun süresi ve niteliği artırılarak birkaç deneme sonra kontaminasyonun önüne kısmen geçilebildi. Steril edilen eksplantların çizelge 3.1’de verilen hormon karışımlarıyla hazırlanan besin ortamlarına ekimi yapıldı. İnkübasyon bir ay süresince 25 ± 1 °C’ de karanlık ortamda gerçekleştirildi. Kontaminasyonun önüne geçilebildikten sonra yapılan ekimlerde kullanılan eksplant (örnek) sayısı ve kontaminasyon oranı çizelge 4.1’de verilmiştir. Tüm eksplantları kontamine olan petriyer sayılmamıştır.

Çizelge 4.1. Denemelerde kullanılan eksplant sayısı ve kontaminasyon oranı.

Ortam	Eksplant (Örnek) Sayısı	Kontaminasyon Oranı (%)	Kontamine Olmayan Örneklerin Oranı
1 2mg/L 2,4-D	72	25 / 72 % 34,7	47 / 72 % 65,3
2 2mg/L 2,4-D 2mg/L Kinetin	66	21 / 66 % 31,8	45 / 66 % 68,2
3 2mg/L Kinetin	68	27 / 68 % 39,7	41 / 68 % 60,3
4 Hormonsuz	77	33 / 77 % 42,9	44 / 77 % 57,1

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi 1. ortamda kullanılan 72 eksplantın 25’i, 2. ortamda kullanılan 66 eksplantın 21’i, 3. ortamda kullanılan 68 eksplantın 27’si ve 4 nolu ortamda kullanılan 77 eksplantın 33 tanesi kontamine olmuştur.

Kontamine olmayan eksplantlarda kallus oluşturma oranı 1 nolu (2mg/L 2,4-D) ortamda %49; 2 nolu (2 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L Kinetin) ortamda %66,7; 3 nolu (2 mg/L Kinetin) ortamda %61; 4 nolu (hormonsuz) ortamda ise %52,3 olarak gözlemlendi. Bu değerler ile ortama renk veren ve organ geliştiren eksplantların oranları çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kontamine olmayan eksplantlarda kallus oluşturma, ortama renk verme ve organogenez oranları.

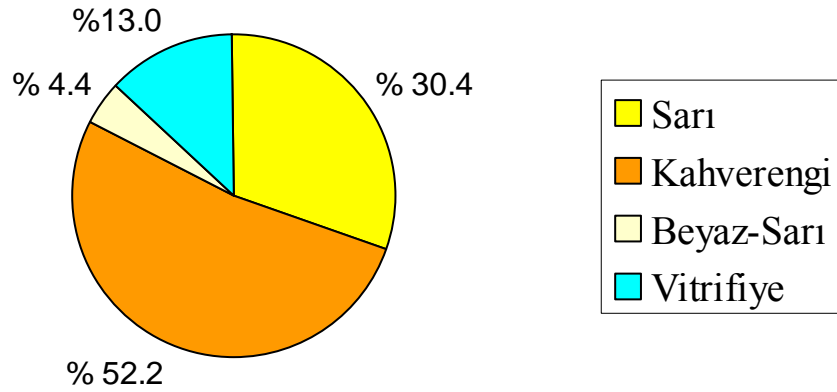
Ortam	Kallus Oluşturma Oranı (%)	Renk Verme Oranı (%)	Organogenez Oranı (%)
1 2mg/L 2,4-D	23 / 47 % 49	8 / 47 % 17	0 / 47 % 0
2 2mg/L 2,4-D 2mg/L Kinetin	30 / 45 % 66,7	2 / 45 % 4,4	0 / 45 % 0
3 2mg/L Kinetin	25 / 41 % 61	0 / 41 % 0	4 / 41 % 9,8
4 Hormonsuz	23 / 44 % 52,3	0 / 44 % 0	8 / 44 % 18,2

Çizelge 4.3’de ise oluşan kallusların niteliği ve bu niteliğin görülme oranı verilmektedir. 1 nolu ortamda sarı (şekil 4.5), kahverengi, beyaz-sarı ve vitrifiye (camsı) kallus oluşumu gözlemlendi. Oranlar ise sırasıyla %14,9; 25,5; 2,1 ve 6,4 olarak gerçekleşti. 1 nolu ortamda oluşan kallus miktarı içinde bu değerleri oranlayacak olursak %30,4 sarı, %52,2 kahverengi, %4,4 beyaz-sarı, %13,0 oranında vitrifiye kallus görüldü (şekil 4.1).

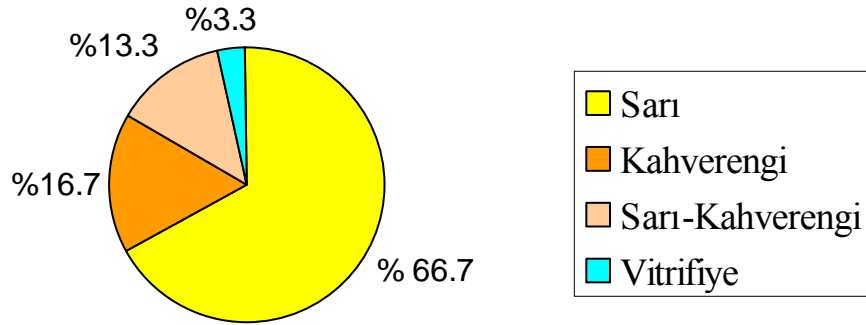
2 nolu ortamda sarı (%44,4) (şekil 4.6), kahverengi (%11,1), sarı-kahverengi (%8,9) ve vitrifiye (%2,2) kallus görüldü. Bu kallusların karşılaştırmalı oranları (şekil 4.2) ise sırasıyla %66,7; 16,7; 13,3 ve 3,3 olarak bulundu.

Çizelge 4.3. Oluşan kallusların niteliği ve görülme oranları

Ortam	Kallus Oluşturma Oranı	Kallusun Niteliği						
		Beyaz	Beyaz-Sarı	Sarı	Sarı-Kahverengi	Kahverengi	Kırmızı	Vitrifiye (Camsı)
1 2mg/L 2,4-D	Genel Oran	-	1 / 47 % 2,1	7 / 47 %14,9	-	12 / 47 % 25,5	-	3 / 47 % 6,4
	Kallusa Göre	-	% 4,4	% 30,4	-	% 52,2	-	% 13,0
2 2mg/L 2,4-D 2mg/L Kinetin	Genel Oran	-	-	20 / 45 % 44,4	4 / 45 % 8,9	5 / 45 % 11,1	-	1 / 45 % 2,2
	Kallusa göre	-	-	% 66,7	% 13,3	% 16,7	-	% 3,3
3 2mg/L Kinetin	Genel oran	3 / 41 % 7,3	1 / 41 % 2,4	12 / 41 % 29,3	-	9 / 41 % 22,0	-	-
	Kallusa göre	%12,0	% 4,0	% 48,0	-	% 36,0	-	-
4 Hormon- suz	Genel oran	1 / 44 % 2,3	5 / 44 % 11,4	12 / 44 % 27,3	-	3 / 44 % 6,8	2 / 44 % 4,6	-
	Kallusa göre	% 4,4	% 21,7	% 52,2	-	% 13,0	% 8,7	-

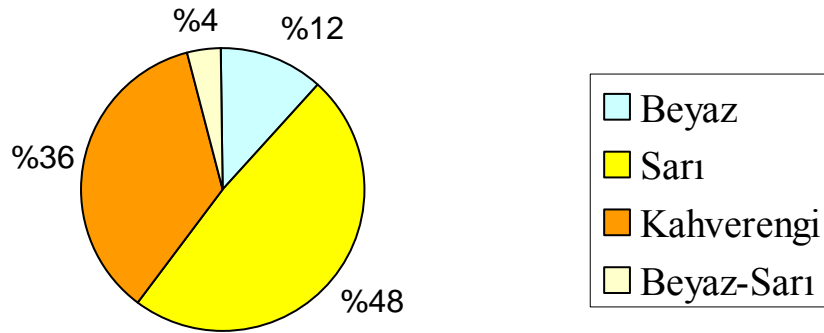


Şekil 4.1. 1 nolu ortamda oluşan kallusların yüzdeleri oranları



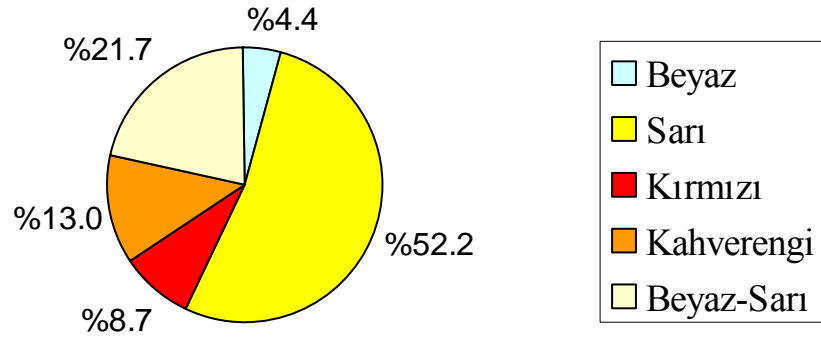
Şekil 4.2. 2 nolu ortamda oluşan kallusların yüzdeleri oranları

3 nolu ortamda gözlenen kalluslar, beyaz (%7,3), sarı (%29,3), kahverengi (%22,0), beyaz-sarı (%2,4)'dir. Bu kallus miktarlarının karşılaştırmalı oranları (şekil 4.3) sırasıyla %12, 48, 36 ve 4'tür. Bu ortamda doğrudan kök gelişimi (organogenez) de gözlemlendi (şekil 4.7).



Şekil 4.3. 3 nolu ortamda oluşan kallusların yüzdeleri oranları

4 nolu ortamda gözlenen kallus çeşitleri ve oranları ise şöyledir: Beyaz %2,3; sarı %27,3; kırmızı %4,6; kahverengi %6,8; beyaz-sarı %11,4. Kendi aralarında karşılaştırmalı oranları ise beyaz %4,4; sarı %52,2; kırmızı %8,7; kahverengi %13,0; beyaz-sarı %21,7'dir (şekil 4.4). Bu ortamda oluşan kallus miktarı diğer ortamlara göre daha azdır. Buna karşılık çok gelişmiş kökler ve zayıf gövde oluşumları gözlemlendi (şekil 4.8).



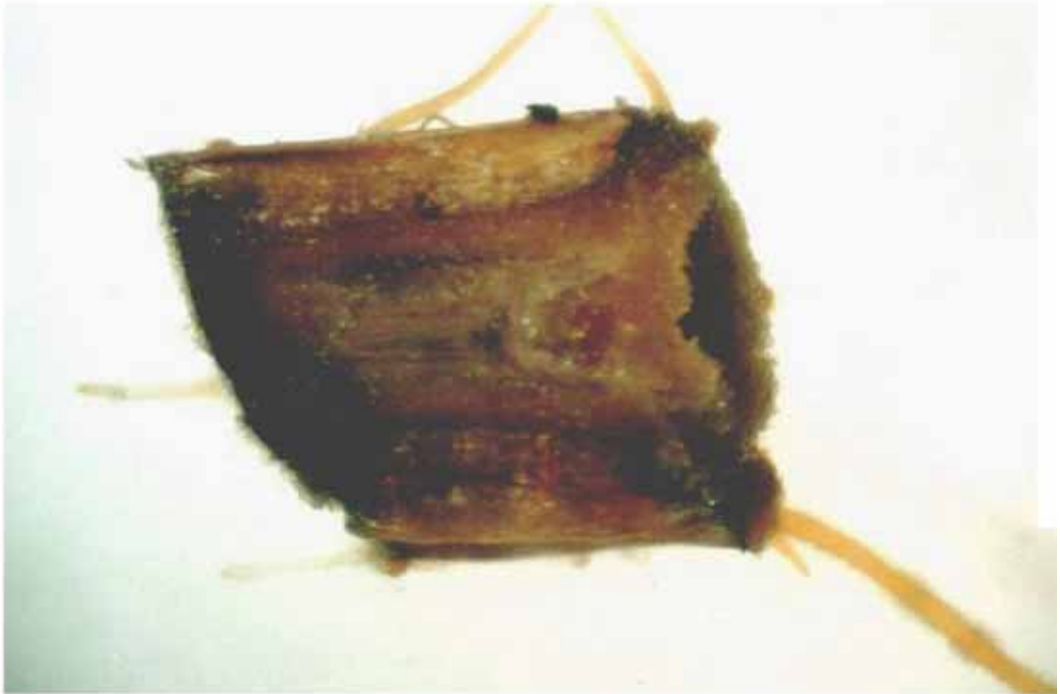
Şekil 4.4. 4 nolu ortamda oluşan kallusların yüzdeler oranları



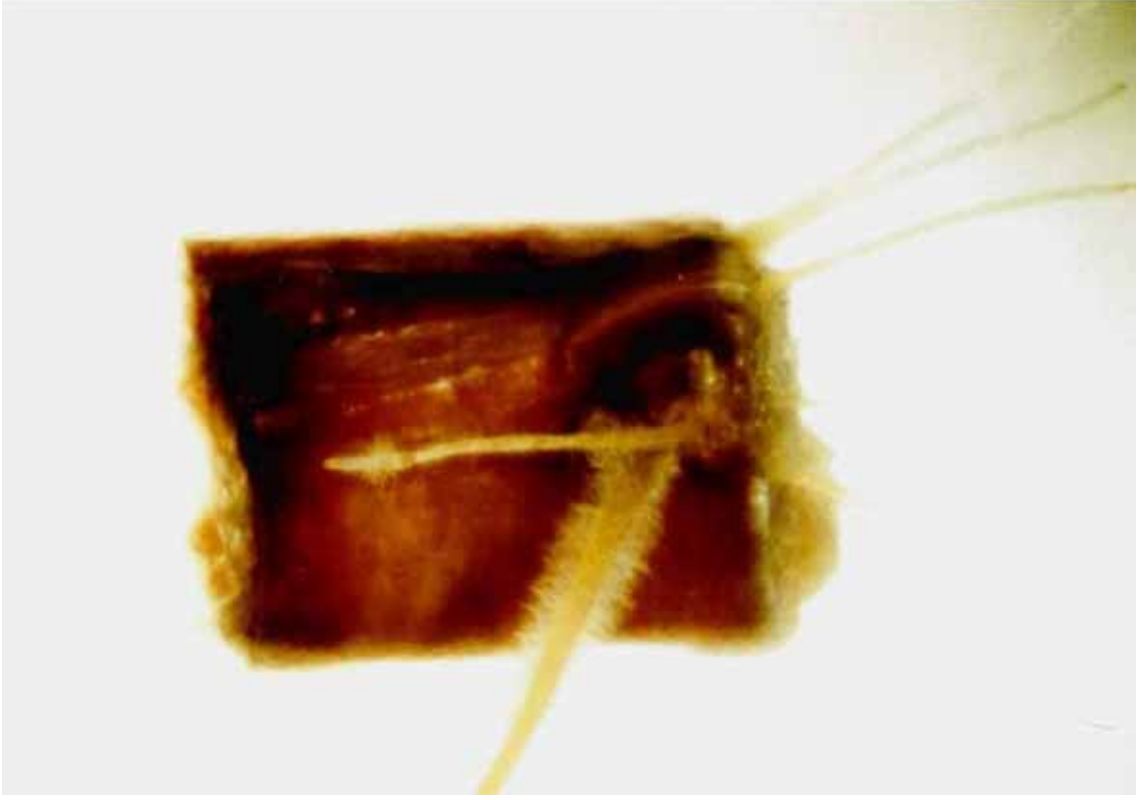
Şekil 4.5. 2 mg/L 2,4-D içeren 1 nolu MS ortamında oluşan yoğun, sarı ve kahverengi kallus



Şekil 4.6. 2 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L Kinetin içeren 2 nolu MS ortamında oluşan yoğun kallus



Şekil 4.7. 2 mg/L Kinetin içeren 3 nolu MS ortamında kallus ve kök oluşumu



Şekil 4.8. Hormonsuz MS ortamında kök ve zayıf gövde gelişimi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Rubia tinctorum L. Anadolu'da çok yaygın olarak yetişen bir türdür. En eski medeniyetlerin yer aldığı Akdeniz bölgesinde İ.Ö. 2000 yılından beri dokuma boyamasında kullanılmaktadır (Angelini vd 1997). Özellikle 1700'lü yıllarda dünya kırmızı kumaş boyası ihtiyacının 2/3 si Batı ve Orta Anadolu'da tarımı yapılan *R. tinctorum* L. kökleri ile karşılanıyordu. 19. y.y. sonlarında sentetik boyaların üretimi ile bu bitkinin tarımı tamamen yok olmuştur. Fakat son yıllarda bitkilerden elde edilen pigmentlerle boyamanın daha kaliteli, insan sağlığına uygun ve daha çevreci olduğu ortaya çıkmıştır. İtalya, boyama amacı ile Güney Amerika ve Afrika'dan *R. tinctorum* L. başta olmak üzere çeşitli boya bitkileri ithal etmektedir (Angelini vd 1997).

R. tinctorum L.'un boyama özelliği köklerinde bulunan alizarin, ruberitrik asit, purpurin gibi çeşitli AK'lardan ileri gelmektedir. *Rubia* türlerinin tarımının yanı sıra, daha kolay, sürekli ve ucuz ürün alabilmek için doku kültürü yolu ile bu sekonder metabolitlerin elde edilmesi üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Angelini vd 1997, Sato vd 1991, Mizutani vd 1997, Mischenko vd 1999, Shim vd 1999, Bóka vd 2002, Abdullah vd 2003). Renkli maddeler bu bitkinin köklerinde yoğun olarak bulunmaktadır ve bu amaçla kullanılan kısmı da kökleridir. Bu sebeple bu çalışmada, *R. tinctorum* L.köklerinin doku kültürüne cevabı araştırılmıştır. Eksplant olarak alınacak bitki kısımları çok önemlidir. Örneğin, sekonder metabolit çalışmalarında istenen maddenin en çok bulunduğu organdan eksplant alınması gerekir. *R. tinctorum* L'da eksplantları, boyar maddenin en çok bulunduğu köklerden alınmıştır. Endemik bir kök boya bitkisi olan *Arnebia densiflora*'da benzer çalışma yapan Kurnaz (2002) ve Övet (2003) de özellikle boyar maddenin yoğun olduğu kök eksplantları ile çalışmışlardır. Bu araştırmacılar da, bu çalışmada olduğu gibi eksplant kaynağından gelen yoğun kontaminasyon problemi ile karşılaşmışlardır. Eksplantta yapılan ön yıkama, yüzey sterilizasyonunda kullanılan sodyum hipokloritin ve sürenin kademeli olarak artırılması ile bu sorun kısmen çözülmüştür.

Ercan (1996) *Rubia tinctorum* L. da yaptığı mikroüretim çalışmasında, gövde, nod ve yapraklardan aldığı eksplantlardan doku kültürü yolu ile yeni bitkicikler oluşturmaya

çalışmış ve nodlara göre yaprak dokularının organogenez yeteneğinin daha fazla olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, kök eksplantlarında hormonsuz ve kinetini ortamlarda organ oluşumu gözlemlendi (Çizelge 4.2, Şekil 4.7 ve 4.8). Ancak hormonsuz ortamdaki organ gelişimi kinetini ortamdakine oranla daha fazladır. Bu sonuçlar hormonsuz ortamın organogenezini daha çok teşvik ettiğini göstermektedir.

R. akane de AK'ların biyosentez yollarının tespiti için yapılan hücre süspansiyon kültürlerinde (Han vd 2001), AK'ların üretimi amacı ile yapılan doku kültürlerinde (Mizutani vd 1997) en iyi sonuçları, ortam olarak MS ve hormon olarakta, 2 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L Kinetin ile almışlardır. Ercan (1996) da en iyi sonucu, benzer şekilde 2 mg/L BAP kullandığı MS ortamında almıştır. Bu çalışmada 2 mg/L 2,4-D ve 2 mg/L Kinetin tek tek ve karışım halinde kullanıldı. Karışım ve tek başına Kinetin kullanıldığında başarılı sonuçlar (%66,7, 61) elde edildi. Fakat 2,4-D li ve hormonsuz ortamlarda elde ettiğimiz sonuçlar da bunlara oldukça yakındır (%49, 52,3).

Sato vd (1991) tarafından *Rubia tinctorum* L. doku kültüründe, *Agrobacterium rhizogenes*' le infeksiyon sonucu oluşan saçak köklerde NAA, IAA, 2,4-D ve Kinetin fitohormonları ile sükröz konsantrasyonunun etkisi araştırılmış, 0,5 veya 5 µM IAA içeren ortamda kök oluşumunun 19 kat daha fazla arttığı belirtilmiştir. Ayrıca 2,4-D ilave edilmiş ortamda saçak kök gelişiminin az olduğu ve 0,5 µM NAA ile Kinetin veya 2,4-D (Kinetinli veya Kinetinsiz) kombinasyonu eklenince kallus oluşumunu azalttığı köklerde sarıdan kıvrımsı kahverengiye doğru bir renk değişikliği görüldüğü bildirilmektedir. Saçak köklerin yaş ağırlığı, 23 gün sonra hormonsuz sıvı MS ortamında yaklaşık 7,5 katına çıkmış, 5 µM NAA ve Kinetin veya 2,4-D eklenince köklerde alizarin daha fazla miktarda biriktirilmiştir. Çalışmamızda yalnız 2,4-D içeren ortamda gelişimin az olduğunu, 2,4-D'nin yanında Kinetin içeren veya sadece Kinetin içeren ortamlarda kallusun daha iyi geliştiğini gözledik. Bütün denemelerimizde sarı ve kahverenkli kallus oluşumu görüldü (Çizelge 4.3).

Bóka vd (2002), maksimum hücre bölünmesinin 7-14. günler arasında olduğunu belirtmiştir. Bizim örneklerimizde de benzer şekilde 7 ve 14. günler arasında maksimum oranda kallus üremiştir.

Mizutani vd (1997), *Rubia akane* NAKAI ile yaptıkları çalışmada 30 g/L sükröz, 1.0 mg/L 2,4-D ve 2.0 mg/L Kinetin içeren MS ortamında kök ve gövde nodlarında kallus üretmeyi denemiş, sadece gövdeden kallus üretmeyi başaramışlardır. Bizim çalışmamızda ise benzer hormon ve şeker konsantrasyonunu içeren MS ortamında *Rubia tinctorum* L. köklerinden % 60'ın üzerinde bir verimle kallus üretmeyi başardık.

AK lar hücre içinde oluşmaktadır. Boyar madde olarak kullanıldığında veya hücre süspansiyon kültürü ile elde edilmesine çalışıldığında hücre dışına çıkması daha kullanışlıdır. Mischenko vd (1999), Shim vd (1999) ve Bóka vd (2002) başta olmak üzere pek çok araştırmacı, bu amaçla kültür ortamına çeşitli kimyasal maddeler (örn: tween-80) ve mantarlar gibi uyarıcılar katarak hem oluşan sekonder metabolit miktarını artırmaya hemde sekonder metabolitin kültür ortamına geçmesini sağlamaya çalışmışlardır. Çalışmalarımızda sadece 2,4-D içeren 1 nolu ortamda % 17 oranında ortama renk verme olayı görüldü. Ayrıca 2,4-D ve Kinetin hormonlarının karışım halinde kullanıldığı 2 nolu ortamda da % 4,4 oranında renklenme görülmüştür. Bu olay kallus kültürlerimizde oluşan antrakinonların ortama da çıktığını göstermektedir.

Kök boya bitkisinden elde edilen boyar maddelerin sentetiklere oranla daha sabit, estetik, insan sağlığına uygun ve çevreci olması, antrakinon pigmentlerinin farmasötik özelliklerinin ortaya çıkması gibi nedenlerle Kök Boya bitkisi günümüzde oldukça önem kazanmaktadır. Ticari olarak en kısa sürede maksimum antrakinon üretimi hedeflendiği düşünülürse, tüm bitkiyi elde etmek yerine *in vitro* koşullarda kallus ve köklerin oluşturulup, bunlardan ihtiyaç duyulan maddelerin ekstre edilmesi, bitkinin kültüründe sorun olan süreyi kısaltacaktır. Ayrıca doku kültürü yoluyla elde edilen kallus ve köklerden normal bitkiye oranla iki kat fazla antrakinon elde edilebilmektedir (van Tegelen vd 1999, Han vd 2001, Bóka vd 2002).

Bundan sonraki çalışmalarımızda hücre ve doku kültürü yoluyla antrakinonların elde edilerek, miktarlarının belirlenmesi yönünde çalışmalar yapılacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdullah, S.T., Ali, A., Hamid, H., Ali, M., Ansari, S.H. & Alam, 2003. Two new anthraquinones from the roots of *Rubia cardifolia* Linn. *Pharmazie* 58; 3. 216-217.
- Angelini, L.G., Pistelli, L., Belloni, P., Bertoli, A. & Panconesi, S. 1997. *Rubia tinctorum* L. a source of natural dyes: Agronomic evaluation, quantitative analysis of alizarin and industrial assays. *Ind. Crop. Prod.* 6; 303-311.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. 2001. Bitki Biyoteknolojisi –1- Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniv. Vakfı Yayınları. 1-23,221,251.
- Baytop, T. 1983. Farmasötik Botanik. İstanbul Üniversitesi Yayınları: 3158, Eczacılık Fakültesi Yayınları: 36, İstanbul.
- Blömeke, B., Poginsky, B., Schmutte, C., Marquardt, H., Westendorf, J. 1992. Formation of genotoxic metabolites from anthraquinone glycosides, present in *Rubia tinctorum* L. *Mutat Res*, 265; 263-272.
- Bóka, K., Jakab, J. and Kırály, I. 2002. Comparison of the effect of different fungal elicitors on *Rubia tinctorum* L. suspension culture. *Biologia Plantarum*, 45(2); 281-290.
- Brown, D.C.W., Thorpe, T.A. 1995. Crop improvement through tissue culture. *World J. Microbiology Biotechnics*, 11; 409-415.
- Chang, P. & Chen, C. 1995. Isolation and characterization of antitumor anthraquinones from *Morinda umbellata*. *Chin. Pharm. J.* 47; 347-353 Taipei.
- Davis, P.H. 1982 *Flora of Turkey*. Vol; 7 Edinburgh.
- El-Emary, N.A. & Backheet, E.Y. 1998. Three hydroxymethylanthraquinone glycosides from *Rubia tinctorum* L. *Phytochemistry*, 49; 277-279.
- Endo, M., Sakata, K. & Katayama, A. 1997. The pigments in the callus of *Rubia akane* and their dyeing properties. *Nippon Sanshigaku Zasshi*, 66; 107-112.
- Enez, N. 1987. Anadolu'da yün boyamacılığında kullanılmış olan bitkiler ve doğal boya larla yün boyamacılığı. Marmara Üniversitesi G.S.F. Yayınları, No: 1, Türkiye.
- Ercan, A.G. 1996. Kök boyası (*Rubia tinctorum* L.) bitkisinin in vitro koşullarda rejenerasyon yeteneğinin araştırılması. Akdeniz Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.

- Han, Y. S., Van der Heijden, R., Lefeber, A.W.M., Erkelens, C. & Verpoorte, R. 2001. Biosynthesis of anthraquinones in cell culture of *Cinchona* 'Robusta' proceeds via the methylerythritol 4-phosphate pathway. *Phytochemistry*.
- Ismail, N.H., Ali, A.M., Aimi, N., Kitajima, M., Takayama, H. & Lajia, N.H. 1997. Anthraquinone from *Morinda elliptica*. *Phytochemistry*, 45; 1723-1725.
- Itokawa, H., Qiao, Y. & Takeya, K. 1989. Anthraquinones and naphthohydroquinones from *Rubia cardifolia*. *Phytochemistry*, 28; 3465-3468.
- Itokawa, H., Qiao, Y. & Takeya, K. 1991. Anthraquinones, naphthoquinones and naphthohydroquinones from *Rubia oncotricha*. *Phytochemistry*, 30; 637-640.
- Itokawa, H., Ibraheim, Z. Z., Qiao, Y. & Takeya, K. 1993. Anthraquinones, naphthohydroquinones and naphthohydroquinone dimers from *Rubia cardifolia* and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm.Bull.* 41(10) 1869-1872.
- Kawasaki, Y., Goda, Y. & Yoshihira, K. 1992. The mutagenic constituents of *Rubia tinctorum* L. *Chem. Pharm. Bull.* 40; 1504-1509.
- Knorr, D., Caster, C., Dorneburg, H., Dorn, R., Graf, S., Havkin-Frenkel, D., Pddtolski, A., Werrman, U. 1993. Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue cultures. *Food Technol*, 12; 57-63.
- Koblitz, H. 1988. Anthraquinones. In: Constabel F. and Somatic Cell Genetics of Plants. 5:113-139, Academic Press, Newyork, London.
- Koumaglo, K., Gbeassor, M., Nikabu, O., Souza, C.D. & Werner, W. 1992. Effects of three compounds extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum*. *Planta Med.* 58; 533-534.
- Kuo, S.C., Chen, P.R., Lee, S.W. & Chen, Z.T. 1995. Constituents of Rubiaceae plants in Taiwan. Part 2. Constituents of root of *Rubia lanceolata* hayata. *J. Chin Chem. Soc. (Taipei)* 42; 869-871.
- Kurnaz, N., 2002. *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. Bitkisinin Doku Kùltürüne Cevabı. YL. Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kyte, L. 1987. Plants from test tubes. An Introduction to Micropropagation, Timber Press, Portland, Oregon. 51-52.
- Leistner, E. 1985. Biosynthesis of chorismate-derived quinones in plant cell cultures. In: Neumann, K.H., Barz, W. & Reinhard, E. Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures (pp 215-224). Springer-Verlag, Berlin, New York.

- Lodhi, A.H. & Charlwood, B.V. 1996. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation *Rubia peregrina* L: In vitro accumulation of anthraquinones. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46; 103-108.
- Maheswari, N., Rajyalahsmi, K., Baneja, K., Dhir, S.K., Chowdry, C.N., Maheswari, S.C. 1995. In vitro culture of Wheat and genetic transformation. Retrospect and prospect. *Critic. Rev. Plant Sci.*, 14 (2); 149-178.
- Marec, F., Kollárova, I., & Jegorov, A., 2001. Mutagenicity of natural anthroquinones from *Rubia tinctorum* L. in the *Drosophila* wing spot test. *Planta medica*, 67; 127-131.
- Memişoğlu, M. 2000. Doku Kültürü Metodları ile *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. Bitkisinden Kallus Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, G. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognazi Anabilim Dalı, Ankara. 62-64.
- Mischenko, N.P., Fedoreyev, S.A., Glazunov, V.P., Chernoded, G.K., Bulgakov, V.P. & Zhuravlev, Y.N. 1999. Anthraquinone production by callus cultures of *Rubia cardifolia*. *Fitoterapia*, 70; 552-557.
- Mizutani, H., Hashimoto, O., Nakashima, R. & Nagai, J. 1997. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Rubia akane* NAKAI. *Biosci. Biotech.* 61; 1743-1744.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15; 473-497.
- Ochatt, S. J., Power, J. B. 1992. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: MW Fowler, GS Warren, M Moo-Young (eds) *Plant Biotechnology: Comprehensive Biotechnology*, Second supplement, 99-127.
- Okuyama, E., Sato, K. & Yoshihira K. 1990. 2-ethoxycarbonyl-1-hydroxyanthraquinone from *Rubia akane*. *Phytochemistry*, 29; 3973-3974.
- Övet, B., 2003. *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. Bitkisinin farklı hormon konsantrasyonları içeren MS ortamına yanıtı. YL. Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Rath, G., Ndonzao, M. & Hostettmann, K. 1995. Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida*. *Int. J. Pharmacogn.* 33; 107-114.

- Sato, K., Kubota, H., Goda, Y., Yamada, T. & Maitani, T. 1997. Glutathione enhanced anthraquinone production in adventitious root cultures of *Rubia tinctorum* L. *Plant Biotechnol*, 14; 63 –66.
- Sato, K., T. Yamazaki, E. Okuyama, K. Yoshihira, K. Shimomura 1991. Anthraquinone production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum* L.: Influence of Phytohormones and sucrose concentration. *Phytochemistry*, 30; 1507-1509.
- Sato, K., Y. Goda, Y. Kawasaki, E. Okuyama, K. Yoshihira, Y. Ozeki and M. Nakamura, 1992. Characteristic of anthraquinone production in plant roots and cell suspension cultures of *Rubia tinctorum* L. and *R. akane*. *Plant Tissue Culture Letters*, 9(3); 220-226.
- Schulte, V., El-Shagi, H., Zenk, M. H. 1984. Optimization of 19 Rubiaceae species in cell culture for production of anthraquinones. *Plant Cell Rep.* 33; 51-54.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Leblebici, E., Görk, G., Bekat, L. 1989. Tohumlu Bitkiler Sistematigi. Ege Üniv. Basımevi, Bornova, İzmir.
- Shin, S.H., Chi, H.J. 1989. Current studies of tissue culture of some medical plants in Korea. In: *Proc. Int. Sym. on New Drug Development from Natural Products*, pp. 79-95, May 2-3, Seoul.
- Shim, J.J., Shin, J.H., Pai, T., Chung, I.S., Lee, H.J. 1999. Permeabilization of elicited suspension culture of madder (*Rubia akane* Nakai) cells for release of anthraquinones. *Biotechnology Techniques*, 13; 249-252.
- Sittie, A.A., Lemmich, E., Olsen, C.E., Hviid, L., Kharazmi, A., Nkrumah, F.K. & Christensen, S.B. 1999. Structure-activity studies: *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida*. *Planta Med.* 65; 259-261.
- Strobel, J., Hieke, M., Gröger, D. 1991. Increased anthraquinone production in *Galium vernum* cell cultures induced by polymeric adsorbents. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 24; 207-210
- Suzuki, H., Matsumoto, T., Mikami, Y. 1984. Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones by *Rubia cordifolia* plant cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* 48; 603-610.
- Talapatra, S.K., Sarkar, A.C., Talapatra, B. 1981. Two pentacyclic triterpenes from *Rubia cordifolia*. *Phytochem.* 20;1923-1927.

- Thomson, R.H. 1987. Naturally Occurring Quinones. III. Recent Advances. Chapman and Hall, London.
- Tóth, Z.A., Raatikainen, O., Naaranlahti, T. and Auriola, S. 1993. Isolation and determination of alizarin in cell culture of *Rubia tinctorum* L. and emodin in *Dermocybe sanguinea* using solid-phase extraction and high- performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 630; 423-428.
- Tripathi, Y.B., Sharma M. & Manickam, M.1997. Rubiadin, a new antioxidant from *Rubia cordifolia*. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 34; 302-306.
- Van den Berg, A.J.J. & Labadie, R.P. 1989. Quinones. In: Harborne JB (ed) *Methods In Plant Biochemistry*, 1; 451-491. Academic Press Limited, London.
- Van Tegelen, L.J.P., Bongaerts, R.J.M., Croes, A.F., Verpoorte, R. & Wullems. G.J. 1999. Isochorismate synthase isoform from elicited cell cultures of *Rubia tinctorum* L. *Phytochemistry*, 51; 263-269.
- Vidal-Tessier, A.M., Delaveau, P. & Chamğion, B. 1987. New anthraquinones of *Rubia cardifolia* L. roots. *Ann. Pharm. Fr.*, 45; 261-267.
- Younos, C., Rolland, A. Fleurentin, J., Lanhers, M., Misslin, R. & Mortier, F 1990. Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrofolia*. *Planta Med.* 56; 430-434.

ÖZGEÇMİŞ

Antakya'da 1977 yılında doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Antakya'da tamamladı. 1996 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2000 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu. Şubat 2001'de Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a kabul edildi.