

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE GÜNCEL UYGULAMALAR VE DEĞERLENDİRMELER

Editörler

Güngör YILMAZ & Tünay KARAN



LIVRE DE LYON

Natural Sciences

2023

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE GÜNCEL UYGULAMALAR VE DEĞERLENDİRMELER

Editörler

Güngör YILMAZ & Tünay KARAN



LIVRE DE LYON

Lyon 2023

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE GÜNCEL UYGULAMALAR VE DEĞERLENDİRMELER

Editörler

Güngör YILMAZ & Tünay KARAN



LIVRE DE LYON

Lyon 2023

Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Uygulamalar ve Değerlendirmeler

Editors • Prof. Dr. Güngör YILMAZ • Orcid: 0000-0003-0070-5484

Assoc. Prof. Dr. Tünay KARAN • Orcid: 0000-0002-9114-8400

Cover Design • Motion Graphics

Book Layout • Motion Graphics

First Published • December 2023, Lyon

ISBN: 978-2-38236-635-6

copyright © 2023 by **Livre de Lyon**

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without prior written permission from the Publisher.

Publisher • Livre de Lyon

Address • 37 rue marietton, 69009, Lyon France

website • <http://www.livredelyon.com>

e-mail • livredelyon@gmail.com



LIVRE DE LYON

ÖNSÖZ

Değerli okurlar;

Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Uygulamalar ve Değerlendirmeler adlı bu kitapta yer alan bölümler alanında uzman değerli akademisyenler tarafından hazırlanmıştır. Bitki biyoteknolojisinin geleceği ve bitki genetik kaynaklarının korunması bölüm olarak ele alınmıştır. Kitapta kenevir bitkisinin in vitro doku kültürü çalışmaları, kenevir ıslahında moleküler teknikler, kannabinoidler ve terapötik etkileri hakkında bilgiler ve uygulamalar verilmekle birlikte transgenik bitki türleri, bitki doku kültürü çalışmaları, sekonder metabolit üretim teknikleri ve metalik nanopartiküllerin yeşil sentezi gibi güncel araştırmalardan da bahsedilmektedir. Ayrıca bitkilerdeki gelişmiş ekstraksiyon teknikleri, bitkisel protein tozu üretimi ve gıdalarda mikroenkapsülasyon çalışmaları mevcuttur. Son olarak da Veteriner Hekimlikte tedavi amaçlı kullanılan tıbbi ve aromatik bitkiler anlatılmıştır.

Kitap, bitki biyoteknolojisinin gıda, tıp, veteriner, ziraat, mühendislik, kimya gibi pek çok alan ve sektörde güncel araştırmalar ve bulgular ışığında harmanlanarak okuyucuya ve araştırmacılara sunulmuştur.

Kitabın oluşturulmasında emeği geçen ve katkı sağlayan tüm yazarlara ve yayın ekibine teşekkür ederiz.

Mesleki saygılarımızla
Prof. Dr. Güngör YILMAZ
Doç. Dr. Tünay KARAN

CONTENTS

ÖNSÖZ	I
BÖLÜM I. BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNİN GELECEĞİ VE BİTKİ GENETİK KAYNAKLARININ KORUNMASI <i>Sevgi DURNA DAŞTAN</i>	1
BÖLÜM II. KENEVİR ISLAHINDA MOLEKÜLER TEKNİKLERİN KULLANIMI <i>Ahmad ALSALEH & Muhsin İbrahim AVCI & Güngör YILMAZ</i>	17
BÖLÜM III. KENEVİR BİTKİSİNDE İN VİTRO DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI <i>Saber DELPASAND KHABBAZI & Güngör YILMAZ</i>	61
BÖLÜM IV. TRANSGENİK BİTKİ TÜRLERİ İÇİN İLGİLİ KARAKTER VE GENLER: İŞARET GENLERİ VE PROMOTÖRLER <i>İnanç BARAL & Taner DAŞTAN</i>	79
BÖLÜM V. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ: BİTKİ GELİŞİMİNİN YÖNLENDİRİLMESİ <i>Dilek ARSLAN ATEŞŞAHİN & Şeyda KAYA</i>	109
BÖLÜM VI. BİTKİLERDE GELİŞMİŞ EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ <i>Ferda ESER</i>	131
BÖLÜM VII. ASMADA BULUNAN SEKONDER METABOLİTLER VE İN VİTRO KOŞULLARDA ÜRETİM TEKNİKLERİ <i>Emine Sema ÇETİN</i>	149

BÖLÜM VIII.	BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BİTKİ BAZLI PROTEİN TOZU ÜRETİMİ	169
	<i>Fadime SEYREKOĞLU</i>	
BÖLÜM IX.	BİTKİSEL GIDALARDA MİKROENKAPSÜLASYON UYGULAMALARI	189
	<i>Şeyda ÖZTÜRK & Cemalettin BALTACI</i>	
BÖLÜM X.	SALVIA CİNSİ BİTKİ EKSTRATLARI KULLANILARAK METALİK NANOPARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ	211
	<i>Ramazan CEYLAN & Tünay KARAN</i>	
BÖLÜM XI.	VETERİNER HEKİMLİKTE TEDAVİDE KULLANILAN BİTKİLER	231
	<i>İmran GARİP</i>	

BÖLÜM I

BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNİN GELECEĞİ VE BİTKİ GENETİK KAYNAKLARININ KORUNMASI

Future of the Plant Biotechnology and Conservation of Plant Genetic Sources

SEVGI DURNA DAŞTAN*

**(Prof. Dr.) Sivas Cumhuriyet Üniversitesi,
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sivas, Türkiye
E-mail: sdurna@cumhuriyet.edu.tr
ORCID: 0000-0003-4946-5602*

Özet

Bitki genetik kaynaklarının korunması, biyoçeşitliliğin sürdürülmesi ve genetik çeşitliliğin gelecek nesiller için devam ettirilmesi açısından kilit bir öneme sahiptir. Önerilen stratejiler, in situ ve ex situ koruma çabalarını bütünlük içinde birleştiren, yeni teknolojileri kullanan ve koruma stratejilerinde genetik çeşitliliği, bağlantıyı ve sürdürülebilirliği vurgulayan bütünlükçü, disiplinler arası bir yaklaşımı içerir. İn situ koruma çabaları, bir türün ve onun genlerinin doğal yaşama ortamlarında korunmasını, rasgele eşeyli üreme sonuçlarını entegre ederek, ve genetik temsilciliği artırmak için detaylı örnekleme yapılmasını ve yeni bireylerin eklenmesini gerektiren bir süreci içerir. Bu stratejiler, genetik erozyonla mücadele etmek ve sürdürülebilir tarımı teşvik etmek için temel öneme sahiptir ve Birleşmiş Milletler Sürdürülebilir Kalkınma Hedefi 2.5'e uygun olarak tarımsal biyoçeşitlilik ve gıda güvenliği üzerine odaklanmaktadır. Bitki türleri için “Reintroduction; yeniden tanıtmaya” biyolojisinin, biyoçeşitliliğin korunması için temel bir araç olarak kurulması ve “reintroduction” çabalarında genetik çeşitliliğin öneminin, gelecekteki bitkisel çeşitliliği koruma çabalarını şekillendirmesi beklenmektedir. Yerel bitkisel

çeşitliliklerin genetik yapısını ve tarla bitkisi popülasyonlarının çeşitliliğini anlamak, yerel çiftçileri içeren stratejilerin oluşturulması için kritiktir. Bu yaklaşım, yerel bitkisel çeşitlilik genetik kaynaklarının genetik bütünlüğünün iyileştirilmesini ve korunmasını kolaylaştırır. Bitki genetik kaynaklarının (BGK, PGR) ex situ korunması kapsamında yaşanan hassasiyet, gelecek nesiller için bitki çeşitliliğini korumak için sağlam koruma stratejilerine duyulan ihtiyacı vurgular. Bu stratejilere ek olarak, in vitro kültür teknikleri, bitki genetik kaynaklarının korunması için etkili biyoteknolojik yaklaşımlar olarak hizmet veren pratik alternatifler sunar. Koruma uzmanları, biyolojik çeşitliliği kapsamlı bir şekilde korumak ve yönetmek amacıyla in situ ve ex situ yöntemleri “Entegre Koruma Stratejisi” olarak birleştirmektedir ve bu yaklaşım ile, etkili koruma için genetik çeşitliliği, bağlantıyı ve sürdürülebilirliği sağlamayı amaçlamaktadırlar. Kısaca bitki genetik kaynaklarının korunması için önerilen bütünlükçü stratejiler, etkili bir koruma için genetik çeşitliliği, bağlantıyı ve sürdürülebilirliği temin etmeyi amaçlayan geniş bir entegre bir yaklaşımı içermektedir.

Anahtar Kelimeler: bitki, biyoteknoloji, gelecek perspektifi, genetik kaynak, koruma

Abstract

Plant genetic resources (PGR) conservation is pivotal for maintaining biodiversity and ensuring the availability of genetic diversity for future generations. The proposed strategies encompass a holistic, interdisciplinary approach, integrating in situ and ex situ conservation efforts, utilizing new technologies, and emphasizing genetic diversity, connectivity, and sustainability in conservation strategies. In situ conservation efforts involve preserving a species and its genes in their natural habitat, integrating the consequences of random and unmanaged sexual reproduction, a process that requires detailed sampling and addition- introduction of new individuals to enhance genetic representativeness. These strategies are fundamental for addressing genetic erosion and promoting sustainable agriculture, aligning with the United Nations Sustainable Development Goal 2.5, which focuses on agricultural biodiversity and food security through seed banks. The establishment of plant reintroduction biology as a key tool for biodiversity conservation and the acknowledgment of the importance of genetic diversity in reintroduction efforts are anticipated to shape future conservation endeavors. Understanding the genetic structure of landraces and the diversity of on-farm plant populations is crucial for formulating strategies involving local farmers. This approach facilitates the improvement and safeguarding of the genetic integrity of landrace genetic resources.

The vulnerability of PGR conserved ex situ underscores the need for robust conservation strategies to safeguard plant diversity for future generations. In addition to these strategies, in vitro culture techniques offer practical alternatives for PGR conservation, serving as efficient tools for biotechnological approaches. Conservationists are increasingly combining in situ and ex situ methods into an “Integrated Conservation Strategy” to protect and manage biological diversity comprehensively. Finally, the holistic strategies proposed for the conservation of PGR encompass a broad, integrated approach, aiming to ensure genetic diversity, connectivity, and sustainability for effective conservation.

Keywords: plant, biotechnology, conservation, future perspective, genetic source

1. Giriş

Geçmişten günümüze bir bütün olarak bakıldığında alan olarak bitki biyoteknolojisi, son yıllarda çeşitli uygulamalara yönelik umut verici perspektifler sunarak önemli adımlar atmıştır. Genetik mühendisliği ve biyoteknolojideki ilerlemeler, süs bitkilerinde çiçeksel özellikleri geliştirmede etkili olmuştur (Noman vd., 2017). Ayrıca, tarımda nano-biyoteknolojinin kullanımı, bitki büyümesini ve stres toleransını artırmada potansiyel göstermiştir (Zhao vd., 2020). Gıda çalışmaları olarak baklagillerin genetik iyileştirmesi de odak noktası olmuş olup, son yıllarda bitki biyoteknolojisi ve ilgili moleküler yöntemlerin ıslahta uygulanmasında ilerlemeler kaydedilmiştir (Punia vd., 2022). CRISPR/Cas stratejilerinin ortaya çıkması, bitki verimini artırmaya ve sürdürülebilir tarımsal üretimi güçlendirmeye katkıda bulunmuştur (Maximiano ve Franco, 2022). Ayrıca, bitki biyoteknolojisi, biyoenerji üretiminde önemli gelişmelere yol açarak bitki üretkenliği ve kalitesinde önemli artışlara neden olmuştur (Davies vd., 2010). Dahası, bitki sekanslarından türetilen ifade elemanlarının keşfi, gen ifadesini düzenleme ve bitki biyoteknoloji özelliklerini optimize etme konusunda yeni fırsatlar yaratmıştır (To vd., 2021).

Bu fırsat ve gelişmeler, bitki biyoteknolojisinin çeşitli tarımsal ve çevresel zorluklarla başa çıkma potansiyelini vurgulamaktadır. Genom düzenleme gibi yenilikçi teknolojilerin entegrasyonu, bitki biyoteknolojik uygulamaların kapsamını ve karmaşıklığını genişletmiştir (Watanabe vd., 2021). Ayrıca, bilim ile toplum arasındaki diyalog, bitki ıslahındaki teknolojik yenilikleri takip etmede esaslı hale gelmiş, etkili iletişim ve işbirliğinin gerekliliğini vurgulamıştır (Benard vd., 2009). Genel olarak, bitki biyoteknolojisi alanındaki mevcut gelişmeler, sürdürülebilir tarım ve çevre yönetimi için umut verici olanaklar sunan dinamik ve evrilen bir manzaranın yansımasıdır.

Bitki biyoteknolojisi alanının geleceğine dair bir genel bakış sunulmasından önce mevcut literatür uyarınca bitki biyoteknolojisi araştırmalarında gelinen durumun genel olarak incelenmesi ve mevcut halde bitki gen kaynaklarının korunması konusundaki literatürdeki eğilimlerin genel haliyle gözden geçirilmesi faydalı olacaktır. Bu nedenle, öncelikle bahsedilen bu konulara değinilip ardından mevcut literatür verileri ışığında bitki biyoteknolojisinin geleceği ve bitki gen kaynaklarının korunması konularına değinilecektir.

1.1. Bitki Biyoteknolojisi Alanında Mevcut Duruma Genel Bakış

Bitki biyoteknolojisindeki mevcut durum, önemli gelişmeler ve dönüştürücü potansiyel ile karakterize edilen dinamik bir manzarayı yansıtmaktadır. Sentetik biyoloji, bitki biyoteknolojisinin yeteneklerini devrim niteliğinde değiştirmeye yönelik önemli bir güç olarak ortaya çıkmış, botanik form ve fonksiyonun kapsamını genişletmiştir (Patron, 2020). Bu genişleme, tarım ve endüstride yenilikçi ilerlemelere olanak tanımış, gelişmekte olan ülkelerde geliştirilen iyileştirilmiş ürünlerin yerel ve küresel pazarlara entegrasyonu ve yayılması için yeni perspektifler sunmuştur (Bull vd., 2011). Ayrıca, CRISPR/Cas9 sistemi, bitki genom düzenleme potansiyeli nedeniyle oldukça dikkat çekmiş olup, bitki ıslahı alanında yapılacak çalışmalar için ve gelecekteki yeni gelişmeler için önem taşımaktadır (Bortesi ve Fischer, 2015). Nanopartiküllerin bitki biyoteknolojisinde kullanılması, bitki biyoteknolojisini geliştirmekle birlikte aynı zamanda bu alandaki gelecekteki etkileri değerlendirmekte umut vaat etmektedir (Kokina ve Plaksenkova, 2022). Ayrıca, bitki virolojisinin rolünün daha net olarak anlaşılmasıyla birlikte, biyoteknoloji için çeşitli araç setleri sunmuş olup, devam eden bitki viroloji ile ilgili araştırmaların gelecekte biyoteknoloji için daha fazla umut vadeden araçlar ortaya çıkarması beklenmektedir (Wang vd., 2020).

Ayrıca, biyoteknolojideki son yenilikler ve ilerlemeler, çay bitkisinin genomik yapısı ve bitki genetik kaynakları alanında önemli ilerlemeler kaydetmesine olanak tanımış, çay kalitesinin moleküler mekanizmaları ve çay bitkisi genomunun evrimi konusundaki anlayışımızı artırmıştır (Xia vd., 2020). Sebzelere heterozis çalışmaları, genom, transkriptom, proteom ve epigenom düzeylerindeki moleküler biyoteknoloji ilerlemeleri sayesinde önemli bir ilerleme kaydetmiştir (Yu vd., 2021). Ayrıca, bitki biyoteknolojisi sektörü, son yirmi yıl içinde devam eden birleşmeler ve diğer bilimlerle olan etkileşimleri yoluyla sürekli bir yeniden yapılanma sürecinden geçmiş, endüstriyi şekillendirmiştir (Marco ve Rausser, 2008). Metabolomik, post-

genomik platformlarla entegre edilmiş olarak, birçok bitki türünde genetik-fenotipik anlamda önemli gelişmelere olanak tanımış ve bitkilerin sıcak stres toleransının artırılmasına katkıda bulunmuştur (Raza, 2020).

Son yıllarda, yenilikçi teknolojilerin uygulanması, bitki bilimi araştırmalarında büyük değişikliklere yol açarak süs bitkilerinin korunması ve bitki korumasına yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Ayrıca, bitki biyoteknolojisi, üretkenliği artırma, çeşitlendirme ve daha sürdürülebilir tarımın geliştirilmesi gibi geniş bir olasılık yelpazesi sunarak küresel gıda güvenliği, çevre koruma ve özellikle yeni iklim koşullarına uyum sağlayacak nitelikte tarımın devam ettirilmesi gibi küresel sorunlara çözümler getirmektedir. Genel olarak değerlendirmek gerekirse, bitki biyoteknolojisinin mevcut durumu, son teknolojilerin bir araya gelmesi, disiplinlerarası araştırma ve tarım, gıda güvenliği ve çevresel sürdürülebilirlik gibi küresel sorunlara odaklanmanın artmasıyla belirlenmektedir.

1.2. Bitki Genetik Kaynaklarının Korunması Alanında Mevcut Duruma Genel Bakış

Bitki genetik kaynaklarının korunması, biyolojik çeşitliliğin sürdürülmesi ve sürdürülebilir tarımın kritik bir yönüdür. Son araştırmalar, ex situ koruma altındaki bitki popülasyonlarının temsil ediciliğini değerlendirmeye odaklanmıştır. Ex situ koruma faaliyetlerinin başlangıcında kaynak popülasyonlarından yeterli genetik varyasyonun yakalanıp yakalanmadığının belirlenmesi amaçlanmaktadır (Wei ve Jiang, 2020). Bu, bitki türlerinin genetik çeşitliliğini sürdürmek için hayati olan nitelikleri, aynı zamanda değişen çevresel koşullara uyum sağlama açısından da önemlidir (Wimp vd., 2004). Ayrıca, hem korunan hem de korunmayan alanlarda tıbbi bitki türlerinin genetik yapısı, çeşitliliği ve uzun vadeli yaşayabilirliğini anlama konusunda artan bir ihtiyaç oluşmuştur. Nitekim bu değerli genetik kaynakları korumak için etkili koruma stratejilerine olan ihtiyaç daha da belirgin hale gelmiştir (Shivaprakash vd., 2014).

Ayrıca, in situ koruma yaklaşımlarının rolü giderek artan bir ilgi kazanmış, tehdit altındaki ancak yaygın bitki türlerinde in situ melezleme oranlarının ve genetik ile ekocoğrafik korumanın değerlendirilmesini gerektirmiştir (Barnaud vd., 2008; Zumwalde vd., 2022). Bu, korumaya daha bütünsel bir yaklaşıma doğru bir kayma olarak görülmekte, genetik çeşitlilik çalışmalarının ekolojik ve coğrafi düşüncelerle entegre edilerek koruma sonuçlarını iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca, Gen Koruma Birimleri (GKB'ler) kavramı, genetik

çeşitliliği ve evrimsel süreçleri in situ korumak için önerilmiş, türlerin sürekliliği için genetik çeşitliliğin önemini vurgulamakta ve hedeflenmiş koruma çabalarının gerekliliğine odaklanmaktadır (Minter vd., 2021).

Bitki genetik kaynaklarının korunması, özellikle Bitki Koruma Küresel Stratejisi bağlamında bitki genetik kaynaklarının korunması için stratejiler ve kurumlar oluşturma çabalarıyla bir odak noktası olmuştur. Bu, gıda güvenliğini ve sürdürülebilir tarımsal kalkınmayı sağlamak için bitki türlerinin genetik çeşitliliğini koruma konusundaki küresel bir taahhüdü yansıtmaktadır. Ayrıca, asma gibi ekonomik olarak önemli bitkilerin genetik kaynaklarının korunması, çeşitliliği ve ekonomik kazançları sürdürmek için vurgulanan kurumsal klonal seleksiyon, kitle seleksiyon ve özel klonal seleksiyon arasında bir arada yaşama ihtiyacını vurgulayarak koruma açısından kritik bir yönü belirtmiştir (Roby vd., 2014).

Genel olarak, bitki genetik kaynaklarının korunması konusundaki mevcut durum, ex situ ve in situ yaklaşımları, genetik çeşitlilik çalışmalarını ve hem doğal hem de yetiştirilen bitki türleri için koruma stratejilerinin oluşturulmasını içeren koruma çabalarının çok yönlü doğasını vurgulamaktadır. Bu çabalar, bitki genetik kaynaklarını koruma, sürdürülebilir tarımı teşvik etme ve genetik erozyon ile çevresel değişikliklerin zorluklarıyla başa çıkma açısından hayati öneme sahiptir.

Mevcut durumun ortaya konulmasından sonra takip eden başlıklarda mevcut literatür bilgilerine dayalı olarak bitki biyoteknolojisi ve bitki gen kaynaklarının korunması konularında şekillenen gelecek perspektiflerine değinilecektir.

2. Bitki Biyoteknolojisi ve Bitki Gen Kaynaklarının Korunması Alanlarında Gelecek Perspektifleri

2.1. Bitki Biyoteknolojisi Alanında Şekillenen Gelecek Perspektiflerine Genel Bakış

Bitki biyoteknolojisi araştırmalarındaki gelecek perspektifleri ve yönelimler, çeşitli yenilikçi yaklaşımları ve ortaya çıkan eğilimleri kapsamaktadır. Çay bitkilerinde üretim programlarının hızlanması, gelecekteki fonksiyonel genomik çalışmalar aracılığıyla beklendiği gibi, genetik olarak geliştirilmiş çay bitkisi çeşitlerinin geliştirilmesi için umut vaat etmektedir (Xia vd., 2020). Ayrıca, biyoteknolojiyi kullanarak Kassava bitkisi (*Manihot esculenta*) gibi bitkilerin yetiştirilmesi ve bunlarda genetik iyileştirme potansiyelinin araştırılması konusunda,

seçim belirteci genleri yabancı DNA içermeyen ürünler elde etmeye yönelik çalışmalara odaklanılmıştır. İşte bu yeni odak konular da biyoteknoloji araştırmalarında gelecek yönelimin bir göstergesidir (Chavariaga-Aguirre vd., 2016). Ayrıca, gelişmekte olan ülkelerden gelen iyileştirilmiş bitkilerin ve türevlerinin yerel pazarlara ve küresel ekonomiye entegrasyonu, bitki biyoteknolojisinde yeni olanaklar sunmaktadır (Bull vd., 2011).

Bitki biyoteknolojisi araştırmalarının geleceği, metagenomik ve sentetik biyoloji çağında virüsleri kullanmayı içermekte ve bitki virolojisinde teknik kısıtlamaları aşmak için enfeksiyöz klon montajını basitleştirmektedir (Pasin vd., 2019). Ayrıca, kimyasal çeşitliliğin anlaşılması, gen dizileme, Yeni Üretim Teknikleri (NPT'ler) ve sentetik biyoloji araçlarındaki son teknolojik ilerlemelerle birleştirildiğinde, çeşitli bitki türlerinde metabolik mühendislik için yeni olanaklar açılması beklenmektedir (Molina-Hidalgo vd., 2021). Tarım sektörünü sürdürülebilirliğe yönlendirmek, bitki biyoteknolojisinin büyüyen nüfusu yeterli besleyici gıda ile besleme konusundaki büyük zorluğa nasıl katkıda bulunabileceğine dair perspektifleri de ortaya çıkarmaktadır (Montagu, 2020).

Ayrıca, bitki stabilizasyonu, botanik genomik ve hayvan yem endüstrisinde biyoteknolojinin önemine dair gelecekteki araştırmalar ve bakış açıları vurgulamaktadır ki, bunlar çevresel sürdürülebilirlik açısından biyoteknolojik yaklaşımların önemini ortaya koymaktadır (Nasir vd., 2022). Bitki patojen etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasının ve bitki-bitki etkileşimlerine dair ilerlemelerin, yeni biyolojik kontrol ajanlarının geliştirilmesine ve bitkilerin rekabete tepkilerinin manipülasyonu yoluyla verimlerinin artırılmasına katkıda bulunması beklenmektedir (Westwood vd., 2018). Ayrıca, bitki biyoteknolojisi araştırmalarının geleceğinin, rasyonel olarak tasarlanmış amino asit motiflerine sahip yeni işlevsel merkezlerin keşfini içereceği ve özellikle sinyal moleküllerinin yapısal ve işlevsel yönlerini ortaya çıkaracağı öngörülmektedir (Wong vd., 2018).

Nanopartiküllerin bitki biyoteknolojisindeki geleceğine dair sonuçlar da değerlendirilmekte olup (Kokina ve Plaksenkova, 2022), yakın gelecekte küresel tarım ve çevre sorunlarına çözüm bulmak için gerekli olan inovasyon derecesini destekleyebilecek entelektüel çalışma konularının ortaya çıkmasında nanopartikül, nanoteknoloji ve yeni materyal geliştirme konularının sıklıkla karşımıza çıkabileceği düşünülmektedir (Smith vd., 2016). Bitki biyoteknolojisi araştırmalarının geleceği ayrıca bitki hastalığı yönetiminde moleküler ve biyoteknolojik tekniklerin uygulanmasını içermekte olup, moleküler seviyede bitki hastalıkları yönetimi için uygulanabilirlikleri ortaya koymaktadır (Dayou vd., 2018).

Sonuç olarak, bitki biyoteknolojisi alanının geleceği, işlevsel genomik, metabolik mühendislik, nanomateryal teknolojileri, sürdürülebilirlik, ve hastalık yönetimi gibi bir dizi farklı perspektifi ve potansiyel yönelimleri içermektedir. Bu gelecek yönelimleri, küresel sorunları ele alma ve bitki biyoteknolojisinde inovasyonu teşvik etme konusunda önemli potansiyel taşımaktadır ve yeni çalışma alanları oluşturmaktadır.

2.2. Bitki Gen Kaynaklarının Korunması Alanında Şekillenen Gelecek Perspektiflerine Genel Bakış

Bitki genetik kaynaklarının korunmasında geleceğe yönelik bakış açıları ve yönelimler, çeşitli yenilikçi yaklaşımları ve ortaya çıkan eğilimleri içermektedir. Bitkilerin doğal habitatlarında, yerinde ve habitat dışında yapılan koruma çabalarının entegrasyonu, daha etkili ve sürdürülebilir bir korumanın sağlanmasına katkıda bulunmayı amaçlamaktadır. Bu şekilde, değerli genetik kaynaklar, gelecek nesiller için korunacak ve kullanılabilir olacaktır (Ebert ve Engels, 2020). Ayrıca, doğal koleksiyonların tamamlanması, mevcut araştırma çabaları için kritik bir öneme sahiptir ve bitki biyolojik çeşitlilik kaybının devam ettiği bir dönemde gelecekteki araştırmalara destek sağlamak önemlidir (González-Toral ve Cires, 2022). Bitki genetik kaynaklarının korunmasının geleceği aynı zamanda çevresel değişim ve biyoçeşitlilik kaybının artışı ile tehdit altındaki ancak yaygın bitki türlerinin genetik ve ekocoğrafik korunmasının değerlendirilmesini içermektedir (Zumwalde vd., 2022).

Ayrıca, bitki genetik kaynaklarının etkili ve verimli bir şekilde korunması, küresel gıda güvenliğinin sağlanması açısından temel bir öneme sahiptir ve bitki genetik kaynaklarının yerinde korunmasını iyileştirmek için yeni teknolojilerin önemini vurgulamaktadır (Hay, 2021). Bitki genetik kaynaklarının çeşitli tarım geliştirme süreçlerinde kullanılması, çiftçiler tarafından iyileştirilmiş çeşitlerin benimsenmesi, yetiştirilmesi, tüketilmesi veya pazarlanması, uzun vadede değerli genetik kaynakların sürdürülebilir bir şekilde korunmasının en etkili yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Yali, 2022). Ayrıca, belirli türlerde genetik yapı bilgisindeki eksikliklerin giderilmesi, popülasyonlar arasında yüksek bağlantının anlaşılmasında gereklidir ve bu nedenle koruma genetiğinde intraspesifik genetik bağlantı ve popülasyon yapısını anlamının önemini vurgulamaktadır (Jaun ve Wymann, 2022).

Bitki genetik kaynaklarının korunmasının geleceği, fenotipik varyasyonun genotipik temelini ortaya çıkarılmasına ve tahrip edilen bitkiler için kapsamlı analizlere ve bütün genom yeniden dizileme verilerine olan ihtiyacı vurgulayarak,

var olan bitki türlerinin genetik kaynaklarını şekillendiren evrimsel, ekolojik ve insan faktörlerinin anlaşılmasını içermektedir (Tian ve Ma, 2021; Gepts, 2006). Ayrıca, yeniden tanıtım (reintroduction) biyolojisinin biyoçeşitlilik koruma için önemli bir araç olarak kurulması ve yeniden tanıtımda genetik çeşitliliğin önemi, gelecekteki koruma çabalarını şekillendireceği öngörülmektedir (Ren vd., 2014). Bitki genetik kaynaklarının ex situ korunmasının zayıflığı ve genetik erozyonun etkileri, bitki çeşitliliğini gelecek nesiller için korumak için güçlü koruma stratejilerine olan ihtiyacı vurgulamaktadır (Fu, 2017).

Sonuç olarak, bitki genetik kaynaklarının korunmasındaki gelecek perspektifleri ve yönlendirmeleri, çok yönlü ve disiplinler arası bir yaklaşımı, in situ ve ex situ koruma çabalarının entegrasyonunu, yeni teknolojilerin kullanımını ve koruma stratejilerinde genetik çeşitlilik, bağlantılılık ve sürdürülebilirliğe vurguyu içermektedir.

3. Bitki Gen Kaynaklarının Korunması İçin Önerilen Yaklaşımlara Genel Bakış

Bitki genetik kaynaklarının korunması, biyoçeşitliliğin sürdürülmesi ve genetik çeşitliliğin gelecek nesillere aktarılması açısından kritiktir. Bitki genetik kaynaklarının korunması için önerilen stratejiler, çeşitli yenilikçi yaklaşımları ve ortaya çıkan eğilimleri kapsamaktadır. Bu stratejiler, genetik aşınmayla başa çıkma, değerli genetik kaynakları koruma ve sürdürülebilir tarımı teşvik etme açısından önemlidir.

Önerilen yaklaşımlardan bir tanesi, genetik çeşitliliğin korunmasını sağlamak için in situ ve ex situ koruma çabalarının entegrasyonunu içerir. Tarım bitkilerinin genetik kaynaklarının in situ koruma stratejilerini belirleyebilmek kapsamında, kontrolsüz eşeyli üreme ve bunun genetik sonuçlarının belgelenmesinin gerekliliği öne sürülmektedir (Élias vd., 2001). Ayrıca, gelecekteki tür örnekleme çabalarında daha kapsamlı örnekleme stratejilerinin kullanılması ve gerektiğinde yeni bireylerin eklenmesi, ex situ koruma altındaki bitki popülasyonlarının genetik temsiliyetlerini artırmaya yönelik önemli adımlardır (Wei ve Jiang, 2020).

Ayrıca, bitki genetik kaynaklarının ex situ koruma yöntemlerini iyileştirmek için yeni teknolojilerin kullanılması, küresel gıda güvenliğini sağlamak açısından esastır. “Birleşmiş Milletler Sürdürülebilir Kalkınma Hedefi 2.5” tarım biyoçeşitliliği ve tohum bankaları aracılığıyla gıda güvenliği üzerine odaklanmaktadır ve bitkilerin genetik çeşitliliğini, yabani akrabalarını ve diğer ekonomik veya kültürel olarak değerli türleri koruma taahhüdünü

vurgular (Hoban vd., 2020). Ayrıca, yeniden tanıma biyolojisinin biyoçeşitlilik koruma için önemli bir araç olarak kurulması ve yeniden tanımlanan türlerdeki genetik çeşitliliğin önemi, gelecekteki koruma çabalarını şekillendirmesi beklenmektedir.

Tarım arazilerinde var olan yerleşik bitki popülasyonlarının genetik yapısını ve genetik çeşitliliğini anlamak, yerel yetiştiricileri de içeren stratejilerin geliştirilmesinde temel öneme sahiptir. Bu stratejiler, yetiştirici ve çiftçilerin katılımıyla karasal bitki türlerinin genetik kaynaklarının genetik bütünlüğünün geliştirilmesine ve korunmasına olanak tanıyacaktır (Lioi vd., 2005). Dahası, ex situ korunan bitki genetik kaynaklarının savunmasızlığı, bitki çeşitliliğini gelecek nesiller için güvence altına almak için güçlü koruma stratejilerinin gerekliliğini vurgulamaktadır (Fu, 2017).

Bu stratejilere ek olarak, in vitro kültür teknikleri, bitki genetik kaynaklarının korunmasında pratik alternatifler olarak tarla koleksiyonlarına olanak tanıyan biyoteknolojik stratejilerin geliştirilmesine imkan sağlamıştır (Bosco vd., 2015). Ayrıca, koruma uzmanlarının biyolojik çeşitliliğin korunması ve yönetimi bağlamında “Entegre Koruma Stratejisi” çerçevesinde in situ ve ex situ koruma yaklaşımlarını birleştirmeye yönelik bir eğilim bulunmaktadır (Edwards ve Jackson, 2019).

Genel olarak, bitki genetik kaynaklarının korunması için önerilen stratejiler, bütüncül ve disiplinlerarası bir yaklaşımı kapsar. Bu stratejiler, in situ ve ex situ koruma çabalarını entegre etmek, yeni teknolojileri kullanmak ve koruma stratejilerinde genetik çeşitliliği, bağlantıyı ve sürdürülebilirliği vurgulamak üzerine odaklanmıştır.

4. Sonuç

Bitki genetik kaynaklarının korunması, biyoçeşitliliğin sürdürülmesi ve genetik çeşitliliğin gelecek nesiller için temin edilmesi açısından hayati bir öneme sahiptir. Önerilen bütünlükçü stratejiler, in situ ve ex situ koruma çabalarını entegre ederek, yeni teknolojileri kullanarak, genetik çeşitliliği, bağlantıyı ve sürdürülebilirliği vurgulayarak kapsamlı ve disiplinler arası bir yaklaşım sunmaktadır. İn situ koruma çabaları, yönetimsiz eşeysel üreme sonuçlarını içermekte olup, genetik temsilciliği artırmak için özenli örnekleme ve yeni bireylerin eklenmesini gerektirir. Bu stratejiler, genetik erozyonla mücadele etmek, sürdürülebilir tarımı teşvik etmek ve Birleşmiş Milletler’in tarımsal biyoçeşitlilik ve gıda güvenliği üzerine odaklanan hedeflerine uyum sağlamak adına temel bir öneme sahiptir. Ayrıca, “reintroduction, yeniden tanıma”

biyolojisinin, biyoçeşitlilik koruma için kilit bir araç olarak kabul edilmesi ve reintroduction çabalarındaki genetik çeşitliliğin öneminin anlaşılması, gelecekteki koruma çabalarını etkileyecektir. Yerel bitkisel çeşitlerin genetik yapısı ve tarla bitkisi popülasyonlarının çeşitliliğini anlamak, yerel çiftçi ve yetiştiricileri içeren stratejilerin oluşturulması için kritiktir. Bu yaklaşım, yerel bitki çeşitlerinin genetik kaynaklarının, genetik bütünlüğünü iyileştirme ve koruma noktasında önemli bir adımı temsil etmektedir. Bitki genetik kaynaklarının (PGR), ex situ korunması kapsamında yaşanan hassasiyet, gelecek nesiller için bitki çeşitliliğini güvence altına alacak sağlam koruma stratejilerinin gerekliliğini vurgular. İn vitro kültür teknikleri gibi yeni yaklaşımlar, biyoteknolojik araştırmalara etkili alternatifler sunmaktadır. Sonuç olarak, bitki genetik kaynaklarını koruma stratejilerinin bütünlükçü ve disiplinler arası bir yaklaşımı benimsemesi, genetik çeşitliliği, bağlantıyı ve sürdürülebilirliği vurgulaması, etkili bir koruma için kapsamlı bir çerçeve sunmaktadır.

Kaynaklar

Barnaud, A., Trigueros, G., McKey, D., & Joly, H. (2008). High outcrossing rates in fields with mixed sorghum landraces: how are landraces maintained?. *Heredity*, 101(5), 445-452. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.77>

Benard, M., Vriend, H., Haperen, P., & Beekman, V. (2009). Science and society in dialogue about marker assisted selection. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 23(4), 317-329. <https://doi.org/10.1007/s10806-009-9211-4>

Bortesi, L. and Fischer, R. (2015). The crispr/cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>

Bosco, D., Sinski, I., Comachio, V., Maia, J., Ritschel, P., & Quecini, V. (2015). In vitro techniques for grapevine germplasm conservation. *Acta Horticulturae*, (1082), 201-205. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2015.1082.27>

Bull, S., Ndunguru, J., Gruissem, W., Beeching, J., & Vanderschuren, H. (2011). Cassava: constraints to production and the transfer of biotechnology to african laboratories. *Plant Cell Reports*, 30(5), 779-787. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0986-6>

Chavarriga-Aguirre, P., Brand, A., Medina, A., Prías, M., Escobar, R., Martínez, J., & Tohmé, J. (2016). The potential of using biotechnology to improve cassava: a review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(5), 461-478. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9776-3>

Davies, M., Campbell, M., & Henry, R. (2010). The role of plant biotechnology in bio-energy production. *Plant Biotechnology Journal*, 8(3), 243-243. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00493.x>

Dayou, O., Mwangi, M., Egesa, A., Muteti, P., & Chumba, C. (2018). Application of molecular and biotechnological techniques in plant disease management: a review. *African Journal of Biotechnology*, 17(31), 938-948. <https://doi.org/10.5897/ajb2018.16532>

Ebert, A. and Engels, J. (2020). Plant biodiversity and genetic resources matter!. *Plants*, 9(12), 1706. <https://doi.org/10.3390/plants9121706>

Edwards, C. and Jackson, P. (2019). The development of plant conservation in botanic gardens and the current and future role of conservation genetics for enhancing those conservation efforts. *Molecular Frontiers Journal*, 03(01), 44-65. <https://doi.org/10.1142/s2529732519400078>

Élias, M., Penet, L., Vindry, P., McKey, D., Panaud, O., & Robert, T. (2001). Unmanaged sexual reproduction and the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, cassava (*manihot esculenta crantz*), in a traditional farming system. *Molecular Ecology*, 10(8), 1895-1907. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01331.x>

Fu, Y. (2017). The vulnerability of plant genetic resources conserved ex situ. *Crop Science*, 57(5), 2314-2328. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.01.0014>

Gepts, P. (2006). Plant genetic resources conservation and utilization: the accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop Science*, 46(5), 2278-2292. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0169gas>

González-Toral, C. and Cires, E. (2022). Relevance of dna preservation for future botany and ecology. *Molecular Ecology*, 31(20), 5125-5131. <https://doi.org/10.1111/mec.16652>

Hay, F. (2021). New technologies to improve the ex situ conservation of plant genetic resources., 185-216. <https://doi.org/10.19103/as.2020.0085.14>

Hoban, S., Callicrate, T., Clark, J., Deans, S., Dosmann, M., Fant, J., ... & Griffith, M. (2020). Taxonomic similarity does not predict necessary sample size for ex situ conservation: a comparison among five genera. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 287(1926). <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0102>

Jaun, A. and Wymann, H. (2022). Lack of genetic structure suggests high connectivity of *parnassius phoebus* between nearby valleys in the alps. *Alpine Entomology*, 6, 1-6. <https://doi.org/10.3897/alpento.6.80405>

Kokina, I. and Plaksenkova, I. (2022). Nanoparticles in plant biotechnology: achievements and future challenges. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B Natural Exact and Applied Sciences*, 76(2), 204-210. <https://doi.org/10.2478/prolas-2022-0031>

Lioi, L., Piergiovanni, A., Pignone, D., Puglisi, S., Santantonio, M., & Sonnante, G. (2005). Genetic diversity of some surviving on-farm italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces. *Plant Breeding*, 124(6), 576-581. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01153.x>

Marco, A. and Rausser, G. (2008). The role of patent rights in mergers: consolidation in plant biotechnology. *American Journal of Agricultural Economics*, 90(1), 133-151. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8276.2007.01046.x>

Maximiano, M. and Franco, O. (2022). Crispr/cas: the new frontier in plant improvement. *Acs Agricultural Science & Technology*, 2(2), 202-214. <https://doi.org/10.1021/acscagstech.1c00279>

Minter, M., O'Brien, D., Cottrell, J., Ennos, R., Hill, J., & Hall, J. (2021). Exploring the potential for 'gene conservation units' to conserve genetic diversity in wild populations. *Ecological Solutions and Evidence*, 2(2). <https://doi.org/10.1002/2688-8319.12061>

Molina-Hidalgo, F., Vazquez-Vilar, M., D'Andrea, L., Demurtas, O., Fraser, P., Giuliano, G., ... & Goossens, A. (2021). Engineering metabolism in nicotiana species: a promising future. *Trends in Biotechnology*, 39(9), 901-913. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.012>

Montagu, M. (2020). The future of plant biotechnology in a globalized and environmentally endangered world. *Genetics and Molecular Biology*, 43(1 suppl 2). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0040>

Nasir, N., Zakarya, I., Kamaruddin, S., & Islam, A. (2022). Advances and future prospects on biotechnological approaches towards azolla for environmental sustainability. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 45(3), 595-609. <https://doi.org/10.47836/pjtas.45.3.04>

Noman, A., Aqeel, M., Deng, J., Khalid, N., Sanaullah, T., & He, S. (2017). Biotechnological advancements for improving floral attributes in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00530>

Pasin, F., Menzel, W., & Daròs, J. (2019). Harnessed viruses in the age of metagenomics and synthetic biology: an update on infectious clone assembly and biotechnologies of plant viruses. *Plant Biotechnology Journal*, 17(6), 1010-1026. <https://doi.org/10.1111/pbi.13084>

Patron, N. (2020). Beyond natural: synthetic expansions of botanical form and function. *New Phytologist*, 227(2), 295-310. <https://doi.org/10.1111/nph.16562>

Punia, M., Rolaniya, L., & Jat, R. (2022). Recent advancements in genetic improvement of food legume crops.. <https://doi.org/10.5772/intechopen.106734>

Raza, A. (2020). Metabolomics: a systems biology approach for enhancing heat stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 41(3), 741-763. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02635-8>

Ren, H., Jian, S., Liu, H., Zhang, Q., & Lü, H. (2014). Advances in the reintroduction of rare and endangered wild plant species. *Science China Life Sciences*, 57(6), 603-609. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4658-6>

Roby, J., Leeuwen, C., Gonçalves, E., Graça, A., & Martins, A. (2014). The preservation of genetic resources of the vine requires cohabitation between institutional clonal selection, mass selection and private clonal selection. *Bio Web of Conferences*, 3, 01018. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20140301018>

Shivaprakash, K., Ramesha, B., Shaanker, R., Dayanandan, S., & Ravikanth, G. (2014). Genetic structure, diversity and long term viability of a medicinal plant, nothapodytes nimmoniana graham. (icacinaceae), in protected and non-protected areas in the western ghats biodiversity hotspot. *Plos One*, 9(12), e112769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112769>

Smith, S., Lence, S., Hayes, D., Alston, J., & Corona, E. (2016). Elements of intellectual property protection in plant breeding and biotechnology: interactions and outcomes. *Crop Science*, 56(4), 1401-1411. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.10.0608>

Tian, X. and Ma, Y. (2021). Editorial: conservation genomic studies for threatened plants. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.778712>

To, J., Davis, I., Marengo, M., Shariff, A., Baublite, C., Decker, K., ... & Elich, T. (2021). Expression elements derived from plant sequences provide effective gene expression regulation and new opportunities for plant biotechnology traits. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.712179>

Wang, M., Gao, S., Zeng, W., Yang, Y., Ma, J., & Wang, Y. (2020). Plant virology delivers diverse toolsets for biotechnology. *Viruses*, 12(11), 1338. <https://doi.org/10.3390/v12111338>

Watanabe, K., Odahara, M., Miyamoto, T., & Numata, K. (2021). Fusion peptide-based biomacromolecule delivery system for plant cells. *Acs*

Biomaterials Science & Engineering, 7(6), 2246-2254. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00227>

Wei, X. and Jiang, M. (2020). Meta-analysis of genetic representativeness of plant populations under ex situ conservation in contrast to wild source populations. *Conservation Biology*, 35(1), 12-23. <https://doi.org/10.1111/cobi.13617>

Westwood, J., Charudattan, R., Duke, S., Fennimore, S., Marrone, P., Slaughter, D., ... & Zollinger, R. (2018). Weed management in 2050: perspectives on the future of weed science. *Weed Science*, 66(3), 275-285. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.78>

Wimp, G., Young, W., Woolbright, S., Martinsen, G., Keim, P., & Whitham, T. (2004). Conserving plant genetic diversity for dependent animal communities. *Ecology Letters*, 7(9), 776-780. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00635.x>

Wong, A., Tian, X., Gehring, C., & Marondedze, C. (2018). Discovery of novel functional centers with rationally designed amino acid motifs. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.02.007>

Xia, E., Tong, W., Wu, Q., Shu, W., Zhao, J., Zhang, Z., ... & Wan, X. (2020). Tea plant genomics: achievements, challenges and perspectives. *Horticulture Research*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0225-4>

Yali, W. (2022). Germplasm, conservation and its potential role in crop improvement. *International Research Journal of Natural Sciences*, 10(2), 1-17. <https://doi.org/10.37745/irjns.13/vol10n2pp117>

Yu, D., Gu, X., Zhang, S., Dong, S., Han, M., Gebretsadik, K., ... & Bo, K. (2021). Molecular basis of heterosis and related breeding strategies reveal its importance in vegetable breeding. *Horticulture Research*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00552-9>

Zhao, L., Lü, L., Wang, A., Zhang, H., Huang, M., Wu, H., ... & Ji, R. (2020). Nano-biotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(7), 1935-1947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06615>

Zumwalde, B., Fredlock, B., Beckman, E., Duckett, D., McCauley, R., Spence, E., ... & Hoban, S. (2022). Assessing ex situ genetic and ecogeographic conservation in a threatened but widespread oak after range-wide collecting effort. *Evolutionary Applications*, 15(6), 1002-1017. <https://doi.org/10.1111/eva.1339>.

BÖLÜM II

KENEVİR ISLAHINDA MOLEKÜLER TEKNİKLERİN KULLANIMI

Utilization of Molecular Techniques in Hemp Improvement

AHMAD ALSALEH^{1*} & MUHSİN İBRAHİM AVCI² &
GÜNGÖR YILMAZ³

^{1*}(Dr. Öğr. Üyesi.) Tarım ve Gıda, Kenevir Araştırmaları Enstitüsü,
Yozgat Bozok Üniversitesi, 66200 Yozgat, Türkiye
E-mail: aal_saleh@yahoo.com
ORCID: 0000-0001-7078-3221

²Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü,
Ankara, 06170 Ankara, Türkiye
E-mail: muhsinibrahim.avci@tarimorman.gov.tr
ORCID: 0000-0003-1228-7507

³(Prof. Dr.) Tarla bitkileri, Ziraat Fakültesi,
Yozgat Bozok Üniversitesi, 66200 Yozgat, Türkiye
E-mail: gungor.yilmaz@bozok.edu.tr
ORCID: 0000-0003-0070-5484

Özet

Moleküler tekniklerin kullanımı, bitki ıslahı alanında devrim yaratarak, etkin ıslah programlarının geliştirilmesine imkan sağlamış ve yeni bir çağ başlatmıştır. Bu detaylı inceleme, moleküler araçların kenevir ıslahı üzerindeki dönüştürücü etkisini, erken dönemde istenilen özelliklerin tespitinden pazarda rekabet edebilme durumuna kadar irdeliyor. Erken dönemde önemli özelliklerin belirlenmesi, ıslahçıların fide aşamasında stratejik seçimler yapabilmesine, ıslah sürecini kolaylaştırmasına ve kıt olan kaynakların efektif kullanımına olanak sağlamaktadır. Genetik markörlerin geliştirilmesi

ve validasyonu (test edilmesi), kenevirin genetik çeşitliliği ve çeşit tespiti konusundaki bilgimizi artırarak güvenilir çeşit tanımlaması ve germplazm yönetimini mümkün kılmaktadır. Öncü araştırmalar, kenevir bitkilerinde cinsiyet belirleme alanında çığır açmış ve ıslahın etkinliğini artırarak, yüksek CBD içeriği gibi üstün özelliklere sahip dişileştirilmiş kenevir bitkilerinin yetiştirilmesine katkı sağlamıştır. Genetik altyapıların açığa çıkartılması, kenevir genotiplerinin akrabalık durumlarına ve popülasyon dinamiklerine ışık tutarak, istenilen özelliklere sahip gelişmiş çeşitler için optimize edilmiş ıslah çalışmalarına yön vermektedir. Bu gelişmeler, özel amaçlı kenevir çeşitlerinin ıslahı ile gelişen pazar taleplerine hızlı cevap verilmesini sağlayarak, kenevir endüstrisini rekabet edebilir hale getirmiştir. Farklı genetik profillere sahip yeni kenevir çeşitleri, farklı ürünler ile geniş pazarlar için yeni alanlar açarak ürün farklılaştırmasına imkan sağlamaktadır. Moleküler teknikler, tekstil, sağlık, inşaat malzemeleri ve diğer birçok alanda yeni kenevir ürünlerinin geliştirilmesini teşvik ederek yeniliğe katkıda bulunmaktadır. Bunun yanında, bu teknikler, kimyasal girdilere olan bağımlılığı azaltmakta, sürdürülebilirlik ve çevresel sorumluluk alanındaki düzenlemelerle uyumaktadır. Sonuç olarak, moleküler tekniklerin kenevir ıslah programlarına dahil edilmesi daha yeşil, daha sağlıklı ve daha sürdürülebilir bir dünya için zemin hazırlayacaktır. Bu bölüm, moleküler tekniklerin kenevir ıslahının evrimini şekillendirmedeki rollerini ve devrim niteliğinde sayılabilecek potansiyellerini vurgulamaktadır. Genetikçiler ve ıslahçılar kenevir genetiğini keşfetmeye devam ettikçe, moleküler tekniklerin etkisi, endüstriyel kenevir için sonsuz fırsatlar vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: moleküler teknikler, genetik markörler, hassas ıslah, kenevirde erken dönemde özelliklerin belirlenmesi

Abstract

The integration of molecular techniques has revolutionized the field of crop improvements, showing a new era of precision-driven breeding programs. This vast investigation delves into the transformative impact of molecular tools on hemp agriculture, spanning from early trait identification to market competitiveness. Progress in early trait identification has permitted breeders to make strategic selections during the seedling phase, simplifying the breeding process and conserving valuable resources. The development and validation of genetic markers have heightened our understanding of hemp diversity and cultivar depiction, enabling precise cultivar identification and germplasm management. Pioneering research has transformed gender identification in

cannabis plants, enhancing breeding efficiency and catalyzing the cultivation of feminized hemp crops with heightened CBD content and other desired traits. Genetic structure explanation has shed light on the evolutionary affinities and population dynamics of hemp varieties, directing optimized breeding approaches for enhanced cultivars with the required traits. These improvements have placed the industry for market competitiveness, allowing fast response to evolving customer demands through tailored hemp cultivars. The outcome of unique cultivars with different genetic profiles enables product differentiation, opening routes for wide markets with different applications. Molecular techniques encourage innovation, pushing the development of novel hemp-derived products in textiles, health, construction materials, and beyond. Furthermore, these techniques align with regulations of sustainability and environmental responsibility, reducing dependence on chemical inputs. In conclusion, the incorporation of molecular techniques into hemp improvement programs will establish the stage for a greener, healthier, and more sustainable world. This chapter highlights their revolutionary potential, emphasizing their role in shaping the revolution of hemp breeding. As geneticists and breeders resume exploring hemp genetics, the impact of molecular techniques vows a future of endless opportunities for industrial hemp.

Keywords: molecular techniques, genetics markers, precision breeding, hemp early trait identification

1. Giriş

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), tekstil, ilaç ve gıda gibi birçok alanda kullanılan, son yıllarda önemi gittikçe artan, çok yönlü ve ekonomik açıdan önemli bir kültür bitkisidir. Kenevir ürünlerine olan talebin artması, yüksek kanabinoid içeriği, yüksek lif kalitesi ve hastalıklara dayanıklılık gibi istenilen özelliklere sahip yeni kenevir çeşitlerinin geliştirilmesine olan ihtiyacı artırmaktadır. Bunu başarmak için araştırmacılar ve ıslahçılar, güçlü araçlar olan moleküler tekniklere yönelmişlerdir (Visković vd., 2023). Moleküler teknikler, bitkinin genetiğinin hassas analizini ve manipülasyonunu mümkün kılan birçok genomik ve genetik araçları kapsar. Bu yöntemler ıslahçılara bitkinin genetik yapısı hakkında benzeri görülmemiş bilgiler sağlayarak ve istenen özelliklerle ilişkili spesifik genlerin seleksiyonu ile manipülasyonunu mümkün kılarak kenevir ıslahı alanında devrim yaratmıştır. Kenevir ıslahında moleküler tekniklerin kullanımı, ıslah sürecinin hızlandırılması, istenilen özelliklerin seleksiyonunda etkinliğin ve doğruluğun artırılması ve sonuç olarak farklı endüstrilerin ihtiyaçlarını karşılayacak yeni

ve üstün çeşitlerin geliştirilmesinde yardımcı olmaktadır (Pérez-de-Castro vd., 2012). Bu kapsamlı kitap bölümünde, kenevir ıslahında moleküler tekniklerin kullanımını kapsamlı bir şekilde inceleyeceğiz. Moleküler tekniklerin farklı uygulamalarını ve bu uygulamaların avantajlarını tartışacak, kenevir ıslahına katkılarını vurgulayacağız.

Kenevir ıslahçıları, moleküler araçlardan faydalanarak germplazmdaki genetik çeşitliliği daha iyi kavrayabilir (Alsaleh vd., 2015), istenilen özelliklerle ilişkili markörleri belirleyebilir, kompleks özelliklerin genetik yapısını tespit edebilir ve spesifik özelliklerin ıslahı için genom üzerinde düzenleme yapabilirler. Moleküler yöntemlerin en önemli avantajlarından biri, kenevir germplazmındaki genetik varyasyonu analiz etme yetenekleridir. Islahçılar, DNA markörleri kullanarak farklı kenevir aksesyonları arasında mevcut olan genetik varyasyonu tespit edebilirler. Bu bilgi ıslah programlarında melezleme ve genetik çeşitliliğin korunması ile kullanılmasında faydalanılabilecek çeşitli ebeveynlerin seçimi için hayati önem taşır. Bununla beraber, moleküler markörler genetik çeşitliliği ölçmek ve karakterize etmek için güçlü bir araç olup, çeşitli çevre koşullarına karşı adaptasyon ve dayanıklılık sergileyen üstün çeşitlerinin geliştirilmesine fayda sağlar (Alsaleh vd., 2015).

Kenevir ıslahında kullanılan bir diğer önemli moleküler teknik Markör Destekli Seleksiyon (MAS)'dur (Borin vd., 2021). MAS yöntemi, moleküler markörler ile geleneksel fenotipik değerlendirmeyi birleştirerek, seleksiyonda etkinlik ve doğruluğu artırmaktadır (Lande vd., 1990). İstenilen özellikler ile ilişkili moleküler markörleri tespit edip ve kullanan ıslahçılar, seleksiyonu hızlandırarak, çok zaman alan ve girdi yoğun olan fenotipik değerlendirmelere olan ihtiyacı azaltabilirler. Bunun yanında MAS, istenilen genetik yapıya sahip olan bitkilerin fide dönemi gibi erken dönemlerde tespitini mümkün kılarak ıslah sürecini hızlandırır ve yeni kenevir çeşitlerinin geliştirilmesi için gereken generasyon dönemini önemli ölçüde kısaltır (Collard ve Mackill, 2007). Genetik çeşitlilik analizi ve MAS'ın yanı sıra, moleküler teknikler kenevir ıslahında kullanılabilecek daha çok sayıda uygulama sunmaktadır. Bunlardan biri, Nicel Özellik Lokusları (QTL) haritalaması olup, bu yöntem ıslahçılara istenen özelliklerin ekspresyonu ile ilgili genom bölgelerinin belirlenmesi yoluyla kompleks özelliklerin genetik yapısının tespitine imkan sağlamaktadır (Ates vd., 2016; Farouk vd., 2021; Ünlü vd., 2022). Genomik seleksiyon, genom boyu markörler ve fenotipik veri kullanarak hatların potansiyellerinin tahmin edilmesine ve erken dönemlerde üstün bitkilerin seçilmesine olanak tanıyarak, ıslah süresinin kısaltılmasını ve seleksiyonun doğruluğunun artırılmasını mümkün kılar.

CRISPR-Cas9 gibi genom düzenleme teknolojileri ise genomdaki spesifik gen ve düzenleyici bölgelerde hedefli modifikasyonlarda kullanılabilen hassas

araçlardır ve ıslahçıların istenilen özellikleri aktarma veya susturmalarını sağlar (Liu vd., 2021; Zhang vd., 2021). Transkriptomik ve gen ifade profili oluşturma, ıslahçıların çeşitli biyolojik süreçlerin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında fikir edinmelerine imkan sağlayarak, istenilen özelliklerle ilişkili önemli genlerin ve düzenleyici yolların tanımlanmasına yardımcı olur (Abbas vd., 2022; Qiu vd., 2021).

Sonuç olarak, kenevir ıslahında moleküler tekniklerin kullanılması kenevir ıslahı alanında devrim yaratmıştır. Bu teknikler, ıslahçılara bitkinin genetik çeşitliliği hakkında önemli bilgiler sağlar, istenilen özelliklerin seleksiyonunu mümkün kılar, karmaşık özelliklerin genetik temellerinin tespitine ve hassas genetik düzenlemelere imkan sağlar. Moleküler yöntemlerden faydalanan ıslahçılar, üstün özelliklere, yüksek performans ve adaptasyon kabiliyetine sahip yeni kenevir çeşitlerinin geliştirilmesini hızlandırabilirler. Moleküler tekniklerdeki gelişmeler, kenevirin genetik potansiyelini daha da artırarak, kenevir endüstrisinin sürdürülebilir büyümesine ve ekonomik fizibilitesine katkıda bulunmak için umut vaat etmektedir. Bu nedenle, bu bölüm, kenevirdeki moleküler ıslah stratejilerine kapsamlı ve ayrıntılı bir genel bakış sunmayı, avantajlarını, uygulamalarını ve gelecekteki beklentilerini vurgulamayı amaçlamaktadır.

2. Uygulamalar, Yararları ve Endüstriye Etkileri

Moleküler tekniklerin kenevir ıslahına entegrasyonu, verim kalite ve sürdürülebilirliği artırmak için benzersiz bir fırsat sunarak bitki ıslahı alanında bir değişim yaratmıştır. Bu gelişmiş metodolojiler, genetik bilginin moleküler düzeyine inerek ıslah sürecini hızlandırır, istenilen özelliklerin seleksiyonunu kolaylaştırır ve bitkinin genel performansını optimize eder. Bu kapsamlı moleküler yöntemlerin etkisi, genetik çeşitlilik analizinden markör destekli seleksiyona ve genetik olarak geliştirilmiş çeşitlerin geliştirilmesine kadar uzanan uygulamaların kullanıldığı kenevir endüstrisinde açıkça görülmektedir. Bu tekniklerin avantajları pazarda rekabete, ürünün farklılaştırılmasına, inovasyona, sürdürülebilirliğe ve pazarın gelişmesine katkı sağlamaktadır.

Markör destekli seleksiyon, bitki ve hayvan ıslahında istenilen özelliklerin seçiminde moleküler markörlerden faydalanarak, seleksiyonun etkinliğini ve doğruluğunu artıran bir ıslah yöntemidir (Collard ve Mackill, 2007). Moleküler markörler MAS için vazgeçilmezdir, zira moleküler markörler, ıslahçıların istenen özellikleri genom üzerinde tanımlamasına ve takip etmesine imkan sağlayan belirteçler olarak çalışırlar. MAS, moleküler markörlerin sunduğu bilgiyi kullanarak ıslah sürecinin hızlandırılmasına ve seleksiyon doğruluğunun artırılmasına olanak sağlar. Islahçılar moleküler markörler tarafından ortaya çıkarılan genetik varyasyonu analiz ederek, istenen genetik özellikleri taşıyan

bitkileri tespit edebilirler (Alsaleh vd., 2022a). Bu, ıslah sürecinin erken bir aşamasında bilinçli kararlar almalarına olanak tanıyarak, zaman alıcı ve emek-yoğun fenotipik değerlendirmelere olan ihtiyacı azaltır.

Özetle, MAS ve moleküler markörler arasındaki ilişki, modern ıslah programları için çok önemlidir. Moleküler markörler, istenilen özelliklerin seleksiyonu için gerekli genetik bilgiyi sağlayarak, ıslahçıların üstün özelliklere sahip yeni bitki ve hayvan çeşitlerinin geliştirilmesine duyulan ihtiyaca daha hızlı ve etkili bir şekilde yanıt vermesine olanak sağlar (Hasan vd., 2021).

2.1. Moleküler Markörleri Anlamak

Bitki ıslahı alanında moleküler markörler bitki türlerinde genetik çeşitliliği belirlemek ve kullanmak için vazgeçilmez araçlar olmuşlardır. DNA'daki genetik varyasyonu temsil eden bu markörler, ıslahçılara istenilen özellikleri belirlemede yol gösterici olarak çalışırlar (Alsaleh vd., 2022a). Moleküler markörlerin önemi ıslah sürecini hızlandırma, seleksiyon hassasiyetini artırma ve popülasyonda bulunan geniş genetik potansiyeli değerlendirebilme imkanlarında yatmaktadır. Moleküler markörler, bir popülasyon içindeki bireyler arasında genetik çeşitlilik ortaya koyan spesifik DNA parçalarıdır. Bu markörler, Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP) veya Ekle-sil Polimorfizmleri (InDel) gibi nükleotid seviyesinde veya Basit Dizi Tekrarları (SSR) gibi yapısal seviyede olabilirler (Jain vd., 2019; Teama, 2018; Nadeem vd., 2018). Genom boyunca dağılmış olan moleküler markörler, kalıtsaldır ve bir generasyondan diğerine aktarılabilir (Amiteye vd., 2021).

Günümüzde ıslah programlarında markör destekli seleksiyonda geniş bir markör havuzu kullanılmaktadır (Ahmad vd., 2015). Genetik gösterge görevi gören bu moleküler markörler, ıslahçılara önem arz eden özelliklerin genomdaki yerlerini tespit ve takip etme olanağı sağlar. Bu bölümde, moleküler destekli seleksiyonda yoğun olarak kullanılan moleküler markör tiplerini kapsamlı olarak inceleyeceğiz. Karakteristik özellikleri, temel ilkeleri ve uygulamaları göz önünde bulundurulduğunda, moleküler markörler aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilirler (Borin vd., 2021).

2.1.1. DNA Sekansı Temelli Markörler

DNA Sekansı Temelli Markörler, DNA dizilerindeki genetik varyasyonlara ilişkin önemli bilgiler sunan çok çeşitli genetik markörleri kapsar (Teama, 2018). Öne çıkan iki DNA Sekansı Tabanlı Markör türü, Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP'ler) ve Ekle/Sil (InDels) markörleridir. SNP'ler, DNA sekansı içindeki

tek baz çifti varyasyonlarını vurgulayan markörlerdir. SNPler genomda yoğun olarak bulunmaları ve fazla bilgi sunmaları sebebiyle genetik çalışmalar için paha biçilemez araçlardır (Keats, 2013). SNP'ler PCR amplifikasyonu ardından jel elektroforezi yöntemi veya sekanslama yöntemi gibi birçok genotipleme tekniği ile tespit edilebilirler. Bunun yanında InDel'ler DNA sekanslarında oluşan ekleme veya silmelerden kaynaklanan varyasyonları temsil ederler ve PCR amplifikasyonu ve jel elektroforez yöntemi veya sekanslama ile belirlenebilirler. Olağanüstü çözünürlük sunan SNP'ler ve InDel'ler, genetik çeşitliliği tespit, popülasyon yapılarını belirleme ve birçok organizmada genetik varyasyonların tespiti için yapılan genomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılırlar (Ali vd., 2020). Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi, SNP'ler ve InDel'ler gibi DNA Sekansı Temelli Markörlerini tamamlayıcı bir genotipleme tekniğidir. HRM analizi, genellikle DNA sekansındaki SNP'ler ve küçük Ekle/sil (InDel) gibi genetik varyasyonların tespitinde kullanılır (Pasay vd., 2008). Bu teknik, sekans farklılıklarını belirlemek için DNA fragmentlerinin erime davranışlarından yararlanır. HRM analizi sırasında, DNA fragmentleri, çift sarmallı DNA'nın denatürasyonuna yol açan sıcaklık değişikliklerine tabi tutulur. Sıcaklık arttıkça, DNA kolları ayrılır ve DNA bağlayıcı boyaların floresansı değişerek sekanstaki varyasyonlarının tanımlanmasına olanak tanır. HRM analizi, örnekleri genotiplemek ve genetik varyasyonları tespit etmek için hızlı ve uygun maliyetli bir tekniktir ve bu nedenle genomik çalışmalarda ve moleküler teşhiste değerli bir araç olarak önümüze çıkar (Lochlainn vd., 2011). SNP'ler ve InDel'ler gibi DNA Sekansı Temelli Markörleri, HRM analizi ile bile kullanan araştırmacılar, DNA sekanslarındaki varyasyonu tespit ve analiz etmedeki imkanlarını artırabilirler.

Bu yöntemlerin birlikte kullanımı, genotipleme ve genetik varyasyon analizinde çözünürlükte, doğruluk ve verimlilikte artış sunar. Bunun yanı sıra, araştırmacılara genetik yapıyı açığa çıkarma, popülasyon yapısını tespit etme ve genetik varyasyonların kullanım potansiyelini değerlendirme imkanı sağlar. Sonuç olarak, DNA Sekansı Temelli Markörler ve HRM analizinin entegrasyonu, genetik çeşitliliğin, evrimsel ilişkilerin ve birçok organizmalardaki karmaşık özelliklerin genetik temelini daha iyi bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunur.

2.1.2. Tekrar Temelli Markörler

Tekrar Temelli Markörler alanında, öne çıkan iki adet markör kullanılmaktadır, bunlar: Basit Tekrarlı Diziler (SSR) ve Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm (ISSR) markörleridir. Mikrosatellitler olarak da adlandırılan SSR'lar, tekrarlanan

dizilerin sayısındaki varyasyonla karakterize edilen kısa tekrarlayan DNA sekanslarını içerir. Bu markörlerin birçok canlıda genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve popülasyon yapısı tespitinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Çok yönlü kullanım alanları bulunan SSR'lar, genetik haritalama ve markör destekli seleksiyon gibi birçok çalışmada kullanılmaktadır (Litt, 1989). Bunun yanında ISSR'lar, mikrosatelit dizileri arasındaki bölgeleri hedefleyen primerlerden yararlanır. Bu yenilikçi markör, genetik çeşitlilik analizinde, popülasyon yapısı çalışmalarında ve genom haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır. ISSR'lar, mikrosatelitler arası bölgeleri hedefleyerek, popülasyonların genetik çeşitliliği ve yapısı hakkında bilgi sunarak, evrimsel ilişkilerin anlaşılmasını kolaylaştırır ve benzersiz genetik profillerin tanımlanmasına yardımcı olur (Zietkiewicz vd., 1994).

2.1.3. Amplifikasyon Temelli Markörler

Amplifikasyon Temelli Markörler, bilgilendirici genetik markörler oluşturmak için amplifikasyon tekniğini kullanan birkaç markör tipini içerirler. Bu markörler genetik varyasyon hakkında önemli bilgiler sunarak, ıslah programlarında özellik bazlı seleksiyona imkan sağlarlar. Bu gruptaki markörler şunlardır:

1- Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler (SCAR): SCAR'lar istenilen özellikler ile ilişkili spesifik DNA sekanslarından elde edilirler. Bu markörler Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) veya Rastgele Çoğaltılmış Polimorfizm DNA (RAPD) gibi teknikler kullanılarak geliştirilirler. SCAR markörleri istenilen özellikle ilişkili DNA sekansını taşıyan bireylerin seleksiyonuna imkan sağlamalarından ötürü ıslah ve özellik bazlı seleksiyon için çok önemlidirler (Paran ve Michelmore, 1993).

2- Bölünerek Çoğaltılmış Polimorfik Dizi (CAP): CAP'ler, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) markörlerinden elde edilirler. Bu markörler PCR ile amplifiye edilmiş DNA fragmentlerinin restriksiyon enzimi kullanılarak parçalanmasına dayanır. CAP markörleri DNA sekanslarındaki varyasyonlar hakkında önemli bilgiler sunar ve jel elektroforez yöntemi ile görselleştirilerek önemli özellikler ile ilişkili polimorfik bölgelerin tespitine olanak sağlar (Michaels ve Amasino, 1998).

3- Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (SRAP) markörleri, bilgilendirici markörler elde etmek için PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) amplifikasyonuna dayanan genetik bir genetik markör tipidir. Bu markörler, genomdaki bitişik retrotranspozon ile ilgili sekansları arasında bulunan DNA bölgelerini amplifiye

etmek için tasarlanmış spesifik primer kombinasyonlarından türetilirler. Amplifiye fragmentler daha sonra jel elektroforez kullanılarak görselleştirilir ve elde edilen bantlar, genetik çeşitlilik ve popülasyon yapılarının değerlendirilmesi gibi genetik analizler için kullanılırlar (Li ve Quiros, 2001).

4- Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP): AFLP seçici olarak spesifik DNA fragmentlerini amplifiye ederek markör elde edilen bir tekniktir. AFLP, DNA'nın restriksiyon enzim ile sindirilmesini ve ardından spesifik adaptörlerin fragmentlere ligasyonunu, daha sonra adaptörlere tamamlayıcı olan primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir ve çoğaltılmış fragmentler elde edilir. AFLP markörleri, yüksek çözünürlüklü genom parmak izini elde etmemizi sağlar ve genetik haritalama ve DNA parmak izi dahil olmak üzere çeşitli çalışmalarda kullanılabilir (Bleas vd., 1998).

5- Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP): RFLP, restriksiyon enzimi tarafından üretilen DNA fragmentlerinin uzunluk farklarını analiz ederek DNA dizilerindeki varyasyonları tespit eden bir tekniktir. DNA numunelerinin spesifik restriksiyon enzimleri ile sindirilmesini ve ardından elde edilen fragmentlerinin boyuta göre ayrılması için jel elektroforezi kullanır. RFLP markörleri, genleri haritalama ve genetik çeşitliliği analiz etmek için genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Jarcho, 1994).

2.1.4. Genotipleme Platformları

Genotipleme Platformları, yüksek verimli genotipleme ve genetik markörlerin analizini mümkün kılan gelişmiş teknolojileri ve metodolojileri kapsar. Bu platformlar, büyük popülasyonları genotiplemek için verimli ve ölçeklenebilir yaklaşımlar sunar ve genellikle genetik çeşitlilik analizinde, genom boyu ilişkilendirme çalışmalarında ve moleküler markör destekli seleksiyonda kullanılır. İki önemli genotipleme platformu şunlardır:

1- Çeşitlilik Dizin Teknolojisi (DArT): DArT hibridizasyon bazlı array teknolojisini ve PCR bazlı markör tespitini birlikte kullanan bir genotipleme platformudur. DArT, birden çok örnekte çok sayıda markörün eş zamanlı genotiplemesine imkan tanır. DArT markörleri, polimorfik sekansların karmaşıklığını azaltma (CRoPS) gibi genom karmaşıklığı azaltma tekniklerinden türetilir ve mikroarray veya yüksek yoğunluklu genotipleme çiplerinde bulunur. DArT, çeşitli organizmalarda genetik çeşitlilik, genetik haritalama ve genomik analizler için yüksek verimli ve uygun maliyetli bir yaklaşım sağlar (Baloch vd., 2017; Jaccoud vd., 2001).

2- Kompetitif Allel Spesifik PCR (KASP): KASP, başta Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP) ve Ekle/Sil (In/Del) markörleri olmak üzere belirli genetik varyasyonları tespit etmek için allel spesifik primerler kullanan bir genotipleme teknolojisidir. KASP analizi, allel spesifik primerlerin, alternatif allel baskılanıp hedef allelin spesifik olarak amplifiyesi için tasarlanan kompetitif amplifikasyon reaksiyonunu kullanır. KASP teknolojisi, markör destekli seleksiyon, ıslah çalışmaları ve ilişkilendirme çalışmaları gibi çeşitli alanlarda kullanılabilecek, yüksek verimli genotipleme için güvenilir ve esnek bir platform sunar (Kumpatla, 2012).

2.1.5. İfade Analizi

Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ve RNA-seq (RNA sekanslama) gibi gen ekspresyon markörleri, organizmalardaki gen aktivitesinin ve ekspresyon paternlerinin aydınlatılmasında faydalıdır. Bu markörler, genlerin transkripsiyonel aktivitesi hakkında değerli bilgiler sunarak, araştırmacıların gen ifadesinin düzenlenmesini derinlemesine incelemelerine, farklı olarak ifade edilen genleri belirlemelerine ve çeşitli biyolojik süreçleri yöneten karmaşık moleküler mekanizmaları çözmelerine olanak tanır. Bilim insanları, gen ekspresyon paternlerini inceleyerek, genlerin nasıl aktif hale geldiği veya baskılandığı hakkında engin bilgiler elde edebilir, bu da gelişimsel biyoloji, hastalık mekanizmaları ve potansiyel terapötik hedeflerin tespiti dahil olmak üzere çeşitli araştırma alanları için önemli bilgiler sunar (Qiu vd., 2021).

2.1.6. Epigenetik Analizi

Bisulfit Sekanslama ve Metilasyon Spesifik PCR (MSP), DNA metilasyon paternlerini ve gen regülasyonu ve hücrel prosesler üzerindeki etkilerini incelemede önemli bir rol üstlenirler. Bu markörler, DNA'daki epigenetik modifikasyonları, özellikle metilasyonu ve bunların çeşitli biyolojik bağlamlardaki önemini araştırmak için güçlü araçlardır. Bisulfit sekans, metillenmiş sitozinleri korurken metillenmemiş sitozinleri urasillere dönüştürerek DNA metilasyon paternlerinin yüksek çözünürlüklü haritalanmasına olanak sağlar. Bu teknik, genom boyunca bireysel sitozin kalıntılarının metilasyon durumuna ilişkin kapsamlı bilgiler sağlayarak, araştırmacıların farklı metillenmiş bölgeleri tanımlamasına ve bunların gen ekspresyonu ve hücrel fonksiyon üzerindeki etkilerini anlamasına olanak tanır. Bunun yanında MSP, seçici olarak metile olmuş ya da olmamış DNA bölgelerini seçici olarak amplifiye ederek belirli lokuslardaki DNA metilasyonu hakkında kantitatif bilgi sunan PCR temelli bir

metottur. Araştırmacılar, metilasyon markörlerini kullanarak, DNA metilasyonu, gen regülasyonu, gelişim ve hastalık arasındaki karmaşık etkileşimi çözerek epigenetik mekanizmaların ve bunların çeşitli biyolojik süreçlerdeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilirler (Laird, 2003).

2.1.7. Genomik Çeşitlilik Analizi

Genomik SSR'lar (gSSR) genetik çeşitlilik ve popülasyon dinamiği hakkında önemli bilgiler sağlayarak, moleküler genetik ve genomik alanında vaz geçilemez bir rol oynamaktadırlar. Genom sekanslarından elde edilen bu markörler, yüksek derecede polimorfik olup, birçok genetik çalışmada yoğun olarak kullanılırlar. Araştırmacılar gSSR'ları kullanarak, bir popülasyondaki genetik çeşitliliği tespit edebildikleri gibi evrimsel ilişkileri de belirleyebilirler. gSSR'ların bolluğu ve polimorfik yapıları, bu markörleri genetik haritalama, popülasyon genetiği (Peakall vd., 1998) ve Genom Boyu İlişkilendirme (Doğal germplazmlarda bulunan varyasyonları kullanarak markörlerin tespiti için kullanılan güçlü bir genomik araçtır.) çalışmalarında vazgeçilmez bir araç yapmaktadır (Baloch vd., 2022). Karşılaştırmalı genomik markörler, genomun evrimini anlamada, fenotipik varyasyonun genetik temelini deşifre etmede ve genomlardaki fonksiyonel öğeleri belirlemede paha biçilmez araçlardır. Araştırmacılar, farklı organizmaların veya akraba türlerin genomlarını karşılaştırarak, çeşitli fenotiplere katkıda bulunan bölgeleri, evrimsel ilişkileri ve genetik varyasyonları belirleyebilirler.

Karşılaştırmalı genomik markörler, biyolojik çeşitliliği, adaptasyonu ve türleşmeyi şekillendiren genomik süreçlerin belirlenmesine imkan sağlar. Araştırmacılar, karşılaştırmalı genomik sayesinde, biyolojik çeşitlilik ve evrimin altında yatan moleküler mekanizmalara ışık tutarak genotip ve fenotip arasındaki karmaşık bağlantıları çözebilirler (Kuleung vd., 2003).

2.1.8. Fonksiyonel Markörler

Fonksiyonel moleküler markörler, önemli özellikleri kodlayan genlerin manipülasyonu ve istenilen özelliklerin seleksiyonu için güvenilir araçlar olup, genotip ve fenotip arasında direkt bir bağlantı görevini üstlenirler. Bu markörler, istenilen özellikler ile ilişkili spesifik genetik varyasyonları tespit ederek, bitki ve hayvan ıslahı başta olmak üzere ıslah programlarında seleksiyonun etkinliğini ve doğruluğunu artırır. Fonksiyonel markörler ıslahçılara bilgi sağlayarak arzu edilen genetik altyapıya sahip genotiplerin seçilmesini mümkün kılarlar ve dolayısıyla ıslah sürecinin hızlanmasında katkıda bulunurlar (Salgotra ve Stewart,

2020; Rao, 1982). Fonksiyonel moleküler markörlerin kullanımı yalnızca ıslah programının etkinliğini artırmakla kalmaz, aynı zamanda genlerin işleyişinin ve biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına da katkıda bulunur. Araştırmacılar, belirli özelliklerle ilişkili genleri veya genom bölgelerini saptayarak, altta yatan mekanizmaları açığa çıkartabilirler. Fonksiyonel markörlerin sunduğu bilgiler, hastalıklara dayanıklılık, verim potansiyeli veya stres toleransı gibi karmaşık özelliklerin genetik temelini aydınlatılmasına yardımcı olur ve ilerideki ar-ge çalışmaları için temel oluşturur. Fonksiyonel markörler SNP'ler, InDel'ler veya fonksiyonel genlerle ilişkisi belirlenmiş DNA sekansları gibi birçok formda olabilirler. Bu markörler, genotipleme çipleri, yüksek verimli sekanslama, hedefli moleküler çipler gibi farklı yöntemlerle tespit edilebilirler. Kullanım alanları geleneksel ıslah programlarının ötesinde, genetik mühendisliği, genom düzenleme ve moleküler teşhislerin geliştirilmesini kapsar. Fonksiyonel moleküler markörlerin gücünden yararlanan ıslahçılar ve araştırmacılar, birçok organizmada verimi ve hastalıklara dayanıklılığı artırma ve istenilen edilen özelliklere sahip genotipler geliştirmede önemli bir avantaj sağlarlar. Bu markörler, genlerin işleyişini anlamak, genetik özellikleri manipüle etmek ve biyoloji bilimlerindeki ilerlemelere katkı sağlamak için değerli bir araç sunarak genotip ve fenotip arasındaki boşluğu doldurur.

2.1.9. Diğer Markörler

Retrotranspozonlar, genom içinde hareket edebilen, genom evrimine ve genetik çeşitliliğe katkıda bulunan mobil genetik elementlerdir. Markör olmadıkları halde genom yapısı ve işlevi üzerindeki etkileri açısından incelenirler (Cömertpay vd., 2016; Baloch vd., 2015; Grzebelus, 2006; Kumar ve Bennetzen, 1999).

Çeşitli moleküler markörlerin kullanılması, kenevir ıslahçılarına, ıslah sürecini hızlandırmak, seleksiyonun etkinliğini artırmak ve kenevir popülasyonlarındaki genetik potansiyeli ortaya çıkarmak için güçlü bir araç seti sağlar. Her markör türü, genetik çeşitlilik değerlendirmesinde, genetik haritalamada, özellik ilişkilendirme analizinde ve MAS'ta benzersiz avantajlar ve uygulamalar sunar. Kenevir ıslahçıları, bu moleküler markörlerin gücünden yararlanarak bilinçli kararlar alabilir, ıslah programının etkinliğini artırabilir ve istenen özelliklere sahip üstün kenevir çeşitleri geliştirebilirler.

2.2. Kenevir Islahında Moleküler Markörlerin Önemi

Moleküler markörlerin kullanılmaya başlaması ile kenevir ıslahında önemli bir dönüşüm gerçekleşmiştir. DNA analizinden elde edilen bu güçlü araçlar,

ıslahçılara kenevir bitkisinin genetik yapısı hakkında benzeri görülmemiş bilgiler sunarak alanda devrim yaratmıştır. Moleküler markörler, istenen özelliklere sahip yeni ve gelişmiş kenevir çeşitlerinin ıslahını hızlandırmada önemli hale gelmiştir. Bu bölümde, kenevir ıslahında moleküler markörlerin önemini kapsamlı bir şekilde inceleyeceğiz, faydalarını, uygulamalarını ve endüstri üzerindeki etkilerini keşfedeceğiz. Kenevir ıslahında moleküler markörlerin öneminden bazıları şöyledir:

2.2.1. Genetik Doğruluk Ve Kesinlik

Moleküler markörler ıslahçılara daha önce geleneksel ıslah yöntemleri ile mümkün olmayan bir genetik doğruluk ve kesinlik sunarlar. Islahçılar, kenevir bitkisinin DNA sekanslarını ve moleküler karakteristiklerini inceleyerek, kenevirin genetik yapısı hakkında kesin bilgilere ulaşabilirler. Böylece ıslahçılar, yüksek kanabinoid içeriği, yüksek lif kalitesi ya da hastalıklara tolerans gibi istenilen spesifik özellikler için seleksiyon yapabilirler. Moleküler markörler bu istenilen özelliklerin altında yatan genetik yapıyı doğru ve etkili biçimde belirleyip, manipüle ederek, bu özelliklere sahip gelişmiş yeni çeşitler elde edilmesine imkan sağlar (Hasan vd., 2021). Moleküler markörlerin en önemli avantajı, kenevir bitkilerinin genomlarında var olan varyasyonu direkt olarak tespit edebilmesinde yatar (Amiteye vd., 2021). Çevre şartlarından etkilenen ve uzun zaman alabilen fenotipik değerlendirmenin aksine moleküler markörler var olan genetik varyasyonunun direkt tespitine olanak sağlar (Alsaleh vd., 2022a; Alsaleh, 2022b). Bu da ıslahçıların bitkinin genetik kompozisyonuna dayanarak bilinçli kararlar almasına yol açar. Moleküler markörler SNP'ler ve InDel'ler gibi nükleotid seviyesindeki varyasyonları tespit ederek istenilen özellikler arasındaki farkları gösteren genetik tablolar olarak görev yaparlar. İstenilen özellikler ile ilişkili spesifik genom bölgelerini hedefleyen ıslahçılar moleküler markörler yardımı ile istenen alellere sahip genotipleri belirleyebilirler. Arzu edilen özelliklerin seleksiyonunda moleküler markörlerden faydalanılması sadece geleneksel fenotipik değerlendirmenin kullanılmasından daha doğru sonuçlar verir. Fenotipik değerlendirmeler çevresel faktörlerden etkilendiği gibi ölçüm hatalarına ve subjektif değerlendirmelere de açıktır. Bunun aksine moleküler markörler objektif ve güvenilebilir sonuçlar sunarak çelişki yaratan çevresel faktörleri elimine eder (Ceballos vd., 2015). Bunun yanında, moleküler markörler, çoklu gen tarafından yönetilen veya poligenik bir yapıya sahip olan kompleks özelliklerin değerlendirilmesini ve kullanılmasını kolaylaştırır (Salgotra ve Stewart, 2020). Lif kalitesi, kanabinoid içeriği veya hastalıklara tolerans gibi özelliklerin yalnızca fenotipik gözlemlere dayalı olarak

değerlendirilmesi zordur. Moleküler markörler, ıslahçıların bu özelliklerin genetik temelini incelemelerine ve ekspresyonlarına katkıda bulunan bireysel genetik faktörleri belirlemelerine olanak tanıyarak ıslah programlarının etkinliğine katkıda bulunur (De Mori ve Cipriani 2023). Dahası, moleküler markörler, ıslahçılara melezlemede kullanılacak ebeveynlerin seçilmesinde ve farklı bireylerden istenilen özelliklerin bir genotipde birleştirilmesinde yardımcı olur. Potansiyel ebeveynlerin genetik profillerini belirlemek, ıslahçıların genetik çeşitlilik ve istenilen özellikler bakımından birbirini tamamlayan bitkileri tespit etmesine olanak tanır böylece gelişmiş özelliklere, daha fazla heterozigositeye ve farklı çevre şartlarına yüksek adaptasyon kabiliyetine sahip yeni genotipler elde edilmesini sağlar (Hasan vd., 2021).

2.2.2. Islah Sürecinin Hızlandırılması

Yalnızca fenotipik değerlendirmeye dayanan geleneksel ıslah yöntemlerinde istenen özelliklerin elde edilmesi birkaç generasyon sürebilir hatta uzun zaman alabilir. Moleküler markörler, ıslahçıların istenen özelliklere sahip bitkileri erken bir aşamada tanımlamasını sağlayarak seleksiyon için gereken süreyi azaltır. Bu hızlandırılmış ıslah süreci, ıslahçıların yeni çeşitleri daha hızlı geliştirmelerine ve pazar taleplerine ve değişen çevre koşullarına daha etkin bir şekilde yanıt vermelerine olanak tanır (Ahmar vd., 2020).

2.2.3. Melezleme için Ebeveynlerin Seçimi

Moleküler markörler, melezleme için ebeveynlerin seçimini kolaylaştırarak ıslahçıların farklı bireylerden istenen özellikleri stratejik olarak birleştirebilmelerine imkan sunar. Islahçılar, potansiyel ebeveynlerin genetik profillerini belirleyerek, genetik çeşitlilik ve sahip oldukları özellikler bakımından birbirini tamamlayan bitkileri belirleyebilirler. Bu da daha fazla heterozigositeye bununla birlikte üstün özelliklere ve farklı çevre şartlarına yüksek adaptasyon kabiliyetine sahip yeni genotipler elde edilmesine olanak sağlar (Hasan vd., 2021).

2.2.4. Kompleks Özelliklerin Seleksiyonu

Moleküler markörler, ıslahçıların birden fazla gen ile yönetilen ve poligenik yapıya sahip olan kompleks özelliklerin belirlenmesine ve kullanılmasına katkı sağlar. Lif kalitesi, kanabinoid içeriği ve hastalıklara tolerans gibi özelliklerin sadece fenotipik gözlemlerle belirlenmesi zordur. Moleküler markörler ıslahçıların bu özelliklerin genetik altyapılarını açığa çıkarmalarına ve bu

özelliklerin ekspresyonunda etkili olan faktörleri tespit etmelerine imkan tanır. Elde edilen bu bilgiler, istenilen genetik kombinasyonlara sahip olan yeni genotiplerin geliştirilmesinde ve dolayısıyla ıslah programlarının daha efektif hale gelmesinde önemli rol oynarlar (Hasan vd., 2021)

2.2.5. Genetik Çeşitliliğin Takibi ve Korunması

Moleküler markörler, kenevir popülasyonlarında genetik çeşitliliğin takibinde ve korunmasında da çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Çeşitli genotiplerden oluşan bir popülasyonu genotipleyen ıslahçılar, popülasyondaki genetik çeşitliliği belirleyebilir ve potansiyel eksiklikleri tespit edebilirler. Moleküler markörlerin sunduğu bu bilgiler, genetik çeşitliliği koruma ve geliştirmeyi ön plana çıkaran ıslah stratejilerinin dizayn edilmesinde katkıda bulunurlar, böylece kenevir çeşitlerinin uzun süreli dayanıklılığını ve sürdürülebilirliğini garanti altına alırlar (Alsaleh vd., 2016, Schwartz vd., 2007).

2.2.6. Seleksiyonun Doğruluğunun Artırılması

Moleküler markörler genetik varyasyonunun objektif ve güvenilir olarak belirlenmesini sağlayarak, çevresel faktörlerin minimize edilmesine katkıda bulunur. Böylece istenilen özelliklere sahip genotiplerin seleksiyonunda doğruluğu artarken, genotiplerin genetik potansiyellerinin yerine çevresel şartlardan kaynaklanabilecek etkilerin seleksiyonda söz sahibi olmasının riski azalır (Sinha, 2023).

2.2.7. Genetik Yapının Açığa Çıkarılması

Moleküler markörler ıslahçıların kenevir bitkilerindeki genetik yapıları açığa çıkarmasına ve istenilen özellikler ile ilişkili spesifik genler ve genom bölgelerini tespit etmelerine imkan sağlar. Bu bilgiler, önemli özelliklerin genetik altyapısının belirlenmesinde ve istenilen özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesinde önem arz eder (Borin vd., 2021).

Özetleyecek olursak, moleküler markörler, ıslahçılara bitkilerin genetik yapısını doğru ve kesin bir şekilde değerlendirmek için güçlü araçlar sağlayarak kenevir bitkisi ıslahında devrim yaratmıştır. Bu düzeydeki genetik doğruluk ve kesinlik, hedeflenen özelliklerin seleksiyonunu mümkün kılar, ıslah süreçlerini hızlandırır ve arzu edilen özelliklere sahip gelişmiş kenevir çeşitlerinin gelişimine katkı sağlar. Moleküler markörler, kenevir tarımını geliştirmek, kaynak kullanımını optimize etmek ve pazar taleplerine etkin bir şekilde yanıt vermek için vazgeçilmezdir.

2.3. Uygulamalar

2.3.1. Genetik Çeşitlilik Analizi

Üstün özellikler ve adaptasyon kabiliyetine sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesi için temel teşkil ettiğinden genetik çeşitlilik bitki ıslahının olmazsa olmaz bir parçasıdır (Ali vd., 2020; Salgotra ve Chauhan, 2023). Moleküler markörler, kenevir popülasyonlarında bulunan genetik çeşitliliğin değerlendirilmesinde ve anlaşılmasında çok önemli bir rol oynayarak genetik açıdan farklı ve dirençli yeni çeşitler geliştirme çalışmalarında ıslahçılara önemli bilgiler sağlar (Alsaleh vd., 2022c). Islahçılar kenevir popülasyonlarındaki genetik çeşitliliği moleküler markörler yardımı ile tespit edebilirler. Bu bilgi, popülasyonların genetik yapısının kavranmasına, benzersiz genetik profillerin belirlenmesine, melezleme için ebeveynlerin seçilmesine ve genetik çeşitliliğin korunması ve genetik erozyonun önlenmesi için uygun ıslah stratejilerinin tasarlanmasına yardımcı olur. Zira genetik çeşitliliğin korunması kenevir bitkisini değişen çevre koşullarına, zararlılara ve hastalıklara karşı güvencesi konumundadır. Genetik çeşitlilik çalışmalarında moleküler markörlerin en önemli avantajlarından biri, genom boyunca çok çeşitli genetik varyasyonları tespit edebilme yetenekleridir. Moleküler markörler, ıslahçıların kenevir genomundaki belirli lokuslarda veya bölgelerdeki DNA sekans varyasyonlarını incelemesine olanak tanır. Islahçılar, bu markörleri analiz ederek, kenevir popülasyonları içindeki ve arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirebilir ve genetik yapının kapsamlı bir resmini çizebilirler. Moleküler markörler kullanan genetik çeşitlilik analizi, ıslahçıların benzersiz genetik profilleri belirlemesine, farklı kenevir aksesyonları arasındaki ilişkiyi değerlendirmesine ve popülasyon yapılarını tespit etmesine yardımcı olur. Bu bilgi, efektif ıslah stratejileri geliştirmek, germ plazm koleksiyonlarını yönetmek ve genetik kaynakları korumak için hayati önem taşır. Islahçılar, kenevir popülasyonlarında bulunan genetik çeşitliliği belirleyerek, ebeveyn seçimi ve melezleme ile ilgili bilinçli kararlar verebilir bunun yanında farklı genetik yapıya sahip materyallerin ıslah programlarına dahil edilmesini sağlayabilirler. Moleküler markörler yoluyla genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi, istenilen özelliklerin tanımlanmasını ve üstün çeşitlerin geliştirilmesini de kolaylaştırır. Islahçılar, istenen belirli özelliklerle ilişkili genetik varyasyonları analiz ederek, hastalıklara tolerans, lif kalitesi, kannabinoid içeriği ve verim potansiyeli gibi özelliklerle ilişkili markörleri belirleyebilir. Bu da ıslahçıların istenen genetik özelliklere sahip bitkileri seçmelerini ve bunları ıslah programlarına dahil etmelerini sağlar ve sonuç olarak yüksek performans ve adaptasyon kabiliyetine sahip kenevir çeşitlerinin geliştirilmesine yardımcı olur. Ayrıca, moleküler

markörler, ıslah programlarındaki popülasyonlardaki zamanla değişen genetik çeşitliliği takip edebilmek için bir araç sağlar (Wenne, 2023). Kenevir ıslahçıları, moleküler markörler kullanarak genetik varyasyonları periyodik olarak analiz ederek, genetik bileşimdeki değişiklikleri değerlendirebilir ve ıslah sürecinde meydana gelebilecek çeşitlilik kaybını tespit edebilir. Bu da popülasyonların genetik çeşitliliğini korunmasına yardımcı olur, genetik darboğazların artmasını önler ve kenevir ıslahının uzun vadeli sürdürülebilirliğini sağlar. Moleküler markörler kullanılarak yapılan genetik çeşitlilik analizi, kenevir ıslah programlarında genetik kaynakların korunmasına ve kullanılmasına da katkıda bulunur. Kenevir, lif üretimi, kanabinoid ekstraksiyonu ve biyoyakıt geliştirme dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için potansiyele sahip, zengin bir genetik çeşitliliği olan çok yönlü bir bitkidir. Islahçılar, kenevir germplazm koleksiyonlarının genetik çeşitliliğini ve popülasyon yapısını inceleyerek, benzersiz aksesyonları belirleyebilir ve bunların korunmasına ve kullanımına öncelik verebilir. Bu, çeşitli kenevir genetik kaynaklarının korunmasını ve sürdürülebilir kullanımını sağlar, üstün özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesine ve değişen çevre koşullarına adaptasyonuna katkı sağlar. Bunun yanında, moleküler markörler, ıslah yöntemlerinin, çevresel faktörlerin ve seleksiyon baskısının kenevir popülasyonlarının genetik çeşitliliği üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine olanak tanır. Islahçılar, farklı generasyonlar veya popülasyonlar arasındaki genetik çeşitliliği karşılaştırarak, ıslah stratejilerinin etkinliğini değerlendirebilir ve potansiyel genetik erozyonu ve çeşitlilik kaybını tespit edebilirler. Böylece ıslah programındaki genetik çeşitliliği koruyarak ya da genişleterek, programlarının sürdürülebilirliğini ve kenevir çeşitlerinin dayanıklılığını sağlayabilirler.

2.3.2. Markör Destekli Seleksiyon (MAS)

MAS, kenevir ıslahında istenilen özellikler için seleksiyon sürecini hızlandırmak üzere moleküler teknikleri kullanan güçlü bir araçtır. Moleküler markörler tarafından sağlanan bilgileri entegre ederek, ıslahçılar daha kesin ve verimli kararlar verebilmekte, bu da istenen özelliklere sahip gelişmiş kenevir çeşitlerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Markör destekli seleksiyonun kullanmanın en önemli avantajlarından biri, bitki gelişiminin erken bir aşamasında belirli özelliklere sahip bitkileri belirleme ve seçme imkanıdır. Geleneksel fenotipik değerlendirme metotları, genellikle kapsamlı tarla denemeleri ve uzun zaman alan değerlendirmeler gerektirerek, hastalıklara tolerans, verim ve kanabinoid içeriği gibi özelliklerin seleksiyonunu yüksek girdili ve uygulanması

zor kılar (Alsaleh, 2023). Moleküler markörler, ıslahçılara, genotip ve fenotip arasında direkt bir bağlantı oluşturarak, değerli bir alternatif sunarlar (Borin vd., 2021; Concibido vd., 1996; Xu ve Crouch, 2008). Moleküler markörler, istenilen özelliklerin ekspresyonundan sorumlu spesifik genler ve kenevir genomundaki bölgeler ile ilişkilendirilebilirler. Islahçılar, bu markörlerin var olup olmadığı inceleyerek, kısa sürede bir çok genotipi tarayabilir ve istenilen özellikleri taşıyan bireyleri tespit edebilirler (Barcaccia vd., 2020). Böylece ıslahçılar, sahip oldukları imkanları, istenilen özelliklere sahip olma olasılığı daha yüksek olan genotipleri kullanarak, fenotipik değerlendirmeler için gereken zaman ve emeği azaltabilirler. Bununla beraber, moleküler markörler birden çok özellik için aynı zamanda seleksiyon yapılmasını mümkün kılar. İstenilen özelliklerle ilişkili farklı gen ve genom bölgelerini kullanarak markör paneli oluşturarak, ıslahçılar birden çok özellik için etkin bir seleksiyon yapabilirler. Bu durum, yüksek lif kalitesi, tercih edilen kanabinoid profili ve hastalık toleransı gibi birçok özelliği barındıran çeşitlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulan kenevir bitkisi için önem arz eder.

Kenevir ıslahçıları, moleküler markörleri seleksiyon sürecine entegre ederek, birden çok istenen özelliğe sahip bitkileri aynı anda değerlendirip seçebilir bu da genel performansı iyileştirilmiş çeşitlerin geliştirilmesine imkan sağlar (Borin vd., 2021). MAS'ın bir diğer önemli avantajı, arzu edilen özelliklerin yabancı veya egzotik germplazmdan çeşitlere aktarılmasına olanak sağlamasıdır. Kenevir ıslahında yabancı akrabalar veya yerel çeşitler, ticari çeşitlerde bulunmayan benzersiz genetik varyasyonlara sahip olabilir (Migicovsky ve Myles, 2017). Ancak, bu özelliklerin elit hatlara aktarımı istenen özellikler ile birlikte gelen istenmeyen özelliklerden dolayı zor olabilir ve yoğun bir geri melezlemeye ihtiyaç duyulabilir. Moleküler markörler ıslahçıların istenilen özellikleri seçerek, istenmeyen genetik materyalin aktarımını minimuma indirmelerine imkan tanır. Bu hedefe yönelik yaklaşım, introgresyonun etkinliğini artırır, yeni çeşitlerin gelişimini hızlandırır ve ıslah programları için mevcut olan genetik çeşitliliği genişletir (Hasan vd., 2015). Ayrıca MAS, seleksiyonun doğruluğunu ve hassasiyetini artırarak ıslah programlarının optimizasyonuna katkıda bulunabilir. Islahçılar, moleküler markörleri kullanarak, çevresel faktörlerin fenotipe etkilerini ve dolayısıyla seleksiyondaki etkilerini azaltabilirler. Fenotipik değerlendirmeler, istenen özelliklere sahip bitkilerin belirlenmesinde tutarsızlıklara ve zorluklara yol açan çevresel varyasyonlardan etkilenebilir. Moleküler markörler, bitkilerin genetik kompozisyonunu doğrudan değerlendirerek daha objektif ve güvenilir bir yaklaşım sağlayarak daha doğru seçimler yapılmasına imkan sağlar. Bu durum, ıslahçıların kaynaklarını en umut verici hatlar için kullanmasına, ıslah

programının verimliliğini artırmasına ve ıslah sürecini kısaltmasına olanak tanır (Cobb vd., 2018). MAS ayrıca genomik verilerin ve gelişmiş istatistiksel araçların ıslah sürecine entegrasyonunu kolaylaştırır. Moleküler markörlerin kullanımı, QTL haritalama, GWAS ve genomik seleksiyon tekniklerinin uygulanmasını mümkün kılar (Alsaleh, 2022b). Bu yaklaşımlar, karmaşık özelliklerle ilişkili genom bölgelerini tanımlamak ve genetik profillerine dayalı olarak bitkilerin performansını tahmin etmek için moleküler markörler tarafından sağlanan bilgileri kullanır. Islahçılar, genotipik ve fenotipik verileri beraber kullanarak, seleksiyonun doğruluğunu ve etkinliğini artıran, üstün özelliklere sahip çeşitlerin geliştirilmesinde faydalı olabilecek tahmin modelleri geliştirebilir (Kushanov vd., 2021).

Bu bölümde, markör destekli seleksiyonun büyüleyici dünyasını ve kenevir ıslah programlarındaki önemli rolünü inceleyeceğiz. MAS, kenevir bitkilerinde seleksiyon sürecini hızlandırmak ve istenilen özelliklerin seleksiyonunun etkinliğini artırmak için moleküler markörleri kullanan güçlü bir moleküler ıslah tekniğidir. MAS, genomik bilgiyi geleneksel ıslah yöntemleriyle entegre ederek, ıslahçıların daha bilinçli kararlar vermesini ve istenen özelliklere sahip bireyleri daha etkili bir şekilde seçmesini sağlar. Bu bölümde, kenevir ıslahında MAS ile ilgili ilkeleri, avantajları, uygulamaları ve zorlukları keşfedeceğiz.

2.3.2.1. Genetik Varyasyon ve Özelliklerin Kalıtımı

MAS'ın ilk ilkesi, bir popülasyon içindeki genetik varyasyonun tanımlanmasıdır. Genetik varyasyon, bitki popülasyonlarında gözlenen fenotipik varyasyonu kontrol eden, bireyler arasında DNA dizilerinde doğal olarak meydana gelen farklılıkları ifade eder. Bu genetik çeşitlilik, ıslah yoluyla istenilen özelliklere sahip bireylerin seçilmesi için olmazsa olmazdır. Islahçılar, istenilen özelliklerin genetik temelini anlayarak bitkilerin performansını iyileştirmek için genetik varyasyondan yararlanırlar (Cobb vd., 2018). Smith vd., (2022), ABD'de ticari kenevirin fitokimyasal çeşitliliğini incelemiş, farklı kemotipler tespit etmiş, gözlemlenen kimyasal çeşitliliğin, ticari etiketlerle eşleşmediğini bunun da sınıflandırmayı ve kanuni düzenlemeleri etkilediğini bildirmişlerdir.

2.3.2.2. Markör- Özellik İlişkilendirme

MAS'ın ikinci ilkesi, istenilen özelliklerle yakından bağlantılı moleküler markörlerin tanımlanmasıdır. Moleküler markörler, kolayca saptanabilen

ve ayırt edilebilen spesifik DNA dizileridir. Bu markörler, Tek Nükleotid Polimorfizmleri, InDel markörleri veya diğer markörleri türleri olabilirler. Araştırmacılar, bağlantı haritalama veya GWAS gibi genetik analizler yoluyla, istenilen özelliklerle birlikte segregasyona uğrayan markörleri belirleyebilirler. Markörler ve özellikler arasındaki bu ilişki, ıslahçıların bitkileri genotipleyerek ve bu özelliklerle ilişkili markör alellerin varlığını tarayarak dolaylı olarak istenen özellikleri seçmesine olanak tanır (Srungarapu vd., 2022).

2.3.2.3. Markör Geliştirme ve Validasyon

MAS'ı etkin bir şekilde uygulamak için uygun moleküler markörlerin geliştirilmesi ve validasyonu gereklidir. Markör geliştirme, genotipler arasında varyasyon gösteren polimorfik bölgeler için genomun taranmasını içerir. Potansiyel markörler belirlendikten sonra, istenen özelliklerle ilişkilendirilmelerini sağlamak için doğrulanmaları gerekir. Bu doğrulama süreci, farklı popülasyonlardan çok sayıda bireyin genotiplenmesini ve markör-özellik ilişkilerinin istatistiksel olarak analiz edilmesiyle gerçekleştirilir. Doğrulama süreci, markörlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini onaylayarak ıslahçıların bunları MAS'ta güvenle kullanmasını sağlar (Borin vd., 2021).

2.3.2.4. Markör Destekli Seleksiyon ve Islah

MAS'ın nihai ilkesi, markör bilgilerinin ıslah programında alınan kararlara entegrasyonudur. MAS ile ıslahçılar, yalnızca fenotipik değerlendirmelere güvenmek yerine, markörleri ıslahta kullanarak seleksiyon yapabilirler. Bu yaklaşım, ıslahçıların, erken dönemlerde seleksiyon yapabilmesine olanak tanıyarak kapsamlı tarla değerlendirmeleri için gereken zamana ve kaynaklara olan ihtiyacı azaltır. Islahçılar, markör bilgilerini dahil ederek, istenen özelliklere sahip bireyleri seleksiyonunda etkinliği artırabilir ve bu üstün özelliklere sahip yeni çeşitlerin daha hızlı bir şekilde geliştirilmesine fayda sağlar.

Özetle, Markör Destekli Seleksiyonun (MAS) ilkeleri, genetik varyasyonu tanımayı, markör-özellik ilişkilerini tanımlamayı, markör geliştirmeyi ve validasyonunu ve ıslah sürecinde alınacak kararlara rehberlik etmek için markör bilgilerini kullanmayı içerir. Moleküler markörlerden yararlanan MAS, ıslahçılara ıslah sürecini hızlandırmak, seleksiyonun verimliliğini artırmak ve bitki ıslahı programlarında istenen özellikler için genetik kazancı artırmak için güçlü bir araç sağlar.

2.4. Markör Destekli Seleksiyonun Avantajları

Markör destekli seleksiyonun en önemli avantajları şunlardır:

2.4.1. Seleksiyon Doğruluğunun Artırılması

MAS'ın en büyük avantajlarından biri, istenen özelliklere sahip bireyleri doğru bir şekilde seçebilme yeteneğidir. İslahçılar, istenilen özelliklerle ilişkili moleküler markörleri kullanarak, bu özelliklerin moleküler düzeyde varlığını veya yokluğunu doğrudan belirleyebilirler. Bu, yalnızca çevresel faktörlerden etkilenen ve bitki gelişiminin ileri aşamalarına kadar belirgin olmayabilen fenotipik gözlemlere kıyasla daha yüksek bir kesinlik düzeyi sağlar. MAS, ıslahçıların istenen genetik profile sahip bitkileri seçmesini sağlayarak, üstün çeşitler geliştirmede başarı olasılığını artırır (Bhat vd., 2016).

2.4.2. Erken Dönemde Özelliklerin Tespiti

MAS, fide aşaması gibi bitki gelişiminin erken aşamalarında istenilen özelliklerin tanımlanmasına olanak sağlar. İstenilen özelliklerin erken dönemde tanımlanması, ıslahçıların seleksiyon için kararlarını erken bir aşamada vermesine, böylece zamandan ve kaynaklardan tasarruf edilmesini mümkün kılarak önemli bir avantaj sağlar (Collard ve Mackill, 2007). Geleneksel fenotipik seleksiyon yöntemleri genellikle bitkilerin olgunluğa erdiği dönemde ya da birden fazla yılda değerlendirme yapılmasını gerektirdiğinden dolayı uzun zaman almaktadır. MAS ile ıslahçılar, istenilen özellikleri erken dönemde seçerek, kaynaklarını umut vaat eden genotipler için kullanabilir, yeni çeşitler geliştirmek için gereken süreyi kısaltabilirler (Alsaleh, 2023). İslahçılar, ıslah sürecine moleküler markörleri entegre ederek, genotipleri doğrudan değerlendirme imkanına kavuşurlar, bu da istenilen özelliklerle ilişkili genetik markörlerin belirlenmesine imkan sağlar. Erken dönemde seleksiyon için moleküler markörlerin kullanılması çeşitli avantajlar sunar. Birincisi, ıslahçıların sahip oldukları kaynakları, istenilen özellikler için en büyük potansiyele sahip hatlar için kullanmasına imkan sağlayarak ıslah programı verimliliğini artırır. Bu hedefe yönelik yaklaşım, çok sayıda bitki üreterek değerlendirme ihtiyacını ortadan kaldırarak zamandan, yerden ve kaynaklardan tasarruf sağlar. İkinci olarak, MAS yoluyla erken dönemde seleksiyon, özelliklerin tanımlanmasında doğruluğu artırır. Moleküler markörler, istenilen özelliklerle ilişkili spesifik genetik markörlerin var olup olmadığı hakkında objektif ve güvenilir bilgi sağlar. Elde edilen bu bilgi,

fenotipik değerlendirmeleri etkileyebilen çevresel faktörlerin etkisini azaltarak daha kesin ve tutarlı seleksiyon imkanı sağlar. Bunun yanında, erken dönemde seleksiyon, ıslahçıların daha kısa bir zaman çerçevesi içinde birden fazla generasyonu değerlendirmelerine olanak tanır. Islahçılar, istenen özelliklere sahip bitkileri kısa sürede seçerek ve melezleyerek, gelecek generasyonu daha hızlı elde edebilir ve genetik kazanç oranını etkili bir şekilde artırabilir. Bu hızlandırılmış ıslah döngüsü, istenilen özelliklerin genotiplere daha hızlı bir şekilde aktarılmasına, dolayısıyla üstün özelliklere sahip yeni çeşitlerinin daha kısa sürede geliştirilmesine katkıda bulunur. Literatürdeki birçok çalışma, MAS'ın endüstriyel kenevir ıslahındaki etkinliğini vurgulamaktadır. Birçok araştırmacı, lif kalitesi, kanabinoid içeriği, hastalık toleransı ve agronomik özellikler gibi istenilen özellikleri tespit ve gözlem için moleküler markörler kullanmışlardır. Islahçılar, bitkiler fiziksel olgunluğa ulaşmadan önce bile bu özellikler ile ilişkili moleküler markörleri kullanarak seleksiyon yapabilirler.

2.4.3. Islah Programlarının Hızlandırılması

MAS, üstün çeşitler geliştirmek için gereken ıslah süresini kısaltarak ıslah sürecini önemli ölçüde hızlandırır. Islahçılar, moleküler markörleri ıslaha entegre ederek, istenilen özelliklere sahip bitkileri hızla tanımlayabilir ve seçebilir, bu da daha hızlı genetik ilerlemeye olanak sağlar. MAS, istenilen genetik özelliklere sahip bireylerin erken bir aşamada tanımlanmasını sağlayarak, ıslahçıların etkin melez kombinasyonları ve ilerisinde seleksiyonlar yapmasına olanak tanır. Bu hızlandırılmış ıslah süreci, üstün çeşitlerin daha kısa sürede geliştirilmesini sağlayarak, ıslahçıların pazar taleplerine daha hızlı cevap verebilmelerine katkıda bulunur (Sinha, 2023).

2.4.4. Yüksek Seleksiyon Etkinliği

MAS, ıslahçıların aynı anda birden fazla özellik için seleksiyon yapabilmesine imkan sağlayarak seleksiyon verimliliğini artırır. Geleneksel fenotipik seleksiyon, fenotipik değerlendirmeyle ilgili zorluklar nedeniyle genellikle sınırlı sayıda özelliğe odaklanır. Buna karşılık, MAS, markör bilgisini kullanarak birden çok özelliğin eş zamanlı olarak seçilmesine izin verir. Islahçılar, yalnızca fenotipik gözlemlere dayanarak doğru bir şekilde değerlendirilmesi genellikle zor olan hastalık direnci veya kalite özellikleri gibi karmaşık özellikler için MAS yardımı ile seleksiyon yapabilirler. Bu yüksek seleksiyon verimliliği, üstün özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Benzer şekilde, birden çok dayanıklılık geni aynı çeşitte

veya genotipte “piramitlendiğinde” (birleştiğinde), her bir genin varlığının fenotipik olarak doğrulanması zordur. Bir dayanıklılık geninin varlığı, diğer genlerin etkisini gizleyebilir. Dayanıklılık genlerinin her biri için farklı markörler mevcutsa, bu sorunun üstesinden gelinebilir (Moeinizade vd., 2020).

2.4.5. Genetik Çeşitliliğin Korunması

MAS’ın sunduğu bir diğer avantaj, genetik çeşitliliği etkin bir şekilde koruma ve kullanabilme imkanıdır. Bitki ıslahçıları, genetik varyasyonla ilişkili moleküler markörleri tanımlayarak ve kullanarak, çeşitli genetik yapıları koruma ve ıslah programlarına dahil etme konusunda bilinçli kararlar alabilirler. Bu, germplazmda mevcut olabilecek değerli genetik çeşitlilik kaybının önlenmesine yardımcı olur. MAS, ıslahçıların genetik kaynakların tam potansiyelinden yararlanmalarına ve çeşitlerin adaptasyon kabiliyeti, çevre şartlarına dayanıklılığına ve genel genetik çeşitliliğini geliştirmelerine katkıda bulunur. İstenilen özellik resesif aleller ile kontrol ediliyor ise, bu özellik baskın alel tarafından maskelendiği için geri melezlemede heterozigot bitkilerin tespiti fenotipleme yoluyla mümkün olmaz. Geleneksel bir geri melezleme programında, resesif alellere sahip bitkiler, kendine döllenme veya resesif bir tester ile test melezlemesi yapıldıktan sonra projeni testi ile tanımlanır. Bu zaman alıcı yöntem MAS uygulanan ıslah programında ihtiyaç duyulmaz, çünkü resesif aleller moleküler markörler ile tespit edilebilir (Li vd., 2022).

2.4.6. Çevresel Koşullara Bağlı Kalmama

MAS çevre koşullarından etkilenmez. Bitkisel üretimde karşılaşılan problemler (hastalıklar, zararlılar, yüksek sıcaklık ve su stresi gibi) düzensiz olarak ortaya çıkar. Bu sebepten, belirli bir yıl veya yerde bu çevresel etmenlere karşı dayanıklılığın değerlendirilmesi mümkün olmayabilir. MAS, genotiplerin stres faktörlerine toleransını çevresel koşullarına bağlı kalmadan belirleyebilmeye olanak sağlar (Peng vd., 2000).

2.4.7. Çevresel Varyasyon

Tarladaki çevresel varyasyon, incelenen özelliklerin kalıtım derecesini yani fenotipik varyasyonun bitkinin genetiği ile kontrol edilen kısmını düşürür. Düşük kalıtım derecesinde, fenotipik seleksiyon ile genetik ilerleme yavaş olacaktır, çünkü seleksiyonu yapılan özellik için varyasyonun büyük bir kısmı çevresel varyasyon, deneysel hata veya genotip x çevre interaksiyonundan kaynaklanmaktadır ve bir sonraki nesle aktarılmayacaktır. Eğer istenilen

özelliğ için güvenilir bir markör halihazırda mevcutsa, MAS böyle bir durumda fenotipik seleksiyondan daha fazla genetik ilerleme olanağı sunabilir (Gitonga vd., 2014).

2.4.8. Maaliyet

MAS'ın maliyetini etkileyebilecek bir husus, aynı DNA örneği kullanarak birden fazla markörün taranabilme imkanınıdır. Bitki örneğinden DNA ekstraksiyonu, MAS'ın darboğazlarından birisidir. Ancak, DNA bir defa ekstre edilip saflaştırıldıktan sonra, aynı veya farklı özellikler için birçok defa kullanılabilir, bu da zamandan ve girdiden tasarruf sağlar. MAS, incelenen özelliğe bağlı olarak, geleneksel fenotip seleksiyonundan daha ucuz ve hızlı olabilir. Güvenilir bir markör yardımı ile seleksiyon böyle bir durumda daha uygun maliyetli olacaktır (Collard ve Mackill, 2007).

2.5. Kenevir İslahında Markör Destekli Seleksiyon Uygulamaları

MAS, kenevir ıslah programlarında birçok çalışmada kullanılmaktadır. Lif kalitesi, kanabinoid profillerinin tespiti, bitki cinsiyeti tespiti, hastalıklara tolerans, verim ve diğer pek çok özelliğ için seçimi için kullanılmaktadır (Sebastian vd., 2023). Örneğın, lif kalitesinin iyileştirilmesinde, lif mukavemeti, uzunluğu veya lignin içeriğ azaltılmış genotiplerin seleksiyonu için MAS kullanılabilir (Ijaz vd., 2019). Kanabinoid profilleri söz konusu olduğunda MAS, CBD (kannabidiol) veya THC (tetrahidrokanabinol) gibi daha yüksek seviyelerde spesifik kanabinoid içeren bitkilerin seleksiyonuna katkı sağlar (Petit vd., 2020; Doh vd., 2019; Borna vd., 2017). Ayrıca MAS, zararlılara, patojenlere veya abiyotik stres etmenlerine karşı toleranslı genotiplerin belirlenmesine olanak sağlayarak, istenilen özelliklere sahip yeni kenevir çeşitlerinin gelişmesine fayda sağlar (Salgotra ve Chauhan 2023). MAS'ın kenevir ıslahındaki temel uygulamaları şunlardır:

2.5.1. Genetik Çeşitlilik Analizi

MAS, kenevir germplazmasının genetik çeşitliliğ hakkında değerli bilgiler sunar. Kenevir ıslahçıları, moleküler moleküler marköleri kullanarak kenevir popülasyonları içindeki genetik yanıklığı ve çeşitliliğ değerlendirebilir. Böylece, ıslahçılar genetik kazancı en üst düzeye çıkarmak ve genetik çeşitliliğ korumak için etkili ıslah stratejileri tasarlamayabilirler. MAS ayrıca kenevir çeşitlerinin genetik tabanını genişletmek için benzersiz genetik profillerin

tanımlanmasına ve çeşitli genetik kaynakların kullanılmasına yardımcı olur. Kenevir çalışmalarında moleküler tekniklerin kullanılması, *Cannabis sativa*'nın genetik inceliklerini kavramada yeni bir çağ açmıştır. Yenilikçi moleküler yaklaşımlar kullanarak bu alana önemli katkılarda bulunan çok sayıda araştırmacı ile son yıllarda, kenevirin genetik çeşitliliği, popülasyon yapısı ve fonksiyonel özelliklerini inceleyen çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bu çığır açan araştırmalar, kenevir ıslah programlarında üstün özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesine katkı sağlayarak ve kenevir ıslahı alanında devrim yaratmıştır. Moleküler tekniklerin önemli bir rol oynadığı alanlardan biri genetik çeşitlilik çalışmalarıdır. Markör Destekli Seleksiyon (MAS), moleküler markörleri analiz ederek kenevir germplazmasının genetik çeşitliliği hakkında değerli bilgiler verir. Bu sayede ıslahçılar, kenevir popülasyonlarındaki genetik yakınlığı ve çeşitliliği değerlendirebilirler. MAS'tan elde edilen bilgiler, ıslahçılara, genetik çeşitliliği korurken, genetik kazancı en üst düzeye çıkaracak ıslah stratejileri tasarlamada fayda sağlar. Ayrıca MAS, benzersiz genetik profillerin tanımlanmasını kolaylaştırarak, ıslahçıların çeşitli genetik kaynaklardan yararlanmalarını ve kenevir çeşitlerinin genetik tabanını genişletmelerini sağlar. Bu yaklaşım, yalnızca daha dayanıklı kenevir çeşitlerinin geliştirilmesine katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli çevresel koşullara uyum sağlayabilmelerine de fayda sağlar. Araştırmacıların bu alana katkıları, kenevir genetiğinin daha iyi anlaşılmasına imkan sağlamıştır. Örneğin, Akgur ve Aasim (2022)'ın nanoparçacıkların in vitro koşullarda kenevirde açığa çıkardığı genetik çeşitliliğini araştırdığı çalışma ile bu alanda önemli bir yol kat edilmiştir. iPBS retrotranspozonlarına odaklanan çalışmaları, nanoparçacıkların kenevir fideleri üzerindeki etkisine moleküler düzeyde ışık tutarak, kenevirde çevresel etkileşimler ve nanoparçacık kaynaklı genetik varyasyonlar hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Ek olarak, Schwabe vd., (2021), *Cannabis sativa*'nın genetik yapısı hakkında federal üretim, doğadan toplama ve kültür örneklerini kapsayan kapsamlı bir karşılaştırmalı çalışma yürütmüştür. Bu çalışma, kenevirdeki genomik varyasyonları ortaya çıkararak, kenevirin evrimsel tarihi ve kültüre alınması hakkında önemli bilgiler sunuyor. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, germplazm yönetimi, ıslah stratejileri ve kenevir ıslah programlarında genetik kaynakların kullanımını için önemli etkilere sahiptir. Sawler vd., (2015), farklı kenevir çeşitleri ile genetik yapıları arasındaki karmaşık ilişkileri çözerek, esrar ve kenevir genetik yapılarını anlamamıza katkıda bulunmuştur. Bu araştırma, esrarı endüstriyel kenevirden ayıran temel genomik farklılıklar hakkında değerli bilgiler sunarak, kanabinoid profillerinin

ve diğer özelliklerin genetik yapısına ilişkin daha fazla araştırma için bir temel teşkil etmiştir. Ren vd., (2021) tarafından yapılan büyük ölçekli tüm genom yeniden dizileme çalışması, *Cannabis sativa*'nın kültüre alınmasına ışık tutmuş, kenevirin yabani atalarından bugün yaygın olan formuna kadar izlediği evrimsel süreç hakkında değerli bilgiler sağlamıştır. Kenevir bitkisinin kültüre alınmasının tarihini anlamak, genetik çeşitliliği korurken istenilen özellikleri artıran ıslah stratejileri geliştirmek için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, Shams vd., (2020), fitokimyasal, agro-morfolojik ve moleküler markörleri entegre eden çok yönlü bir yaklaşım kullanarak İran orijinli *Cannabis* popülasyonlarının genetik yapısını ve çeşitliliğini araştırmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, kenevir genetik kaynaklarının korunması ve sürdürülebilir kullanımı için çok önemli olan İran kenevir popülasyonlarında bulunan zengin genetik çeşitliliğe ilişkin değerli bilgiler sunmuştur. Henry vd., (2020)'nin yürüttüğü bir araştırma Kuzey Amerika'da üretilen kenevirindeki önemli özelliklerinin genetik temelini kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlayan Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) assayinin geliştirilmesine imkan sağlamıştır. Bu çalışma, üstün özelliklere sahip genotiplerin seleksiyonu ve ıslahı için yeni yollar açmıştır. Soler vd., (2017), *Cannabis sativa* var. *indica* çeşitlerini SSR markörleri yardımı ile genetik yapılarını araştırmış, kenevir ıslahı ve germplazm yönetimi için değerli bilgiler elde etmişlerdir. Elde edilen bilgiler, istenilen özelliklerin genetik temellerinin tanımlanmasına, etkin ıslah programlarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Khatak vd., (2016), ISSR markörleri kullanarak *Cannabis sativa*'nın farklı genotiplerinde türler arası ve tür içi çeşitlilik analizini araştırmışlardır. Bu araştırma, farklı kenevir genotiplerinde bulunan genetik varyasyonlara ilişkin bilgimizi artırmış ve kenevir çeşitlerinin genetik temelini genişletmek için çeşitli genetik kaynakların kullanılması için bir temel sağlamıştır. Xia vd., (2022), 19 STR tiplleme sistemi kullanan *Cannabis sativa* için hızlı bir tespit yönteminin geliştirilmesi ve doğrulanması konusunu derinlemesine incelemişlerdir. Bu yeni yaklaşım, kenevir genotiplerinin genetik varyasyonları hakkında değerli bilgiler sunarak doğru tanımlamaya ve karakterizasyona imkan sağlar.

2.5.2. Erken Dönemde Seleksiyon

Kenevir ıslahında moleküler tekniklerin kullanılması, kenevir ıslahı ve yetiştiriciliğinde, özellikle erken dönemde cinsiyet belirlemede önemli bir atılım sağlamıştır. Aynı erkek ve dişi bireylere sahip iki evcikli bir bitki olan kenevir, kaynakları uygun kullanmak ve yüksek kaliteli kenevir ürünleri elde etmek için erken dönemde doğru cinsiyet belirlemeye ihtiyaç duyar. Markör Destekli

Seleksiyon, ıslahçıların fide aşamasındaki dişi bitkileri belirlemesine olanak tanıyarak erken dönemde bilinçli kararlar alabilmelerine olanak sağlar. Bu da tarla denemeleri için gereken zaman ve kaynakları azaltabilmelerine katkıda bulunarak ıslah sürecini hızlandırır. Moleküler markörler, fide aşamasında büyük popülasyonların taranmasına imkan sağlar, istenen özelliklere sahip bireylerin seçimini kolaylaştırır ve sonuç olarak yeni kenevir çeşitlerinin geliştirilmesini hızlandırır. Bu modern yaklaşım, ıslahın etkinliğini artırır, ıslahçıların üstün genetik özelliklere sahip genotiplere odaklanmasını sağlar ve istenen özelliklere sahip üstün kenevir çeşitlerinin geliştirilmesine katkıda bulunur. Sonuç olarak, moleküler teknikler kenevir bitkilerinin cinsiyetini erken bir aşamada belirlemek için doğru, verimli ve kesin araçlar sunarak kenevir ıslahında büyük bir önem arz etmektedir. Bu uygulama kenevir ıslahında ve üretiminde, kaynak kullanımını efektif kullanma, dişileştirilmiş kenevir bitkilerini teşvik etme ve genetik olarak geliştirilmiş kenevir çeşitlerinin geliştirilmesini hızlandırma konusunda olumlu etkileri vardır. Moleküler tekniklerin yardımıyla kenevir endüstrisi, bu çok yönlü bitkinin potansiyelini daha da açığa çıkarabilir, kenevir üretimi ve ürün geliştirmede yenilikçiliği, sürdürülebilirliği ve karlılığı artırabilir. Borin vd., (2021), özellikle çeşit ve cinsiyet değerlendirmeleri için kenevir için moleküler markörlerinin geliştirilmesi ve test edilmesinde önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Yaptıkları çalışmalar, ıslah programlarının geliştirilmesine ve istenilen özelliklerin belirlenmesine katkıda bulunmuştur. Diğer yandan, Prentout vd., (2020), *Cannabis sativa* fidelerinin cinsiyetini belirlemek için genetik markörlerin geliştirilmesi üzerine araştırmalar yapmış ve bitki gelişiminin erken aşamalarında cinsiyet belirleme sürecini kolaylaştırmıştır. Toth vd., (2020), *Cannabis sativa* L için cinsiyet ve kanabinoid kemotipleri ile ilişkili genetik markörler geliştirdiğini ve valide ettiğini bildirmiştir. Bu araştırma, belirli cinsiyet ve kanabinoid profillerine sahip olan kenevir bitkilerinin doğru ve etkili bir şekilde tanımlanmasına imkan sağlamıştır. Pan vd., (2021), *Cannabis* için Çin kenevir germplazmının genetik yapısının analizini kolaylaştıran ve cinsiyetle ilişkili markörlerin tanımlanmasını sağlayan bir InDel markör veritabanının oluşturulduğunu bildirmiştir. Törjék vd., (2002) iki erkek-cinsiyet ile ilişkili DNA RAPD primerleri ve Mandolino vd., (1999)'den faydalanarak bir markör (MADC – *Cannabis sativa*'da erkek cinsiyet ile ilişkili DNA) geliştirmiştir.

2.5.3. Kannabinoid Profilinin Seleksiyonu

Kenevir çeşitleri çoğunlukla kanabinoid içerikleri, özellikle de psikoaktif olmayan bileşik kannabidiol (CBD) için yetiştirilir. MAS, ıslahçıların CBD-

THC (tetrahidrokanabinol) oranını optimize ederek veya ilgilenilen diğer küçük kanabinoidleri hedefleyerek belirli kannabinoid profillerine sahip bitkileri seçmelerine olanak tanır. İslahçılar, kannabinoid biyosentez yollarıyla ilişkili moleküler markörleri belirleyerek, bitkileri gelişimlerinin erken dönemlerinde tarayabilir ve istenen kannabinoid profillerine sahip olanları seçebilir, böylece yasal gerekliliklere uygunluğu ve pazar taleplerini karşılayabilir. Borna vd., (2017), uyuşturucu ve uyuşturucu olmayan *Cannabis* türleri ile ilişkili başlıca kanabinoid genlerindeki SNP'leri tanımlamak için yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizinden yararlanmışlardır. Bu araştırma, kenevirde kannabinoid biyosentezinin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Doh vd., (2019), düşük tetrahidrokanabinol (THC) içeriğine sahip *Cannabis sativa* çeşitlerini diğer Güney Kore çeşitlerinden ayırt etmek için DNA markörleri geliştirmiştir. Yürüttükleri çalışma, nükleotid dizilerine dayalı olarak kenevir bitkilerinin tanımlanmasına ve ayrıştırılmasına katkıda bulunmuştur. Vergara vd., (2016), bitki cinsiyetini erken dönemde belirlemek için cinsiyetle ilişkili moleküler markörlerin tanımlanması da dahil olmak üzere kenevir ve kenevir genetiğini incelemişler, ve çalışmalarını CBD üretimi ve diğer kullanım alanları için dışı bitkilerin etkin bir şekilde seçilmesine katkıda bulunmuştur. Jin vd., (2021), farklı bitki kısımlarında ikincil metabolitler kullanılarak *Cannabis* kemotiplerini incelemişlerdir. THC-baskın, CBD-baskın ve ara genotipler için ayırt edici markörler belirlemişlerdir. Bu bulgular, tıbbi ve kenevir ürünleri çalışmalarında kalite standardizasyonu ve hatların tanımlanması için kullanılabilir.

2.5.4. Lif Kalitesinin Artırılması

Lif kalitesi, tekstil ve kağıt üretimi gibi endüstriler için kenevir ıslahında olmazsa olmaz bir özelliktir. MAS, lif uzunluğu, mukavemeti ve inceliği dahil olmak üzere istenilen lif özelliklerine sahip kenevir genotiplerinin seleksiyonuna yardımcı olur. İslahçılar, lif kalitesiyle ilişkili moleküler markörleri tanımlayarak, üstün lif özelliklerine sahip genotipleri seçebilir, bu da yüksek kaliteli lif içeriğine sahip yeni çeşitlerinin geliştirilmesine katkıda bulunur. üstün özelliklere sahip yeni kenevir çeşitlerinin geliştirilmesi lif endüstrisinin özel gereksinimlerinin karşılanmasını ve kenevirin sürdürülebilir ve çok yönlü bir lif bitkisi olarak kullanılmasını teşvik eder. Petit vd. (2020), kenevirdeki lif kalitesinin genetik yapısını aydınlatmak için genom çapında bir ilişkilendirme çalışması yürütmüştür. Bu araştırma ile araştırmacılar lif özelliklerinin altında yatan genetik faktörleri tespit ederek lif gelişimi için değerli bilgiler sağlamıştır. Salentijn vd. (2019), kenevirin verimini, lif kalitesini ve “çiçeklenme zamanı”

ve “cinsiyet belirleme” gibi fenolojik özelliklerini etkileyen genetik yapıya odaklanmaktadır. Bu özellikleri kontrol eden moleküler mekanizmaları anlamak, üstün kenevir çeşitleri geliştirmek için çok önemlidir.

2.5.5. Özelliklerin Seleksiyonu ve Genetik İlerleme

MAS, ıslahçıların istenilen özelliklere sahip kenevir hatlarını seçmelerini sağlar. Islahçılar, lif kalitesi, yağ içeriği, kanabinoid bileşimi veya hastalık toleransı gibi özelliklerle ilişkili moleküler markörleri tanımlayarak, ebeveyn seçimi ve yapılacak melezler hakkında bilinçli kararlar verebilir. MAS, yüksek verim ve kaliteye sahip kenevir çeşitlerinin geliştirilmesine yol açan birden çok özelliğin eş zamanlı olarak seçilmesine imkan sağlar. Punja ve Holmes, 2020 yılında yaptıkları çalışmada esrar türlerinde hermafroditizmi araştırmışlardır. Hermafrodit çiçekli bitkilerin genetik olarak dişi tohumlar verdiğini, yabancı döllenmiş tohumların ise eşit erkek-dişi oranı gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hermafrodit tohumlardan elde edilen kuşağın ise yabancı döllenmişlerin kendine döllendikleri durumdaki gibi olduğu tespit edilmiş ve erkek bitkilerde genetik markörler tanımlamıştır.

2.5.6. Hastalıklara Dayanıklılık Islahı

Hastalıklara dayanıklılık, çeşitli patojenlerin neden olduğu verim kayıplarına karşı koruma sağlayarak kenevir üretiminde hayati bir rol oynar. Markör Destekli Seleksiyon (MAS), ıslahçıların, Fusarium solgunluğu, külleme ve kenevir mozaik virüsü gibi hastalıklara karşı genetik direnci olan bitkileri tespit edilebilmesini sağlar. Islahçılar, dayanıklılık genleriyle ilişkili moleküler markörleri belirleyerek, büyük popülasyonları hastalık direnci açısından etkin bir şekilde tarayabilir ve dayanıklı genotipleri ıslah programlarına dahil edebilirler. Bu da hastalıklara dayanıklılığı yüksek kenevir çeşitlerinin geliştirilmesine imkan sağlayarak, kimyasal kontrole olan ihtiyacı azaltır ve sürdürülebilir üretime olumlu katkı sağlar. MAS’a ek olarak, DNA tabanlı patojen tespiti, kenevir yetiştiricileri için zararlı küfleri, akarları, virüsleri ve külleme, kurşuni küfleri, pas akarları ve birçok viroidleri tespit edebilen önemli testler sunar. Hop latent viroid (HLVd) ve marul kloroz virüsü (LCV), kenevir bitkisi için önemli tehditler oluştururken, kenevir kriptomik virüsü (CCV) ve tütün mozaik virüsü (TMV) de bitki sağlığını etkileyebilir. Külleme, kurşuni küf, pas akarları ve fusarium kenevir bitkilerini etkileyen yıkıcı zararlılardır. DNA tabanlı patojen tespiti yoluyla erken tespit ve önleyici tedbirler, verimi önemli ölçüde artırabilir ve patojen salgınlarının risklerini azaltabilir.

Sonuç olarak, kenevir araştırmalarında moleküler tekniklerin kullanılması *Cannabis sativa*'nın genetik düzeyde anlaşılmasını sağlamıştır. Araştırmacılar tarafından yürütölen bu çalışmalar, kenevirin genetik çeşitliliğine, popölasyon yapısına ve fonksiyonel özelliklerine ışık tutmuş, kenevir ışlah programlarında yenilik ve ilerlemeler sağlamıştır. Moleküler tekniklerin entegrasyonu, kenevir genetiği bilgimizi zenginleştirmiş ve ışlahçılara üstün özelliklere sahip yeni kenevir çeşitlerinin geliştirilmesinde fayda sağlamaktadır. Bilim dünyası kenevir genetiğine ışık tutmaya devam ettikçe, değişim ve gelişim potansiyelinin sınırsızlığı sürüyor. Kenevirin genetik yapısına ilişkin araştırmalar, bu çok yönlü bitkinin tam potansiyelinden yararlanmak için heyecan verici beklentiler sunuyor ve kenevir endüstrisini daha yeşil, daha sağlıklı ve daha sürdürülebilir bir geleceğe doğru ilerletiyor.

2.6. Markör Destekli Seleksiyonun Zorlukları

Markör Destekli Seleksiyon büyük bir potansiyel sunarken, aynı zamanda beraberinde zorlukları da getiriyor. MAS'ın ışlah programlarına dahil edilmesi bilgi, altyapı ve kaynaklar gerektiriyor. Bu zorlukların üstesinden gelmek, MAS'ın kenevir ışlah programlarına başarılı bir şekilde entegre edilmesini sağlamak için araştırmacılar, ışlahçılar ve endüstri paydaşları arasında iş birliğine dayalı çabaları gerektirmekte. MAS için karşılaşılan temel zorluklar başlıca şöyledir:

2.6.1. Markör-Özellik İlişkilendirme

MAS'ın başarılı bir şekilde uygulanması, istenilen özelliklere sıkı sıkıya bağlı olan güvenilir moleküler markörlerin mevcudiyetine dayanır. Ancak, özellikle çevresel faktörlerden etkilenen ve birden çok genle yönetilen kompleks özellikler için güçlü bir markör-özellik ilişkisi kurmak zor olabilmektedir. Bir özelliğin var olup olmadığını doğru bir şekilde tespit edebilen güvenilir markörleri belirlemek ve valide etmek, kapsamlı genetik ve fenotipik gözlemler, gelişmiş istatistiki analizler ve çok çeşitli genetik altyapıya sahip bireylerde büyük ölçekli validasyon gerektirir. Bu zorluğun üstesinden gelmek ve istenilen özelliklerle tutarlı ilişkiler sergileyen markörleri belirlemek için GWAS ve bağlantı haritalaması dahil olmak üzere kapsamlı genomik analizler yapmayı zorunlu kılar (Alsaleh, 2022b).

2.6.2. Markör Geliştirme ve Maliyet

MAS için uygun spesifik moleküler markörler geliştirmek zaman alıcı ve pahalı olabilmektedir. Markör geliştirme süreci ilgilenilen genomik bölgelerin

sekanslanmasını ve analizini, primer tasarlanmasını ve genotiplemenin optimizasyonunu içerir. Moleküler markörler kullanılarak büyük popülasyonların genotiplendirilmesiyle ilgili maliyet de bazı ıslah programları için sınırlayıcı bir faktör olabilir. Bu nedenle, farklı ıslah programlarında amaca ve beklentiye bağlı olarak MAS uygulamasının pratikliğini ve ekonomik fizibilitesini göz önünde bulundurarak, genotiplemenin ve markör geliştirmenin maliyet ve faydalarını dengede tutabilmek çok önemlidir.

2.6.3. Genetik Altyapı Etkisi

Moleküler markörlerin performansı genetik altyapı etkisinden, yani markör alelleri ile genotiplerin genetik altyapısı arasındaki etkileşimlerden etkilenebilir. Bu etkiler, bitkinin performansının doğru tahmin edilmesini engelleyen, farklı genetik yapılarda markör-özellik ilişkilerinde farklılıklara neden olabilir. Genetik arka plan etkilerinin üstesinden gelmek, genotip-çevre etkileşimlerinin varlığı da dahil olmak üzere, istenilen özelliklerin genetik mimarisinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını gerektirir. Çeşitli genetik altyapıları dahil etmek ve çok lokasyonlu denemeler kurmak, genetik arka plan etkilerinin etkisini en aza indirmeye ve MAS tahminlerinin güvenilirliğini artırmaya yardımcı olabilir.

2.6.4. Özelliklerin Kompleksitesi ve Poligenik Özellikler

MAS, özellikle etkisi yüksek olan genler veya gen bölgeleri tarafından kontrol edilen özellikler için etkilidir. Ancak, verim, abiyotik ve biyotik streslere toleransı ve kalite özellikleri dahil olmak üzere birçok önemli özellik, birçok genler tarafından kontrol edilir ve çevresel faktörlerden etkilenir. Kompleks özelliklerle ilişkili markörlerin tanımlanması ve doğrulanması kapsamlı genetik ve istatistiksel analizler gerektirdiğinden, bu poligenik özellikler MAS için zorluk arz eder. Genom boyu markör bilgisi ve tahmine dayalı modelleri kullanan genomik seleksiyon gibi gelişmiş teknikler, kompleks özelliklerin ortaya çıkardığı zorlukların üstesinden gelmek için markör destekli seleksiyonu tamamlayıcı olarak kullanılabilir.

2.6.5. Etik ve Kanuni Hususlar

Islah programlarında moleküler markörlerin kullanılması, etik ve kanuni hususları gündeme getirir. Fikri mülkiyet hakları, genetik kaynaklara erişim ve genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO'lar) kullanımını düzenleyen kanunlar, MAS'ın uygulanmasında zorluklar ortaya çıkarabilir. Islahçılar, düzenlemelere uymak ve genetik kaynaklara eşit erişim haklarını garanti altına almak için bu yasal ve etik çerçeveleri göz önünde bulundurmalıdırlar.

2.6.6. Sınırlı Genomik Kaynaklar

MAS'ın başarısı, büyük ölçüde, anotasyonu iyi yapılmış referans genomlar, transkriptomlar ve genetik haritalar dahil olmak üzere kapsamlı genomik kaynakların mevcudiyetine bağlıdır. Fakat, bazı bitkilerde veya gözardı edilmiş türlerde, genomik kaynakların eksikliği, MAS'ın uygulanması için önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Bu tür bitkiler için genomik kaynakların üretilmesi ve düzenlenmesi, bilim camiasının işbirliği ve yatırımını gerektiren, zaman alan ve yoğun kaynak tüketen bir süreçtir. Genom dizileme projeleri ve genetik ve fiziksel haritaların geliştirilmesi de dahil olmak üzere genomik kaynakları geliştirmeye yönelik çabalar, MAS uygulamasının daha geniş bir bitki türü yelpazesine aktarılması için önem arz etmektedir.

Bu zorlukların, araştırmacılar, ıslahçılar ve endüstri paydaşları arasında işbirliği ile üstesinden gelinir. Genomik teknolojilerdeki, istatistiksel yöntemlerdeki ve bilgisayar teknolojilerindeki gelişmeler, MAS'ın etkinliğini ve verimliliğini sürekli olarak geliştirmektedir. Bunun yanında, markör-özellik ilişkisi, markör tasarlama, genetik altyapı etkileri, kompleks özellikler, etik ve kanuni hususlar ve sınırlı genomik kaynaklarla ilgili zorlukların üstesinden gelmek için araştırma ve geliştirmeye yatırım yapmak elzemdir. Bu zorlukların üstesinden gelinerek, MAS daha fazla etkin kullanılabilir ve bitki ıslah programlarına entegre edilebilir, bu da hızlandırılmış genetik kazanca, üstün özelliklere sahip çeşitlerin geliştirmesine ve sürdürülebilir tarımsal uygulamalara olanak sağlar.

2.7. Endüstriye Etkisi:

Kenevir ıslahında moleküler tekniklerin kullanımı, kenevir endüstrisinde dönüştürücü bir etkiye sebep olmuştur. Islah metotlarında, bitkinin genetiğinin anlaşılmasında ve ürün geliştirilmesinde önemli bir rol oynayarak, kenevir bitkisinin birçok sektörde önemli bir yere ulaşmasına katkıda bulunmuştur. Moleküler tekniklerin endüstriye başlıca etkileri şu alanlarda görülebilir:

2.7.1. Pazarda Rekabet

Yüksek lif kalitesi, yüksek tane verimi veya spesifik kanabinoid profilleri gibi üstün özelliklere sahip kenevir çeşitleri, endüstriye tüketicilerin ve endüstrilerin çeşitli taleplerini karşılamada rekabet avantajı sağlar. Moleküler teknikler, ıslahçıların pazar trendlerine yanıt verebilmesine ve son kullanıcıların değişen ihtiyaçlarına uygun çeşitler geliştirebilmesine olanak sağlar.

2.7.2. Ürün Farklaştırma

Moleküler tekniklerin kullanımı, farklı genetik profillere sahip benzersiz kenevir çeşitlerinin geliştirilmesine imkan sağlar, bu da üreticilerin ve sanayicinin pazarda ürünlerini farklılaştırmalarına ve endüstrinin spesifik taleplerine cevap verebilmelerine katkıda bulunur. Ekonomik büyüme ve pazarın genişlemesi için yeni fırsatlar yaratarak niş pazarlar, özel ürünler ve katma değerli uygulamalar için yollar açar.

2.7.3. İnovasyon ve Yenilik

Moleküler teknikler yeniliği ve kenevirden türetilen yeni ürünlerin geliştirilmesini teşvik eder. İslahçılar, moleküler markörler kullanarak ve önemli özelliklerin genetik altyapısını ortaya çıkararak, lif kalitesi, tane besleyicilik değeri, kanabinoid profilleri ve diğer istenilen özelliklerde ilerleme sağlayabilir. Bu da tekstil, inşaat malzemeleri, sağlık ve sürdürülebilir tarım gibi sektörlerde yeni uygulamaların geliştirilmesine yol açan ürün inovasyonunu destekler.

2.7.4. Sürdürülebilirlik ve Çevre Yönetimi

Kenevir ıslahında moleküler tekniklerin kullanılması, sürdürülebilir tarım ve çevre yönetimi ilkeleriyle uyumludur. Endüstri, hastalıklara dayanıklılık, stres etmenlerine tolerans ve üstün son kullanım özelliklerine sahip yeni çeşitler yetiştirerek, kimyasal girdilere bağımlılığı azaltabilir, kaynak verimliliğini artırabilir ve daha sürdürülebilir bir tarım sistemine katkıda bulunabilir.

3. Sonuç

Kenevir İslahında Moleküler Tekniklerin Kullanımı bölümünde, moleküler tekniklerin entegrasyonu ile kenevir tarımı ve ıslahı alanındaki devrimsel gelişmeler hakkında derinlemesine bir değerlendirme sunduk. Bu genomik araçların ve moleküler markörlerinin kenevir ıslahı üzerindeki önemli etkisi, araştırmacıların ve ıslahçıların verime, kaliteye ve sürdürülebilirliğe yaklaşımlarını temelden değiştirdiği için ne kadar övülse azdır. Bölüm boyunca, birçok moleküler teknikleri inceledik ve uygulamaları ve kenevir ıslahı üzerine etkilerini tartıştık.

Güvenilir moleküler markörler ile erken dönemde istenilen özelliklerin tespiti, ıslahçıların fide döneminde stratejik seçimler yapmasına olanak tanıyan, ıslah sürecini kolaylaştıran ve değerli ve kısıtlı kaynakların efektif

kullanılmasına olanak sağlayan güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Genetik markörlerin geliştirilmesi ve validasyonu, kenevir çeşitliliği ve karakterizasyonu konusundaki anlayışımızı önemli ölçüde artırmıştır. Nükleotid dizilerinden ve cinsiyet ile ilişkili bölgelerden yararlanarak araştırmacılar, farklı *Cannabis sativa* çeşitlerini ayırt edebilir ve tanımlayabilir, bu da germplazm yönetimine ve sürdürülebilir tarıma katkıda bulunur. Retrotranspozonlar ve fitokimyasal markörlerden elde edilen bilgiler, kenevir bitkileri ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimleri ortaya çıkararak, çevresel etkileşimler ve çeşit koruma çabaları için değerli bilgiler sunar. Bu çalışmalar, genetik çeşitlilik analizinin önemini vurgulayarak, kenevir tarımının uzun vadeli sürdürülebilirliğine katkıda bulunur ve çevresel zorluklar karşısında kenevir popülasyonlarının dayanıklılığını artırır. Genetik yapıların çeşitli araştırmacılar tarafından aydınlatılması, kenevir çeşitlerinin evrimsel ilişkilerine ve popülasyon dinamiklerine ışık tutmuştur. Bu araştırmalar, optimize edilmiş ıslah stratejileri için çok önemli bilgiler sunarak, istenilen özellikler ve adaptasyon kabiliyetine sahip üstün çeşitlerin geliştirilmesine fayda sağlamıştır. Moleküler markörlerin ve genomik tekniklerin uygulanmasıyla yapılan çalışmalar, kenevir çeşitleri de dahil olmak üzere kenevir bitkilerinde cinsiyet tanımlamasında devrim yaratmıştır. Bu gelişme, yalnızca verimi artırmakla kalmadı, aynı zamanda dişileştirilmiş kenevir bitkilerinin yetiştirilmesine ve yüksek CBD içeriği ile üstün özelliklere sahip çeşitler geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Bunun yanında tarım, tıp ve endüstrideki uygulamaların gelişmesine fayda sağlamıştır. Kenevir ıslahında moleküler teknikler, araştırmacılara ve ıslahçılara olasılıklarla dolu bir geleceğe doğru rehberlik ediyor. Kenevir genetiği hakkındaki bilgimiz artmaya devam ettikçe, yenilik ve dönüşüm potansiyelinin de sonu görünmüyor. “Kenevir ıslahında Moleküler Tekniklerin Kullanımı” bölümü, sürdürülebilir, verimli ve güvenilir ıslah programlarını yürütmeye moleküler biyoloji ve genetiğin gücünün bir kanıtıdır. Kenevir tarımı devam ettikçe, bu moleküler araçlar, insanlığın ve çevrenin iyileştirilmesi için bu çok yönlü bitkinin tüm potansiyelini açığa çıkararak, şüphesiz çok önemli bir rol oynamaya devam edecek. Bu bölüm, bilimsel bilginin pratik uygulama ile kesiştiği ve benzeri görülmemiş olasılıklar çağını başlatan bir paradigma değişikliğine işaret ediyor.

“Kenevir ıslahında Moleküler Tekniklerin Kullanımı”, kenevir tarımının gidişatını daha yeşil, daha sağlıklı ve daha sürdürülebilir bir dünyaya doğru şekillendirmede moleküler biyolojinin önemli etkisini ve potansiyelini özetlemektedir. Araştırmacılar ve ıslahçılar, yol gösterici pusulaları olarak moleküler tekniklerle, kenevir bitkisindeki genetik hazinelerden yararlanmak için bir arayışa giriyor ve bu olağanüstü bitkinin sürdürülebilir tarım, sağlık ve endüstrinin temel direklerinden biri haline geldiği bir geleceği geliştiriyor.

Sonuç olarak, kenevir ıslahında moleküler tekniklerin kullanılması, kenevir tarımının sınırsız olasılıkları ile heyecan verici bir yolculuğun başlangıcını işaret ediyor. Bilimsel bilgi ile pratiğin moleküler biyoloji yoluyla birleştirilmesi, kenevirin merkezde yer aldığı, gelecek nesiller için daha yeşil, daha sağlıklı ve daha sürdürülebilir bir gezegene katkıda bulunduğu bir dünyanın kapılarını açacaktır.

Kaynaklar

Abbas, A., Shah, A. N., Shah, A. A., Nadeem, M. A., Alsaleh, A., Javed, T., .Abdelsalam, N. R. (2022). Genome-Wide Analysis of Invertase Gene Family, and Expression Profiling under Abiotic Stress Conditions in Potato. *Biology*, 11(4), 539. <https://doi.org/10.3390/biology11040539>.

Ahmad, F., Akram, A., Farman, K., Abbas, T., Bibi, A., Khalid, S., & Waseem, M. (2015). Molecular markers and marker assisted plant breeding: current status and their applications in agricultural development. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences*, (11), 35–50.

Ahmar, S., Gill, R. A., Jung, K., Faheem, A., Qasim, M. U., Mubeen, M., & Zhou, W. (2020). Conventional and Molecular Techniques from Simple Breeding to Speed Breeding in Crop Plants: Recent Advances and Future Outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2590. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>.

Akgur, O., & Aasim, M. (2022). Deciphering the iPBS retrotransposons based genetic diversity of nanoparticles induced in Vitro seedlings of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Molecular biology reports*, 49(7), 7135–7143. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07596-7>.

Ali, F., Nadeem, M. A., Barut, M., Habyarimana, E., Chaudhary, H. J., Khalil, I. H., . Baloch, F. S. (2020). Genetic Diversity, Population Structure and Marker-Trait Association for 100-Seed Weight in International Safflower Panel Using SilicoDART Marker Information. *Plants*, 9(5), 652. <https://doi.org/10.3390/plants9050652>.

Alsaleh, A. (2023). From Grain to Genome: Investigating Arsenic Levels in *Triticum turgidum* ssp *durum* Desf. Using GWAS: Arsenic Levels in Durum Wheat from Türkiye. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 11(6), 1148–1160. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i6.1148-1160.6088>.

Alsaleh, A., Baloch, F. S., Sesiz, U., Nadeem, M. A., Hatipoğlu, R., Erbakan, M., & Özkan, H. (2022a). Marker-assisted selection and validation of DNA markers associated with cadmium content in durum wheat germplasm. *Crop & Pasture Science*, 73(8), 943–956. <https://doi.org/10.1071/cp21484>.

Alsaleh, A. (2022b). SSR-based genome-wide association study in Turkish durum wheat germplasms revealed novel QTL of accumulated platinum. *Molecular Biology Reports*, 49(12), 11289–11300. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07720-7>.

Alsaleh, A., Bektas, H., Baloch, F. S., Nadeem, M. A., & Özkan, H. (2022c). Turkish durum wheat conserved ex-situ and in situ unveils a new hotspot of unexplored genetic diversity. *Crop Science*, 62(3), 1200–1212. <https://doi.org/10.1002/csc2.20723>.

Alsaleh, A., Baloch, F.B., Nachit, M., Hakan Özkan, H. (2016). Phenotypic and genotypic intra-diversity among Anatolian durum wheat “Kunduru” landraces. *Biochemical Systematics and Ecology*, Volume 65, Pages 9-16, SSN 0305-1978, <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.01.008>.

Alsaleh, A., Baloch, F.S., Derya, M. Azrak, M., Kilian, B., Özkan, H. & Nachit, M. (2015). Genetic Linkage Map of Anatolian Durum Wheat Derived from a Cross of Kunduru-1149 × Cham1. *Plant Mol Biol Rep* 33, 209–220 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0749-6>.

Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10), e08093. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093>.

Ates, D., Sever, T., Aldemir, S., Yağmur, B., Temel, H. Y., Kaya, H. B., Tanyolac, B. (2016). Identification QTLs controlling genes for SE uptake in lentil seeds. *PLOS ONE*, 11(3), e0149210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149210>.

Baloch, F. S., Alsaleh, A., De Miera, L. E. S., Hatipoğlu, R., Çiftçi, V., Karaköy, T., Özkan, H. (2015). DNA based iPBS-retrotransposon markers for investigating the population structure of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.06.017>.

Baloch, F. S., Alsaleh, A., Shahid, M. Q., Çiftçi, V., De Miera, L. E. S., Aasim, M., Hatipoğlu, R. (2017). A Whole Genome DArTseq and SNP Analysis for Genetic Diversity Assessment in Durum Wheat from Central Fertile Crescent. *PLOS ONE*, 12(1), e0167821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167821>.

Baloch, F. S., Nadeem, M. A., Sönmez, F., Habyarimana, E., Mustafa, Z., Karaköy, T., . . . Chung, Y. S. (2022). Magnesium- a forgotten Element: Phenotypic Variation and genome wide Association study in Turkish Common bean germplasm. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.848663>.

Barcaccia, G., Palumbo, F., Scariolo, F., Vannozzi, A., Borin, M., & Bona, S. (2020). Potentials and Challenges of Genomics for Breeding cannabis cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573299>.

Bhat, J. A., Ali, S., Salgotra, R. K., Mir, Z. A., Dutta, S., Jadon, V., Prabhu, K. V. (2016). Genomic selection in the era of next generation sequencing for complex traits in plant breeding. *Frontiers in Genetics*, 7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00221>.

Blears, M. J., De Grandis, S. A., Lee, H., & Trevors, J. T. (1998). Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21(3), 99–114. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900537>.

Borin, M., Palumbo, F., Vannozzi, A., Scariolo, F., Sacilotto, G. B., Gazzola, M., & Barcaccia, G. (2021). Developing and Testing Molecular Markers in Cannabis sativa (Hemp) for Their Use in Variety and Dioecy Assessments. *Plants*, 10(10), 2174. <https://doi.org/10.3390/plants10102174>.

Borna, T., Salami, S. A., & Shokrpour, M. (2017). High resolution melting curve analysis revealed SNPs in major cannabinoid genes associated with drug and non-drug types of cannabis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1333456>.

Ceballos, H., Kawuki, R., Gracen, V., Yencho, G. C., & Hershey, C. H. (2015). Conventional breeding, marker-assisted selection, genomic selection and inbreeding in clonally propagated crops: a case study for cassava. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(9), 1647–1667. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2555-4>.

Cobb, J. N., Biswas, P., & Platten, J. D. (2018). Back to the future: revisiting MAS as a tool for modern plant breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(3), 647–667. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3266-4>.

Collard, B. C. Y., & Mackill, D. J. (2007). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363(1491), 557–572. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>.

Cömertpay, G., Baloch, F. S., Derya, M., Andeden, E. E., Alsaleh, A., Sürek, H., & Özkan, H. (2016). Population structure of rice varieties used in Turkish rice breeding programs determined using simple-sequence repeat and inter-primer binding site-retrotransposon data. *Genetics and Molecular Research*, 15(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017158>.

Concibido, V. C., Denny, R., Lange, D. A., Orf, J. H., & Young, N. D. (1996). RFLP Mapping and Marker-Assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332. *Crop Science*, 36(6), 1643–1650. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183x003600060038x>.

De Mori, G., & Cipriani, G. (2023). Marker-Assisted Selection in Breeding for Fruit Trait Improvement: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8984. <https://doi.org/10.3390/ijms24108984>.

Doh, E. J., Lee, G., Yun, Y., Kang, L. W., Kim, E. S., Lee, M. Y., & Oh, S. (2019). DNA Markers to Discriminate *Cannabis sativa* L. ‘Cheungsam’ with Low Tetrahydrocannabinol (THC) Content from Other South Korea Cultivars Based on the Nucleotide Sequences of *Tetrahydrocannabinolic Acid Synthase* and Putative *3-Ketoacyl-CoA Synthase* Genes. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/8121796>.

Farouk, I., Alsaleh, A., Motowaj, J., Gaboun, F., Belkadi, B., Filali-Maltouf, A., Nachit, M. M. (2021). Detection of grain yield QTLs in the durum population Lahn/Cham1 tested in contrasting environments. *Turk Biyoloji Dergisi*, 45(1), 65–78. <https://doi.org/10.3906/biy-2008-41>.

Gitonga, V. W., Koning-Boucoiran, C., Verlinden, K., Dolstra, O., Visser, R. G. F., Maliepaard, C., & Krens, F. A. (2014). Genetic variation, heritability and genotype by environment interaction of morphological traits in a tetraploid rose population. *BMC Genetics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0146-z>.

Grzebelus, D. (2006). Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers. (2006). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14, 21–29.

Hasan, M. M., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Mahmood, M., Harun, A. R., Alam, M. A., Latif, A. (2015). Marker-assisted backcrossing: a useful method for rice improvement. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 237–254. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.995920>.

Hasan, N., Choudhary, S., Naaz, N., Sharma, N., & Laskar, R. A. (2021). Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00231-1>.

Henry, P., Khatodia, S., Kapoor, K. *et al.* (2020). A single nucleotide polymorphism assay sheds light on the extent and distribution of genetic diversity, population structure and functional basis of key traits in cultivated north American cannabis. *J Cannabis Res* 2, 26 (2020). <https://doi.org/10.1186/s42238-020-00036-y>.

Ijaz, B., Zhao, N., Kong, J., & Hua, J. (2019). Fiber Quality Improvement in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Quantitative Trait Loci Mapping and Marker Assisted Selection Application. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01585>.

Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., & Kilian, A. (2001). Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 29(4), 25e–225. <https://doi.org/10.1093/nar/29.4.e25>.

Jain, A., Roorkiwal, M., Kale, S. M., Garg, V., Yadala, R., & Varshney, R. K. (2019). InDel markers: An extended marker resource for molecular breeding in chickpea. *PLOS ONE*, 14(3), e0213999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213999>.

Jarcho, J. A. (1994). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Current Protocols in Human Genetics*, 1(1), 2.7.1-2.7.15. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0207s01>.

Jin, D., Henry, P., Shan, J., & Chen, J. (2021). Identification of Chemotypic Markers in Three Chemotype Categories of Cannabis Using Secondary Metabolites Profiled in Inflorescences, Leaves, Stem Bark, and Roots. *Frontiers in plant science*, 12, 699530. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699530>.

Keats, B. J. (2013). Population genetics. In *Elsevier eBooks* (pp. 1–12). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-383834-6.00015-x>.

Khatak, S., Ghai, M., Dahiya, S. (2016). ISSR Marker based Inter and Intra- Specific Diversity Analysis in Different Genotypes of Cannabis sativa. *International Journal of Engineering Technology Science and Research (IJETSR)*. Volume 3, Issue 4, page: 6-16.

Kuleung, C., Baenziger, P. S., & Dweikat, I. (2003). Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(6), 1147–1150. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1532-5>.

Kumar, A., & Bennetzen, J. L. (1999). Plant retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 33(1), 479–532. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.479>.

Kumpatla, S. P. (2012). Genomics-assisted plant breeding in the 21st century: technological advances and progress. Retrieved from <https://scienceweb.uz/publication/276>.

Kushanov, F. N., Turaev, O. S., Ernazarova, D. K., Gapparov, B. M., Oripova, B. B., Kudratova, M. K., Abdurakhmonov, I. Y. (2021). Genetic Diversity, QTL Mapping, and Marker-Assisted Selection Technology in Cotton (*Gossypium* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.779386>.

Laird, P. W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 253–266. <https://doi.org/10.1038/nrc1045>.

Lande, R., & Thompson, R. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124(3), 743–756. <https://doi.org/10.1093/genetics/124.3.743>.

Li, G., & Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(2–3), 455–461. <https://doi.org/10.1007/s001220100570>.

Li, Y., Kaur, S., Pembleton, L. W., Valipour-Kahrood, H., Rosewarne, G. M., & Daetwyler, H. D. (2022). Strategies of preserving genetic diversity while maximizing genetic response from implementing genomic selection in pulse breeding programs. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(6), 1813–1828. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04071-6>.

Litt, M. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *PubMed Central (PMC)*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715430/>.

Liu, Q., Yang, F., Zhang, J., Hang, L., Rahman, S., Islam, S., . . . She, M. (2021). Application of CRISPR/CAS9 in crop quality improvement. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4206. <https://doi.org/10.3390/ijms22084206>.

Lochlainn, S.Ó., Amoah, S., Graham, N.S., Alamer, K., Rios, J.J., Kurup, S., Stoute, A., Hammond, J.P., Østergaard, L., King, G.J., White, P.J., Broadley, M.R. (2011) High Resolution Melt (HRM) analysis is an efficient tool to genotype EMS mutants in complex crop genomes. *Plant Methods*. 2011 Dec 8;7(1):43. doi: 10.1186/1746-4811-7-43. PMID: 22152063; PMCID: PMC3251530.

Mandolino, G., Carboni, A., Forapani, S., Faeti, V., Ranalli, P. (1999). Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.) *Theor Appl Genet*. 1999;98(1):86–92. doi: 10.1007/s001220051043.

Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (1998). A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *The Plant Journal*, 14(3), 381–385. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00123.x>.

Migicovsky, Z., & Myles, S. (2017). Exploiting wild relatives for genomics-assisted breeding of perennial crops. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00460>.

Moeinizade, S., Kusmec, A., Hu, G., Wang, L., & Schnable, P. S. (2020). Multi-trait genomic selection methods for crop improvement. *Genetics*, 215(4), 931–945. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303305>.

Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., Baloch, F.S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32(2), 261–285. doi:10.1080/13102818.2017.1400401.

Pan, G., Li, Z., Huang, S. *et al.* (2021). Genome-wide development of insertion-deletion (InDel) markers for Cannabis and its uses in genetic structure analysis of Chinese germplasm and sex-linked marker identification. *BMC Genomics* 22, 595 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07883-w>.

Paran, I., & Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(8), 985–993. <https://doi.org/10.1007/bf00215038>.

Pasay, C., Arlian, L. G., Morgan, M. S., Vyszenski-Moher, D. L., Rose, A., Holt, D. C., . . . McCarthy, J. S. (2008). High-resolution melt analysis for the detection of a mutation associated with permethrin resistance in a population of scabies mites. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(1), 82–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00716.x>.

Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M., & Rafalski, A. (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 15(10), 1275–1287. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025856>.

Peng, J.H., T. Fahima, M. S. Röder, Y. C. Li, A. Grama, and E. Nevo. (2000). Microsatellite high-density mapping of the stripe-rust resistance gene YrH52 region on chromosome 1B and evaluation of its marker-assisted selection in the F2 generation in wild emmer wheat. *New Phytologist* 146:141-154.

Perez-De-Castro, A. M., Vilanova, S., Cañizares, J., Pascual, L., Esteras, C., Díez, M.J., Picó, B. (2012). Application of genomic tools in plant breeding. *Current Genomics*, 13(3), 179–195. <https://doi.org/10.2174/138920212800543084>.

Petit, J., Salentijn, E., Paulo, M. J., Denneboom, C., Van Loo, E., & Trindade, L. M. (2020). Elucidating the Genetic Architecture of Fiber Quality in Hemp (*Cannabis sativa* L.) Using a Genome-Wide Association Study. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.566314>.

Prentout, D., Razumova, O., Rhoné, B., Badouin, H., Henri, H., Feng, C., ... & Marais, G. A. (2020). An efficient RNA-seq-based segregation analysis identifies the sex chromosomes of *Cannabis sativa*. *Genome Research*, 30(2), 164-172.

Punja, Z. K., & Holmes, J. E. (2020). Hermaphroditism in Marijuana (*Cannabis sativa* L.) Inflorescences – Impact on Floral Morphology, Seed Formation, Progeny Sex Ratios, and Genetic Variation. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00718>.

Qiu, Y., Wang, J., Lei, J., & Roeder, K. (2021). Identification of cell-type-specific marker genes from co-expression patterns in tissue samples. *Bioinformatics*, 37(19), 3228–3234. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab257>.

Rao, C. R. (1982). Diversity and dissimilarity coefficients: A unified approach. *Theoretical Population Biology*, 21(1), 24–43. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(82\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0040-5809(82)90004-1).

Ren, G., Zhang, X., Li, Y., Ridout, K., Serrano-Serrano, M. L., Yang, Y., Liu, A., Ravikanth, G., Nawaz, M. A., Mumtaz, A. S., Salamin, N., & Fumagalli, L. (2021). Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science advances*, 7(29), eabg2286. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg2286>.

Salentijn, E., Petit, J., & Trindade, L. M. (2019). The complex interactions between flowering behavior and fiber quality in hemp. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00614>.

Salgotra, R. K., & Chauhan, B. S. (2023). Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14(1), 174. <https://doi.org/10.3390/genes14010174>.

Salgotra, R. K., & Stewart, C. N. (2020). Functional markers for precision plant breeding. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4792. <https://doi.org/10.3390/ijms21134792>.

Sawler J., Stout, J.M., Gardner, K.M., Hudson, D., Vidmar, J., Butler, L., et al. (2015). The Genetic Structure of Marijuana and Hemp. *PLoS ONE* 10(8): e0133292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133292>.

Schwabe, A. L., Hansen, C. J., Hyslop, R. M., & McGlaughlin, M. E. (2021). Comparative Genetic Structure of *Cannabis sativa* Including Federally Produced, Wild Collected, and Cultivated Samples. *Frontiers in plant science*, 12, 675770. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.675770>.

Schwartz, M. K., Luikart, G., & Waples, R. S. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.009>.

Sebastian, J. S. V., Dong, X., Trostle, C., Pham, H. T., Joshi, M. S., Jessup, R. W., . . . Provin, T. (2023). Hemp agronomy: current advances, questions, challenges, and opportunities. *Agronomy*, *13*(2), 475. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020475>.

Shams, R., Azizi, A., Hamzei, J., Noroozisharaf, A., Moghadam, S., Kordrostami, M. (2020). Genetic structure and diversity of Iranian Cannabis populations based on phytochemical, agro-morphological and molecular markers. *Industrial crops and products*, *158*, 112950. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112950.

Sinha, D. (2023). Integrated genomic selection for accelerating breeding programs of Climate-Smart cereals. *MDPI*. <https://doi.org/10.3390/genes14071484>

Smith, C.J., Vergara, D., Keegan, B., Jikomes, N. (2022). The phytochemical diversity of commercial Cannabis in the United States. *PLoS ONE* *17*(5): e0267498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267498>.

Soler, S., Gramazio, P., Figas, M.R., Vilanova, S., Rosa, E., Llosa, R.R., Borrás, D., Plazas, M., Prohens, J. (2017). Genetic structure of Cannabis sativa var. indica cultivars based on genomic SSR (gSSR) markers: Implications for breeding and germplasm management, *Industrial Crops and Products*, Pages 171-178, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.043>.

Srungarapu, R., Mahendrakar, M. D., Mohammad, L. A., Chand, U., Jagarlamudi, V. R., Kondamudi, K. P., Srinivasan, S. (2022). Genome-Wide association analysis reveals Trait-Linked markers for grain nutrient and agronomic traits in diverse set of chickpea germplasm. *Cells*, *11*(15), 2457. <https://doi.org/10.3390/cells11152457>.

Teama, S. (2018). DNA Polymorphisms: DNA-Based molecular markers and their application in medicine. In *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79517>.

Toth, J. A., Stack, G. M., Cala, A. R., Carlson, C. H., Wilk, R. L., Crawford, J., . . . Smart, L. B. (2020). Development and validation of genetic markers for sex and cannabinoid chemotype in *Cannabis sativa* L. *Gcb Bioenergy*, *12*(3), 213–222. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12667>.

Ünlü, A., Polat, İ., Yildirim, A., & Onus, A. N. (2022). Mapping quantitative trait loci and developing first molecular marker for race 5 of *Podosphaera xanthii* resistance in melon (*Cucumis melo* L.). *Turkish Journal of Botany*, *46*(2), 123–133. <https://doi.org/10.55730/1300-008x.2676>.

Vergara, D., Baker, H., Clancy, K., Keepers, K. G., Mendieta, J. P., Pauli, C. S., Kane, N. C. (2016). Genetic and Genomic Tools for *Cannabis sativa*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *35*(5–6), 364–377. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1267496>.

Visković, J., Zheljaskov, V. D., Sikora, V., Noller, J. S., Latković, D., Ocamb, C. M., & Koren, A. (2023). Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Agronomy and Utilization: A Review. *Agronomy*, *13*(3), 931. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030931>.

Wenne, R. (2023). Microsatellites as Molecular Markers with Applications in Exploitation and Conservation of Aquatic Animal Populations. *Genes*, *14*(4), 808. <https://doi.org/10.3390/genes14040808>.

Xia, R., Tao, R., Qu, Y., Zhang, X., Yu, H., Yuan, C., Zhang, S., & Li, C. (2022). Development and Validation of a Novel and Fast Detection Method for *Cannabis sativa*: A 19-Plex Short Tandem Repeat Typing System. *Frontiers in plant science*, *13*, 837945. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.837945>.

Xu, Y., & Crouch, J. H. (2008). Marker-Assisted selection in plant breeding: From publications to practice. *Crop Science*, *48*(2), 391–407. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.04.0191>.

Zhang, X., Xu, G., Cheng, C., Lei, L., Sun, J., Xu, Y., . . . Tang, Q. (2021). Establishment of an *Agrobacterium* -mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis Sativa* L.). *Plant Biotechnology Journal*, *19*(10), 1979–1987. <https://doi.org/10.1111/pbi.13611>.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994;20 (2):176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>.

BÖLÜM III

KENEVİR BİTKİSİNDE İN VİTRO DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

In Vitro Tissue Culture Studies in Cannabis Plant

SABER DELPASAND KHABBAZI^{1*} & GÜNGÖR YILMAZ²

^{1*} (Dr. Öğr. Üyesi) Yozgat Bozok Üniversitesi, Kenevir Araştırmaları
Enstitüsü, Tarım ve Gıda Anabilim Dalı, Yozgat, Türkiye

E-mail: saber.delpasand@gmail.com

ORCID: 0000-0002-1697-9327

²(Prof. Dr.) Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Tarla Bitkileri Bölümü, Yozgat, Türkiye

E-mail: gungor.yilmaz@yobu.edu.tr

ORCID: 0000-0003-0070-5484

Özet

Kenevir bitkisi tek yıllık otsu bir bitki olup, endüstri, tıp, gıda ve eğlence gibi çeşitli alanlarda kullanım potansiyeline sahiptir. Bu bitkinin yetiştiriciliği uzun yıllar yasak olduğundan dolayı doku kültürü dahil bir çok alanda henüz yeterince araştırılmamıştır. *In vitro* doku kültürü yöntemleriyle bu bitki, çevre koşullarından bağımsız olarak kısa sürede çok sayıda çoğaltılabilir. Ancak doku kültürü için bitki genotip faktörünün araştırılması ve optimum besin ortamı içeriği ve fitohormonların sağlanması gerekir. Bu alanda yapılmış çalışmaların veriminin memnun edici olmaması ayrıca sonuçların tekrarlanabilirliğinin düşük olması kenevir doku kültüründeki araştırmaların önemini vurgulamaktadır. *In vitro* da rejenerasyon ve mikroçoğaltım için yüksek verimli tekrarlanabilir protokolün geliştirilmesi, bu bitki üzerine yapılacak gen transformasyon ve genetik düzenleme çalışmaları için de önemli bir adım sayılır. Bu bölüm kenevir doku kültürü ve mikro çoğaltımındaki besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi önemli faktörleri dikkate alarak hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: doku kültürü, in vitro rejenerasyon, kenevir, mikroçoğaltım

Abstract

The cannabis plant is an annual herbaceous plant and has the potential for use in various fields such as industry, medicine, food, and recreation. Since the cultivation of this plant has been prohibited for many years, it has not yet been adequately investigated in many areas, including tissue culture. Employing the *in vitro* tissue culture methods, this plant can be propagated in large numbers within a short period of time, regardless of environmental conditions. However, for tissue culture, the plant genotype factor should be investigated and optimum nutrient medium content and phytohormones should be provided. The studies conducted in this field to date are not satisfactory and the results are low in reproducibility emphasizing the importance of further research in cannabis tissue culture. The development of a highly efficient reproducible protocol for *in vitro* regeneration and micropropagation is also considered an important step for gene transformation and genetic modification studies on this plant. This chapter has been prepared by taking into account important factors such as nutrient media and plant growth regulators in cannabis tissue culture and micropropagation.

Keywords: Cannabis, in vitro regeneration, micropropagation, tissue culture

1. Giriş

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), Orta Asya kökenli, hızlı büyüyen otsu bir bitkidir (Andre vd., 2016). Bu bitki Cannabaceae familyasına aittir ve çok amaçlı kullanımı nedeniyle 5000 yılı aşkın bir süredir kültürü yapılmaktadır. Kenevir bitkisinden elde edilen lif, kumaş, iplik ve kağıt endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, gıda, yağ ve ilaç kaynağı ve eğlence amaçlarla da değerlendirilmektedir (Booth ve Bohlmann, 2019). Bu bitkinin kültürü dünyadaki çeşitli iklimlere uygun olmasına rağmen, birçok ülkede zaman zaman üretimi yasaklanmıştır. Bunun başlıca nedeni, uyuşturucu olarak kullanılan ve bağımlılık yapan tetrahidrokannabinol (THC) bileşiğinin hammadde kaynağı olmasıdır (De Meijer, 1995). Kenevir bitkisinin sekonder bileşiklerinden kannabidiol (CBD), günümüz araştırmalarında ilgi alanı olmuştur. Bu bileşiğin farmakoloji alanında kullanılabilecek bağımlılık yapmayan bir ilaç özelliği taşıdığı düşünülmektedir (Fitzcharles vd., 2023). Kenevir bitkisi kimyasal profil içeriğine göre niteliksel olarak farklı çeşitlere ayrılabilir ve kannabidiol

ve tetrahidrokannabinol oranları bu çeşitlerin sınıflandırılmasında genel bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Chandra vd., 2010). Tetrahidrokannabinol (THC) psikotrop bir maddedir ve kenevirin THC içeriğine bağlı olarak, lif tipi kenevir (<math><0,3</math>) veya uyuşturucu tipi esrar ($0,3$) olarak sınıflandırılabilir. Genel olarak, kenevirin erkek ve dişi çiçekleri ayrı bitkilerde gelişir ancak bazen hermafrodit fenotip de gösterir (Thomas ve ElSohly, 2016). Kanabinoid üretmek için dişi bitkiler, daha yüksek miktarlarda kanabinoid üretmeleri de dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle erkek bitkilere tercih edilir. Son yıllarda bu bitkinin farmasötik ve diğer endüstriyel amaçlarla yetiştirilmesine Türkiye'nin de aralarında bulunduğu bazı ülkelerde izinli olarak yetiştiriciliğini yapılması mümkündür. Bu bitki üzerine yapılan araştırmalar daha iyi lif ve tohum kalitesi, yüksek CBD içeriği veya tek evcikli bireyler gibi çok amaçlı özelliklere sahip yeni endüstriyel kenevir çeşitleri üretimine odaklıdır (Salentijn vd., 2015). *In vitro* doku kültürü çalışmaları, hem ıslah çalışmalarında kullanılacak gerekli ebeveyn bitkilerin sağlanmasında, hem de ıslah çalışmaları sonucunda elde edilen üstün çeşitlerin genetik yapıları değiştirilmeden çoğaltılmasında büyük katkılar sağlamaktadır. *In vitro* bitki çoğaltımında, bitkiler besin ortamı içeren kültür kaplarında ve yapay ışıkla aydınlatılan bir kültür odasında yetiştirilir. Böylece değerli genetik yapısına sahip ana bitkinin özellikle nesilleri tehlike altında olan germplazmaların çok sayıda küçük bir alanda hızlı çoğaltılması ve muhafaza edilmesi sağlanır (Ergül vd., 2018).

Ayrıca modern moleküler biyoloji teknikleriyle genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretilmesinde *in vitro* doku kültürü çalışmaları son derece önemli bir yere sahiptir (Bakhsh vd., 2016; Anayol vd., 2016; Khabbazi vd., 2018; Nofouzi vd., 2019). Birçok bitkinin *in vitro* şartlarda rejenerasyonu ve mikroçoğaltılması üzerine araştırmalar yapılmış ve etkili protokoller geliştirilmiştir. Ancak kenevir bitkisinin birçok ülkede yetiştirilmesinin yasak olması nedeniyle bu bitki üzerinde *in vitro* doku kültürü de dahil olmak üzere yeterli araştırma yapılmamıştır. Bu bölüm, kenevir bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımı ve rejenerasyonunda gerekli olan hususları dikkate alarak hazırlanmıştır.

2. Bitkilerde İn Vitro Doku Kültürü

Bitki doku kültürü, genellikle bitki klonlarını üretmek için kontrollü beslenme ve çevre koşulları altında hücrelerin, dokuların, organların veya tüm bitkinin *in vitro* da aseptik kültürüdür. Bu kontrollü koşullar, bitkilere gelişmeleri ve çoğalmaları için uygun bir ortam sağlar. Besin kaynağı, ortam pH'sı, ışık ve sıcaklık doku kültüründe önemli faktörlerden sayılır. Bitki doku kültürü, büyük

ölçekli bitki çoğaltımı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki doku kültürü teknikleri bitki çoğaltma, hastalık eliminasyonu, bitki yetiştirme ve sekonder metabolitlerin üretiminde büyük endüstriyel öneme sahip hale gelmiştir.

Eksplant olarak adlandırılan küçük doku parçaları, devam eden bir süreçte yüzlerce ve binlerce bitki üretmek için kullanılabilir. Tek bir eksplant, *in vitro* da nispeten kısa bir süre ve alanda mevsim ve hava durumu ne olursa olsun yıl boyunca çoğaltılarak birkaç bin bitkiye dönüştürülebilir (Akin-Idowu vd., 2009). Somatik embriyolar ve vegetatif tomurcuklar gibi eksplantlar kapsüllere alınarak sentetik tohumlar üretilebilir. Bu tohumlar kontrollü koşullar altında daha uzun süre muhafaza edilebilir ve istenilen zaman *in vitro* rejenerasyon ve kitlesel bitki çoğaltmada kullanılabilir (Khabbazi vd., 2019).

Yüksek verimli üretim amacıyla genetik olarak özdeş bitkiler (klonlar) *in vitro* koşullarda çoğaltılabilir. Mikroçoğaltım ile çoğaltılan bitkiler tek tip ve genotipi ana bitki ile aynıdır, patojen içermez ve geleneksel klonlama yöntemleriyle üretilen bitkilerle karşılaştırıldığında yüksek canlılık gösterirler (Hartmann vd., 2002). Bazı kallus kültürlerinde, somaklonal varyasyonun meydana gelme olasılığı nedeniyle ana bitkilerden farklı kalıtsal özelliklere sahip klonların da oluşumu mümkündür (George 1993).

3. Besin Ortamının İçeriği

Doku kültürü ortamı, bitkilerin normal büyümesi ve gelişmesi için gerekli tüm besin maddelerini içerir. Besin ortamları esas olarak makrobesinler, mikrobeseinler, vitaminler, diğer organik bileşenler, bitki büyüme düzenleyicileri (BBD), karbon kaynağı ve katı olması durumunda bazı katılaştırıcı maddeler içerir (Tablo 1). Murashige ve Skoog ortamı (1962) veya MS besin ortamı, birçok bitki türünün *in vitro* vejetatif çoğalmasında yaygın şekilde kullanılır. Ortamın pH'sı hem bitkilerin gelişmesi hem de BBD'lerin aktivitesini etkileyen önemli faktördür. Besin ortamı hem sıvı hem de katı şeklinde olabilir ve pH'sı 5,6-5,8 arasında ayarlanır. Ortamın bileşimi, özellikle BBD'ler ve nitrojen kaynağı, eksplantların başlangıç tepkisi üzerinde önemli etkilere sahiptir.

3.1. Bitki Doku Kültüründe Kullanılan Besin Ortamları

Bitki doku kültürü bitkilerin laboratuvarında aseptik koşullarda yetiştirilmesine olanak tanır. Doku kültüründe uygulanan sıcaklık, ışık ve fotoperiyod ile birlikte kullanılan besin maddeleri ve su, eksplantların gelişmesini sağlar. Hücreler ve dokuların farklılaşması ve gelişimi, ortama farklı BBD'lerin eklenmesiyle yönlendirilebilir. Bu çalışmaların çoğunda MS

besin ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) tam, ½ MS veya MMS (modifiye MS) olarak kullanılmıştır, ancak bazı çalışmalarda MS ortamının bileşenlerinin yetersiz olması nedeniyle ortam içeriği değiştirilebilir (Tablo 1). MS besin ortamı yüksek nitrat ve amonyum içeriğinden dolayı birçok monokotiledon ve dikotiledon bitki türünün *in vitro* kültüründe başarılı olmuştur. Ancak yüksek amonyum bazı bitkilerin doku kültürü için uygun değildir (Gamborg vd., 1976). MS ortamı yanında B5 ve modifiye edilmiş B5 besin ortamları da kullanılmaktadır (Gamborg vd., 1968). B5 ortamının amonyum oranı MS'e göre düşüktür ve bitkilerin ihtiyaçlarına bağlı besin ortamı seçilir. Örneğin B5 besin ortamı soğan bitkisi (*Allium cepa* L.) doku kültürü için uygun olmadığından bu ortamın amonyum ve fosfat miktarı arttırılarak daha uygun bir formülasyona (BDS) getirildi (Dunstan ve Short, 1977). BDS'nin kalsiyum miktarının arttırılmasıyla birçok monokotiledon, dikotiledon ve bazı odunsu bitkilere uygun BABI besin ortamı geliştirilmiştir (Greenway vd., 2012). Bu besin ortamının BDS'ye kıyasla bitki biyokütle büyümesi üzerinde güçlü bir etkisi olmamasına rağmen, bazı durumlarda eklenen kalsiyum ile bitki rejenerasyonu üzerinde olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (Greenway vd., 2012).

DKW ve WPM ortamları odunsu bitkilerin doku kültürü için geliştirilmiştir (Lloyd ve McCown, 1980, Driver ve Kuniyuki, 1984). WPM, ½-MS ve MMS, daha az makro besin içerdikleri nedeniyle odunsu bitkilerin doku kültüründe yaygın olarak kullanılmaktadır. WPM'nin toplam nitrojen miktarı düşüktür ve MS'den daha az amonyum içerir. Öte yandan DKW, MS gibi daha yüksek bir amonyum-nitrat oranına sahiptir, ancak MS ile karşılaştırıldığında daha düşük bir toplam nitrojen içeriğine sahiptir (Tablo 1). Ayrıca WPM ve DKW'nin yüksek sulfat içeriği bazı odunsu bitkilerin doku kültürüne olumlu katkılar sağlamıştır (Phillips ve Garda, 2019). Kenevir bitkisinin doku kültürü çalışmalarının çoğunda MS besin ortamı tam veya ½ MS olarak kullanılmıştır. Genellikle sürgün ve kallus oluşumu için tam MS kullanılırken, köklenme için ½ MS kullanılmıştır (Adams vd., 2021).

MS'nin yanı sıra DKW, WPM, B5 ve BABI ortamları da kullanılmış ve yapılan bir araştırma sonucuna göre DKW ortamlarında yetiştirilen kenevir bitkilerinin daha sağlıklı olduğu tespit edilmiştir (Page vd., 2020). DKW ve MS besin ortamlarının her ikisinin de nispeten zengin bazal tuzlar içerdiği kenevir doku kültürünün yüksek besin seviyeleri gerektirdiğini düşündürür. Bu iki besin ortamı arasındaki en önemli fark DKW'nin MS'e göre daha yüksek kükürt, bakır ve kalsiyum oranına sahip olmasıdır (Page vd., 2020). Ayrıca DKW'nin bir başka avantajı da, bu besin ortamında yetiştirilen birçok kenevir çeşidinin,

mikroçoğaltma kabiliyetinde bozulma olmadan birkaç yıl boyunca muhafaza edilmesidir (Monthony vd., 2020)

Tablo 1. Yaygın olarak kullanılan bitki doku kültürü bazal ortamlarının besin konsantrasyonları (Phillips ve Garda, 2019)

Bazal ortam	B5	BDS	BABI	MS	MMS	WPM	DKW
<i>Makrobesinler (mg L⁻¹)</i>							
KNO ₃	2500	2500	2500	1900	950	–	–
K ₂ SO ₄	–	–	–	–	–	990	1559
NH ₄ NO ₃	–	320	320	1650	825	400	1416
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	–	–	–	–	–	556	1948
NH ₄ H ₂ PO ₄	–	230	230	–	–	–	–
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150	150	150	–	–	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	134	134	–	–	–	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	250	250	370	185	370	740
KH ₂ PO ₄	–	–	–	170	85	170	265
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	150	440	440	220	96	149
<i>Mikrobesinler (mg L⁻¹)</i>							
H ₃ BO ₃	3	3	3	6.2	6.2	6.2	4.8
KI	0.75	0.75	0.75	0.83	0.83	–	–
MnSO ₄ ·H ₂ O	10	10	10	16.9	16.9	22.3	33.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	2	2	10.6	10.6	8.6	–
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	–	–	–	–	–	–	17
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.039	0.039	0.039	0.025	0.025	0.25	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.39
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	–	–
NiSO ₄ ·6H ₂ O	–	–	–	–	–	–	0.005
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	33.8
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	45.4
<i>Vitaminler ve organik maddeler (mg L⁻¹)</i>							
Myo-inositol	100	100	100	100	100	100	100
Nicotinic acid	1	1	1	0.5	1	0.5	1
Pyridoxine HCl	1	1	1	0.5	1	–	0.5
Thiamine HCl	10	10	10	0.1	10	1.6	2
Glycine	–	–	–	2	–	–	20
L-Glutamine	–	–	–	–	–	–	250
Sucrose (g/L)	20	30	30	30	30	20	30
pH	5.5	5.8	5.8	5.8	5.8	5.6	5.5

3.2. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki hormonları iki ana gruba ayrılır. Birinci grup oksin, sitokinin, gibberellinler, absisik asit ve etilenin ait olduğu klasik bitki hormonlarını içerirken, diğer grup jasmonatlar, salisilik asit, brasinosteroidler ve poliaminler gibi daha sonra tescillenmiş hormonları ihtiva eder (Gross ve Parthier, 1994). Eski grup hormonlardan oksinler, sitokininler ve gibberellinler bitki büyümesini destekler ancak absisik asit ve etilen bitki büyümesi üzerine inhibe edici etkiye sahiptir.

Doğal bitki hormonları etkisine sahip sentetik bileşiklere bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) denir ve doku kültürü çalışmalarında kullanılır (Davies, 1995). *In vitro* doku kültüründe kullanılan BBD'ler bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının büyümesini ve farklılaşmasını sağlar. BBD'ler kimyasal haberciler olarak hücreden hücreye hareket ederler, iletişimi kolaylaştırırlar ve bitkilerdeki tüm gelişme ve büyüme faktörlerini yönetirler. Oksinler ve sitokininler en yaygın kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir ve genellikle hücre çoğalmasını ve bitki büyümesini teşvik ederler. 1-Naftalin asetik asit (NAA) ve İndol-3-bütirik asit (IBA) doku kültüründe en yaygın kullanılan oksin türleridir. NAA ve IBA'dan sonra en çok 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), indol-3-asetik asit (IAA) ve pikloram (PIC) kullanılır (Herman, 2015). NAA, IBA ve IAA, sürgün çoğaltma ve köklendirme kültürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. IAA doğal bir BBD türüdür, ışığa karşı hassastır ve kolayca degrade olur. Doku kültürü çalışmalarında sitokininler arasında sırasıyla N6-benziladenin (BA) ve kinetin (KIN) en çok kullanılmıştır; tidiazuron (TDZ) ve 2-izopenteniladenin (2-IP), BA ve KIN'e göre daha az kullanılmıştır (Herman, 2015). Zeatin bir doğal sitokinin türüdür ve kimyasal yapısı BA gibi sentetik versiyonlarına göre daha az stabil ve ayrıca pahalıdır. TDZ'nin hem oksinler hem de sitokininlerle ortak özelliklere sahip olduğu görülmektedir ve çoğunlukla odunsu bitki uygulamalarında kullanılmaktadır (Huetteman ve Preece, 1993; Phillips ve Garda, 2019).

Doku ve organ kültürlerinde hücre büyümesinin, hücre farklılaşmasının ve organogenezin sitokininler ve oksinler arasındaki etkileşim tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (Gaspar vd., 1996). Herman (2015) araştırmasına göre yapılan doku kültürü çalışmalarının %89'unda sadece oksin ve sitokinin kullanılması kültürün başarılı olması için yeterlidir. Oksin ve sitokinin arasındaki oran bitki doku kültürü çalışmalarında hücre diferansiyasyon veya dediferansiyasyon durumunu kontrol eder. Kullanılan BBD'lerin türü ve konsantrasyonu, esas olarak bitkinin türüne, kültürü yapılan doku veya organa ve deneyin amacına bağlıdır (Ting, 1982). Yüksek oksin konsantrasyonu

genellikle kök oluşumunu desteklerken, yüksek sitokinin konsantrasyonu sürgün rejenerasyonunu teşvik eder (Khabbazi vd., 2017). Hem oksin hem de sitokinin dengesi, kallus olarak bilinen farklılaşmamış hücrelerden oluşan bir kütlelenin gelişmesini sağlar.

Oksinler, hücre büyümesi, hücre bölünmesinin başlatılması ve meristemlerin organize edilmemiş kallus dokulara veya genellikle kökler olmak üzere tanımlanmış organlara dönüşmelerine yol açar ve vasküler farklılaşmayı destekler (Gaspar vd., 1996). Sitokininler ise genellikle oksinlerle birlikte hücre bölünmesinin uyarılmasını sağlarlar. Oksinler ve sitokininler her biri hücre döngüsünün farklı fazlarını etkileyerek hücre bölünmesini ortak olarak düzenlerler. Oksinler DNA replikasyonunu etkilerken, sitokininler mitoz ve sitokinez üzerine etkili olduğu görülmektedir (Vesely ve diğerleri, 1994; Gaspar vd., 1996). Bu nedenle, doku kültürlerinde kullanılan oksin ve sitokininlerin miktarları dikkatli bir şekilde dengelenmesi ve kontrol edilmesi gerekmektedir. Gibberellinler (GA'lar), hücre bölünmesini ve uzamasını artırmaları için özellikle odunsu bitkilerin *in vitro* doku kültüründe sürgün uzamasını desteklemek amaçla kullanılır ancak GA'lar sürgün, kök ve somatik embriyo oluşumunu engelleyebilir (Gaspar vd., 1996).

4. Kenevirde Doku Kültürü

Kenevir, tohum, klonal çoğaltma veya doku kültürü yöntemleriyle çoğaltılabilir. İç mekan tarımında, klonal çoğaltma daha çok tercih edilen çoğaltma yöntemidir ve genellikle gövde kesimleri yoluyla gerçekleştirilir. İstenen nitelikleri taşıyan ana bitkinin çoğaltılmasıyla, gelecek nesiller için bu özellikler korunur. Klonal çoğaltma yönteminin aynı zamanda arzu edilen ana bitkileri muhafaza etmek için geniş alan ihtiyacı, böcek zararlıları ve hastalıklar olasılığı ve otomatik çiçeklenen çeşitlerde vejetatif büyümeyi sürdürmenin zorluğu gibi sınırlamaları da vardır (Monthony vd., 2021).

Klonal çoğaltmanın kısıtlamalarını aşmak için alternatif olarak doku kültürü yöntemleri kullanılır. Kenevir doku kültürü çalışmaları sürgün rejenerasyonu ve mikroçoğaltım olarak iki ana gruba ayrılır. Bu çalışmalarda kotiledon, hipokotil, genç yapraklar, bitki sapı, yaprak sapı, boğum arası, aksiller ve apikal meristem, çiçek ve kök kısımları kullanılabilir. Meristem bölgeleri, bitki gelişiminin ilk dönemlerinde ve yüksek plastisiteye sahip hücreleri içeren bölgelerdir ve mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılır. Sürgün rejenerasyon çalışmalarında, yaprak sapları veya kotiledonlar gibi meristematik olmayan dokulardan sürgün oluşumu sağlanır.

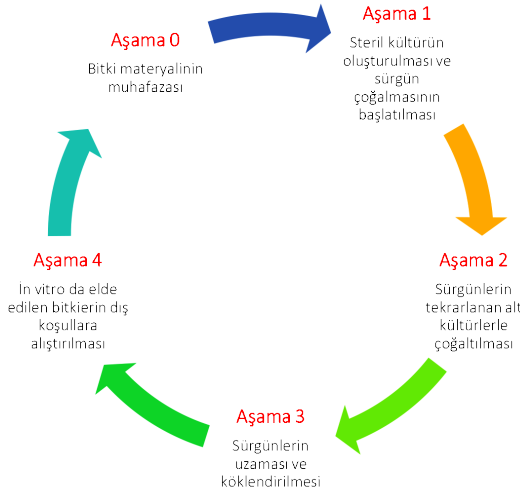
4.1. Mikroçoğaltım

Mikroçoğaltım, sağlıklı ve hastalık taşımayan bitkilerin kısa sürede ve tüm yıl boyunca büyük ölçekte *in vitro* koşullarda üretimidir. Bu yöntem bitki çoğaltması ve nesilleri tehdit altında olan bitki türlerinin *in vitro* da korunması için güvenilir bir yaklaşımdır. Mikroçoğaltım, aksiller, apikal ve çiçek meristemleri gibi mevcut bir meristem bölgesinden çoklu sürgünün elde edilmesini sağlar. Kenevir üzerinde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında aksiller ve apikal meristem eksplantları daha fazla kullanılmakta olup, bunlardan aksiller meristem eksplantları daha başarılı sonuçlar vermektedir. Cannabis ile ilgili en eski *in vitro* çalışmalar endüstriyel kenevir üzerine yapılmıştır ve bunun *in vitro* kültüre uygunluğunun ve doku kültürünün bitkinin tarımsal ve kimyasal özelliklerini etkileyip etkilemeyeceğinin belirlenmesine odaklanmıştır (Richez-Dumanois vd., 1986; Plawuszewski vd., 2006; Wielgus vd., 2008; Chandra vd., 2010). Richez-Dumanois ve ark. (1986), IBA ve BAP kullanımıyla, boğum bölgelerindeki meristem dokularından oluşan sürgünlerin büyümesini teşvik ederek kenevirin *in vitro* da çoğaltılabileceğini göstermiştir. Ayrıca *in vitro* da yetiştirilen bitkilerin kimyasal ve fiziksel profillerinin, serada yetiştirilen bitkilere benzer olduğu da bildirilmiştir. Bu bulgu, aynı zamanda boğum bölgelerini kullanarak mikroçoğaltımı yapılan medikal kenevirde de doğrulanmıştır (Chandra vd., 2010).

Bitki mikroçoğaltımı genelde beş farklı aşamaya bölünür (Şekil 1). Temel olarak bu süreç ana bitki materyalini kullanarak başlar bu yüzden bu materyalin temin edilmesi ve korunması gerekmektedir (Aşama 0). Ana bitkilerden temin edilen eksplantlarla steril kültür oluşturulup ve sürgün çoğalması başlatılır (Aşama 1). Elde edilen sürgünler defalarca alt kültür yapılarak çoğaltılır (Aşama 2). Besin ortamlarına uygun BBD'ler eklenerek sürgünlerin uzaması ve ardından köklendirilmesi sağlanır (Aşama 3). Bir sonraki aşamada *in vitro* koşullarda elde edilen bitkiler dış koşullara alıştırılır (Aşama 4). Aşama 0'daki ana bitkilerin genel durumu iyiye, eksplantların dezenfeksiyona tepkisi iyi olur. Aşama 1'de ana bitkilerden kalan enerji kalıntıları ve hormonlar sonucunda ilk büyüme hızı sağlanır. Hızlı büyüme ardından kültür stabil hale gelinceye kadar sporadik büyüme yaşanır (Murashige, 1974; Vardja ve Vardja, 2001). Aşama 2'deki eksplantların uzun vadede kültürlerinde gerileme olur öyle ki aşama 1'den alınan rejenere olmuş eksplantların sayısında %82'ye kadar düşüş görülmüştür (Wróbel vd., 2022). Kültürlerdeki gerileme, dokularda hiperhidrite (camsılık), kalluslaşma ve birçok durumda kültürlerin ölümüyle kendini gösterir (Page vd., 2020). Ayrıca erkek kenevir bitkilerin dişileşmesine (feminizasyonuna)

ve bu bitkilerde hermafroditizmin ortaya çıkmasına neden olur. Erkek kenevir bitkilerinde hermafroditizmin görünmesi aşama 2’de etilenin birikimi ve besin ortamının optimum olmamasından kaynaklı olabilir (Galoch, 1978; Kumar vd., 2009). Bu sorunların ortaya çıkması kenevir bitkisinin uzun sürede (aşama 2) *in vitro* koşullarda tutulmasını ve mikroçoğaltımını zorlu hale getirmiştir. Aşama 2 deki sorunları aşmak için bu aşamada kullanılacak besin yerlerinin makro ve mikro element içeriği optimize edilmelidir. Kenevir doku kültürü çalışmalarında genelde MS besin ortamı kullanılıyor ancak DKW besin ortamının daha yüksek seviyelerde kükürt, bakır ve kalsiyum içerdiğinden dolayı aşama 2 için daha iyi olduğu bildirilmiştir (Page vd., 2020). DKW besin ortamını kullanarak, birçok kenevir çeşidi ciddi bir gerileme olmaksızın birkaç yıl boyunca *in vitro* da muhafaza edilmektedir (Monthony vd., 2020).

Eksplantlar *in vitro* koşullar altında büyümeye alıştıktan sonra, 2. aşamada oluşan sürgünlerin sayısı, sürekli alt kültürle katlanarak artar. Kenevir bitkisinde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarının çoğunun amacı BBD’lerin mikroçoğaltımdaki etkilerinin araştırılmasına ve bu bitkinin 1., 3. ve 4. aşamalarının optimizasyonuna odaklıdır. Ancak 2. aşamada ve tekrarlanan alt kültürlemeler sonucunda bitkilerin sağlığının uzun sürede nasıl etkilendiği ayrıca araştırılmalıdır.



Şekil 1. Doku kültürü çalışmalarının farklı aşamaları

4.2. Rejenerasyon

Bitkilerin *in vitro* da meristem bölgelerini kullanarak çoğaltılması, düşük mutasyon oranı ve genetik olarak özdeş bitki oluşumunu sağlasa da, daha

yüksek bitki çoğaltım oranı elde etmek için *de novo* rejenerasyon sistemleri kullanılabilir. Sürgün mikroçoğaltımında kullanılan meristematik bölgeler bitkinin tüm doku bileşiminin küçük bir kısmını temsil eder ve sınırlı sayıdadır. Meristematik olmayan somatik dokulardan rejenerasyon, mikroçoğaltım için daha geniş bir başlangıç malzemesi sağlar. Organogenez ve embriyogenez yoluyla somatik dokulardan *de novo* rejenerasyon, üretilen eksplantların sayısını önemli derecede artırabilir.

Sürgün rejenerasyonu kallus veya süspansiyon kültürlerinden doğrudan veya dolaylı organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla gerçekleşir. Kenevir doku kültürü çalışmalarında hipokotil, epikotil, kotiledon, yaprak, yaprak sapı, boğum arası, akisler boğumlar, çiçek ve kök dokuları kullanılarak *in vitro* rejenerasyon potansiyeli araştırılmıştır (Monthony vd., 2021). Beş kenevir çeşidi üzerine yapılan bir çalışma, hipokotil, kotiledon ve gerçek yaprakların doğrudan organogenezini inceleyerek, beş çeşidin tamamında hipokotillerin en duyarlı olduğunu belirlemiştir (Galán-Ávila vd., 2020). Bu çalışmada uygulamalara hipokotil eksplantlarının %49,5'inin, kotiledon ve gerçek yaprak eksplantlarının ise sırasıyla %4,7 ve %0,42'sinin yanıt verdiği rapor edilmiştir. Ayrıca rejenerasyon oranı eksplant kaynağına ve genotipe bağlı ciddi derecede değişiklik göstermiştir. Ancak elde edilen eksplant başına sürgün sayısı oldukça düşük olup 1-2 adettir. Lata ve ark.(2010), medikal kenevirin somatik dokularından oluşan kallusların %96,6'sından dolaylı rejenerasyon ve ortalama kültür başına 12,3 adet sürgün elde etmiştir. Kallus oluşumu 0,5 μ M NAA+1,0 μ M TDZ içeren MS besin ortamında gerçekleşmiştir ve ardından kallus dokuları rejenerasyon için 0,5 μ M TDZ içeren MS ortamına aktarılmıştır. Sürgün rejenerasyonunda bu protokolün sonuçları başarılı olmasına rağmen diğer çalışmalarda tekrarlanamamıştır. Benzer çalışmaların ise sonuçları ya tam paylaşılmamıştır ya da belirsizdir. Bu yüzden bu protokollerin tekrarlanabilirliği, hem rejenerasyon hem de sürgün mikroçoğaltımında düşüktür.

Ayrıca, meristem hücresi olmayan somatik dokular ve kallustan elde edilen sürgünlerde somaklonal varyasyon da görünebilir. Somaklonal varyasyon doku kültüründe ve genel olarak kallugenez aracılığıyla oluşan sürgünlerde ortaya çıkar. Somaklonal varyasyonun sıklığı, kullanılan eksplantın kaynağı, genotip, *in vitro* büyüme koşulları, kültür süresinin uzunluğu ve alt kültürlerin sayısı gibi farklı faktörlerden etkilenebilir. Bu faktörlerin çoğu, *in vitro* kültürün başlatılması ve alt kültürlenme sırasında oksidatif strese neden olur ve ortaya çıkan stres, mutasyon oranının artışı destekler (Adhikary vd., 2021). Doku kültürünün amacına bağlı olarak somaklonal varyasyon avantaj ya da dezavantaj olarak değerlendirilebilir.

4.3. Somatik Embriyogenez

Bitkilerde somatik hücrelerden bipolar yapıların oluşmasına somatik embriyogenez (SE) denir (Yang ve Zhang, 2010). Bu embriyolar tipik embriyonik organları, radikulayı, hipokotil ve kotiledonları taşır ancak farklı bir şekilde gelişirler. SE, devamlı klonal çoğaltım için önemli bir biyoteknolojik yaklaşım olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntem, somatik hücre veya dokuların farklılaşmış embriyolara dönüştüğü bir süreçtir. Somatik embriyolar dölleme olmadan oluşur ve zigotik embriyolar gibi tam bitkilere dönüşebilir. SE, doğrudan eksplantlardan veya dolaylı olarak kallus adı verilen organize olmayan bir hücre kütesinin oluşmasıyla başlatılabilir (Yang ve Zhang, 2010). Doğrudan ve dolaylı SE arasında ayırım yapmak zordur çünkü bunlar ortamda birlikte gerçekleşirler (Von Arnold vd., 2002). SE yoluyla bitki rejenerasyonu tohum, yaprak veya sap kısımlarından embriyogenik kültürlerin indüksiyonu ve ardından embriyoların çoğalmasıyla gerçekleşir. Olgun embriyolar daha sonra çimlenme ve bitkicik gelişimi için kültüre alınır ve son olarak toprağa aktarılır.

Somatik embriyo indüksiyonu BBD'lere bağlı bir süreçtir. Oksinler SE oluşumunun ve postembriyonik bitki gelişiminin erken aşamalarının ana düzenleyicisidir (Elhiti ve Stasolla, 2016). Oksin indükleyici promotörlerle yapılan birçok çalışmada, oksinlerin erken embriyo oluşumunda anahtar adımlara aracılık ettiğini belirlenmiştir (Smit ve Weijers, 2015). IAA ve IBA, 2-naftoksiasetik asit (2-NOA) ve NAA gibi oksinler SE'yi indükleyebilir. Farklı BBD'ler SE'yi etkiler ancak 2,4-D SE üzerine maksimum etkinliği gösterdiğinden dolayı yaygın olarak kullanılır (Raghavan, 2004). 2,4-D stres faktörü olduğundan bitki türüne özel uygulanması gerekmektedir. Örneğin havuç bitkilerinde 2,4-D'nin ortamdan uzaklaştırılması embriyogenik yapının gelişimini arttırmaktadır (Fujimura, 2014).

Sitokininlerin ayrıca SE dahil büyüme, gelişme ve farklılaşmanın çeşitli yönlerinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Hindistan cevizi suyunun biber bitkisi SE'si üzerindeki etkisinin 10 µM TDZ den daha büyük olduğu görünmüştür bunun nedeni ise hindistan cevizinde doğal olarak Zeatin gibi sitokininin bulunmasıdır (Ge vd., 2006). Ancak SE'yi başlatmak için sitokininin takviyesi her zaman gerekli değildir (Steinitz vd., 2003).

JA (jasmonik asit) ve ABA yonca bitkisinde kallus büyümesi ve SE üzerinde inhibitör etki göstermiştir (Ruduş vd., 2001). JA diğer BBD'lerle birlikte besin ortamına eklendiğinde sürgün, kök ve kallus oranını artırır ve mikrotüp ve soğancık oluşumunu indükler ancak SE'yi olumsuz etkiler (Kamińska, 2021).

4.4. *In Vitro* da Gelişen Sürgünlerin Köklendirilmesi

Kenevir *in vitro* köklendirme çalışmalarının çoğunlukla başarılı olduğu görülmektedir ve bunların çoğunda genotip ve tipten bağımsız olarak sürgünlerin kök durumu tatmin edicidir. Köklendirme için kullanılan besin ortamları çoğunlukla tam MS ancak bazı çalışmalarda ½ MS, DKW, DARIA (root+) ve B5 besin ortamları da kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda köklenmeyi desteklemek için besin ortamına aktif kömür ilave edilmiştir (Richez-Dumanois vd., 1986; Lata vd., 2009a). Köklendirme araştırmalarında IBA, NAA, IAA, Kinetin+NAA, TDZ+NAA ve mT gibi farklı BBD'lerin etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında IBA içeren ½ MS besin ortamlarının daha iyi kök oluşum yüzdesi gösterdiği görülmüştür (Monthony vd., 2021).

4. Sonuç

Kenevir bitkisinin ekiminin yasaklanması sonucunda bu bitki üzerine doku kültürü çalışmaları dâhil yeterli araştırma yapılmamıştır. Ancak son yıllarda bazı ülkelerde yasakların gevşetilmesiyle birlikte bu bitki farklı yönlerden araştırılmaya başlanmıştır. Kenevir bitkisinin doku kültürü, genotipe bağlıdır ve rejenerasyona karşı inatçıdır, bu da bu bitkinin *in vitro* da rejenerasyonunu zorlaştırmaktadır. Ayrıca yüksek tekrarlanabilirliğe sahip başarılı mikroçoğaltım ve rejenerasyon protokollerinin bulunmaması, bu bitki üzerine daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir. Bu bitkinin mikroçoğaltımı ve rejenerasyonunun optimize edilmesi aynı zamanda bu bitkinin gen transformasyonu ve genetik modifikasyon çalışmalarına da önemli katkılar sağlayacaktır.

Kaynaklar

Adams, T. K., Masondo, N. A., Malatsi, P., & Makunga, N. P. (2021). Cannabis sativa: From therapeutic uses to micropropagation and beyond. *Plants*, 10(10), 2078.

Adhikary, D., Kulkarni, M., El-Mezawy, A., Mobini, S., Elhiti, M., Gjuric, R., ... & Bhowmik, P. (2021). Medical cannabis and industrial hemp tissue culture: Present status and future potential. *Frontiers in plant science*, 12, 627240.

Akin-Idowu, P.E., Ibitoye, D.O., Ademoyegun, O.T. (2009). Tissue culture as plant production technique for plant horticultural crop. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(16): 3782-3788.

Anayol, E., Bakhsh, A., Karakoç, Ö. C., Onarıcı, S., Köm, D., Aasim, M., ... & Özcan, S. (2016). Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton. *Plant Biotechnology Reports*, 10, 83-94.

Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science*, 19.

Bakhsh, A., Anayol, E., Khabbazi, S. D., Karakoç, Ö. C., Sancak, C., & Özcan, S. (2016). Development of insect-resistant cotton lines with targeted expression of insecticidal gene. *Archives of Biological Sciences*, 68(4), 773-780.

Booth, J. K., & Bohlmann, J. (2019). Terpenes in *Cannabis sativa*—From plant genome to humans. *Plant Science*, 284, 67-72.

Chandra, S., Lata, H., Mehmedic, Z., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2010). Assessment of cannabinoids content in micropropagated plants of *Cannabis sativa* and their comparison with conventionally propagated plants and mother plant during developmental stages of growth. *Planta medica*, 76(07), 743-750.

Davies, P. J., ed. *Plant hormones*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1995:13-38.

De Meijer, E. P. M. (1995) Fibre hemp cultivars: A survey of origin, ancestry, availability and brief agronomic characteristics. *Journal of the International Hemp Association*, 2(2), 66-73.

Driver JA, Kuniyuki AH (1984) In vitro propagation of Paradox walnut rootstocks. *HortScience* 19:507.

Dunstan DI, Short KC (1977) Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol Plant* 41:70–72

Elhiti M, Stasolla C (2016) Somatic embryogenesis: the molecular network regulating embryo formation. *Somat Embryog Ornam Appl*.

Ergül, A., Khabbazi, S. D., Oğuz, M. Ç., Özmen, C. Y., Gürel, S., & Gürel, E. (2018). In vitro multiplication of wild relatives in genus *Beta* conserves the invaluable threatened germplasms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134, 169-175.

Fitzcharles, M. A., Clauw, D. J., & Häuser, W. (2023). Cautious Hope for Cannabidiol (CBD) in Rheumatology Care. *Arthritis care & research*, 75(6), 1371-1375.

Fujimura T (2014) Carrot somatic embryogenesis. A dream come true? *Plant Biotechnol Rep* 8(1):23–28.

Galán-Ávila, A., García-Forte, E., Prohens, J., & Herraiz, F. J. (2020). Development of a direct in vitro plant regeneration protocol from *Cannabis*

sativa L. seedling explants: developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 645.

Galoch, E. (1978). The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). The influence of plant growth regulators on sex expression in male and female plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 47(1–2), 153-162.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158.

Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. *In Vitro* 12:473–478.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32, 272-289.

George, E.F. (1993) *Plant propagation by Tissue Culture*. Eastern Press, Eversley.

Ge L, Yong JWH, Tan SN, Ong ES (2006) Determination of cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 27(11):2171–2181.

Gross, D., & Parthier, B. (1994). Novel natural substances acting in plant growth regulation. *Journal of plant growth regulation*, 13, 93-114.

Greenway MB, Phillips IC, Lloyd MN, Hubstenberger JF, Phillips GC (2012) A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 48:403–410

Hartmann HT, Kester DE, Davies FT Jr, Geneve RL (2002) *Hartmann & Kester's plant propagation: Principles and practices* (7th ed). Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.

Herman EB (2015) *Recent advances in plant tissue culture XXI. Media and techniques for growth, regeneration and storage: 2011–2015*. Agritech Consultants Inc., Shrub Oak, NY 148 pp.

Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazurn: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:105–109.

Kamińska M (2021) Role and activity of jasmonates in plants under in vitro conditions, plant cell. *Tissue Organ Cult (PCTOC)* 146(3):425–447.

Khabbazi, S. D., Barpete, S., Sancak, C., & Özcan, S. (2017). Preconditioning effect of BAP on in vitro multiplication of mature embryo of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Fresen Environ Bull*, 26, 919-925.

Khabbazi, S. D., Khabbazi, A. D., Özcan, S. F., Bakhsh, A., Başalma, D., & Özcan, S. (2018). Expression of GNA and biting site-restricted cry1Ac

in cotton; an efficient attribution to insect pest management strategies. *Plant Biotechnology Reports*, 12, 273-282.

Khabbazi, S. D., Yüksel Özmen, C., & Ergül, A. (2019). Synthetic seeds of wild beet: basic concepts and related methodologies. *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*, 377-396.

Kumar, V., Parvatam, G., & Ravishankar, G. A. (2009). AgNO₃: a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(2), 8-9.

Lata, H., Chandra, S., Khan, I., & ElSohly, M. A. (2009). Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45, 12-19.

Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2010). High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ^9 -tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. *Planta medica*, 76(14), 1629-1633.

Lloyd G, McCown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 30:421–427.

Monthony, A. S., Kyne, S. T., Grainger, C. M., & Jones, A. M. P. (2021). Recalcitrance of *Cannabis sativa* to de novo regeneration; a multi-genotype replication study. *PloS one*, 16(8), e0235525.

Monthony, A. S., Page, S. R., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). The past, present and future of *Cannabis sativa* tissue culture. *Plants*, 10(1), 185.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.

Nofouzi, F., OĞUZ, M. Ç., Khabbazi, S. D., & ERGÜL, A. (2019). Improvement of the in vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Medicago sativa* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43(1), 96-104.

Page, S. R. G., Monthony, A. S., & Jones, A. M. P. (2020). Basal media optimization for the micropropagation and callogenesis of *Cannabis sativa* L. *BioRxiv*, 1, 1-23.

Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 242-257.

Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell

expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *Am J Bot* 91(11):1743–1756.

Richez-Dumanois, C., Braut-Boucher, F., Cosson, L., & Paris, M. (1986). Multiplication végétative in vitro du chanvre (*Cannabis sativa* L.). Application à la conservation des clones sélectionnés. *Agronomie*, 6(5), 487-495.

Ruduś I, Kępczyński J, Kępczyńska E (2001) The influence of the jasmonates and abscisic acid on callus growth and somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. tissue culture. *Acta Physiol Plant* 23(1):103–107.

Salentijn, E. M., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., & Trindade, L. M. (2015). New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial crops and products*, 68, 32-41.

Smit ME, Weijers D (2015) The role of auxin signaling in early embryo pattern formation. *Curr Opin Plant Biol* 28:99–105.

Steinitz B, Küsek M, Tabib Y, Paran I, Zelcer A (2003) Pepper (*Capsicum annum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39(3):296–303.

Thomas, B.F.; ElSohly, M.A. The botany of *Cannabis sativa* L. In *The Analytical Chemistry of Cannabis*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 1–26.

Ting, I.P. (1982). *Plant physiology*. Addison-Wesley Reading, Massachusetts. 642.

Vardja, R., & Vardja, T. (2001). The effect of cytokinin type and concentration and the number of subcultures on the multiplication rate of some decorative plants. *Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol*, 50(1), 22-32.

Vesely, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L., ... & Meijer, L. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European journal of biochemistry*, 224(2), 771-786.

Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 69(3):233–249.

Wielgus, K., Luwanska, A., Lassocinski, W., & Kaczmarek, Z. (2008). Estimation of *Cannabis sativa* L. tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration. *Journal of Natural Fibers*, 5(3), 199-207.

Wróbel, T., Dreger, M., Wielgus, K., & Słomski, R. (2022). Modified nodal cuttings and shoot tips protocol for rapid regeneration of *Cannabis sativa* L. *Journal of Natural Fibers*, 19(2), 536-545.

Yang X, Zhang X (2010) Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Crit Rev Plant Sci* 29(1):36–57.

BÖLÜM IV

TRANSGENİK BİTKİ TÜRLERİ İÇİN İLGİLİ KARAKTER VE GENLER: İŞARET GENLERİ VE PROMOTÖRLER

*Associated Traits and Genes for Transgenic Plant Species:
Marker Genes and Promotors*

İNANÇ BARAL^{1*} & TANER DAŞTAN²

^{1}Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü, Genetik, Sivas, Türkiye
E-mail: inancbaral@gmail.com
ORCID: 0000-0001-7272-3724*

*²(Doç. Dr.) Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyokimya Bölümü, Sivas, Türkiye
E-mail: tdastan@cumhuriyet.edu.tr
ORCID: 0000-0003-0296-6979*

Özet

Transgenik bitki araştırmaları, istenen özellikleri kazandırmak için bitki türlerine yeni genlerin eklenmesini mümkün kılarak tarım alanında devrim yapmıştır. Bu bölümde transgenik bitki araştırmalarının temel yönlerine genel bir bakış sunulmuş ve özellikle promotor ve işaretçi genlerin kullanımına odaklanılmıştır. Promotorlar, gen ifadesini düzenlemede kritik bir rol oynar ve bitkilerin dokuya özgü ifadesi, uyarılabilir gen düzenlemesi ve transgenik bitkilerde artan stres toleransı sağlamak için farklı tipte promotorlar, örneğin floem özgül promotorlar, stres uyarılabilir promotorlar ve RuBisCo küçük alt birim promotorları gibi birçok tür kullanılmıştır. Neomisin fosfotransferaz II (nptII), yeşil floresan protein (GFP) ve β -glukuronidaz (GUS) gibi işaretçi genler, transgenik bitkilerin tanımlanması, seçilmesi ve karakterize edilmesinde

önemli rol oynamıştır. Bu işaretçi genler, gen ifadesi desenlerinin, dokuya özgü ifadesinin ve hücresel lokalizasyonun izlenmesini kolaylaştırmıştır. Ayrıca, çevresel riskleri azaltma ve düzenleyici onayı kolaylaştırma konularıyla ilgili endişeleri ele almak için seçilebilir işaretçi genlerin varlığı ile ilgili alternatifler olarak, işaretçisiz stratejiler ortaya çıkmıştır. Cre/lox veya FLP/FRT gibi site özgü rekombinasyon sistemlerini kullanarak, işaretçisiz transgenik bitkiler oluşturulabilir, çevresel riskleri azaltabilir ve düzenleyici onayı kolaylaştırabilir. Promotor ve işaretçi genlerin birleşimi, transgenik bitki araştırmalarını önemli ölçüde ilerletmiştir, böylece artan stres toleransı, daha iyi böcek direnci ve artmış verim gibi iyileştirilmiş özelliklere sahip genetik olarak değiştirilmiş ürünlerin geliştirilmesini mümkün kılmıştır.

Anahtar Kelimeler: gen, işaretleyici, karakter, promotör, transgenik bitki

Abstract

Transgenic plant research has revolutionized the field of agriculture by enabling the introduction of novel genes into plant species to confer desired traits. This chapter provides an overview of the key aspects of transgenic plant research, focusing on the use of promoter and marker genes. Promoters play a crucial role in regulating gene expression, and various types of promoters, such as phloem-specific promoters, stress-inducible promoters, and RuBisCo small subunit promoters, have been employed to achieve tissue-specific expression, inducible gene regulation, and enhanced stress tolerance in transgenic plants. Marker genes, including neomycin phosphotransferase II (nptII), green fluorescent protein (GFP), and β -glucuronidase (GUS), have been instrumental in the identification, selection, and characterization of transgenic plants. These marker genes have facilitated the monitoring of gene expression patterns, tissue-specific expression, and subcellular localization. Additionally, marker-free strategies have emerged as alternatives to address concerns related to the presence of selectable marker genes in transgenic plants. By utilizing site-specific recombination systems, such as Cre/lox or FLP/FRT, marker-free transgenic plants can be generated, reducing potential environmental risks and facilitating regulatory approval. The combination of promoter and marker genes has significantly advanced transgenic plant research, enabling the development of genetically modified crops with improved traits, such as enhanced stress tolerance, improved insect resistance, and increased productivity.

Keywords: gene; marker; promoter; trait; transgenic plant

1. Giriş

Transgenik bitki türleri, diğer organizmalardan gelen yabancı genlerin tanıtılması yoluyla genetik olarak değiştirilmiş bitkilerdir. Bu genetik değişiklik, genetik mühendislik gibi tekniklerle elde edilir, burada belirli genler bitkinin genomuna istenen özellikleri veya karakteristikleri sağlamak amacıyla eklenir. Bu yabancı genler, diğer bitki türlerinden, bakterilerden ve hatta hayvanlardan gelmiş olabilir (Snow vd., 2003).

Transgenik bitkilerin geliştirilmesi, tarımı devrimleştirmiş ve gıda üretimi ile ekin iyileştirmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur. Transgenik bitki türlerinin önemli olmasının başlıca nedenlerinden biri, ekin verimliliğini ve verimini artırma yetenekleridir. Genetik değişiklikler sayesinde bitkiler, zararlılara, hastalıklara ve herbisitlere karşı dirençli olacak şekilde tasarlanabilir, bu da kimyasal girdilere duyulan ihtiyacı azaltır ve ekilen ürünlerin verimini artırır (Low vd., 2018). Örneğin, *Bacillus thuringiensis* (Bt) bakterisinden gelen genlerin bitkilere tanıtılması, böcek zararlılarına karşı dirençli ürünlerin elde edilmesine neden olmuş ve bu da kimyasal böcek ilaçlarına olan ihtiyacı azaltmıştır (Crickmore, 2006).

Transgenik bitkiler aynı zamanda ekili ürünlerin besin içeriğini artırma potansiyeline sahiptir. Bitkilere vitamin, mineral veya esansiyel amino asit seviyelerini artırarak besin değerlerini artırmak için genler tanıtılabilir (Low vd., 2018). Bu da, belirli nüfuslardaki beslenme eksikliklerini ele alma potansiyeline sahiptir ve bu tarım ürünlerine dayalı olarak geçimlerini sağlayan bireylerin genel sağlığı ve refahını iyileştirebilir.

Tarım verimliliğini ve besin içeriğini artırmanın yanı sıra, transgenik bitki türleri çevresel sürdürülebilirliğe de katkı sağlayabilir. Bitkileri herbislere karşı dirençli hale getirerek, çiftçiler daha sürdürülebilir yabancı ot kontrol uygulamalarını benimseyebilirler, bu da toprağı korumaya ve erozyonu azaltmaya yardımcı olur (Inui ve Ohkawa, 2005). Ayrıca, transgenik bitkiler kuraklığa daha dayanıklı veya azot kullanım verimliliği artırılmış şekilde tasarlanabilir, bu da suyun korunmasına ve sentetik gübre ihtiyacının azaltılmasına yardımcı olabilir (Low vd., 2018).

Ancak, transgenik bitki türleri ile ilişkilendirilen potansiyel riskler ve zorlukları göz önünde bulundurmak önemlidir. Bir endişe, transgenik bitkilerden yabani akraba bitki formlarına gen akışının olasılığıdır; bu, transgenlerin yayılmasına ve istenmeyen ekolojik etkilere yol açma potansiyeline neden olabilir (Saji vd., 2005). Diğer bir endişe ise zararlıların veya yabancı otların

transgenik bitkilere tanıtılan özelliklere karşı direnç geliştirmesi potansiyelidir (Teulon ve Losey, 2002). Ayrıca, transgenik bitki türlerinin kullanımıyla ilgili toplumsal ve etik düşünce unsurları bulunmaktadır, bunlar arasında halk algısı, tüketici kabulü ve geleneksel tarım uygulamalarına potansiyel etki bulunmaktadır (Heuvel vd., 2007; Nathalie vd., 2015).

Genel haliyle transgenik bitki türleri, belirli özelliklere veya karakteristiklere sahip olacak şekilde tasarlanmış genetik olarak değiştirilmiş bitkilere sahiptir. Bu bitkiler, tarım ürünlerinin verimliliğini artırma, besin içeriğini iyileştirme ve çevresel sürdürülebilirliğe katkıda bulunma potansiyeline sahip oldukları için önemlidir. Bununla birlikte, transgenik bitki türlerinin kullanımıyla ilişkilendirilen potansiyel riskler ve zorlukları dikkatlice düşünmek, güvenli ve sorumlu bir şekilde kullanımlarını sağlamak için önem taşımaktadır.

Tarım bilimlerindeki en önemli transgenik bitki uygulamalarından biri, “*Bacillus thuringiensis*” (Bt) bakterisinden böcek öldürücü proteinler üretmek üzere genetik olarak değiştirilmiş Bt ürünleridir (Tabashnik vd., 2013). Bu proteinler belirli böcek zararlılarına karşı toksiktir ve transgenik bitkilere yerleşik böcek direnci sağlar. Bt ürünleri geniş bir şekilde benimsenmiş ve böcek zararlılarına karşı azaltıcı etki ve kimyasal böcek ilaçlarına olan ihtiyacı azaltma konusunda önemli bir etki yapmıştır (Tabashnik vd., 2013). Özellikle pamuk güvesi kurdu ve Batı Mısır kök kurdu gibi zararlılarla mücadelede etkili olmuşlardır (Baum vd., 2007). Bt ürünlerinin kullanımı, sadece bitki verimini artırmakla kalmamış, aynı zamanda böcek ilaçlarının çevresel etkisini azaltmıştır (Tabashnik vd., 2013).

Başka bir önemli transgenik bitki uygulaması ise, belirli herbisitlere dayanıklı olacak şekilde genetik olarak değiştirilmiş herbisitlere dayanıklı ürünlerdir (Ahmad vd., 2012). Bu özellik, çiftçilerin ekilen bitkilerine zarar vermeden herbisit uygulayarak yabancı otları daha etkili bir şekilde kontrol etme olanağı sağlar. Glyphosate dirençli ürünler, transgenik pamuk ve tütün gibi ürünler, geniş bir şekilde benimsenmiş olup, yabancı ot yönetim uygulamalarını devrim niteliğinde değiştirmiştir (Liu ve Cao, 2018). Bu ürünler, çiftçilere daha sürdürülebilir yabancı ot kontrol yöntemlerini benimsemelerini sağlamış, bu da toprağı korumaya ve erozyonu azaltmaya yardımcı olmuştur.

Besin içeriği artırılmış transgenik bitkiler de dikkate değerdir. Genetik değişiklikler yoluyla transgenik bitki türlerinde vitamin, mineral ve esansiyel amino asit seviyelerini artırmak için çaba sarf edilmektedir. Bu, belirli nüfuslardaki besin eksikliklerini ele almaya ve bu ürünlere dayalı olarak geçimini sürdüren bireylerin genel sağlık ve refahını iyileştirmeye potansiyel

taşıır. Ayrıca, kuraklığa daha dayanıklı veya azot kullanım verimliliği artırılmış transgenik bitkilere sahip olma potansiyeli, doğal su kaynaklarının korunmasına katkıda bulunma ve sentetik gübre ihtiyacını azaltma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, süs bitkileri yetiştiriciliği yönünden çiçek morfolojisi veya koku değişiklikleri gösteren transgenik bitkiler geliştirilmiştir. Bu bitkiler benzersiz ve görsel olarak çarpıcı özellikler sergileyebilirler, bu nedenle bahçıvanlar ve süs bitkisi - bahçe bitkisi meraklıları arasında popülerdirler (Wang vd., 2011).

Sonuç olarak, transgenik bitki türleri tarım bilimlerine önemli katkılarda bulunmuştur. Bt ürünleri, herbisite dayanıklı ürünler, besin değeri artırılmış ürünler ve süs transgenik bitkiler bu alandaki en dikkat çeken örnekler arasındadır. Bu bitkiler, zararlılara karşı direnç, yabancı ot yönetimi, besin içeriği ve estetik çekicilik konularında iyileştirmeler sağlamışlardır. Ancak, kullanımlarıyla ilişkilendirilen potansiyel riskleri ve zorlukları düşünmek, güvenli ve sorumlu kullanımlarını sağlamak açısından önemlidir.

Bu kitap bölümünde kavramsal olarak genel bakışı sunulmuş olan ve tarım bilimleri için son derece kritik bir konu olan transgenik bitki türleriyle ilişkilendirilen genlere ve genetik karakterlere değinilecek ve özellikle bu bitki türleri için önemli olan işaret (markör) genler ve promotörler anlatılacaktır.

2. Transgenik Bitki Türleri İçin Genler ve Genetik Karakterler

2.1. Genel Bakış

Transgenik bitki türleri, gelişimleri ve istenen özelliklerinin elde edilmesi için önemli olan çeşitli genler ve özelliklerle ilişkilidir. Bu genler ve özellikler, transgenik bitkilere belirli özellikler kazandırmak, verimliliklerini artırmak ve zararlılara, hastalıklara ve çevresel streslere karşı dayanıklılıklarını artırmak konusunda kritik bir rol oynamaktadır.

Transgenik bitki türlerinde yaygın olarak kullanılan önemli bir gen, *Bacillus thuringiensis* (Bt) genidir. Bu gen, belirli böcek zararlıları için toksik olan böcek öldürücü proteinleri kodlar. Bitkilere tanıtıldığında, Bt geni yerleşik böcek direnci sağlar ve kimyasal böcek ilaçlarına olan ihtiyacı azaltır (Lloyd vd., 2005). Bu gen, pamuk ve mısır gibi çeşitli ekinlere başarılı bir şekilde entegre edilmiştir ve onları yıkıcı böcek zararlarından korumak için kullanılmıştır.

Transgenik bitki türleri ile ilişkilendirilen diğer önemli bir özellik, herbisit direncidir. Bu özellik, belirli herbisitlere tolerans kazandıran genlerin tanıtılmasıyla elde edilir. Herbisite dayanıklı ürünler, çiftçilere herbisit uygulamalarını yaparken ekim yaptıkları bitkilerine zarar vermeden yabancı

otları daha etkili bir şekilde kontrol etme olanağı sağlar. Örneğin, glifosat'a dayanıklı ürünler, geniş bir şekilde benimsenmiş ve yabancı ot yönetim uygulamalarını devrim niteliğinde değiştirmiştir.

Metabolik yollarla ilgili genler, transgenik bitki türlerinde de önemlidir. Bu genler, ekilen bitkilerin besin içeriğini artırmak için tanıtılabilir, örneğin vitaminlerin, minerallerin veya esansiyel amino asitlerin seviyelerini artırarak daha üstün ürünler elde edilebilir (Krichevsky vd., 2012). Ayrıca, stres toleransı ile ilgili genler, kuraklık toleransı veya tuz toleransı gibi, transgenik bitki türlerinde büyük öneme sahiptir. Bu genler bitkilere zorlu çevresel koşullara dayanma yeteneği kazandırır ve genel verimliliklerini artırır (Zameer vd., 2022).

Gen düzenleme teknolojileri, CRISPR-Cas9 gibi, transgenik bitki araştırmalarında giderek daha önemli hale gelmiştir. Bu teknolojiler, belirli genlerin hassas değişikliklerini yapma imkanı sağlar, istenen özelliklere sahip transgenik bitkilerin geliştirilmesine olanak tanır (Yang vd., 2023). Gen düzenleme, hastalık direnci, artırılmış verim veya geliştirilmiş besin içeriği gibi özelliklerle ilişkilendirilen belirli genleri tanıtmak veya değiştirmek için kullanılabilir (Yu vd., 2021).

Bazı durumlarda, transgenik bitkilerdeki transgenlerin varlığı istenmeyebilir. Bu nedenle, transgen içermeyen bitkilerin geliştirilmesi, transgenik bitki araştırmalarında önemli bir odak noktası haline gelmiştir. Transgenik bitkilerden transgenleri ortadan kaldırmak veya ayırmak için çeşitli stratejiler kullanılmıştır, bunlar arasında seçilebilir işaretçilerin, gen çıkarma sistemlerinin ve genom düzenleme teknolojilerinin kullanılması bulunur (Yang vd., 2023; Du vd., 2019; He ve Zhao, 2019). Transgen içermeyen bitkilerin geliştirilmesi, istenen özelliklerin korunmasını sağlarken, transgenlerin varlığıyla ilişkilendirilen potansiyel endişeleri en aza indirir. Transgenleri bitkilere tanıtmamanın, hedeflenmeyen etkileri ve ekosistemlerde etkilere neden olabileceğini unutmamak önemlidir. Bu nedenle, transgenik bitki türlerinin potansiyel ekolojik etkilerini dikkatlice değerlendirmek ve olası riskleri en aza indirmek için stratejileri düşünmek önemlidir (Powell vd., 2007; Cheryatova ve Yembaturova, 2022).

2.2. Transgenik Bitki Türleri İçin Önemli Hedef Genler ve Gen Grupları

Transgenik bitki türleri ile ilişkilendirilen genler ve özellikler, genetik değişikliğin belirli istenen özellikler ve hedeflerine bağlı olarak değişiklik gösterir. Temel kategoriler halinde mevcut literatür bilgileri takip eden maddeler üzerinde durmaktadır.

1. Bt Genleri: *Bacillus thuringiensis* (Bt) genlerinin bitkilere tanıtılması, belirli böcek zararlılarına karşı direnç sağlar. Bu genler, zararlılara toksik olan böcek öldürücü proteinler üretir ve böcek ilaçlarına olan ihtiyacı azaltır (Snow vd., 2003). Transgenik bitkilerdeki Cry1Ac (Zhu vd., 2012; Boddupally vd., 2018; Zhao vd., 2021), Cry2Ab (Teulon ve Losey, 2002; Zhu vd., 2003; Rabha vd., 2017) ve Cry1Ab (Stewart vd., 1997; Jones, 1999; Douches vd., 2001) gibi Bt genleri, belirli böcek zararlılarına (güve kurtları ve kök kurtları gibi) karşı direnç sağlamak amacıyla incelenmiştir. Çalışmalar, bu genlerin başarılı bir şekilde ifade edildiğini ve çeşitli ekinlerde zararlılara karşı direncin artırılmasında etkili olduklarını göstermektedir.

2. Herbisit Direnç Genleri: Transgenik bitkiler, belirli herbisitlere direnç sağlayan genlerle tasarlanabilir. Bu genler, bitkilerin herbisitlere dayanıklı olmasına olanak tanır, böylece ekin bitkilerine zarar vermeden daha etkili yabancı ot kontrolü sağlar (Shih vd., 2016). En yaygın kullanılan glifosat direnç geni, glifosattan etkilenmeyen bir enzimi kodlayan EPSPS (5-enolpiruvylshikimate-3-phosphate sentaz) genidir (Owen ve Zelaya, 2005). Bu gen, transgenik bitkilerin glifosatinin inhibe edici etkilerini atlayarak esansiyel amino asitler üretmeye devam etmelerine olanak tanır. En yaygın kullanılan glufosinat direnç geni ise, glufosinatı detoksifiye eden bir enzimi kodlayan bar (phosphinothricin acetyltransferase) genidir (Inui ve Ohkawa, 2005). Bu gen, transgenik bitkilerin glufosinat uygulamasını hayatta kalabilecekleri şekilde yapmalarına olanak tanır. ALS inhibitör direncine sahip transgenik bitkiler, herbisite daha az duyarlı olan mutasyona uğramış ALS genlerinin tanıtılmasıyla geliştirilmiştir (Kawai vd., 2007a,b). Bu genler, transgenik bitkilerin ALS inhibitörlerinin varlığında bile normal amino asit sentezini sürdürmelerine olanak tanır. Bu herbisit direnç genleri, soya fasulyesi, mısır, pamuk ve kanola gibi çeşitli ekinlere başarılı bir şekilde entegre edilmiştir ve etkili yabancı ot kontrol seçenekleri sunmuştur. Ancak, herbisit direnç genlerinin transgenik bitkilerde kullanılması, herbisit dirençli yabancı otların olasılıkla gelişme endişelerine yol açmıştır. Tek bir etki mekanizmasıyla herbisitlerin sürekli kullanılması, yabancı ot popülasyonları üzerinde seçim baskısı oluşturarak herbisit dirençli yabancı otların evrimine yol açabilir (Owen ve Zelaya, 2005).

3. Metabolik Yol Genleri: Metabolik yollarla ilişkilendirilen genler, ekilen bitkilerin besin içeriğini artırmak için tanıtılabilir. Örneğin, vitaminlerin, minerallerin veya esansiyel amino asitlerin sentezine katılan genler, transgenik bitkilerde bu bileşenlerin seviyelerini artırmak için tanıtılabilir (Krichevsky vd., 2012). Çok sayıda ve karmaşık ilişkiler kuran genleri içeren bu kategoride hedefler

genel olarak son ürüne dayalı olarak belirlenmiştir. Bu açıdan bu kategorideki genler genel olarak azot metabolizmasıyla ilgili genler (Yanagisawa vd., 2004), vitamin sentezinde görevli genler (Naqvi vd., 2009), terpenoid sentez genleri (Lange vd., 2011), flavanoid sentez genleri (Qin vd., 2017) ve karotenoid sentez genleri (Zhu vd., 2008) olarak literatürde yer bulmuştur.

4. Stres Tolerans Genleri: Kuraklık, tuzluluk veya aşırı sıcaklık gibi çevresel streslere karşı dayanıklılık sağlayan genler, zorlu koşullarda başarılı olabilen transgenik bitkilerin geliştirilmesi için önemlidir. Bu genler, bitkilerin strese dayanabilme ve ondan kurtulabilme yeteneklerini artırabilir (Pruthvi vd., 2014; Jackson vd., 2004). Önemli çevresel şartlar dikkate alınarak bu yöndeki genler hedef çevre şartına bağlı olarak gruplandırılmaktadır ve bunlar kuraklığa dayanıklılık genleri (Bhatnagar-Mathur vd., 2007), tuz tolerans genleri (Gaxiola vd., 2001), oksidatif strese dayanıklılık genleri (Kim vd., 2011), sıcaklık tolerans genleri (Lu vd., 2013) ve soğukluk tolerans genleri (Yun ve Kwon, 2008) olarak ifade edilebilir. Yine, bu grupta yer alan genlerin büyük çoğunluğu aynı zamanda transkripsiyon faktörleri olarak görülmektedir.

5. Çiçeklenme Genleri: Çiçeklenme yollarında rol oynayan genler, transgenik bitkilerde çiçeklenme zamanını ve süresini kontrol etmek için manipüle edilebilir. Bu, daha iyi tozlaşma için çiçeklenmeyi senkronize etmek veya süs amaçları için çiçeklenme süresini uzatmak için kullanışlı olabilir (Matsuda vd., 2009). Bu gruptaki genler genellikle karmaşık ilişkiler kuran genlerden oluşmaktadır ve çok farklı çalışmalarda kullanılmıştır. Genel olarak özetlenecek olursa elma ve armut bitkilerinde Arabidopsis FT geninin aşırı ifadesinin erken çiçeklenmeye neden olduğu (Tanaka vd., 2014; Matsuda vd., 2009), SEP3 ve LMADS3 gibi MADS-box transkripsiyon faktörlerinin ifadesinde değişiklik gösteren transgenik bitkilerin, erken çiçeklenme fenotipleri sergilediği (Tzeng vd., 2003; Gao vd., 2021), narenciye bitkilerinde CiFT geninin ve tütün bitkilerinde FBP21 geninin tanıtılmasının erken çiçeklenmeyi teşvik ettiği (Soares vd., 2020; Ma vd., 2010), flavonoid biosentezine katılan F3'5'H, F3'H ve DFR gibi genlerin ifadesinin azaltılması veya aşırı ifadesi ile çiçek renginde değişikliklere neden olduğu (Tanaka vd., 2009; Tanaka vd., 2010), çiçek gelişimi ile ilişkili genlerin, SOC1, AGL6 ve AGL24 gibi, manipülasyonunun çiçeklenme zamanında ve çiçek morfolojisinde değişikliklere neden olduğu (Fan vd., 2007; Giovannini vd., 1999), RoTFL1c ve CO gibi belirli genlerin ektopik ifadesinin çiçeklenme zamanını ve bitki büyümesini etkilediği (Wang vd., 2018; Hyun vd., 2016), OsRAA1 ve AINTEGUMENTA gibi belirli genlerin tanıtılmasının, çiçeklenme zamanını ve bitki büyümesini etkilediği (Wang vd., 2009; Kuluev vd., 2012) çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

6. Aktin ile İlişkilendirilen Protein Genleri: Aktin ile ilişkilendirilen proteinleri kodlayan genler, pamuk gibi kültür bitkilerinde lif gelişimi sırasında hücre uzunluğu ve ikincil hücre duvarı oluşumunda kritik bir rol oynar. Bu genlerin manipülasyonu, lif özelliklerini etkileyebilir ve ürün kalitesini artırabilir (Wang vd., 2008). Birçok çalışma, transgenik bitkilerde aktin ile ilişkilendirilen protein genlerinin manipülasyonunun etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmaların neticesinde (1) Aktin bağlama alanı 2 (ABD2) ifadesinin, yeşil floresan protein (GFP) ile birleştirilmesi, Arabidopsis köklerinde F-aktin'in canlı görüntülenmesine olanak tanımıştır (Lanza vd., 2012; Wang vd., 2007), (2) Aktin ile ilişkilendirilen proteinler, kök teli büyümesi, pamukta lif gelişimi ve polen tüpü büyümesi ile ilişkilendirilmiştir (Li vd., 2018; Wang vd., 2008; Vaškebová vd., 2017), (3) Aktin izoformları ve aktin bağlama proteinlerinin bitki gelişiminde farklı ifade desenlerine ve işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (Kandasamy vd., 2002; Zhong vd., 1996), (4) Aktin ile ilişkilendirilen proteinler, oksidatif stres toleransı, patojenlere karşı savunma tepkileri ve hücre genişlemesinin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Cao vd., 2022; Barrero vd., 2003), (5) Aktin sitoskeleton organizasyonu ve dinamikleri, kloroplast hareketleri, simbiyotik etkileşimler ve kök nodülasyonu için kritik olduğu bulunmuştur (Wang vd., 2011; Zhang vd., 2018), (6) Aktin ile ilişkilendirilen proteinlerin çiçek gelişimini ve polen verimliliğini etkilediği gösterilmiştir (Kandasamy vd., 2007; An vd., 1996).

7. Seçilebilir İşaretçi Genler: Seçilebilir işaretçi genler, transgenik bitki yapısına genellikle dahil edilir ve dönüşmüş hücrelerin tanımlanmasını ve seçilmesini kolaylaştırmak için kullanılır. Bu genler, belirli antibiyotiklere veya herbisitlere direnç sağlar ve araştırmacılara transgenik bitkileri seçici olarak yetiştirip çoğaltma imkanı sunar (Sato vd., 2013; Milner vd., 2014). Seçilebilir işaretçi genler, transgenik bitki araştırmalarında hayati öneme sahiptir çünkü başarılı bir şekilde dönüştürülmüş hücrelerin tanımlanmasına ve seçilmesine olanak tanır. Bu genler genellikle belirli antibiyotiklere veya herbislere karşı direnç sağlarlar, böylece dönüştürülmüş hücrelerin büyümesine ve hayatta kalmasına izin verirken, dönüştürülmemiş hücrelerin büyümesini engellerler. Seçilebilir işaretçi genlerin kullanımı, istenen özelliklere sahip genetik olarak değiştirilmiş bitki ırklarının verimli bir şekilde üretilmesini sağlayarak transgenik bitkilerin geliştirilmesini büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Bununla birlikte, seçilebilir işaretçi genlerin kullanımı, çevre ve insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri nedeniyle endişelere yol açmıştır. Bu endişeleri ele almak için, seçilebilir işaretçi genlerin transgenik bitkilerde kullanımına gerek olmadan yapılabilen işaretsiz dönüşüm yöntemleri gibi alternatif stratejiler geliştirilmiştir.

Bu yaklaşımlar, seçilebilir işaretçi genlerin varlığıyla ilişkilendirilen potansiyel riskler olmadan işaretersiz transgenik bitkilerin üretilmesini amaçlar (Sato vd., 2013; Milner vd., 2014).

8. Transkripsiyon Faktör Genleri: Transkripsiyon faktörleri, çok sayıda genin ifadesini kontrol eden düzenleyici proteinlerdir. Belirli transkripsiyon faktörü genlerinin tanıtılması, hedef genlerin ifadesini değiştirebilir ve stres toleransı veya artırılmış verim gibi istenen özellikleri sağlayabilir (Pruthvi vd., 2014). Transgenik bitkilerin transkripsiyon faktörlerinin ifadesi veya aktivitesi üzerinde değişiklikler yapılabilir ve bu değişiklikler gen düzenleyici ağlarını incelemek ve bitki özelliklerini geliştirmek amacıyla kullanılabilir. Örneğin, DREB/CBF (dehidrasyon yanıt ögesi bağlanma/C-repeat bağlanma faktörü) gibi stres yanıtı veren transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesinin, transgenik ekinlerde abiyotik stres toleransını artırdığı gösterilmiştir (Sarkar vd., 2014; Morran vd., 2011). Benzer şekilde, çiçeklenmeye dahil olan transkripsiyon faktörlerinin, örneğin FT (Çiçeklenme Lokusu T), aşırı ifadesi, transgenik bitkilerde çiçeklenme zamanını manipüle etmek için kullanılmıştır (Aoyama ve Chua, 1997; Suzuki vd., 2005). Transkripsiyon faktörü genleri aynı zamanda transgenik bitkilerde gen düzenlemesi için araçlar olarak kullanılabilir. Örneğin, bir organizmadan DNA bağlama alanlarını diğer bir organizmadan transkripsiyonel aktivasyon alanlarıyla birleştirerek oluşturulan kimerik transkripsiyon faktörleri, hedef genlerin ifadesini düzenli bir şekilde kontrol etmek için kullanılabilir. Örneğin, indüklenebilir promotörlerle kimerik transkripsiyon faktörlerinin kullanımı, transgenik bitkilerde gen ifadesinin hassas bir şekilde kontrol edilmesine olanak tanımıştır (Moore vd., 1998). Ayrıca, transkripsiyon faktörü genleri, transgenik bitkilerin seçiminde kullanılan işaretleyici genlerin geliştirilmesinde de kullanılmıştır. Örneğin, belirli antibiyotiklere veya herbislere direnç sağlayan transkripsiyon faktörlerinin seçilebilir işaret olarak kullanılması, dönüştürülmüş hücrelerin tanımlanmasını ve seçilmesini kolaylaştırmıştır (Kawai vd., 2007a,b; Sloan vd., 1993).

Transgenik bitkilerde virüs aracılı gen susturma (VIGS) genleri kullanılarak hedef mRNA yıkılması ile bitki hücre ve doku fonksiyonlarının incelenmesi ile hem yeni yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlanmış, hem de bitkilerdeki hücresel savunma mekanizmalarının anlaşılması mümkün olmuştur (Ratcliff vd., 1997; Ruíz vd., 1998). Bu öncü çalışmalar neticesinde çeşitli fenotiplerin virüs aracılı gen susturma ile elde edilebildiği çalışmalar şekillenmiştir (Bai vd., 2015). Metallothionein (MT) genleri de transgenik bitki

araştırmalarında üzerinde önemle durulmuş hedefler olmuştur ve farklı çevresel şartlara dayanıklılık (Jin vd., 2017), herbisitlere karşı dayanıklılığın geliştirilmesi (Inui ve Ohkawa, 2005) ve metabolit üretiminin yönlendirilmesi (Mihálik vd., 2020) konuları öne çıkmıştır. Süs bitkileri yönünden de estetik karakterlerin yönlendirilmesi için Rol genleri yaygın olarak incelenmiştir (Giovannini vd., 1999). Üretilen transgenik bitkilerin doğal çevre şartlarındaki ekolojik etkileri de önemli bir çalışma alanı olarak öne çıkmaktadır (Brunet ve Stewart, 2010).

3. Transgenik Bitki Araştırmalarında Promotör ve İşaretçi Genler

3.1. Transgenik Bitki Türlerinde Promotör Bölge ve Genler

Promotorlar, gen ifadesini düzenlemede kritik bir rol oynar ve transgenik bitki araştırmalarının vazgeçilmez bileşenlerindedir. Bir genin bitkide ne zaman ve nerede ifade edileceğini belirlerler, bu da onları transgenik bitkilerde istenen özelliklere ulaşmak için önemli araçlar haline getirir. Burada, transgenik bitki türlerinde kullanılan ve önem arz eden promotorlar gözden geçirilerek ve genel bakış sunulacaktır.

Özsuyu özgül promotor, özellikle özsuyu dokusunda böcek öldürücü proteinlerin ifade edilmesi amacıyla transgenik pirinç bitkilerinde kullanılmıştır (Rao vd., 1998). Bu promotor, özsuyu emen böceklere karşı direnç kazandırmak için oldukça kullanışlıdır, çünkü bu böceklerin beslendiği yer özsuyu dokusudur ve böcek öldürücü proteinlerin burada hedeflenmiş bir şekilde ifade edilmesine izin verir. Rao ve diğerleri (1998) tarafından yapılan bir çalışma, pirinç kahverengi yaprak tırtılına karşı direnç kazandırmada özsuyu özgül bir promotorun etkililiğini göstermiştir. Özsuyu özgül bir promotor kullanarak, araştırmacılar, transgenik pirinç bitkilerinin özsuyu dokusunda böcek öldürücü bir protein ifade etmeyi başardılar ve bu özsuyu emen böceklere karşı direnç sağlamıştır (Rao vd., 1998). Pirinç Tungro bacilliform virüsü (RTBV) kaynaklı özsuyu özgül promotor de yaygın bir şekilde incelenmiştir. Yin ve diğerleri (1997), bu promotorun, transgenik pirinç bitkilerinde güçlü özsuyu özgül bir raporcu gen ifadesini sürdürdüğünü bulmuşlardır. Bu promotorun özsuyu hücrelerine özgü olması, özsuyu gelişimini ve işlevini incelemek için değerli bir araç haline getirir. Ayrıca, özsuyu özgül promotor diğer bitki türlerinde de kullanılmıştır. Zhao ve diğerleri (2004), farklı bitki türlerinde transgen ifadesini sürdürmek için heterolog özsuyu özgül bir promotoru başarıyla kullanmışlardır. Bu promotor, *Arabidopsis SUC2* geninden elde edilmiş olup hem homolog hem de heterolog bağlamlarda özsuyu özgül ifadeyi yönlendirmiştir.

Özsuyu özgül promotorların böceklere karşı bitki savunmasındaki önemi, Mondal ve diğerleri (2017) tarafından daha da vurgulanmıştır. Araştırmacılar, *Arabidopsis Aktin-Depolimerize Edici Faktör3 (ADF3)* genini ifade ederek özsuu özgül SUC2 promotorunun yaprakbiti saldırısına karşı hassasiyeti düzeltebileceğini göstermişlerdir.

RuBisCO küçük alt birim promotoru, transgenleri veya seçilebilir işaretçileri ifade etmek için çeşitli bitki türlerinde yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Bakhsh ve Husnain, 2012). Ayrıca, aktin, übikitin ve tubulin genlerinden türetilen promotorlar, transgenik bitkilerde gen ifadesinde esneklik ve çok yönlülük sağlamıştır. RuBisCo küçük alt birim promotoru, gen ifadesini çeşitli bitki türlerinde yönlendirmek için transgenik bitki araştırmalarında sıklıkla tercih edilmiştir. RuBisCo (ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oxygenaz) fotosentezde yer alan önemli bir enzimdir ve RuBisCo'nun küçük alt birimi, enzim montajı ve işlevi için temel bir rol oynamaktadır. Whitney ve diğerleri (2001) tarafından yapılan bir çalışma (Whitney vd., 2001), plastomik RuBisCo küçük alt birim genlerinin kontrolü altında tütün kloroplastlarında RuBisCo'nun küçük alt birimlerinin başarılı bir şekilde ifade edildiğini göstermiştir. Küçük alt birimler, hegzadamerik RuBisCo kompleksine katlanabilmiş ve monte edilebilmiş, bu da RuBisCo küçük alt birim promotorunun uygun protein montajını yönlendirmedeki işlevselliğini vurgulamıştır. Başka bir çalışmada, Fukayama ve diğerleri (2018), transgenik pirinçte RuBisCo aktivaz (Rca) ifade seviyesini ve RuBisCo içeriği ile ilişkisini incelemişlerdir (Fukayama vd., 2018). Rca'yı aşırı ifade eden transgenik bitkilerde RuBisCo küçük alt biriminin transkript seviyelerinin arttığını bulmuşlar, bu da RuBisCo küçük alt birim promotorunun RuBisCo ifadesini düzenlemedeki potansiyel rolünü göstermektedir. RuBisCo küçük alt birim promotoru, stres yanıtları bağlamında da incelenmiştir. Xu ve diğerleri (2010), ısı stresi altında çok yıllık bir çim türünde hem RuBisCo büyük hem de küçük alt birimlerin ifade seviyelerinin azaldığını gözlemlemişlerdir (Xu vd., 2010). Bu bulgu, RuBisCo küçük alt birim promotorunun çevresel streslere yanıt olarak RuBisCo ifadesini düzenlemede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, RuBisCo küçük alt birim promotoru, fotosentezi artırmak amacıyla genetik mühendislik yaklaşımlarında da kullanılmıştır. Chen ve diğerleri (2022), tütün bitkilerinde, *H. neapolitanus*'tan gelen genlerle yerel olarak RuBisCo büyük alt birimini kodlayan geni genetik olarak değiştirmişler ve tütün bitkilerinde hızlı ve etkin bir RuBisCo enzimi üretmişlerdir (Chen vd., 2022). Bu yaklaşım, RuBisCo aktivitesini artırarak fotosentetik verimliliği artırmayı hedeflemiştir. Fotosentezdeki rolünün yanı sıra, RuBisCo küçük alt birim promotoru, gen ifadesi düzenlemesi bağlamında da incelenmiştir.

Suganami ve diğerleri (Suganami vd., 2020), pirinç bitkilerinde RuBisCo küçük alt birim geni ile RuBisCo aktivaz (RCA) arasındaki gen ifadesinin zirve zamanlamasındaki farklılıkları rapor etmişlerdir. Bu bulgu, RuBisCo küçük alt birim promotörünün yaprak gelişimi sırasında RuBisCo ifadesinin zamansal düzenlemesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Yerleşik (Natif) çoklu stres uyarılabilir promotörler, belirli stres koşullarına yanıt olarak genlerin uyarılabilir ifadesini elde etmek için kullanılmıştır (Sreedharan vd., 2013). Bu promotörler, kontrol edilmemiş stresli koşullarda minimal ifadeyi korurken, hedef genin stres altındaki koşullarda hemen uyarılmasını sağlar. Bu özgünlük, transgenik bitkilerde hassas gen düzenlemesi için kritik öneme sahiptir. Kasuga ve diğerleri tarafından yapılan dikkat çekici bir çalışma (Kasuga vd., 1999), tek bir stresle uyarılan transkripsiyon faktörünün, gen transferi yoluyla bitkiyi kuraklık, tuzluluk ve don stresine karşı daha dayanıklı hale getirilmesini başarıyla göstermiştir. Araştırmacılar, birden çok stres tarafından uyarılan Arabidopsis RD29A promotörünü kullanarak, transkripsiyon faktörü DREB1A/CBF3'ün ifadesini yönlendirmiştir. Transgenik bitkiler, geliştirilmiş stres toleransı sergilemiş, bu da doğal çoklu stresle uyarılan promotörlerin stres direnci sağlama konusundaki etkinliğini vurgulamıştır. Dey ve diğerleri (2015) tarafından yapılan bir derleme çalışmasında (Dey vd., 2015), yazarlar bitkilerde sentetik promotörlerin gelişimi ve önemini tartışmışlardır. Bunu, biyotik streslere uyarlanabilir ve abiyotik streslere uyarlanabilir promotörler olmak üzere farklı işlevsel rejimler altında kategorize etmişlerdir. Bu promotörler, streslere yanıt veren genlerin ifadesini yönlendirmek için kullanılmış ve transgenik bitkilerde stres savunma mekanizmalarının hedefli olarak etkinleştirilmesine olanak tanımıştır. Nakashima ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışma, stres toleransını artırmak için stresle uyarılan promotörlerin kullanımını göstermiştir (Nakashima vd., 2007). OsNAC6 promotörü, OsNAC6'nın aşırı ifadesini yönlendirmek için kullanıldı ve bu, normal koşullarda OsNAC6'nın büyümeye olumsuz etkilerini bastırarak stres toleransını artırdı. Bu çalışma, stres koşullarında bitki performansını artırmak için gen ifadesini düzenlemede stresle uyarılan promotörlerin potansiyelini vurgulamaktadır. Ayrıca, Maruyama ve diğerleri (2004), mikroarray analizi kullanarak Arabidopsis DREB1A/CBF3 transkripsiyon faktörünün soğuğa uyarlanmış downstream genlerini tanımlamışlardır (Maruyama vd., 2004). DREB1A promotörü, DREB1A'nın aşırı ifadesini yönlendirmek için kullanılmış, bu da stresle uyarılan genlerin etkinleştirilmesine ve kuraklık, tuzluluk, don ve büyüme gerilemesine karşı geliştirilmiş toleransa yol açmıştır.

Pirinç RbcS gen promotorunun, tek çenekli türlerin genetik tasarımında tarımsal öneme sahip genlerinin ifadesi için kullanışlı olduğu gösterilmiştir (Kyozyuka vd., 1993). Bu promotor, hem gelişimsel olarak hem de ışıkla düzenlenir ve çevresel ipuçlarına yanıt olarak gen ifadesini kontrol etmek için değerli bir araç olmuştur. RbcS geni, fotosentez için gerekli olan RuBisCo enziminin küçük alt ünitesini kodlar. Kyozyuka ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışma, transgenik pirinç bitkilerinde domates RbcS-GusA füzyon geninin ışıkla düzenlenen ve hücreye özgü ifadesini göstermiştir (Kyozyuka vd., 1993). Pirinç RbcS gen promotoru, GUS rapor geninin ifadesini yönlendirmek için kullanılmış ve bu, yalnızca fotosentetik dokularda yüksek düzeyde ifade sağlamıştır. Bu çalışma, pirinç RbcS gen promotorunun tek çenekli türlerin genetik mühendisliğinde tarımsal olarak önemli genlerin ifadesi için kullanışlılığını vurgulamıştır. Başka bir çalışmada, Feng ve diğerleri (2020), transgenik pirinç bitkilerinde yeşil dokularla sınırlı bir hedef gen ifade etmek için pirinç RbcS gen promotorunu kullanmıştır (Feng vd., 2020). Promotor, gen ifadesini fotosentetik dokularla sınırlamak için etkiliydi ve transgenik bitkilerde doku özgü ifade elde etmek için kullanışlı bir araç sağladı. Ayrıca, pirinç RbcS gen promotoru işaretçi içermeyen transgenik bitkilerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Li ve diğerleri (2011), transgenik pirinç bitkilerinin belirli dokularında bir hedef gen ifade etmek için RbcS promotorunu kullandı ve çevreye salınan Bt toksininin seviyelerini azalttı (Li vd., 2011). Bu yaklaşım, pirinçte böcek direncini artırmayı hedeflerken potansiyel çevresel etkileri minimize etmeyi amaçlamıştır. Pirinç RbcS gen promotoru, bitki performansını artırma bağlamında da araştırılmıştır. Başka çalışmalarda ise (Garg vd., 2005; Kong vd., 2016), RbcS promotoru tarafından kontrol edilen bir F-box geninin ifadesini transgenik buğday bitkilerinde incelemesi gerçekleştirilmiştir. RbcS promotorunun kontrolündeki gen ifadesi ile, bitki büyümesi ve gelişimini etkilemeden kuraklık toleransının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, pirinç RbcS gen promotoru, belirli gen ifade desenlerini elde etmek için diğer düzenleyici elementlerle birleştirilmiştir. Başka bir çalışmada ise araştırmacılar (Garg vd., 2005), RbcS promotorunu, RNA interferans ile birleştirerek pirinçte dokuya özgü gen susturma elde etmek için kullanmışlardır. Promotor, RNAi yapılarının hedeflenen ifadesine izin vererek belirli dokularda etkili gen susturmayı sağlamıştır.

Pirinç sitokrom c gen promotoru, tek çenekli bitkilerde yüksek düzeyde ve yaygın bir promotor olarak araştırılmıştır (Jang vd., 2002). Bu promotorun, kökler ve yapraklar dahil olmak üzere çeşitli dokularda yüksek düzeyde gen ifadesini yönlendirdiği gösterilmiş ve bu nedenle sağlam transgen ifadesi elde etmek için değerli bir araç olmuştur. Jang ve diğerleri (2002), yüksek düzeyde ve

evrensel ifade edilmiş pirinç sitokrom c geni (OsCc1) ve promotor aktivitesini transgenik bitkilerde gösterdiler. Pirinç sitokrom c gen promotoru, lüsiferaz rapor geninin ifadesini sürmek için kullanıldı ve sonuç olarak yapraklar ve kökler de dahil olmak üzere çeşitli dokularda güçlü ve düzenli bir ifade elde edildi (Jang vd., 2002). Bu çalışma, pirinç sitokrom c gen promotorunun tek çenekli türlerde güçlü transgen ifadesi elde etmek için kullanışlı bir araç olduğunu vurgulamıştır. Zhang ve diğerleri (2011), börülce tripsin inhibitör geninin ifadesini artırmak için sitokrom c gen promotorunu transgenik pirinç bitkilerinde kullanmışlardır (Zhang vd., 2011). Bu yaklaşım, bitkilerin otoburlara karşı savunma mekanizmalarını artırmayı amaçlamaktadır. Feike ve diğerleri (2019), standart genetik parçaların karakterizasyonunu yapmış ve baklagil ve tahıl köklerinin genetik mühendisliği için ortak ilkeleri oluşturmuşlardır. Pirinç sitokrom c gen promotoru, bitki köklerinde belirli gen ifadesi desenlerini elde etmek için diğer düzenleyici unsurlarla bir arada kullanılmıştır (Feike vd., 2019).

Özetle, promotor seçimi başarılı transgenik bitki araştırmaları için kritiktir. Farklı promotorlar, doku özgül ifade, stresle uyarılabilir ifade veya yüksek düzeyde ifade gibi özel avantajlar sunar. Doğru promotor seçilerek araştırmacılar gen ifadesini hassas bir şekilde kontrol edebilir ve transgenik bitki türlerinde istenen özelliklere ulaşabilir.

3.2. Transgenik Bitki Türlerinde Kullanılan İşaretçi Genlere Genel Bakış

İşaretleme genleri, başka bir ifade ile işaretçi genler, transgenik bitki araştırmalarında çok önemli bir rol oynar. Bu genler, genellikle hedef genle birlikte tanımlanır ve transgenik bitkileri diğer transgenik olmayan bitkilerden ayırt etmeyi mümkün kılan seçilebilir veya puanlanabilir bir özellik sağlar. Transgenik bitki araştırmalarında yaygın kullanılan işaretleyici genler bu başlık altında gözden geçirilecektir.

Birçok bitki türünde, özellikle tütün, pirinç, mısır ve Arabidopsis gibi bitkilerde, kullanılan yaygın bir işaretleyici gen, neomisin fosfotransferaz II (nptII) genidir. Bu gen, kanamisin adlı antibiyotiğe karşı direnç sağlar. NptII geni, kanamisine karşı direnç sağlayarak, transgenik bitkilerin büyümesini desteklerken, transgenik olmayan bitkilerin büyümesini engelleyerek, dönüşmüş hücrelerin veya dokuların seçilmesine olanak tanır (Darbani vd., 2007; Chen vd., 1998).

Başka bir yaygın olarak kullanılan işaretleyici gen, ifade edildiğinde gözle görülür yeşil floresans üreten yeşil floresan protein (GFP) genidir. GFP, transgenik bitkilerde gen ifadesini, doku özgül ifadeyi veya alt hücrel konumlandırmayı izlemek için görsel bir işaretleyici olarak yaygın bir şekilde

kullanılmıştır (Tamaoki vd., 2006). GFP işaretleyici, ek seçim ajanlarına ihtiyaç duymadan transgenik gen ifadesinin doğrudan görselleştirilmesine olanak tanır.

Bitki dokularında kullanılan β -glukuronidaz (GUS) geni, β -glukuronit substratlarını hidrolize edebilen bir enzimi kodlayan başka bir önemli işaretleyici genidir. GUS geni, transgenik bitkilerde gen ifade desenlerini, promotör aktivitesini ve doku özgül ifadeyi değerlendirmek için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Chen vd., 1998). GUS analizi, GUS aktivitesinin mavi bir çözelti oluşturarak tespitini sağlar ve transgen ifadesi için görsel bir işaretleyici sunar.

Son yıllarda, transgenik bitkilerde seçilebilir işaretleyici genlerin varlığı ile ilgili endişeleri ele almak için işaretleyici olmayan stratejiler dikkat çekmektedir. Bu stratejiler, işaretleyici genin transgenik bitkilerden çıkarılması için Cre/lox veya FLP/FRT gibi site özgü rekombinasyon sistemlerinin kullanılmasını içerir (Zhang vd., 2003; Wang vd., 2005). İşaretleyici olmayan yaklaşımlar, seçilebilir işaretleyici genlerin varlığı olmadan transgenik bitkilerin üretilmesine olanak tanır. Bu yaklaşım potansiyel çevresel endişeleri azaltabilir ve yasal onay almayı kolaylaştırabilir. Bu nedenle son zamanlarda bu yaklaşıma yönelik çalışmalar artış göstermektedir.

Yukarıda anlatılanların haricinde, örneğin, fosfinotricin asetiltransferaz (bar) genine direnç sağlayan, ve antibiyotik higromisine direnç sağlayan higromisin fosfotransferaz (hpt) geni gibi diğer seçilebilir işaretleyici genler bitki dönüşümünde yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Woo vd., 2011). Bu seçilebilir işaretleyiciler, özel herbisitlere veya antibiyotiklere direnç sağlayarak transgenik hücrelerin veya dokuların seçimini mümkün kılar ve daha özgül seçilebilirlik sağlamaktadır.

Özetlemek gerekirse, transgenik bitki türlerinde kullanılan önemli işaretleyici genler arasında neomisin fosfotransferaz II (nptII) geni, yeşil floresan protein (GFP) geni, β -glukuronidaz (GUS) geni, fosfinotricin asetiltransferaz (bar) geni ve higromisin fosfotransferaz (hpt) geni bulunmaktadır. Bu işaretleyici genler, transgenik bitkilerin tanımlanması, seçilmesi ve karakterize edilmesinde etkili olmuş, araştırmacılara gen ifadesini, doku özgül ifadeyi ve alt hücresele konumu inceleme olanağı sağlamıştır. Ayrıca, işaretleyici genlerin varlığıyla ilgili endişeleri ele almak için işaretsiz stratejiler, transgenik bitkilerde seçilebilir işaretleyici genlerin varlığına ilişkin endişeleri ele almanın alternatifleri olarak ortaya çıkmıştır.

4. Sonuç

Sonuç olarak, transgenik bitki araştırmalarında kullanılan promotör ve işaretleme genleri, gen ifadesini hassas bir şekilde düzenlemeyi, dönüştürülmüş

hücrelerin seçilmesini ve transgenik bitkilerin karakterizasyonunu sağlayarak bu alandaki önemli bir ilerlemeye yol açmıştır. Phloem (floem, özsu) özgül promotör, RuBisCoküçük alt birim promotörü ve stresle uyarılan promotörler gibi promotörler, dokusal spesifik ifade elde etmek, uyarlamalı gen düzenlemeyi gerçekleştirmek ve transgenik bitkilerin stres toleransını artırmak için değerli araçlar sunmuştur. Neomisin fosfotransferaz II (nptII), yeşil floresan protein (GFP) ve β -glukuronidaz (GUS) gibi işaretleyici genler, transgenik bitkilerin tanımlanması, seçilmesi ve karakterizasyonunda kritik roller oynamıştır. Bu genler, gen ifadesinin, doku özgül ifadesinin ve hücresel konumun izlenmesini kolaylaştırmış, gen işlevi ve bitki gelişimi hakkında bilgi sağlamıştır. Ayrıca, seçilebilir işaretçi genlerin transgenik bitkilerde bulunmasına ilişkin endişeleri ele almak için “marker-free” (işaretleyici içermeyen) stratejiler ortaya çıkmıştır. Bu stratejiler, site-spesifik rekombinasyon sistemlerini kullanan, seçilebilir işaretçi genler gerektirmeyen transgenik bitkilerin oluşturulmasına izin vermiştir. Bu yaklaşımlar, potansiyel çevresel riskleri azaltmak ve düzenleyici onayı kolaylaştırmak için kullanılmaktadır. Promoter ve işaretçi genlerin bir araya gelmesi, genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin istenen özelliklere sahip olarak geliştirilmesine büyük katkı sağlamıştır. Bu araçlar, gen düzenlemesi, bitki gelişimi ve stres yanıtlarının anlaşılmasına katkıda bulunurken, sürdürülebilir tarım ve ürün iyileştirmesi için fırsatlar sunmaktadır.

Toparlanırsa, transgenik bitki araştırmalarında yaygınlaşan promotör ve işaretçi genlerin kullanımı ile hassas gen düzenlemesi, dönüştürülmüş hücrelerin seçimi ve transgenik bitkilerin karakterizasyonu için güçlü araçlar elde edilmiştir. Bu gelişmeler, iyileştirilmiş özelliklere sahip genetik olarak değiştirilmiş ürünlerin geliştirilmesinin yolunu açmış ve yiyecek, yem ve lif üretiminin sürdürülebilir ve verimli bir şekilde yapılmasına katkıda bulunmuştur.

Kaynaklar

Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, N. & Al-Qurainy, F. (2012). Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances*, 30(3), 524-540. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.006>

An, Y., Huang, S., McDowell, J., McKinney, E., & Meagher, R. (1996). Conserved expression of the arabidopsis act1 and act3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *The Plant Cell*, 8(1), 15. <https://doi.org/10.2307/3870065>

Aoyama, T. and Chua, N. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal*, 11(3), 605-612. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11030605.x>

Bai, S., Tuan, P., Tatsuki, M., Yaegaki, H., Ohmiya, A., Yamamizo, C., ... & Moriguchi, T. (2015). Knockdown of carotenoid cleavage dioxygenase 4 (ccd4) via virus-induced gene silencing confers yellow coloration in peach fruit: evaluation of gene function related to fruit traits. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 257-264. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0920-8>

Bakhsh, A. and Husnain, T. (2012). Endeavours of rubisco small subunit promoter as a tool of green tissue specific expression. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 48(1), 1-9. <https://doi.org/10.17221/34/2011-cjgpb>

Barrero, R., Umeda, M., Yamamura, S., & Uchimiya, H. (2003). Over-expression of arabidopsis cap causes decreased cell expansion leading to organ size reduction in transgenic tobacco plants. *Annals of Botany*, 91(5), 599-603. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg056>

Baum, J., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G., Feldmann, P., Ilagan, O., ... & Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through rna interference. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1322-1326. <https://doi.org/10.1038/nbt1359>

Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. (2007). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, 27(3), 411-424. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0474-9>

Boddupally, D., Tamirisa, S., Gundra, S., Vudem, D., & Khareedu, V. (2018). Expression of hybrid fusion protein (cryIacasa) in transgenic rice plants imparts resistance against multiple insect pests. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26881-9>

Brunet, J. and Stewart, C. (2010). Impact of bee species and plant density on alfalfa pollination and potential for gene flow. *Psyche a Journal of Entomology*, 2010, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2010/201858>

Cao, T., Qin, M., Zhu, S., & Li, Y. (2022). Silencing of a cotton actin-binding protein ghwlim1c decreases resistance against verticillium dahliae infection. *Plants*, 11(14), 1828. <https://doi.org/10.3390/plants11141828>

Chen, L., Marmey, P., Taylor, N., Brizard, J., Espinoza, C., D'Cruz, P., ... & Fauquet, C. (1998). Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nature Biotechnology*, 16(11), 1060-1064. <https://doi.org/10.1038/35111>

Chen, T., Riaz, S., Davey, P., Zhao, Z., Sun, Y., Dykes, G., ... & Liu, L. (2022). Producing fast and active rubisco in tobacco to enhance photosynthesis. *The Plant Cell*, 35(2), 795-807. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac348>

Cheryatova, Y. and Yembaturova, E. (2022). Transgenic plants - a threat to local flora?. *Ecological Genetics*, 20(1S), 54-55. <https://doi.org/10.17816/ecogen112372>

Crickmore, N. (2006). Beyond the spore - past and future developments of bacillus thuringiensis as a biopesticide. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 616-619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02936.x>

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C., & Camargo, W. (2007). Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnology Journal*, 2(1), 83-90. <https://doi.org/10.1002/biot.200600182>

Dey, N., Sarkar, S., Acharya, S., & Maiti, I. (2015). Synthetic promoters in planta. *Planta*, 242(5), 1077-1094. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2377-2>

Douches, D., Kisha, T., Coombs, J., Li, W., Pett, W., & Grafius, E. (2001). Effectiveness of natural and engineered host plant resistance in potato to the colorado potato beetle. *Hortscience*, 36(5), 967-970. <https://doi.org/10.21273/hortsci.36.5.967>

Du, D., Jin, R., Guo, J., & Zhang, F. (2019). Construction of marker-free genetically modified maize using a heat-inducible auto-excision vector. *Genes*, 10(5), 374. <https://doi.org/10.3390/genes10050374>

Fan, J., Li, W., Dong, X., Wei, G., & Shu, H. (2007). Ectopic expression of a hyacinth agl6 homolog caused earlier flowering and homeotic conversion in arabidopsis. *Science in China Series C Life Sciences*, 50(5), 676-689. <https://doi.org/10.1007/s11427-007-0083-4>

Feike, D., Korolev, A., Soumpourou, E., Murakami, E., Reid, D., Breakspear, A., ... & Miller, J. (2019). Characterizing standard genetic parts and establishing common principles for engineering legume and cereal roots. *Plant Biotechnology Journal*, 17(12), 2234-2245. <https://doi.org/10.1111/pbi.13135>

Feng, Z., Yuan, M., Zou, J., Wu, L., Wei, L., Chen, T., ... & Zuo, S. (2020). Development of marker-free rice with stable and high resistance to rice black-streaked dwarf virus disease through rna interference. *Plant Biotechnology Journal*, 19(2), 212-214. <https://doi.org/10.1111/pbi.13459>

Fukayama, H., Mizumoto, A., Ueguchi, C., Katsunuma, J., Morita, R., Sasayama, D., ... & Azuma, T. (2018). Expression level of rubisco activase negatively correlates with rubisco content in transgenic rice. *Photosynthesis Research*, 137(3), 465-474. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0525-9>

Gao, W., Zhang, L., Wang, J., Liu, Z., Zhang, Y., Xue, C., ... & Zhao, J. (2021). Zjsep3 modulates flowering time by regulating the lhy promoter. *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03305-x>

Garg, A., Sawers, R., Wang, H., Kim, J., Walker, J., Brutnell, T., ... & Wu, R. (2005). Light-regulated overexpression of an arabidopsis phytochrome

a gene in rice alters plant architecture and increases grain yield. *Planta*, 223(4), 627-636. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0101-3>

Gaxiola, R., Li, J., Undurraga, S., Dang, L., Allen, G., Alper, S., ... & Fink, G. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the *avp1* *h⁺*-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11444-11449. <https://doi.org/10.1073/pnas.191389398>

Giovannini, A., Zottini, M., Morreale, G., Spena, A., & Allavena, A. (1999). Ornamental traits modification by *rol* genes in *osteospermum ecklonis* transformed with *agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 35(1), 70-75. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0012-2>

He, Y. and Zhao, Y. (2019). Technological breakthroughs in generating transgene-free and genetically stable crispr-edited plants. *Abiotech*, 1(1), 88-96. <https://doi.org/10.1007/s42994-019-00013-x>

Heuvel, T., Renes, R., Gremmen, B., Woerkum, C., & Trijp, J. (2007). Consumers' images regarding genomics as a tomato breeding technology: "maybe it can provide a more tasty tomato". *Euphytica*, 159(1-2), 207-216. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9474-7>

Hyun, K., Oh, J., Park, J., Noh, Y., & Song, J. (2016). Structural analysis of *frigida* flowering-time regulator. *Molecular Plant*, 9(4), 618-620. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.11.009>

Inui, H. and Ohkawa, H. (2005). Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian *p450* monooxygenase genes. *Pest Management Science*, 61(3), 286-291. <https://doi.org/10.1002/ps.1012>

Jackson, M., Stinchcombe, J., Korves, T., & Schmitt, J. (2004). Costs and benefits of cold tolerance in transgenic *arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*, 13(11), 3609-3615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2004.02343.x>

Jang, I., Choi, W., Lee, K., Song, S., Nahm, B., & Kim, J. (2002). High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome *c* gene *oscc1* and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots. *Plant Physiology*, 129(4), 1473-1481. <https://doi.org/10.1104/pp.002261>

Jin, S., Xu, C., Li, G., Sun, D., Li, Y., Wang, X., ... & Liu, S. (2017). Functional characterization of a type 2 metallothionein gene, *ssmt2*, from alkaline-tolerant *suaeda salsa*. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18263-4>

Jones, D. (1999). Natural pesticides and the evolution of food plants. *Pesticide Science*, 55(6), 634-636. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9063\(199906\)55:63.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9063(199906)55:63.0.co;2-1)

Kandasamy, M., Burgos-Rivera, B., McKinney, E., Ruzicka, D., & Meagher, R. (2007). Class-specific interaction of profilin and adf isoforms with actin in the regulation of plant development. *The Plant Cell*, 19(10), 3111-3126. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052621>

Kandasamy, M., McKinney, E., & Meagher, R. (2002). Functional nonequivalency of actin isoforms in Arabidopsis. *Molecular Biology of the Cell*, 13(1), 251-261. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-07-0342>

Kasuga, M., Li, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17(3), 287-291. <https://doi.org/10.1038/7036>

Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Fukuda, A., Tanaka, Y., & Shimizu, T. (2007a). Functional analysis of transgenic rice plants expressing a novel mutated als gene of rice. *Journal of Pesticide Science*, 32(4), 385-392. <https://doi.org/10.1584/jpestics.g07-08>

Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Shimizu, T., Fukuda, A., & Tanaka, Y. (2007b). A novel mutant acetolactate synthase gene from rice cells, which confers resistance to als-inhibiting herbicides. *Journal of Pesticide Science*, 32(2), 89-98. <https://doi.org/10.1584/jpestics.g06-40>

Kim, K., Kim, Y., Lim, G., Lee, M., & Jung, Y. (2011). Expression of catalase (cat) and ascorbate peroxidase (apx) in transgenic tobacco under cadmium stress. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 44(1), 53-57. <https://doi.org/10.7745/kjssf.2011.44.1.053>

Kong, X., Zhou, S., Yin, S., Zhao, Z., Han, Y., & Wang, W. (2016). Stress-inducible expression of an f-box gene *tafb1* from wheat enhanced the drought tolerance in transgenic tobacco plants without impacting growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01295>

Krichevsky, A., Zaltsman, A., King, L., & Citovsky, V. (2012). Expression of complete metabolic pathways in transgenic plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 28(1), 1-14. <https://doi.org/10.5661/bger-28-1>

Kuluev, B., Knyazev, A., Lebedev, Y., Postrigan, B., & Chemeris, A. (2012). Obtaining transgenic tobacco plants expressing conserved regions of the *antennapedia* gene in antisense orientation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(3), 307-317. <https://doi.org/10.1134/s1021443712030107>

Kyozuka, J., McElroy, D., Hayakawa, T., Xie, Y., Wu, R., & Shimamoto, K. (1993). Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcs-gusa* and rice *rbcs-gusa* fusion genes in transgenic rice. *Plant Physiology*, 102(3), 991-1000. <https://doi.org/10.1104/pp.102.3.991>

Lange, B., Mahmoud, S., Wildung, M., Turner, G., DAVIS, E., Lange, I., ... & Croteau, R. (2011). Improving peppermint essential oil yield and composition by metabolic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 16944-16949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111558108>

Lanza, M., García-Ponce, B., Castrillo, G., Catarecha, P., Sauer, M., Rodríguez-Serrano, M., ... & Leyva, A. (2012). Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants. *Developmental Cell*, 22(6), 1275-1285. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.04.008>

Li, J., Chen, S., Wang, X., Shi, C., Liu, H., Yang, J., ... & Jia, H. (2018). Hydrogen sulfide disturbs actin polymerization via s-sulfhydration resulting in stunted root hair growth. *Plant Physiology*, 178(2), 936-949. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00838>

Li, J., Jiang, D., Zhou, H., Li, F., Jiang, Y., Hong, L., ... & Zhuang, C. (2011). Correction: expression of rna-interference/antisense transgenes by the cognate promoters of target genes is a better gene-silencing strategy to study gene functions in rice. *Plos One*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/annotation/6818176e-4f00-4229-a133-a83d0c3b11da>

Liu, F. and Cao, Y. (2018). Expression of a bacterial *aroA* gene confers tolerance to glyphosate in tobacco plants. *Turkish Journal of Biology*, 42(2). <https://doi.org/10.3906/biy-1712-56>

Lloyd, A., Plaisier, C., Carroll, D., & Drews, G. (2005). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(6), 2232-2237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409339102>

Low, L., Yang, S., Kok, D., Abdullah, J., Tan, N., & Lai, K. (2018). Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method.. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79369>

Lu, X., Guan, Q., & Zhu, J. (2013). Downregulation of *csd2* by a heat-inducible *mir398* is required for thermotolerance in arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 8(8), e24952. <https://doi.org/10.4161/psb.24952>

Ma, G., Ning, G., Zhang, W., Zhan, J., Lv, H., & Bao, M. (2010). Overexpression of petunia *soc1*-like gene *fbp21* in tobacco promotes flowering without decreasing flower or fruit quantity. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(3), 573-581. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0263-4>

Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Identification of cold-inducible downstream

genes of the arabidopsis *dreb1a/cbf3* transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*, 38(6), 982-993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02100.x>

Matsuda, N., Ikeda, K., Kurosaka, M., Takashina, T., Isuzugawa, K., Endo, T., ... & Omura, M. (2009). Early flowering phenotype in transgenic pears (*pyrus communis* l.) expressing the *cift* gene. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78(4), 410-416. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.78.410>

Mihálik, D., Lančaričová, A., Mrkvová, M., Kaňuková, Š., Moravčíková, J., Glasa, M., ... & Kraic, J. (2020). Diacylglycerol acetyltransferase gene isolated from *euonymus europaeus* l. altered lipid metabolism in transgenic plant towards the production of acetylated triacylglycerols. *Life*, 10(9), 205. <https://doi.org/10.3390/life10090205>

Milner, S., Ferradini, N., Nicolia, A., Veronesi, F., Salvi, S., & Rosellini, D. (2014). Copy number estimation of a plant-derived selectable marker gene by high resolution melting analysis: a tool to simplify transgenic plant breeding. *Crop Science*, 54(3), 1133-1138. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.09.0631>

Mondal, H., Louis, J., Archer, L., Patel, M., Nalam, V., Sarowar, S., ... & Shah, J. (2017). Arabidopsis actin-depolymerizing factor3 is required for controlling aphid feeding from the phloem. *Plant Physiology*, 176(1), 879-890. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01438>

Moore, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J., & Palme, K. (1998). A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 376-381. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.376>

Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., ... & Lopato, S. (2011). Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of *dreb/cbf* factors. *Plant Biotechnology Journal*, 9(2), 230-249. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00547.x>

Nakashima, K., Tran, L., Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a *nac*-type transcription factor *osnac6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51(4), 617-630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03168.x>

Naqvi, S., Zhu, C., Farré, G., Ramessar, K., Bassié, L., Breitenbach, J., ... & Christou, P. (2009). Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(19), 7762-7767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901412106>

Nathalie, H., Eloiza, A., Priscila, A., & Juliana, V. (2015). Biotechnology in agriculture: the perception of farmers on the inclusion of genetically modified organisms (gmos) in agricultural production. *African Journal of Agricultural Research*, 10(7), 631-636. <https://doi.org/10.5897/ajar2014.9323>

Owen, M. and Zelaya, I. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Management Science*, 61(3), 301-311. <https://doi.org/10.1002/ps.1015>

Powell, J., Gulden, R., Hart, M., Campbell, R., Levy-Booth, D., Dunfield, K., ... & Klironomos, J. (2007). Mycorrhizal and rhizobial colonization of genetically modified and conventional soybeans. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4365-4367. <https://doi.org/10.1128/aem.00594-07>

Pruthvi, V., Rama, N., & Nataraja, K. (2014). Simultaneous expression of abiotic stress responsive transcription factors, *atdreb2a*, *athb7* and *atabf3* improves salinity and drought tolerance in peanut (*arachis hypogaea* l.). *Plos One*, 9(12), e111152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111152>

Qin, L., Hou, Y., Meng, X., Lin, J., Li, Y., & Hou, B. (2017). Ectopic expression of glycosyltransferase *ugt76e11* increases flavonoid accumulation and enhances abiotic stress tolerance in *arabidopsis*. *Plant Biology*, 20(1), 10-19. <https://doi.org/10.1111/plb.12627>

Rabha, M., Sharma, S., Acharjee, S., & Sarmah, B. (2017). Isolation and characterization of *bacillus thuringiensis* strains native to assam soil of north east india. *3 Biotech*, 7(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0935-y>

Rao, K., Rathore, K., Hodges, T., Fu, X., Stöger, E., Sudhakar, D., ... & Gatehouse, J. (1998). expression of snowdrop lectin (*gna*) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *The Plant Journal*, 15(4), 469-477. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00226.x>

Ratcliff, F., Harrison, B., & Baulcombe, D. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276(5318), 1558-1560. <https://doi.org/10.1126/science.276.5318.1558>

Ruíz, M., Voinnet, O., & Baulcombe, D. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell*, 10(6), 937-946. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.937>

Saji, H., Nakajima, N., Aono, M., Tamaoki, M., Kubo, A., Wakiyama, S., ... & Nagatsu, M. (2005). Monitoring the escape of transgenic oilseed rape

around japanese ports and roadsides. *Environmental Biosafety Research*, 4(4), 217-222. <https://doi.org/10.1051/ebr:2006003>

Sarkar, T., Thankappan, R., Kumar, A., Mishra, G., & Dobaría, J. (2014). Heterologous expression of the *atdrebl1a* gene in transgenic peanut-conferred tolerance to drought and salinity stresses. *Plos One*, 9(12), e110507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110507>

Sato, H., Shimizu, T., Kawai, K., Kaku, K., Arakawa, A., Tachibana, T., ... & Takamizo, T. (2013). Herbicide-resistant tall fescue with cytoplasmic male sterility selected by a mutated rice acetolactate synthase gene. *Crop Science*, 53(1), 201-207. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0199>

Shih, P., Liang, Y., & Loqué, D. (2016). Biotechnology and synthetic biology approaches for metabolic engineering of bioenergy crops. *The Plant Journal*, 87(1), 103-117. <https://doi.org/10.1111/tpj.13176>

Sloan, J., Schwartz, B., & Becker, W. (1993). Promoter analysis of a light-regulated gene encoding hydroxypyruvate reductase, an enzyme of the photorespiratory glycolate pathway. *The Plant Journal*, 3(6), 867-874. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1993.03060867.x>

Snow, A., Pilson, D., Rieseberg, L., Paulsen, M., Pleskac, N., Reagon, M., ... & Selbo, S. (2003). A bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecological Applications*, 13(2), 279-286. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)013\[0279:abtrha\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2003)013[0279:abtrha]2.0.co;2)

Soares, J., Weber, K., Qiu, W., Stanton, D., Mahmoud, L., Wu, H., ... & Grosser, J. (2020). The vascular targeted citrus flowering locus *t3* gene promotes non-inductive early flowering in transgenic carrizo rootstocks and grafted juvenile scions. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78417-9>

Sreedharan, S., Shekhawat, U., & Ganapathi, T. (2013). Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *musapip1;2* display high tolerance levels to different abiotic stresses. *Plant Biotechnology Journal*, 11(8), 942-952. <https://doi.org/10.1111/pbi.12086>

Stewart, C., All, J., Raymer, P., & Ramachandran, S. (1997). Increased fitness of transgenic insecticidal rapeseed under insect selection pressure. *Molecular Ecology*, 6(8), 773-779. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1997.00239.x>

Suganami, M., Suzuki, Y., Kondo, E., Nishida, S., Konno, S., & Makino, A. (2020). Effects of overproduction of rubisco activase on rubisco content in transgenic rice grown at different n levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1626. <https://doi.org/10.3390/ijms21051626>

Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., & Mittler, R. (2005). Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiology*, 139(3), 1313-1322. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070110>

Tabashnik, B., Brévault, T., & Carrière, Y. (2013). Insect resistance to bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31(6), 510-521. <https://doi.org/10.1038/nbt.2597>

Tamaoki, M., Imai, H., Takahashi, H., Toda, Y., Niwa, Y., Nakajima, N., ... & Saji, H. (2006). Development of visible markers for transgenic plants and their availability for environmental risk assessment. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(5-6), 377-386. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-5-614>

Tanaka, N., Ureshino, A., Shigeta, N., Mimida, N., Komori, S., Takahashi, S., ... & Wada, M. (2014). Overexpression of arabidopsis ft gene in apple leads to perpetual flowering. *Plant Biotechnology*, 31(1), 11-20. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.0912a>

Tanaka, Y., Brugliera, F., & Chandler, S. (2009). Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(12), 5350-5369. <https://doi.org/10.3390/ijms10125350>

Tanaka, Y., Brugliera, F., Kalc, G., Senior, M., Dyson, B., Nakamura, N., ... & Chandler, S. (2010). Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 74(9), 1760-1769. <https://doi.org/10.1271/bbb.100358>

Teulon, D. and Losey, J. (2002). Issues relating to the practical use of transgenic crops for insect pest management. *New Zealand Plant Protection*, 55, 396-404. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2002.55.3914>

Tzeng, T., Hsiao, C., Chi, P., & Yang, C. (2003). Two lily sepallata-like genes cause different effects on floral formation and floral transition in arabidopsis. *Plant Physiology*, 133(3), 1091-1101. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026997>

Vaškebová, L., Šamaj, J., & Ovečka, M. (2017). Single-point act2 gene mutation in the arabidopsis root hair mutant der1-3 affects overall actin organization, root growth and plant development. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx180>

Wang, F., Lian, L., Liu, Y., Zhang, Y., Fang, R., & Liu, Q. (2018). Rotfl1c of rosa multiflora has a dual-function in suppressing reproductive growth and promoting vegetative growth of arabidopsis. *Science China Life Sciences*, 61(12), 1599-1601. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0082-1>

Wang, F., Yang, C., Wang, L., Zhong, N., Wu, X., Han, L., ... & Xia, G. (2011). Heterologous expression of a chloroplast outer envelope protein from *Suaeda salsa* confers oxidative stress tolerance and induces chloroplast aggregation in transgenic arabidopsis plants. *Plant Cell & Environment*, 35(3), 588-600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02438.x>

Wang, H., Wang, J., Gao, P., Jiao, G., Zhao, P., Li, Y., ... & Xia, G. (2008). Down-regulation of *ghadf1* gene expression affects cotton fibre properties. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), 13-23. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00367.x>

Wang, J., Chong, K., & Xu, Y. (2009). Overexpression of *osraa1* promotes flowering and hypocotyls elongation in arabidopsis. *Chinese Science Bulletin*, 54(22), 4221-4228. <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0627-z>

Wang, X., Singer, S., & Liu, Z. (2011). Silencing of meiosis-critical genes for engineering male sterility in plants. *Plant Cell Reports*, 31(4), 747-756. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1193-9>

Wang, Y., Chen, B., Hu, Y., Li, J., & Zhang, L. (2005). Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the *cre/lox* site-specific recombination system. *Transgenic Research*, 14(5), 605-614. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-0884-9>

Wang, Y., Yoo, C., & Blancaflor, E. (2007). Improved imaging of actin filaments in transgenic arabidopsis plants expressing a green fluorescent protein fusion to the c- and n-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytologist*, 177(2), 525-536. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02261.x>

Whitney, S., Baldet, P., Hudson, G., & Andrews, T. (2001). Form I rubiscos from non-green algae are expressed abundantly but not assembled in tobacco chloroplasts. *The Plant Journal*, 26(5), 535-547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01056.x>

Woo, H., Suh, S., & Cho, Y. (2011). Strategies for developing marker-free transgenic plants. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(6), 1053-1064. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0519-3>

Xu, Y., Gianfagna, T., & Huang, B. (2010). Proteomic changes associated with expression of a gene (*ipt*) controlling cytokinin synthesis for improving heat tolerance in a perennial grass species. *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3273-3289. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq149>

Yanagisawa, S., Akiyama, A., Kisaka, H., Uchimiya, H., & Miwa, T. (2004). Metabolic engineering with *dof1* transcription factor in plants: improved

nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7833-7838. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402267101>

Yang, L., Machin, F., Wang, S., Saplaoura, E., & Kragler, F. (2023). Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks. *Nature Biotechnology*, 41(7), 958-967. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01585-8>

Yin, Y., Zhu, Q., Dai, S., Lamb, C., & Beachy, R. (1997). Rf2a, a bzip transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *The Embo Journal*, 16(17), 5247-5259. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5247>

Yu, K., Liu, Z., Gui, H., Geng, L., Wei, J., Liang, D., ... & Chen, X. (2021). Highly efficient generation of bacterial leaf blight-resistant and transgene-free rice using a genome editing and multiplexed selection system. *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02979-7>

Yun, S. and Kwon, H. (2008). Ecophysiological changes in a cold tolerant transgenic tobacco plant containing a zinc finger protein (pif1) gene. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 27(4), 389-394. <https://doi.org/10.5338/kjea.2008.27.4.389>

Zameer, M., Shafique, S., Shafique, S., Tahir, U., Zahra, N., Rashid, B., ... & Afzaal, R. (2022). Physiological and biochemical response of transgenic cotton plants to drought stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 31(4), 3909-3918. <https://doi.org/10.15244/pjoes/146461>

Zhang, D., Tu, X., Li, P., & Bao, L. (2011). Transgenic plants of petunia hybrida harboring the cyp2e1 gene efficiently remove benzene and toluene pollutants and improve resistance to formaldehyde. *Genetics and Molecular Biology*, 34(4), 634-639. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572011005000036>

Zhang, W., Subbarao, S., Addae, P., Shen, A., Armstrong, C., Peschke, V., ... & Gilbertson, L. (2003). Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*zea mays* L.) plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(7), 1157-1168. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1368-z>

Zhang, X., Han, L., Wang, Q., Zhang, C., Yu, Y., Tian, J., ... & Kong, Z. (2018). The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *medicago truncatula*. *New Phytologist*, 221(2), 1049-1059. <https://doi.org/10.1111/nph.15423>

Zhao, S., Wang, F., Zhang, Q., Zou, J., Xie, Z., Li, K., ... & Zhou, Z. (2021). Transformation and functional verification of cry5aa in cotton. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82495-8>

Zhao, Y., Li, Q., & Davis, R. (2004). Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. *Plant Cell Reports*, 23(4), 224-230. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0812-0>

Zhong, H., Sun, B., Warkentin, D., Zhang, S., Wu, R., Wu, T., ... & Sticklen, M. (1996). The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes. *Plant Physiology*, 110(4), 1097-1107. <https://doi.org/10.1104/pp.110.4.1097>

Zhu, B., Lawrence, J., Warwick, S., Mason, P., Braun, L., Halfhill, M., ... & Stewart, C. (2003). Stable bacillus thuringiensis (bt) toxin content in interspecific fl and backcross populations of wild brassica rapa after bt gene transfer. *Molecular Ecology*, 13(1), 237-241. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2004.02018.x>

Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P., & Capell, T. (2008). Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18232-18237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809737105>

Zhu, J., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J., Qi, H., Wei, Z., ... & Li, S. (2012). Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsrna of an insect-associated gene ecr. *Plos One*, 7(6), e38572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038572>

BÖLÜM V

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ: BİTKİ GELİŞİMİNİN YÖNLENDİRİLMESİ

Plant Tissue Culture: Directing Plant Development

DİLEK ARSLAN ATEŞŞAHİN^{1*} & ŞEYDA KAYA²

^{1}(Dr.), Fırat Üniversitesi, Baskil Meslek Yüksekokulu,*

Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, 23100, Elazığ, Türkiye

E-mail: datessahin@firat.edu.tr

ORCID: 0000-0002-1528-9367

²(Öğr. Gör.), Gaziantep İslam Bilim ve Teknoloji Üniversitesi,

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar

Teknikleri Programı, Gaziantep, Türkiye

E-mail: sydkaya58@gmail.com

ORCID: 0000-0001-8489-8687

Özet

Bitki doku kültürü, biyoteknoloji alanı içerisinde bitki hücrelerini, dokularını ve organlarını, şartları kontrol edilen kontrollü bir yetiştirme ortamında üretme, manipüle etme ve yönlendirme olanağı sağlayan güçlü bir tekniktir. Bu teknik, bitki materyalinin aseptik bir ortamda, oksin (auxin) ve sitokin gibi büyüme düzenleyicileri ile besin maddeleri eklenmiş bir besiyerinde kültüre edilmesini içerir. Bitki doku kültürünün temel amacı, farklı hedeflere sahip çalışmalar için kullanılabilen, klonlar olarak da bilinen genetik olarak aynı bitkilerin üretilmesidir. Bitki doku kültürünün faydaları sayısızdır. İlk olarak, bitki doku kültürlerinin yapılması çeşitli endüstrilerde kullanılan ikincil (sekonder) metabolitler dahil olmak üzere farmasötikler ile gıda ve kozmetikte kullanılan aktif bileşiklerin sürekli üretimini mümkün kılar. Bitki hücrelerinin in vitro kültürünü yapmak, bu bileşiklerin tutarlı ve standart bir kaynağının elde edilmesini sağlar. Ayrıca, bitki doku kültürü, geleneksel

tohum üretimi gibi geleneksel yöntemlere dayanmadan istenen özelliklere sahip bitkilerin hızlı çoğalmasını sağlar. Bu teknik, somatik embriyogenez gibi teknikler aracılığıyla genetik çeşitliliği artırma fırsatı da sunar. Ayrıca, bitki doku kültürü bitki biyoteknolojisi araştırmalarında hayati bir rol oynar. Gen düzenleme ve dönüşüm gibi tekniklerin uygulanmasına olanak tanır, bu da gen fonksiyonlarını incelemek, genetik olarak değiştirilmiş bitkiler geliştirmek ve temel ve uygulamalı bitki araştırmalarını ilerletmek için kullanılabilir. Bitki doku kültürü ayrıca genetik olarak değiştirilmiş bitki hücrelerinin yeniden oluşturulmasına olanak tanır ve bu da büyük miktarlarda süs bitkilerinin üstün klonlarını seçmek için kullanılabilir. Bu uygulamaların yanı sıra, bitki doku kültürü bitkilerin hızlı bir şekilde çoğaltılmasına, hastalık taşıma olasılığının azaltılmasına ve nesli tehlikede olan türlerin korunmasına olanak tanır. Yılın her döneminde bitki üretimini sağlar, hastalık taşıma olasılığını azaltır ve bu şekilde de biyoçeşitliliğin korunmasına katkı sağlar. Sonuç olarak, bitki doku kültürü, aktif bileşiklerin üretimi, üstün genotiplerin korunması ve yeni çeşitlerin geliştirilmesi için kullanılan değerli bir tekniktir. Bitki doku kültürü yöntemleri, bitki biyoteknolojisi araştırmalarında hayati bir rol oynayarak, bitkilerin hızlıca çoğaltılmasında, hastaliksız bitkilerin eldesinde ve nesli tehlikede olan türlerin korunmasında avantajlar sunar. Her geçen gün gelişen teknolojiyle birlikte bitki biyoteknolojisi ve doku kültürü teknikleri de daha da gelişmekte ve protokollerin daha da optimize edilmesine yardımcı olarak, bitkisel uygulamaların genişletilmesine katkıda bulunmaya devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: bitki doku kültürü; bitki gelişimi; yönlendirme

Abstract

Plant tissue culture is a potent biotechnological technique, allowing precise control over the propagation, manipulation, and directed development of plant cells, tissues, and organs within a controlled environment. It involves aseptic culturing of plant material on a nutrient medium fortified with growth regulators, such as auxins and cytokinins, with the primary aim of generating genetically identical plants, known as clones, for diverse applications. Plant tissue culture holds numerous advantages. It facilitates the continuous production of active compounds like secondary metabolites utilized across industries like pharmaceuticals, cosmetics, and food production. It assures a consistent and standardized supply of these compounds through in vitro culturing. Additionally, it enables the preservation and propagation of superior genotypes, hastening the multiplication of desirable trait-bearing plants while obviating traditional

methods like seed propagation. This technique also encourages genetic diversity enhancement through methods such as somatic embryogenesis, fostering novel variety development. Plant tissue culture is pivotal in plant biotechnology research, facilitating techniques like gene editing and transformation for gene function studies, genetically modified plant development, and both basic and applied plant research. It also enables the regeneration of genetically modified plant cells to select abundant superior ornamental plant clones. Plant tissue culture offers added benefits, including rapid plant propagation throughout the year, the assurance of disease-free plants, and endangered species conservation, all while reducing disease transmission risks. In conclusion, plant tissue culture's value in biotechnology lies in active compound production, superior genotype preservation, and novel variety development. It is a cornerstone of plant biotechnology research and provides additional benefits like accelerated propagation, disease control, and biodiversity preservation. Plant tissue culture techniques are evolving with ever-developing technology and continue to contribute to the expansion of herbal applications, contribute the innovations and advancement of plant science and biotechnology by helping to further optimize protocols.

Keywords: directing development; plant development; plant tissue Culture.

1. Giriş

Bitki doku kültürü, biyoteknoloji biliminde sıklıkla kullanılan, bitki hücrelerini, dokularını veya organlarını kontrollü bir deney ortamında yetiştirmek amacıyla yararlanılan bir tekniktir (Espinosa-Leal vd., 2018). Bu yöntem, bitki materyalinin aseptik kültürünün, oksinler (auxin) ve sitokinler gibi büyüme düzenleyicileriyle desteklenmiş bir besin ortamında gerçekleştirilmesini içerir (Fehér, 2019). Bitki doku kültürünün temel amacı, genetik olarak aynı bitkileri üretmektir, bu da klonlar olarak bilinir ve çeşitli amaçlar için kullanılabilir (Jayusman vd., 2022).

Bitki doku kültürü yapılmasının temel nedenlerinden biri, sekonder metabolitler gibi çeşitli amaçlarla tercih edilen aktif bileşiklerin üretimidir (Espinosa-Leal vd., 2018). Bitki doku kültürü yöntemi, bu bileşiklerin sürekli üretimine olanak tanır ve bu aktif bileşikler genellikle farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılır (Espinosa-Leal vd., 2018). Bitki hücrelerini in vitro kültüre alarak, bu bileşiklerin düzenli olarak, tutarlı ve standart bir tedarik yöntemiyle eldesi mümkün olur. Bu şekilde tutarlı bitki

materyalinin kitlesel üretimi sayesinde, standart kaliteye sahip fitofarmasötikler elde etmek mümkün olur (Debnath vd., 2006). Aynı zamanda tıbbi uygulamalar ve tedaviler için gerekli olan, aktif bileşenlerin tutarlı - standart seviyelerine sahip tıbbi bitkilerin bulunabilirliğini sağlar. Yüksek kaliteli bitkisel ilaçların üretiminde de bitki doku kültürü yöntemleri kullanılmaktadır (Debnath vd., 2006; Maher vd., 2019). Bitki doku kültürününün diğer önemli bir uygulaması, üstün genetik materyali koruma ve çoğaltmadır (Fehér, 2019). Bu teknik, hastalık direnci veya yüksek verim değeri gibi istenen özelliklere sahip bitkilerin hızlı bir şekilde çoğaltılmasına olanak tanır ve geleneksel yöntemlere (tohum çoğaltma gibi) dayanmadan gerçekleştirilebilir (Fehér, 2019). Bitki doku kültürü ayrıca somatik embriyogenez gibi teknikler aracılığıyla genetik çeşitliliği artırma fırsatı da sunar, bu da yeni çeşitlerin geliştirilmesine yol açabilir (Fehér, 2019). Gen düzenleme ve dönüşüm gibi yöntemlerin bitki doku kültürü yapılarak kolaylıkla uygulanmasına olanak tanır; bu yöntemler gen fonksiyonunu incelemek, genetik olarak değiştirilmiş bitkiler geliştirmek ve temel - uygulamalı bitki araştırmalarını ilerletmek için kullanılabilir (Maher vd., 2019). Aynı zamanda bitki doku kültürü, genetik olarak değiştirilmiş bitki hücrelerinin yeniden üretilmesine olanak tanır ve bu da süs bitkilerinin üstün klonlarını büyük miktarlarda seçmek için kullanılabilir (Jayusman vd., 2022).

Bütün bu uygulamaların yanı sıra, bitki doku kültürününün diğer faydaları şu şekilde sıralanabilir: i) Mevsim sınırlaması olmaksızın bitkilerin hızlıca çoğaltılmasına olanak tanır, çünkü doku kültürü ile yetiştirilen bitkiler yılın herhangi bir zamanında yetiştirilebilir (Jayusman vd., 2022). ii) Bitkilerin hastalık taşıma olasılığını azaltır, çünkü dokuları, in vitro kültür ile üretilen bitkiler zararlılardan, patojenlerden ve diğer kontaminantlardan arındırılmıştır (Jayusman vd., 2022). iii) Nesli tükenme tehlikesi taşıyan bitki türlerinin korunması için bir araç sağlar (Nisa, 2018). In vitro olarak kontrollü koşullarda bitki hücrelerinin kültüre edilmesiyle, bu türlerin korunması ve çoğaltılması mümkün olur, bu da türlerin hayatta kalmasını ve biyolojik çeşitliliğinin korunmasını garantiler (Nisa, 2018). iv) Biyoteknolojik olarak önemli aktif bileşiklerin üretimi, üstün genotiplerin korunması ve yüksek kaliteli bitkisel ilaçların geliştirilmesi kolaylıkla, kısa sürelerde ve hızlıca mümkün olmaktadır.

Bitki doku kültüründe kullanılan stratejiler, bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının başarılı bir şekilde in vitro çoğaltılması, yeniden üretilmesi ve manipülasyonunu amaçlayan geniş bir teknik ve yaklaşım yelpazesini kapsar. Bu yöntemler, genetik olarak aynı bitkilerin üretilmesi, yeni çeşitlerin geliştirilmesi ve değerli bileşiklerin üretilmesi için hayati öneme sahiptir. Bu yüzden bitki

doku kültüründe, eksplant kültürlerinin kurulması önemli bir basamaktır. Eksplantlar, gövdeler, yapraklar veya embriyolar gibi çeşitli bitki parçalarından elde edilebilen ve sterilize edilip büyüme düzenleyicilerle takviye edilmiş bir besiyeri ortamına yerleştirilen parçalardır (Luo vd., 2015). Bu besin ortamı, eksplantların büyümesini ve gelişimini desteklemek için gerekli olan besin maddeleri ve hormonları sağlar. Bu yöntemle, hücrelerin farklılaşmamış bir kümesi olan kallus oluşturmanın başlatılması mümkün olur, ve bu kallus daha sonra çeşitli amaçlar için daha fazla manipüle edilebilir (Phillips vd., 1994). Bitki doku kültürlerinde yaygın olarak kullanılan bir başka yöntem somatik embriyogenezdır, bu yöntem somatik hücrelerden embriyo benzeri yapıların indüksiyonunu içerir. Bu süreç, embriyogenezin doğal sürecini taklit eder ve göreceli olarak kısa bir süre içinde büyük sayıda embriyo üretmeyi mümkün kılar. Somatik embriyogenez, istenen özelliklere sahip bitkilerin çoğaltılması için özellikle yararlıdır, çünkü üstün genotiplerin deney ortamlarında hızlı bir şekilde çoğaltılmasını sağlar. Somatik embriyogenezin yanı sıra, bitki doku kültürlerinde kullanılan diğer bir yöntem organogenezistir. Organogenezis, eksplantlardan sürgün veya kök yapılarının oluşumunun indüksiyonunu içerir (Akshatha vd., 2018). Kültür ortamındaki büyüme düzenleyicilerini ve bunların miktarlarını manipüle ederek, belirli organların gelişimini yönlendirmek mümkün olur. Bu yöntem genellikle toprağa aktarılabilen ve olgun bitkilere dönüşebilen bitki fidelerinin üretimi için kullanılır (Akshatha vd., 2018). Genetik mühendislik teknikleri olan gen düzenleme ve dönüşümü gibi uygulamalar aynı zamanda bitki doku kültürlerinde de kullanılır. Gen düzenleme, belirli genlerin hassas bir şekilde değiştirilmesine olanak tanırken, gen dönüşümü yabancı genlerin bitki hücrelerine tanıtılmasını içerir. Bu teknikler bitki biyoteknoloji araştırmalarında devrim yapmış ve hastalık direnci veya artmış verim gibi geliştirilmiş özelliklere sahip genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin geliştirilmesini mümkün kılmıştır.

Bitki doku kültürünün başarısını sağlamak için çeşitli faktörler her zaman göz önünde bulundurulmalı ve optimize edilmelidir. Göz önünde bulundurulacak faktörlerin başında uygun eksplantların seçimi, uygun kültür ortamı ve büyüme düzenleyicilerinin seçimi gelmektedir. Diğer taraftan sıcaklık, ışık ve nem gibi çevresel koşulların mutlaka çalışılacak bitki türüne göre optimize edilmesi gerekmektedir (Jayusman vd., 2022). Kültür ortamının bileşimi, içindeki besin maddeleri ve büyüme düzenleyicilerinin türü ve konsantrasyonu, in vitro bitki hücrelerinin büyümesi ve gelişmesinde kritik roller oynamaktadır (Jayusman vd., 2022). Ayrıca, uygulamalar sırasında steril tekniklerin ve aseptik koşulların kullanılması, kontaminasyonu önlemek ve sağlıklı bitki materyalinin

büyümesini sağlamak için çok önemlidir. Ayrıca, teknolojideki ilerlemeler, bitki doku kültürlerinde yeni yöntemlerin ve stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Örneğin, üç boyutlu iskelelerin kullanımı, izole edilmiş bitki hücrelerinin morfojenезinin daha gerçekçi ve kontrol edilen bir ortamda incelenmesini sağlamıştır (Luo vd., 2015). Bu yaklaşım, bitki hücrelerinin davranışını ve gelişimini üç boyutlu bir platform aracılığıyla üç boyutlu olarak anlamak için önemlidir ve bu tür teknik gelişmeler, bitki büyüme ve farklılaşma süreçlerini anlamak açısından önemli olup yeni bakış açılarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

Sonuç olarak, bitki doku kültürü, bitki hücrelerini, dokularını ve organlarını in vitro çoğaltmak, yeniden üretmek ve manipüle etmek için çeşitli yöntemler ve stratejiler kullanır. Bu yöntemler eksplant kültürleri, somatik embriyogenez, organogenez ve genetik mühendislik tekniklerini içerir. Kültür koşullarının optimizasyonu, kültür ortamının bileşimi ve çevresel faktörler gibi yöntemin tüm bileşenleri, bitki doku kültürlerinin başarısı için kritiktir. Teknolojideki ilerlemeler, bitki hücre davranışı ve gelişimini daha iyi anlamamıza yardımcı olan üç boyutlu iskeleler gibi yeni inovatif yöntemlerin geliştirilmesine de katkıda bulunmuştur.

Bu genel bilgilerden sonra bu bölümde bitki doku kültürü yöntemi ile bitki gelişiminin yönlendirilmesi konusuna genel bir bakış sunulup önemli noktalara değinilerek literatürdeki mevcut durum aktarılacaktır.

2. Bitki Gelişiminin Kontrolü ve Yönlendirilmesi

Bitki gelişimini kontrol eden ve yönlendiren faktörler çeşitli genetik, epigenetik ve çevresel süreçlerden etkilenir. Bu faktörler birbiriyle etkileşime girer ve bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının büyümesini, farklılaşmasını ve morfojenезini düzenler. Bitki gelişimini kontrol eden önemli faktörlerden biri ışıktır. Bitkilerin ışığa tepki verdiği fotomorfojenез süreci, tohum çimlenmesinden çiçeklenmeye ve yaşlanmaya kadar çeşitli gelişimsel süreçlerde kritik bir rol oynar (Tripathi vd., 2019). Fotoreseptörlerin bir sınıfı olan fitokromlar, kırmızı ve uzak - kızıl ışığı algılar ve yanıt verir, bitki büyüme ve gelişiminin çeşitli yönlerini düzenler (Rockwell ve Lagarias, 2017). Fitokromlar ile diğer düzenleyici proteinler arasındaki etkileşim, bitki gelişimini etkiler (Franklin ve Quail, 2009). Işık ayrıca, fotomorfojenезde rol oynayan genlerin ifadesini etkiler ve bu da çeşitli gelişimsel süreçleri kontrol eder (Tripathi vd., 2019).

Bitki gelişiminde başka bir önemli faktör epigenetik düzenlemelerdir. Epigenetik değişiklikler, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi,

gen ifadesini ve gelişimsel süreçleri etkileyebilir (Han vd., 2019). Bu tür değişiklikler kalıtlı olabilir ve bitkilerde büyüme, farklılaşma ve üreme gelişimini düzenlemede rol oynar (Wagner, 2003). Çeşitli epigenetik yollar, tohum gelişiminde, embriyo oluşumunda ve diğer gelişimsel süreçlerde aktif olarak rol oynar (Han vd., 2019). Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici genler de dahil olmak üzere genetik tüm faktörler, bitki gelişimini kontrol etmede kritik öneme sahiptir. Transkripsiyon faktörleri, yaprak gelişimi, çiçek gelişimi, ve tohum oluşumu gibi gelişimsel süreçlerde rol oynayan belirli genlerin ifadesini düzenler (Yruela, 2015). Örneğin, KNOX (KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN) transkripsiyon faktörleri, damarlı bitkilerde sürgün gelişimini ve yosunlarda sporofit gelişimini kontrol eder (Pires vd., 2013). Diğer düzenleyici genler, hormon üretimi ve sinyal yolları gibi süreçlerde önemli roller oynar. Örneğin, gibberellinler (GAs), çimlenme, gövde büyümesi, çiçeklenme ve meyve gelişimi dahil olmak üzere bitki büyüme ve gelişiminin çeşitli yönlerini düzenleyen hormonlardır (Lange ve Lange, 2006). Bu genlerdeki mutasyonlar veya ekspresyon değişiklikleri, gelişimsel anormalliklere veya bitki morfolojisinde değişikliklere yol açabilir.

Yetiştirme ortamındaki sıcaklık, besin maddesi içeriği ve biyotik etkileşimler gibi çevresel faktörler de elbetteki bitki gelişimini önemli ölçüde etkiler. Örneğin, sıcaklık, çiçeklenme gibi gelişimsel süreçlerin zamanlamasını ve bitki organlarının büyümesini ve gelişimini etkileyebilir (Wagner, 2003; Hakim ve Dalimunthe, 2022). Bitki yetiştirme ortamının besin maddesi içerikleri ve miktarları, temel mineraller ve makrobesin maddelerinin bulunabilirliği gibi çevresel özellikler de uygun bitki büyüme ve gelişimi için kritiktir (McIntyre, 2001). Mikroorganizmalarla simbiyotik ilişkiler veya komşu bitkilerle rekabet gibi biyotik etkileşimler de bitki gelişimini etkiler (Rodriguez vd., 2009; Delesalle ve Mazer, 2002).

Sonuç olarak, bitki gelişimi, karmaşık bir etkileşim ağı olan genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin birbirleriyle etkileşimi tarafından kontrol edilir ve yönlendirilir. Işık, fitokromlar aracılığıyla ışığın algılanması da dahil olmak üzere fotomorfojenizde kritik bir rol oynar ve çeşitli gelişimsel süreçleri düzenler. Epigenetik değişiklikler, DNA metilasyonu ve histon değişiklikleri gibi, gen ifadesini ve gelişimsel süreçleri etkileyebilir. Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici genler de dahil olmak üzere genetik faktörler, belirli gelişimsel süreçleri kontrol eder. Sıcaklık, besin maddesi bulunabilirliği ve biyotik etkileşimler gibi çevresel faktörler de bitki gelişimini etkilemektedir. Bu faktörleri ve etkileşimlerini anlamak, etkileşim derece ve yönlerini ifade

edecek şekilde faktör - etkileşim haritalarını çıkarmak, bitki gelişiminin temel mekanizmalarını açığa çıkarmak, bitki büyümesini teşvik etmek ve bitki morfolojisi üzerinde maniplasyonlar yapabilmek amacıyla stratejiler geliştirmek için oldukça önemlidir.

2.1. Bitki Doku Kültürlerinde Bitki Gelişiminin Yönlendirilmesinde Kullanılan Yöntem ve Yaklaşımlara Genel Bakış

Bitki doku kültüründe bitki gelişimini kontrol etme ve yönlendirme için kullanılan yöntemler ve stratejiler, çeşitli teknikleri ve yaklaşımları içerir. Bu yöntemler genetik mühendislik, kültür koşullarının optimize edilmesi, büyüme düzenleyicilerinin optimizasyonu ve alternatif dönüşüm protokollerinin kullanılmasını içerir.

Genetik mühendislik teknikleri içerisinde *Agrobacterium* aracılı dönüşüm tekniği, bitki doku kültüründe belirli genlerin bitki hücrelerine tanıtılmasında yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Gelvin, 2003). Bu yöntem, bitki hücrelerine istenen genleri ilave etmek için sıklıkla kullanılan, doğal olarak taşıdığı plazmitleri aracılığıyla DNA aktarımını kolaylıkla gerçekleştirebilen, Gram negatif özellikli bir toprak bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens* türünün kullanılmasını içerir. Bu teknik, bitkilerde hastalık direnci veya artırılmış verim gibi yeni özelliklerin veya değişikliklerin tanıtılmasına olanak tanır.

Bitki doku kültürünün başarısı için kültür koşullarının optimize edilmesi önemlidir. Kültür ortamının bileşimi, sıcaklık, ışık yoğunluğu ve nem gibi faktörler, bitki hücrelerinin uygun büyüme ve gelişimini teşvik etmek için dikkatlice kontrol edilmelidir (Bednarek ve Orłowska, 2019). Oksinler (Auxinler) ve sitokinler gibi büyüme düzenleyicilerinin seçimi ve konsantrasyonu da bitki gelişimini yönlendirmede önemli bir rol oynar (Espinosa-Leal vd., 2018). Tüm bu faktörlerin ideal bir şekilde optimizasyonu ile araştırmacılar somatik embriyogenez veya organogenez gibi belirli gelişimsel süreçleri başlatabilirler.

Geleneksel *Agrobacterium* aracılı bitki dönüşümü ile ilişkilendirilen bazı sınırlamaları aşmak amacıyla plastit dönüşümü gibi alternatif dönüşüm protokolleri geliştirilmiştir (Filipecki ve Malepszy, 2006). Plastit dönüşümü, yabancı genlerin kloroplast genomuna tanıtılmasını içermektedir ve bu şekilde, transgenlerin yüksek düzeyde ifadesinin yapılması ve aynı zamanda gen susturmanın olmaması gibi avantajlar sunar. Bu yöntem, birçok sekonder metabolitin sentez yerinin kloroplastlar olması sebebiyle değerli bileşiklerin üretimi için özellikle kullanışlı olabilir.

Bu yöntemlere ek olarak, büyüme düzenleyicilerinin manipülasyonu bitki doku kültüründe önemli bir stratejidir. Kültür ortamındaki auxin ve

sitokin konsantrasyonlarını ayarlayarak, araştırmacılar hücre bölünme ve farklılaşmaları arasındaki dengeyi kontrol edebilir ve belirli bitki yapılarının oluşmasını sağlayabilirler (Phillips vd., 1994). Örneğın, daha yüksek bir sitokin konsantrasyonu sürgün oluşumunu teşvik ederken, daha yüksek bir auxin konsantrasyonu kök oluşumunu teşvik eder. Ayrıca, doku kültürü protokollerinin optimizasyonu ve belirli tekniklerin kullanımı, doku kültürü sırasında meydana gelebilecek genetik ve epigenetik değişiklikler olan somaklonal değişimin minimize edilmesine yardımcı olabilir (Machczyńska vd., 2014). Somaklonal değişiklik, yeniden üretilen bitkiler arasında fenotipik farklılıklara yol açabilir ve onların istikrarını ve performansını etkileyebilir. Araştırmacılar, kültür koşullarını dikkatlice seçerek ve manipüle ederek somaklonal değişikliğin oluşma olasılığını azaltabilir ve yeniden üretilen bitkilerin genetik sadakatinin sürdürülmesini garantileyebilirler (Rani ve Raina, 2000).

Genel olarak, bitki doku kültüründe bitki gelişimini kontrol etme ve yönlendirmek için kullanılan yöntemler ve stratejiler, genetik mühendislik teknikleri, kültür koşullarının optimize edilmesi, büyüme düzenleyicilerin manipülasyonu ve alternatif dönüşüm protokollerini içermektedir. Bu yaklaşımlar, araştırmacılara belirli genleri tanıtmak, istenen gelişimsel süreçleri başlatmak ve genetik ve epigenetik değişiklikleri en aza indirmek için olanak sağlar. Bu yöntemleri kullanarak uygulanmış bitki doku kültürleri ile de genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin üretimi, elit genotiplerin çoğaltılması ve değerli bileşiklerin standart ve uygun miktarlarda üretimi mümkün kılınmaktadır.

2.2. Bitki Doku Kültüründe Bitki Gelişiminin Yönlendirilmesinde Önemli Olan Konular

Bitki doku kültüründe bitki gelişimini yönlendirmenin kritik yönleri, genetik istikrar, kültür koşullarının optimize edilmesi, büyüme düzenleyicilerinin manipülasyonu ve uygun teknikler ve protokollerin kullanılması gibi faktörleri içerir. Bu faktörlerin dikkatlice ele alınması, başarılı bir bitki doku kültürü protokolünün sağlanmasına yardımcı olur.

Genetik istikrar, bitki doku kültürlerinde önemli ve mutlaka dikkate alınması gereken bir husustur. Genetik istikrarın kaybı, doku kültürü sırasında meydana gelebilir ve bu, yeniden üretilen bitkilerde genetik ve epigenetik değişikliklere yol açan somaklonal değişikliğe neden olabilir (Phillips vd., 1994). Genetik istikrarın sağlanması için uygun eksplantların dikkatlice seçilmesi, kültür koşullarının dikkatlice optimize edilmesi ve genetik değişikliklere neden olabilen stres faktörlerinin minimize edilmesi önemlidir (Bi vd., 2021). Ayrıca,

genetik istikrarın düzenli olarak moleküler işaretleyiciler ve diğer teknikler aracılığıyla izlenmesi de gereklidir.

Kültür koşullarının optimize edilmesi, bitki doku kültüründe bitki gelişimini yönlendirmek için kritik bir öneme sahiptir. Kültür ortamının bileşimi, sıcaklık, ışık yoğunluğu ve nem gibi faktörler, bitki hücrelerinin uygun büyüme ve gelişimini teşvik etmek için dikkatlice kontrol edilmelidir (Feng vd., 2022). Bu koşulları ayarlayarak, araştırmacılar bitki hücrelerinin istenen morfogenezini ve farklılaşmasını teşvik edebilirler. Büyüme düzenleyicilerinin manipülasyonu ile bitki gelişimini yönlendirme sürecinde, Oksinler ve sitokinler, sürgün veya kök oluşturma gibi belirli gelişimsel süreçleri başlatmak için kültür ortamına eklenabilir (Feng vd., 2022). Bu büyüme düzenleyicileri arasındaki denge, istenen organogenez veya embriyogenezin teşvik edilmesi için ayarlanabilir. Ayrıca, gibberellinler veya absisik asit gibi diğer büyüme düzenleyicilerinin kullanılması da bitki gelişiminin farklı aşamalarının düzenlenmesi için gereklidir (Feng vd., 2022). Kültür ortamında bitki gelişimini *in vitro* yönlendirmek için uygun tekniklerin ve protokollerin seçimi kritik öneme sahiptir. İstenen sonuç için somatik embriyogenez, organogenez veya kallus kültürü gibi farklı teknikler kullanılabilir (Chen vd., 2016). Uygun eksplantın seçimi, belirli kültür ortamlarının kullanılması ve biyoreaktörler veya üç boyutlu iskeleler gibi belirli *in vitro* koşulların uygulanması da bitki gelişimini yönlendirmede son derece etkilidir (Luo vd., 2015; Curtis, 2005). Ayrıca, gen ifadesi ve istikrar açısından avantajlar sunan plastit dönüşümü gibi alternatif dönüşüm protokollerinin kullanımı da mümkündür. Genetik istikrar, istenen özelliklerin korunması ve somaklonal değişimin minimize edilmesi için kritiktir. Espinosa-Leal vd. (2018) tarafından, gen düzenleme ve abiyotik stres uygulamalarının, bitki doku kültürlerinin verimliliğini ve etkililiğini arttırdığı gösterilmiştir (Espinosa-Leal vd., 2018; Filipecki ve Malepszy, 2006; Rojsanga vd., 2017). Kültür ortamındaki auxinlerin, sitokinlerin, gibberellinlerin ve/ya absisik asitin konsantrasyonlarını ayarlayarak, hücre bölünmesi ile farklılaşması arasındaki denge kontrol edilir ve belirli bitki yapılarının oluşması teşvik edilir (Xu vd., 2020; Ji vd., 2023).

Uygun eksplantların seçimi, bitki doku kültüründe bitki gelişimini yönlendirmek için hayati önem taşır. Farklı bitki parçaları, yapraklar, gövdeler veya embriyolar gibi farklı bitki parçaları eksplant olarak kullanılabilir (Bi vd., 2021). Eksplantın seçimi, istenen sonuca ve çalışılacak bitki türüne bağlıdır. Uygun eksplantların seçimi, kallus veya organojenik yapıların başarılı bir şekilde başlatılmasını, sürdürülmesini ve geliştirilmesini sağlar. Bu teknikler ve koşulların yanı sıra, uygun dönüşüm protokollerinin kullanımı, genetik istikrarın

izlenmesi ve kültür protokollerinin optimize edilmesi gibi diğer faktörler de bitki doku kültüründe bitki gelişimini yönlendirmede elzemdir (Sharma vd., 2017; Zebarjadi vd., 2018; Datta vd., 2018; Kavadikeri ve Rao, 2018). Bu faktörler, istenen özelliklere sahip bitkilerin başarılı bir şekilde yeniden üretilmesini sağlar ve üretilen bitkiler arasında genetik ve epigenetik değişiklikleri en aza indirir.

2.3. Bitki Gelişiminin Yönlendirilmesinde Oksin, Sitokin, Gibberellin ve Absisik Asit Kullanımına Genel Bakış

Oksinlerin en yaygın formu indol-3 asetik asit (IAA) olup, bunlar genel olarak hücrenin hacim ve boyut bakımından büyümesine ve genişlemesine neden olan maddelerdir. Hücrenin hacimsel olarak gelişmesi, uzaması, doku gelişimi ve kök oluşumu bu grup bitki büyüme düzenleyicileri (hormonlar) ile teşvik edilmektedir. Oksin bütün gelişmiş bitkiler tarafından sentezlenen bir bitki hormonu olup, hücre uzaması, kök başlangıcı ve apikal baskınlık gibi bitki büyüme ve gelişiminin çeşitli aşamalarında yer almaktadır (Tanaka vd., 2006). Kültür içinde, oksinler genellikle kallus oluşumunu, kök gelişimini ve somatik embriyogenezin başlatılmasını teşvik etmek için kullanılmaktadır (Růžička vd., 2009). Ayrıca, kültür sistemlerinde organ oluşumunun polaritesini ve yönünü etkileyebilirler (Viaene vd., 2014). Oksinlerin bitki dokusundaki dağılımı ve taşınması, PIN proteinleri gibi belirli oksin taşıyıcıları tarafından düzenlenir (Feng vd., 2022). Oksinler içerisinde IAA, doğal olarak oluşan tek oksin molekülüdür. Doğal oksinlerin biyosentez yeri genelde tepe tomurcukları ve yapraklardır ve bitkide tepeden aşağı doğru inerler, bu yüzden taşınması polar hareket olarak tanımlanmıştır. IAA, bitkilerin büyüme gösteren uç kısımlarında (koleoptil ucu, tomurcuk, yaprak ve kök ucu) oldukça fazladır. IAA dışında en yaygın bulunan oksinler; fenoksi asetik asit (FOAA), indol bütirik asit (IBA), parakloro fenoksi asetik asit (4-CPA), naftalin asetik asit (NAA), 2,4-D, fenil asetik asit (FAA), naftoksi asetik asit (NOAA), ve 2,4,5-triklorofenoksi asetik asit (2,4,5-T)'lerdir (Seçer, 1989; Kumlay ve Eryiğit, 2011). Oksinlerin bitkilerde büyüme ve gelişmeyi teşvik etme görevlerinin dışında diğer görevleri şu şekilde özetlenebilir: i) Hücrenin osmoz mekanizmasını artırarak, hücrenin su geçirgenliğini artırır, hücre çeperinin esnekleşmesini ve genişlemesini sağlayan özelleşmiş RNA ve proteinlerin sentezini teşvik ederek hücre büyümesinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Seçer, 1989; Kumlay ve Eryiğit, 2011). ii) Adventif kök gelişimini sağlamaktadır yani oksin uygulamasıyla, gövde boğumlarından köklendirme yapılması mümkündür. iii) Oksinler, yaprak ve meyve dökülmesinin engellenmesinde önemlidir. Özellikle sürekli yeşil

yapraklı kalması istenen süs bitkilerinin yetiştiriciliğinde ve hasat yapılmadan önce narenciye meyvelerinin dökülmesinin engellenmesinde oksin uygulanır. Diğer taraftan oksinin fazla uygulanması da tam ters bir etki göstererek, meyve dökülmesini hızlandırabilir. Oksin hormonunun bu etkisinden yararlanarak, elma veya zeytin gibi meyvelerde daha iyi meyve olgunlaşmasını sağlamak amacıyla, meyve seyrekleşmesini sağlamak için fazla oksin uygulaması yapıldığı bilinmektedir. iv) Bitkilerde oksin konsantrasyonu ile, tepe - uç kısımlarda büyümenin hızlı olduğu dönemlerde, alt kısımlardaki tomurcukların uyanmaları engellenmektedir. Buna apikal dominansi (tepe tomurcuğu baskısı) denir. v) Oksinler ışığa duyarlı oldukları için, ışıkla inaktif hale gelirler ve hücre büyümesini yavaşlatırlar. Bu yüzden de fototropizm olayına sebep olurlar (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Sitokinler içerisinde en önemlileri, kinetin ve zeatin olup, hücre bölünmesi, sürgün başlangıcı ve yaşlanmanın önlenmesinde rol oynarlar (Chen vd., 1985). Doku kültürü içinde, sitokinler, genellikle oksinlerle birlikte kullanılır ve sürgün oluşumunu, sürgün uzamasını ve farklılaşmamış kallusun çoğalmasını teşvik etmek için yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Hobbie ve Estelle, 1994). Oksinler ile sitokinler arasındaki denge, organojenezi yönlendirmek ve hücrelerin kaderini belirlemek için kritiktir (Cline, 1994). Sitokinler, diğer hormonların aksine, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan kinin yapısındaki organik bileşiklerdir (Kumlay ve Eryiğit, 2011). Oksinler, kök oluşumunu teşvik ederken, sitokinler sürgün oluşumunu teşvik ederler. Doku kültürü ortamlarında bitkilerin organlaşmasına ve oluşan organ taslaklarının gelişimine katkıda bulunurlar. Sitokinlerin diğer görevleri şu şekilde özetlenebilir: i) Sitokinler, yapraklarda nükleaz ve proteaz enzimlerinin sentezini engelleyerek DNA ve protein yıkımını önledikleri ve bu vesile ile de yaşlanmayı geciktirdikleri düşünülmektedir.

ii) Sitokinler dormansinin kırılmasında, karbonhidrat metabolizmasının hızlandırılmasında, apikal dormansi sürecinin engellenmesinde de etkilidir.

iii) Bir sitokin çeşidi olan Kinetin, protein ve nükleik asit sentezine devam ettirerek özellikle kesme çiçeklerin uzun süre dayanmasını sağlamaktadır. iv) Doku kültürü çalışmalarında oksin - sitokin dengesi ile bitkinin kök ve sürgün geliştirme zamanları kontrol edilebilmektedir. Mesela IAA+Kinetin uygulaması, mitoz bölünmenin artışına ve hücrelerin sürekli meristematik halde kalmasına sebep olur. Klorofil kaybı nedeniyle oluşan yapraklardaki sararmaların geciktirilmesi de sitokin hormonunun uygulamasıyla mümkün olur. v) Pürin tabanlı sitokinler, bitkinin meyve tutmasını desteklemek, daha iri meyvelerin oluşmasını sağlamak, marul ve maydanoz gibi sebzelerin ve kesme çiçeklerin

hasat sonrası raf ömrünün uzatılmasını sağlamak amacıyla da kullanılmaktadır (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Giberellinler (GAs), bitki büyüme ve gelişiminin çeşitli yönlerinde, sürgün uzaması, tohum çimlenmesi ve çiçeklenmede rol oynarlar (Dörffling, 2015). Doku kültürü içinde giberellinlerin dışsal uygulaması, belirli bitki türlerinde sürgün uzamasını teşvik edebilir ve çiçeklenmeyi başlatabilir (Ñorbová, 2021). Giberellinler, kültür sistemlerinde sekonder metabolitlerin üretimini ve adventif köklerin büyümesini etkileyebilir (Upadhyaya vd., 1991). Doku kültüründe giberellinlerin kullanımı, yeniden üretilen bitkilerin büyüme ve gelişimini artırabilir. Giberellinler, hücrenin boyut olarak gelişmesi, genişlemesi ve bölünmesinde, meristem oluşumunda etkili maddelerdir.

Absisik asit (ABA), diğer hormonların aksine bitki büyümesini engelleyen moleküller sınıfında yer almaktadır. ABA, tohum dinlenmesi, stomaların kapanması, RNA ve buna bağlı olarak protein sentezinin yavaşlatılması ve stres yanıtları dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynar (Luo vd., 2014). Kültür içinde, ABA sık sık eksplantlarda dinlenme oluşturmak veya sürgün uzamasını engellemek için kullanılır. ABA, doku kültürü sistemlerinde somatik embriyoların farklılaşmasını ve olgunlaşmasını da etkileyebilir (Luo vd., 2014). Doku kültüründe ABA uygulaması, bitki hücrelerinin gelişim süreçlerini ve yanıtlarını düzenleyebilir. ABA, Seskiterpen (Sesquiterpen) molekül yapısında bir bileşiktir. Oksin, gibberellin ve sitokin hormonları vb. gibi büyümeyi hızlandırıcı moleküllerin doğal antagonistidir. Bitkilerin tüm dokularında tüm yapılarında hemen hemen her zaman bulunur. Ancak ABA miktarı çevre koşullarından oldukça etkilenir ve çevre koşulları değiştikçe, ABA miktarı azalır yada artar. Buna bağlı olarak da fizyolojik olaylardaki etkisi ve sonuç olarak da bitkinin fizyolojik gelişim süreçleri de değişir. Genelde ABA miktarının, dormansi halindeki tohum ve tomurcuklarda yüksek miktarlarda bulunduğu ve bu sebeple de dormansiyi sürdürücü bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Ancak, yaprak gövde ve meyvelerde de bulunduğu unutulmamalıdır (Kumlay ve Eryiğit, 2011).

Neticede oksinler, sitokinler, gibberellinler ve absisik asit, bitki doku kültürlerinde bitki gelişimini yönlendirmede önemli roller oynamaktadırlar. Bu bitki hormonları, doku kültürlerinde kallus oluşumu, sürgün uzaması, kök başlatma ve somatik embriyogenez gibi belirli gelişimsel süreçleri tetiklemek için manipüle edilebilmektedir. Bu hormonlar arasındaki denge ve etkileşim, doku kültürü sistemlerinde hücrelerin kaderini ve farklılaşmasını belirlemek için hayati öneme sahiptir. Bu hormonların rollerini anlayarak ve manipüle ederek,

araştırmacılar doku kültüründe bitki gelişimini çeşitli uygulamalar için etkili bir şekilde yönlendirebilirler.

3. Bitki Gelişiminin Yönlendirilmesine Yönelik Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Çıkarımlar

Literatürde yer alan çalışmalar bir bütün olarak ele alındığında, bitki gelişiminin bitki doku kültürlerinde yönlendirilmesine yönelik yapılan çeşitli çalışmalar yeni ve farklı sonuçlara ulaşarak yeni gelecek perspektifleri oluşturmuştur. Mevcut halde varılan sonuçlar ve oluşan gelecek perspektifleri şu şekilde sıralanabilmektedir:

1. Biyoaktif bileşiklerin üretimi: Bitki doku kültürü yöntemleri, alkaloidler, flavonoidler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli biyoaktif bileşiklerin üretimi için başarılı bir şekilde kullanılmıştır ve kullanılmaya devam etmektedir (Espinosa-Leal vd., 2018). Bunlar, farmasötik ve nutrasötik endüstrileri için önemli ve gerekli bileşiklerdir.

2. Genomik ve epigenomik değişiklikler: Çalışmalar, doku kültürünün bitkilerde genomik ve epigenomik değişikliklere yol açabileceğini ve somaklonal varyasyona neden olabileceğini ortaya koymuştur (Neelakandan ve Wang, 2011). Bu değişiklikleri anlamak, genetik kararlılığı sürdürmek ve doku kültürü protokollerini optimize etmek için önemli gelecek perspektifleri doğurmaktadır.

3. Işık kaynaklarının etkisi: Ultra viyole (UV), floresan ve LED'ler gibi farklı ışık kaynaklarının, kültür ortamı içinde sekonder metabolitlerin üretimini etkilediği bulunmuştur (Hashim vd., 2021). Bu yüzden bitki doku kültürlerinde, ışık çeşidi, kalitesi ve miktarının düzenlenmesi, belirli bileşiklerin üretimini artırmak için manipüle edilebilir önemli özellikler olarak düşünülmelidir.

4. Diferansiyasyon kaybı ve totipotens: Bitki doku kültürü ile yapılan çalışmalarda, olgun bitki hücrelerinin diferansiye olma yetisini kaybedebildiğine ve totipotenslerini yeniden kazanabildiklerine dair çok fazla kanıt elde edilmiştir (Sugiyama, 2015). Bu kanıtlarda, bitkilerin yeniden üretimi ve genetik olarak aynı bitkilerin sürekli üretimi için önemli sonuçlar doğurmuştur.

5. Somaklonal varyasyon ve epigenetik değişiklikler: Doku kültürü kaynaklı somaklonal varyasyon ve epigenetik değişiklikler kapsamlı bir şekilde bitki doku kültürü çalışmalarında araştırılmıştır (Bednarek ve Orłowska, 2019). Bu tür varyasyonlar, yeniden üretilen bitkiler arasında fenotipik farklılıklara neden olabilir ve bunlar da, bitki iyileştirme ve genetik kararlılık açısından yeni perspektiflerin bulunmasının gerekliliğini doğurmuştur.

6. DNA metilasyon desenleri: DNA metilasyon desenlerinin doku kültürü sırasında değiştiği ve bu değişikliklerin gelişimsel olarak düzenlenebildiği gösterilmiştir (Ghosh vd., 2017). DNA metilasyonunun dinamiklerini anlamak, somaklonal varyasyonu kontrol etmek ve kültür protokollerini bu yönde optimize etmek açısından bu bulgular yeni çalışma alanları oluşturmuştur.

7. Doku kültürü koşullarının optimize edilmesi: Araştırmalar, doku kültürü koşullarını en ideal şekilde optimize etmeye odaklanmakta ve somaklonal varyasyonu en aza indirmek ve bitkilerin yeniden üretimini artırmak için çaba göstermektedir (Orłowska, 2021). Kültür ortamı bileşimi, büyüme düzenleyicileri ve eksplant seçimi gibi faktörler, doku kültürünün verimliliğini ve başarısını artırmak için her geçen gün daha iyi olacak şekilde optimize edilmekte ve bu da farklı kültür stratejilerinin geliştirilmesine yol açmaktadır.

8. Fosfoproteinler ve sinyal iletimi: Araştırmalar, özellikle somatik embriyogenez sırasında ve doku kültürü sırasında fosfoproteinlerde ve sinyal iletim yollarında değişikliklerin tanımlandığını göstermiştir (Aroonluk vd., 2019). Bu moleküler mekanizmaların anlaşılması, doku kültüründe bitki gelişiminin düzenlenmesine dair yeni anlayışlar sunabilmektedir.

9. Tarım ve çevre koruma alanındaki uygulamalar: Bitki doku kültürü yöntemleri, tarımda seçkin genotiplerin çoğaltılması, ürün iyileştirmesi ve germplazmanın korunması için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Twaij vd., 2020; Oseni vd., 2018). Bitki doku kültürü yöntemleri, istenen özelliklere sahip bitkilerin hızla çoğaltılması konularında ve tehlikede olan bitki türlerinin korunması konularında yeni olanaklar sunmuştur.

10. İkincil metabolitlerin üretimi ve tasarımı: Doku kültürü teknikleri, bitkilerde ikincil metabolit üretimini tasarlamak için de kullanılmıştır (Chandra ve Chandra, 2011). Bu yeni yaklaşımlar, biyoaktif maddeler ve lezzet verici maddeler gibi bitki yetiştiriciliğinde değerli bileşiklerin üretimi için önemli yeni imkanlar sunmuştur.

Özetle, bitki doku kültüründe bitki gelişimini yönlendirmeye dair yapılan çalışmalar, öncelikle biyoaktif bileşiklerin üretimi, genomik ve epigenomik değişikliklerin tanımlanması ve kontrol edilmesi, doku kültürü koşullarının en ekonomik ve hızlı üretimi sağlayacak şekilde optimize edilmesi vb. gibi bir çok alanda yarar sağlamış ve yeniliklerin geliştirilmesine vesile olmuştur. Aynı zamanda tarım uygulamalarında verimlerin artırılmasına, koruma altına alınması gereken türlerin hızlı ve etkili bir şekilde korunmasına yönelik çabaların ve yöntemlerin geliştirilmesine de büyük ölçüde yarar sağlamıştır.

Ayrıca bitki doku kültürü ile bitki gelişiminin kontrol edilmesine yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen tüm bulgular, bitki gelişiminin çok daha iyi anlaşılmasına, metabolik, fizyolojik ve genetik süreçlerin ve yolların keşfedilmesine ve daha iyi öğrenilmesine ve elbetteki ürün iyileştirmesi ve yeni ürün geliştirilmesi alanlarına hizmet etmiştir. Bitki doku kültürü yöntemleri ve bitki gelişiminin yönlendirilmesi ile ilgili yapılan tüm çalışmalar, bitkisel üretim ve değerli bileşiklerin üretimi konularında vazgeçilmez araçlar sunmaktadır.

4. Sonuç

Sonuç olarak, bitki doku kültüründe bitki gelişimini yönlendirmek, genetik stabilite, kültür koşulları, büyüme düzenleyicileri ve uygun tekniklerin manipülasyonunu içeren karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Genetik mühendislik, kültür koşullarının optimize edilmesi ve büyüme düzenleyicilerinin manipülasyonu gibi tekniklerin kullanılmasıyla, araştırmacılar bitki gelişimini doku kültüründe kontrol etme ve yönlendirme konusunda önemli ilerlemeler kaydetmişlerdir. Bu gelişmeler, biyoaktif bileşiklerin üretimi, genomik ve epigenomik değişikliklerin anlaşılması ve doku kültürü protokollerinin optimize edilmesi de dahil olmak üzere dikkate değer sonuçlara yol açmıştır. Ayrıca, oksinlerin, sitokinlerin, gibberellinlerin ve absisik asidin bitki gelişimini yönlendirmedeki rolüne ışık tutan çalışmalar, özellikle belirli gelişimsel süreçleri düzenleme açısından önemlerini vurgulamıştır. Tarım ve bitki koruma alanlarında doku kültürü tekniklerinin uygulanması, ürün iyileştirmesi, germplasm muhafazası ve değerli bileşiklerin üretimi için yeni potansiyel fırsatlar göstermiştir. Bununla birlikte, somaklonal varyasyon gibi zorluklar ve doku kültürü protokollerinin daha fazla optimize edilmesinin gerekliliği gibi bazı eksikliklerle birlikte bitki biyoteknolojisi ve doku kültürü yöntemlerindeki çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Genel olarak, bitki doku kültüründe bitki gelişimini yönlendirmek, çeşitli uygulamalar için büyük vaatler taşımakta olup, bitki biyoteknoloji alanında aktif araştırma ve yeniliklerin devam ettiği bir alan olarak önemini korumaktadır.

Kaynaklar

Akshatha, M.D., Kavadikeri, S., Rao, N.N. (2018). In vitro micropropagation and antioxidant assay in *Colocasia esculenta*. Plant Tissue Cult Biotechnol 28(2):183-190.

Aroonluk, S., Roytrakul, S., & Jantasuriyarat, C. (2019). Identification and characterization of phosphoproteins in somatic embryogenesis acquisition during oil palm tissue culture. *Plants*, 9(1), 36. <https://doi.org/10.3390/plants9010036>

Bednarek, P. and Orłowska, R. (2019). Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (Pctoc)*, 140(2), 245-257. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01724-1>

Bi, W., Shukla, M., Ren, L., Hamborg, Z., Blystad, D., Saxena, P., ... & Wang, Q. (2021). Epigenetic and genetic integrity, metabolic stability, and field performance of cryopreserved plants. *Plants*, 10(9), 1889. <https://doi.org/10.3390/plants10091889>

Chandra, S. and Chandra, R. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 371-395. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9210-8>

Chen, C., Ertl, J., Leisner, S., & Chang, C. (1985). Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. *Plant Physiology*, 78(3), 510-513. <https://doi.org/10.1104/pp.78.3.510>

Chen, S., Yu, H., Luo, H., Wu, Q., Li, C., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese Medicine*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13020-016-0108-7>

Cline, M. (1994). The role of hormones in apical dominance. new approaches to an old problem in plant development. *Physiologia Plantarum*, 90(1), 230-237. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1994.900133.x>

Curtis, W. (2005). Application of bioreactor design principles to plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (Pctoc)*, 81(3), 255-264. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6646-1>

Datta, A., Zahara, M., Boonkorkaew, P., & Mishra, A. (2018). Effect of plant growth regulators on the growth and direct shoot formation from leaf explants of the hybrid phalaenopsis 'pink'. *Acta Agriculturae Slovenica*, 111(1). <https://doi.org/10.14720/aas.2018.111.1.01>

Debnath, M., Malik, C., & Bisen, P. (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(1), 33-49. <https://doi.org/10.2174/138920106775789638>

Delesalle, V. and Mazer, S. (2002). The neighborhood matters: effects of neighbor number and sibling (or kin) competition on floral traits in *spergularia marina* (caryophyllaceae). *Evolution*, 56(12), 2406. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2002\)056\[2406:tnmeon\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2002)056[2406:tnmeon]2.0.co;2)

Dörffling, K. (2015). The discovery of abscisic acid: a retrospect. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 795-808. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9525-6>

Espinosa-Leal, C., Puente-Garza, C., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>

Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>

Feng, Y., Bayaer, E., & Qi, Y. (2022). Advances in the biological functions of auxin transporters in rice. *Agriculture*, 12(7), 989. <https://doi.org/10.3390/agriculture12070989>

Filipecki, M. and Malepszy, S. (2006). Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *Journal of Applied Genetics*, 47(4), 277-286. <https://doi.org/10.1007/bf03194637>

Franklin, K. and Quail, P. (2009). Phytochrome functions in arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 11-24. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp304>

Gelvin, S. (2003). agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>

Ghosh, A., Igamberdiev, A., & Debnath, S. (2017). Detection of dna methylation pattern in thidiazuron-induced blueberry callus using methylation-sensitive amplification polymorphism. *Biologia Plantarum*, 61(3), 511-519. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0678-3>

Hakim, L. and Dalimunthe, A. (2022). Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant in vitro propagation: a comprehensive review. *Iop Conference Series Earth and Environmental Science*, 1115(1), 012051. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1115/1/012051>

Han, Q., Bartels, A., Cheng, X., Meyer, A., An, Y., Hsieh, T., ... & Xiao, W. (2019). Epigenetics regulates reproductive development in plants. *Plants*, 8(12), 564. <https://doi.org/10.3390/plants8120564>

Hashim, M., Ahmad, B., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B., & Anjum, S. (2021). Comparative effects of different light sources on the production of key secondary metabolites in plants in vitro cultures. *Plants*, 10(8), 1521. <https://doi.org/10.3390/plants10081521>

Hobbie, L. and Estelle, M. (1994). Genetic approaches to auxin action. *Plant Cell & Environment*, 17(5), 525-540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb00147.x>

Jayusman, L., Hakim, L., Dalimunthe, A. (2022). Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant in vitro propagation: a comprehensive review. 4th International Conference on Natural Resources and Technology, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 1115 (2022) 012051 doi:10.1088/1755-1315/1115/1/012051

Ji, B., Xuan, L., Zhang, Y., Mu, W., Paek, K., Park, S., ... & Li, X. (2023). Application of data modeling, instrument engineering and nanomaterials in selected medid the scientific recinal plant tissue culture. *Plants*, 12(7), 1505. <https://doi.org/10.3390/plants12071505>

Kavadikeri, S. and Rao, N. (2018). In vitro micropropagation and antioxidant assay in colocasia esculenta. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 28(2), 183-190. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v28i2.39677>

Kumlay, A.M., Eryiğit, T. (2011). Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.* 1(2): 47-56.

Lange, M. and Lange, T. (2006). Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development. *Plant Biology*, 8(3), 281-290. <https://doi.org/10.1055/s-2006-923882>

Luo, C., Wightman, R., Meyerowitz, E., & Smoukov, S. (2015). A 3-dimensional fibre scaffold as an investigative tool for studying the morphogenesis of isolated plant cells. *BMC Plant Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0581-7>

Luo, X., Chen, Z., Gao, J., & Gong, Z. (2014). Abscisic acid inhibits root growth in arabidopsis through ethylene biosynthesis. *The Plant Journal*, 79(1), 44-55. <https://doi.org/10.1111/tpj.12534>

Machezyńska, J., Orłowska, R., Zimny, J., & Bednarek, P. (2014). Extended metaflp approach in studies of tissue culture induced variation (tciv) in triticale. *Molecular Breeding*, 34(3), 845-854. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0079-2>

Maher, M., Nasti, R., Vollbrecht, M., Starker, C., Clark, M., & Voytas, D. (2019). Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nature Biotechnology*, 38(1), 84-89. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2>

McIntyre, G. (2001). Control of plant development by limiting factors: a nutritional perspective. *Physiologia Plantarum*, 113(2), 165-175. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130203.x>

Neelakandan, A. and Wang, K. (2011). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports*, 31(4), 597-620. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1202-z>

Nisa, Z. (2018). Micropropagation through apical shoot explants and morphogenic potential of different explants of *saussurea lappa*: an endangered medicinal plant. *Pure and Applied Biology*, 7(4). <https://doi.org/10.19045/bspab.2018.700220>

Ňorbová, M. (2021). Phytohormones. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition Health and Life Quality*, 5(2). <https://doi.org/10.15414/ainhlq.2021.0023>

Orłowska, R. (2021). Barley somatic embryogenesis-an attempt to modify variation induced in tissue culture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s40709-021-00138-5>

Oseni, O., Pande, V., & Nailwal, T. (2018). A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 3778-3786. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.438>

Phillips, R., Kaeppeler, S., & Olhoft, P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls.. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5222-5226. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5222>

Pires, N., Yi, K., Breuninger, H., Catarino, B., Menand, B., & Dolan, L. (2013). Recruitment and remodeling of an ancient gene regulatory network during land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9571-9576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305457110>

Rani, V. and Raina, S. (2000). Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(5), 319-330. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0059-6>

Rockwell, N. and Lagarias, J. (2017). Phytochrome diversification in cyanobacteria and eukaryotic algae. *Current Opinion in Plant Biology*, 37, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.003>

Rodriguez, R., Freeman, D., McArthur, E., Kim, Y., & Redman, R. (2009). Symbiotic regulation of plant growth, development and reproduction. *Communicative & Integrative Biology*, 2(2), 141-143. <https://doi.org/10.4161/cib.7821>

Rojsanga, P., Bunsupa, S., Brantner, A., & Sithisarn, P. (2017). Comparative phytochemical profiling and in vitro antioxidant activity of extracts from raw materials, tissue-cultured plants, and callus of *oroxylum indicum* (L.) Vent. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/6853212>

Růžička, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., ... & Benková, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4284-4289. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900060106>

Seçer, M. (1989). Doğal büyüme düzenleyicilerin (bitkisel hormonların) bitkilerdeki fizyolojik etkileri ve bu alanda yapılan araştırmalar. *Derim*, 6: (3),109-124.

Sharma, M., Kumari, A., & Mahant, E. (2017). Micropropagation and analysis of phytochemical profile of tissue culture grown *plantago ovata* forsk.. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(4), 202. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i4.16532>

Sugiyama, M. (2015). Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *Journal of Plant Research*, 128(3), 349-359. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0706-y>

Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P., & Friml, J. (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(23), 2738-2754. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6116-5>

Tripathi, S., Hoang, Q., Han, Y., & Kim, J. (2019). Regulation of photomorphogenic development by plant phytochromes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6165. <https://doi.org/10.3390/ijms20246165>

Twajj, B., Jazar, Z., & Hasan, N. (2020). Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. *International Journal of Plant Biology*, 11(1), 8385. <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8385>

Upadhyaya, N., Parker, C., Letham, D., Scott, K., & Dart, P. (1991). Evidence for cytokinin involvement in rhizobium (ic3342)-induced leaf curl syndrome of pigeonpea (*cajanus cajan* millsp.). *Plant Physiology*, 95(4), 1019-1025. <https://doi.org/10.1104/pp.95.4.1019>

Viaene, T., Landberg, K., Thelander, M., Medvecká, E., Pederson, E., Feraru, E., ... & Friml, J. (2014). Directional auxin transport mechanisms in early diverging land plants. *Current Biology*, 24(23), 2786-2791. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.056>

Wagner, D. (2003). Chromatin regulation of plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/s1369526602000079>

Xu, B., Rina, W., Tang, F., Gao, C., Gao, X., & Shi, F. (2020). Haploid culture and double haploid induction in medicago sativa l. cv. xinjiangdaye. *Legume Research - An International Journal*, (Of). <https://doi.org/10.18805/lr-575>

Yruela, I. (2015). Plant development regulation: overview and perspectives. *Journal of Plant Physiology*, 182, 62-78. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.05.006>

Zebarjadi, A., Kazem, S., & Kahrizi, D. (2018). Cell dedifferentiation and multiplication of burdock (*arctium lappa*) as a medicinal plant. *Cellular and Molecular Biology*, 64(7), 92-96. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.7.16>.

BÖLÜM VI

BİTKİLERDE GELİŞMİŞ EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ

Advanced Extraction Techniques in Plants

FERDA ESER

(Doç. Dr.), Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu,
Mülkiyet Koruma ve Güvenlik Bölümü, Amasya, Türkiye.

E-mail: ferda.eser@amasya.edu.tr

ORCID: 0000-0003-1753-6349

Özet

Bitki biyoteknolojisi, bitki çeşitlerinin geliştirilmesi, biyoteknolojik ürünlerin üretilmesi, ürün kalitesinin artırılması, herbisitlere dayanıklı bitki türlerinin geliştirilmesi ve gıdaların raf ömrünün uzatılması gibi çok geniş kullanım alanına sahip bir alandır. En basit bitki hücresi bile çok karmaşık yapıya sahip olup çok sayıda farklı molekül içerirler. Bitkilerde istenilen molekül grubunu hücrenin diğer kısımlarından ayırmak için kullanılan ekstraksiyon işleminin etkili ve verimli gerçekleştirilebilmesi için ekstraksiyon yönteminin seçimi önem arz etmektedir. Sekonder metabolit eldesinde perkolasyon, soxhlet ekstraksiyonu, maserasyon gibi geleneksel yöntemler yaygın olarak kullanılsa da son yıllarda gelişen teknoloji ile beraber ileri ekstraksiyon teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu bölümde ultrasonik destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, enzim destekli ekstraksiyon, darbeli elektriksel alan ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu tekniklerinin temel prensipleri, kullanım alanları, avantaj ve dezavantajları ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: ekstraksiyon, sekonder metabolit, gelişmiş teknikler

Abstract

Plant biotechnology is a field with a wide range of uses, such as the development of plant varieties, the production of biotechnological products, the improvement of product quality, the development of herbicide-resistant plant species, and the extension of the shelf life of foods. Even the simplest plant cell has a very complex structure and contains many different molecules. The selection of the extraction method is important in order to carry out the effective and efficient extraction process, which is used to separate the desired molecule group from the other parts of the cell in plants. Although traditional methods such as percolation, soxhlet extraction, maceration are widely used in secondary metabolite extraction, advanced extraction techniques have been used with the developing technology in recent years. In this section, the basic principles, usage areas, advantages and disadvantages of ultrasonic assisted extraction, microwave assisted extraction, supercritical fluid extraction, enzyme assisted extraction, pulsed electric field extraction and pressurized liquid extraction techniques are discussed.

Keywords: extraction, secondary metabolite, advanced techniques

1. Giriş

Primer ve sekonder metabolitler bitkilerin biyolojik sistemini oluşturur. Karbonhidratlar, aminositler ve proteinler bitki dokularının büyük oranda gelişme ve olgunlaşma evrelerinde kullanılan birincil metabolitlerdir. Sekonder metabolitler ise bitkilerin hayatta kalması ve doğal koşulların üstesinden gelmesi için gelişim döngüsü sırasında üretilir (Azmir vd., 2013). Bitkilerin tedavi edici özellikleri ve yaygın biyolojik aktiviteleri büyük oranda sekonder metabolit içeriklerine bağlıdır. Sekonder metabolitlerin miktarları ve çeşitleri, aynı bitkinin popülasyonları arasında da farklılık göstermektedir. Bu bileşikler, bitkilerin biyotik ve abiyotik strese karşı korunmasında etkin rol oynamaktadırlar.

Bitki sekonder metabolitleri ağrı kesici, kas gevşetici, yatıştırıcı, antimikrobiyal, insektisit gibi farklı özelliklere sahip olup çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Tıpta kullanılan atropin, morfin, papaverin, nikotin, rosmarinik asit vb. bitkilerden üretilen yaygın sekonder metabolitlerdendir. Bitki sekonder metabolitlerinin izolasyonu, saflaştırılması, kimyasal yapılarının tayini, hücre kültürü çalışmaları, genetik kodlarının belirlenmesi gibi konularda yapılan çalışmalar her geçen gün artmasına rağmen yeterli seviyede değildir (Oskay ve Oksay, 2009).

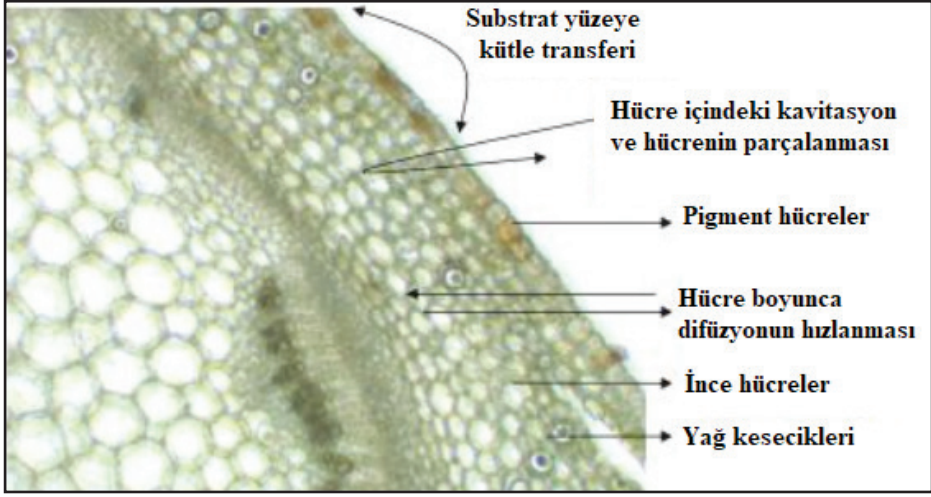
Ekstraksiyon (özütleme), bitki ve hayvan dokularından ayrılması istenen bileşiklerin elde edilmesinde kullanılan önemli bir basamaktır. Ekstraksiyon işlemi, gıda, tarım, kozmetik, ilaç, modern ve alternatif tıp vb. birçok alanda yaygın olarak kullanılan bir prosestir. Bitkiler, yararlı fitokimyasalları düşük oranda içerdiğinden, istenilen bileşiğin yüksek miktarda elde edilmesi ekstraksiyon verimliliği açısından önem arz etmektedir. Son yıllarda, modern ve yeşil teknolojilerin daha önemli hale gelmesi; yüksek seçicilik, daha az çözücü, zaman ve enerji gereksinimi gibi avantajları da beraberinde getirmektedir (Zhang vd., 2018). Bu bağlamda, bitkilerden sekonder metabolitlerin ekstraksiyonunda kullanılan gelişmiş teknikler; çalışma prensipleri, kullanım alanları, avantaj ve dezavantajları bakımından ele alınmıştır.

2. Bitki Biyoteknolojisinde Kullanılan Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri

2.1. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon (*Ultrasound Assisted Extraction, UAE*)

Ses dalgalarının saniyede 20000 ve üzerinde titreşmeleri ile üretilen ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) yönteminde numuneye 20 kHz üzerindeki frekanslarda akustik titreşimler uygulanır. Uygulanan titreşimlerin sıvı içerisinden geçmesiyle kavitasyon adı verilen boşluk oluşumu meydana gelir. Bunun sonucu olarak sıvı içerisinde çok sayıda kabarcık meydana gelir ve katı maddeleri mekanik olarak sarsarak partiküllerin kopması sağlanır. Ses dalgaları genel olarak çözücü ve katı madde arasında etkili temas kurar (Büyüktuncel, 2012).

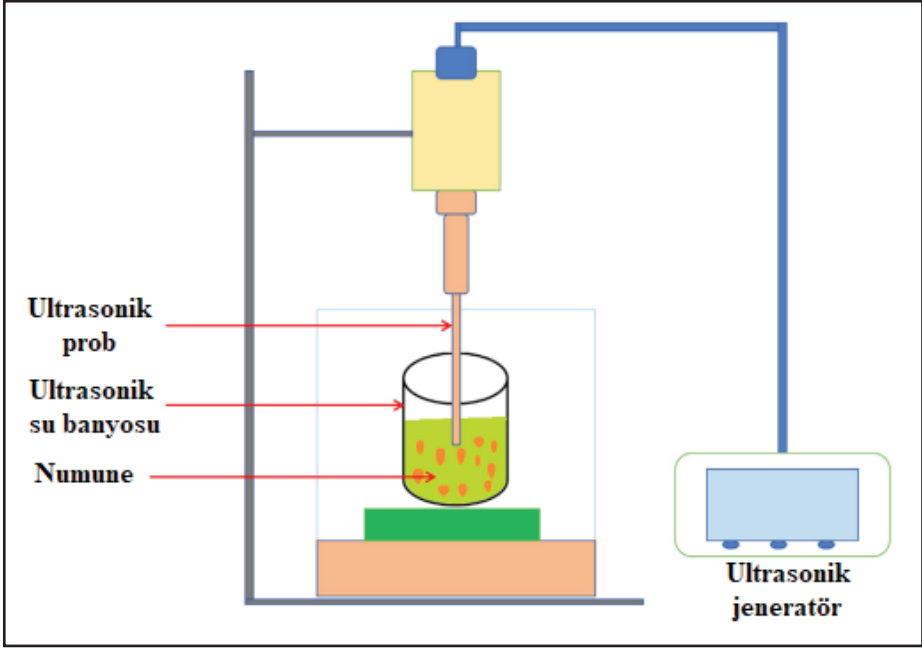
Ekstraksiyon süresi, numune miktarı, çözücünün cinsi, sıcaklık, frekans gibi birçok parametre UAE sisteminin verimliliğini etkilediğinden, ekstraksiyon işleminden önce optimizasyon çalışmasına gerek duyulmaktadır (Vinatoru, 2001).



Şekil 1. Hücre duvarının kavitasyon ile parçalanması ve çözücünün hücreye nüfuzu (Blake ve Gibson, 1987)

UAE, gıda teknolojisi, arıtma, nanoteknoloji, elektrokimya, farmasötik gibi birçok alanda kullanılan basit ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Bu yöntemde ses dalgaları bitki hücrelerini parçalayarak difüzyonun ve ozmotik prosesin hızlanmasını sağlamaktadır. Bunun sonucu olarak hem ekstraksiyon hızı hem de ekstraksiyon verimi artmaktadır. Ultrasonik ekstraksiyonda öncelikle çözücünün bitki hücrelerine difüzyon hızlanması ve bu sayede hücreyi şişirmesi gerçekleşir. Daha sonra hücre duvarı parçalanarak hücre içinde bulunan maddelerin çözücü içerisine geçmesi sağlanır (Şekil 1).

Bitkilerden çeşitli doğal bileşiklerin ekstraksiyonunda UAE yönteminin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu ekstraksiyon yöntemi kompleks cihazlar gerektirmediğinden ve nispeten düşük maliyetli olduğundan bitki ekstraksiyonunda yaygın olarak tercih edilmektedir. Basit bir UAE sisteminin şematik gösterimi Şekil 2’de verilmiştir.

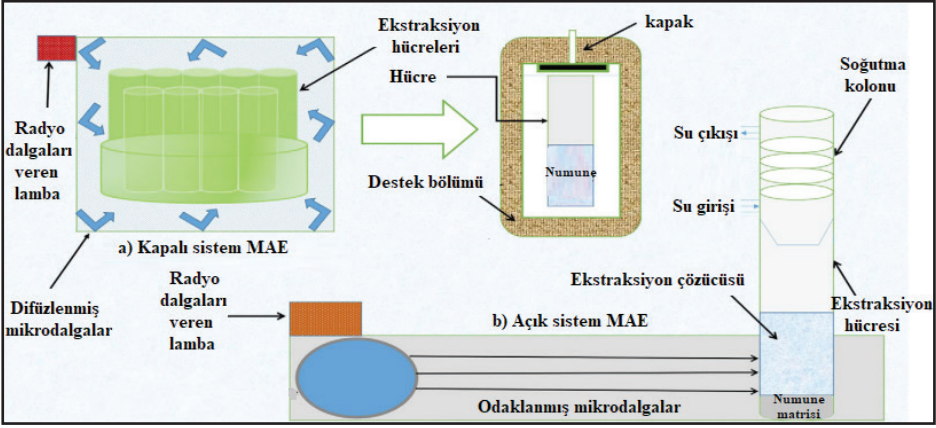


Şekil 2. Basit UAE sisteminin şematik gösterimi (Farooq vd., 2022)

2.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (Microwave Assisted Extraction, MAE)

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), bitkisel materyaller de dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan biyoaktif kimyasal maddeleri ekstrakte etmek için kullanılan bir yöntemdir. Mikrodalga, yüksek frekanslı elektromanyetik dalga olup, mikrodalga enerjisini kullanarak ısıtma prensibine dayanır. MAE yönteminde temel prensip iyon iletimi ve dipol rotasyon yolu ile molekülün mikrodalga etkisine maruz bırakılmasıdır. İyonik iletim sonucunda çözelti ısınır. Ekstraksiyon verimini arttırmak için çözücü seçimi oldukça önemlidir.

Ekstraksiyon prosesi genellikle kapalı kapta gerçekleştirildiğinden basınç artışı ile birlikte çözücünün kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara ısıtılması sağlanır. Genel olarak iki çeşit MAE sistemi vardır: Kapalı sistem MAE ve açık sistem MAE (Şekil 3). Kapalı sistem MAE sıcaklık kontrollü ve basınç altında gerçekleştirilirken, açık sistem MAE atmosfer sıcaklığında gerçekleştirilir. Kapalı kap sistemi, özellikle uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılır.



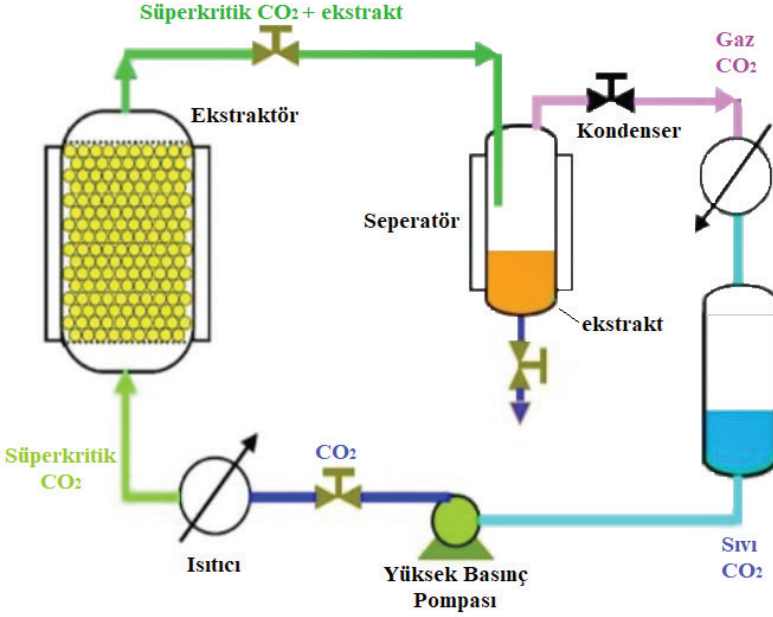
Şekil 3. MAE sisteminin çalışma prensibi ve mekanizması a) Kapalı sistem MAE b) Açık sistem MAE (Ameer vd., 2017)

MAE süreci, numunenin ekstraksiyon hücresine yüklenmesi ile başlar. Mikrodalga ışımanın uygulanmasıyla çözücünün ayarlanan sıcaklığa ısıtılması için ön ekstraksiyon işlemi başlatılır. İstenilen sıcaklığa ulaşmak için gereken süre numune sayısına ve numune türüne bağlıdır. Genellikle ısıtma işlemi 2 dakikadan daha az zamanda gerçekleşir. Daha sonra numune ısıtılarak 10-30 dak. aralığında ekstraksiyon süreci tamamlanır (Eskilsson ve Björklund, 2000).

Biyoaktif maddelerin hızlı bir şekilde ekstraksiyonunu sağlayan MAE, bitkilerden terpen, alkaloid, uçucu yağ, protein gibi sekonder metabolitlerin elde edilmesinde kullanılan etkili bir yöntemdir (Prandi vd., 2022; Zghaibi vd., 2019; Büyüktuncel, 2012).

2.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE), çözücü olarak CO₂ gibi süperkritik bir akışkanın kullanıldığı, yüksek basınçla maddenin akışkan içerisinde çözünmesinin sağlanarak ürünün akışkandan ayrılması için basıncın azaltıldığı bir ekstraksiyon yöntemidir (Şekil 4). Süperkritik akışkan madde, sıvı ve gaz madde arasında bulunan maddenin bir ara halidir. Yüksek yoğunluğa sahip olması, çözünürlüğü arttırdığından ekstraksiyon verimi de artar.



Şekil 4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun şematik görünümü (URL 1)

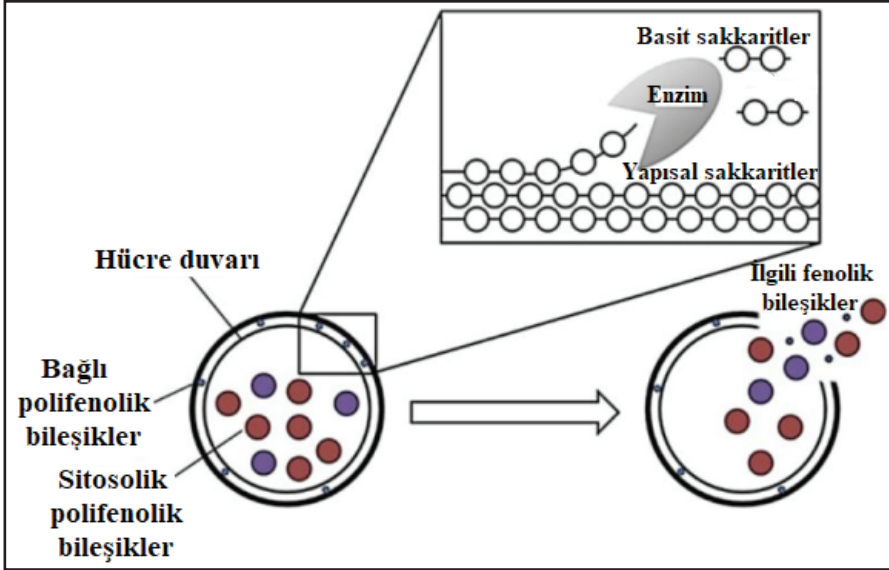
Genel olarak, basit bir SFE prosesi, ekstraksiyon ve ayırma ana basamaklarından oluşur. Ekstraksiyon için sistem ayarlamalarına bağlı olarak katı veya sıvı numuneler kullanılabilir ancak katı numuneler sıvı numunelere nazaran daha çok kullanılır. Katı numunelerle çalışılırken kolon öncelikle kurutulmuş ve öğütülmüş örneklerle doldurulur, basınçlı süperkritik çözücü kolon boyunca akar ve katı matristen ekstrakte edilebilir bileşikler çözer. Çözünmüş bileşikler difüzyon yoluyla ayırıcıya (separatör) taşınır, ekstrakt ve çözücü karışımları burada basınç düşürücü, sıcaklık artırıcı veya her ikisi yardımıyla ayrılır (Pereira ve Meireles, 2010; Schuster vd., 2018).

SFE, gıda, farmakoloji, polimer çevre analizleri gibi alanlarda daha yaygın kullanılmakla birlikte son yıllarda bitki biyoteknolojisi alanında da kullanılmaya başlanmıştır. Biyoteknoloji ve ilgili alanlarda SFE teknolojisinin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar çevre örneklerinden organik kirliliklerin ekstraksiyonu (Bielská vd., 2013; Yang vd., 2008; Hallgren vd., 2006; Cajthaml ve Šašek, 2005), gıda (Sangeetha vd., 2023; Yu vd., 2023; Icen ve Guru, 2009), hayvan dokusu ekstraksiyonu (Létisse vd., 2010; Sahena vd., 2010), bitkilerden doğal ürünlerin izolasyonu (Tyśkiewicz vd., 2018; Abdelmohsen vd., 2022), farmasötik uygulamalar (Kapoor vd., 2022; Zielinski vd., 2021), genetiği değiştirilmiş organizmalar (Bernal vd., 2008) gibi alanlarda yoğunlaşmıştır.

2.4. Enzim Destekli Ekstraksiyon (Enzyme Assisted Extraction, EAE)

Bitki matrisinde bulunan bazı fitokimyasallar, sitoplazmada dağınık halde bulunduğundan bazı bileşiklerin ekstraksiyonu geleneksel çözücü ekstraksiyonu ile gerçekleştirilemez. Bu durum, polisakkarit-lignin ağında tutulan bileşiklerin hidrofobik ve hidrojen bağlarına erişilememesinden kaynaklanır. Enzim destekli ekstraksiyon (EAE), bağlı bileşiklerin serbest kalmasında kullanılan etkili bir ekstraksiyon tekniğidir. EAE’de, ekstraksiyon esnasında α -amilaz, selülaz, pektinaz gibi spesifik enzimlerin ilavesi, hücre duvarını parçalayarak polisakkarit ve lipit bileşenlerinin hidrolizini sağlamaktadır (Azmir vd., 2013; Şengül ve Topdaş, 2019).

EAE’nin temel prensibi, bitki hücre duvarının, hücre içi bileşenleri serbest bırakmak için optimum koşullar altında, katalizör olarak enzim kullanımı ile hidroliz edilerek parçalanmasıdır (Şekil 5). Bitki hücre duvarı enzimin aktif bölgesine bağlanır. Bu, enzimin şeklini değiştirmesine ve substratın aktif bölgesine yerleşmesine neden olur, böylece enzim-substrat arasında maksimum etkileşim sağlanır. Enzimin şeklindeki değişiklik, hücre duvarındaki bağların kırılmasına ve aktif bileşenlerin dışarı çıkmasına neden olur (Sheldon ve Van Pelt, 2013). Enzim bileşimi ve konsantrasyonu, bitkinin partikül büyüklüğü, hidroliz süresi, pH, sıcaklık, EAE’yi etkileyen önemli parametrelerdir (Dunford ve Dunford, 2004; Muniglia vd., 2014).



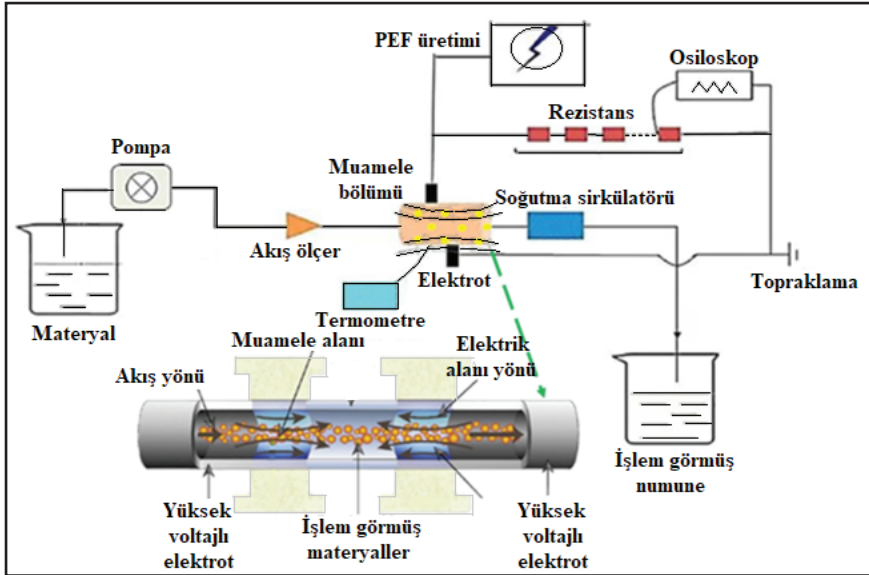
Şekil 5. Bitki hücre duvarlarının enzimatik bozulması ve biyoaktif bileşiklerin salınımı (Gligor, 2019).

Bitki biyoteknolojisinde EAE'nin kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çalışmalar özellikle gıda olarak da kullanılabilen bitkilerden biyokaktif bileşenlerin enzim yardımı ile ekstrakte edilmesi, ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu ve diğer ekstraksiyon yöntemleri ile kıyaslanması üzerine yoğunlaşmıştır (Boulila vd., 2015; Charoensiddhi vd., 2016; Chen vd., 2014; Deng vd., 2014; Le ve Le, 2012).

2.5. Darbeli Elektriksel Alan (Pulsed Electric Field, PEF) Ekstraksiyonu

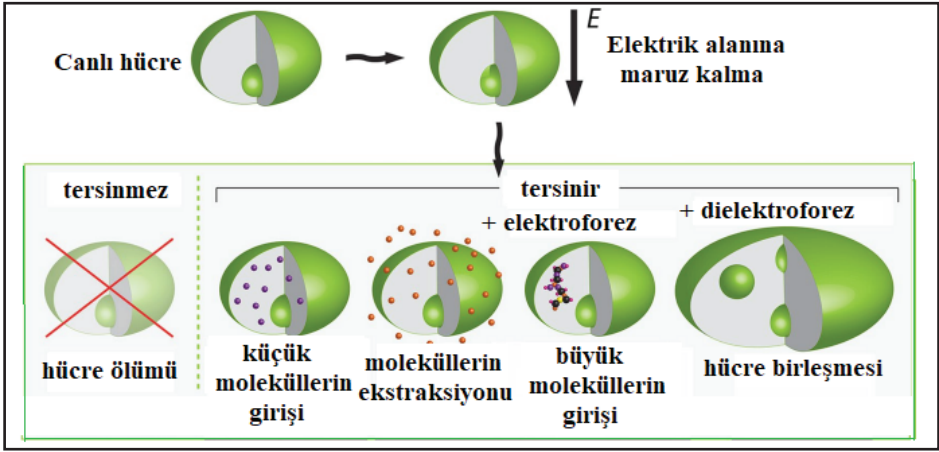
Darbeleri elektriksel alan (PEF) yöntemi, bitki materyalinden çeşitli bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılan etkili tekniklerden birisidir. Bitki materyalinin darbeleri elektriksel alana maruz bırakılması, yüksek voltajlı kısa darbelerle elektroporasyon yoluyla hücre zarını bozar ve hücre içi bileşenlerin açığa çıkmasını sağlar. PEF yöntemi, bitki materyalinden yüksek verim ve saflığa sahip ekstraktlar elde edilmesinde etkili olarak kullanılır (Farooq vd., 2022).

PEF ekstraksiyon verimliliği, bitki türü, elektrik darbelerinin sayısı, süresi, darbe dalga formu, elektriksel alan şiddeti, ortamın iletkenliği ve iyonik kuvveti gibi faktörlere bağlıdır.



Şekil 6. PEF sisteminin şematik diyagramı (Fan vd., 2022)

Genel olarak bir PEF ünitesinde yüksek voltajlı jeneratör, muamele bölümü (uygulama odacığı), akış kontrol sistemi, kontrol ve monitör aygıtları yer almaktadır (Şekil 6).



Şekil 7. Darbeli elektriksel alana maruz kalan hücrelerin şematik gösterimi (Mahnič-Kalamiza vd., 2014)

Hücrelerin elektriksel alana maruz bırakılması elektroporasyondan dolayı hücre zarı geçirgenliğinin artmasını sağlar. Böylece, biyorafinerilerde hücrelerin öldürülmesinde, küçük ve büyük moleküllerin hücre içine girişlerinde ve ekstraksiyonunda kullanımına olanak sağlar (Şekil 7).

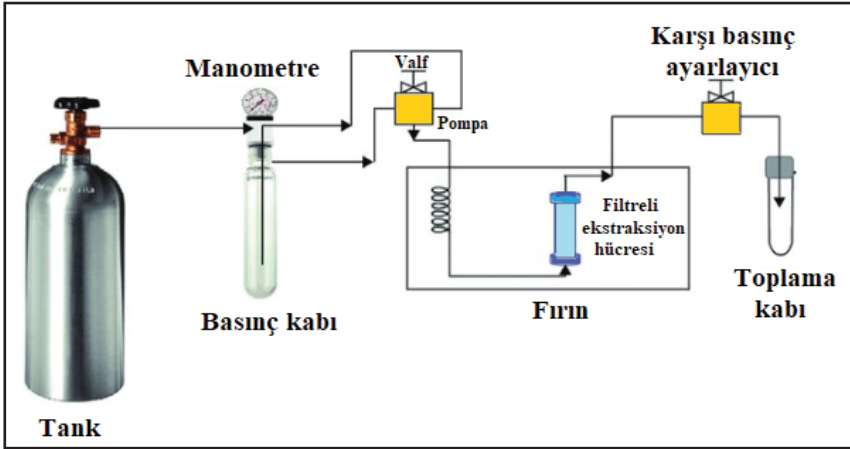
PEF ekstraksiyon yöntemi kullanılarak bitkisel materyallerden karbohidrat, lipid, pigment, fenol gibi bileşiklerin ekstraksiyonu yüksek verimde gerçekleştirilmiştir (Goettel vd., 2013; Zbinden vd., 2013; Luengo vd., 2015; Geada vd., 2018). PEF ayrıca genetik düzenleme için küçük moleküllerin kütle aktarım hızını, DNA ve RNA'nın hücrelere nüfuzunu arttırmak için de kullanılmaktadır (Golberg ve Rubinsky, 2013).

2.6. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyon (Pressurized Liquid Extraction, PLE)

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu olarak da adlandırılan basınçlı sıvı ekstraksiyon (PLE) yöntemi, bitkisel kaynaklardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için çevre dostu bir ekstraksiyon prosesidir (Alvarez-Rivera vd., 2020). PLE yöntemi, CO_2 yerine organik çözücülerin kullanıldığı süperkritik sıvı ekstraksiyonunun bir uzantısı olarak da görülebilir. Yüksek basınç uygulayarak çözücünün kaynama noktasına ulaştıktan sonra bile sıvı halde kalmasını sağlayan bir tekniktir. Ekstraksiyon sıcaklığı, PLE verimini ve seçiciliğini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Yüksek sıcaklık, çözücünün, çözünen maddenin ve matriksin yüzey gerilimini düşürdüğünden numune daha çok ıslanır. Çözücünün yüzey gerilimi azaldığından çözücü kavitesi daha kolay oluşur. Bunun sonucu olarak analitler, çözücüde daha hızlı çözünür (Büyüktuncel, 2012).

Isıtma işleminden sonra ekstraksiyon hücresinin çözücünün kaynama noktasının altına kadar soğutulması sağlanır. Daha sonra ekstraksiyon hücresine yüksek basınç uygulanarak ekstrakte edilen maddenin çözücü ile birlikte filtreden geçmesi sağlanır. Isıya duyarlı bileşikler için uygun olmayan PLE yönteminde çözücünün kaynamasını önlemek amacıyla 20 MPa kadar basınç uygulanmaktadır (Kellner vd., 2004). Ekstraksiyon süresi, çözücü türü ve miktarı, numune miktarı, numuneye uygulanan ön işlemler PLE verimini etkileyen önemli parametrelerdendir (Björklund vd., 1999).

PLE sistemi genel olarak fırın, filtrelili ekstraksiyon hücresi, pompa, toplama kabı, basınç ayarlayıcı ve manometreden oluşur (Şekil 8). PLE yönteminde öncelikle numune ekstraksiyon hücresine yüklenir, hücre organik çözücü ile doldurularak sıcaklık ve basınç ayarlanır. Belirlenen sürede numunenin ekstraksiyonu gerçekleştirilerek basınç serbest bırakılır ve ekstraktın toplama kabına geçmesi sağlanır. Ekstraktın tamamının toplama kabına geçmesi için hücre temiz çözücü ile yıkanır ve uygun bir gaz kullanılarak numunedeki çözücü atıkları temizlenir (Camel, 2001).



Şekil 8. Basıncılı sıvı ekstraksiyonu şematik görünümü (Richter, 1996)

PLE yöntemi, ilk olarak yarı-uçucu organik bileşikler, organoklorlu ve organofosforlu pestisitler, klorlu herbisitler poliklorlu bifeniller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar için geliştirilen bir tekniktir. Sonraki yıllarda özellikle farmasötik, çevre ve gıda alanlarında, biyoaktif ve besinsel bileşiklerin ve organik kirletici maddelerin ekstraksiyonunda kullanılmaya başlanmıştır (Barp vd., 2023).

Bitki biyoteknolojisinde kullanılan gelişmiş ekstraksiyon tekniklerinin avantaj ve dezavantajları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Gelişmiş ekstraksiyon tekniklerinin avantaj ve dezavantajları (Şengül ve Topdaş, 2019; Nadar vd., 2018; Farooq vd., 2022; Büyüktuncel, 2012)

	Avantajları	Dezavantajları
UAE	<ul style="list-style-type: none"> *Ekstraksiyon süresi kısa *Kimyasal kullanımı az *Enerji tüketimi az *Yüksek verim *Düşük maliyet *Matrikse bağlı değil 	<ul style="list-style-type: none"> *Ekstraksiyon verimi optimize edilmiş parametrelere bağlı *Filtrasyon gerekliliği
MAE	<ul style="list-style-type: none"> *Ekstraksiyon süresi kısa *Ekstraksiyon verimi yüksek *Yüksek seçicilikte ekstraksiyon *Çözücü tüketimi az 	<ul style="list-style-type: none"> *Organik çözücü kullanımından dolayı çevre dostu özelliği düşük *Ekipmanlar pahalı *Apolar bileşiklerde düşük ekstraksiyon verimi *Isıya duyarlı bileşikler için uygun değil
SFE	<ul style="list-style-type: none"> *Sıcağa duyarlı bileşiklerin ekstraksiyonu *Çevre dostu *Çözücü tüketimi az *Hızlı *Yüksek seçicilik *Otomasyona uygun *Az miktarda numune ile çalışabilme imkanı 	<ul style="list-style-type: none"> *Tüplerde düşük miktarda (%1-2) bulunan oksijenin bozunmaya yol açabilmesi *Yüksek maliyet *Matrikse bağımlılık *Polar maddelerin ekstraksiyonunun zor olması *Sıvı örnek ve çözelti ekstraksiyonunun zor olması
EAE	<ul style="list-style-type: none"> *Ekonomik *Çevre dostu *Yüksek ekstraksiyon oranı *Bağlı bileşikler için uygun *Yüksek seçicilik 	<ul style="list-style-type: none"> *Yüksek enzim maliyeti *Endüstriyel düzeyde uygun değil *Ekstraksiyon süresince uygun koşulları devam ettirmek zor
PEF	<ul style="list-style-type: none"> *Ekstraksiyon süresi kısa *Çözücü miktarı az *Seçici ekstraksiyon *Yüksek verim *Çevre dostu 	<ul style="list-style-type: none"> *Proses parametrelerinin korunması gerekliliği
PLE	<ul style="list-style-type: none"> *Çözücü tüketimi az *Ekstraksiyon süresi kısa *Çevre dostu *Filtrasyon ihtiyacı yok *Hızlı (10-40 dk) *Otomasyona uygun 	<ul style="list-style-type: none"> *Düşük seçicilik *Matrikse bağımlılık *Yüksek maliyet

3. Sonuç

Bitkilerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda tüm bitkileri kapsayan standart bir ekstraksiyon yöntemi bulunmamaktadır. Ekstraksiyon yöntemi, istenilen sekonder metabolitin kimyasal yapısına, çözünürlüğüne, polaritesine, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre değişiklik gösterir. Bu nedenle ekstraksiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarını göz önünde bulundurarak karar vermek önem arz etmektedir. Bitki biyoteknolojisinde geliştirilen yöntemlerin bitkilere uygulanması, Türkiye'nin tarımsal potansiyelinin etkili şekilde kullanılabilmesinde önemli rol oynamaktadır.

Kaynaklar

Abdelmohsen, UR., Sayed, A.M., & Elmaidomy, A. H. (2022). Natural products' extraction and isolation-between conventional and modern techniques. *Frontiers in Natural Products*, 1, 873808.

Alvarez-Rivera, G., Bueno, M., Ballesteros-Vivas, D., Mendiola, J. A., & Ibanez, E. (2020). Pressurized liquid extraction. In *Liquid-phase extraction* (pp. 375-398). Elsevier.

Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 16(2), 295-315.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.

Barp, L., Višnjevec, A. M., & Moret, S. (2023). Pressurized liquid extraction: A powerful tool to implement extraction and purification of food contaminants. *Foods*, 12(10), 2017.

Bernal, J. L., Nozal, M. J., Toribio, L., Diego, C., Mayo, R., & Maestre, R. (2008). Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean. *Journal of Chromatography A*, 1192(2), 266

Bielská, L., Šmídová, K., & Hofman, J. (2013). Supercritical fluid extraction of persistent organic pollutants from natural and artificial soils and comparison with bioaccumulation in earthworms. *Environmental Pollution*, 176, 48-54.

Björklund, E., Bøwadt, S., Nilsson, T., & Mathiasson, L. (1999). Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 285-293.

Blake, J. R., & Gibson, D. C. (1987). Cavitation bubbles near boundaries. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 19(1), 99-123.

Boulila, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Amor, I. B., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Industrial Crops & Products*, 74, 485-493.

Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, 2, 209-242.

Çağthamlı, T., & Šašek, V. (2005). Application of supercritical fluid extraction (SFE) to predict bioremediation efficacy of long-term composting of PAH-contaminated soil. *Environmental Science & Technology*, 39(21), 8448-8452.

Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193.

Charoensiddhi, S., Lorbeer, A. J., Lahnstein, J., Bulone, V., Franco, C. M., & Zhang, W. (2016). Enzyme-assisted extraction of carbohydrates from the brown alga *Ecklonia radiata*: Effect of enzyme type, pH and buffer on sugar yield and molecular weight profiles. *Process Biochemistry*, 51(10), 1503-1510.

Chen, H., Zhou, X., & Zhang, J. (2014). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*. *Carbohydrate Polymers*, 111, 567-575.

Deng, Q., Zhou, X., & Chen, H. (2014). Optimization of enzyme assisted extraction of *Fructus mori* polysaccharides and its activities on antioxidant and alcohol dehydrogenase. *Carbohydrate Polymers*, 111, 775-782.

Dunford, N. T., & Dunford, H. B. (2004). Nutritionally enhanced edible oil processing. AOCs Publishing.

Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.

Fan, R., Wang, L., Fan, J., Sun, W., & Dong, H. (2022). The pulsed electric field assisted-extraction enhanced the yield and the physicochemical properties of soluble dietary fiber from orange peel. *Frontiers in Nutrition*, 9, 925642.

Farooq, S., Mir, S. A., Shah, M. A., & Manickavasagan, A. (2022). Extraction techniques. In *Plant Extracts: Applications in the Food Industry* (pp. 23-37). Academic Press.

Geda, P., Rodrigues, R., Loureiro, L., Pereira, R., Fernandes, B., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2018). Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology—Applications, techniques and future trends. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 656-668.

Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crişan, G., & Ferreira, I. C. F. R. 2019. Enzyme-assisted extractions of polyphenols - A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 302-315.

Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., & Frey, W. (2013). Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Research*, 2(4), 401-408.

Golberg, A., & Rubinsky, B. (2013). Mass transfer phenomena in electroporation—transport in biological media.

Hallgren, P., Westbom, R., Nilsson, T., Sporring, S., & Björklund, E. (2006). Measuring bioavailability of polychlorinated biphenyls in soil to earthworms using selective supercritical fluid extraction. *Chemosphere*, 63(9), 1532-1538.

Icen, H., & Guru, M. (2009). Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 50(3), 225.

Kapoor, S., Singh, M., Srivastava, A., Chavali, M., Chandrasekhar, K., & Verma, P. (2022). Extraction and characterization of microalgae-derived phenolics for pharmaceutical applications: A systematic review. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9), 1044-1063.

Kellner, R., Mermet, J. M., Otto, M., Valcárcel, M., & Widmer, H. M. (2004). *Analytical chemistry: A modern approach to analytical science*. Weinheim: Wiley-Vch.

Le, H. V., & Le, V. V. M. (2012). Comparison of enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of vitamin C and phenolic compounds from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(6), 1206-1214.

Létisse, M., Rozières, M., Hiol, A., Sergent, M., & Comeau, L. (2006). Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without organic modifier: I. Optimization of extraction conditions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(1), 27-36.

Luengo, E., Martínez, J. M., Bordetas, A., Álvarez, I., & Raso, J. (2015). Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 15-22.

Mahnič-Kalamiza, S., Vorobiev, E., & Miklavčič, D. (2014). Electroporation in food processing and biorefinery. *The Journal of Membrane Biology*, 247:1279–304.

Muniglia, L., Claisse, N., Baudalet, P. H., & Ricochon, G. (2014). Enzymatic aqueous extraction (EAE). *Alternative Solvents for Natural Products Extraction*, 167-204.

Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108, 309-330.

Oskay, D., & Oskay, M. (2009). Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi. *Ecological Life Sciences*, 4(2), 31-41.

Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2010). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 340-372.

Prandi, B., Di Massimo, M., Tedeschi, T., Rodríguez-Turienzo, L., & Rodríguez, Ó. (2022). Ultrasound and microwave-assisted extraction of proteins from coffee green beans: Effects of process variables on the protein integrity. *Food and Bioprocess Technology*, 15(12), 2712-2722.

Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., & Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.

Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Yazid, A. M., Khatib, A., & Norulaini, N. A. N. (2010). Fatty acid compositions of fish oil extracted from different parts of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) using various techniques of supercritical CO₂ extraction. *Food Chemistry*, 120(3), 879-885.

Sangeetha, K., Ramyaa, R. B., Khaneghah, A. M., & Radhakrishnan, M. (2023). Extraction, characterization, and application of tomato seed oil in the food industry: An updated review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 100529.

Schuster, J. J., Bahr, L. A., Fehr, L., Tippelt, M., Schulmeyr, J., Wuzik, A., & Brauer, A. S. (2018). Online monitoring of the supercritical CO₂ extraction of hop. *The Journal of Supercritical Fluids*, 133, 139-145.

Sheldon, R. A., & Van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235.

Şengül, M., & Topdaş, E. F. (2019). Katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan modern teknikler ve bu teknikler arasında ultrason yardımlı ekstraksiyonun yeri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(2), 201-216.

Tyskiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. *Molecules*, 23(10), 2625.

URL 1: <https://www.gidahatti.com/makale/11529243/can-kayacilar/superkritik-ekstraksiyon-bitkisel-ozut-elde-etme-teknolojisi>

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313.

Yang, Y., Cajthaml, T., & Hofmann, T. (2008). PAH desorption from river floodplain soils using supercritical fluid extraction. *Environmental Pollution*, 156(3), 745.

Yu, Z. R., Weng, Y. M., Lee, H. Y., & Wang, B. J. (2023). Partition of bioactive components from red pitaya fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peels into different fractions using supercritical fluid fractionation technology. *Food Bioscience*, 51, 102270.

Zbinden, M. D. A., Sturm, B. S., Nord, R. D., Carey, W. J., Moore, D., Shinogle, H., & Stagg-Williams, S. M. (2013). Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. *Biotechnology & Bioengineering*, 110(6), 1605-1615.

Zghaibi, N., Omar, R., Mustapa Kamal, S. M., Awang Biak, D. R., & Harun, R. (2019). Microwave-assisted brine extraction for enhancement of the quantity and quality of lipid production from microalgae *Nannochloropsis* sp. *Molecules*, 24(19), 3581.

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 1-26.

Zielinski, A. A. F., del Pilar Sanchez-Camargo, A., Benvenuti, L., Ferro, D. M., Dias, J. L., & Ferreira, S. R. S. (2021). High-pressure fluid technologies: Recent approaches to the production of natural pigments for food and pharmaceutical applications. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 850-869.

BÖLÜM VII

ASMADA BULUNAN SEKONDER METABOLİTLER VE IN VITRO KOŞULLARDA ÜRETİM TEKNİKLERİ

Secondary Metabolites in Vine and in Vitro Production Techniques

EMINE SEMA ÇETİN*

**(Doç. Dr.), Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Bölümü, Yozgat, TÜRKİYE,
E-mail: esema.cetin@yobu.edu.tr
ORCID: 0000-0001-7601-8491*

Özet

Sekonder metabolitler, bitkilerden elde edilen, onların yaşamsal fonksiyonları üzerinde primer metabolitler gibi etkileri bulunmayan bileşiklerdir. Bitkilerin kendilerini savunma amacıyla ürettikleri bu bileşiklerin son yıllarda başta ilaç sanayi olmak üzere gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde önemli rolleri olduğunun anlaşılması ile bu bileşiklere duyulan ilgi daha da artmıştır.

Sekonder metabolitler ilk olarak geleneksel yöntemlerle yani doğadan toplanarak ekstrakte edilmiştir. Ancak bu yöntemlerin uygulanmasında bir takım güçlükler bulunmaktadır. Son yıllarda ise bu bileşenlerin üretiminde büyük avantajlar sunması nedeniyle biyoteknolojik metotlar içerisinde yer alan hücre süspansiyon kültürleri kullanılmaktadır. Ayrıca farklı kaynaklarla bitkide/doku ya da hücrede mutasyon oluşturularak, elisitör uygulamaları ile, öncü besleme ile ya da genetik transformasyon ve metabolik mühendislik tekniklerinin kullanımı ile üretimin daha da artırılabilirdiği bilinmektedir.

Meyve ve sebzelerin sekonder metabolitler bakımından zengin oldukları bilinmektedir. Bunlar içerisinde asma ve onun ürünü olan üzüm, sekonder

metabolitler ve özellikle fenolik bileşikler bakımından zengindir. Bu nedenle metabolit üretiminde üzerinde en fazla durulan bitkilerden birisidir. Derleme niteliğindeki bu çalışma ile de asmada bulunan sekonder metabolitler ve onların in vitro koşullardaki üretimine ilişkin yapılan çalışmalara yer verilmiştir.

Anahtar kelimeler: sekonder metabolitler, asma, in vitro teknikler, sağlık, gıda, kozmetik

Abstract

Secondary metabolites are compounds obtained from plants that do not have effects on their vital functions like primary metabolites. In recent years, interest in these compounds, which plants produce for self-defense, has increased as it has been understood that they have important roles in the pharmaceutical industry, food, cosmetics and pesticide sectors.

Secondary metabolites were first extracted by traditional methods, that is, collected from nature. However, there are some difficulties in applying these methods. In recent years, cell suspension cultures, which are included in biotechnological methods, have been used because they offer great advantages in the production of these components. In addition, it is known that production can be further increased by creating mutations in the plant/tissue or cell with different sources, elicitor applications, precursor feeding or the use of genetic transformation and metabolic engineering techniques.

It is known that fruits and vegetables are rich in secondary metabolites. Among these, vine and its product, grapes, are rich in secondary metabolites and especially phenolic compounds. For this reason, it is one of the plants most emphasized in metabolite production. In this review, studies on secondary metabolites found in grapevine and their production under in vitro conditions are included.

Keywords: secondary metabolites, grapevine, in vitro techniques, health, food, cosmetic

1. Giriş

Bitkiler son derece kompleks bileşikleri sentezleme kapasitesine sahip canlılardır. Üretilen bu organik bileşikler her ne kadar primer ve sekonder olarak gruplandırılrsa da birçok yönüyle aralarındaki bu sınırların çok net olmadığı bilinmektedir.

Genel bir tanım olarak primer metabolitler, bitkilerin büyüme ve gelişmesinde mutlak gerekli olan, fotosentez ve solunum başta olmak üzere pek çok fizyolojik

olayda rolleri bulunan bileşiklerdir. Bitkilerin köklerinden sürgün uçlarına kadar bütün kısımlarında ve farklı miktarlarda sentezlenen karbonhidratlar, yağlar, proteinler, nükleik asitler, mineral maddeler ve bazı vitaminler önemli primer metabolitler içerisindedir. Tüm bu bileşiklerin kökeni fotosentez sonucu üretilen şekerler olup, bitki bünyesinde nispeten yüksek miktarlarda sentezlenmektedirler. Ancak farklı sektörlerde kullanım olanağı bakımından ele alındığında bu bileşikler ticari yönden çok büyük bir değer taşımamaktadırlar. Yağlar, yağ asitleri, şekerler bu bileşiklere örnek olarak verilebilir.

Primer metabolitlerin yanında, bitkinin büyüme ve gelişmesi bakımından mutlak gerekli olmayan bileşikler de üretilmektedir. Primer metabolitlerin son ürünleri olarak ortaya çıkan bu bileşikler “sekonder metabolitler” olarak tanımlanırlar. Bu bileşikler önceleri herhangi bir işe yaramayan atık bileşikler olarak ele alınmışlardır. Ancak bir takım fonksiyonları ortaya çıktıkça bu alandaki çalışmalara yoğunlaşmış ve önemli fonksiyonları tespit edilmiştir. Bugün artık bu bileşiklerin bitkilerin olumsuz koşullarda (kuraklık, tuzluluk) adaptasyon yeteneklerini geliştirerek hayatta kalmalarında, farklı mikroorganizmalara ve herbivorlara karşı kendilerini savunmalarında, yaralanma sonrası iyileşmenin sağlanmasında, tozlanma ya da tohumlarının taşınması için böcekleri etkilemede, renk, tat ve kokunun oluşumunda rol oynadıkları bilinmektedir.

Yapılan araştırmalar, bitki bünyesinde bu denli önemli olan bileşiklerin insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Bilindiği üzere bitkiler alemi insanoğlunun hem beslenmesi hem de hastalıklardan korunmasında en temel kaynaktır. Ancak sadece hastalıklardan korunma değil, hastalıkların tedavisinde de bitkilerin rolü tartışılmaz. Mevcut ilaçların etken maddesinin büyük bir çoğunluğunun bitkisel kaynaklı olduğu bilinen bir gerçektir. Sekonder bileşenler özelinde değerlendirildiğinde de bu bileşiklerin sahip oldukları antioksidan, antifungal ve antibakteriyel özellikleri nedeni ile bugün uzun vadeli kullanımının kanser, kardivasküler hastalıklar, tip II diyabet gibi pek çok hastalık üzerine olumlu etkiler gösterdiği bilinmektedir.

Sekonder metabolitler çok küçük miktarlarda sentezlenmesi ve gıda, tatlandırıcı, boya, ilaç, lif, yapıştırıcı, yağ, mum ve parfüm gibi çok çeşitli sektörlerde kullanım olanağı bulması nedeni ile yükte hafif pahada ağır olarak tanımlanan bileşiklerdir. Ancak üretimlerinde primer metabolitler gibi bir kararlılık ve süreklilik durumunun olmaması, üretiminin düşük ve farklı dönemlerde değişen miktarlarda olması, bitkinin tümünde gerçekleşmemesi yani özelleşmiş hücrelerde olması, pek çok değişkene bağlı olarak sentezinin de değişmesi durumları nedeni ile primer metabolitlere göre üretim süreci çok daha zordur.

Son yıllarda ise biyoteknolojik metotlar içerisinde yer alan özellikle hücre süspansiyon kültürü teknikleri değerli bileşenlerin üretiminde büyük avantajlar sunmaktadır (Bekheet ve Sota, 2023). Geleneksel yöntemlerin pek çok dezavantajı bu yöntemler ile ortadan kalkmakta ve in vitro tekniklerin diğer üstünlükleri de ön plana çıkmaktadır. Öncelikle bu yöntemlerle belirli bir döneme bağlı kalmaksızın yılın her döneminde üretim yapılabilir (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002). Üretimin belirli bir döneme bağlı olmaması, metaboliti yüksek miktarda üreten hücrelerin seçilebilmesi büyük avantajdır. Örneğin üzüm salkımında olgunlaşma döneminde üretilen bir bileşiğin in vitro da üretimi için bu dönemi beklemek gereksiz uygun bir başlangıç materyali ile üretim tüm yıla dağılabilmektedir. Aynı zamanda çevre faktörlerinin kısıtlayıcı etkisi de söz konusu değildir. Belirli bir organ ya da dokuda üretilen bir bileşiği üretmek için o yapıya bağlı kalmadan tek bir hücreden bu bileşiği üretmek mümkün olmaktadır.

Bunun yanında bitkinin bileşeni sentezleme kapasitesini artırmak, doğada ürettiğinden çok daha yüksek miktarlara ulaşmak da mümkündür. Farklı kaynaklarla bitkide/doku ya da hücrede mutasyon oluşturarak, elisitör uygulamaları ile, öncü besleme ile ya da genetik transformasyon ve metabolik mühendislik tekniklerinin kullanımı ile üretimin çok yüksek miktarlarda sağlanabildiği bilinmektedir.

Meyve ve sebzelerin sekonder metabolitler bakımından zengin oldukları bilinmektedir. Bunlar içerisinde asma ve onun ürünü olan üzüm, sekonder metabolitler ve özellikle fenolik bileşikler bakımından zengindir. Bu nedenle metabolit üretiminde üzerinde en fazla durulan bitkilerden birisini oluşturmakta ve üzümde elde edilen ekstraktların günümüzde ciddi bir tüketici talebi olduğu da bilinmektedir.

Derleme niteliğindeki bu çalışma ile de asmada bulunan sekonder metabolitler ve onların in vitro koşullardaki üretimine ilişkin yapılan çalışmalara yer verilmiştir.

2. Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması

Bilinen en yaygın sekonder metabolitler fenolik bileşikler, tanenler, renk maddeleri, alkaloidler, uçucu yağlar, glikozitler, heterozitler, steroidler, saponinler ve reçinelerdir. Bununla birlikte sekonder metabolitler biyosentetik orijinlerine göre alkaloidler, terpenler ve fenolik bileşikler olmak üzere üç temel grupta sınıflandırılırlar.

Alkaloidler bitkiler tarafından sentezlenen oldukça geniş bir bileşen grubudur. Bunların çoğu amino asitlerden türemiştir. Şu ana kadar 300'den fazla

bitki familyasından 10.000'in üzerinde farklı alkaloid keşfedilmiştir. Alkoloidler bitkilerde daha çok herbivorlara, sineklere ve mikroorganizmalara karşı kendini savunma amacıyla üretilmektedir. Bazıları da nikotin örneğinde olduğu gibi doku hasarlarına cevap olarak sentezlenirler. Alkoloidler çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Birçok alkoloid amino asit prekürsörlerinden veya anthranilik asit ve nikotinik asitten türetilmektedir (Topçu ve Çölgeçen, 2015).

Alkoloidler sınıflandırılma şekillerine göre de büyük değişiklik gösteren bir gruptur. Bir sınıflandırmada türetildikleri amino asitlerin nitrojen atomu taşıyan halka sisteminin yapısı baz alınırken (pirolidin, indole, piperidin, pirolizidin, tropan, kuinolin, izokuanolin, aporpin, imidazole, diazokin, purin, steroidal, amino ve diterpen alkoloidler), bir diğer sınıflandırma şeklinde aneljezik ya da narkotik gibi farmakolojik etkileri baz alınmıştır. Taksonomik sınıflandırmada ise en çok buldukları familyaların adı kullanılmaktadır. Halkasal çekirdek yapısına göre ise heterosiklik ve heterosiklik olmayan şekilde sınıflandırılırlar (Alvarez, 2014).

Bir diğer sekonder metabolit grubu terpenlerdir. Bitki terpenleri sekonder metabolitlerin geniş bir sınıfıdır. Geleneksel bitkisel tedavilerde yoğun olarak kullanılmaktadır. Bitkinin savunma mekanizmasının harekete geçirilmesinde etkilidirler (Tholl, 2006). Terpenlerin geniş biyolojik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle gıdalarda, aroma verici olarak, biyolojik renklendirici olarak, kozmetikte, dezenfektan olarak ve agrokimyasal üretiminde de öne çıkmaktadır. Sağlık üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Kronik rahatsızlıklarda ve büyüme bozukluklarında terpen bileşiklerinin kullanıldığı bilinmektedir (Dillard ve German, 2000). Tokoferol bu alanda üzerinde durulan bir diğer bileşiktir. Sahip olduğu yüksek antioksidan etki nedeni ile kanser hücreleri üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Kline vd., 2004).

Karotenoidler terpenlerin diğer bir önemli sınıfıdır. Meyve ve sebzelere sarı, turuncu ve kırmızı renk pigmentlerini veren bileşiklerdir. Bitkilerde 600'den fazla karotenoid olduğu bilinmektedir. Yüksek antioksidan aktivite göstermektedirler. Prostat, kolon ve akciğer kanseri üzerinde etkili olduklarına ilişkin çalışma bulunmaktadır (Milani vd., 2017).

Fenolik bileşikler, şikimik asit izyolu ve fenilpropanoid metabolizmasından türetilen, antioksidan özellikler taşıyan en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir (Shadidi ve Yeo, 2016). Fenolik bileşikler temelde flavanoidler ve flavanoid olmayanlar olmak üzere 2 sınıfa ayrılabilirler.

Flavanoidler; flavanoller (kateşin, proantosiyanidinler vb.), flavonoller (kuersetin, mirisetin vb.) ve antosiyanidinler (siyanidin, malvinidin vb.) flavanoidler grubuna ait bileşiklerdir.

Flavanoid olmayan bileşikler; C6-C1 yapısındaki fenolik asitler (kafeik asit, gallik asit vb.), C6-C2-C6 yapısındaki stilbenler (resveratrol, piceid, viniferin vb.) ve C6-C3-C3-C6 yapısındaki lignanlar flavanoid olmayan bileşiklerdir. Fenolik asitler de yapılarındaki fonksiyonel gruplara bağlı olarak farklı biyolojik aktiviteler gösteren bileşiklerdir. Hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asit olarak iki alt gruba ayrılırlar (Shadidi ve Yeo, 2016).

Hidroksibenzoik asitler, 6-C1 fenilmetan yapısındaki bileşiklerdir. Gallik asit, salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit bu grup içerisinde yer alır. Fenilpropan C6-C3 yapısında olan hidroksisinnamik asitlere ise örnek olarak kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asit verilebilir (Balasundram, 2006; Saldamlı, 2007).

Fenolik bileşiklerin genel olarak düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oluşumunu engellediği, kardiovasküler hastalıkları önlediği antikanserijen ve antimikrobiyal etki gösterdiği, antioksidan özellikleri ile de serbest radikaller olarak adlandırılan bileşiklere kendilerine bağlayarak onların zararlarını önledikleri tespit edilmiştir (Shen vd., 2017; Aubert ve Chalot, 2018).

Meyve ve sebzeler sekonder metabolitler bakımından zengin ürünlerdir. Bunlar içerisinde asma ve üzüm, sekonder metabolitler ve özellikle fenolik bileşikler bakımından zengindir (Murthy vd., 2002). Üzüm ve üzüm ürünlerinin bazı kronik hastalıkların riskini düşürmelerinin içerdiği fenolik bileşiklerden kaynaklandığı bilinmektedir (Aubert ve Chalot, 2018). Bu nedenle metabolit üretiminde üzerinde en fazla durulan bitkilerden birisini oluşturmaktadır.

2.1. Asmada Bulunan Sekonder Metabolitler ve In Vitro Koşullarda Üretimine Yönelik Çalışmalar

Asma bitkisinin çok çeşitli sekonder metabolitleri sentezlediği bilinmektedir. Bununla birlikte üretilen bu bileşiklerin tip ve konsantrasyonlarının pek çok faktöre göre değiştiği de bir gerçektir. Öncelikle asma üzerinde bulunduğu doku ve organa göre farklılığın gözlemlendiği, sadece üzüm tanesinin farklı kısımlarında bile kompozisyonların değiştiği saptanmıştır. Örneğin üzüm tanesinde (Martínez Maqueda vd., 2018; Millar vd., 2018), üzümün çekirdeğinde (Taghizadeh vd., 2016) ve kabuğunda (Yubero vd., 2013) bu değişimi görmek mümkündür. Bileşen sentezinin üzüm çeşidine bağlı olarak da değiştiği (Garrido ve Borges, 2013; de la Cerda-Carrasco vd., 2015), ayrıca bitkinin bulunduğu yetişme ortamının yine bu konuda belirleyici rol üstlendiği görülmüştür.

Asmada bulunan ve çeşitli fonksiyonları bulunan bu bileşiklerin in vitro koşullarda özellikle hücre süspansiyon kültürleri ile elde edilmesine yönelik uzun yıllara dayalı çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Decendit ve Merillon (1996); Decendit vd. (1996) ile Waffo Teguo vd. (1996) bu alanda ilk çalışma yapan araştırmacılar olup, asmada hücre süspansiyon kültürlerinin uygun besin ortamlarında kültüre alındıklarında antosiyanin, kateşin, tanen ve stilbenler gibi bileşikler yüksek miktarlarda ürettiklerini belirtmişlerdir. Vitrac vd. (2002) de asmanın hücre süspansiyon kültürlerinde önemli fenolik bileşenler olan ve renkli üzümlerde bulunan antosiyaninler ile proantosiyanidin, kateşin ve stilbenler gibi fenolik bileşikler yüksek oranda sentezlemeyi başarmışlardır. Ancak geleneksel yöntemlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmış olmakla birlikte in vitro tekniklerde de endüstriyel anlamda sekonder metabolit üretiminin istenilen ölçüde gerçekleşemediği tespit edilmiş olup, bu durumun tekniğin önündeki en önemli sorun olduğu belirtilmiştir (Kim vd., 2004). Ekonomik düzeyde bir üretimin gerçekleştirilememiş olmasının en önemli nedeni hücre kültürleri ile metabolit üretiminde, birbirini takip eden ve her birisi kritik öneme sahip çok sayıda aşamanın olması ve bu süreçte de iyi bir bilgi birikimi ve donanımlı bir laboratuvar altyapısının gerekliliğidir. Hücre kültürlerini oluşturacak hücre hatlarının seçimi, ortamın optimizasyonu, besin ortamı seçimi, kültür koşullarının optimizasyonu, karıştırma ve havalandırmanın optimizasyonu, elisitör seçimi, besin ve prekürsör eklenmesi, permeabilizasyon, sabitleme, metabolitlerin seçici emilimi, biyotransformasyon, biyoreaktor uygulamaları (Topçu ve Çölgeçen, 2015) gibi tüm aşamalar başarıyı etkileyen kritik noktalarlardır.

Öncelikle her hücrenin/hücre topluluğunun ihtiyaçlarını karşılayacak besin ortamının belirlenmesi oldukça zordur. Bir üretim sürecinde araştırmacı yüzlerce besin ortamının performansını değerlendirmek zorunda kalılabilmektedir. Bunun yanında bu kültürler sayısız özellikte hücrelerin bir arada bulunduğu bir topluluktur. Dolayısıyla böylesi büyük bir heterojenlikte, genetik ve epigenetik stabiliteden bahsedilememektedir. Farklılaşmalar ve kimyasal bir takım sinyal iletimleri sonucunda metabolit üretimi de homojen olamamaktadır (Kim vd., 2004; Nail ve Roberts, 2004).

Süspansiyon kültürlerinde kültürün canlı kalabilmesi için sıvı besin ortamının shaker adı verilen karıştırıcılarla havalandırılması gerekmektedir. Bu durumda da nispeten büyük olan bitki hücreleri zarar görebilmektedir. Bu da bir aşamadan sonra metabolit üretimini etkilemektedir (Kieran vd., 1997). Tüm bu değinilen olumsuzlara karşın, optimizasyon sağlanabildiğinde sekonder metabolit üretiminde hücre süspansiyon kültürleri etkin bir kullanım potansiyeline sahiptirler. Özellikle büyük ölçekli biyoreaktörlerin kullanıldığı sistemlerde yüksek miktar ve saflıkta metabolit üretimini sağlamak mümkündür. Bu nedenle söz konusu problemlerin ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalar

da yapılmaktadır. Bu süreçte de bu bileşiklerin doğada nasıl ve hangi koşullar altında üretimlerinin arttığına ilişkin çalışmalara odaklanılmış ve bu ortamı yapay olarak in vitro da oluşturmak gerektiği düşünülmüştür. Öncelikle sekonder metabolitlerin doğada çeşitli biyotik ve abiyotik stresler karşısında daha yüksek miktarlarda üretildiği bilinmektedir (Niesen vd., 2013). Bitkiler yetiştirildikleri ortamlarda maruz kaldıkları biyotik ve abiyotik streslere karşı kendilerini korumak için farklı stratejiler geliştirirler (Commun vd., 2003). Bitkilerin kendilerini koruma/savunma sürecinde iki farklı mekanizma gösterdikleri bilinmektedir. Öncelikle bitki herhangi bir stres durumuna maruz kalmadan bir savunma durumunda bulunmaktadır. Herhangi bir strese maruz kaldıktan sonra da bir savunma durumu gerçekleşmektedir. Bu süreçlerde de bitkilerin bir takım içsel sinyaller ilettikleri bilinmektedir. Bu sinyaller; salisilik asit, (Malamy ve Klessig, 1992) etilen ve jasmonatlardan (Sökmen ve Gürel, 2001; Theis ve Lerdau, 2003) oluşmaktadır. Bu bileşikler savunma mekanizmalarının başlatılmasında aktif rol oynamaktadırlar. Purkayashta (1995), fitoaleksinlerin stresin başlamasından birkaç saat sonra sentezlendiklerini ve birkaç gün sonra da maksimum seviyeye ulaştıklarını belirtmiştir. Buradan yola çıkarak, bu stresin yapay olarak in vitro da oluşturulması gerekliliği ile ortama stres yapıcı ya da doğada bu bileşiklerin üretimi sürecinde sinyal rolü üstlendiği bilinen bileşikler besin ortamına elisitör olarak ilave edilmeye başlanmıştır. Günümüzde de bu alandaki uygulamaların çok yönlü olarak devam ettiği bilinmektedir. Geldiğimiz noktada elisitör uygulamaları hücre süspansiyon kültürlerinde etkili bir şekilde kullanılabilen ve olumlu sonuçları alınan uygulamalardır.

Elisitörler temelde biyotik ve abiyotik elisitörler olmak üzere iki grupta incelenirler. Biyotik elisitörler biyolojik orjinli yapılardır. Bitki hücre duvarlarındaki kitin, pektin, selüloz bazlı polissakkarit içeren yapılar ve mikroorganizmalar biyotik elisitörlerdendir. Abiyotik elisitörler ise biyolojik olmayan orijine sahip yapılardır. Fiziksel (ışık, sıcaklık, tuz, kuraklık ve osmotik stres), kimyasal (ağır metaller, mineral tuzlar ve gaz formunda toksinler) ve hormonal (jasmonatlar ve salisilik asit) abiyotik stresler olarak gruplandırılırlar (Naik ve Al-Khayri, 2016). Elisitör amacıyla ortama ilave edilen bu maddelerin tek ya da bir kaçının bir arada kullanıldığı da bilinmektedir.

Asmada sekonder metabolit üretiminde de hücre süspansiyon kültürlerinde elisitör kullanımının yoğun olarak uygulandığı bilinmektedir. Bu alanda yapılan ilk araştırmalardan birisinde Cormier vd. (1990), *Vitis vinifera* hücre kültürlerinde antosiyanin üretimini artırmak için sakkarozun etkisini incelemişlerdir. Sakkaroz, bir taraftan ortama karbon kaynağı sağlaması, diğer

tarafından ortamın yoğunluğunu artırarak hücreler üzerinde baskı oluşturulması şeklinde çift yönlü etki göstermektedir. Araştırmada farklı dozlarda sakkaroz kullanılmış ve 50 g/l sakkaroz içeren besin ortamında antosiyanin üretiminin 20 g/l miktarına oranla yaklaşık iki kat arttığı ifade edilmiştir. Sakkaroz dışında aynı amaca yönelik olarak glikoz ve mannitol de kullanılabilir.

Do ve Cormier (1991), Gamay üzüm çeşidine ait genç meyvelerin meyve etlerinden elde ettikleri kalluslardan başlattıkları hücre süspansiyon kültürlerine kültürün 7. gününde 88 mM sakkaroz; 132 mM sakkaroz ve 88 mM sakkaroz ile 165 mM mannitolü kombinasyonlu olarak ilave etmişlerdir. Oluşan yüksek osmotik basıncın antosiyanin birikimini artırdığını saptamışlardır.

Gamay üzüm çeşidine ait hücre kültürlerinde yapılmış olan bir diğer araştırmada Larronde vd. (1998) besin ortamına sakkaroz, glikoz, fruktoz, mannitol ve sorbitol ilave etmişler ve antosiyanin birikimi ile kullanılan sakkaroz tiplerinin dozları arasında pozitif bir ilişki olduğunu saptamışlardır. Özellikle 0,15 M dozunda sakkaroz kullanımının antosiyanin birikimini 12 kat artırdığını belirtmişlerdir.

Hücre kültürlerinde büyümeyi düzenleyicilerin de metabolit birikiminde etkili oldukları bilinmektedir. Üzümde en fazla kullanılan çeşitlerden birisi olan Gamay çeşidinde yapılmış bir diğer çalışmada 7 günlük hücre kültürlerinde bitki büyümeyi düzenleyicilerinin etkisi incelenmiştir. Farklı dozlarda 2,4-di kloro fenoksiasetik asit, naftalen asetik asit, benzil amino purin ve kinetinin ilave edilen hücre süspansiyonları 5000 lüks ışık altında kültüre almışlardır. Araştırmacılar kinetinin antosiyanin birikimi üzerinde daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (Krisa vd., 1999a).

Krisa vd. (1999b), Gamay ve Cabernet Sauvignon çeşitlerine ait yaprak saplarından elde ettikleri hücre kültürlerine metil jasmonat ve fenil alanin ile bazı büyümeyi düzenleyicileri ilave etmişlerdir. Araştırma sonucunda kullanılan elisitörlerin metabolit birikimine katkı sağladığını ifade etmişlerdir. Araştırmalarında karboksi metil selülozun antosiyanin birikimi üzerine olan etkisini inceleyen Nagamori vd. (2001) ise Bailey Alicant A.çeşidine ait kallusları sıvı B5 ortamında kültüre almışlardır. Ortama %0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 dozunda olmak üzere farklı oranlarda karboksi metil selüloz ilave etmişlerdir. Araştırma sonucunda kullanılan %0.8'lik konsantrasyonun, antosiyanin miktarını kontrol grubuna oranla 5 kat fazla artırdığını ifade etmişlerdir.

Asmada stilben türevleri en çok üzerinde çalışılan bileşiklerdendir. Bu durum hem asmanın bu bileşikler bakımından zengin olması hem de bu bileşiklerin insan sağlığı üzerinde son derece önemli fonksiyonlarının

bulunmasından kaynaklanmaktadır. Resveratrol ve türevlerinin antimikrobiyal etki gösterdiği, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklarda önleyici etkilerinin bulunduğu, tümör gelişimini engellediği, antioksidan etkiler gösterdiği, kalp ve karaciğer sağlığını korumada etkili olduğu bilinmektedir (Shen vd., 2017). Bu nedenle araştırmalarında Gamay üzüm çeşidinde stilben üretimini artırmayı amaçlayan Decendit vd. (2002) elisitör olarak jasmonik asidin metil esteri olan metil jasmonatı uygulamışlardır. Kalluslardan elde ettikleri hücreleri B5 besin ortamının makro elementlerini, MS besin ortamının mikro elementlerini ve Morel besin ortamının vitaminlerini içeren besin ortamında kültüre almışlar ve kültürün 6-7.günlerinde besin ortamına 25 mM metil jasmonat ilave etmişlerdir. Araştırma sonucunda ilave edilen metil jasmonatın flavanollerin ve stilben türevlerinin sentezini artırmada etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Gamay üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde metabolit üretimini artırmaya yönelik bir diğer araştırma da Zhang vd. (2002) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmada antosiyanin sentezinin artırılması amacıyla jasmonik asit ile ışık uygulaması kullanılmıştır. Jasmonik asidin etkisini incelemek için kültür ortamına 0 (kontrol), 10 ve 20 μM dozlarında jasmonik asit ilave edilirken, ışık uygulamasının etkisini incelemek için de kültürler 8000-8300 lüks ışık altında kültüre alınmışlardır. Kontrol grupları da karanlıkta kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda maksimum antosiyanin birikiminin 20 μM metil jasmonat uygulamasında gerçekleştiği ve bunun kontrol ile kıyaslandığında 8.5 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca karanlıkta kültüre alınan hücre süspansiyonlarına kıyasla ışık altındaki hücrelerde de antosiyanin birikiminin 4.8 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Aumont vd. (2004) elisitör olarak fenil alanin kullandıkları araştırmalarında polifenol sentezinin arttığını ifade etmişlerdir. Barbera üzüm çeşidinde hücre süspansiyon kültürlerinde jasmonik asit, metil jasmonat ve Na-orthovanadate'in resveratrol (*trans* ve *cis* formları) üretimindeki etkilerini inceleyen Tassoni vd. (2005), metil jasmonat uygulamasının her iki resveratrol birikimini de teşvik ettiğini ve bu etkisinin jasmonik asitten daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmada 0.1 mM ve 1.0 mM dozlarında Naorthovanadate, *cis*-resveratrol üretimini teşvik ederken, *trans*-resveratrol üzerinde etkisiz bulunmuştur.

Qu vd. (2006) de elisitör olarak fenil alanin ve metil jasmonat ile ışık uygulamasının antosiyanin birikimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Hücreler sıvı ortamda kültüre alınmışlar ve belirli süre gelişmelerinin sağlanmasının ardından alt kültüre alınmışlardır. Alt kültüre alınmalarının 4. gününde ise 30 $\mu\text{mol/L}$ fenil alanin ve 218 $\mu\text{mol/L}$ metil jasmonat ilave etmişlerdir. Işık uygulaması amacıyla da uygulama grubu 3000-4000 lüks'lük ışık altında kültüre alınırken, kontrol grubu örnekleri karanlıkta bırakılmıştır.

Kültürlerden 7. günde alınan örneklerde de antosiyanin birikimi incelendiğinde her iki uygulamanın da antosiyanin birikimini artırdığı belirlenmiştir.

Belhadj vd. (2008), araştırmalarında Gamay üzüm çeşidine ait hücre kültürlerinde metil jasmonat ve sakkarozun resveratrol birikimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. B5 sıvı besin ortamında kültüre alınan hücrelere kültürün ilerleyen günlerinde tek ya da kombine olarak 80 mM sakkaroz ve 20 mM metil jasmonat ilave etmişlerdir. Belirli saat aralıklarında alınan örneklerde metabolit birikimini incelemişlerdir. Metil jasmonat-sakkaroz uygulamasından 6 saat sonra *trans*- resveratrol birikiminin kontrol grubuna oranla 6 kat daha fazla gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Asmada hücre süspansiyon kültürlerinde metabolit üretimi amacıyla yapılan bir diğer araştırmada elisitör olarak salisilik asit ve etephon; ön besleme amacıyla da fenil alanin ve şikimik asit kullanılmış ve antosiyanin birikimi incelenmiştir. Araştırma sonucunda elisitör uygulamalarının etkili olduğu; ön beslemede de şikimik asit ve fenil alanin ilave edilmemiş kontrol hücrelerine kıyasla ön besleme yapılan kültürlerde antosiyanin birikiminin çok daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (Thaw Saw vd., 2010).

Raluca vd. (2011), *Vitis vinifera* kallus kültürlerinde biyotik ve abiyotik elisitörlerin resveratrol biyosentezi ve birikimi üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda oluşturdukları iki aşamalı kültür sisteminde mannitol (2mM) ve jasmonik asit (40µM) kombinasyonlarının kalluslarda resveratrol birikimini artırdığını ifade etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada da Chasselas üzüm çeşidi ile *V. berlandieri*'ye ait hücre süspansiyon kültürlerine 0.2 mM metil jasmonat ilavesinin resveratrol üretimini artırdığı belirtilmiştir. 2L'lik biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimde kontrol hücrelerinde resveratrol üretiminin gerçekleşmediği; metil jasmonatın bazı resveratrol türevlerinin (e-viniferin, d-viniferin, 3-metilviniferin ve piseatannol) sentezlenmesinde etkili olduğu ve ilk kez biyoreaktör ile kitlesel üretimin gerçekleştirildiği vurgulanmıştır (Donnez vd., 2011).

Farklı abiyotik kimyasal elisitörlerin *Vitis vinifera* hücre süspansiyon kültürlerinde etkisinin incelendiği bir araştırmada (Cai vd., 2013), kobalt, gümüş ve kadmiyumun fenolik asit üretimini teşvik etmede etkili olduğu ve uygulamadan dört saat sonra 3-O-glucosyl-resveratrol miktarının elisitör uygulaması ile 1,6 kat arttığı belirtilmiştir. Höll vd. (2013), *Vitis vinifera* kök tüylerinden oluşturulan hücre kültürlerinde UV-C ışığı, yaralanma ve fungus enfeksiyonunun stilben üretimini artırdığını belirtmişlerdir. Nopo Olozabal vd. (2014) ise JA ve MeJA'nın *Vitis rotundifolia* kök hücre kültürlerinde stilbenlerin üretimini artırmada elisitör olarak etkili bir şekilde kullanıldığını belirtmişlerdir.

Cabernet Sauvignon üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde yapılan bir araştırmada UV-C uygulaması ile birlikte MeJA ya da salisilik asit elisitörlerinin stilben üretim miktarı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda uygulamaların stilben üretimini artırmada son derece etkili olduğu belirtilmiştir (Xu vd., 2015).

Biyotik elisitörlerin de sekonder metabolit üretiminde kullanıldığı bilinmektedir. Bu alanda yapılmış olan bir çalışmada Naik ve Al-Khayri (2016), *Pseudomonas syringae* tarafından üretilen bir fitotoksin olan koronatinin asmada viniferin üretiminde biyotik elisitör olarak başarıyla kullanıldığını belirtmişlerdir.

Hosseini vd. (2017), araştırmalarında seyreltik (1/2) MS besin ortamına ilave ettikleri metil jasmonat ya da sodyum asetatın kök tüyü hücre kültürlerinde resveratrol (stilbenoid) miktarını artırmada etkili olduğunu ve uygulama yapılmayan kültürlere kıyasla resveratrol miktarının 1,5 kat arttığını belirtmişlerdir.

Kuzey Amerika kökenli bir asma türü olan *V. labrusca*'ya ait hücre kültürlerinde siklodekstrinlerin etkilerinin incelendiği araştırmalarda 13 mM siklodekstrin kültür sırasında ortama eklenmiştir. 14 L'lik biyoreaktörde yapılan bu uygulamalarda sadece resveratrol değil, e-viniferin, paldol ve labruskol birikimi de sağlanmıştır (Nivelle vd., 2017a; Nivelle vd., 2017b).

Andi vd. (2019), Shahani üzüm çeşidine ait tane dilimlerinden elde ettikleri kallus dokularından hücre süspansiyonları oluşturmuş ve bu kültürlerde stilben üretimini artırmak amacıyla farklı elisitörlerin etkisini incelemişlerdir. Işık (135,1 $\mu\text{mol/s/m}^2$ ve karanlık), fenilalanin (0; 0,1; 0,5 ve 1 mM) ve metil jasmonatın (0 ve 25 μM) etkilerinin tek ya da kombinasyonlu olarak incelendiği araştırma sonucunda karanlıkta yetiştirilen kültürlerin aydınlıkta yetiştirilenlere oranla toplam stilbenleri (resveratrol + piceid) daha yüksek miktarlarda biriktirdiği gösterilmiştir. Yüksek ışık koşuluyla karşılaştırıldığında karanlık, 1 mM fenilalanin ve 25 μM MeJA kombinasyonu fenolik bileşiklerin, toplam flavonoidlerin ve toplam stilbenlerin yüksek düzeyde üretimini teşvik etmiştir. Araştırmacılar, elde ettikleri sonucu karanlık koşulların MeJA ve fenilalanin kombinasyonunun *V. vinifera* hücre kültürlerinde bir biyoreaktör sistem kullanılarak büyük ölçekli stilben bileşiklerinin üretimi için etkili bir metot olduğu şeklinde özetlemişlerdir.

W16 asma genotipinde *Agrobacterium rhizogenes* ile muamele ettikleri köklerden hücre süspansiyon kültürleri oluşturan Hoseinpanahi vd. (2020), kültür ortamına metil jasmonat, sodyum asetat, asetik asit ve amonyum nitrat olmak üzere farklı elisitörler ilave etmişlerdir. Kültür süreci sonrasında resveratrol

üretimi ince tabaka kromatografisi ve HPLC ile belirlenmiştir. Araştırma sonucunda kontrol grubuna oranla elisitör uygulamalarında resveratrol üretim kapasitesinin yüksek olduğu belirtilmiştir.

Jeong vd. (2020), asmada (*Vitis labruscana* L.) hücre kültürü ortamında resveratrol ve viniferinden oluşan stilben bileşiklerinin miktarını artırmak için farklı elisitörlerin etkilerini incelemişlerdir. Bu alanda en çok kullanılan metil jasmonata ek olarak araştırmacılar metil - β -siklodekstrin ve asmada ilk kez steviosit'in elisitör olarak kullanımını değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucunda metil jasmonat ve steviositin ya da metil - β -siklodekstrin'in birlikte kullanıldığı ortamlarda 3L'lik biyoreaktör ortamında bu bileşiklerin yüksek miktarda sentezlendiğini ifade etmişlerdir.

Bhaskar vd. (2021), asmada hücre kültürlerinde antosiyanin üretiminde farklı biyotik elisitörleri denemiş ve uygulamaların metabolit üretiminde etkili olduğunu vurgulamışlardır.

Hücre süspansiyon kültürlerine ilave edilen elisitörlerin metabolit birikimini artırmada başarılı olduğu görülmekle birlikte bu başarının pek çok faktöre bağlı olarak değiştiği de bilinmektedir. Burada en önemli faktör genotiptir. Her hücre genotipinin sentezleyebileceği sekonder metabolit tip ve miktarı farklıdır. Bir diğer önemli faktör ise başlangıç materyali olarak kullanılan eksplantın tipidir. Asmada sekonder metabolit üretimi ile ilgili araştırmalarda çoğunlukla yaprak sapları kullanılmaktadır (Zhang vd., 2002; Tassoni vd., 2005). Başlangıç materyali olarak Concord çeşidine ait olgunlaşmamış tanelerden ve yaprak saplarından oluşan kallusların kullanıldığı araştırmada Shure ve Acree (1994), β -damascenone üretiminde yaprak sapından elde edilen kalluslarda daha başarılı sonuçların alındığını belirtmişlerdir.

Hücre süspansiyon kültürlerinde metabolit üretiminde önemli olan bir diğer faktör de elisitörün uygulandığı ve uygulama sonrası hücrelerden örnek alındığı dönemdir. Her hücrenin hedef metaboliti en yüksek düzeyde sentezlediği belirli bir dönem bulunmaktadır. Bu dönem, hücrelerin içinde buldukları gelişme durumları ile ilgilidir. Yapılan çalışmalar belirli bir gelişme süreci sonrası alt kültüre alınan hücrelerde yeniden bir büyüme döneminin başladığını göstermektedir. Asmada yapılan araştırmalar kültürlerin 5. ya da 7. gününde elisitör uygulamalarının gerçekleştirilmesinin uygun olduğunu göstermektedir. Elisitör uygulaması sonrası kültür ortamında büyümesini ve gelişmesini sürdüren hücrelerin ortamdan alındıkları dönem de metabolit birikimi bakımından önemlidir. Farklı dönemlerde yapılan örneklemelerde metabolit sentezinin son derece değişken olduğu belirlenmiştir. Örneğin Krisa vd. (1999a), elisitör uygulaması sonrası maksimum antosiyanin üretiminin 12. günde gerçekleştiğini

bildirmişlerdir. Bu nedenle optimizasyon bakımından farklı zamanlarda örnek olarak değişimi saptamak gerekmektedir.

Hücre kültürlerinde başarıyı etkileyen bir diğer faktör ise, kültüre alınan hücrelerin miktarıdır. Bitki hücre kültürleri tek hücreler ile agregatların karışım halinde bir arada oldukları bir topluluktur. Agregatlar farklı kültür sistemlerinde sayıları birkaç ile birkaç yüz arasında değişen farklı büyüklüklere sahip topluluklardır. Agregatlar içerisindeki her bir hücre oksijen ve besin elementleri taşınımı bakımından farklı bir mikro çevreye sahiptir. Bu durum hücre büyümesini ve üretilecek metabolitin tipini ve miktarını doğla olarak etkilemektedir. Dolayısıyla sabit bir metabolit üretiminde kültürlerin homojen olması, kültürün uygunluğunun düzenli olarak incelenmesi ve optimize edilmiş olması önemlidir (Qu vd., 2006).

3. Sonuç

Bitkilerden elde edilen ve insan sağlığı üzerinde önemli etkileri olan, aynı zamanda çok farklı alanlarda da kullanım olanağı olan, ekonomik değeri yüksek sekonder metabolitlerin kitlesel boyutta üretilebilmesi son derece önemlidir. Geleneksel yöntemlerle doğadan toplama ve ekstrakte etme işlemi pek çok dezavantajı nedeni ile modern teknolojide yerini in vitro tekniklere bırakmıştır. Özellikle hücre kültürleri ile yüksek miktarda metabolit üretmek mümkündür. Bununla birlikte bileşen üretimi halen istenilen seviyeye ulaşamamıştır. Bu nedenle doğru besin ortamı, uygun başlangıç materyali ve uygun elisitörlerin kullanıldığı kültürlerin biyoreaktörler ile kitlesel üretiminin sağlanmasına yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Kaynaklar

Alvarez, M.A. (2014). Plant Biotechnology for Health : From Secondary Metabolites to Molecular Farming, Springer International Publishing.

Andi, S.A., Gholamib, M., Fordc, C.M., & Maskanib, F. (2019). The effect of light, phenylalanine and methyl jasmonate, alone or in combination, on growth and secondary metabolism in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*.<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111625>.

Aubert, C., & Chalot, G. (2018). Chemical composition, bioactive compounds, and volatiles of six table grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Food Chemistry*, 240, 524-533.

Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Defieux, G., Krisa, S., & Merillon, J.M. (2004). Production of highly ¹³C-labeled

polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Journal of Biotechnology*, 109, 287-294.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.

Bekheet, S., & Sota, V. (2023). In vitro production of plant nutraceuticals. Review article. *Biotechnology*, 22(1), 1-17.

Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., & Merillon, J.M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 493-499.

Bhaskar, R., Xavier, L., Udayakumaran, G., Kumar, D., Venkatesh, R., & Nagella, P. (2021). Biotic elicitors: a boon for the in-vitro production of plant secondary metabolites. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149(1-2), 7-24.

Cai, Z., Kastell, A., Speiser, C., & Smetanska, I. (2013). Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2), 330-340.

Commun, K., Mauro, M.C., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M., & Jeandet, P. (2003). Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 317-323.

Cormier, F., Crevier, H.A., & Do, C.B. (1990). Effect of sucrose concentration on accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspensions. *Canadian Journal of Botany*, 68, 1822-1825.

De la Cerda-Carrasco, A., López-Solís, R., Nuñez-Kalasic, H., Peña-Neira, Á., & Obreque-Slier, E. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1521-1527.

Decendit, A., & Merillon, J.M. (1996). Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 15, 762-765.

Decendit, A., Ramawat, K.G., Waffo-Teguo, P., Deffieux, G., Badoc, A., & Merillon, J.M. (1996). Anthocyanins catechins condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Biotechnology Letters*, 18, 659-662.

Decendit, A., Waffo Tegu, P., Richard, T., Krisa, S., Vercauteren, J., Monti, J.P., Deffieux G., & Merillon, J.M. (2002). Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 60, 795-798.

Dillard, C.J., & German, J.B. (2000). Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *Journal of Food Chemistry*, 80, 1744-1756.

Do, C.B., & Cormier, F. (1991). Accumulation of peonidin 3-glucoside enhanced by osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 24, 49-54.

Donnez, D., Kim, K.H., & Antoine, S. (2011). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochemistry*, 46(5), 1056-1062.

Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844-1858.

Hoseinpanahi, B., Bahramnejad, B., Majdi, M., Dastan, D., & Ashengroph, M. (2020). The effect of different elicitors on hairy root biomass and resveratrol production in wild *Vitis vinifera*. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(1), 25-31.

Hosseini, S.M., Bahramnejad, B., DouletiBaneh, H., Emamifar, A., & Goodwin, P.H. (2017). Hairy root culture optimization and resveratrol production from *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 33, 67.

Höll, J., Vannozzi, A., & Czemplin, S. (2013). The R2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell*, 25(10), 4135-4149.

Jeong, Y.J., Park, S.H., Park, S.C., Kim, S., Kim, T.H., Lee, J., Kim, S.W., Ryu, Y.B., Jeong, J.C., & Kim, C.Y. (2020). Induced extracellular production of stilbenes in grapevine cell culture medium by elicitation with methyl jasmonate and stevioside. *Bioresources and Bioprocessing*, 7, 38.

Kieran, P.M., Mac Loughlin, P.F., & Malone, D.M. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59, 39-52.

Kim, B.J., Gibson, D.M., & Shuler, M.L. (2004). Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnology Progress*, 20, 1666-1673.

Kline, K., Yu, W., & Sanders, B.G. (2004). Vitamin E and breast cancer. *Journal of Nutrition*, 134, 34585-34625.

Krisa, S., Teguo, P.W., Decendit, A., Deffieux, G., Vercauteren, J., & Merillon, J.M. (1999a). Production of ¹³C-labelled anthocyanins by *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 51, 651-656.

Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., & Mérillon, J.M. (1999b). Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and ¹³C biolabeling. *Journal of Natural Production*, 62, 1688-1690.

Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Cheze, C., Deffieux, G., & Merillon, J.M. (1998). Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Reports*, 17, 946-950.

Malamy, J., & Klessig, D.F. (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. *The Plant Journal*, 2, 643-654.

Martínez Maqueda, D., Zapatera, B., Gallego Narbón, A., Vaquero, M.P., Saura Calixto, F., & Pérez-Jiménez, J. (2018). A 6-week supplementation with grape pomace to subjects at cardiometabolic risk ameliorates insulin sensitivity, without affecting other metabolic syndrome markers. *Food Function*, 9(11), 6010-6019.

Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2017). Carotenoids: Biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 174, 1290-1324.

Millar, C.L., Duclos, Q., Garcia, C., Norris, G.H., Lemos, B.S., DiMarco, D.M., & Blesso, C.N. (2018). Effects of freeze-dried grape powder on high-density lipoprotein function in adults with metabolic syndrome: a randomized controlled pilot study. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 16(9), 464-469.

Murthy, K.N.C., Singh, R.P., & Jayaprakasha, G.K. (2002). Antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5909-5914.

Nagamori, E., Hiraoka, K., Honda, H., & Kobayashi, T. (2001). Enhancement of anthocyanin production from grape (*Vitis vinifera*) callus in a viscous additive supplemented medium. *Biochemistry Engineering Journal*, 9, 59-65.

Naik, P.M., & Al-Khayri, J.M. (2016). Impact of Abiotic Elicitors on *In vitro* Production of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Journal of Advanced Research in Biotechnology*, 1(2), 7.

Nail, M.C., & Roberts, S.C. (2004). Preparation of single cells from aggregated *Taxus* suspension cultures for population analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 817-826.

Niesen, D.B., Hessler, C., & Seeram, N.P. (2013). Beyond resveratrol: a review of natural stilbenoids identified from 2009–2013. *Journal of Berry Research*, 3,181–196.

Nivelle, L., Hubert, J., Courot, E., Borie, N., Renault, J.H., Nuzillard, J.M., Harakat, D., Clément, C., Martiny, L., Delmas, D., Jeandet, P., & Tarpin, M. (2017a). Cytotoxicity of labruscol, a new resveratrol dimer produced by grapevine cell suspensions, on human skin melanoma cancer cell line HT-144. *Molecules*, 22(11), 1940.

Nivelle, L., Hubert, J., Courot, E., Jeandet, P., Aziz, A., Nuzillard, J.M., Renault, J.H., Clément, C., Martiny, L., Delmas, D., & Tarpin, M. (2017b). Anti-cancer activity of resveratrol and derivatives produced by grapevine cell suspensions in a 14 L stirred bioreactor. *Molecules*, 22(3), 474.

Nopo Olazabal, C., Condori, J., Nopo Olazabal, L., & Medina Bolivar, F. (2014). Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of *Vitis rotundifolia* treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 50-69.

Purkayashta, R.P. (1995). Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: M. Daniel, R.P. Purkayashta (Eds.), *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*, Marcel Dekker, 1-39 p. New York.

Qu, J.G., Zhang, W., Jin, M.F., & Yu, X.J. (2006). Effect of homogeneity on cell growth and anthocyanin biosynthesis in suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22 (5), 805-810.

Raluca, M., Sturzoiu, C., Florenta, H., Aurelia, B., & Gheorghe, S. (2011). Biotic and abiotic elicitors induce biosynthesis and accumulation of resveratrol with antitumoral activity in the long - term *Vitis vinifera* L. callus cultures. *Roman Biotechnology Letters*, 16(6), 6683-6689.

Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.

Saldamlı, İ. (2007). Gıda Kimyası. *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*. Ankara, 463-492.

Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216.

Shen, J., Zhou, Q., Li, P., Wang, Z., Liu, S., He, C., Zhang, C., & Xiao, P. (2017). Update on phytochemistry and pharmacology of naturally occurring resveratrol oligomers. *Molecules*, 22, 2050.

Shure, K., & Acree, T. (1994). Production of β -damascenone precursors in cell cultures of *Vitis labrusca* cv. Concord grapes. *Plant Cell Reports*, 13, 477-480.

Sökmen, A., & Gürel, E. (2001). Sekonder Metabolit Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi. *Selçuk Üniversitesi Yayınları*, Konya, 211-261.

Taghizadeh, M., Malekian, E., Memarzadeh, M.R., Mohammadi, A.A., & Asemi, Z. (2016). Grape seed extract supplementation and the effects on the biomarkers of oxidative stress and metabolic profiles in female volleyball players: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 18(9), 1-9.

Tassoni, A., Fornale, S., Franceschetti, M., Federica, M., Michael, A., Perry, B., & Bagni, N. (2005). Jasmonates and Na orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist*, 166, 895-905.

Thaw Saw, N.M.M., Riedel, H., Kütük, O., Ravichandran, K., & Smetanska, I. (2010). Effect of Elicitors and Precursors on the Synthesis of Anthocyanin in Grape *Vitis vinifera* Cell Cultures. *Energy Research Journal* 1(2), 189-192.

Theis, N., & Lerda, M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal Plant Science*, 164 (3), 93-102.

Tholl, D. (2006). Terpene syntheses and the regulation diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 297-304.

Topçu, Ş., & Çölgeçen, H., 2015. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(2), 9-29.

Vitrac, X., Krisa, S., Decendit, A., Vercauteren, J., Nühlich, A., Monti, J.P., Deffieux, G., & Merillon, J.M. (2002). Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 95, 49-56.

Waffo Teguo, P., Hawthorne, M.E., Cuendet, M., Merillon, J.M., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., & Mehta, R.G. (2001). Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoid and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Nutrition and Cancer*, 40, 173-179.

Xu, A., Zhan, J.C., & Huang, W.D. (2015). Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122(1), 197-211.

Yubero, N., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Villanueva, S., Carrion, J.M., Larrarte, E., & Moro, C. (2013). LDL cholesterol-lowering effects of grape extract used as a dietary supplement on healthy volunteers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(4), 400-406.

Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., & Franco, C. (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, 162, 459-468.

BÖLÜM VIII

BIYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE BİTKİ BAZLI PROTEİN TOZU ÜRETİMİ

Production of Plant Based Protein Powder by Biotechnological Methods

FADIME SEYREKOĞLU

(Dr. Öğr. Üyesi), Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu
Gıda İşleme Bölümü, Suluova, Amasya, Türkiye
E-mail: fadime.tokatli@amasya.edu.tr
ORCID: 0000-0001-9787-4115

Özet

Bitkisel protein tozu, sağlıklı bir yaşam tarzının önemli bir bileşeni haline gelmiştir. Sporcular, veganlar ve sağlıklı beslenmek isteyen birçok kişi, bitkisel protein tozlarını günlük beslenmelerinin bir parçası olarak kullanmaktadır. Bu artan talep, bitkisel protein tozu üretiminde biyoteknolojik yöntemlerin kullanımını teşvik etmektedir. Bu bölümde biyoteknolojik yöntemler ve diğer yöntemler ile bitkisel protein tozu üretimi ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar yer almaktadır. Bitkisel protein tozu üretiminde, biyoteknoloji özellikle protein içeriğini artırmak, kaliteyi iyileştirmek ve çevresel sürdürülebilirliği sağlamak için kullanılır. İlk olarak, bitkisel protein tozu üretimi için uygun bitki kaynakları seçilmelidir. Soya fasulyesi, bezelye, mercimek, chia tohumları gibi bitkiler, yüksek protein içerikleri nedeniyle tercih edilen kaynaklardır. Biyoteknoloji, bu bitkilerin protein içeriğini artırmak için gen mühendisliği, doku kültürü ve seleksiyon yöntemlerini içerir. Ayrıca enzim kullanımı ile bitkisel materyallerden protein izolasyonu daha kolay gerçekleşmektedir. Alkali ve tuz ile çöktürme yöntemleri yaygın olarak kullanılmakla birlikte enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile protein verimi, kalitesi artırılırken ekstraksiyon süresi kısalmaktadır. Endüstriyel açıdan değerlendirdiğimizde tüm bu avantajlar biyoteknolojik yöntemlerin önemini ortaya koymaktadır. Biyoteknolojik olarak

bitkisel materyalde genlerle düzenleme yapılarak protein oranı da arttırılabilir. Fakat bu bölümde bitki yetiştikten sonraki dönemde bitki materyalinden protein eldesinde kullanılan enzimler, hammaddeler ve verim üzerindeki etkilerine değinilmiştir. Son yıllarda giderek önem kazanan protein içeriği yüksek olan gıdalara yenilerini ekleyebilmek bu çalışmalar ile mümkün olacaktır. Üretilen bitkisel bazı proteinler gıdalara eklenip kullanılabilirlikleri de belirlenmelidir.

Anahtar kelimeler: bitki bazı protein, biyoteknolojik, enzim, çöktürme

Abstract

Plant based protein powder has become an essential component of a healthy lifestyle. Athletes, vegans and many people who want to eat healthy use plant protein powders as part of their daily diet. This increasing demand encourages the use of biotechnological methods in the production of vegetable protein powder. In this section, biotechnological methods and other methods and the production of plant based protein powder and studies on this subject are included. In the production of plant based protein powder, biotechnology is used especially to increase protein content, improve quality and ensure environmental sustainability. First, suitable plant sources should be selected for the production of plant based protein powder. Plants such as soybeans, peas, lentils, and chia seeds are preferred sources due to their high protein content. Biotechnology includes gene engineering, tissue culture and selection methods to increase the protein content of these plants. In addition, protein isolation from plant materials is easier with the use of enzymes. Although alkaline and salt precipitation methods are widely used, the enzyme-assisted extraction method increases protein yield and quality and shortens the extraction time. From an industrial point of view, all these advantages reveal the importance of biotechnological methods. Biotechnologically, the protein ratio can be increased by regulating the plant material with genes. However, in this section, the enzymes used in the production of protein from the plant material in the period after the plant is grown, the raw materials and their effects on the yield are mentioned. With these studies, it will be possible to add new foods with high protein content, which has become increasingly important in recent years. Produced plant-based proteins should be added to foods and their usability should be determined.

Keywords: plant-based protein, biotechnological, enzyme, precipitation

1. Giriş

Bitkisel proteinler bitkisel kaynaklı atıklar ve yan ürünleri arasında yer alan önemli biyoaktif bileşenler içeren materyallerdir. Protein yetersizliği giderek

artış gösteren bir sağlık sorunudur. Modern beslenme biçimi uygulayan ve diyet yapan insanlarda yetersiz protein alımı görülmektedir. Giderek artış gösteren nüfus, hayvansal protein eldesin de çevrenin olumsuz etkilenmesi vejetaryenlik ve vegan eğilimindeki artış yenilenebilir ve sürdürülebilir protein kaynaklarına ihtiyacı da beraberinde getirmektedir (Pojić vd., 2018).

Depo proteinleri olarak da bilinen bitkisel proteinler bitki metabolizmasını etkileyerek proteinlerin besin değerlerini ve fonksiyonel özelliklerini belirlemektedirler (Saldamlı ve Temiz, 2017). Oldukça çeşitli fonksiyonel özelliklere sahip olan bitki bazlı proteinler bu özellikleri sayesinde gıda sanayinde geniş bir kullanıma sahiptir. Aroma, tekstür, kıvam, jelleştirme, çözünürlük, viskozite, köpürme, emülsifikasyon gibi fonksiyonel özelliklerde iyileştirme sağlamaktadır (Pour-El, 1981).

Bitkisel bazlı proteinler gıda ve besin takviyelerinde önemli fonksiyonel özelliklere sahiptir. Sahip olduğu emülsifiye etme, su bağlama, köpürme ve jelleştirme gibi fonksiyonel özellikleri ile gıda ve sağlık sektöründe biyopolimer geliştirme malzemesi olarak kullanılırlar (Gupta ve Nayak, 2015).

Özel beslenme biçimlerini seçen vejetaryen ve vegan gibi tüketici grupları soya fasulyesi gibi bitkisel kaynaklı proteinler ile protein gereksinimlerini karşılamaktadır. Nohut, fasulye, pirinç, mısır, patates, buğday, yer fıstığı, ceviz ve fındık alternatif bitkisel bazlı protein kaynaklarıdır (Özdemir vd., 2013). Bitkisel materyallerden protein izolasyonu için elektroforez, santrifüjleme, çöktürme, kromatografi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Elektroforez ve kromatografi yöntemlerinde proteinlerin şekil, boyut ve yükleri önem taşırken; çöktürme yönteminde ise çözünürlük özellikleri önem taşımaktadır (Kumar ve Sharma, 2015).

Bu bölümde bitkisel bazlı protein tozu üretim yöntemleri ve konu ile ilgili çalışmalardan bahsedilmiştir.

2. Bitki Bazlı Proteinler

Nüfusun artması ile birlikte baklagiller, tahıllar, meyveler, tohumlar ve kabuklu yemişlerden elde edilen bitkisel bazlı proteinlere karşı olan talepte artış göstermiştir (Rincon vd., 2020). Bazı sağlık problemleri, değişen beslenme alışkanlıkları ve çevre ile ilgili oluşan endişeler toplumun bitkisel bazlı proteinlere eğilimini arttırmıştır (Atalar vd., 2021).

Gıda güvenliği, küresel yetersiz beslenme, yenilenebilir ve sürdürülebilir besin kaynakları ile ilgili endişeler alternatif proteinler ile ilgili çalışmaların artışını sağlamıştır (Godfray vd., 2010). Bitkiler, mikroorganizmalar, bakteriler, mantarlar, algler, doku kültürü ve böcekler alternatif protein kaynaklarını

oluşturmaktadır (Asgar vd., 2010). Karbonhidrat ve yağ işleme sanayinde çıkan yan ürünler ve atıklardan bitkisel bazlı proteinler üretilerek üretimde ortaya çıkan atıklar değerlendirilmekte ve hammadde bütünüyle değerlendirilmektedir. Ortaya çıkan yan ürünlerde antioksidan, antimikrobiyal bileşikler, diyet lifleri, sekonder metabolitler gibi değerli bileşenler yer almaktadır (González-Pérez & Vereijken, 2007; Rezig vd., 2013; Tulbek vd., 2017).

Bitkisel kaynaklı ve hayvansal kaynaklı proteinler gıda proteinlerini oluşturmaktadır. Bu proteinler kendilerini oluşturan aminoasit bileşenleri, fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca avantaj ve dezavantajları mevcuttur (Beran vd., 2018). Hayvansal proteinler bütün esansiyel aminoasitlere sahiptir ve sindirim oranları yüksektir. Fakat yoğun biçimde tüketilmeleri sonucunda yapısında bulunan yağ ve kolesterol kalp-damar rahatsızlıkları, obezite ve kansere sebep olabilir (Muguerza vd., 2004).

Artan nüfus ve çevre bilincinin gelişmesi, sürdürülebilir gıdalara yönelik yapılan çalışmaların sayısını arttırmaktadır (Aiking, 2011). Hayvansal kaynaklı proteinler sera gazı emisyonlarını arttırarak iklim değişikliğine, enerji ve su tüketimine neden olmaktadır. Bitkisel bazlı proteinlerin kullanımı ile bu problemleri önleyebiliriz (Nielsen vd., 2018; Stehfest vd., 2009).

Bitkisel kaynaklı proteinlerin protein miktarı ve sindirilebilirliği hayvansal kaynaklı proteinlere göre daha azdır. Fakat tüketilen protein miktarı arttırılarak bu problem ortadan kaldırılabilir. Hayvansal kaynaklı proteinlere göre daha ucuzdur ve oldukça geniş kaynak çeşitliliği vardır. Özellikle ekonomisi gelişmekte olan ülkelerde iyi bir alternatif protein kaynağıdır (Mariotti, 2017). Vejetaryen ve vegan gibi özel tüketici grupları içinde fonksiyonel ve oldukça faydalı protein kaynağıdır. İlaveten yapısında bulunan yüksek lif içeriği uzun süre tokluk sağlamaktadır (Asgar vd., 2010; Kristensen vd., 2016).

Soya proteinleri en yüksek üretimi ve tüketimi olan bitkisel kaynaklı proteinlerdir. Soya fasulyesi yaklaşık olarak yapısında %40 protein içermektedir. Üretimini kolay olması, emülsiyon ve tekstür oluşturma gibi fonksiyonel özelliklere sahip olması ve ekonomik olması soya fasulyesinden protein eldesinde avantaj sağlamaktadır (Endres, 2001, Nilüfer, 2006). Soya fasulyesi yüksek lif içeriği ve yapısında bulunan tüm esansiyel aminoasitler, demir, kalsiyum ve çinko açısından oldukça zengindir (Asgar vd., 2010).

Piyasada en fazla üretimi ve tüketimi olan bitkisel protein grubu soya proteinleridir. Fakat bazı insanlar için bileşiminde bulunan bazı maddeler alerjik reaksiyon oluşturabilir. Bundan dolayı soya fasulyesine alternatif olarak acı bakla, fasulye, mısır, pirinç, patates, bezelye, ayçiçeği bitkilerinden de bitki

bazlı proteinler üretilmektedir. Literatürde yer alan çalışmaların bir bölümü Tablo 1.'de verilmiştir.

Tablo 1. Bitki atıkları veya yan ürünlerinden protein elde etmek için yapılan bazı çalışmalar

Gıda Grubu	Kullanılan Ürün	Kaynak
Yeşil yapraklı bitki	Çay yaprağı atıkları	Qiaoyun vd., (2017)
Meyve ve sebzeler	Domates atıkları ve kabukları	Meshkani vd., (2016)
	Kayısı çekirdeği	Sharma vd., (2010)
	Nar taneleri	Talekar vd., (2018)
Tahıllar	Mısır yaprağı	Wikberg vd., (2017)
	Pirinç kepeği	Phongthai vd., (2016)
	Yulaf kepeği	Prosekov vd., (2018)
Yağlı tohumlar	Susam kepeği	Görgüç vd., (2019)
	Susam unu (yağsız)	Achouri vd., (2012)
	Fıstık ezmesi (yağsız)	Batal vd., (2005)
	Keten tohumu küspesi	Tirgar vd., (2017)

Son yıllarda tahıllardan ve yalancı tahıllardan elde edilen proteinlere karşı talepte artış görülmüştür. Artış gösteren talebi karşılamak için meyveler, baklagiller, tohumlar ve kabuklu yemişlerden de bitkisel bazlı proteinler üretilmektedir (Rincon vd., 2020).

Susam tohumu, fıstık tohumu, ayçiçeği tohumu, kolza tohumu, kanola tohumu gibi yağlı tohumlar, pirinç, buğday, arpa, yulaf gibi tahıllar, acı bakla, mercimek, bezelye, nohut gibi baklagiller günümüzde önemli bitkisel protein kaynakları arasında yer almaktadır. Hepsi yapılarında farklı aminoasit bileşimi göstermektedir (Duranti, 2006).

Bitki bazlı proteinlerin önemli kaynakları arasında yeşil bitkiler ve yaprakları da yer almaktadır. Bu bitkiler alternatif protein kaynaklarıdır. Yeşil bitkiler ve yaprakları minerallerden kalsiyum, bakır, demir, fosfor, çinko vitaminlerden, A, D, E, K gibi yağda eriyen ve B, C gibi vitaminler ve klorofil, kumarin, karoten, izoflavonlar gibi fitokimyasal bileşenler, sekonder metabolitler ve fitöosterjenler açısından zengindirler (Tenorio, 2017a). Yonca, pancar yaprağı, ıspanak, çim, çay yaprağı gibi bol miktarda protein içeren bitkiler ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Fakat bu proteinlerin gıdalarda kullanımı ticari olarak hayata geçirilmemiştir (Tenorio vd., 2016).

Yeşil bitki ve yapraklarından elde edilen protein konsantresi suda çözünen protein fraksiyonudur. Nötr ve beyaz renkli olan protein konsantresinin büyük bölümü Ribuloz 1,5 bifosfat karboksilaz oksijenaz (rubisco) dan oluşmaktadır (Tenorio, 2017a). Rubisco sahip olduğu fonksiyonel özellikleri ile gıda sanayinde kullanılabilir niteliktedir. Fakat bu durum saflık kriterine ve kullanılan hammaddeye göre değişkenlik gösterebilir (De Jong ve Nieuwland, 2011; Lamsal vd., 2007).

Yeşil sebzeler ve yaprakları %85-95 nem oranına sahip olduğu için bu durum protein ekstraksiyonunu sınırlandırmaktadır. Taşıma ve üretim esnasında mikrobiyal ve enzimatik bozulmalar görülebilir. Bu durumu engellemek için yapraklar dondurma veya kurutma ile stabilize edilmelidir. Fakat kurutma protein ekstraksiyonunda bazı problemlere sebep olduğu için önerilmez (Bals vd., 2012, Tenorio vd., 2017c). Tenorio vd. (2017c) tarafından şeker pancarı yapraklarından protein üretiminde dondurma yöntemi stabilizasyon için en uygun yöntem olarak belirlenmiştir.

3. Protein Ayrıştırma Yöntemleri

Kromatografi, çöktürme ve ultrafiltrasyon proteinleri ayırmada kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (Novák ve Havlíček, 2016). Proteinlerin yükü, boyutu, şekli ve özellikleri kromatografi ve ultrafiltrasyon yönteminde önem taşımaktadır. Çöktürme yönteminde ise çözünürlük özellikleri ve izoelektrik noktaları önem taşır (Kumar ve Sharma, 2015).

3.1. Alkali Ekstraksiyon ve İzoelektrik Çöktürme Yöntemi

Proteinler, karboksil (COOH) ve amino grubundan (NH₂) oluşan organik bileşiklerdir. Bu durum proteinlerin asidik durumda bazik, bazik durumda ise asidik davranmasına sebep olmaktadır (Harvey ve Ferrier, 2010).

Fakat proteinlerin hem asit hemde baz ile tepkime vermediği yüklerinin sıfır olduğu pH değerine izoelektrik nokta denilmektedir. Bu noktada proteinlerin çözünürlükleri düşüktür (Moldoveanu ve David, 2013). Böylece pH değişimi ile çözünürlük artırılarak izoelektrik / ekstraksiyon çöktürme yöntemi ortaya çıkarılmıştır.

Alkali ekstraksiyon ve izoelektrik çöktürme yöntemi ile protein izolatinın elde edildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bu çalışmaları şöyle özetleyebiliriz. Keten tohumu ekstraksiyonu şartları olarak pH 8,6, katı: çözücü (1/16) ve ekstraksiyon süresi 24 saat olarak ve sonrasında çöktürme işleminde şartlar pH 4,2, sıcaklık 4 °C ve süre olarak 16 saat uygulanmıştır. Bu işlemler sonucunda %90,6 saflık içeren protein izolatu üretilmiştir (Kaushik vd., 2016).

Tropik meyve çekirdeklerinden protein eldesi için bu yöntem kullanılmıştır. Ekstraksiyon şartları 2-12 pH, sıcaklık 25 °C süre 30 dakika ve katı sıvı oranı 1:20 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve meyve çekirdeklerinin maksimum ve minimum çözünme şartları belirlenmiştir. pH 12 iken proteinlerin çözünürlük değerleri %80 ile maksimum değeri göstermiştir. pH için pH 12 değeri seçilmiştir. Çöktürme işlemi pH 4 iken gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon ve çöktürme işlemleri sonucunda elde edilen protein konsantrasyonlarının protein miktarı 844,3 g/kg olarak tespit edilmiştir (Ulloa vd., 2017).

Kenevir tohumu küspesinden protein ekstraksiyonunun yapıldığı bir çalışmada pH 10, katı:sıvı oranı 1/20 ve ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı 2 saat ve 35 °C olarak ayarlanmıştır. Sonrasında çöktürme işlemi 5 pH ve sıcaklığı 4 °C olacak şekilde bir gece çöktürme işlemi yapılmıştır. Çalışma sonunda %91,4 saflıkta protein izolatları üretilmiştir (Hadnaev vd.,2018).

Farklı bir çalışmada *Buchholzia coriacea* kullanılmıştır. *Buchholzia coriacea* çekirdekleri ayrılarak protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma şartları olarak pH 8 ve katı/sıvı oranı olarak da 1/20, sıcaklık ve süre ise 37 °C'de 2 saat olacak şekilde ekstraksiyon yapılmıştır. Çöktürme pH 5'te uygulanmıştır. İşlem sonucundaki protein konsantrasyonlarının protein miktarı %56,45 olarak tespit edilmiştir (Ijarotimi vd., 2018).

3.2. Tuz Destekli Ekstraksiyon/ Çöktürme Yöntemi

Bu yöntemde, protein moleküllerinin iyonik şiddeti ayarlanır ve proteinlerin çözünürlükleri değiştirilerek bu farklılıklardan yararlanır. Düşük konsantrasyona sahip tuz protein solüsyonuna eklendiğinde protein ile tuz iyonları arasında oluşan elektrostatik proteinlerin başka bileşiklerle bağ yapmasına engel olur. Bu durum proteinlerin çözünürlüğünün artmasını sağlar ve tuz ile çözdürme olarak adlandırılır (Novák ve Havlíček, 2016). Artan tuz konsantrasyonu sayesinde su molekülleri tuz iyonları ile etkileşerek yüzey geriliminin artmasını sağlar ve proteinler daha sıkı katlanır. Protein- yüzey alanı azaldığında ise protein su etkileşimi azalarak hidrofobik grupların çökmesi sağlanır (Novák ve Havlíček, 2016).

Bu yöntemde potasyum klorür ve sodyum klorür kullanılabilir. Fakat amonyum sülfat tuzu hem ekonomik olması hemde suda daha fazla çözünmesi ile daha yaygın kullanılmaktadır (Nelson ve Cox, 2005). Yöntemde fazla tuzu uzaklaştırmak için diyaliz uygulanmaktadır (Duong-Ly vd., 2014). Bu işlemde pasif difüzyon ile yarı geçirgen bir zardan solüsyon geçirilir. Yüksek konsantrasyondaki tuz difüzyon ile tampon çözeltiye geçer ve protein saflaştırılmış olur (Harcum, 2008). Bu yöntem protein ve enzimlerin

saflaştırılmasında ön işlem olarak uygulanmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar giderek artış göstermektedir. Tuz destekli ekstraksiyon yöntemi ile ilgili çalışmalardan bazılarını şu şekilde kısaca açıklayabiliriz.

Su kabağından peroksidaz enzimi üretiminin yapıldığı çalışmada; su kabağı unu (20g), 50mL fosfat tamponu (pH 7) ile ekstrakte edilmiştir. Sonra %60-90 saflıkta olan amonyum sülfat ile çöktürme uygulanmıştır. 4 C°'de 12 saat diyaliz işleminden sonra kromatografik yöntemlerle protein saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir (Köksal vd., 2012).

Kalipatti sapota isimli tropikal meyveden polifenoloksidaz ve peroksidaz enziminin izole edilmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve kromatografi yöntemleri bir arada kullanılmıştır. Meyve pulpu fosfat tamponunda (pH 7) sıcaklık 4°C'de ve süre olarak 180 dakikada ekstrakte edilmiştir. Sonrasında %80 saflıktaki amonyum sülfat ile çöktürme uygulanmıştır (Vishwasrao vd., 2017).

Bir diğer çalışmada *Albizia lebeck* tohumları 10/1 oranında sodyum fosfat (pH 7.5) ile yarım saat ekstrakte edilmiştir. Ardından amonyum sülfat ile çöktürme yapılmıştır ve kromatografik yöntemlerle saflaştırma işlemi uygulanmıştır (Sharma vd., 2012).

Su kestanesinde kalkan izomeraz enzimi saflaştırılması çalışmasında ise su kestaneleri, fosfat tamponu (pH 7) ile ekstraksiyon uygulanmıştır. Kademeli olarak %35 ve %80 saflıkta amonyum sülfat ile bir gece çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında diyaliz işlemi uygulanmış ve kromatografik yöntemlerle saflaştırma işlemi yapılmıştır (He ve Pan, 2017).

Şeker kamışının depolanarak ve taze olarak yapısında bulunan selüloz enzimlerinden saflaştırıldığı çalışmada; şeker kamışı sitrat tamponu (ph 4.8) ile ekstrakte edilmiştir. Sonrasında amonyum sülfat çözeltisi ile çöktürme işlemi yapılmıştır. Bu proses sonucunda depolanmış şeker kamışından %35, taze olan şeker kamışından ise %49 oranında selüloz enzimi elde edilmiştir (Adetuyi vd., 2018).

Bahsettiğimiz bu yöntemlerden izoelektrik ve amonyum sülfat çöktürme yöntemleri farklı hammaddelerde farklı protein verimlerine neden olmaktadır. Maksimum oranda protein elde etmek için kullandığımız hammaddeye en uygun yöntemi kullanmamız gerekir. Literatürde yer alan bazı çalışma örnekleri şu şekilde sıralanabilir.

İzoelektrik, amonyum sülfat ve bu yöntemlerin kombinasyonlarının çay yapraklarında test edildiği çalışmada izoelektrik-amonyum sülfat çöktürme yöntemi en iyi sonuçları göstermiştir. Elde edilen konsantratlarda en yüksek protein miktarı bu yöntemle %89,70 olarak bulunmuştur (Cui vd., 2017).

İzoelektrik, amonyum sülfat ve alkol ile çöktürme yöntemlerinin mercimek protein izolasyonunda kullanıldığı bir çalışmada ise; amonyum sülfat ve alkol ile çöktürme yöntemleri ile yüksek protein verimi elde edilmiştir. Sırasıyla %93 ve %100 protein miktarı elde edilmiştir. Alkol ile çöktürme yöntemi en yüksek verim eldesini sağlamıştır. (Alsohaimy vd., 2007).

Porphyra umbilicalis, *Ulva lactuca* ve *Saccharina latissima* gibi kırmızı, yeşil, kahverengi deniz yosunlarından protein izolasyonunun yapıldığı çalışmada izoelektrik çöktürme ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılmıştır ve protein verimleri karşılaştırılmıştır. İzoelektrik çöktürme yöntemi *Porphyra umbilicalis* ve *Saccharina latissima* türlerinde, amonyum sülfat çöktürme yöntemi ise *Ulva lactuca* türünde en yüksek protein elde etmeyi sağlamıştır (Harrysson vd., 2018).

Zhang vd. (2017), tarafından yapılan patates protein konsantresi ile ilgili çalışmada ise izoelektrik ve amonyum sülfat çöktürme yöntemleri kullanılmıştır. Sonrasında elde edilen protein verimi karşılaştırılmıştır. %85.80 verim ile izoelektrik çöktürme yöntemi en yüksek protein miktarına sahip yöntem olarak belirlenmiştir (Zhang vd., 2017).

Benzer şekilde patatesle yapılan bir çalışmada farklı çöktürme yöntemleri kullanılmıştır. Asit, $FeCl_3$, $MnCl_2$, etanol, ısı asit kombinasyonu, amonyum sülfat çöktürme yöntemi uygulanarak protein izolatu elde edilmiştir. %98.60 ile maksimum oranda protein verimine sahip olan yöntem bu çalışma ile amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilmiştir (Waglay vd., 2014).

Yapılan farklı çalışmalarda protein verimi farklı oranlarda elde edilmiştir. Bu durumda kullanılan hammadde, hammaddenin sahip olduğu protein miktarı ve türü, kullanılan yöntem, yöntem parametreleri, uygulanan sıcaklık, pH gibi ortam şartları son durumdaki protein verimi üzerinde etkilidir.

3.3. Biyoteknolojik Yöntemler

Biyoteknolojik yöntemlerle bitkilerde genetik yapı değiştirilmektedir. Bu işlemler hastalıklara, zararlılara, herbisitlere ve strese karşı dayanıklılık sağlamak için yapılmaktadır. Ayrıca verimin artırılması ve kimyasal besin öğelerinin artışı içinde bu yöntemler kullanılmaktadır.

Kimyasal bileşiklerin kalitesini arttırmadaki amaç gıda ve beslenme fizyolojisi için daha uygun biçimde değerlendirmektir. Bitkide bulunmayan veya miktarı az olan bileşenler bitkiye aktarılmaktadır. Böylece bitki bu besin öğelerince zenginleştirilmektedir. Karbonhidratlar, vitaminler, mineraller, esansiyel yağ asitleri ve proteinlerin miktarını arttırmak için biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır.

Bitkilerdeki protein içeriğinin değiştirilmesindeki amaç yapısını oluşturan amino asitlerdir. Aminoasitler arasında yer alan lizin birçok gıda maddesinde ve yem bitkisinde yeterli miktarda yer almamaktadır. Araştırmalarda bitkilere enzim aktarımı yapılarak lizin sentezi sağlanmaktadır. Bu enzim lizin biyosentezinde görev almaktadır. Böylece bitkideki lizin miktarı artırılmaktadır (Demir vd., ,2006).

Bu şekilde bitkilerde biyoteknolojik yöntemlerle protein miktarı artırılabilir. Bitkisel bazlı protein üretiminde de enzimler aracılığıyla bitkilerde bulunan proteinler ekstrakte edilip protein izolatları elde edilmektedir.

Yukarıda bahsettiğimiz yöntemlerle protein ekstraksiyonu yaptığımızda protein veriminde ve fonksiyonel özelliklerinde bazı kayıplar oluşmaktadır. Özellikle selüloz, lignin, pektin ve hemiselüloz gibi polisakkarid yapısındaki bileşikler proteinlerin ekstraksiyonunu engellemektedir. Enzimler kullanıldığı zaman bu bileşikler parçalanır ve protein ekstraksiyonu kolaylaşırken verim de arttırılır. Enzim destekli ekstraksiyon yönteminde diğer kimyasallar kullanılmaz ve çevreye olan etkiler de daha olumlu olur (Nadar vd., 2018).

Enzimlerin kullanıldığı protein saflaştırılmasında besin değeri yüksek, oldukça iyi fonksiyonel özellikler gösteren, maksimum verimde ve kalitede protein izolasyonu sağlanmaktadır (Marathe vd., 2017).

Tablo 2. Protein ekstraksiyonunda kullanılan ticari enzimler

Ham madde	Kullanılan enzim	Referans
Mikroalg	Protex	Sari vd., (2016)
Fıstık	Alkalaz	Jiang vd., (2010)
Yulaf kepeği	Viscozyme- L	Liu vd., (2008)
Pirinç kepeği	hemiselülaz, Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L, Celluclast,	Hanmoungjai vd., (2002)
Çay yaprakları	Flavourzyme, Nötraz, Protamex ve Alkalaz,	Shen vd., (2008)
Zeytin yaprakları	Celluclast selülaz	Vergara-Barberan vd., (2015)
Soya fasulyesi unu	Celluclast, Hemiselülaz, Pektinaz, Proteaz	Rosenthal vd., (2001)

Enzimlerin protein ekstraksiyonunda kullanıldığı durumlarda kullanılan hammaddenin fizikokimyasal özelliklerine ve bileşimine göre farklı yapı ve özellikler gösteren enzimlerden yararlanılmaktadır. Böylece maksimum verimde

en iyi fonksiyonel özellikler gösteren protein izolatları elde edilmektedir. Tablo 2'de ticari olarak kullanılan enzimlerden bazıları yer almaktadır.

Literatürde sınırlı sayıda protein izolatlarının eldesinde enzimlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bu çalışmaların bazılarında diğer yöntemlerle karşılaştırmalar da yapılmıştır. Sonuçlara bakıldığında enzimlerin kullanıldığı yöntemde protein veriminde artış görülmektedir.

Yulaf kepeğinden protein izolasyonunun yapıldığı çalışmada Viscozyme L enzimi kullanılmıştır. Enzim miktarı ve ekstraksiyon koşulları yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilerek çalışma gerçekleştirilmiştir. Enzim kullanılmadan elde edilen protein verimi %14.76 iken Viscozyme L enzimi kullanılarak yapılan çalışmada protein verimi %56.20 çıkmıştır (Liu vd., 2008).

Fıstıktan proteinlerin ekstrakte edildiği çalışmada alkalaz enzimi kullanılarak protein verimi karşılaştırılmıştır. Enzim miktarı ve ekstraksiyon şartları optimize edilerek çalışma gerçekleştirilmiştir. Alkali ekstraksiyonu ile protein verimi %71.38; alkalaz enzimi kullanıldığında ise verim %88.22 olarak hesaplanmıştır (Jiang vd., 2010).

Sari vd. (2013), soya fasulyesi, kolza tohumu, mikroalg küspelerinden protein izolasyonu için alkali ekstraksiyonu ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanmıştır. Soya fasulyesi, kolza tohumu ve mikroalgler için alkali ekstraksiyon yönteminde protein verimi sırasıyla %80, %15, %30 enzim destekli ekstraksiyon yönteminde ise %90, %50 ve %80 olarak hesaplanmıştır (Sari vd., 2013).

Balkabağı çekirdeğinden albümin izolasyonunda geleneksel yöntem ile ultrasonik ekstraksiyon ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır ve protein verimi karşılaştırılmıştır. Enzim kullanılması ile protein verimi %16 oranında arttırılmıştır (Tu vd., 2015).

Susam tohumlarından protein ekstraksiyonu için enzim destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Protex, alcalase, natuzyme, kemzyme ve viscozyme enzim karışımları kullanılmıştır ve maksimum verim protex enzimi ile %87.1 olarak belirlenmiştir (Latif ve Anwar,2011).

Chirinos vd. (2017), *Plukenetia Volubilis* küspesinden protein izolasyonu konusunda yaptıkları çalışmada alkalaz enzimi kullanmışlardır. Ekstraksiyon yöntemi olarak alkali ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemleri optimize edilerek kullanılmıştır. Alkali ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemlerinde sırasıyla %29.7 ve %44.7 protein verimine ulaşmışlardır (Chirinos vd., 2017).

Enzimatik ekstraksiyon özellikle yapraklarda bulunan protein ekstraksiyonunda kullanılan bir yöntemdir. Suda çözünmeyen proteinlerin

yapıdan ayrılabilmesi için enzimlerden yararlanmak son zamanlarda çalışmalarda yer almaktadır.

Zeytin yapraklarından protein ekstraksiyonunun yapıldığı bir çalışmada celluclast enzimi kullanılmıştır. Kullanılan enzim yaprağın mezokarp kısmını parçalamıştır. Böylece zeytin yaprağında bulunan proteinlerin ekstraksiyonu daha kolay yapılarak protein verimi arttırılmıştır (Vergara-Barberán vd., 2015).

Benzer şekilde mikroalglerden protein ekstraksiyonu yapılmıştır. Enzim olarak proteaz enzimi kullanılmıştır. Alkali ve enzim destekli ekstraksiyon yöntemlerinde sırasıyla %32.7 ve %73.2 protein verimi hesaplanmıştır (Sari vd., 2016).

Proteinlerin ekstraksiyonunda enzim kullanılması protein verimini ve kalitesini arttırmaktadır. Yapılan bütün çalışmalarda enzim kullanımı protein veriminde artışa sebep olmuştur. Ayrıca bazı hammaddelerden protein ekstraksiyonu zorken enzim kullanımı bu durumu kolaylaştırmaktadır. Hem süre hemde endüstriyel alanda protein izolasyonunda enzim kullanımı birçok avantajı da beraberinde getirmektedir. Özellikle gıda alanında yan ürün veya gıda atıklarından protein izolasyonu ile ilgili çalışmalar son günlerde artış göstermektedir. Bu ürünlerin değerlendirilerek gıda endüstrisinde kullanım olanakları bu alanda yapılması planlanan çalışmalar ile artış gösterecektir.

Biyoteknolojik olarak enzim kullanımı protein ekstraksiyonunda son yıllarda giderek artış göstermekle beraber yapılan çalışmalar sınırlı sayıda kalmaktadır. Bu konu ile ilgili özellikle yüksek protein içeriğine sahip olan bitkisel bileşikler değerlendirilmelidir. Bitkisel materyalde hangi enzim kullanılmalı ve hangi ekstraksiyon yöntemi verimi ve kaliteyi arttırır bu parametreler belirlenmelidir.

Bu yöntemlerle elde edilen protein konsantreleri dondurarak kurutma veya püskürtmeli kurutma ile protein tozu haline getirilmektedir. Liyofilizatörde dondurarak kurutma, püskürtmeli kurutucuda ise püskürtmeli kurutma işlemleri uygulanmaktadır.

4. Sonuç

Her geçen gün dünya nüfusunun artış göstermesi besinlere ve proteinlere olan ihtiyacı da beraberinde getirmektedir. Hayvansal kaynaklardan sağlanan proteinlerin yeterli olmaması ve ekonomik olarak pahalı olması bitkisel kaynaklı proteinlere olan arzı da arttırmaktadır. Bitkisel materyallerin hammadde olarak kullanıldığı alanlarda atıkların değerlendirilmesinde de bitkisel bazı proteinlerin üretimi önem taşımaktadır.

Bitkisel proteinlerin üretim yöntemleri her geçen gün farklılıklar göstermektedir. Özellikle alkali ve tuz ile çöktürme yöntemleri yaygın halde kullanılan yöntemler arasındadır. Fakat kullanılan kimyasallar çevreye verdiği zarar bu yöntemlerin yerine yeni yöntemlerin kullanılmasına sebep olmaktadır. Biyoteknolojik yöntemler ile hammadde de bulunan proteinler atırılabilir veya gen transferi ile istenen proteinler üretilebilir. Ayrıca enzim destekli ekstraksiyon ile protein verimi ve kalitesi artırılabilir. Ekstraksiyon süresi kısılırken fonksiyonel protein üretimi sağlanabilmektedir. Biyoteknolojik yöntemler aynı zamanda bitkisel protein tozu üretim sürecinin çevresel sürdürülebilirliğini de artırır. Geleneksel tarım yöntemlerine göre daha az su ve enerji kullanımı gerektirir ve kimyasal gübre ve pestisit kullanımını azaltır.

Sonuç olarak, biyoteknolojik yöntemlerle bitkisel protein tozu üretimi, daha yüksek kaliteli ürünlerin, çevresel sürdürülebilirliğin ve verimliliğin sağlanmasına olanak tanır. Bu yöntemler, bitkisel protein tozu endüstrisinin geleceğinde önemli bir rol oynayacaktır ve tüketici talebi ile birlikte daha fazla yenilik beklenmektedir. Bu nedenle, bitkisel protein tozu üretiminde biyoteknolojik yöntemlere olan yatırım ve araştırmaların devam etmesi gerekmektedir. Üretilen bitkisel bazlı proteinlerin gıda takviyesi kullanımı dışında gıdalarda kullanım olanakları çalışmalarla belirlenmelidir. Böylece tüketiciler için fonksiyonel protein içeriği artırılmış daha ekonomik ve sağlıklı ürünler piyasada yer alabilecektir. Ayrıca vejetaryen, vegan gibi özel beslenme grupları içinde besin çeşitliliği arttırılacaktır.

Kaynaklar

Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food research international*, 46(1), 360-369.

Adetuyi, F. O., Akintimehin, E. S., Karigidi, K. O., Okonji, R. E., & Adeniyi, D. A. (2018). Partial purification and characterisation of cellulase from sugarcane as affected by postharvest storage of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) stem. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 41(1), 379-391.

Aiking, H. (2011). Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2-3), 112-120.

Alsohaimy, S. A., Sitohy, M. Z., & El-Masry, R. A. (2007). Isolation and partial characterization of chickpea, lupine and lentil seed proteins. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(1), 123-129.

Asgar, M. A., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., & Karim, A. A. (2010). Nonmeat protein alternatives as meat extenders and meat analogs. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(5), 513-529.

Atalar, I., Kurt, A., Gul, O., & Yazici, F. (2021). Improved physicochemical, rheological and bioactive properties of ice cream: Enrichment with high pressure homogenized hazelnut milk. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 24, 100358.

Bals, B. D., Dale, B. E., & Balan, V. (2012). Recovery of leaf protein for animal feed and high-value uses. *Biorefinery co-products: Phytochemicals, primary metabolites and value-added biomass processing*, 179-197.

Batal, A., Dale, N., & Café, M. (2005). Nutrient composition of peanut meal. *Journal of applied poultry research*, 14(2), 254-257.

Beran, M., Drahorad, J., Vltavsky, O., Urban, M., Laknerova, I., Fronck, M., ... & Formankova, S. (2018). Pilot-scale production and application of microparticulated plant proteins. *J Nutr Food Sci*, 8(1), 655-662.

Chirinos, R., Aquino, M., Pedreschi, R., & Campos, D. (2017). Optimized methodology for alkaline and enzyme-assisted extraction of protein from sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) kernel cake. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2), e12412.

Cui, Q., Ni, X., Zeng, L., Tu, Z., Li, J., Sun, K., Chen, X. and Li, X., 2017, Optimization of Protein Extraction and Decoloration Conditions for Tea Residues, *Horticultural Plant Journal*, 3(4), 172–176.

de Jong, A., & Nieuwland, M. (2011). *Literature study on the properties of Rubisco*. TNO.

Demir, A., Seyis, F., & Orhan, K. U. R. T. (2006). GENETİK YAPISI DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR: I. BİTKİLER. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(2), 249-260.

Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In *Methods in enzymology* (Vol. 541, pp. 85-94). Academic Press.

Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67-82.

Endres, J. G. (2001). *Soy protein products: characteristics, nutritional aspects, and utilization*. The American Oil Chemists Society.

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *science*, 327(5967), 812-818.

González-Pérez, S., & Vereijken, J. M. (2007). Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2173-2191.

Görgüç, A., Bircan, C., & Yılmaz, F. M. (2019). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food chemistry*, 283, 637-645.

Gupta, P., & Nayak, K. K. (2015). Characteristics of protein-based biopolymer and its application. *Polymer Engineering & Science*, 55(3), 485-498.

Hadnađev, M., Dapčević-Hadnađev, T., Lazaridou, A., Moschakis, T., Michaelidou, A. M., Popović, S., & Biliaderis, C. G. (2018). Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 526-533.

Hanmoungjai, P., Pyle, D. L., & Niranjan, K. (2002). Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 77(7), 771-776.

Harcum, S. (2008). Purification of protein solutions. In *Biologically inspired textiles* (pp. 26-43). Woodhead Publishing.

Harrysson, H., Hayes, M., Eimer, F., Carlsson, N. G., Toth, G. B., & Undeland, I. (2018). Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützing, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* (Linnaeus) JV Lamouroux using three different methods. *Journal of Applied Phycology*, 30, 3565-3580.

Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2010). Biochemistry (Lippincott's illustrated reviews series). *Biochem (Lippincott Illus Rev Ser)*.

He, F., & Pan, Y. (2017). Purification and characterization of chalcone isomerase from fresh-cut Chinese water-chestnut. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 402-409.

Ijarotimi, O. S., Malomo, S. A., Fagbemi, T. N., Osundahunsi, O. F., & Aluko, R. E. (2018). Structural and functional properties of *Buchholzia coriacea* seed flour and protein concentrate at different pH and protein concentrations. *Food Hydrocolloids*, 74, 275-288.

Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., & Xu, S. (2010). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 233-238.

Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C. J., Wang, B., & Adhikari, B. (2016). Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. *Food chemistry*, *197*, 212-220.

Koksal, E., Bursal, E., Aggul, A. G., & Gulcin, I. (2012). Purification and characterization of peroxidase from sweet gourd (*Cucurbita Moschata* Lam. Poiret). *International journal of food properties*, *15*(5), 1110-1119.

Kristensen, M. D., Bendsen, N. T., Christensen, S. M., Astrup, A., & Raben, A. (2016). Meals based on vegetable protein sources (beans and peas) are more satiating than meals based on animal protein sources (veal and pork)—a randomized cross-over meal test study. *Food & nutrition research*, *60*(1), 32634.

Kumar, P., & Sharma, S. M. (2015). An overview of purification methods for proteins. *Ijar*, *1*(12), 450-459.

Lamsal, B. P., Koegel, R. G., & Gunasekaran, S. (2007). Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT-Food Science and Technology*, *40*(9), 1520-1526.

Latif, S., & Anwar, F. (2011). Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food chemistry*, *125*(2), 679-684.

Liu, J., Guan, X., Zhu, D., & Sun, J. (2008). Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling. *LWT-Food science and technology*, *41*(10), 1913-1918.

Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., & Singhal, R. S. (2017). Enzyme-assisted extraction of bioactives. *Food bioactives: Extraction and biotechnology applications*, 171-201.

Mariotti, F. (Ed.). (2017). *Vegetarian and plant-based diets in health and disease prevention*. Academic Press.

Meshkani, S. M., Mortazavi, S. A., Rad, A. H. E., & Beigbabaei, A. (2016). Optimization of protein extraction and evaluation of functional properties of tomato waste and seeds from tomato paste plants. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, *13*(4), 2387-2401.

Moldoveanu, S. C. and David, V., 2013, Solutes in HPLC, Essentials in Modern HPLC Separations, 449-464.

Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(9), 452-457.

Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, *108*, 309-330.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.

Nielsen, L. V., Kristensen, M. D., Klingenberg, L., Ritz, C., Belza, A., Astrup, A., & Raben, A. (2018). Protein from meat or vegetable sources in meals matched for fiber content has similar effects on subjective appetite sensations and energy intake—a randomized acute cross-over meal test study. *Nutrients*, *10*(1), 96.

Nilüfer, D., Boyacıoğlu, D., Fak, İ. K. M., & Maslak, İ. Soya Esaslı Ürünlerde Protein Denatürasyonunun İki Farklı Yöntem ile İncelenmesi.

Novák, P., & Havlíček, V. (2016). Protein extraction and precipitation. In *Proteomic profiling and analytical chemistry* (pp. 51-62). Elsevier.

Özdemir, Y., Güven, E., & Özdemir, A. B. (2013). Et ürünlerinde kullanılabilir soya proteini alternatifleri. *Electronic J. of Food Tech*, *8*(1), 44-51.

Phongthai, S., Lim, S. T., & Rawdkuen, S. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of cereal science*, *70*, 146-154.

Pojić, M., Mišan, A., & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, *75*, 93-104.

Pour-El, A. K. I. V. A. (1981). Protein functionality: classification, definition, and methodology.

Prosekov, A., Babich, O., Kriger, O., Ivanova, S., Pavsky, V., Sukhikh, S., ... & Kashirskih, E. (2018). Functional properties of the enzyme-modified protein from oat bran. *Food Bioscience*, *24*, 46-49.

Qiaoyun, C. U. I., Xinghong, N. I., Liang, Z. E. N. G., Zheng, T. U., Jin, L. I., Kang, S. U. N., ... & Xinghui, L. I. (2017). Optimization of protein extraction and decoloration conditions for tea residues. *Horticultural Plant Journal*, *3*(4), 172-176.

Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarrodo, M., Hessini, K., Guéguen, J., & Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(32), 7715-7721.

Rincon, L., Botelho, R. B. A., & de Alencar, E. R. (2020). Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. *Lwt*, *128*, 109479.

Rosenthal, A. P. D. L., Pyle, D. L., Niranjana, K., Gilmour, S., & Trinca, L. (2001). Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. *Enzyme and Microbial Technology*, *28*(6), 499-509.

Saldamlı, İ. ve Temiz, A. (2017). Amino Asitler. Peptitler. Proteinler. Gıda Kimyası. Saldamlı, İ. (baş ed.). Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara. Türkiye. s. 227-317.

Sari, Y. W., Bruins, M. E., & Sanders, J. P. (2013). Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, 43, 78-83.

Sari, Y. W., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2016). Techno-economical evaluation of protein extraction for microalgae biorefinery. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 31, No. 1, p. 012034). IOP Publishing.

Sharma, P., Nath, A. K., Kumari, R., & Bhardwaj, S. V. (2012). Purification, characterization and evaluation of insecticidal activity of trypsin inhibitor from *Albizia lebbek* seeds. *Journal of Forestry Research*, 23(1), 131-137.

Sharma, P. C., Tilakratne, B. M. K. S., & Gupta, A. (2010). Utilization of wild apricot kernel press cake for extraction of protein isolate. *Journal of food science and technology*, 47, 682-685.

Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., & Chen, J. (2008). Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(2), 929-938.

Stehfest, E., Bouwman, L., Van Vuuren, D. P., Den Elzen, M. G., Eickhout, B., & Kabat, P. (2009). Climate benefits of changing diet. *Climatic change*, 95(1-2), 83-102.

Talekar, S., Patti, A. F., Singh, R., Vijayraghavan, R., & Arora, A. (2018). From waste to wealth: High recovery of nutraceuticals from pomegranate seed waste using a green extraction process. *Industrial Crops and Products*, 112, 790-802.

Tenorio, A. T. (2017). *Sugar beet leaves for functional ingredients* (Doctoral dissertation, Wageningen University and Research).

Tenorio, A. T., Gieteling, J., De Jong, G. A., Boom, R. M., & Van Der Goot, A. J. (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food chemistry*, 203, 402-408.

Tenorio, A. T., Schreuders, F. K. G., Zisopoulos, F. K., Boom, R. M., & Van der Goot, A. J. (2017). Processing concepts for the use of green leaves as raw materials for the food industry. *Journal of cleaner production*, 164, 736-748.

Tirgar, M., Silcock, P., Carne, A., & Birch, E. J. (2017). Effect of extraction method on functional properties of flaxseed protein concentrates. *Food chemistry*, 215, 417-424.

Tu, G. L., Bui, T. H. N., Tran, T. T. T., Ton, N. M. N., & Le, V. V. M. (2015). Comparison of enzymatic and ultrasonic extraction of albumin from defatted pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed powder. *Food Technology and Biotechnology*, 53(4), 479-487.

Tulbek, M. C., Lam, R. S. H., Asavajaru, P., & Lam, A. (2017). Pea: A sustainable vegetable protein crop. In *Sustainable protein sources* (pp. 145-164). Academic Press.

Ulloa, J. A., Villalobos Barbosa, M. C., Resendiz Vazquez, J. A., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J. C., Silva Carrillo, Y., & González Torres, L. (2017). Production, physico-chemical and functional characterization of a protein isolate from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. *CyTA-Journal of Food*, 15(4), 497-507.

Vergara-Barberán, M., Lerma-García, M., Herrero-Martínez, J., & Simó-Alfonso, E. F. (2015). Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food chemistry*, 169, 28-33.

Vishwasrao, C., Chakraborty, S., & Ananthanarayan, L. (2017). Partial purification, characterisation and thermal inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase isolated from Kalipatti sapota (*Manilkara zapota*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3568-3575.

Waglay, A., Karboune, S., & Alli, I. (2014). Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. *Food chemistry*, 142, 373-382.

Wikberg, H., Grönqvist, S., Niemi, P., Mikkelsen, A., Siika-Aho, M., Kanerva, H., ... & Tamminen, T. (2017). Hydrothermal treatment followed by enzymatic hydrolysis and hydrothermal carbonization as means to valorise agro-and forest-based biomass residues. *Bioresource technology*, 235, 70-78.

Zhang, D. Q., Mu, T. H., Sun, H. N., Chen, J. W., & Zhang, M. (2017). Comparative study of potato protein concentrates extracted using ammonium sulfate and isoelectric precipitation. *International Journal of Food Properties*, 20(9), 2113-2127.

BÖLÜM IX

BİTKİSEL GIDALARDA MİKROENKAPSÜLASYON UYGULAMALARI

Microencapsulation Applications in Herbal Foods

ŞEYDA ÖZTÜRK^{1*} & CEMALETTİN BALTACI²

^{1*}(Dr. Öğr. Üyesi) Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Zile Meslek
Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Tokat
E-mail: drrseydaozturk@gmail.com
ORCID: 0000-0001-7183-2478

²(Doç. Dr.), Gümüşhane Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Gümüşhane.
E-mail: cbaltaci11@gmail.com
ORCID: 0000-0002-4336-4002

Özet

Bu makale, bitkilerdeki önemli bileşenlerin mikroenkapsülasyonu üzerinde odaklanmaktadır. Nane, kekik, biberiye ve karanfil gibi bitkiler, uçucu yağlar ve fenolik bileşikler açısından zengin kaynaklardır. Mikroenkapsülasyon, bu değerli bileşenlerin stabilitesini korumak, etkinliklerini artırmak ve kontrollü salınımını sağlamak için etkili bir yöntemdir. Bu çalışma, bitkilerdeki bileşenlerin mikroenkapsülasyonunun önemini vurgulamakta ve gelecekteki araştırmaların bu alanda daha fazla ilerleme sağlaması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, mikroenkapsülasyonun bitkisel bileşenlerin ticari değerini artırabileceği ve endüstriyel uygulamalarda kullanımını genişletebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: bitki, enkapsülasyon, mikroenkapsülasyon

Abstract

This article focuses on the microencapsulation of important components in plants. Herbs such as mint, thyme, rosemary and clove are rich sources of essential oils and phenolic compounds. Microencapsulation is an effective method to maintain the stability of these valuable ingredients, increase their effectiveness and ensure their controlled release. This study highlights the importance of microencapsulation of components in plants and shows that future research should provide further progress in this area. It was also concluded that microencapsulation could increase the commercial value of herbal ingredients and expand their use in industrial applications.

Keywords: encapsulation, microencapsulation, plant

1. Giriş

Bitkilerdeki bileşenlerin mikroenkapsülasyonu, son yıllarda büyük bir ilgi ve araştırma konusu haline gelmiştir. Bu teknik, bitki bileşenlerinin stabilitesini artırmak, etkinliklerini korumak ve kontrollü salınım sağlamak amacıyla kullanılan etkili bir yöntemdir. Bitkisel bileşenler, sağlık, kozmetik, gıda ve diğer endüstrilerde yaygın olarak kullanılan önemli maddelerdir. Ancak, bu bileşenlerin çevresel faktörlere karşı hassasiyeti ve stabilite sorunları, kullanımlarını sınırlayabilmektedir. İşte bu noktada, mikroenkapsülasyon teknikleri önemli bir çözüm sunmaktadır (Aydın ve Ünlüel, 2021).

Mikroenkapsülasyon, bitki bileşenlerini mikroskobik kapsül zarlarına hapsederek koruma altına alan bir süreçtir. Bu yöntem, bileşenlerin oksidasyon, nem, sıcaklık ve ışığa maruz kalma gibi çevresel faktörlere karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlar. Ayrıca, mikroenkapsülasyon sayesinde bileşenlerin kontrollü salınımı mümkün olur, böylece istenen etkilerin elde edilmesi daha kolay hale gelir (Tontul, 2011).

Nane, kekik, biberiye ve karanfil gibi bitkiler, mikroenkapsülasyon için sıkça kullanılan bileşenler arasındadır. Nane bitkisi, ferahlatıcı özellikleriyle bilinir ve mentol gibi etkili bileşenler içerir. Kekik bitkisi, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olan timol gibi bileşenleri içerir. Biberiye ise anti-inflamatuar etkisiyle bilinir ve bağışıklık sistemini destekleyici özellikleri vardır. Karanfil ise antiseptik ve ağrı kesici etkisiyle tanınır ve eugenol adlı bileşeni içerir.

Bu makalede, nane, kekik, biberiye ve karanfil bitkilerinin mikroenkapsülasyonu üzerine detaylı bilgiler sunulmaktadır. Mikroenkapsülasyon, bu bitkilerin etkin bileşenlerini koruma ve kullanım

alanlarını genişletme potansiyeline sahiptir. Özellikle sağlık, kozmetik ve gıda endüstrilerinde, mikroenkapsülasyonun bitki bileşenlerinin etkinliğini artırarak ürünlerin daha iyi performans göstermesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. Enkapsülasyon ve Uygulama Alanları

Gıda bileşenlerinin enkapsülasyonu, uzun bir geçmişe sahip olan ve günümüzde hala sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Enkapsülasyon yöntemi, bir madde veya karışımın (katı, sıvı, gaz) başka bir madde tarafından kaplanması ya da hapsedilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemin kullanımı ile gıda ürünlerinde kullanılan çeşitli bileşenlerin korunması, stabilizasyonu, kontrollü salınımı ve işlevselliği artırılmaktadır. Enkapsülasyon işleminde esansiyel yağlar, aromatik hidrokarbonlar, enzimler, mikrobiyal metabolitler, mikroorganizmalar, vitaminler, tatlandırıcılar, renklendiriciler gibi çeşitli bileşenler kullanılmaktadır. Bu maddelerin enkapsülasyonu, gıda bileşeninin stabilitesinin artırılması, aşınma etkilerine karşı korunması ve raf ömrünün uzatılmasını sağlar. Örneğin, bitkilerdeki esansiyel yağlar enkapsülasyon ile daha uzun raf ömrüne sahip olabilir, aroma maddeleri daha stabil hale gelebilir (Soyuçok vd., 2019)

Enkapsülasyon, gıda korunmasında farklı amaçlara yönelik olarak kullanılabilir. Bunlar arasında aroma koruma, tatlandırıcıların kontrolü, renk stabilitesinin sağlanması, vitaminlerin korunması, probiyotiklerin canlılığının korunması, etkili enzim kullanımı gibi amaçlar bulunmaktadır. Enkapsülasyon, gıda bileşenlerinde istenmeyen koku veya tatların maskeleymesi, kontrollü salınım gibi görevleri de yerine getirmektedir (Koç vd., 2010; Tutun ve Yurdagül, 2022).

Enkapsülleme işlemi sadece gıda endüstrisinde kullanılmamaktadır. Tıp, tarım, yem, eczacılık, veteriner, biyoteknoloji gibi daha birçok alanda kullanılabilir. Enkapsülasyon yönteminin çeşitli endüstrilerde kullanım nedeni, örnek uygulamaları ve avantajları Tablo 1'de belirtilmiştir. Bununla birlikte bu alanlarda bitki bileşenlerinin enkapsülasyonu işlemi çalışmaları yaygındır. Özellikle çalışmalarda bitkilerdeki antioksidan, antimikrobiyal ve esansiyel yağların enkapsülasyonu görülmektedir.

Tablo 1. Enkapsülasyon yönteminin çeşitli endüstrilerde kullanımı
(Gökmen vd., 2012; Aydın ve Ünlüel, 2021).

Kullanım Alanı	Kullanılma Nedeni	Örnek Uygulamalar	Avantajlar
Gıda endüstrisi	Stabilizasyon, koruma, kontrollü salınım, tat ve aroma koruması	Meyve suyu mikrokapsülleri, probiyotiklerin korunması, vitamin takviyeleri	Uzun raf ömrü, düşük miktarda aktif bileşen kullanımı, hassas içeriklerin korunması
İlaç endüstrisi	Stabilizasyon, koruma, kontrollü salınım, hedeflenen teslimat	İlaç mikrokapsülleri, nanopartikül taşıyıcılar, uzun süreli etki sağlayan ilaçlar	Hedeflenen teslimat, uzun süreli etki, ilaç stabilizasyonu, yan etkilerin azaltılması
Kozmetik endüstrisi	Aktif bileşen stabilizasyonu, koruma, etkinlik artırımı	Kozmetik mikrokapsülleri, güneş koruyucular, antioksidan içeren kremler	Uzun süreli etki, daha iyi bileşen stabilizasyonu, kontrollü salınım, daha iyi cilt penetrasyonu
Tarım ve bitki koruma	Pestisit koruma, kontrollü salınım, hedeflenen teslimat	Bitki koruma mikrokapsülleri, pestisitlerin zamanlı salınımı, bitki büyüme düzenleyicileri	Hedeflenen teslimat, daha az çevresel etki, pestisit direncinin azalması, uygulama maliyetinin düşürülmesi
Biyomedikal uygulamalar	Hedeflenen ilaç teslimatı, doku mühendisliği, biyosensörler	İlaç taşıyıcı nanoteknolojileri, doku mühendisliği materyalleri, biyosensörler	Hedeflenen teslimat, ilaçların hedefli bölgeye ulaşması, biyolojik uyumluluk, dokuya uyumlu yapılar oluşturma, hassas tespit ve analiz yapabilme yeteneği
Tarım ve bitki koruma	Pestisit koruma, kontrollü salınım, hedeflenen teslimat	Bitki koruma mikrokapsülleri, pestisitlerin zamanlı salınımı, bitki büyüme düzenleyicileri	Hedeflenen teslimat, daha az çevresel etki, pestisit direncinin azalması, uygulama maliyetinin düşürülmesi
Diyet takviyeleri	Aktif bileşen stabilizasyonu, koruma, kontrollü salınım	Vitamin takviyeleri, omega-3 yağ asitleri mikrokapsülleri	Daha iyi biyoyararlanım, stabilize edilmiş formda sunma, hoş olmayan tat veya kokuyu maskeleyme, uzun raf ömrü sağlama

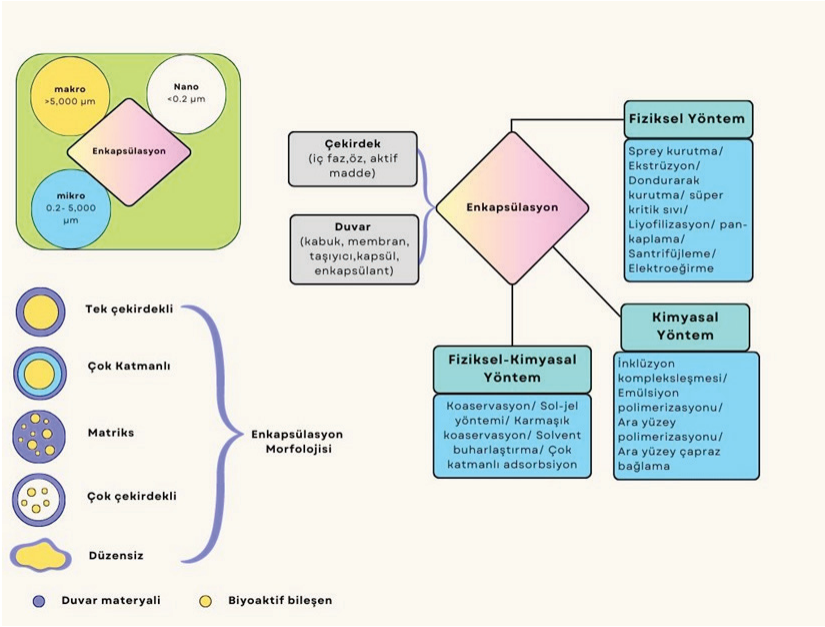
3. Enkapsülasyonun Temel Prensipleri ve Uygulama Yöntemleri

Enkapsülasyonun oluşmasında “hedef bileşen ve hedef bileşeni saran” olmak üzere iki temel unsur vardır. Bu unsurlardan hedeflenen bileşeni saran kısma; duvar, kabuk, membran, taşıyıcı, enkapsülant veya kapsül denilmektedir. Hedeflenen maddeye; iç faz, çekirdek, öz veya aktif madde denilmektedir. Enkapsülleme işleminde, duvar malzemeleri olarak nişasta, maltodekstrin, pullulan, sakkaroz, maltoz, jelatin, peynir altı suyu, kazeinatlar ve kazein gibi bileşenler kullanılabilir. Çekirdek maddesi ise katı ve sıvı yağların yanı sıra aromalar ve tat maddeleri, vitaminler ve minerallerin yanı sıra renk ve enzim bileşenleri de olabilir. Bununla birlikte kapsül çoklu duvarlara sahip olabilir (Wang vd., 2009; Koç vd., 2010; Gökmen vd., 2012; Varhan ve Koç, 2018; Soyuçok vd., 2019)

Enkapsülasyonda elde edilen ürünler kapsül boyutlarına göre (Şekil 1);

1. Nanoenkapsülasyon (<0.2 μm),
2. Mikroenkapsülasyon (0.2- 5,000 μm) ve
3. Makroenkapsülasyon (>5,000 μm) olarak sınıflandırılmaktadır

Kapsüllerin rezervuar tipi ve matris tipi olmak üzere iki temel tipi vardır. Enkapsülantlar küresel, silindirik, oval ya da düzensiz şekilde olabilmektedir. Rezervuar tipi (kapsül, tek çekirdekli veya çekirdekli kabuk tipi) enkapsülant aktif ajanın etrafında bir kabuk vardır. Ayrıca, birden fazla bölme içeren çok çekirdekli kapsüller vardır. Matris tipinde, çekirdek madde taşıyıcı malzeme üzerine dağılır. Bu iki türün kombinasyonu olan üçüncüsünde, matrisin çekirdek malzemesi ile yeniden kaplanması gerekir (Burgain vd., 2011; Kahraman, 2019; Aydın ve Ünlüel, 2021) (Şekil 1)



Şekil 1. Enkapsülasyona ait sınıflandırmalar (Zabot vd., 2022)

Enkapsülasyon teknolojileri, temelde iki yöntem üzerine kurulmuştur (Çoruhli, 2013).

I) Çekirdek bileşen polimer bir çözelti içine eklenir ve homojen bir şekilde dağılması sağlanır. Bu süreçte, ince damlacıklar oluşur ve daha sonra jelasyon, kurutma, soğutma veya koaservasyon gibi teknikler kullanılarak bu damlacıklar katılaştırılır. Bu yöntemde, polimer çözeltisi çekirdek bileşeni çevreleyerek bir kapsül oluşturur.

II) Katı toz taneleri bir akışkan yatakta karıştırılır. Ardından, Bu parçacıklar üzerine kaplama çözeltisi püskürtülür. Daha sonra, kurutma ya da soğutma işlemiyle kaplama çözeltisi katılaştırılır ve böylece çekirdek bileşenin kapsüle alındığı katı parçacıklar elde edilir.

Bir enkapsülasyon çalışmasında enkapsülasyon uygulamasından önce dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Bunlar;

1. Amaca uygun çekirdek maddenin belirlenmesi,
2. Çekirdek maddeye uygun duvar malzemesinin belirlenmesi,
3. Uygun enkapsülasyon yönteminin belirlenmesi,

4. Çekirdek maddenin ve duvar malzemesinin fiziksel ve kimyasal özellikleri,
5. Çekirdek maddeye ve duvar malzemesine uygun işlem koşulları,
6. Çekirdek maddenin raf ömrü,
7. Enkapsülasyon işleminden sonraki depolama koşulları,
8. Parçacık boyutu ve yoğunluğu, maliyeti gibi konulardır (Gökmen vd., 2012; Atak vd., 2017a).

Kaplama yöntemi olarak çekirdek bileşenin kapsüle edilmesi farklı yöntemlerle sağlanabilir: Püskürterek kurutma (20-150um), püskürterek soğutma, dondurarak kurutma (liyofilizasyon), akışkan yataklı kaplama (50-10000um), koaservasyon (1-500um), ekstrüzyon (700-6600um), lipozom, santrifüj-süspansiyon ayırma (5-1000um), kokristalizasyon vb. Farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal prosesler kullanılmaktadır. (Atak vd., 2017b) (Şekil 1). Püskürterek kurutma, bu yöntemlerden en popüler olanıdır. Bu yöntem, özellikle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Püskürterek kurutma, büyük ölçekli üretim imkanı sunmakta ve kurutma maliyetlerini dondurarak kurutma yöntemine göre azaltmaktadır. Bu nedenle, püskürtmeli kurutma yöntemi ucuz ve kullanımı uygun olduğu için mikroenkapsülasyon işlemlerinde en yaygın olarak tercih edilen yöntemdir.



Şekil 2. (Desai ve Park, 2005; Başıyigit, 2017)

Mikroenkapsülasyon teknikleri, ürünlerin raf ömrünü artırmak ve biyoaktif özelliklerini korumak amacıyla birçok alanda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde de mikroenkapsülasyon, bitki esansiyel yağlarının enkapsülasyonu gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bitkisel esansiyel yağların mikrokapsülasyonu, meyve sularının, içeceklerin ve diğer gıda gruplarının zenginleştirilmesini ve geliştirilmesini sağlar. Bu da fonksiyonel gıdalar pazarında önemli etkilerini temsil etmektedir (Başyigit, 2017).

4. Enkapsüle Bitki Bileşenleri Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar

Literatürde tıbbi ve aromatik bitkilerin mikroenkapsülasyonu üzerine bazı araştırmalar bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar Şekil 3 ve Şekil 4 de verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde nane, kekik, biberiye ve karanfil bitki bileşenlerinin mikroenkapsülasyonu ayrıntılı bir biçimde incelenecektir.

BAZI ÇALIŞMALAR





BİTKİ	AMACI	KAYNAK
 Nane	Nane esansiyel yağının mikroenkapsülasyonu, salınım kinetiğinin belirlenmesi (Gam arabik-maltoidekstrin, gam arabik; püskürtmeli kurutma)	Püskürtmeli Kurucutu ile Mikroenkapsüle Edilmiş Nane (<i>Mentha piperita</i> ve <i>Mentha spicata</i>) Esansiyel Yağının Salınım Profili. Başyigit ve Çam, 2017b
 Kekik	Kekik suyu ve ekstresinin mikroenkapsülasyonu, asetillendirme işleminin uygulanabilirliğinin belirlenmesi (Asetillendirilmiş mısır nişastası; püskürtmeli ve dondurarak kurutma)	Kekik Ekstresinde Asetillendirilmiş Nişastanın Mikroenkapsüle Özelliğinin Araştırılması. Uğurtay, 2020
 Ada çayı	Ada çayı yağı enkapsülasyonu, en iyi formülasyonun belirlenmesi (maltoidekstrin, akasya gamı, modifiye nişasta; püskürtmeli kurutucu)	Adaçayı Yağının Püskürtmeli Kurucutu ile Enkapsülasyonuna Taşıyıcı Malzemelerin Etkisi. Aytumur, 2017
 Biberiye	Biberiye uçucu yağının mikroenkapsülasyonu, salınım özelliklerinin belirlenmesi (aljinat-nişasta; emülsifikasyon yöntemi)	Mikroenkapsüle Biberiye Esansiyel (uçucu) Yağının in Vitro Antioksidan Etkisinin İncelenmesi. Sezer Öztürk, 2016
 Karabiber	Karabiber oleorezininin enkapsülasyonu, enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve morfolojisinin belirlenmesi (beta-siklodekstrin; dondurarak kurutma)	Karabiber (<i>Piper Nigrum</i> L.) Oleorezininin Dondurarak Kurutma Tekniği ile Mikroenkapsülasyonu. Özdemir, 2013

Şekil 3. Literatürde bitki bileşenlerinin mikroenkapsülasyonu üzerine yapılan bazı çalışmalar-1

BAZI ÇALIŞMALAR



BİTKİ	AMACI	KAYNAK
 Meyan Kökü	Meyan kökü ekstraktının mikroenkapsülasyonu, depolama stabilitesinin belirlenmesi (maltodekstrin ve gam arabik; püskürtmeli kurutma)	Mikroenkapsüle Meyan Kökü (<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.) Şerbeti (çayı) Üretimi ve Depolamanın Kalite Üzerine Etkisi. Basyiğit, 2017
 Karanfil, Tarçın vd.	Tarçın, zerdeçal, zencefil, karanfil ve defne ekstraktlarının enkapsülasyonu, ekme ve yaş makarna formülasyonunda etkilerinin belirlenmesi (Fosfatidilkolin; lipozomal enkapsüle)	Lipozomal Enkapsüle Edilmiş Bazı Bitki Ekstraktlarının Ekme ve Yaş Makarna Formülasyonlarında Doğal Koruyucu Olarak Kullanımı. Aslan, 2022.
 Kuşburnu	Kuşburnu fenolik bileşiklerinin mikroenkapsülasyonu, kaplama materyalinin enkapsülasyon verimi ve ısı stabilite üzerine etkileri (maltodekstrin ve gam arabik; dondurarak kurutma)	Kuşburnu (<i>Rosa canina</i>) Fenolik Bileşiklerinin Mikroenkapsülasyonu. Erdem vd., 2021
 Çörek otu	Çörek otu yağı enkapsülasyonu, partiküllerin morfolojik yapıları üzerine etkilerinin belirlenmesi (zein; koaksiyal elektropüskürtme yöntemi)	Proses Parametreleri ve Çözelti Özelliklerinin Koaksiyal Elektropüskürtme Yöntemi İle Elde Edilen Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri Üzerine Etkisi. Atay ve Altan, 2019
 Keten tohumu	keten tohumu enkapsülasyonu, Yağ oranının etkisini, sıcaklığın etkisi ve enkapsülasyon etkinliği (yağsız süt tozu, püskürterek kurutma)	Keten Tohumu Yağı Ve Yağsız Süt Tozu İçeren Emülsiyonların Püskürterek Kurutma İle Enkapsülasyonu: Yağ Oranı ve Kurutma Sıcaklığının Etkileri. Çevik vd., 2021

Şekil 4. Literatürde bitki bileşenlerinin mikroenkapsülasyonu üzerine yapılan bazı çalışmalar-2

4.1. Nane (*Mentha piperita*)

Nane, Lamiaceae familyasına ait bir bitki olup, tıbbi ve aromatik özellikleriyle bilinen bir bitkidir. Ve birçok çalışma alanında karşımıza çıkmaktadır. Nane yaprakları, ferahlatıcı ve rahatlatıcı etkisiyle popülerdir. Ayrıca üretilen nane yağı, sindirim sorunlarını hafifletebilir, mide bulantısını azaltabilir ve baş ağrısını yatıştırabilir. Ayrıca nane, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu bilinen mentolu içerir. Bu nedenle enkapsülasyon yöntemi, nane yağının değerli bileşenlerini korunması ve uzun süreli kullanımı için stabilize sağlamada kullanılabilir (Çelik ve Ayran, 2020).

Nane bitkisi, tıbbi, kozmetik, gıda ve aromaterapi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. Nane bitkisinin yaprakları ve gövdeleri, uçucu yağlar ve diğer biyoaktif bileşenleri içerir. Ancak bu bileşenler, çevresel etkiler, oksidasyon, ışık, sıcaklık ve nem gibi faktörlerden etkilenebilirler. Bu nedenle, nane bitkisinin enkapsülasyonu, bu bileşenlerin stabilitesini artırarak etkinliğini korumayı hedefler.

Nane bitkisinin enkapsülasyonu için farklı yöntemler ve materyaller kullanılabilir. Örneğin, polimerler, lipitler veya farklı mikroenkapsülasyon teknikleri kullanılarak nane özleri ve uçucu bileşenler kapsülendir. Bu enkapsülasyon materyalleri, nane bileşenlerini dış etkenlerden korur ve onların kontrollü salınımını sağlar. Bu yöntem, nane bitkisinin biyoaktif bileşenlerini daha verimli bir şekilde kullanmamıza yardımcı olurken, aynı zamanda nane bitkisinin aromatik özelliklerini de koruyarak lezzet ve koku sağlar (Özgün, 2015).

Bu nedenle nane bileşenlerinin mikroenkapsülasyonu konusunda birçok araştırma mevcuttur. Bununla ilgili olarak Badee vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, nane esansiyel yağı, maltodekstrin, arap zıncı ve arap zıncı-maltodekstrin (1:1) karışımı ile püskürterek kuruma yöntemiyle mikroenkapsüle edilmiştir. Araştırmacılar nane yağının enkapsülasyon işleminin, nane yağının kimyasal bileşiminde önemli bir değişiklik yapmadığını yani enkapsülasyonun nane yağının temel bileşenlerini koruduğunu ve stabilitesini sağladığını belirtmişlerdir. Nane yağının mikroenkapsülasyonunda en iyi malzemenin arap zıncı olduğunu ancak arap zıncı konsantrasyonunun %30'un üzerine çıkarılmaması gerektiğini vurgulamışlardır. Bunun sebebi olarak ise püskürtücü kurutucudan geçirilemeyecek kadar çözeltinin yoğun olmasıdır. Ayrıca arap zıncı ile %81 oranında aroma tutulumu tespit edilmişlerdir. Püskürtmeli kurutma tekniğini kullanarak benzer bir çalışmayı Başyigit (2017) yapmıştır. Başyigit çalışmasında arap zıncı ile maltodekstrin materyallerini karşılaştırılmakla birlikte arap zıncı maliyetini düşürmek için maltodekstrin ile kombine edilerek (%38-62), %100 arap zıncı kullanımı kadar etkin bir kaplama materyali olup olmayacağını belirlemek istemiştir. *M. spicata* ve *M. piperita* türlerine ait nane esansiyel yağının mikroenkapsülasyonu maltodekstrin-arap zıncı kaplamasının, saf arap zıncı kadar etkin olduğunu belirtmiştir. Başyigit ve Çam (2017b) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, püskürtmeli kurutma kullanılarak mikrokapsüllenen nane uçucu yağının (*Mentha piperita* ve *Mentha spicata*) salınım profili araştırılmıştır. Nane uçucu yağlarının salım hızının 0. dereceden reaksiyon dinamiğine uyduğunu ve salım kinetiğinin hem nane türüne hem de kullanılan kaplamanın türüne ve konsantrasyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bakri vd. (2017), ton balığı yağı ve/veya nane yağı içeren emülsiyonları püskürterek kurutma yöntemi ile mikrokapsüllere dönüştürmüştür. Kapsülleme işlemini peynir altı suyu izolatu + inülin ile gerçekleştirmiştir. Yüzey morfolojisi analizinde, spreyle kurutulmuş mikrokapsüllerin küre şeklinde olduğunu, ancak çok sayıda çentik ve görünür büzülme sergilediğini belirtmişlerdir. Depolama süresince, hem ton balığı yağı

hem de ton balığı yağı + *M. piperita* yağı mikrokapsüllerinin boyutunda bir artış görüldüğünü, karışım yağı mikrokapsüllerine gelince, *M. piperita* yağının varlığının, mentonun mentole dönüşmesine neden olduğunu belirtmiştir. Son olarak *M. piperita* yağının karışım yağı mikrokapsüllerine dahil edilmesinin yüzey morfolojisi ve oksidasyon özelliklerini etkilediğini bildirmişlerdir.

Alasalvar (2017), buzlu çay üretimi sırasında fenolik bileşiklerin kaybını azaltmak ve depolamayı kolaylaştırmak için nane özütlerini maltodekstrin duvar materyalini kullanarak püskürterek kurutmuştur. *M. spicata* ve *M. piperita* mikrokapsülasyon etkinliği değerleri sırasıyla %99,24 ve %96,50 oranlarında bulunmuştur. Elde edilen mikrokapsüle ürünlerin yüzey fenolik madde miktarı belirlenmiştir.

Dong vd., (2007) ise püskürtme tekniğinden farklı olarak nane yağının mikrokapsülasyonunda koaservasyon yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada duvar materyali olarak jelatin/arap zıncı kullanmışlar ve çok çekirdekli nane yağı mikrokapsülleri hazırlanmışlardır. Çalışma sonucunda mikrokapsülasyon işlemi sırasında duvar materyallerinin konsantrasyonlarının artırılmasına rağmen, çekirdek/duvar materyali oranının değişmediğini, bu durumda, nane yağı içeren mikrokapsüllerin yağ yükü değerlerinin yaklaşık olarak %75-80 aralığında olduğunu belirtmiştir. Başka bir çalışmada ise araştırmacılar benzer şekilde çapraz bağlı nane yağı içeren koaservat mikrokapsüller oluşturmak için jelatin ve arap zıncı duvar malzemelerini kullanmışlardır. Araştırmacılar, dağıtıcı ortamın mikrokapsül salınımı üzerinde önemli bir etkisi olduğunu, koaservat kapsüllerin soğuk suda çok yavaş salındığını ve çekirdeğin duvara oranının önemli bir etkisi olmadığını bulgulamışlardır. Ayrıca mikrokapsüllerin soğuk suda çok daha iyi depolama stabilitesinin olduğunu belirtmişlerdir (Dong vd., 2011).

Gökbulut (2017), kaplama malzemesi zeine farklı miktarlarda kazein (%1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15) eklemiştir. Mikrokapsülasyonu liyofilizasyon işlemi kullanarak gerçekleştirmiştir. Mikrokapsüllerin en yüksek kapsülleme etkinliği %13 Zein-Kazein formülasyonunda(%54,66) gerçekleşmiştir. Bununla birlikte, sadece zein kullanılan mikrokapsüllerin kapsülleme etkinliği %46,84'dir. Test sonuçlarına göre, sadece zein kullanılarak üretilen mikrokapsüllerin nane salım oranı %64,27, zein kazein mikrokapsüllerinin ise %37.86'tür. Ayrıca, mikrokapsüllemiş nane yağının serbest formdan daha uzun süre korunduğunu ve belirli bir süre boyunca daha küçük miktarlarda salındığını gösterdiğini ifade etmiştir.

Özgün (2015) ise nane (*Mentha piperita*) uçucu yağının çekirdek maddesi olarak belirlemiştir. 2-hidroksipropil beta-siklodekstrin (HP-β-SD) ise duvar

malzemesi olarak kullanmıştır. Oluşturulan mikrokapsüllerin mentol tutma etkinliği %72,81 belirlemiştir. DSC analizi sonucu nanenin 2-hidroksipropil beta-siklodekstrin kavitesinde korunduğunu ve faz-çözünürlük çalışmalarında, doğrusal termogramları göstermiştir. Bununla birlikte, kapsüllenmiş yağın antioksidan içeriği ve toplam fenolikleri doğal nane'den daha yüksektir.

4.2. Kekik (*Thymus vulgaris*)

Kekik, Lamiaceae familyasına ait bir bitki olup, güçlü aroması ve antiseptik özellikleriyle tanınır. Kekik bitkisi, esansiyel yağlar, fenolik bileşikler ve diğer biyoaktif bileşenler açısından zengin bir içeriğe sahiptir. Kekik yağı, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan etkilere sahip olan timol ve karvakrol gibi bileşikler içerir. Kekik, solunum yolu enfeksiyonlarını hafifletebilir, bağışıklık sistemini güçlendirebilir ve sindirimi destekleyebilir. Kekik bitkisi, esansiyel yağlar, fenolik bileşikler ve diğer biyoaktif bileşenler açısından zengin bir içeriğe sahiptir. Bu bileşenlerin çevresel etkilere, oksidasyona, sıcaklığa ve nem gibi faktörlere karşı hassas olması, enkapsülasyonun önemini ortaya koymaktadır (Çelik ve Ayran, 2020).

Kekik bitkisinin bileşenlerinin enkapsülasyonu, aktif bileşenlerin stabilitesini artırmak, korumak ve kontrollü salınımını sağlamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Kekik bileşenlerinin enkapsülasyonunda çeşitli materyaller ve yöntemler kullanılmaktadır. Polimerler, lipitler ve proteinler gibi farklı enkapsülasyon materyalleri tercih edilebilir. Bu materyaller, kekik bileşenlerini dış etkenlere karşı korur ve onların stabilitesini artırır. Bu nedenle kekik bileşenlerinin mikroenkapsülasyonu konusunda birçok araştırma mevcuttur. Uğurtay (2020) asetillendirilmiş nişasta üretimi için kekik bitkisinden elde edilen kekik suyu ve ekstraktına mikroenkapsülasyon işlemi uygulamıştır. Çalışmada püskürtmeli ve dondurarak kurutma yöntemleri kullanılarak mikroenkapsülasyon etkinliği araştırılmıştır. Sirke, sitrik asit ve tartarik asit ile asetillendirilmiş nişasta kaplama materyallerinin daha iyi kalite özelliklere sahip olduğunu belirtmiştir. Verim açısından dondurarak kurutma yönteminin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Kekik suyundan üretilen tozların, carr indeks ve hausner oranlarına göre daha iyi kabul edilebilir düzeyde olduğunu ayrıca bütün tozlarda DPPH ve ABTS radikallerine karşı antioksidan aktivite tespit edildiğini belirtmiştir. En yüksek antioksidan aktivite değerlerinin kekik ekstre enkapsüle tozlarında olduğunu belirlemiş ve kekik ekstresi tozlarında daha fazla toplam fenolik madde miktarı bulunduğunu vurgulamıştır.

Karagözlü (2017) ise kompleks koaservasyon yöntemini kullanmıştır. Kekik yağı içeren ve tannik asitle sertleştirilmiş jelatin-arap zıncı duvarlara sahip mikrokapsüllerden yapılmıştır. Araştırmacı çalışma sonucunda, esansiyel kekik yağının mikrokapsüllerden salınımının jelatin ve tannik asitlerdeki artışla azaldığının, ancak kekik yağındaki artışla arttığının sonucuna varmıştır. Ayrıca kekik yağı miktarının artmasının, timol ve karvakrol gibi bileşiklerin miktarında ve antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde miktarında artışa neden olduğunu, mikrokapsüllerin şeftali suyuna ilave edilmesiyle antimikrobiyal özellik kazandığını gözlemlemiştir. Martins vd. (2011)'da çalışmasında koaservasyon yöntemini tercih etmiştir. Kekik yağı polilaktit mikrokapsüller aracılığıyla timol ve para-simen ile kapsüllenmiştir. Araştırmacılar timolün ilk bir saat içinde daha hızlı salındığını ve sonraki birkaç gün boyunca sabit kaldığını bulmuşlardır. Bununla birlikte, kekik yağındaki polar bileşikler apolar bileşiklerden daha hızlı salındığını belirtmişlerdir. Çalışmada, mikrokapsüllerin morfolojik özelliklerinin salım hızını etkilediğini ve tek katmanlı mikrokapsül sistemleri ile geliştirilebileceğini vurgulamışlardır.

Soliman vd. (2013), kekik, tarçın ve karanfil uçucu yağlarını aljinat-CaCl₂ çapraz bağlama yöntemiyle mikrokapsüle etmişlerdir. Çalışmada, çapraz bağlayıcı miktarının yükleme kapasitesi ve kapsülleme verimliliği üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ve Ca-aljinat mikrokürelerinin uçucu yağların buharlaşma hızını azaltabileceğini söylemişlerdir.

Baranauskaite vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise, *Origanum onites* L.'deki rosmarinik asit ve karvakrolu, lipozomlar aracılığıyla enkapsüle etmiştir. Araştırmacılar, enkapsülasyon işleminin etkinliğini incelemek için enkapsüle edilen bileşenlerin depolama süresi boyunca nasıl değiştiğini değerlendirmiştir. 4°C'de 30 gün depolamada enkapsülasyon etkinliklerinde az bir oranda değişim olduğunu, farklı bileşen yüklü lipozom örneklerinin depolama sırasında enkapsülasyon etkinliklerindeki farklılığın, bileşenlerin suda çözünürlük özelliklerinin farklı olmasından kaynaklanabileceğini belirtilmiştir. Cui vd. (2017)'da lipozom kapsüllü kekik yağının *Salmonella enteritidis*'e (*S. enteritidis*) karşı antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir. Tavuk eti üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, enkapsüle kekik yağının, enkapsüle edilmemiş kekik yağına oranla *Salmonella*'ya karşı daha fazla sürede inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmiştir. Ayrıca lipozom kapsüllü kekik yağının, düşük konsantrasyonda *Salmonella*'ya karşı etkili bir antibakteriyel madde olduğunu belirtmiştir.

4.3. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*)

Biberiye, Lamiaceae familyasına ait bir bitki olup, aromatik ve tıbbi özellikleriyle bilinmektedir. Son yıllarda, biberiye ve biberiye yağı üzerinde yapılan araştırmalar, bu bitkinin sağlık üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Biberiye yağı, özellikle antioksidan etkisiyle dikkat çekmektedir. Antioksidanlar, vücutta serbest radikallerle mücadele ederek hücresel hasarı azaltabilir ve sağlığı destekleyebilir. Biberiye yağının antioksidan bileşenleri, çevresel stres faktörlerine karşı koruyucu etkiler sağlayabilir. Biberiye yağı ayrıca, odaklanmayı artırmak ve hafızayı desteklemek için kullanılan bir bileşendir. Biberiye bitkisi aynı zamanda anti-inflamatuar özelliklere de sahip olabilir. İnflamasyon, birçok sağlık sorununun temelinde yer alan bir süreçtir (Can vd., 2016)

Biberiye bitkisinin bileşenleri arasında esansiyel yağlar, fenolik bileşikler, flavonoidler ve terpenoidler bulunur. Esansiyel yağlar, bitkinin yapraklarında ve çiçeklerinde yoğun olarak bulunan uçucu yağlardır. Biberiye esansiyel yağının ana bileşenleri olan rosmarinik asit, karnosolik asit ve kafeik asit, bitkinin antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve antikanser özelliklerinden sorumlu olabilir (Nieto vd., 2018).

Biberiye bitkisinin bileşenlerinin enkapsülasyonu, bileşenlerin stabilitesini korumak, etkinliğini artırmak ve kontrollü salınımını sağlamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Biberiye bitkisinde bulunan esansiyel yağlar, fenolik bileşikler, flavonoidler ve terpenoidler gibi çeşitli bileşenlerin korunması ve kullanımının optimize edilmesi için enkapsülasyon teknikleri uygulanabilir.

Enkapsülasyon işlemi, bileşenlerin çevresel etkilerden korunmasını ve stabilitesini artırmasını sağlar. Örneğin, oksidasyon, ışık, nem ve sıcaklık gibi faktörler biberiye bileşenlerinin bozulmasına ve etkinliklerinin azalmasına neden olabilir. Ancak enkapsülasyon sayesinde, bileşenler dış etkenlere maruz kalmadan daha uzun bir süre boyunca stabil kalmaktadır.

Biberiye bileşenlerinin enkapsülasyonu aynı zamanda kontrollü salınımı sağlar. Kapsül veya parçacıklar, çözünürlük, pH veya çevresel faktörlere bağlı olarak zamanla bileşenleri serbest bırakabilir. Bu, biberiye bileşenlerinin istenen etkilerini uzun süre boyunca sürdürmelerine olanak tanır.

Enkapsülasyon ayrıca biberiye bileşenlerinin kullanım kolaylığını artırır. Kapsüller veya parçacıklar, çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Örneğin, gıda ürünlerine eklenerek tat ve aroma sağlayabilirler. Kozmetik ürünlerde stabiliteyi artırıcı ve cilt üzerinde olumlu etkiler sağlayıcı olarak kullanılabilirler. Ayrıca farmasötik uygulamalarda da kullanılarak terapötik etkinliğin artırılmasına yardımcı olabilirler (Peker ve Arslan, 2011).

Tüm bu nedenlerden dolayı biberiye bileşenlerinin mikroenkapsülasyonu konusunda birçok araştırma mevcuttur. maltodekstrin ve arap zımkı gibi malzemelerin yanı sıra inülin ve modifiye starchs gibi malzemeleri ayrı ayrı ve birlikte duvar malzemesi olarak kullanmışlar ve biberiye yağını püskürterek kurutma yöntemiyle mikrokapsülle etmişlerdir. Fernandes vd. (2014), yüksek bağıl nem koşullarında en düşük su emilimini inülin içeren uygulamalarda gözlemlendiğini, tozların ıslanabilirlik özelliğinin, inülin ilavesiyle geliştirildiğini belirtmiştir. Ayrıca emülsifikasyon uygulamalarında yüksek kapasiteye sahip olan bu malzemelerin uçucu bileşenleri birlikte tutmada etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Parçacıkların, arap zımkı veya inülin mevcut olduğunda daha pürüzsüz yüzeylere ve daha fazla kıvrıma sahip olduğunu, saf arap zımkı veya modifiye nişasta ile hazırlanan tozlarda ise daha büyük parçacıklar gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte modifiye nişasta-inülin ile arap zımkı-maltodekstrin kombinasyonunun benzer etki gösterdiğini, ancak arap zımkı-inüline kıyasla daha iyi bir şekilde uçucu yağ tuttuğunu tespit etmişlerdir.

Hadian vd. (2017) yaptığı bir çalışmada, biberiye esansiyel yağının kitosan-benzoik asit ile enkapsüle edilmesinin, enkapsüle edilmemiş biberiye esansiyel yağına göre daha etkili bir şekilde dana pırzolada bulunan Salmonella sayısını azalttığını ortaya koymuşlardır. Enkapsüle biberiye yağının 2 mg/g düzeyinde uygulandığında, patojenlerin sayısında önemli bir azalma sağlandığını belirlenmişlerdir. Bu bulguların doğrultusunda araştırmacılar, patojenlerin sayısını azaltmada ve ürünlerin raf ömrünü uzatmada biberiye esansiyel yağının enkapsüle edilerek kullanılabileceğini vurgulamıştır.

Yapılan başka bir çalışmada ise Sezer Öztürk (2016) biberiye uçucu yağın aljinat/nişasta duvar materyali kullanarak emülsifikasyon yöntemiyle mikroenkapsüle etmiştir. Optimum mikrokapsül koşullarını % 2,0 (w/v) sodyum aljinat, % 7,0 (w/v) biberiye uçucu yağ, % 1,0 (w/v) nişasta ve % 1,0 (w/v) CaCl₂ çapraz bağlayıcı olarak belirlemiştir. Mikroenkapsülasyon etkinliğini ise % 87,16 olarak hesaplamıştır. Salınan uçucu yağ oranını nişasta kullanılarak hazırlanan mikrokapsüllerde % 55,38, nişasta kullanılmadan hazırlanan mikrokapsüllerde % 64,44 olarak belirlemiştir. Mikroenkapsüle biberiye uçucu yağın, serbest uçucu yağa kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini, özellikle 240 dakika sonra, mikroenkapsüle edilmiş biberiye uçucu yağın % 86,43 DPPH süpürme gücüne ve % 72,67 ABTS süpürme gücüne sahip olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca düzgün yüzeyli ve kırık-çatlak içermeyen küresel mikrokapsüller elde edildiğini, ortalama çaplarının 500-1000 µm arasında değiştiğini söylemiştir.

Turasan (2014) ise, biberiye uçucu yağını, maltodekstrin ve peynir altı suyu duvar materyalleri kullanarak (3:1 ve 1:3) dondurarak kurutma yöntemiyle mikroenkapsüle etmiştir. Araştırmacı peynir altı suyu protein konsantresi/maltodekstrin oranının artmasının kurutma ve enkapsülasyon verimliliğini artırdığını bildirmiştir.

4.4. *Karanfil (Syzygium aromaticum)*

Karanfil, Myrtaceae familyasına ait bir bitkidir ve güçlü baharatlı bir aromaya sahiptir. Ayrıca karanfil, tıbbi özellikleriyle de dikkat çekmektedir. Karanfil yağı, özellikle eugenol adı verilen bileşeni sayesinde antimikrobiyal özellik gösterir. Bu özellik, karanfil yağının dış ağrısını hafifletme, enfeksiyonlara karşı koruma sağlama ve antioksidan özellikleriyle hücre sağlığını destekleme gibi faydalarını destekler (Kerdiğe, 2019).

Karanfil bitkisinin bileşenleri arasında eugenol, eugenyl asetat, karyofillen, karyofillen oksit ve karyofillen epoksit gibi uçucu yağlar ve fenolik bileşikler bulunur. Karanfil bitkisinin en önemli bileşeni eugenoldür. Eugenol, karanfilin karakteristik kokusunu ve sağlık faydalarını sağlayan bir uçucu yağdır. Aynı zamanda antiseptik, anti-inflamatuar, analjezik ve antioksidan özelliklere sahiptir. Eugenolün yanı sıra, karanfilde diğer uçucu yağlar, fenolik bileşikler ve karyofillen gibi bileşikler de bulunur (Kerdiğe, 2019).

Karanfil (*Syzygium aromaticum*) bitkisinin bileşenlerinin enkapsülasyonu, bileşenlerin stabilitesini korumak, etkinliklerini artırmak ve kontrollü salınımını sağlamak için kullanılan bir yöntemdir. Karanfilin bileşenlerinin enkapsülasyonu, genellikle polimerlerden oluşan kapsül veya parçacıklar kullanılarak gerçekleştirilir.

Karanfilin mikroenkapsülasyonu konusunda ise birçok araştırma mevcuttur. Radünz vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, enkapsüle edilmiş karanfil yağının antioksidan aktivitesinin enkapsüle edilmemiş karanfil yağına göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, enkapsüle karanfil yağının patojenlere karşı daha etkili olduğu ve *S. aureus* ve *Salmonella typhimurium* gibi bakterilere karşı bakterisidal etkisi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, enkapsüle karanfil yağının işlenmiş et ürünlerinde nitrit benzeri bir koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir. Bu bulgular, karanfil yağının enkapsülasyonu ile koruyucu etkisinin artırılabilirliğini ve gıda endüstrisinde kullanım potansiyelini artırabileceğini göstermektedir.

Hill vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, tarçın kabuğu ve karanfil ekstraktları dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak Beta-siklodekstrin

ile mikrokapsüle edilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin trans-sinamaldehit ve öjenol tutma etkinliklerinin sırasıyla %42 ve %78 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, enkapsülasyonun karanfil bileşenlerini koruma açısından etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir. Beta-siklodekstrin ile yapılan enkapsülasyon, karanfilin aktif bileşenlerinin stabilitesini artırarak, uzun süreli kullanımlarda etkinliğini korumasına yardımcı olabilir.

Çolakdalcı (2022), farklı kabuk malzemeleri (maltodekstrin, sodyum kazeinat, arap zıncı ve jelatin) kullanılarak dondurarak kurutma yöntemiyle karanfil esansiyel yağını mikrokapsüllemiş ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada karanfil uçucu yağını oluşturan bileşenler arasında öjenolun (%71.86) ana fenolik bileşen olarak belirlendiğini, en yüksek mikrokapsülasyon etkinliğinin maltodekstrin/sodyum kazeinat (%86.22) mikrokapsüllerinde tespit edildiğini bildirmiştir. Maltodekstrin/sodyum kazeinat mikrokapsüllerinin küresel bir yapı sergilediğini, diğerlerinde çentikli ve kırık cam benzeri bir yapı gözlemlendiğini belirtmiştir. Gerçekleştirilen salınım testinde duvar materyallerin çözünürlüğünün mikrokapsüllerin salınımına etki ettiğini ve maltodekstrin/sodyum kazeinat/jelatin mikrokapsüllerinin en düşük salınımına sahip olan mikrokapsül olarak belirlendiğini rapor etmiştir. Karanfil uçucu yağının maltodekstrin/sodyum kazeinat ve maltodekstrin/sodyum kazeinat/arap zıncı formülasyonları ile hazırlanan mikrokapsüllerin maltodekstrin/sodyum kazeinat/Jelatin formülasyonuna kıyasla hem mikrokapsül karakterizasyon testlerinde hem de antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerde daha başarılı olduğunu bildirmiştir.

5. Sonuç

Bu makale, bitkilerdeki bileşenlerin mikrokapsülasyonunun önemini vurgulamış ve nane, kekik, biberiye ve karanfil gibi bitkilerdeki uçucu yağlar ve ekstraktlarının enkapsülasyon sürecini detaylı bir şekilde ele almıştır. Mikrokapsülasyon, bu değerli bileşenlerin stabilitesini koruma, etkinliklerini artırma ve kontrollü salınımını sağlama konularında etkili bir stratejidir.

Yapılan çalışmalar, bitkisel bileşenlerin mikrokapsülasyonunun bir dizi avantajını ortaya koymaktadır. İlk olarak, mikrokapsülasyon, bitkisel bileşenlerin hassas doğasını koruyarak çevresel faktörlere karşı direnç sağlar. Böylece, ışık, oksijen, nem ve yüksek sıcaklık gibi etmenlerin bileşenler üzerindeki olumsuz etkileri en aza indirgenir. Bu, bileşenlerin stabilitesini artırır ve daha uzun bir raf ömrü sağlar.

İkinci olarak, mikroenkapsülasyon, bileşenlerin kontrol edilebilir salınımını sağlar. Bu, bitkisel bileşenlerin zamanla ve belirli bir hızda serbest bırakılmasını mümkün kılar. Bu özellik, bitkisel bileşenlerin terapötik veya aromatik etkilerini daha uzun süre sürdürmesini sağlar. Özellikle gıda, kozmetik ve farmasötik alanlarda, kontrollü salınım, ürünlerin etkinliğini ve kullanıcı deneyimini artırmak için büyük bir öneme sahiptir.

Üçüncü olarak, mikroenkapsülasyon, bitkisel bileşenlerin formülasyon ve uygulama alanlarını genişletir. Mikrokapsüller, çeşitli ürünlerde kullanılacak farklı formülasyonlara entegre edilebilir. Örneğin, gıda ürünlerine ve kozmetik ürünlere eklenerek özellikli ürünler oluşturulabilir.

Sonuç olarak, bitkilerdeki bileşenlerin mikroenkapsülasyonu, değerli bileşenlerin stabilitesini ve etkinliğini artırırken, çeşitli endüstrilerde kullanımlarını genişletebilir. Bu yöntem, bitkisel bileşenlerin ticari değerini artırabilir ve ürünlerin daha uzun süre dayanmasını sağlayarak müşteri memnuniyeti sağlayabilir.

Kaynaklar

Alaşalvar, H. (2017). Tıbbi ve aromatik nane türlerinden buzlu çay üretimi (Yüksek Lisans Tezi). Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Aslan, M. (2022). Lipozomal enkapsüle edilmiş bazı bitki ekstraktlarının ekmek ve yaş makarna formülasyonlarında doğal koruyucu olarak kullanımı (Doktora Tezi). Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya.

Atak, Z., Koç, M. ve Kaymak-Ertekin, F. (2017b). Gıda endüstrisinde aroma mikroenkapsülasyonu. Akademik Gıda, 15(4), 416-425.

Atak, E., Yıldız, E. ve Uslu, M. E. (2017a). Fenolik bileşiklerin enkapsülasyonu. M C B Ü Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi, 24(2), 82-92.

Atay, E. ve Altan, A. (2019). Proses parametreleri ve çözelti özelliklerinin koaksiyal elektropüskürtme yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin morfolojik özellikleri üzerine etkisi. Gıda, 44(3), 534-551.

Aydın, Ö. ve Ünlüel, İ. (2021). Enkapsülasyon teknikleri ve kontrollü salım. Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, 32(Özel Sayı), 640-648.

Aytemur, E. (2017). Adaçayı yağının püskürtmeli kurutucu ile enkapsülasyonuna taşıyıcı malzemelerin etkisi (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.

Badee, A. Z. M., Amal, E., El- Kader, A. ve Hanan, M. A. (2012). Microencapsulation of peppermint oil by spray drying. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 6(12), 499-504.

Bakri, A. M, Fang, Z., Khan, M. A, Chen, Y., Chen, Y. Q. ve Liang, L. (2017). Tuna oil and mentha piperita oil emulsions and microcapsules stabilized by whey protein isolate and inulin: Characterization and stability. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 494-503.

Baranauskaite, J., Duman, G., Corapcıoğlu, G., Baranauskas, A., Taralp, A., Ivanauskas, L. ve Bernatoniene, J. (2018). Liposomal incorporation to improve dissolution and stability of rosmarinic acid and carvacrol extracted from Oregano (*O. onites* L.). *BioMed Research International*.

Başıyđit, B. (2017). Mikroenkapsüle instant meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra* L.) şerbeti (çayı) üretimi ve depolamanın kalite üzerine etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Harran Üniversitesi, şanlıurfa.

Başıyđit, B. ve Çam, M. (2017a). Püskürtmeli kurutucu ile nane (*Mentha piperita* ve *Mentha spicata*) esansiyel yağı mikroenkapsülasyonu. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(1), 24-34.

Başıyđit, B. ve Çam, M. (2017b). Püskürtmeli kurucutu ile mikroenkapsüle edilmiş nane (*Mentha Piperita* ve *Mentha Spicata*) esansiyel yağının salınım profili. *Gıda*, 42(2), 186-196.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. ve Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483.

Can, Ö. P., Ağaoğlu, S. ve Alemdar, S. (2016). Biberiye ekstraktı ilavesinin tavuk köftesinin kalite özellikleri üzerine etkisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, (1)1, 01-06.

Cui, H., Yuan, L., Ma, C., Li, C. ve Lin, L. (2017). Effect of niano-liposome-encapsulated thyme oil on growth of *Salmonella enteritidis* in chicken. *Journal of Food Processing and Pre-servation*, 41, 13299.

Çelik, S. A. ve Ayran İ. (2020). Antioksidan kaynağı olarak bazı tıbbi ve aromatik bitkiler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 13(2), 115-125.

Çevik, K., Alaşalvar, H., Çam, M. ve Yalçın, H. (2021). Keten tohumu yağı ve yağsız süt tozu içeren emülsiyonların püskürterek kurutma ile enkapsülasyonu: yağ oranı ve kurutma sıcaklığının etkileri. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 9(3), 735-742.

Çolakdalcı, ř. (2022). Mikroenkapsüle karanfil uçucu yağının antioksidan ve antimikrobiyal etkisi üzerine farklı duvar materyal kombinasyonlarının etkisi (Yüksek Lisans Tezi). İnönü Üniversitesi, Malatya.

Çoruhli, T. (2013). Kara dut antosiyaninlerinin iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonu ve enkapsülasyon parametrelerinin tepki yüzeyi metodu ile optimize edilmesi (Yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.

Desai, K. G. H. ve Park, H. Y. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.

Dong, Z. J., Touré, A., Jia, C. S., Zhang, X. M. ve Xu, S. Y. (2007). Effect of processing parameters on the formation of spherical multinuclear microcapsules encapsulating peppermint oil by coacervation, *Journal of Microencapsulation*, 24(7), 634-646.

Dong, Z., Ma, Y., Hayat, K., Jia, C., Xia, S. ve Zhang, X. (2011). Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *Journal of Food Engineering*, 104, 455-460.

Erdem, F. (2021). Kuşburnu (*Rosa canina*) fenolik bileşiklerinin mikroenkapsülasyonu. *Gıda*, 46 (4), 1026-1039.

Fernandes, R. V. B., Borges, S. V. ve Bortel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101, 524-532.

Gökmen, S., Palamutoğlu, R. ve Sarıçoban, C. (2012). Applications of encapsulation in food industry. *Electronic Journal of Food Technologies*, 7, 36-50.

Gökbulut, İ. (2017). Nane uçucu yağının enkapsülasyonu için zein-kazein mikrokapsüllerinin geliştirilmesi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(1), 31-40.

Hadian, M., Rajaei, A., Mohsenifar, A. ve Tabatabaei, M. (2017). Encapsulation of *Rosmarinus officinalis* essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antibacterial activity in beef cutlet against *Salmonella Typhimurium* during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 394-401.

Hill, L., Gomes, C. ve Taylor, T. M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT- Food Science and Technology*, 51, 86-93.

Kahraman, S. (2019). Bazı duvar materyalleri ve enkapsülasyon tekniklerinin zeytin yaprağı ekstraktının mikroenkapsülasyonu üzerine etkilerinin incelenmesi (Yüksek lisans tezi). Bursa Teknik Üniversitesi, Bursa.

Karagözlü, M. (2017). Mikroenkapsülasyon parametrelerinin kekik yağında bulunan timol ve karvakrol içeriği üzerine etkileri (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi, İzmir.

Kerdiğe, K. (2019). Karanfil bitkisinde (*Syzygium aromaticum*) uçucu bileşenlerin ve eser elementlerin analizi (Yüksek Lisans Tezi). İnönü Üniversitesi, Malatya.

Koç, M., Sakin, M. ve Ertekin, F. (2010). Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16, 77-86.

Martins, I. M., Rodrigues, S. N., Barreiro, M. F. ve Rodrigues, A. E. (2011). Poly lactide-based thyme oil microcapsules production: evaluation of surfactants. Industrial and Engineering Chemistry Research, 50, 898-904.

Nieto, G., Ros, G., Castilla, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): a review. Medicines, 5(98), 2-13.

Özdemir, N. (2013). Karabiber (*piper nigrum L.*) Oleorezininin dondurarak kurutma tekniği ile mikroenkapsülasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Ankara.

Özgün, N. (2015). Nane uçucu yağının siklodekstrinler ile mikroenkapsülasyonu (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Ankara.

Sezer Öztürk, F. (2016). Mikroenkapsüle biberiye esansiyel (uçucu) yağının in vitro antioksidan etkisinin incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). İnönü Üniversitesi, Malatya.

Peker, H. ve Arslan, S. (2011). Mikroenkapsülasyon ve süt teknolojisinde kullanım alanları. Akademik Gıda, 9(6), 70-80.

Radünz, M., da Trindade, M. L. M., Camargo, T. M., Radünz, A. L., Borges, C. D., Gandra, E. A. ve Helbig, E. (2019). Anti-microbial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. Food chemistry, 276, 180-186.

Soliman, E. A., El-Moghazy, A. Y., Mohy El-Din, M. S. ve Massoud, M. A. (2013). Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity. J. Encap. Adsorp. Sci. 3, 48-55.

Soyuçok, A., Kılıç, B. ve Başyigit Kılıç, G. (2019). Et ürünlerinde enkapsülasyon teknolojisinin kullanımı. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(1), 102-110.

Tontul, İ. (2011). Keten tohumu yağının püskürterek kurutmaya mikroenkapsülasyonu üzerine farklı taşıyıcı madde ve emülsiyon uygulamalarının etkilerinin araştırılması (Yüksek lisans tezi). Akdeniz Üniversitesi, Antalya.

Turasan, H. (2014). Encapsulation of rosemary essential oil (Master Thesis). Middle East Technical University, Ankara.

Tutun, S. ve Yurdakul, Ö. (2022). Enkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. Veteriner farmakoloji ve toksikoloji derneği Bülteni, 13(2), 99-119.

Uğurtay A. (2020). Kekik ekstresinde asetillendirilmiş nişastanın mikroenkapsüle özelliğinin araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.

Varhan, E. ve Koç M. (2018). Gıda bileşenlerinin sprej soğutma yöntemi ile enkapsülasyonu. Food and Health, 4(3), 202-212.

Wang, X., Li, X., Chen, L., Xie, F., Yu, L. ve Li, B. (2011). Preparation and characterisation of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components, Food Chemistry, 126, 1218-1225.

Zabot, G. L. Schaefer Rodrigues, F. Polano Ody, L. Vinicius Tres, M. Herrera, E. Palacin, H. Córdova-Ramos, J. S. Best, I. Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. Polymers 14, 4194.

BÖLÜM X

SALVIA CİNSİ BİTKİ EKSTRATLARI KULLANILARAK METALİK NANOPARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ

Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Salvia Plant Extracts

RAMAZAN CEYLAN^{1,2*} & TÜNAY KARAN³

^{1*}(Dr)Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (SUNUM), Sabancı
Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

²Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji, Genetik
ve Biyomühendislik Programı, Sabancı Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
E-mail: ramazan.ceylan@sabanciuniv.edu
ORCID: 0000-0002-7795-8482

³(Doç. Dr) Yozgat Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Genetik ABD Yozgat, Türkiye
E-mail: tunay.karan@bozok.edu.tr
ORCID: 0000-0002-9114-8400

Özet

Nanobilim ve nanoteknoloji, özellikle metalik nanopartiküller, tıp, eczacılık, biyomedikal mühendislik, tarım ve çevre ürünleri gibi hemen hemen her alanda yaygın pratik uygulamaları nedeniyle son zamanlarda önem kazanmıştır. Metal nanopartiküller için yeşil sentez yöntemi, büyük ölçekli sentezler için hassas boyut, şekil ve içerik kontrolüne sahip basit, güvenilir, uygun maliyetli, toksik olmayan yan ürünler nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu bölümde, burada özetlenen *Salvia* türlerinin ekstraktları destekli metalik nanopartiküllerin sentezi ve uygulamaları anlatılacaktır. Bu nedenle,

bu bölüm, uzun vadeli ve daha güvenli pratik uygulamalar için yeni kimyasal ajanların keşfedilmesine olanak sağlayabilecek ve *Salvia* türlerinin aracılık ettiği metalik nanopartiküllerin tasarımı ve üretimi hakkında bilgi sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: nanoteknoloji; *Salvia* cinsi, yeşil sentez; metalik nanopartiküller

Abstract

Nanoscience and nanotechnology, especially metallic nanoparticles, have recently gained importance because of their widespread practical applications in almost every area like medicine, pharmacy, biomedical engineering, agriculture and environmental products. Green synthesis route for metal nanoparticles have gained interest because of their simple, reliable, cost-effective, non-toxic by-products with precise size, shape, and content control for large scale synthesis. This chapter will depict the *Salvia* species extracts-assisted synthesis of metallic nanoparticles, their applications, which are summarized in here. Therefore, this chapter will provide insight into the design and fabrication of metallic nanoparticles using *Salvia* species-mediated, which could enable the discovery of new chemical agents for long-term and safer practical applications.

Keywords: nanotechnology; *Salvia* genus; green synthesis; metallic nanoparticles

1. Giriş

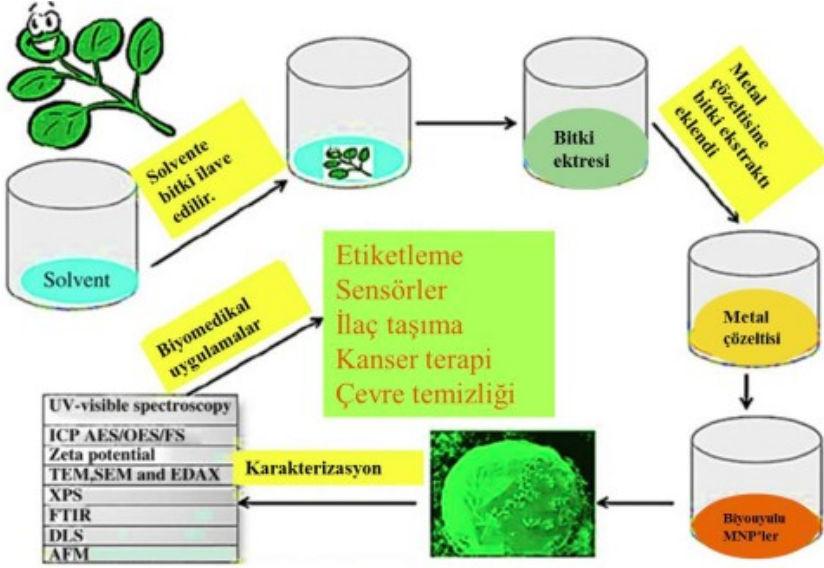
Nanoteknoloji 1-100 nm arasındaki partiküllerin sentezlenmesi ve yönlendirilmesi ile alakalı bir bilim dalıdır. Nanopartiküller (NP) genellikle lazerle kesme, kimyasal indirgeme, parçalama gibi pek çok farklı yöntemlerle sentezlenebilmektedir. NP'leri sentezlemek için çeşitli zararlı kimyasal maddelerin kullanıldığı kimyasal indirgeme yöntemi de dahil olmak üzere bazı geleneksel yöntemler toksisite problemleri nedeniyle hem sağlık hem de çevresel açıdan sorun teşkil etmektedir. Dahası diğer bazı yöntemler ise maddi açıdan ve fazla enerji gereksinimi nedeniyle de kullanımlarda sınırlayıcı etkilere sahiptir. Bununla birlikte NP'leri oluşturmak için kullanılan biyolojik sentez yöntemi ise çevre dostudur ve kirlenici kimyasal ajanlar içermez. Bu da bu yöntemi, başta tıbbi uygulamalar olmak üzere pek çok alanda kullanılabilir olarak ön plana çıkarmaktadır (Elsayed vd., 2022).

Son zamanlarda pek çok araştırmacı NP'lerin sentezinde kullanılan geleneksel fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre daha avantajlı olan biyojenik sentez tekniklerinden biri olan bitki-aracılı NP sentezi üzerine odaklanmıştır.

Bir doğal üründen elde edilen ekstrakt, enzim ya da protein NP'leri en verimli şekilde sentezlemek ve stabilize etmek için kullanılır. Diğer bazı bakteriler ve virüsler gibi biyojenik yöntemlerle karşılaştırıldığında bitkiler ile üretilen NP'ler daha stabilize ve hızlı bir şekilde oluşurlar. Bitkilerde çok fazla miktarlarda fitokimyasal barından yaprak, gövde, çiçek ve tohum gibi kısımları bulunan NP'lerin sentezinde kullanılmaktadır (Doan vd., 2020). Bitki fito-bileşenleri, bitki aracılı NP'leri oluşturmak için indirgeyici ve stabilize edici ajan olarak iş görmektedirler (Khalil vd., 2017). Yeşil sentez olarak bilinen bu yöntem ile bitkilerden NP'lerin çevresel olarak zararsız, ekonomik olarak uygun ve biyolojik olarak güvenli sentezi mümkün olmaktadır. Bu yöntemle sentezlenen NP'ler yeni ve geliştirilebilir nitelikte olması nedeniyle şekillerine, boyutlarına ve dağılımlarına bağlı olarak çeşitli amaçlar için kullanılabilir. Biyotıp, ilaç taşıma, kataliz, uzay endüstrileri, çevre, kozmetik, gıda, sağlık, enerji araştırmaları gibi pek çok alanlarda uygulamaları vardır (Şekil 1) (Singh vd., 2016).

Yaygın olarak “adaçayı” olarak bilinen *Salvia* L. cinsi, dünya çapında 1000'den fazla tür içeren Lamiaceae familyasının en büyük cinslerinden biridir. *Salvia* cinsi; çok yıllık otsu, aromatik ve çalimsı bir bitkidir ve esas olarak Akdeniz, Orta Doğu, Pasifik adaları, tropikal Afrika ve Amerika'da yayılış gösterir (Drew vd., 2017). En fazla tür Meksika'da (yaklaşık 300 tür) bulunmaktadır ve ikinci sırada ise Türkiye (90 türden fazla ve yarısından çoğu endemik) bulunmaktadır (Hafez Ghoran vd., 2022). Bu cins aynı zamanda pek çok rahatsızlığın tedavisinde kullanılan önemli tıbbi bitkileri içerisinde barındırmaktadır. *S. officinalis* (adi adaçayı), *S. multiorrhiza* (kırmızı adaçayı; Çince Danshen), *S. lavandulifolia* (İspanyol adaçayı), *S. sclarea* (misk adaçayı), *S. hispanica* (chia) gibi en iyi tanınan türler, birçok ülkede halk hekimliğinde şifalı bitkiler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bazı *Salvia* türleri Alzheimer karşıtı ve bilişsel güçlendiric, antidepresan; kardiyovasküler, anti hiperglisemik/hiperlipidemik hipotansif, antiinflamatuvar, antioksidan, sitotoksik/anti-proliferatif, antiprotozoal, mantar önleyici, antiviral ve antimikrobiyal gibi ilginç farmakolojik aktiviteler de sergilemektedir (Hafez Ghoran vd., 2022). *Salvia* bitkilerinin büyük çeşitliliği, fitokimyasal zenginlikleri ile birleşerek, yeni yapı iskelelerine sahip yeni farmakolojik olarak aktif bileşikler keşfetme konusunda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Ayrıca içerdikleri ve önemli farmakolojik etkinliklere sahip fitokimyasallar nanopartiküllerin yeşil sentezi için de önemli bir hazine konumundadır.

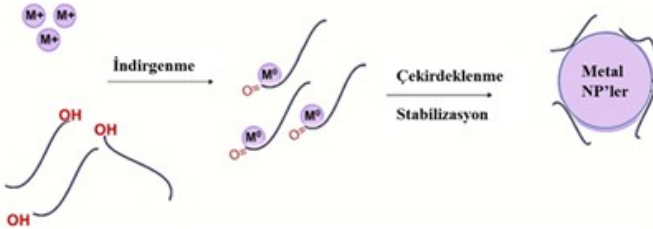
Bu bilgiler ışığında çok önemli bir cins olan *Salvia* cinsinin kullanılarak farklı metal nanopartiküllerinin yeşil sentezi bu bölümde ele alınacaktır.



Şekil 1. Bitkiler kullanılarak sentezlenen metalik NP'lerin gösterimi (Ceylan, 2020)

2. Metalik Nanopartiküller

Metalik nanopartiküller, boyut ayarlamadaki fizibiliteyi, yüksek düzey hacim oranları, geliştirilebilir çözünürlükleri, yüzey uyarlanabilirliği ve daha pek çok fonksiyonel özellikleri ile önemli bilimsel araştırmalara ve teknolojik dönüşümsel ilgiye öncülük etmişlerdir (Şekil 2) (Kaur vd., 2023). Kapsamlı uygulama alanlarına rağmen metalik nanopartiküllerin sentezlenme esnasında kullanılan kimyasallar sahip olduğu yüksek toksisite riskleri nedeniyle insanlar ve çevre için olumsuz yan etkiler oluşturmaktadır. Bu yüzden bazı bitkisel bileşenli maddelerin metalik nanopartiküller için biyosentezi için kullanımı insan ve çevre sağlığına yönelik kaygıları azaltmada oldukça önemlidir.



Şekil 2. Metallerden NP sentezi (Ceylan, 2020)

2.1. Gümüş Nanopartikülleri (AgNPs)

AgNP'ler biyomedikal, sağlık hizmetleri, tarım, tekstil kaplamaları gibi uygulamalarda sıklıkla kullanılan en yaygın metalik nanopartiküllerdir (Calderón-Jiménez vd., 2017). AgNP'lerin en belirgin antibakteriyel, antifungal, ve antioksidan özellikleri göstermektedirler (Priyadarshini, vd., 2013). AgNP'ler özellikle bakterilerin yaralar üzerinde çoğalmalarını engeller ve bu nedenle yanık ve yaraların tedavisinde kullanılan merhemlerde kullanılırlar (Prakash vd., 2013). Gümüş nanopartiküller; sensör teknolojisi, biyolojik seviyelendirme, ev temizlik ürünleri, kumaş temizleyiciler, yansımaya önleyici kaplamalar ve hassas yüksek performanslı elektronikler dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Cheng vd., 2021). Gümüş nanopartiküllerinin tüm bu kullanımları önemli olsa da en önemlisi tıp alanındaki kullanımlarıdır. AgNP'lerin antiinflammatuar özelliklere de sahip olmasıyla birlikte antibakteriyel kullanımı tıp alanı için oldukça önem arz etmektedir. İlk araştırmalar, nanopartiküller mevcut olduğunda yaralarda lokal matriks metaloproteinaz (MMP) aktivitesinin azaldığını ve nötrofil ölümünün arttığını, bunun da yara iyileşmesini hızlandırdığını ileri sürmektedir (Joorabloo ve Liu, 2022).

2.2. Altın Nanopartikülleri (AuNPs)

Tüm metalik nanopartiküller arasında altın nanopartiküller, çok çeşitli boyut ve şekillere ve ayarlanabilir en kararlı optik ve elektriksel özelliklere sahiptir (Chen vd., 2008). Altın nanopartikülleri, hastalıkların teşhisi, ilaçların taşınması, optik ve elektriksel özelliklerin görüntülenmesi dahil olmak üzere çok çeşitli tıbbi uygulamalara sahiptir (Sibuyi vd., 2021).

AuNP'ler son zamanlarda özellikle biyolojik amaçlar için kullanımı dikkat çeken çok sayıdaki metal nanoyapılardan biridir. Ayarlanabilir yüzey plazmon rezonansı (SPR), yüksek yüzey reaktivitesi, biyoyumluluk ve enerji absorbans kapasitesi, onları teşhis ve tedavi ajanları olarak ideal kılan benzersiz özelliklerinden birkaçını oluşturmaktadır. AuNP'leri sentezleme teknikleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç prosedenden oluşmaktadır. AuNP'leri fiziksel yöntem ile sentezlemek için önemli miktarda enerjiye ihtiyaç vardır ve bu yolla üretilen AuNP'lerin kalitesi iyi değildir. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan kimyasal olarak sentezlenen AuNP'lerin toksisitesi de araştırmalarla ortaya konmuştur. AuNP'leri daha minimize ve stabil hale getirmek ve toksisite etkilerinden kurtulmak için biyolojik bir prosedürle bitki

fitokimyasallarının kullanılarak geliştirildiği yöntemlerin ise diğerlerine göre daha üstün olduğu kanıtlanmıştır. Bu yeşil sentez tekniği ekonomik olmakla birlikte terapötik kullanımlar için çok uygundur ve ekolojik kaygıları da en aza indirmektedir. Bununla birlikte AuNP'lerin sentezi sırasında kullanılan fitokimyasalların, sentezlenen nanopartiküllerin antioksidan gücü arttırdığına dair raporlar mevcuttur (Kaur vd., 2023).

2.3. Diğer Metal Nanopartiküller

Metal nanomalzemedeki özel yapısı ve biyokimyasal özelliklerin varlığı, ona inorganik yapıdaki nanoyapılardan daha fazla fayda sağlamaktadır (Mota vd., 2013). Elektronik, enerji, çevresel iyileştirme, biyolojik uygulamalar ve katalizde metal nanopartiküllerin ve metal oksit nanopartiküllerin uygulamaları ümit vericidir. Ag, Au, Fe, Pd, Pt ve ZnO, TiO₂ metal nanopartiküller ve CuO gibi metal-oksit nanopartiküller; yakıt hücrelerinde, biyomedikal uygulamalarda (antibakteriyel, antikanser, ilaç taşınması, biyosensör vb.), su arıtma, organik sentezde katalizör, organik kirleticilerin fotokatalitik olarak uzaklaştırılması ve diğer uygulamalarda kullanılmak üzere sentezlenirler (Gebre, 2023).

3. Metalik NP'lerin Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonu UV-Vis spektroskopisi, Fourier dönüşüm kızıl ötesi spektroskopisi (FT-IR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), X-ışını kırınımı (XRD), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), dinamik ışık saçılımı (DLS), enerji dağılımlı spektroskopi (EDS) gibi fiziksel ve kimyasal olarak çeşitli enstrümanlarla gerçekleştirilir (Çizelge 1) (Vijayaram vd., 2023).

Çizelge 1. Karakterizasyon metodlarının özellikleri, avantajları ve dezavantajları (Ceylan, 2020)

Metod	Fiziksel ve Kimyasal Özellikler	Avantajları	Dezavantajları
<i>UV-Vis</i>	Boyut ve şekle bağlı optik özellikler	-	-
<i>FTIR</i>	Yapı ve konformasyon olarak yüzey özellikleri	-Hızlı ve ucuz çözüm -Numune hazırlama süreci yok ya da daha az -Numune kalınlığına bakılmaksızın üstün tekrarlanabilirlik	-Nano ölçekli analizde duyarlılık nispeten düşüktür -
<i>SEM</i>	Şekil, boyut ve boyut dağılımı	NP'lerin şekil ve boyut navigasyonunun eşzamanlı ölçümü	Örnek veya iletken malzemelerin kaplanması kısıtlanması
<i>TEM</i>	-Şekil heterojenliği -Boyut ve boyutta gezinme. -Dağılım.	-SEM'den daha yüksek uzamsal çözünürlükle, NP'lerin boyut taşımalarının ve şeklinin doğrudan ölçümü gerçekleşir. -NP'lerin kimyasal bileşimi ve elektronik yapılarının incelenmesi -TEM ile birçok analitik teknik eşleştirilir.	-Ultra ince örnekler gereklidir -Fizyolojik olmayan durumlarda numune gereksinimi -Pahalı ekipman
<i>XRD</i>	Kristal malzemeler, şekil, boyut ve yapı tayini için	-İyi organize edilmiş yöntemler. -Atom seviyesinde, yüksek uzamsal çözünürlük	-Kristalli materyallerde kullanımı azalır. -Numune için sadece bir bağlanma veya konformasyon sahası; elektron kırınımına kıyasla erişilebilirlik düşük
<i>Zeta potansiyeli</i>	Yüzeyde yük ile ilgili kararlılık	Çok sayıda parçacığın eşzamanlı ölçümü	Doğru ve tekrar ölçümünün elektroosmotik etki eksikliği
<i>DLS</i>	Hidrodinamik boyut dağılımı	-Hızlı ve tutarlı ölçüm -Ekipman için ucuz giderler -Bazı sıvı ortamlar için kullanılabilir -Hidrodinamik boyutların tam olarak belirlenmesi	-Belirli bileşim için, boyut fraksiyonlarının duyarsız korelasyonu için kullanılır. -Çoklu dağılmış örnekte az sayıda büyük partikül bulunması

3.1. UV-Vis Spektrofotometresi

Nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi kullanılarak karakterizasyonunda, nanopartikül boyut seviyesi çeşitli metallere göre değişmekle birlikte boyut aralığı 2-100 nm'dir. Genellikle UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile doğrulanan nanopartiküller, 300 ila 800 nm arasında değişen dalga boylarında analiz edilir. Belirli tuz koşulları altında sentezlenen metalik nanopartiküller, fark edilebilir alanda nokta spektrumu verecek kadar güçlü absorpsiyona sahiptir (Khan vd., 2022). Önceki çalışma raporları, 200-800 dalga boyunun emiliminin, 2-100 nm nanoparçacık boyut aralığının sınıflandırılması için uygun olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Begum vd., 2022).

3.2. FT-IR

FT-IR analizinde kızılötesi kırmızı ışınlar numunenin içinden geçirilir, IR ışınlarının bir kısmı numune tarafından tutulur ve geri kalan ışınlar numunenin içinden geçer. Spektrum, örnek maddeleri karakterize eden dalga boyunun bir fonksiyonu olarak absorpsiyon veya iletim sağlar (Rozali vd., 2023). FT-IR analizi, nanopartiküllerin örneğin gümüş nitrattan gümüşe indirgenmesinde biyomoleküllerin işlevini tanımlamak için uygun maliyetli, basit ve invazif olmayan bir uygulamadır (Naganthran vd., 2022).

3.3. SEM

Nanopartiküller SEM ile karakterize edilebilir. Bu enstrüman ile, sentezlenen nanopartiküllerin şeklini, boyutunu, morfolojisini ve dağılımı rahatlıkla tanımlanabilmektedir (Habeeb Rahuman vd., 2022). SEM analizi ile uygulamadan önceki ve sonraki morfolojik yapıdaki değişimlerde gözlemlenebilir. Örneğin, hücre şeklindeki gözle görülür değişikliklerin ve hücre duvarındaki nanopartiküllerin deliklerinin, nanopartiküllerin antimikrobiyal etkisinin göstergeleri olarak kullanıldığını bildiren raporlar bildirmiştir (Nahari vd., 2022; Wu vd., 2022).

3.4. XRD

Bir malzeme atomik yapıları XRD ile analiz edilebilir. Bu sistem, malzemelerin niteliksel ve niceliksel seviyelerinin belirlenmesine yardımcı olur. Bir nanomateryalin kristal yapısıyla, nanopatikül boyutunu ve yapısını tanımak ve doğrulamak için XRD kullanılmaktadır (Habeeb Rahuman vd., 2022). XRD verilerinden nanomalzemelerin parçacık boyutunu analiz etmek için, Bragg yansıma yasasının genişliği aşağıdaki denkleme göre belirlenerek

Debye-Scherrer formülü uygulanır: $d = K\lambda/\beta \cos \theta$; d burada parçacık boyutu (nm), K Scherrer sabitidir, λ X-ışınının dalga boyudur, β tam genişliğin yarı maksimumudur ve θ kırınım açısıdır (Bragg açısını yarı) (Alaallah vd., 2023).

3.4. DLS

Dinamik ışık saçılımı olarak bilinen bu yöntemin primer uygulaması nanopartiküllerin niteliksel tanımlanmasına yöneliktir. Nanopartiküllerin yüzey yükü ve boyutu da karakterize edilebilmektedir. Sentezlenen nanopartiküllerin polidispersite indeksi bu yöntem yardımıyla analiz edilebilir (Bagheri vd., 2023).

3.4. Zeta potansiyelinin ölçülmesi

Bu teknik NP'lerin stabilitesini değerlendirmek için kullanılır. Zeta potansiyelinin büyüklüğü NP'lerin stabilizasyon derecesini gösterir (Bagheri vd., 2023).

3.5. EDS

Bu teknik, metal NP'lerin elementel bileşimini incelemek için kullanılır. Bu kaynak, NP'lerin temel anlayışı hakkında kapsamlı bilgi sağlar (Bagheri vd., 2023).

3.6. AFM

Bu teknik (Atomik kuvvet mikroskopisi), yüzey pürüzlülüğünü niteliksel olarak tahmin etmek ve NP'lerin sentez yüzey özelliklerinin kapsamlı bir şekilde görselleştirilmesini sağlamak için kullanılır. Sentezlenen NP'lerin yüksek kaliteli üç boyutlu görüntüleme kapasitesine sahiptir (Bagheri vd., 2023).

3.7. ICP-MS

İndüktif eşleşmiş plazma (ICP) spektrometresi ile, deiyonize ve orijinal nanopartikül çözeltilerindeki metal konsantrasyonu tespit edilebilir. Deneysel olarak, birleştirilmiş plazma kütle spektrometrisi (ICP-MS) ve birleştirilmiş emisyon spektroskopisi (ICP-ES), metal nanopartiküllerin konsantrasyonunu hesaplamak için kullanılır (Bagheri vd., 2023).

4. *Salvia* Türleri Kullanılarak Elde Edilen Metalik NP'ler

Salvia türleri (adaçayı), ülkemizde ballıbabagiller ismiyle anılan Lamiaceae (eski adıyla Labiatae) familyasına aittir. *Salvia* cinsinin adı, familyaya ait bazı bitki türlerinin tıbbi özelliklerine atıfta bulunarak 'iyileşmek veya güvende ve

zarar görmemek' anlamına gelen Latince *salvare* kelimesinden gelmektedir. Yüzyıllardır özellikle Çinliler tarafından uzun ömürlülük bitkisi olarak ya da Roma törenlerinde kutsal bitki olarak kullanılmıştır ve bu isim Fransızca'da *sauge* (sage), Eski İngilizce'de *sawge* olarak çevrilmiştir. *Salvia* cinsi, dünya çapında yaygın olan yaklaşık 900 türü kapsar ve çeşitli süs, yemeklik ve tıbbi türleri içerir (Rajendran vd., 2023).

Salvia officinalis, Akdeniz kıyılarında, özellikle Adriyatik Denizi çevresinde yetişen ve bu cinsin en yaygın ve tıbbi olarak kullanımı geçmiş zamanlardan beri gelen önemli türlerinden biridir. *Salvia* cinsi tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve ünlü bir atasözü ise "bahçesinde adaçayı olan neden ölsün ki", bitkinin tıbbi özelliklerini anlatmaktadır. Birkaç yüzyıl önce, pek çok hastalığı iyileştirmek için kullanılan ev ilaçları listesinin neredeyse her zaman en başında yer alıyordu. *Salvia* türleri dünya çapında bitki çayı, gıda aroması ve kozmetik, parfümeri ve ilaç endüstrilerinde kullanılmaktadır. *Salvia* cinsi genel olarak antibakteriyel, antiviral, antioksidatif, antimalaryal, antiinflamatuvar, antidiyabetik, kardiyovasküler, antitümör ve antikanser dahil olmak üzere çoklu farmakolojik etkileriyle bilinir (Rajendran vd., 2023).

Bu kısımda farklı metaller ile *Salvia* cinsine ait türlerin kullanılarak sentezlenen NP'ler ele alınmıştır. Çizelge 2'de ise bu NP'lerin karkaterizasyon özellikleri kısa bir özet olarak sunulmuştur.

Çizelge 2. *Salvia* türleri araçlığı ile sentezlenen bazı metal nanopartiküllerinin karakterizasyon özellikleri

<i>Salvia</i> Türleri	Metal NP	NP şekli	Boyut (nm)	UV Absorbsiyon (nm)	Referans
<i>S. hispanica</i>	Ag	Küresel	7	443-450	(Hernández-Morales vd., 2019)
<i>S. hispanica</i>	Ag	Küresel	50-120	420	(AlRashdi vd., 2023)
<i>S. officinalis</i>	Ag	Küresel	20	457	(Takcı vd., 2023)
<i>S. coccinea</i>	Ag	Küresel	24	415	(Shanmugam, vd., 2021)
<i>S. leriifolia</i>	Ag	Küresel	27.18	460	(Baghayeri, vd., 2018)
<i>S. africana-lutea</i>	Ag	Küresel	6-8	400-500	(Dube, vd., 2020)
<i>S. verticillata</i>	Ag	Küresel	40-70	400	(Mihailović vd., 2023)
<i>S. pratensis</i>	Ag	Küresel	-	400-440	(Srećković vd., 2023)
<i>S. coccinea</i>	Ag	Küresel	10-30	420-440	(Rajendran et vd., 2023)
<i>S. leucantha</i>	Ag	Küresel	10-30	420-440	(Rajendran vd., 2023)
<i>S. splendens</i>	Ag	Küresel	10-30	420-440	(Rajendran vd., 2023)
<i>S. spinosa</i>	Ag	Küresel	19-125	450	(Pirtarighat, vd., 2019)
<i>S. africana-lutea</i>	Au	Çokgen	10-15	500-600	(Dube vd., 2020)
<i>S. hispanica</i>	Fe ₃ O ₄	-	20.7	-	(Thakur, vd., 2023)
<i>S. officinalis</i>	ZnO	-	-	283-317	(Alrajhi ve Ahmed, 2023)
<i>S. officinalis</i>	Ag-Cu	Küresel	50	-	(Malik vd., 2023)

İki farklı *S. hispanica* tohum varyetesi kullanılarak başarılı bir şekilde AgNP'ler sentezlenmiştir (Hernández-Morales vd., 2019). Parlak sarı-turuncu AgNP'lerin koloidal UV-Vis spektrumları AgNP'ler için 449 ve 448 nm'de maksimum absorpsiyon göstermiştir. AgNP'ler optimum koşullarda ortalama 7 nm nanopartikül boyutuna sahip küresel morfoloji göstermiştir. Yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin antimikrobiyal aktivitesi her iki varyete için, gram negatif *E. coli* ve gram pozitif *S. aureus* bakteri modeli olarak kullanılarak incelenmiş ve umut vaat edici sonuçlar bulunmuştur.

Yine başka bir çalışmada AgNP'ler sentezlenmesi için *S. hispanica* bitkisi kullanılmıştır ve sentezlenen bu AgNP'lerin sıçanlar üzerinde bir enfeksiyona karşı antibakteriyel etkisi incelenmiştir (AlRashdi vd., 2023). Bu AgNP'lerin UV-Vis spektrofotometresi 420nm'de dalga boyunu göstererek parçacıkların nano aralığında sentezlendiğini doğrulamıştır. SEM sonuçlarına göre de bu partiküllerin 50-120 nm aralığında oldukları tespit edilmiştir. *S. hispanica* kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin, antibiyotiklerin etkili bir alternatifi olarak değerlendirilebilecek önemli antibakteriyel etkiye sahip olabileceği değerlendirilmiştir.

Salvia coccinea yapraklarının ekstraktları kullanılarak sentezlenen AgNP çalışmasında bu partiküllerin sitotoksik, antioksidan ve anti inflammatuar özellikleri değerlendirilmiştir (Shanmugam vd., 2021). Küresel şekle sahip bu AgNP'lerin ortalama boyutları ise 24-28.4 nm olarak bulunmuştur. *S. coccinea* ile sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrofotometresinde 415 nm maksimum absorbans gözlemlenmiştir ve AgNP oluşumunu doğrulamıştır. AgNP'lerin kristal yapısı, XRD kullanılarak incelenmiş; kırınım, sırasıyla 27.22, 27.73, 32.67 ve 46.72'lik 2θ açılara karşılık gelen 118.3, 197.2, 130, 178.6 ve 311.5'lik beş iyi ayrılmış kırınım piki göstermiştir. Bu çalışma *S. coccinea* yaprak ekstraktlarının kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin oksidatif stres ve inflamasyonu inhibe ederek inflammatuar hastalıkları hafifletmek için terapötik adaylar olabileceğini göstermiştir.

İndirgeyici ve stabilize edici ajan olarak *Salvia leriifolia* yaprağının sulu ekstraktlarını kullanan Ag nanoparçacıklarının (AgNP'ler) biyosentezi yeşil sentez yöntemiyle başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Baghayeri et al., 2018). Sonuçlar, AgNP'lerin uniform küresel morfoloji ve ortalama 27 nm çapla sentezlendiğini ortaya koymuştur. Nanopartiküller, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus coagulase*, *Acinetobacter baumannii* ve *Streptococcus pneumonia*'nın büyümesini vankomisin antibiyotiklerinden daha fazla inhibe etti, ancak AgNP'lerin *Echerishia coli* ve *Serratia marcescens*'e karşı yeteneği antibiyotiğe göre daha azdı.

Salvia pratensis bitkisinin toprak üstü ve kök kısımlarının sulu ekstraktları kullanılarak gümüş nanopartiküllerinin sentezinin gerçekleştirildiği başka bir çalışmada AgNP'ler başarılı bir şekilde üretilmiştir (Srećković vd., 2023). Uv-Vis spektrofotometresi ile yapılan karakterizasyonda AgNP'lerin 400-440 nm arasında maksimum absorbans verdiği ve AgNP üretimi için uyumlu olduğu bildirilmiştir. *S. pratensis*'in sulu ekstraktının toprak üstü kısmı tarafından sentezlenen gümüş nanoparçacıkları, X-ışını toz kırınımogramlarında sırasıyla

38.14, 44.22, 64.4 ve 77.34°'de Bragg kırınım pikleri sergiledi. Pikler sırasıyla yüz merkezli kübik (fcc) kristal gümüş düzlemlere (111), (200), (220) ve (311) karşılık gelmiştir. Benzer sonuçlar kök ekstraktı ile sentezlenen AgNP'ler içinde bulunmuştur.

Bir başka önemli çalışmada, *Salvia coccinea*, *Salvia leucantha* ve *Salvia splendens* bitkileri kullanılarak Ag NP'lerin sentezini ve bunların kanser hücrelerine karşı etkinliği araştırılmıştır (Rajendran vd., 2023). Her üç *Salvia* türünden sentezlenen nanopartiküller için 420-440 nm'de pikler gözlemlendi. Gümüş nanopartiküllerin parçacıklarının boyutu 10 ila 30 nm arasında değişmektedir. SEM görüntüleri, Ag NP'lerin dairesel veya küresel şekilli olduğunu ve daha yüksek büyütmede topaklaşma gösterdiğini göstermiştir. Yine sentezlenen nanopartiküller, A549 insan akciğer kanseri hücrelerine (HLCC'ler) karşı önemli antikanser aktivite göstermiştir.

Salvia spinosa ile ilk kez sentezlenen gümüş nanopartiküllerin (Ag NP'ler) biyosentezi bitki ekstraktının yeteneğini de doğrulamaktadır (Pirtarighat vd., 2019). 450 nm'de bulunan yüzey plazmon rezonansı AgNP'lerin oluşumunu doğrulamıştır. XRD modeli, AgNP'lerin 111, 200, 220 ve 311 kristal düzlemlerine atfedilebilen 2θ değerlerinde farklı pikleri noktaları ortaya çıkarmıştır. FESEM görüntülerine göre seçilen bazı biyosentezlenmiş nanopartiküllerin boyutu 19–125 nm arasında olduğu bulunmuştur.

Başka bir raporda, *Salvia officinalis* sulu ekstraktını kullanarak gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) hızlı ve basit yeşil biyosentezi araştırılmıştır (Taccı vd., 2023). UV-Vis spektrumu, AgNP'ler için yaklaşık 457 nm'de karakteristik bir absorpsiyon piki göstermiştir. (111), (020), (022), (131) ve (222) kafes düzlemlerindeki XRD desenleri, yüz merkezli kübik gümüş nano yapının üretimini ortaya çıkarmıştır. Ortalama 20 nm boyutuna sahip ağırlıklı olarak küresel nanopartiküller, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı önemli antibakteriyel aktivite göstermiştir.

Salvia verticillata ekstraktı kullanarak AgNP'lerin yeşil olarak sentezlenen başka bir çalışmada AgNP'ler başarılı bir şekilde üretilmiştir (Mihailović vd., 2023). Biyosentezlenen AgNP'ler Uv-Vis'de 400 nm'de maksimum absorbans göstermiştir. Ortalama NP boyutları ise 40 ile 70 nm arasında gözlemlenmiştir.

Bir diğer çalışmada biyojenik gümüş NP'ler (AgNP'ler) ve altın NP'ler (AuNP'ler) üretmek için *S. africana-lutea* su ekstraktları kullanılmıştır ve bunların iki patojen bakteri olan *Staphylococcus epidermidis* and *P. aeruginosa*

karşı antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir (Dube vd., 2020). Absorbans spektrumları, AgNP ve AuNP için sırasıyla 400–500 nm ve 500–600 nm arasındaki karakteristik yüzey plazmon rezonans pikleri ortaya çıkarılmıştır. AgNP için 6-8 nm boyutlarında ve küresel parçacıklar elde edilirken, AuNP için 10-15 nm çapında ve çokgen nanoparçacıklar elde edilmiştir.

Polimerlerle ve *Salvia officinalis* ekstraktları ile sentezlenen ZnONP'lerin karşılaştırılmalı bir çalışmada; *S. officinalis* ekstraktları kullanılarak Hidrotermal yöntemiyle oksidasyon-indirgeme mekanizması yoluyla ZnONP'leri veren sulu çinko nitrat çözeltisi içinde ZnONP'leri sentezlenmiştir (Alrajhi ve Ahmed, 2023). ZnONP'lerin bu yeşil sentez yönteminde *S. officinalis* ekstraktının polimerlere göre daha iyi kaplama, indirgeme ve stabilize etme etkisi sergilemiştir. ZnONP'lerin koloidal süspansiyonunun UV-Vis spektrumları, maviye kaymanın eşlik ettiği 283-317 nm aralığında maksimum absorpsiyon göstermiştir.

Fe_3O_4 -Chia tohumları müsilaj nanokompozitleri (Fe_3O_4 -CSM nanokompozitleri), stabilizasyon ve indirgeyici ajanlar olarak görev yapan *Salvia hispanica* (chia tohumları) tohumlarının müsilaj ekstraktını kullanan alışılmadık, çevre dostu bir birlikte çökeltme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir (Thakur vd., 2023). Bu nanokompozitlerin ortalama boyutu 20,7 nm olarak bulunmuştur. *S. hispanica* ile sentezlenen Fe_3O_4 nanokompozitlerinin antibakteriyel aktivitesi *Escherichia coli*, *Shigella flexineri*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* gibi farklı bakteri suşlarına karşı araştırılmış ve mükemmel bir antibakteriyel sonuç sergilediği gösterilmiştir.

Çevre dostu ve biyoyumlu bir hazırlama yöntemiyle yaygın olarak bilinen adaçayı olan *S. officinalis* ekstraktları kullanılarak bimetalik Ag-Cu nanopartiküller (Ag-Cu NP'ler) sentezlenmiştir (Malik et al., 2023). Sentezlenen Ag-Cu NP'lerin boyutunun, küresel bir şekle ve neredeyse uniform bir dağılıma sahip ve ortalama partikül boyutunun ise yaklaşık 50 nm olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu Ag-Cu NP'lerin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri suşlarına karşı antibakteriyel ve antibiyofilm özellikler sergilediği rapor edilmiştir (Malik vd., 2023).

5. Sonuç

Metalik nanopartiküllerin kozmetik, tarım sektörü, katalizörler, yakıt katkı maddeleri, boya ve kaplamalar, gıda paketlenme ve ilaç dağıtım sistemleri gibi geniş bir uygulama alanı vardır. Bu nedenle nanoteknolojinin sanayi devriminin yeni nesil aracı olacağı öngörülmektedir. Metalik nanopartiküller

için geleneksel sentetik yöntemler pahalıdır ve toksik kimyasallar kullanır, bu da tehlikeli yan ürünlerin oluşumuna yol açar. Son birkaç on yılda yeşil kimya ve nanoteknolojiye artan ilgi, nanomateryallerin, özellikle de bitkilerin nanonaptikül sentezi için indirgeyici/kaplayıcı ajanlar olarak rol alması yeşil yolların kullanılmasına yol açmıştır. Önemli bitki türlerinden olan *Salvia* cinsi farmakoloji başta olmak üzere pek çok alan önemli fitokimyasal içerikler sunmaktadır. Sahip olduğu bu içerikler onlara özellikle metalik nanopartiküllerin yeşil sentezi için fonksiyonel olmalarını sağlamıştır. Bu bölümde belirtildiği üzere pek çok metalik nanopartikülün başarılı bir şekilde sentezlenmesinin ve sentezlenen bu nanopartiküllere işlevsellik özellik kazandırmasının önünü açmaktadır. Böylelikle özellikle farmakolojik alanlarda biyolojik özellikler göstermesi nanoteknolojik olarak yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Bunun yanında biyomühendislik, çevre bilimi, tarım gibi pek çok alanda da yenilikçi fikirlerin gerçekleştirilmesi için ucuz, güvenilir, çevre dostu bir alternatif olacaktır.

Kaynaklar

Alaallah, N. J., ABD ALKAREEM, E., GHAİDAN, A., & Imran, N. A. (2023). Eco-friendly approach for silver nanoparticles synthesis from lemon extract and their anti-oxidant, anti-bacterial, and anti-cancer activities. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 10(1), 205-216.

Alrajhi, A. H., & Ahmed, N. M. (2023). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Salvia officinalis* Extract. In *Handbook of Green and Sustainable Nanotechnology: Fundamentals, Developments and Applications* (pp. 1-21): Springer.

ALRashdi, B. M., Germoush, M. O., Sani, S. S., Ayub, I., Bashir, W., Hussain, B., Ayesha, S. (2023). Biosynthesis of *Salvia hispanica* Based Silver Nanoparticles and Evaluation of their Antibacterial Activity in-vitro and Rat Model, 43(2): 283-289.

Baghayeri, M., Mahdavi, B., Hosseinpor-Mohsen Abadi, Z., & Farhadi, S. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using water extract of *Salvia leriifolia*: Antibacterial studies and applications as catalysts in the electrochemical detection of nitrite. *Applied Organometallic Chemistry*, 32(2), e4057.

Bagheri, A. R., Aramesh, N., Hasnain, M. S., Nayak, A. K., & Varma, R. S. (2023). Greener Fabrication of Metal Nanoparticles Using Plant Materials: A Review. *Chemical Physics Impact*, 100255.

Begum, S. J., Pratibha, S., Rawat, J. M., Venugopal, D., Sahu, P., Gowda, A., Jaremko, M. (2022). Recent advances in green synthesis, characterization, and applications of bioactive metallic nanoparticles. *Pharmaceuticals*, 15(4), 455.

Calderón-Jiménez, B., Johnson, M. E., Montoro Bustos, A. R., Murphy, K. E., Winchester, M. R., & Vega Baudrit, J. R. (2017). Silver nanoparticles: Technological advances, societal impacts, and metrological challenges. *Frontiers in chemistry*, 5, 6.

Ceylan, R. (2020). Bazı *Sideritis* ekstreleri kullanılarak yeşil sentez ile tekli ve hibrid nanomateryallerinin sentezi ve bunların biyolojik aktiviteleri. (Doktora tezi). Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya

Chen, H., Kou, X., Yang, Z., Ni, W., & Wang, J. (2008). Shape-and size-dependent refractive index sensitivity of gold nanoparticles. *Langmuir*, 24(10), 5233-5237.

Cheng, Y., Wang, M., Fang, C., Wei, Y., Chen, J., & Zhang, J. (2021). Variability and improvement of optical and antimicrobial performances for CQDs/mesoporous SiO₂/Ag NPs composites via in situ synthesis. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 403-411.

Doan, V.-D., Huynh, B.-A., Nguyen, T.-D., Cao, X.-T., Nguyen, V.-C., Nguyen, T. L.-H., Le, V. T. (2020). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of *Codonopsis pilosula* roots for antibacterial and catalytic applications. *Journal of Nanomaterials*, 2020, 1-18.

Drew, B. T., González-Gallegos, J. G., Xiang, C.-L., Kriebel, R., Drummond, C. P., Walked, J. B., & Sytsma, K. J. (2017). *Salvia* united: The greatest good for the greatest number. *Taxon*, 66(1), 133-145.

Dube, P., Meyer, S., Madiehe, A., & Meyer, M. (2020). Antibacterial activity of biogenic silver and gold nanoparticles synthesized from *Salvia africana-lutea* and *Sutherlandia frutescens*. *Nanotechnology*, 31(50), 505607.

Elsayed, K. A., Alomari, M., Drmash, Q., Alheshibri, M., Al Baroot, A., Kayed, T., Al-Alotaibi, A. L. (2022). Fabrication of ZnO-Ag bimetallic nanoparticles by laser ablation for anticancer activity. *Alexandria Engineering Journal*, 61(2), 1449-1457.

Gebre, S. H. (2023). Bio-inspired synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: the key role of phytochemicals. *Journal of Cluster Science*, 34(2), 665-704.

Habeeb Rahuman, H. B., Dhandapani, R., Narayanan, S., Palanivel, V., Paramasivam, R., Subbarayalu, R., .Muthupandian, S. (2022). Medicinal plants

mediated the green synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications. *IET nanobiotechnology*, 16(4), 115-144.

Hafez Ghoran, S., Taktaz, F., Mozafari, A. A., Tunçtürk, M., Sekeroglu, N., & Kijjoo, A. (2022). Uncommon Terpenoids from Salvia Species: Chemistry, Biosynthesis and Biological Activities. *Molecules*, 27(3), 1128.

Hernández-Morales, L., Espinoza-Gómez, H., Flores-López, L. Z., Sotelo-Barrera, E. L., Núñez-Rivera, A., Cadena-Nava, R. D., . . . Espinoza, K. A. (2019). Study of the green synthesis of silver nanoparticles using a natural extract of dark or white *Salvia hispanica* L. seeds and their antibacterial application. *Applied Surface Science*, 489, 952-961.

Joorabloo, A., & Liu, T. (2022). Recent advances in nanomedicines for regulation of macrophages in wound healing. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 1-19.

Kaur, R., Mishra, A., & Saha, S. (2023). An overview of phyto-assisted fabrication of metallic nanoparticles. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 102723.

Khalil, A. T., Ovais, M., Ullah, I., Ali, M., Shinwari, Z. K., Khamlich, S., & Maaza, M. (2017). *Sageretia thea* (Osbeck.) mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles and its biological applications. *Nanomedicine*, 12(15), 1767-1789.

Khan, M. Q., Kumar, P., Khan, R. A., Ahmad, K., & Kim, H. (2022). Fabrication of sulfur-doped reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode (S@ rGO/GCE) based acetaminophen sensor. *Inorganics*, 10(12), 218.

Malik, M. A., Albeladi, S. S., Al-Maaqar, S. M., Alshehri, A. A., Al-Thabaiti, S. A., Khan, I., & Kamli, M. R. (2023). Biosynthesis of Novel Ag-Cu Bimetallic Nanoparticles from Leaf Extract of *Salvia officinalis* and Their Antibacterial Activity. *Life*, 13(3), 653.

Mihailović, V., Srećković, N., Nedić, Z. P., Dimitrijević, S., Matić, M., Obradović, A., Katanić Stanković, J. S. (2023). Green synthesis of silver nanoparticles using *Salvia verticillata* and *Filipendula ulmaria* extracts: Optimization of synthesis, biological activities, and catalytic properties. *Molecules*, 28(2), 808.

Mota, L. C., Ureña-Benavides, E. E., Yoon, Y., & Son, A. (2013). Quantitative detection of single walled carbon nanotube in water using DNA and magnetic fluorescent spheres. *Environmental science & technology*, 47(1), 493-501.

Naganthran, A., Verasoundarapandian, G., Khalid, F. E., Masarudin, M. J., Zulkharnain, A., Nawawi, N. M., Ahmad, S. A. (2022). Synthesis, characterization and biomedical application of silver nanoparticles. *Materials*, 15(2), 427.

Nahari, M. H., Al Ali, A., Asiri, A., Mahnashi, M. H., Shaikh, I. A., Shettar, A. K., & Hoskeri, J. (2022). Green Synthesis and Characterization of Iron Nanoparticles Synthesized from Aqueous Leaf Extract of *Vitex leucoxydon* and Its Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 12(14), 2404.

Pirtarighat, S., Ghannadnia, M., & Baghshahi, S. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown in vitro and their antibacterial activity assessment. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 9, 1-9.

Prakash, P., Gnanaprakasam, P., Emmanuel, R., Arokiyaraj, S., & Saravanan, M. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops elengi*, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 255-259.

Priyadarshini, S., Gopinath, V., Priyadharsshini, N. M., MubarakAli, D., & Velusamy, P. (2013). Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 232-237.

Rajendran, R., Pullani, S., Thavamurugan, S., Radhika, R., & Lakshmi Prabha, A. (2023). Green fabrication of silver nanoparticles from *Salvia* species extracts: characterization and anticancer activities against A549 human lung cancer cell line. *Applied Nanoscience*, 13(3), 2571-2584.

Rozali, N. L., Azizan, K. A., Singh, R., Jaafar, S. N. S., Othman, A., Weckwerth, W., & Ramli, U. S. (2023). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy approach combined with discriminant analysis and prediction model for crude palm oil authentication of different geographical and temporal origins. *Food Control*, 146, 109509.

Shanmugam, G., Sundaramoorthy, A., & Shanmugam, N. (2021). Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Leaf Extract of *Salvia coccinea* and Its Effects of Anti-inflammatory Potential in Human Monocytic THP-1 Cells. *ACS Applied Bio Materials*, 4(12), 8433-8442.

Sibuyi, N. R. S., Thipe, V. C., Panjtan-Amiri, K., Meyer, M., & Katti, K. V. (2021). Green synthesis of gold nanoparticles using Acai berry and Elderberry extracts and investigation of their effect on prostate and pancreatic cancer cells. *Nanobiomedicine*, 8, 1849543521995310.

Singh, P., Kim, Y.-J., Zhang, D., & Yang, D.-C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in biotechnology*, 34(7), 588-599.

Srećković, N. Z., Nedić, Z. P., Monti, D. M., D'Elia, L., Dimitrijević, S. B., Mihailović, N. R., Mihailović, V. B. (2023). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Salvia pratensis* L. aerial part and root extracts: bioactivity, biocompatibility, and catalytic potential. *Molecules*, 28(3), 1387.

Takcı, D. K., Ozdenefe, M. S., & Genc, S. (2023). Green synthesis of silver nanoparticles with an antibacterial activity using *Salvia officinalis* aqueous extract. *Journal of Crystal Growth*, 614, 127239.

Thakur, V., Narula, D., Sharma, A., Kaur, M., & Sharma, P. (2023). Investigation on green synthesized nanocomposites of magnetite using *Salvia hispanica* for antibacterial activity. *Materials Today: Proceedings*.

Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y.-Z., Vasantharaj, S., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., & Raeeszadeh, M. (2023). Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles—A Review. *Biological Trace Element Research*, 1-27.

Wu, X., Fang, F., Zhang, B., Wu, J. J., & Zhang, K. (2022). Biogenic silver nanoparticles-modified forward osmosis membranes with mitigated internal concentration polarization and enhanced antibacterial properties. *NPJ Clean Water*, 5(1), 41.

BÖLÜM XI

VETERİNER HEKİMLİKTE TEDAVİDE KULLANILAN BİTKİLER

Plants Used in Treatment in Veterinary Medicine

İMİRAN GARİP*

**(Dr. Öğr. Üyesi) Yozgat Bozok Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
E-mail: imran.garip@bozok.edu.tr
ORCID: 0000-0002-4998-8027*

Özet

Bitkilerin insan ve hayvan tedavisinde kullanılmaları insanlık tarihi kadar eskidir. Son yüzyılda kimyasal ilaçların kullanıma girmesiyle bitkisel tedaviler eski önemini kaybetse de antibiyotik direnci, kimyasal ilaçların yan etkileri ve doğala dönüş talebi gibi sebeplerle, tedavide bitkilere yeniden bir dönüş olduğu görülmektedir. Veteriner hekimliğinde de, bitkisel tedaviler, hayvansal gıdalardaki rezidü sorunu, antibiyotik direnci, hayvan refahı gibi taleplerle birlikte bitkilerin tedavide kullanılması yaygınlaşmaktadır. Özellikle tek sağlık konseptine uygun, hayvanlarda kimyasal ilaçların kullanımını azaltmaya yönelik olarak bitkisel kökenli ilaçlara olan talep artmaktadır. Bu bölümün amacı, tıbbi bitkilerin kullanımını üzerine inceleme sunmak ve bitkilerin hem insan hem de hayvan sağlığında geleneksel veya modern uygulamalarına ilişkin güncel yönler ve gelecek perspektifleri üzerine bilgi vermeyi amaçlamaktadır.

Anahtar kelimeler: bitki, ilaç, veteriner hekimliği

Abstract

The use of plants in human and animal treatment is as old as human history. Although herbal treatments have lost their former importance with the introduction of chemical drugs in the last century, there is a return to herbal treatments in treatment due to reasons such as antibiotic resistance, side effects

of chemical drugs and the demand for a return to nature. In veterinary medicine, using plants in treatment is becoming widespread due to demands such as herbal treatments, residue problems in animal foods, antibiotic resistance and animal welfare. The demand for herbal medicines is increasing, especially in line with the one health concept and to reduce the use of chemical drugs in animals. This chapter aims to present a review of medicinal plants' use and provide information on current aspects and future perspectives regarding the traditional or modern applications of plants in both human and animal health.

Keywords: plant, pharmaceutical, veterinary medicine

1. Giriş

Tıbbi bitkiler esas olarak resmi tedavilerde kullanılan bitkiler olarak kabul edilirler. Aromatik bitkiler aroma ve tatları için kullanılırken aynı zamanda geleneksel tıpta tedavi için kullanılırlar. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) “bitkisel ilaçları” tedavi edici ya da diğer insani faydaları olan, ham ya da yarı hammadde içeren, bir veya daha fazla bitkiden elde edilen bitki kaynaklı materyaller ya da ürünler olarak tanımlamaktadır. Tıbbi bitki terimi, hastalık veya diğer vücut patolojilerinin tedavisinde kullanılan çeşitli bitkileri tanımlamaktadır. Uçucu yağ ise tıbbi bitkilerden damıtma ve çözücüler tarafından çıkarılan yağ olarak bilinir. Aromatik bitkiler, şifalı bitkiler ve bunların uçucu yağlarının çeşitli hastalıklardaki olumlu etkileri tarih boyunca kanıtlanmıştır. Aromatik bitkiler, eski zamanlarda hastalıkları veya diğer anormal durumları tedavi etmek için kullanılan ilk farmakolojik bileşiklerdir(Derbassi vd., 2022).

Günümüzde sağlık alanında bitki kaynaklı ürünler etno-tıp alanında kullanılmaktadır. Hemen hemen tüm eski uygarlıklar, bitkilerin tıbbi kullanımına ilişkin farkındalığın bazı kanıtlarını ortaya koymuştur. Antik çağda medeniyetler, yerli halklar aromatik bitki ve şifalı bitkileri sadece fiziksel değil aynı zamanda zihinsel bozuklukları tedavi etmek için de kullanmaktaydılar(Derbassi vd., 2022). O zamanlar insanlar hastalığın doğaüstü bir nedeni olduğuna ve kötülükten ortaya çıktığına inanılıyordu. Bu nedenle şifacılar buldukları toplumlarda önemli roller oynadılar ve büyük saygı duyuldu. Şu anda, resmi sağlık tesislerine erişimin sınırlı olduğu, izole, kırsal ve dağlık bölgelerde yaşayan toplumlarda, gelişmekte olan ülkelerde birçok fiziksel ve ruhsal tedavide tıbbi bitkilerin kullanımına hâlâ güvenilmekte ve değer verilmektedir. Bitkisel tıp, geleneksel tıbbın ana türünü oluşturmaktadır.

Çinli, Amerikan yerlisi, Tibetli ve Hintli Ayurveda uygulayıcıları sadece menşe ülkelerinde değil, aynı zamanda gelişmiş ülkelerde de değer

görmektedir. Amerika Birleşik Devletleri veya Almanya gibi gelişmiş ülkelerde genellikle, saflaştırılmamış bitki özlerinin karışımlarını kullanırlar. Bu karışım içindeki aktif maddelerin birlikte sinerjik olarak çalışabileceği, böylece tüm bitkinin etkisinin diğerlerinden daha fazla olacağı, toksisitenin ise izole aktif bileşenlerin tek başına kullanıldığından daha az olduğu ifade edilir(Gupta vd., 2015). Veteriner hekimlikte bitki bazlı ilaçların kullanımı pratik deneyim ve gözlemlerin aktarılmasına bağlı olarak geleneksel bilginin nesilden nesile sözlü veya yazılı olarak aktarılmasının gerektirir.

Özellikle 1990'lerden bu yana, hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak ilaçların, özellikle de antibiyotiklerin kullanılmasının, bakteriyel patojenlerde giderek artan antibiyotik direncine yol açtığı ortaya konmuştur. Yem katkısı olarak kullanılan antibiyotikler beraberinde, bu bileşiklerin toksisitesine ilişkin endişelerle birlikte potansiyel olarak gıda zincirine girmesi, insan sağlığı ile ilgili ciddi endişelere yol açmıştır. DSÖ'e göre hayvan beslemede kullanılan antibiyotik kullanım durumu, yoğun ilaç kullanımı olması dolayısıyla insan sağlığı içinde önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bazı antibiyotiklerin kullanımı, bakterilerin direnci nedeniyle pnömoni veya salmonelloz gibi bulaşıcı hastalıkların tedavisinin zorlaşmasına yol açmaktadır.

Avrupa Birliği, 1998 yılından bu yana antibiyotiklerin büyümeyi destekleyici olarak kullanımını aşamalı olarak azaltmaya başlamıştır. Birlik 2006 yılında kullanımlarını tamamen yasaklanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, antibiyotik büyüme destekleyici kullanımına hala izin verilmekle birlikte, küresel talepler doğrultusunda önemli kısıtlamalar da getirilmiştir. Benzer şekilde, antibiyotik kullanımına getirilen kısıtlamalar da Kore, Vietnam ve Çin gibi Asya ülkelerinde Avustralya'da ve hatta Latin Amerika ülkelerinde de uygulanmıştır. (Hart vd., 2004; Suresh vd, Bitki ve şifalı otların ilk defa ne zaman ve nerede ilaç olarak kullanıldığını tespit etmek oldukça zordur.

Özellikle tarih öncesi çağlarda yaklaşık 60.000 yıl önce Kuzey Irak'taki bir Neandertal mezarlığında yapılan kazılarda bitki kullanan insanlar ortaya çıkarıldı ve ölülelerin bedeninin en az yedi çiçekle çevrelenmiş bir kalıntılarının bulunması tıbbi bitkilerin kullanımının en eski kanıtı olarak görülür. (Solecki ve Shanidar, 1975; Jamshidi-Kia vd., 2017). Arkeolojik incelemelere dayanarak, İran'ın Aryan uygarlığı döneminde, MÖ 6500'de Zerdüşt'ün (MÖ 1000-500) yazılarında da bitkilerin tedavide kullanıldığı kanıtlanmıştır. Bu dinin kutsal kitabı Avesta'da çeşitli bitkilerin tıbbi özellikleri hakkında bilgiler verilmiştir. Sümer uygarlığı ise 5000 yıl önce Nagpur bölgesinde keşfedilen kil taşları üzerinde yazılı formüllerde haşhaş, banotu, meyan kökü gibi ikiye civarında

bitki ve oniki bitkisel preparatın tarifi yapılmaktaydı (Kelly, 2009; Guidi ve Landi, 2016). Asurlular, Babilliler ve Mezopotamya'nın diğer sakinleri gibi eski uygarlıklar tarafından karıştırılmış ve uyarlanmıştır (Elgood, 2010). Bu çivi yazısı bulgularıyla desteklenmektedir. Yazıtlarda, Mezopotamya'da yaklaşık M.Ö. 2500'de kullanılan, kil tabletler üzerinde çeşitli bozuklukları tedavi etmek için kullanılan 1000 bitkiden bahsedilmektedir. (Hassan, 2015). İncil'de bahsedilen tarçın yağı, mersin, anason, dereotu, çemen otu, mercanköşk, nane, buhur, sarımsak, ardıç, hardal, mür, safrandır (Tucker, 1986; Duke, 2002). Antik İran'da birçok bitki ve bitki ilaç, dezenfektan ve mutfak maddesi olarak kullanılıyordu (Jamshidi-Kia vd., 2017). 9. ve 13. yüzyıllar arasında Dioskorides ve diğer Yunan hekimlerin el yazmaları Arap diline çevrildi ve daha fazlası bilgilerini ve çarelerini geliştirdiler (Duke, 2002; Castleman, 2017). Her ne kadar SümerlerEski Yunanlılar haşhaş özlerini uzun zamandır ilaç olarak kullanmalarına rağmen, ilk olarak Müslüman bilim adamları afyonun bağımlılık yapıcı özelliklerini fark etmişlerdir. 8. ve 9. yüzyılda İslam tıbbı, İbn Sina ve Razi tarafından yazdıkları kitaplarla daha da geliştirildi. İbn Sina, Müslüman bilimadamları arasında tıbbi bitkileri ve hastalıklarda kullanımını ilk sınıflandırılmayı başardığı için ayrıcalıklı bir yere sahiptir. Aynı şekilde İbnü'l-Baitar 1400 bitkinin özelliklerini kapsamlı şekilde tanımlayıp yaşadığı çağa ışık tutmuştur (Jamshidi-Kia vd., 2017).

Hindistan'da bitki ve baharatların ilaç olarak kullanılması konusunda güçlü bir kültür vardır. Antik çağlarda, Atharva ve Rig Veda'nın kutsal kitaplarının el yazmalarında ve Hint kültürünün en eskileri arasında yer alan Sanskritçe yazılarda bitkilerin ilaç olarak kullanımı yaklaşık olarak MÖ 1500'e dayanmaktadır (Sumner, 2000). En popüler bitkiler arasında yer alan *Rauwolfia serpentina* ana aktif bileşeni rezerpindir ve yılan ısırıklarını ya da akıl hastalarını sakinleştirmek ve tedavi etmek için asırlardır kullanıldığı ifade edilmektedir. Eski Hint terapi sistemleri "yaşam bilimi" anlamına gelen Ayurveda'dır (Jaiswal ve Williams, 2016). Bu bütünsel terapi Rig Veda'nın yazılarına dayanıyordu ve günümüzde sadece Hindistan'daki Hindu topluluklarında değil Batı'da da hala uygulanmaktadır. Hindistan ve Nepal'de Tulsi olarak bilinen bitki fesleğeni (*Ocinum spp*) Ayuveerda tedavisinde çeşitli solunum, mide- bağırsak, böbrek, kan, cilt terapisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Polifenolik bileşik kurkumin içeren bir diğer önemli bitki olan zerdeçal, dünya çapında hala çeşitli ilaç tedavilerinin preparasyonlarında kullanılmaktadır (Henrotin vd., 2013). Unani, tıbbi bitkilerin kullanıldığı başka bir tıbbi ve tedavi edici sistemdir. Bitkilere bütüncül bir yaklaşımla Fars-Arap dünyasında gelişmiştir

ve İbn Sina'nın kitabından elde edilen bilgilere dayanmaktadır (Rahman, 1994). Ancak adından da anlaşılacağı üzere "Unani", "Yunan" anlamına gelir, bu bilgi ilk olarak antik Yunan tıbbından türetilmiş ve dünyanın en etkili filozoflarından biri olan Aristoteles tarafından İslam Dünyasına aktarılmıştır. Büyük İskender'in seferi sırasında Unani, 13. yüzyılda Hindistan'da ve Asya-İslam dünyasında tedavi edici ilaç olarak tanıtıldı ve Hintliler tarafından daha da geliştirildi. Zerdeçal ve karanfil ağz hastalıklarının bugün bile tedavisinde kullanımı bu tarihlere dayanmaktadır. (Hongal vd., 2014). Bugün Unani tıbbı, Hindistan, Pakistan ve Bangladeş gibi Güney Asya ülkelerinin yanı sıra Birleşik Krallık, Kanada, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri gibi Batı ülkelerinde de hâlâ uygulanmaktadır (Parveen vd., 2020). Bitkisel tedaviye 300'den fazla bitkiyi tanımlanmıştır. Geleneksel Çin tıbbı bitkisel tedavinin etkinliği için bitkiler arasındaki sinerjinin hayati önem taşıdığını öne sürmektedir. Buradan hareketle çeşitli formüller oluşturulmuştur ve halen bu formüllerin önemli bir bölümü kullanılmaktadır. Mısır Uygarlığı bitkisel formülleri ilk kullananlar arasındaydı. MÖ 1800 civarına ait "Ebers Papirüs" el yazmaları, bitki türleri ve hangi hastalıklarda kullanılacağı hakkında 700 bitkiden ve 800 reçeteden oluşan bir eser oluşturulmuştur. Bu bitkilerin arasında sarımsak, soğan, aloe vera, nar, kişniş ve ardıç gibi bitkilerden haplar, infuzyon, merhem gibi formüller bulunmaktadır. (Duke, 2002; Cragg ve Newman, 2013; Jamshidi-Kia vd., 2017).

Koruyucu özellikleriyle bilinen tarçın ve yağı Mısırlılar tarafından mumyalama işleminde yaygın olarak kullanıldı (Smith vd., 200). Avrupa'da bitkileri ilaç olarak kullandığına dair ilk kanıt Ötztal Alplerinde bulunan buz adam ötzi'nin cesedinde kamçılı kurt enfestasyonunu iyileştirmek için mantar tükettiğine ilişkin bulgulara dayanmaktadır. Tıbbın babası olarak kabul edilen Yunan hekim Hipokrat (MÖ 460-377), hastalıkların olağanüstü değil, doğal nedenlerle ortaya çıkabileceğini tespit etmiştir. Hastalığın dört sıvının dengesizliğinden kaynaklandığına inanıyordu. Başta çeşitli tıbbi bitkiler olmak üzere 400'den fazla bitki türünün kullanımı yoluyla tedavi etti. Yiyeceklerdeki şifalı otların önemini ilk kez kabul etti ve şunu iddia etti: "yiyecekler ilacınız, ilacınız yemeğiniz" (Solomou vd., 2016). Tıbbi bitkilerin önemini ifade eden en önemli iddiadır. Öte yandan, Pedanius Dioscorides, ilk gerçek tıp botanikçisi olarak kabul edilir (Jones, 1996), çünkü, tedavi edici bitkilere atıfta bulunan De Materia Medica adlı bir ansiklopedi de 600'den fazla şifalı bitkinin özelliklerini yazmıştır (Jamshidi-Kia vd., 2017). Bu kitap şifalı bitkilerin yalnızca bitki tanımlarını ve resimlerinin yanı sıra bunların hazırlanışına, kullanımına ve olası olumsuz veya toksik etkilerine de atıfta bulunmaktadır (Sumner, 2000). Avrupa

Ülkeleri 5. ve 12. yüzyılları arasında tıbbi hizmet edememiştir. Bu dönemde İslam dünyasından bilim adamları Yunan ve Roma kültürünü ve doğudan Çin, Hint tıbbını yorumlayıp daha da ileriye taşıdılar. Ancak Avrupa'lı keşiflerin yeni dünyayı, ipek ve baharat yollarını keşfetmeleriyle ekonomik olarak hızlı bir gelişme yaşanmış ve tıbbi bitkileri dünyanın her tarafından yayılmıştır.

Rusya'da 10. yüzyıla kadar tıbbi bitkisel bilgi Yunan manastırları ziyarete gelen keşişler tarafından tıbbi bitki kullanımı aktarılmıştır. Athos'lu bir keşişin Kiev'deki bir hastanede eczane açması, bu olayın en önemli delili olarak gösterilmektedir. Rus İmparatorluğunun geliştiği 15. ve 16. Yüzyılda Asya, İslam ve Batı Avrupa kültürü tanındıktan sonra, Rus doktorlar hem geleneksel hem de Batı tıbbını birleştirip kullandılar. (Shikov vd., 2014). Nijerya gibi birçok bitkisel ilacın kullanıldığı Afrika ülkelerinde uzun zamandır bilgiler nesilden nesile sözlü olarak aktarıldığı için henüz belgelenmemiştir (Kankara vd., 2015). Bugün bile Afrika'nın çeşitli yerlerinde büyük bir kırsal nüfusun önemli bir oranı temel sağlık hizmeti olarak şifalı bitkilere bağımlıdır (James vd., 2018).

Avrupa'da 18. yüzyılda söğüt kabuğunun (*Cortex salignus*) tedavi edici etkisi ortaya çıkmıştır. Rahip Edward Stone tarafından Kraliyet Felsefi İşlemleri'nde belgelenmiştir. Sıtma olarak bilinen bir hastalık üzerinde olumlu etkiler gösteren kınakına ağaç kabuğu hastalığın tedavisinde ve korunmasında kullanılmıştır. Ayrıca yüksük otu bitkisinin çayının tedavi edici etkileri 1775 yılında William Withering tarafından fark edilmişti (Pierpoint, 2013). Kekik türevleri olan timol ve karvakrol oral apselerin tedavisinde kullanılmaya başlanmış olup, günümüzde ise kozmetik, böcekler için ve yaygın olarak mutfakta yemeklere baharat olarak ve veteriner hekimliğinde yem katkı maddeleri olarak kullanılır (Li vd., 2013). Viktorya dönemi kimyagerleri 1897'de bitki kaynaklı doğal ilaçların keşfine dayanarak Eichengrun ve Hoffmann, mideyi daha az tahriş eden bir ilaç olarak asetil salisilik asiti geliştirdiler. Bu üretim dünya çapında bilinen sentetik ilk ilaçlardan biridir. Alman şirketi Bayer AG, tarafından aspirin olarak bilinen ticari ürün olarak üretildi ve bu bir başlangıçtı (Schmidt vd., 2008). İlaç endüstrisinde yeni sentetik ilaçları yaratmaya odaklandığı birçok değişimin bir arada yaşandığı bir dönemdi. Ayrıca mikroorganizmaların penisilin gibi ilaçları üretme yeteneğinin 1928'de Alexander Fleming tarafından keşfedilmesi, diğer ilaç kaynaklarına bakış açısını da ortaya koymuştur. Bir başka şaşırtıcı keşif, ameliyatlardan önce gevşetici olarak uygulanan alkaloid bileşik hyoscine'in (skopolamin) kullanılmasıydı. Analjezik özelliklerine rağmen geçmişte toksisitesi nedeniyle kullanımı kısıtlanmıştı. Aşırı doz hasta için ölümcül olmaktadır. Böylece 19. yüzyılda şifalı bitkilerden elde edilen

bileşiklerin keşiflerinden, yüksükotu otu (*Digitalis purpurea*) aktif maddesi digoksin ve digitoksin şu anda kullanılmaktadır. Konjestif kalp yetmezliğini tedavi etmek için aktif bileşenleri kullanılmaktadır. En önemlisi, doğal bir ürün olan artemisinin keşfi, sıtmadan muzdarip hastaların ölüm oranını önemli ölçüde azaltan bitkilerden, tıbbi bitkilerin önemini göstermektedir (Jamshidi-Kia vd., 2017). Ancak 20. yüzyılın sonlarında sanayi devrimi ile kimya ve makine mühendisliği, tedavide kullanılan ilaçların tamamına yakını sentetik kimyasallardan üretimine yol açmıştır.

2. Bitkisel Kaynaklı İlaçların Veteriner Hekimliğinde Mevcut Kullanımları

Bitkilerin şifa amaçlı kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir ve modern bilimsel ilaçların kökenlerini oluştururlar. Pek çok geleneksel ilacın kökeni bitkilerden gelmektedir. Örnekler arasında aspirin söğüt kabuğundan, digoksin yüksük otu, kinin kınakına ağacı kabuğu ve morfin afyon haşhaşından keşfedilmiştir. Ancak günümüzde yeni bitki kökenli ilaç ve yem katkı maddeleri keşfedilmeli bunun da son teknolojiyle birleştirmek gerekmektedir. Çeşitli rahatsızlıkların tedavisi nesilden nesile aktarılan bilgiye ve uzun süreli kullanıma dayanmaktadır. Sentetik ilaçların sağlık alanında kullanılmasıyla, tıbbi aromatik bitkilerin doğal olduğu ve bu nedenle sentetik farmasötiklere göre daha güvenli sayılmaktadır. Öte yandan bitkisel ya da bitki bazlı tıbbi ilaç, sentetik ilaçlardan daha olumsuz etki ya da etkileşime yol açabilir. Yapılan çalışmalarda tıbbi olduğu düşünülen birçok bitkinin potansiyel olarak toksik, mutajenik ve kanserojenik etkilerinin olduğu ifade edilmektedir. Tıbbi bitkilerle zehirlenme bitkilerin yanlış tanımlanması, hazırlamada, uygulamada hatalar ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir. Hatta aynı bitkinin farklı coğrafyalarda yetişenler arasında toprak, iklim, yapısına bağlı değişiklikler olabilmektedir. 1000 bitki türünde insanlar için 750 civarında zehirli madde bulunmaktadır. Bitkilerin biyaktif maddelerinin emilim, dağılım, metabolizma ve atılım gibi farmakokinetiği, gıdalarla ve diğer ilaçlarla etkileşimi açısından çok önemlidir (Charen ve Harbord, 2020).

Veteriner hekimlikte aromatik bitki ve bitki ekstraktlarının kolaylıkla popüler hale gelebilmeleri, sentetik ürünler olmadığından güvenli olacağı inanisinden kaynaklanmaktadır. Ancak bunların kapsamlı bir şekilde etki mekanizmaları, dozları ve klinik etkileri açısından araştırılması gerekir. Örneğin Halofuginon, *Dichroa febrifuga*'nın bir ekstraktından türetilir. Orijinal ekstraktın sıtmaya karşı ve koksidiyostatik aktivitesiyle biliniyordu ancak çok

dar bir güvenlik marjına sahip olduğundan bu amaçla kullanılmamaktaydı. Tıbbi bitkilere ilişkin güvenlik, toksisite ve yan etkiler konuları standartlaştırılmalı ve bunların ekstraksiyonu da hayvanlarda yaygın olarak kullanılmadan önce uygun şekilde kontrol edilmeli ve üretilmelidir. Hayvanlar toksik bitkiler acı tada sahip olduklarından gönüllü olarak tüketmezler. Son yıllarda bitki ekstraktlarının yem katkı maddesi olarak kullanımında önemli bir artış görülmektedir(Zhang vd., 2022).

Avrupa'da hayvan yemlerine rutin olarak eklenen antibiyotiklerin kullanımının yasaklandıktan sonra bu yasağın dünya çapında yaygınlaşması, alternatifler bulma konusundaki ilginin artmasına yol açmıştır. Çiftlik hayvanlarından özellikle piliç ve domuz yetiştiriciliğinde antibiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılması verim ve karlılık açısından çok önemlidir (Ezzat vd., 2016). Yasaklardan sonra antibiyotikler yerine ilk akla gelen ise baharatlardı. Bitkisel ilaçların yem katkısı olarak kullanılmasıyla, bitki özlerinin sadece hastalığı önlemediği, tavuk beslenmesinde büyüme performansını da arttırdığının gözlenmesiyle, veteriner hekimlikte aranan ilaçlar olmuşlardır. Ağırıklı olarak aromatik bitkilerin yem katkı maddesi olarak kullanımına odaklanılmıştır. Çünkü antibakteriyel büyüme arttırıcıların ve antikoksidiyallerin geri çekilmesiyle ortaya çıkan boşluk, gıda krizine dönüşmeden bitkisel özlerden elde edilen ilaçlarla doldurulmaya çalışılmıştır (Nahed vd., 2022). Ancak bitkisel özlerin doz seviyeleri, parazitlere karşı etkinlikleri ve antibakteriyel etkinlik potansiyellerini ortaya çıkarmak için ilave çalışmalara ihtiyaç vardır. Aksi takdirde kullanımı yem katkı maddesi olarak sınırlı kalacaktır. Özellikle hayvanlarda bitkisel ilaçların karma şekilde hastalıkların önlenmesinde kullanılması, hızla artan antibiyotik direncine de katkı sağlayacaktır. Çünkü hayvan sağlığında kullanılan antibiyotik kullanımı antibiyotik direncine katkısı azımsanmayacak orandadır (Khan vd., 2019). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1994 yılından beri bitkisel ilaçlar reçete gerektirmemektedir. Ancak bu durum üretici firmaların etiketlerindeki aktif maddeyi yeterince kontrol etmediğinden, büyük oranda iddia edilen miktarların eksikliği ya da yokluğuna rastlanmaktadır. Bu durum bitkisel ilaçların güvenilirliğini azaltmakta gelişmesini aslında yavaşlatmaktadır.

Tıbbi bitkiler ve şifalı otlar geleneksel tıpta yetiştigi vahşi doğadan doğal olarak elde edilir. Ancak birçok zararlı insan faaliyeti ve çevresel faktör nedeniyle aşırı hasat, ormansızlaşma, çölleşme ve küresel ısınma gibi şifalı bitkiler özellikle son on yılda ciddi bir yok olma sorunuyla karşı karşıyadır. Yaklaşık 15.000 şifalı bitki türünün habitat tahribatı, aşırı hasat ve dünya çapındaki ticarete aşırı

derecede konu olmasıyla neslinin tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olduğunu bildirilmektedir (Rasool vd., 2020). Tıbbi bitkiler aynı zamanda gıda, kozmetik, tekstil gibi endüstriler için hammadde olmasından, bitki çeşitliliği üzerindeki baskı son derece fazladır. Tıbbi bitkilerin yabani türlerinin kültüre alınıp yetiştirilmesinin de çevresel dengenin bozulmasına veya genetik dinamiklerde değişikliklere yol açabilecektir. Bu durum yalnızca türlerin korunması açısından değil aynı zamanda yerel halkın geliri ve yaşamı açısından da ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Öte yandan ilaç firmaları hammadde alımın yerel pazarlardan almadığında ise yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalabilir. Bu nedenle yabani tıbbi bitkilerin sürdürülebilir hasat metoduyla korunması büyük önem taşımaktadır. Nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan bitkiler genellikle kanun ve ticari kısıtlamalarla korunmaktadır. Botanikçiler ve ekonomistlerin bir kısmı sürdürülebilir hasadın en önemli yol olması gerektiğini ifade etmektedirler. Doğadan toplanan türler için yerel ekonomilere katkıda bulunan önemli bir koruma stratejisi, uzun vadede bitkileri hasadını yapanlara daha fazla katma değer sunacağı düşünülmektedir. Yoksulluk ve çöküşün yanı sıra Geleneksel kontrollerin yanı sıra, sürdürülebilir yabani toplamanın en büyük zorlukları arasında şunlar bulunmaktadır. Sürdürülebilir hasat uygulamaları hakkında bilgi eksikliği, tanımlanmamış arazi kullanım hakları ve mevzuat ve politika rehberliğinin eksikliği doğadaki tıbbi bitki çeşitliliğini tehdit etmektedir. Tıbbi aromatik bitkiler koruma maliyetlerinin belirlenmesi için farklı üretim sistemlerinin kullanılması türlerin doğada korunmasına, kültüre alınıp yetiştirilmesine ilişkin politikalara rehberlik etmeye yardımcı olacaktır (Rasethe vd., 2019).

Tıbbi aromatik bitkiler gibi yüksek değerli ürünlerin toplanması ve ticareti gelişmiş ülkelerde bile sürdürülebilirlikten önce, hem kültürel hem de ekonomik nedenlere dayanmaktadır (Leaman, 2002). Ticari açıdan değerli olan çay, kekik, zerdeçel, zencefil en çok tüketilen bitkilerdir. Bitki popülasyonları açısından sürdürülebilirliğe ekolojik açıdan da bakılmalıdır. Çünkü Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i geleneksel tıba güvendiği ve bunlardan da %60'nın bitkisel ilaçları tedavide kullandığı bildirilmektedir (James vd., 2018). Teknolojik sentetik ilaçlar dünya ilaç pazarının önemli bir bölümünü kapsamasına rağmen, ilaç geliştirme için yeni ürünlerin potansiyel kaynakları olarak tıbbi bitkileri görülmektedir. Geleneksel tıbbin tıbbi bitkileri kullanımı, ilaç sanayisi için yeni biyoaktif maddelerin keşfinde ve kullanımında merkezi bir yol gösterici etkisi vardır (Tran vd., 2020).

Hayvanların kendilerini tedavi etmek için şifalı bitkileri kullanabileceği fikri ilk yıllarda dikkate alınmasada, hayvanlar deneme yanılma yoluyla

bitkilerdeki biyoaktif bileşikleri öğrenmişlerdir. Binlerce yıl süren bu içgüdüsel hareketi inceleyen insanlar tarafından bitkileri kullanarak tedavi etmeyi hayvanlardan öğrendiği öne sürülmektedir. Geleneklerine bağlı halklar, hayvanlardan öğrendiği bilgileri özümsemişler ve kendi tedavi sitemlerine aktararak kuşaklar boyunca aktarmışlardır (Miara vd., 2019). Bu duruma örnek ise Harry M. Hoxsey tanıttığı Hoxsey kanser tedavisidir. Kanserli bir atın otladığı merada, atın bir müddet sonra, tedavi olması sonucu atın yediği bitkilerle diğer hasta atlarda tedavi başlamış daha sonra ise insanların tedavisinde bu bitkisel karışım kullanılmıştır. Aslında burada tedavi veteriner hekim olan Hoxsey adıyla anılsada, kanser tedavisinde kullanılacak bitkileri belirleyen Hoxsey'in hasta atı olmuştur (Zafar ve Lio, 2021). Nematod parazitler için *vernonia* çalısını kullanan dişi şempanzeyi takip eden Amerikalı Dr Michael Huffman şempanzenin kabızlık, halsizlik ve iştahsızlık çektiğini bu sırada *vernonia* çalısından dalı koparıp yedikten sonra, aynı gün içinde hayvanın iyileşme belirtileri gösterdiği ve dışkısının gramında ilk 24 saatte 130 nematod yumurtası döktüğünü, ancak bir gün sonra bu rakamın 15'e düştüğünü tespit etmiştir. *Vernonia* çalısı Afrika toplulukları tarafından halen geleneksel tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır (Ojimelukwe vd., 2019). Asya filleri, uzun yolculuklara çıkmadan önce doğal uyarıcı ve ağrı kesici maddeleri meyvelerinde bulduran *Entada scheffleri* yediği tespit edilmiştir. Bundan sonra dayanıklılığı arttığı için zorlu ve uzun yollara dayanabildikleri ifade edilmektedir. Hamile fil doğumu kolaylaştırmak için için hodan ağacını kullanır, Dünya Doğayı Koruma Vakfı'ndan bilim adamı Holly Dublin'e göre Afrika fillerinin doğuma hazırlanırken belirli bir ağaç türünü aradığı ve kilometrelerce yol gitmek suretiyle, *Boraginaceae* familyasına ait bir ağacı yapraklarını yediği, dört gün içinde sağlıklı doğum yaptığını ve bir daha bu ağacı yemediğini tespit etmiştir. Kenya'daki kadınlarında aynı amaçla bu yapraklardan çay demlediğini ifade edilmektedir (Biser, 1998; Kelemen, 2021).

Brezilya'daki Muriqui maymunlarının bir aile planlaması uyguladığını ifade edilmektedir. Bu maymunların farklı zamanlarda doğal bir senkronizasyon uyguladığı görülmektedir. *Apulia leiocarpa* ve *Platyopodium elegans*'ın yapraklarını yemek için özel çaba gösterdiği, bu yapraklarda ise östrojenik bir isoflavonoid bulunduğu, bu maddenin ise östrojenik etkiyi arttırdığı ve gebeliği engellediği bildirilmektedir. Ancak *Enterlobium contortisiliquim*'ın meyvesini yiyen dişi maymunların ise progesteron öncüsü içeren meyvelerden dolayı gebe kalma oranları arttırmaktır. Asya'nın iki boynuzlu gergedanları ishal önleyici olarak kırmızı mangrov kabuğunu tedavi amaçlı olarak tüketir. Bu kabuk tanenler açısından zengin olduğundan büzüştürücü etkisiyle ishali keser. Ayılar

ise *Ligusticum porteri* köklerini rahatsızlıklarını gidermek için kullanırken, bu bitkini Amerikan Kızılderilileri için temel bir ilaç olduğu biliniyor. Baş ağrısı, mantar ve böceklerle karşı kullanılmaktadır (Strier, 1996).

Bitkisel ürünler, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde yeni terapötik ajanların değerli kaynakları olmuştur(Atanasov vd., 2021). Tedaviye yönelik doğal ürünlerin keşfi, antik Mezopotamya'ya yaklaşık MÖ 2.600'e kadar uzanmaktadır (Christensen, 2021). 19. yüzyılın sonuna kadar mevcut ilaçların tümü doğal ürünler veya minerallerdi (Christensen, 2021). Doğal ürünler şu anda ya ana doğal ürünler ya da standardize edilmiş türevler olarak tüm yeni ilaçların yarısının temelini oluşturuyor. Son otuz yılda kanser tedavisi sırasında onaylanan ilaçların yaklaşık %80'i ya doğal bileşiklerden ya da bunların türevlerinden üretilmiştir (Gupta vd., 2022). Bu, çeşitli kemotiplerden oluşan bol miktarda havuz ve çeşitli farmakolojik aktivitelerle ilişkili olabilir. Bitkisel ürünlerin, redoks homeostazisinin bozulması, çeşitli programlanmış hücre ölümü ve kanser metastazı gibi hücre fonksiyonları ve yolları düzenleyerek kanserin başlamasını, gelişmesini ve ilerlemesini etkili bir şekilde engellediği bildirilmiştir(Gaikwad vd., Srivastava, 2021). Son çalışmalar, doğal bileşiklerin VEGF'ler yoluyla tümör anjiyogenezini modüle etmede önemli rollerini göstermiştir (Fakhri, vd., 2021). Çeşitli incelemeler, doğal ajanları tümör anjiyogenezine karşı terapötik olarak özetlemiştir (Hussain vd., 2016; Yang vd., 2021).

Bitkilerden elde edilen bileşiklerden ve türetilip sentezlenen birçok ilaç hammaddesi modern tıpta kullanılmaktadır. Dünya çapında yaygın olarak kullanılan allisin sarımsaktan (*Allium sativum*) elde edilir. Bu bileşiğin 100'den fazla türevi kolesterolü düşürmek, dolaşımı teşvik etmek, veteriner hekimliğinde antibakteriyel yem katkıları olarak kullanılmaktadır. Söğüt ağacından (*Salix alba*) elde edilen asetilsalisilik asit, analjezik, antienflamatuvar, kan sulandırıcı etkisiyle kalp krizini önleyici etkilerinden faydalanılır. Ortaçağ Avrupa saraylarında göz bebeği dilatatörü olan atropin (*Atropa belladonna*) kadınlar tarafından gözlerini büyütmek amacıyla kullanılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar neticesinde; organik fosforlu insektisitlerle zehirlenmelerde memelilerdeki antidot olduğu ortaya çıkmıştır (Müller ve Muller, 1998). Konjestif kalp yetmezliği tedavisinde, kalbi uyarmak için yüksük otu (*Digitalis purpurea*) popüler bir halk ilacı olarak kullanılır(Miara vd., 2019). Yeni doğan yavrularda ve immunosupresif hayvanlarda görülen giardiasis tedavisinde, emetin kullanılırken, ipekanın kurutulmuş köklerinden ise kusturucu özelliğiyle öne çıkan ipeka şurubu kullanılır. Nane (*Mentha spicata*) sindirim sistemi kaslarını

yumuşatmak için ilaç olarak kullanılırken, (*Mentha piperata*) topikal kas ağrısı, migren tedavisinde ve buharla birlikte solunan havayla uygulandığında dekonjestandır. Hayvanlarda ilaç olarak son yıllarda kullanıma potansiyeli keşfedilen aktif maddelerden betain, kurkumin, linalol gibi bitkisel aktif maddeler son yıllarda ilaç olarak kullanımları araştırmalara konu olduğundan, günümüzdeki potansiyel kullanımları ele alınmıştır.

2.1. Betain (*Beta vulgaris*)

Trimetilglisin olarak da bilinen betain, özellikle şeker pancarında yaygın olarak bulunan doğal olarak oluşan bir bileşiktir (Davidson vd., 2008). Belirli durumlarda potansiyel terapötik etkileri nedeniyle veteriner hekimlikte kullanılmaktadır. Betaine, birçok bitkide bulunan doğal bir bileşiktir ve antioksidan özelliklere sahiptir. Antioksidanlar, hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasını sağlar. Ancak, betaine'nin antioksidan etkisi, E vitamini kadar ya da özel antioksidanların etkileriyle karşılaştırıldığında daha sınırlı kalmaktadır (Cai vd., 2021; Mishra, vd., 2019). Betain, LPS ile meydana getirilen mastitte sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve TNF α) üretimini azalttığı, LPS'nin tetiklediği nükleer faktör kapp-B (NF- κ B) sinyal yolu aktivitesini azalttığı, SOD ve GSH-Px ve MDA içeriği aktivitesini arttırdığı, Nrf2 ve HO-1'in protein ekspresyonunun artışı inhibe ettiği bundan dolayı mastitte yangı belirtilerini hafiflettiği bildirilmektedir. Bu sonuçlarla, betain'in, NF- κ B ve Nrf2 sinyal yollarını modüle ederek LPS kaynaklı inflamatuvar yanıtı ve oksidatif hasarı hafifleteceği ifade edilmektedir (Cai vd., 2021). Ratlarla kısıtlamaya bağlı strese oksidatif stres belirteçlerini normal düzeylere düşürdüğü bildirilmektedir (Sharma vd., 2022).

Hayvanlarda betaine'nin antioksidan etkileri, vücutta serbest radikal hasarını azaltarak ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak gerçekleşmektedir. Bu durum, hücrelerin ve dokuların oksidatif stresten kaynaklanan zararlardan korunmasına yardımcı olur. Betain tedavisi, insüline duyarlı iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer gibi dokulardaki değişikliklerle güçlü bir şekilde ilişkili olan glikoz toleransını ve insülin etkisini iyileştirir. AMP ile aktifleşen protein kinazın, betainin antidiyabetik etkisinin altında yatan mekanizmada merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (Szkudelska vd., Szkudelski, 2022). Betaine aynı zamanda metilasyon işleminde de önemli bir rol oynar, DNA'nın düzenlenmesi ve protein üretimi gibi birçok temel hücresel süreçte gereklidir. Bu, genel sağlık ve vücut işlevi açısından önemlidir. Hayvancılıkta performansın artırılması amacıyla, genellikle kümes hayvanları, domuz ve sığır gibi çiftlik hayvanları için yem katkı maddesi olarak kullanılır (Davidson vd., 2008). Besin kullanımını

iyileştirdiği, büyümeyi arttırdığı ve verimli yem dönüşümünü teşvik etmektedir. Küresel ısınma ve iklim değişikliği hayvansal üretimde ısı stresinin önemini geçtiğimiz dönemlerden daha önemli hale getirmiştir. Betain hücre içi sıvı dengesini korumak suretiyle hayvanların ısı stresi ve yüksek tuzluluk ortamları gibi olumsuz etkenlerle başa çıkmasında önemli bitkisel etken maddedir (Eklund vd., 2005; Mishra vd., 2019).

Hayvanlarda karaciğer sağlığını desteklemek için kullanılır. Yağların metabolizmasına yardımcı olduğu ve süt ineklerinde en önemli verim kaybına sebep olan yağlı karaciğer hastalığı riskini azalttığı düşünülmektedir. Yağlı karaciğer hastalığı çeşitli enfeksiyöz hastalıklara davetiye çıkardığı ve verimi etkileyebileceğinden, bu özellik hayvancılıkta karlılık ve sürdürülebilirlik açısından önemlidir. Özellikle süt inekçiliğinde yağlı karaciğer sorunu ve bu sorunun sebep olduğu verim kayıpları sürdürülebilir üretimin en önemli engellerindedir (Siljander-Rasi vd., 2003; Wang vd., 2021). Besi sığırlarında ise kas gelişimi amino asitlerin metilasyonunda rol oynadığından kas gelişimini destekler. Bu, kas sağlığının ve gücünün önemli olduğu yarış atları veya gösteri hayvanları gibi performans hayvanlarında da geçerlidir. Betain, osmoregülatör özelliklere sahiptir, yani hücreler içindeki su dengesinin korunmasına yardımcı olur. Bu özellik çevresel tuzluluk oranındaki değişikliklere maruz kalan hayvanlarda yararlı olmaktadır. Sıcak yaz aylarında sıcaklık stresine karşı koruyucu bir etki yapar. Bazı çalışmalar betainin ruminantlarda flora gelişmesine katkı sağladığı, diğer hayvanlarda ise bağırsak sağlığı ve sindirim üzerinde olumlu bir etkisi olabileceği ifade edilmektedir (Mishra vd., 2019; Siljander-Rasi vd., 2003; Tabandeh vd., 2023). Bağırsak bütünlüğünü ve besin emilimini desteklemesinden dolayı sindirim sisteminin sağlıklı çalışmasına yardım eder. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde balık ve karideslerin sağlığını ve büyümesini desteklemek için su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak betain kullanılır. Suda yaşayan hayvanlarda hayatta kalma ve büyüme için önemli olan ozmotik dengenin korunmasına yardımcı olmaktadır. Betain'in metabolizma hemostazın korunmasında olumlu etkileri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, tip-2 diyabette anti-oksidan sistemi iyileştirdiği, insülin direncini hafiflettiği ve metiyonin-homosistein döngüsünü düzenlediğinden hastalığın önlenmesi ve yönetiminde temel bir mikro besin maddesi olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir. Betain'in hayvan yeminde katkı maddesi ve hayvan tedavisinde kullanımına ilişkin düzenlemeler dünyanın değişik bölgelerinde farklılık gösterebilir, ancak Ülkemizde kullanımıyla ilgili bir kısıtlama yoktur (Davidson vd., 2008; Eissa vd., 2021; Mishra vd., 2019).

2.2. Kurkumin (*Curcuma Longa*)

Kurkumin, yemek pişirmede yaygın olarak kullanılan bir baharat olan zerdeçalda bulunan doğal bir bileşiktir. Hem insan hem de veteriner hekimliğinde potansiyel tedavi edici özellikleri nedeniyle dikkat çekmiştir (Li vd., 2019; Li vd, 2020). Kurkuminin hayvanların tedavisinde antienflamatuvar, antioksidan, nöroprotektif,immunomodulatör olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir. Kurkuminin en yaygın bilinen etkisi, anti-inflamatuvar özellikleriyle bilinir. Çeşitli doku ve organlardaki inflamasyonun azaltılmasına yardımcı olabilir. Bu özellikle hayvanlarda artrit veya inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi durumların tedavisinde geçerli olabilir. Yarış atı yetiştiriciliğinde yangının hafifletilmesi eklem sağlığının korunması çok değerli etkileri vardır (Kan vd., 2019). Bu yüzden yarış atlarından melas ile tatlandırılmış ticari ürünler üretilmiştir (Buhmann vd., 2021; Li vd., 2019; Lin vd., 2019). Antioksidan etki hücrelerin oksidatif strese ve serbest radikallerin neden olduğu hasara karşı korunmasına yardımcı olabileceği anlamına gelir. Bu özellik genel sağlığı destekleyebilir ve oksidatif stresle ilgili durumların yönetilmesine yardımcı olabilir.

Kurkumin, antiinflamatuvar etkilerinden dolayı, artrit veya diğer kronik inflamatuvar rahatsızlıklarından muzdarip hayvanlarda ağrının hafifletilmesine yardımcı olabilir. Kurkumin, bağırsak sağlığını destekleyerek ve sindirimi teşvik ederek sindirim sistemi üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Sindirim sorunları veya mide-bağırsak bozuklukları olan hayvanlar için faydalı olmaktadır. Bazı çalışmalar kurkuminin potansiyel anti-kanser özelliklerine sahip olduğunu ileri sürmektedir. Kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir ve vücudun kansere karşı doğal savunmasını destekleyebilir. Kanser ilaçlarının etkilerinin arttırılmasında ve yan etkilerinin azaltılmasında etkili olduğu ifade edilmektedir (Geng vd., 2016; Sun vd., 2016). Ancak bu alanda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Kurkuminin antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri hayvanlarda yara iyileşmesinin daha hızlı olmasına katkıda bulunabilir. Kurkumin'in potansiyel nöroprotektif etkileri, yaşlanan hayvanlarda bilişsel gerileme gibi sinir sistemini etkileyen durumların yönetilmesiyle ilgili olabilir. Kurkumin, bağışıklık sistemini modüle etmeye yardımcı olmaktadır, enfeksiyonlar veya bağışıklıkla ilgili bozukluklar sırasında düzenleyici etkisiyle tedavide kullanılır. Kurkuminin biyoyararlanımı sınırlıdır, bu da tek başına alındığında vücut tarafından iyi bir şekilde emilemeyeceği anlamına gelir. Piperin (karabiberde bulunan bir bileşik) içerenler gibi kurkuminin emilimini artıran formülasyonlar daha etkili olabilir.

2.3. *Kanabidiol (Cannabis sativa)*

Cannabidiol (CBD), kenevir bitkisinden elde edilen psikoaktif olmayan bir bileşiktir. Hem insan hem de veteriner hekimliğinde potansiyel terapötik etkileri nedeniyle popülerlik kazanmıştır. CBD, vücuttaki çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan endokannabinoid sistemle etkileşime girer. CBD'nin veteriner tedavisinde ağrı yönetiminde, kaygı ve stres giderici, nöbet kontrolü, bulantı ve kusmada, kullanılmaktadır. CBD genellikle hayvanlarda, özellikle de kronik ağrı problemi olanlarda veya cerrahi prosedürlere sonra ağrıyı yönetmek için doğal bir alternatif olarak kullanılır. Ağrı yanığının bir ayağını oluşturduğundan ve endokannabinoid sistemle olan ilişkisinden dolayı ağrıyı hafifletmeye yardımcı olabilecek özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Della Rocca ve Di Salvo, 2020; Thao vd., 2023). CBD'nin kaygı giderici (kaygı azaltıcı) etkileri olabilir; bu, ayrılık kaygısı, gürültü fobileri, seyahatle ilgili stres veya diğer kaygı bozuklukları olan hayvanlar için faydalı olabilir (Thao vd., 2023). Özellikle evde beslenen hayvanlarda insanlarla olan yakın ilişki, seyahat, tatil gibi çeşitli sebeplerle ayrılık olduğunda kaygı ve strese sebep olmaktadır. Böbrek üstü bezlerden salgılanan stres hormonları bağışıklık sistemini baskılamakta ve çeşitli hastalıklara davetiye çıkartmaktadır. Bunun en yaygın örneği ise kedilerde görülen uzun tatil dönüşü evde kalmasından dolayı meydana gelen feline infeksiyöz peritonitis (FİP) hastalığı en çarpıcı örnektir. CBD'nin veteriner hekimlikte en iyi bilinen kullanımlarından biri, özellikle epilepsili köpeklerde nöbetleri yönetmektir. FDA, köpeklerde nöbetlerin tedavisi için CBD bazlı spesifik bir ilacı onayladı. CBD, hastalık veya tıbbi tedaviler nedeniyle iştah kaybı yaşayan hayvanlarda iştahı uyarmak için kullanıldığında etkili olduğu ifade edilmektedir (Rong vd., 2017; Thao vd., 2023).

CBD, kemoterapi gibi tedavi gören hayvanlarda veya gastro-intestinal rahatsızlık durumlarında bulantı ve kusmanın azaltılmasına yardımcı olabilir (Atalay vd., 2019; Burstein, 2015). Şampuanlar, kremler ve balsamlar gibi CBD içeren ürünler, hayvanlardaki deri rahatsızlıklarını, alerjileri ve tahrişleri tedavi için kullanılır. CBD bazen kanserli hayvanlar için tamamlayıcı bir tedavi olarak kullanılır. Potansiyel anti-kanser özelliklerine sahip olduğu ve kanser tedavilerinde ilaçların yan etkilerinin azaltılmasında, etkilerinin potansiyalizasyonunda ve ilgili semptomların yönetilmesine yardımcı olacağına dair bildirimler mevcuttur (Della Rocca ve Di Salvo, 2020; Di Salvo vd., 2023). CBD genellikle güvenli kabul edilirken, bazı hayvanlarda uyuşukluk, ağız kuruluğu veya iştahta değişiklik gibi yan etkiler görülebilir. Hayvanlar CBD'ye

farklı tepki verebilir. Bireysel değişkenlik vardır. Bir hayvan için işe yarayan, başka bir hayvan için aynı şekilde işe yaramayabilir. Evcil hayvanın tepkisini izlemek ve gerektiğinde veteriner hekim desteği alınmalıdır.

Özetle, CBD veteriner hekimlikte potansiyel bir tedavi seçeneği olarak ümit vericidir, ancak bir veterinerin rehberliğinde ve evcil hayvanların güvenliğine ve refahına odaklanarak kullanımına dikkatle yaklaşmak önemlidir. Veteriner hekimliğinde kullanımı ile ilgili daha fazla bilimsel çalışma yapılmalıdır.

2.4. Timokinon (*Nigella sativa*)

Timokinon olarak da bilinen, genellikle çörek otu, *Nigella sativa* tohumlarında bulunan biyoaktif bir bileşiktir. Bu bileşik, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser etkileri de dahil olmak üzere potansiyel terapötik özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Veteriner hekimlikte timokinonun kullanımına yönelik bir miktar ilgi olsada, bu alandaki araştırmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Timokinonun hayvanlarda yangısel durumların tedavisinde faydalı olabilecek anti-inflamatuar özellikler göstermiştir. Artrit, inflammatuar bağırsak hastalığı veya diğer inflammatuar bozuklukları olan hayvanların tedavisi için düşünülebilir (Aboubakr vd., 2021; Kathem vd., 2022).

Timokinonun antioksidan özellikleri hücrelerin oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikallerin meydana getirdiği hasardan korunmasına yardımcı olabilir. Bu durum özellikle yaşlı hayvanlar veya çevresel stres faktörlerine maruz kalanlar için geçerli olabilir. Bazı çalışmalar, timokinonun, kanser hücrelerinin büyümesini engelleyerek ve apoptozu (programlanmış hücre ölümü) teşvik ederek kanser önleyici etkilere sahip olabileceği bildirilmektedir. Ancak hayvanlarda çeşitli kanser türlerine karşı etkinliğini ve güvenliğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bağışıklık tepkisini modüle edebilir ve potansiyel olarak enfeksiyonlar veya bağışıklıkla ilgili durumlar sırasında bağışıklık sistemini destekleyebilir (El-Far vd., 2022; Mahmoud ve Abdelrazek, 2019). Timokinon bazı antimikrobiyal özellikler göstermiştir, bu da onu belirli enfeksiyonların tedavisinde yararlı kılabilir. Ancak spesifik patojenlere karşı etkinliğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Tip-2 diabetes hastalığında hipoglisemik etkisinden faydalanılabileceği ifade edilmektedir (Bule vd., 2020). Gastro-intestinal sistem üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir ve potansiyel olarak sindirim sistemi bozuklukları olan hayvanlar için düşünülebilir. Astım ve akciğer iltihabı da dahil olmak üzere solunum sağlığına fayda sağlayabileceğini öne sürülmektedir. Bu, solunum sistemi hastalıklarından muzdarip olan hayvanların tedavisinde faydalı olabileceği öne sürülmektedir (Abdo vd., 2021).

Timokinonun karaciğer üzerindeki potansiyel koruyucu etkileri araştırılmıştır. Karaciğer rahatsızlığı olan veya toksinlere maruz kalan hayvanlar için umut verici sonuçlar olmasına rağmen veteriner hekimlikte kullanımına ilişkin araştırmaların sınırlı olduğunu belirtmek önemlidir (Kathem vd., 2022).

2.5. *Linalol, Linalil Asetat (Lavandula angustifolia)*

İnsanlarda ve hayvanlarda sağlıklı kalmayı sağlamak için uçucu yağlar ve bunların bileşenleri de dahil olmak üzere doğal ürünler kullanılmaktadır. Linalool (2,6-dimetil-2,7-oktadien-6-ol), uçucu yağlarda yaygın olarak bulunan ve parfümlerde, kozmetiklerde, ev temizleyicilerinde ve gıda katkı maddelerinde yaygın olarak kullanılan aromatik bir monoterpen alkoldür. Linaloolün antikanser, antimikrobiyal, nöroprotektif, anksiyolitik, antidepresan, anti-stres, hepatoprotektif, böbrek koruyucu ve akciğer koruyucu aktivitesine dair birçok bildirim vardır. Ancak altta yatan mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Linalool, kanser hücrelerinde oksidatif stres yoluyla kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyebilir ve aynı zamanda normal hücreleri korur. Linalool, bakteriyel hücre zarlarının bozulması yoluyla antimikrobiyal etkiler gösterir. Linalool'ün karaciğer, böbrek ve akciğer üzerindeki koruyucu etkileri, antiinflamatuvar aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Koruyucu etkileri ve düşük toksisitesi nedeniyle linalool, antikanser ilaçları veya antibiyotiklerin adjuvanı olarak kullanılabilir. Antibiyotiklerin etkisini potansiyalize etmesinin nedenlerinden biri ise antibiyofilm özelliğidir. Bu nedenle linalool, doğal ve güvenli bir alternatif tedavi yöntemi olarak uygulanmak için büyük bir potansiyele sahiptir (An vd., 2021; Peana vd., 2002; Pereira vd., 2018).

Linalil asetat ise, günümüz insanının en önemli sorunlarından biri olan hafif bilişsel bozukluk (HBB), yaygınlığı giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunudur. HBB gelişiminin altında yatan mekanizmalar belirlenememesine rağmen, oksidatif stres, inflamatuvar yanıtlar ve endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir; bu faktörleri azaltan ajanların HBB'yi önlemede anahtar olabileceğini düşündürmektedir. Şu anda, HBB tedavisi için hiçbir ajan onaylanmamıştır ve yaygın olarak reçete edilen kolinesteraz inhibitörlerinin etkinliği belirsizliğini korumaktadır. HBB gelişimini engelleyebilecek nispeten güvenli doğal ürünler büyük ilgi görmektedir. Misk adaçayı ve lavanta esansiyel yağlarının ana bileşeni olan linalil asetatın (LA), anti-hipertansif, anti-diyabetik, nöroprotektif, anti-inflamatuvar ve antioksidan özellikler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Alqahtani vd., 2023; Hamad Al-Mijalli vd., 2022; Mony vd., 2022; Qneibi, vd., 2023; Shin vd., 2023).

Lavanta ekstraktı veteriner hekimliğinde yem katkısı olarak her yıl artan bir oranda kullanılmaktadır. Hayvanlarda stresi giderme, verim arttırmak, hastalıklara karşı bağışıklık sistemi modülasyonu, et kalitesini ve lezzetini arttırmak amaçlarıyla kullanılmaktadır (Alqahtani vd., 2023). Hayvan yemlerine antibiyotiklerin yem katkısı olarak katılmasının yasaklandıktan sonra, kullanımı en fazla artan bitkisel ekstraktlardan biridir.

2.6. Okaliptol (*Okaliptüs globulus*)

Okaliptüs geleneksel tıpta en popüler şifalı bitkilerden biridir. İnsanlarda iştah kaybı, enfeksiyonlar, soğuk algınlığı, grip, bronşit, boğaz ağrısı ve zatürreyi tedavi etmek için kullanılmıştır (Galan vd., 2020). Okaliptüs esansiyel yağında (EEO) bulunan ana bileşen 1.8-sineoldür (okaliptol). EEO, 1.8-sineolün yanı sıra a-pinen, a-phellandrene, γ -terpinen, a-terpineol, simen, limonen ve spathulenol içerir (Pan vd., 2020). Okaliptol ile önceden yapılan çalışmalarda, antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteler dahil olmak üzere EEO'nun farmakolojik ve sağlık yararlarını gösterilmiştir (Cai vd., 2021; Hoch vd., 2023).

Bir beslenme denemesinde, okaliptüs takviyesi alan tavşanlarda bağırsak mikrobiyal dengesinde ve bağışıklık tepkisinde iyileşme olduğunu gösterilmiştir (Waly vd., 2020). Yumurta tavuklarını okaliptüs takviyeli bir diyetle beslemenin verim özelliklerini ve et kalitesini iyileştirdiğini ve antioksidan enzim aktivitesini artırarak karaciğerde etanolün neden olduğu oksidatif strese karşı koruduğu bildirilmiştir. Etlik (broyler) piliçlerde okaliptüs takviyesinin, ette esansiyel yağ oranını olumlu yönde etkilediği ve et kalitesini arttırdığı bildirilmektedir. Oksidatif stres canlılarda yaygın bir süreçtir; serbest radikallerin üretimi ile vücudun antioksidan sisteminin bu reaktif türleri ortadan kaldırma yeteneği arasındaki dengesizlik anlamına gelir (Birben vd., 2012). SOD ve GSH-Px enzimleri, serbest radikallerin oluşumunu önleyerek ve antioksidan savunmayı artırarak hücreleri koruyan en önemli antioksidan savunma enzimleridir (Mohebodini ve ark., 2019). Ayrıca lipid peroksidasyonu oksidatif stresin önemli bir sonucudur ve MDA içeriğinin artmasına neden olur. Bu nedenle MDA konsantrasyonu genellikle lipid oksidasyonunun boyutunu değerlendirmek için bir biyobelirteç olarak kullanılır (Shirani vd., 2019). Bulgularımız, EEO'nun diyet takviyesinin, SOD aktivitesini artırarak ve MDA içeriğini azaltarak etlik piliçlerin serum antioksidan kapasitesini arttırdığını gösterdi. Bu, EEO'nun etlik piliçlerde daha etkili bir serbest radikal temizleme aktivitesi sağlayabileceği anlamına gelir. EEO'nun etlik piliçlerde antioksidan etkileri hakkında bilgiler

sınırlı olsa da, in vitro çalışmalardan antioksidan etkilerinin olduğuna dair kanıtlar vardır (Palma vd., 2021) .

EEO'nun antioksidan aktivitesini DPPH gibi antioksidan aktivite test sistemleriyle incelemiştir. Bu çalışmada araştırmacılar, radikal temizleme özellikleri ve lipid peroksidasyon inhibisyon kapasiteleri göz önüne alındığında, EEO'nun sentetik olanların potansiyel ikamesi olarak değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir (Ghanima vd., 2020). Bu yazarlar gözlemlenen antioksidan özellikleri 1.8 sineole bağlamışlardır. Horvathova vd., (2014) ayrıca 1.8 sineolün, DNA koruma kapasitesine ek olarak farklı derecelerde indirgeme gücü, radikal temizleme, şelatlama sergilediğini gözlemledi. Okaliptus yağının antioksidan kapasiteyi arttırdığı mekanizma tam olarak anlaşılammıştır (Salehi vd., 2019). Bununla birlikte, aromatik bitkilerin veya uçucu yağlarının bu gözlem için olası mekanizması, bunların hidrojen veya elektron bağlama yeteneklerine ve ayrıca aromatik yapı içindeki eşlenmemiş elektronun yerini değiştirme yeteneklerine atfedilebileceği ifade edilmektedir (Jin vd., 2020).

2.7. Karvakrol (*Thymus*)

Oksidatif stres, oksijenle reaktif türler arasındaki dengesizlikten ve reaktif ara maddelerin biyolojik sistem yeteneği yoluyla detoksifikasyonundan kaynaklanır; bu serbest radikaller protein, lipitler ve nükleik asitler gibi farklı vücut hücre moleküllerine zarar verir. Bitkilerde bulunan uçucu yağlar, reaktif türlerin neden olduğu hücre hasarını azaltan, mutajenik ve kanserojen süreçleri önleyen doğal antioksidanlardır (Ghanima vd., 2020). Karvakrol, enzimatik antioksidanların (katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz) aktivitesini ve enzimatik olmayan antioksidanların (C vitamini, glutatyonu azaltır ve E vitamini) seviyelerini artıran oldukça yüksek anti-oksidatif ve hepatoprotektif özelliklere sahiptir (Favaretto et al., 2020). *Origanum ones* L., en yüksek miktarda karvakrol içerir ve üçlü negatif meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattına karşı, insan glioblastoma U87 hücre hattına göre önemli anti-oksidan ve antikarsinojenik aktiviteler göstermiştir (Rathod vd., 2021; Li vd., 2020; Alanazi vd, 2022). Bitkinin büyüme döneminde aldığı ışığa göre antioksidan kapasitesinin büyük oranda değiştiği bildirilmektedir (Tohidi vd., 2019).

Karvakrolde hidroksil grubunun (OH) varlığı, radikal temizleme aktivitesinin (süperoksit radikalleri, nitrik oksit ve hidrojen peroksit) ana nedenidir. Zayıf asit karakteri, hidrojen atomlarının eşleşmemiş elektronlara bağışını kolaylaştırır ve molekül rezonans yapısında üretilen elektron

saçılmasıyla başka bir radikalini stabilize edilmesini sağlar (Luna vd., 2010). Karvakrol, beyin, karaciğer ve böbreğe zarar veren kısıtlama stresinin neden olduğu oksidatif strese karşı koruma sağlar. Karaciğerde, akut pankreatit çoklu organ fonksiyon bozukluğuna neden olur ve karvakrolün anti-oksidatif ve hepatoprotektif özelliklere sahip olduğu araştırılmıştır (Imran vd., 2022).

Karvakrol, matris metaloproteaz 2 ve 9'un ekspresyonlarını azaltarak malign hücrelere karşı antikanser yeteneğine sahiptir (Rezvi ve Roy, 2019). Antiproliferatif aktiviteleri, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu daha da artıran apoptozu indükler. JAR ve JEG3 hücrelerindeki kanser hücrelerinde karvakrol, mitokondriyal membranı parçalayarak mitokondriyal matriksteki kalsiyum iyon yükünü indükler, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal iletimini baskılar, ayrıca fosfoinositid 3-'ü azaltır. kinaz/protein kinaz B'yi artırır ve fosfor-P38 ve c-Jun N-terminal kinaz MAPK ekspresyonlarını artırır (Hachlafi vd., 2021) Normal hücrelerdeki (L92) karvakrolün ayrıca mitokondriyal membran potansiyeli bozulması, ROS üretimi, kaspaz3 aktivasyonu ve DNA hasarı yoluyla apoptozu indüklediği bulunmuştur (Jamali vd., 2021). Bir araştırmacı grubu karvakrolün, matris metaloproteaz 2 ve 9'u, hücre proliferasyonunu, siklin B1 ekspresyonunu azaltarak ve G2 ve M fazlarında hücre döngüsünün durdurulmasına neden olarak, LoVo ve HCT116 gibi farklı insan kolon hücre hatlarında bir antikanser ajanı olarak çalışmasının yanında, hücre dışı düzenlenmiş protein kinaz B'nin fosforilasyonunu ve aşağı regüle edilmiş Bcl-2 ekspresyonunu da arttırdığı bildirilmiştir (Sampaio vd., 2021). Ayrıca prostat kanseri hücrelerinde (PC3 hücreleri) tümör büyüme hücrelerinde doza bağlı inhibisyon sergilediği ifade edilmektedir (Elbe vd., 2020).

Diyabetik kardiyomiyopati, diyastolik gevşemede bir anormallik ve daha sonra hipertansiyon, dislipidemi ve koroner arter hastalığı olmadan kalp yetmezliği ile karakterizedir. Diyabet durumunda hiperglisemi, insülin direnci ve artan insülin seviyeleri, diyabetik kardiyomiyopatinin gelişmesine yol açar (Jamali vd., 2021). Carvacrol, PI3K/AKT sinyal aracılı GLUT4 membran translokasyonunu ve PI3K modülasyonunu onardı. Bir çalışma, 6 hafta boyunca db/db fare modelinde intraperitoneal karvakrol uygulamasının streptozotosin kaynaklı tip-1 diyabet ve tip-2 diyabet üzerindeki antidiyabetik etkilerini araştırdı. Carvacrol kan şekeri seviyelerini, kardiyak fibrozisi ve tersine kardiyak hipertrofiyi, Myh7 ve Nppa mRNA ifadelerini önemli ölçüde iyileştirdi. Karvakrol, fosforile edilmiş PI3K ve PDK1 seviyelerini iyileştirdi ve PTEN fosforilasyonunu azaltmaktadır (Liu vd., 2020).

Astımda, büyük ölçüde yer alan inflamatuvar medyatörlerin salınımını azalttığından, peroksizom proliferatörüyle aktiveleştirilen reseptör-alfa (PPAR-a) agonistleri tarafından hava yolu inflamasyonu baskılanabilir (Ezz-Eldin vd., 2019). Karvakrol, geçici reseptör potansiyeli katyon kanalı, A alt ailesi, üye 1 (TRPA1) agonisti olarak görev yaptığından bağırsak mukozitinden korur. Yapılan bir çalışmada, 75 mg/kg irinotekan hidroklorürün (CPT-11) neden olduğu bağırsak mukozitinde TRPA1'i aktive ederek anti-inflamatuvar etkileri belirledi. MPO, NF-κB, C-2 reseptörünü ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini düşürdü ve malondialdehit ve nitrik oksit seviyesini düşürdü. Aynı zamanda ince bağırsaktaki villus mimarisini onardı ve aynı zamanda kandaki bakteri sayısını, lökogramı, vücut kitle değişimini ve hayatta kalma oranını da iyileştirdi. Karvakrol ayrıca nitrik oksit, lipid peroksitler, interlökin-1 beta ve miyeloperoksidazı da önemli ölçüde azaltmıştır (Wang, vd., 2020). Karvakrol ayrıca nitrik oksit, lipid peroksitler, interlökin-1 beta ve miyeloperoksidazı da önemli ölçüde azaltmıştır. Somensi ve ark. RAW 264.7 makrofajlarının LPS aracılı proinflamatuvar aktivasyonu üzerindeki karvakrol etkisinin moleküler yollarını araştırdı. 100 µM karvakrol ile ön inkübasyon, ERK1/2 fosforilasyonunu önledi ve NF-κB'nin (p65) sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonunu inhibe etti, ancak p38 ve JNK aktivasyonuna yanıt vermemiştir (Somensi et al., 2019)

Karvakrol'un, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Serratia spp.*, *Enterobacter spp.*'ye karşı güçlü antibakteriyel aktiviteye sahiptir (Kachur ve Suntres, 2020). Carvacrol'ün antimikrobiyal etkileri *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da aynı şekilde, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida spp.*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma viride*, *Penicillium rubrum* ve dermatofitleri içeren farklı mikroplar üzerinde antifungal etkilere sahiptir. Karvakrol'ün antimikrobiyal aktivitesi, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae* ve *Colletotrichum gloeosporioides* dahil olmak üzere bitkilerin mantar patojenlerine kadar uzanmaktadır (Rodriguez vd., 2023).

2.8. Timol (*Thymus*)

Veterinerlik sektöründe de timolün hayvan hastalıklarını tedavi etmek için olası uygulamaları üzerine araştırmalar yapılmıştır. Arafa ve ark, *Eimeria* cinsinin apikompleksan protozoon parazitinin neden olduğu bir hastalık olan güvercinlerde koksidiyoz'a karşı in vitro ve in vivo çalışmalar yoluyla timolün etkinliğini araştırmıştır. Farklı esansiyel yağlar ookistik aktivite göstermiştir ve

özellikle timolun, tavuk *Eimeria* oökistlerinin in vitro tahribatına neden olmuştur (Arafa vd., 2020). Yazarlar, in vitro çalışmaların, \geq %1,25 konsantrasyonlu timol solüsyonlarının sporlanmamış *Eimeria* oökistlerinde önemli bir etkiye neden olduğunu gösterdiğini, ayrıca karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri de dahil olmak üzere biyokimyasal parametreler, timolün güvercinlerde güvenli olduğunu gösterdi; bu da timolün güvercinlerde koksidiyozun kontrolünde güvenle kullanılabileceğini göstermiştir (Felici vd., 2020; Gholami-Ahangaran vd., 2022). Benzer şekilde, timolün, koyunlarda antelmintik albendazolün (ABZ) hepatic S-oksijenasyonunun in vitro inhibisyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır; önceki çalışmalar timolün, geviş getiren hayvanların gastrointestinal parazitler hastalıklarını tedavi etmek için farmakolojik bir alternatif olduğunu göstermiştir (Miró vd., 2020). Yazarlar, genel olarak sonuçların, timolün kendi antelmintik etkisine sahip olmasının yanı sıra, daha az etkili bir metabolite dönüşümünü önleyerek ABZ antelmintik aktivitesini artırabildiği bildirilmektedir (Miró vd., 2020). Soltani vd. (2014), Şirazi kekiğinin (*Zataria multiflora*) esansiyel yağının, gökkuşuğu alabalığı da dahil olmak üzere çeşitli suda yaşayan hayvanları etkileyen bir patojen olan *Lactococcus garvieae* bakterisi üzerindeki etkisini ve etki mekanizmasını araştırmıştır. Yazarlar, yağın *Lactococcus garvieae*'deki eps D kapsül geninin ekspresyonunu baskıladığı için bakteri oluşumunu engellediğini buldu. Bu, *Z. multiflora* yağının su ürünleri yetiştiriciliğinde laktokokkozu tedavi etmek için kullanılabileceğini düşündürmektedir (Alagawany vd., 2020; Marchese vd., 2016; Nagoor Meeran vd., 2017).

Timol, karvakrol, sineol, alfa-pinen, mentol ve menton, hayvancılık ve kümes hayvanları endüstrisinde yaygın olarak kullanılan en yaygın ve etkili fenoller ve terpenler arasındadır. Bu bileşikler, başta kekik, nane ve biberiye olmak üzere Lamiaceae familyasına ait bitkinin uçucu yağlarında bulunur. Bu bileşikler sinerjistik etkilere sahiptir ve antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antidepresan ve immünomodülatör ajanlar olarak güçlü görünmektedir. Bu biyoaktif bileşikler, sindirim sistemi enzimlerinin salgılanmasını artırır ve böylece sindirimi iyileştirir, bağırsakta çeşitli besin maddelerinin taşınmasını aktive eder, oksidasyon süreçlerini engeller, sindirim sistemindeki bakteri, mantar ve parazitlerin büyümesini engeller, bağırsak mikrobiyal popülasyonunu modüle eder ve bağırsıklık sistemini geliştirir. Çiftlik hayvanlarında ve kümes hayvanlarında bu sistemlerin modülasyonunu düzenler. Bu fizyolojik mekanizmalar, sindirim fonksiyonunun, büyüme performansının, ağırlık artışının ve yemden yararlanma oranının iyileştirilmesine, üretimin artmasına, ölüm oranlarının azalmasına, üretim kalitesinin (tat, renk, doku, raf ömrü, biyolojik değer) iyileştirilmesine ve çevre koşullarına dayanıklılığı arttırmaktadır. Kümes

hayvanlarında ve besi hayvanlarında hoş olmayan kokuların ve zehirli gazların azaltılması sindirimin iyileştirilmesiyle sağlanmaktadır (Salehi vd., 2018). Bitkisel biyoaktif bileşiklerin kümes hayvanları ve büyükbaş hayvanların üretimi ve sağlığı üzerindeki sözü edilen faydalı etkisi göz önüne alındığında, bu değerli kaynakların üretim verimliliğini artırmak ve besicilik ve kümes hayvancılığında kimyasal ilaç kullanımını azaltmak için kullanılması gerekmektedir.

2.9. Alfa Pinen (*Pinus brutea*)

α -Pinen antibakteriyel, antioksidan, antiinflamatuvar etkilerinin yanında candida türlerine etkilidir. α -Pinen çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri suşlarına karşı test edildiğinde metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) karşı aktivite (IC50 = 68,6 ± 7,9 µg/mL) bildirilmektedir (Utegenova vd., 2018). Gram-negatif bakteriler arasında *Escherichia coli* (*E. coli*), 98 µg/mL'lik orta düzeyde antibakteriyel aktiviteyle α -pinene en duyarlı bakteri olduğu ifade edilmektedir (Yang vd., 2016). Ayrıca α -pinenin antifungal potansiyeli özellikle *Candida* türlerine karşı pozitif referans fungusid klotrimazolden daha etkili olduğunu gösterdi. Pinen varlığında blastokonidlerin sayısı azalmış ve *Candida*'nın ana virülans faktörlerine ait sahte hiflere geçiş engellediğini bildirmektedir (Rodrigues vd., 2021). Pinen ayrıca promastigotlara, aksenik amastigotlara ve intramakrofajik amastigotlara karşı sırasıyla 19,7, 16,1 ve 15,6 µg/mL IC50 değerleri ile inhibitör bir etki gösterdiği bildirilmektedir (Rodrigues vd., 2021).

Pinenin en önemli etkilerinden anti-inflamatuvar ve antioksidatif aktivitesi hayvan refahını arttırmada ve hastalıklara karşı korunmasında önemlidir (Bouzenna vd., 2017). İnsan derisi epidermal keratinositlerinde inflamatuvar araçlar nükleer faktör-kappa B (NF-kB), tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) ve interlökin-6'nın (IL-6) protein ekspresyonunu inhibe edilmesi neticesinde antiinflamatuvar etkinin gerçekleşeceği ifade edilmektedir. UVA ışınlarına maruz kalmanın neden olduğu inflamatuvar ve oksidatif yanıt, α -pinen tarafından azaltıldığı bildirilmektedir. Ayrıca α -pinen, apoptotik genler Bax/Bcl-2'nin ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek ve buna bağlı olarak kaspaz kaskadını devre dışı bırakarak UVA'nın neden olduğu apoptotik hücre ölümünü önlemektedir (Karthikeyan vd., 2018).

3. Sonuç

Bitkisel ürünler dünya çapında giderek daha popüler hale gelmesine rağmen standart bir kalite kontrol profilinin olmayışı bunların kabul edilmesinin ve gelişmesi önündeki engellerden biridir. Kaliteleri bitki ilaçlarının etkinliğini ve güvenliğini etkiler. Geleneksel tıp, şifalı bitkilerin yapımında standartlaştırılmış

bir yöntemin bulunmaması nedeniyle günümüzde insanlık bu doğal armağanın tüm faydalarından yararlanamamıştır. Birkaç ülke bitkisel ilaçları geliştirmiş, bunları sağlık sistemlerine dahil etmiş ve yıllar içinde tıbbi bitkiler ve ürünlerini ihraç ederek birçok ülkeye hizmet vermiştir. Farklı ülkeler, tıbbi bitkilerin ve ürünlerinin kalitesini, etkinliğini ve güvenliğini garanti altına almak için ayrı onay, dağıtım, üretim ve pazarlama prosedürleri uygulamaya koymuştur. Hint nüfusunun önemli bir kısmı, özellikle de ormanların içinde ve çevresinde yaşayanların geçim kaynağı, şifalı bitkilerin üretimini, ticaretini (ulusal ve uluslararası), nakliyesini ve katma değer üreten ürünlere dönüştürmektedir. Gelişmekte olan ülkeler, gelişmiş ülkelerdeki üreticilere hammadde tedarik ederek kaynaklarını sürdürülebilir bir şekilde artırmaya ve değer zincirinin başlarında pazarları açmaya çalışmalıdır. Ülkemizde uygun şekilde işlenmiş şifalı bitkiler; kalite, saflık açısından değerlerini artırır ve daha iyi pazarlamayı kolaylaştırır. Böylece beşeri ve veteriner hekimlikte, bitkisel ürün üreten çiftçiler, ticaretiyle uğraşanlar için yeni bir cazibe alanına dönüşen katma değerli şifalı bitkisel ilaçların üretilmesine yardımcı olmakta ve bunun sonucunda toplum için çeşitli kaliteli ürün kategorilerinin ortaya çıkmasına ve sürece dahil olanlara ekonomik fayda sağlanmasına yardımcı olacaktır.

Kaynaklar

Abdo, W., Elmadawy, M. A., Abdelhice, E. Y., Abdel-Kareem, M. A., Farag, A., Aboubakr, M., ... Fadl, S. E. (2021). Protective effect of thymoquinone against lung intoxication induced by malathion inhalation. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–13.

Aboubakr, M., Elshafae, S. M., Abdelhice, E. Y., Fadl, S. E., Soliman, A., Abdelkader, A., Abdeen, A. (2021). Antioxidant and Anti-Inflammatory Potential of Thymoquinone and Lycopene Mitigate the Chlorpyrifos-Induced Toxic Neuropathy. *Pharmaceuticals* 2021, Vol. 14, Page 940, 14(9), 940.

Alagawany, M., Farag, M. R., Salah, A. S., & Mahmoud, M. A. (2020). The role of oregano herb and its derivatives as immunomodulators in fish. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2481–2492.

Alanazi, R., Nakatogawa, H., Wang, H., Ji, D., Luo, Z., Golbourn, B., ... & Sun, H. S. (2022). Inhibition of TRPM7 with carvacrol suppresses glioblastoma functions in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 55(6), 1483-1491.

Alqahtani, A., Abdelhameed, M. F., Abdou, R., Ibrahim, A. M., Dawoud, M., Alasmari, S. M., Attia, H. G. (2023). Mechanistic action of linalyl acetate: Acyclic monoterpene isolated from bitter orange leaf as anti-inflammatory,

analgesic, antipyretic agent: Role of TNF- α , IL1 β , PGE2, and COX-2. *Industrial Crops and Products*, 203, 117131.

An, Q., Ren, J. N., Li, X., Fan, G., Qu, S. S., Song, Y., Pan, S. Y. (2021). Recent updates on bioactive properties of linalool. *Food & Function*, 12(21), 10370–10389.

Arafa, W. M., Abolhadid, S. M., Moawad, A., Abdelaty, A. S., Moawad, U. K., Shokier, K. A., . & Gadelhaq, S. M. (2020). Thymol efficacy against coccidiosis in pigeon (*Columba livia domestica*). *Preventive veterinary medicine*, 176, 104914.

Atalay, S., Jarocka-karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 21, 9(1), 21.

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 20(3), 200-216.

Biser, J. A. (1998). Really wild remedies-medicinal plant use by animals. *Zooger*, 27(1), 80-84.

Bouzenna, H., Hfaiedh, N., Giroux-Metges, M. A., Elfeki, A., & Talarmin, H. (2017). Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 93, 961-968.

Buhrmann, C., Brockmueller, A., Mueller, A. L., Shayan, P., & Shakibaei, M. (2021). Curcumin Attenuates Environment-Derived Osteoarthritis by Sox9/NF-kB Signaling Axis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14).

Bule, M., Nikfar, S., Amini, M., & Abdollahi, M. (2020). The antidiabetic effect of thymoquinone: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Food Research International*, 127, 108736.

Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: A review of their effects on inflammation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(7), 1377–1385.

Cai, Y., Deng, M., Zhang, Q., Liu, Z., Wang, L., Sheng, W., ... & Wang, F. (2021). Effects of dietary betaine supplementation on biochemical parameters of blood and testicular oxidative stress in Hu sheep. *Theriogenology*, 164, 65-73..

Cai, Z. M., Peng, J. Q., Chen, Y., Tao, L., Zhang, Y. Y., Fu, L. Y., Shen, X. C. (2021). 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. *Journal of Asian Natural Products Research*, 23(10), 938–954.

Charen, E., & Harbord, N. (2020). Toxicity of herbs, vitamins, and supplements. *Advances in chronic kidney disease*, 27(1), 67-71.

Christensen, S. B. (2021). Natural products that changed society. *Biomedicines*, 9(5), 472.

Davidson, S., Hopkins, B. A., Odle, J., Brownie, C., Fellner, V., & Whitlow, L. W. (2008). Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation Holstein cows. *J Dairy Sci*, 91(4), 1552–1559.

Della Rocca, G., & Di Salvo, A. (2020). Hemp in veterinary medicine: from feed to drug. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 387.

Derbassi, N. Ben, Pedrosa, M. C., Heleno, S., Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2022). Plant volatiles: Using Scented molecules as food additives. *Trends in Food Science and Technology*, 122, 97–103.

Di Salvo, A., Conti, M. B., & della Rocca, G. (2023). Pharmacokinetics, efficacy, and safety of cannabidiol in dogs: an update of current knowledge. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1204526.

Eissa, A. E., Yusuf, M. S., Younis, N. A., Fekry, M., Dessouki, A. A., Gehad, Abdelatty, A. M. (2021). Effect of poultry offal silage with or without betaine supplementation on growth performance, intestinal morphometry, spleen histomorphology of Nile tilapia. *Wiley Online Library*, 00(5), 1189–1195.

Eklund, M., Bauer, E., Wamatu, J., & Mosenthin, R. (2005). Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. *Nutr Res Rev*, 18(1), 31–48.

Elbe, E., Yigitturk, G., Cavusoglu, T., & Uyanikgil, Y. (2020). Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer. *Bratislava Medical Journal*, 121(2), 122–128.

El-Far, A. H., Tantawy, M. A., Al Jaouni, S. K., & Mousa, S. A. (2020). Thymoquinone-chemotherapeutic combinations: new regimen to combat cancer and cancer stem cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(9), 1581–1598.

Ezzat Abd El-Hack, M., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., ... Adel, M. (2016). Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 28(5), 365–382.

Ezz-Eldin, Y. M., Aboseif, A. A., & Khalaf, M. M. (2020). Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats. *Life sciences*, 242, 117222.

Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Jorjani, M., & Pourgholami, M. H. (2021). The effects of anticancer medicinal herbs on vascular endothelial growth factor based on pharmacological aspects: A review study. *Nutrition and cancer*, 73(1), 1-15.

Favaretto, J. A., Alba, D. F., Marchiori, M. S., Marcon, H. J., Souza, C. F., Baldissera, M. D., Da Silva, A. S. (2020). Supplementation with a blend based on micro-encapsulated carvacrol, thymol, and cinnamaldehyde in lambs feed inhibits immune cells and improves growth performance. *Livestock Science*, 240, 104144.

Felici, M., Tugnoli, B., Ghiselli, F., Massi, P., Tosi, G., Fiorentini, L. Grilli, E. (2020). In vitro anticoccidial activity of thymol, carvacrol, and saponins. *Poultry Science*, 99(11), 5350–5355.

Gaikwad, S., & Srivastava, S. K. (2021). Role of phytochemicals in perturbation of redox homeostasis in cancer. *Antioxidants*, 10(1), 83.

Galan, D. M., Ezeudu, N. E., Garcia, J., Geronimo, C. A., Berry, N. M., & Malcolm, B. J. (2020). Eucalyptol (1,8-cineole): an underutilized ally in respiratory disorders? *Journal of Essential Oil Research*, 32(2), 103–110.

Geng, C., Li, J., Ding, F., Wu, G., Yang, Q., Sun, Y., ... & Tian, X. (2016). Curcumin suppresses 4-hydroxytamoxifen resistance in breast cancer cells by targeting SLUG/Hexokinase 2 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 473(1), 147-153.

Ghanima, M. M. A., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Taha, A., Elnesr, S. S., Ajarem, J., & Mahmoud, A. M. (2020). Consequences of various housing systems and dietary supplementation of thymol, carvacrol, and euganol on performance, egg quality, blood chemistry, and antioxidant parameters. *Poultry Science*, 99(9), 4384-4397.

Gholami-Ahangaran, M., Ahmadi-Dastgerdi, A., Azizi, S., Basiratpour, A., Zokaei, M., & Derakhshan, M. (2022). Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. *Veterinary Medicine and Science*, 8(1), 267–288.

Gupta, A., Atanasov, A. G., Li, Y., Kumar, N., & Bishayee, A. (2022). Chlorogenic acid for cancer prevention and therapy: Current status on efficacy and mechanisms of action. *Pharmacological Research*, 186, 106505.

Gupta, R., Anand Ingle, N., Kaur, N., Yadav, P., Ingle, E., & Charania, Z. (2015). Ayurveda in dentistry: A review. *Journal of International Oral Health*, 7(8), 141–143.

El Hachlafi, N., Chebat, A., & Fikri-Benbrahim, K. (2021). Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacological Properties of *Thymus satureioides* Coss. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021.

Hamad Al-Mijalli, S., ELsharkawy, E. R., Abdallah, E. M., Hamed, M., El Omari, N., Mahmud, S., ... & Bouyahya, A. (2022). Determination of volatile compounds of *Mentha piperita* and *Lavandula multifida* and investigation of their antibacterial, antioxidant, and antidiabetic properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022.

Hoch, C. C., Petry, J., Griesbaum, L., Weiser, T., Werner, K., Ploch, M., Wollenberg, B. (2023). 1,8-cineole (eucalyptol): A versatile phytochemical with therapeutic applications across multiple diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 167, 115467.

Homayoonfal, M., Asemi, Z., & Yousefi, B. (2022). Potential anticancer properties and mechanisms of thymoquinone in osteosarcoma and bone metastasis. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 27(1).

Hussain, A., Bourguet-Kondracki, M. L., Hussain, F., Rauf, A., Ibrahim, M., Khalid, M., & Rengasamy, K. R. (2022). The potential role of dietary plant ingredients against mammary cancer: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(10), 2580-2605.

Imran, M., Aslam, M., Alsagaby, S. A., Saeed, F., Ahmad, I., Afzaal, M., Islam, S. (2022). Therapeutic application of carvacrol: A comprehensive review. *Food Science & Nutrition*, 10(11), 3544–3561.

Jamali, T., Kavooosi, G., Jamali, Y., Mortezaazadeh, S., & Ardestani, S. K. (2021). In-vitro, in-vivo, and in-silico assessment of radical scavenging and cytotoxic activities of *Oliveria decumbens* essential oil and its main components. *Scientific Reports*, 11(1), 14281.

James, P. B., Taidy-Leigh, L., Bah, A. J., Kanu, J. S., Kangbai, J. B., & Sevalie, S. (2018). Prevalence and correlates of herbal medicine use among women seeking Care for Infertility in Freetown, Sierra Leone. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018.

Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 7(1), 1–7.

Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3042–3053.

Kan Yeung, A. W., Horbańczuk, M., Tzvetkov, N. T., Mocan, A., Carradori, S., Maggi, F., Atanasov, A. G. (2019). Curcumin: Total-Scale Analysis of the Scientific Literature. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(7).

Karthikeyan, R., Kanimozhi, G., Madahavan, N. R., Agilan, B., Ganesan, M., Prasad, N. R., & Rathinaraj, P. (2019). Alpha-pinene attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *Life sciences*, 217, 110-118.

Kathem, S. H., Abdulsahib, W. K., & Zalzal, M. H. (2022). Berberine and thymoquinone exert protective effects against immune-mediated liver injury via NF- κ B dependent pathway. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 960981.

Kelemen, C. (2021). A review of self-medication and the taxonomy in which zoopharmacognosy is practiced, 29, 11–13.

Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., & Laudadio, V. (2012). Thymus vulgaris: alternative to antibiotics in poultry feed. *World's Poultry Science Journal*, 68(3), 401-408.

Leaman, D. J. (2002). Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues.

Li, C., Miao, X., Li, F., Adhikari, B. K., Liu, Y., Sun, J., Wang, Y. (2019). Curcuminoids: Implication for inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Phytotherapy Research*, 33(5), 1302–1317.

Li, H., Sureda, A., Devkota, H. P., Pittalà, V., Barreca, D., Silva, A. S., Nabavi, S. M. (2020). Curcumin, the golden spice in treating cardiovascular diseases. *Biotechnology Advances*, 38.

Li, L., He, L., Wu, Y., & Zhang, Y. (2021). Carvacrol affects breast cancer cells through TRPM7 mediated cell cycle regulation. *Life sciences*, 266, 118894.

Li, S., Li, S.-K., Gan, R.-Y., Song, F.-L., Kuang, L., & Li, H.-B. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 51, 289–298.

Lin, X., Bai, D., Wei, Z., Zhang, Y., Huang, Y., Deng, H., & Huang, X. (2019). Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PloS One*, 14(5).

Liu, Y., Wei, J., Ma, K. T., Li, C. L., Mai, Y. P., Qiu, X. X., & Luo, J. D. (2020). Carvacrol protects against diabetes-induced hypercontractility in the aorta through activation of the PI3K/Akt pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 109825.

Luna, A., Lábaque, M. C., Zygadlo, J. A., & Marin, R. H. (2010). Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poultry Science*, 89(2), 366–70.

Mahmoud, Y. K., & Abdelrazek, H. M. (2019). Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 115, 108783.

Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., ... & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food chemistry*, 210, 402-414.

Miara, M. D., Bendif, H., Ouabed, A., Rebbas, K., Ait Hammou, M., Amirat, M., Teixidor-Toneu, I. (2019). Ethnoveterinary remedies used in the Algerian steppe: Exploring the relationship with traditional human herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 244, 112164.

Miró, V., Lifschitz, A., Viviani, P., Rocha, C., Lanusse, C., Costa Jr, L., & Virkel, G. (2020). In vitro inhibition of the hepatic S-oxygenation of the anthelmintic albendazole by the natural monoterpene thymol in sheep. *Xenobiotica*, 50(4), 408-414.

Mishra, A. L. O. K., Verma, A. K., Das, A., Singh, P., Chaudhary, S. K., & Munde, V. K. (2019). Effect of dietary betaine supplementation on production and reproductive performance, milk composition and serum antioxidant profile in gestating sows. *Indian J. Anim. Sci*, 89, 246-250.

Mony, T. J., Elahi, F., Choi, J. W., & Park, S. J. (2022). Neuropharmacological Effects of Terpenoids on Preclinical Animal Models of Psychiatric Disorders: A Review. *Antioxidants*, 11(9), 1834.

Müller, J. L., & Muller, J. L. (1998). Love Potions and the Ointment of Witches: Historical Aspects of the Nightshade Alkaloids. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 36(6), 617–627.

Nagoor Meeran, M. F., Javed, H., Tae, H. Al, Azimullah, S., & Ojha, S. K. (2017). Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: Prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUN), 260734.

Nahed, A., Abd El-Hack, M. E., Albaqami, N. M., Khafaga, A. F., Taha, A. E., Swelum, A. A., Elbestawy, A. R. (2022). Phytochemical control of poultry coccidiosis: a review. *Poultry science*, 101(1), 101542.

Ojmelukwe, P. C., & Amaechi, N. (2019). Composition of *Vernonia amygdalina* and its potential health benefits. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4(6), 1836-1848.

Palma, A., Jesús Díaz, M., Ruiz-Montoya, M., Morales, E., & Giráldez, I. (2021). Available online 25. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 1350–4177.

Pan, M., Lei, Q., & Zhang, H. (2020). Prediction and confirmation of active ingredients in *Eucalyptus globulus* Labill leaves. *Industrial Crops and Products*, 154, 112631.

Parveen, A., Parveen, R., Akhatar, A., Parveen, B., Siddiqui, K. M., & Iqbal, M. (2020). Concepts and quality considerations in Unani system of medicine. *Journal of AOAC International*, 103(3), 609-633.

Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., & Moretti, M. D. L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(8), 721–726.

Pereira, I., Severino, P., Santos, A. C., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2018). Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 566–578.

Pierpoint, W. S. (1997). The natural history of salicylic acid Plant product and mammalian medicine. *Interdisciplinary Science Reviews*, 22(1), 45-52.

Qneibi, M., Bdir, S., Maayeh, C., Bdair, M., Sandouka, D., Basit, D., & Hallak, M. (2023). A Comprehensive Review of Essential Oils and Their Pharmacological Activities in Neurological Disorders: Exploring Neuroprotective Potential. *Neurochemical Research*, 1-32.

Rasethe, M. T., Semenya, S. S., & Maroyi, A. (2019). Medicinal plants traded in informal herbal medicine markets of the Limpopo Province, South Africa. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.

Rasool, A., Srinagar, T., Khalid Mushtaq Bhat, I., Altaf Ahmed Sheikh, I., Jan, A., Shaziya Hassan, I., Hassan, S. (2020). Medicinal plants: Role, distribution and future. ~ 2111 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2).

Rathod, N. B., Kulawik, P., Ozogul, F., Regenstein, J. M., & Ozogul, Y. (2021). Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 733-748.

Rezvi, F. B., & Roy, A. (2019). Carvacrol: A well-known phytochemical for modern dentistry. *Drug Invention Today* |, 11.

Rodrigues Nóbrega, J., De, D., Silva, F., Patricio De Andrade Júnior, F., Mariane, P., Sousa, S., ... Lima, O. (2021). Antifungal action of α -pinene against *Candida* spp. isolated from patients with otomycosis and effects of its association with boric acid. *Natural Product Research*, 35(24), 6190–6193.

Rodriguez, T., Cantu-Soto, M. R. ;, Vazquez-Armenta, E. U. ;, Bernal-Mercado, F. J. ;, Ayala-Zavala, A. T. ;, Roberto Tapia-Rodriguez, M., Ayala-Zavala, J. F. (2023). Inhibition of *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation by Terpenes from Oregano (*Lippia graveolens*) Essential Oil. *Antibiotics* 2023, Vol. 12, Page 1539, 12(10), 1539.

Rong, C., Lee, Y., Carmona, N. E., Cha, D. S., Ragguett, R. M., Rosenblat, J. D., McIntyre, R. S. (2017). Cannabidiol in medical marijuana: Research vistas and potential opportunities. *Pharmacological Research*, 121, 213–218.

Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. D. M., Segura-Carretero, A., & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy research*, 32(9), 1688-1706.

Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Llaique, H., Villalobos, M., Smeriglio, A., ... & Martins, N. (2019). Insights into *Eucalyptus* genus chemical constituents, biological activities and health-promoting effects. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 609-624.

Sampaio, L. A., Pina, L. T. S., Serafini, M. R., Tavares, D. dos S., & Guimarães, A. G. (2021). Antitumor Effects of Carvacrol and Thymol: A Systematic Review. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 702487.

Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism*, 57(SUPPL. 1), S3–S9.

Sharma, S., Kaur, T., Sharma, A. K., Singh, B., Pathak, D., Yadav, H. N., & Singh, A. P. (2022). Betaine attenuates sodium arsenite-induced renal dysfunction in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(6), 2488–2495.

Shin, Y., Sınırlar, G. S.-F., & 2023, undefined. (n.d.). Linalil asetatın oksidatif stres, inflamasyon ve endotel disfonksiyonu üzerindeki etkileri : Linalil asetat hafif bilişsel bozukluğu önleyebilir mi ? *Ncbi.Nlm.Nih.Gov*.

Siljander-Rasi, H., Peuranen, S., Tiihonen, K., Virtanen, E., Kettunen, H., Alaviuhkola, T., & Simmins, P. H. (2003). Effect of equi-molar dietary betaine and choline addition on performance, carcass quality and physiological parameters of pigs. *Anim Sci*, 76(1), 55–62.

Somensı, N., Rabelo, T. K., Guimarães, A. G., Quintans-Junior, L. J., de Souza Araújo, A. A., Moreira, J. C. F., & Gelain, D. P. (2019). Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-κB pathway. *International immunopharmacology*, 75, 105743.

Strier, K. B. (1996). Reproductive Ecology of Female Muriquis (Brachyteles arachnoides). *Adaptive Radiations of Neotropical Primates*, 511–532.

Sun, K., Duan, X., Cai, H., Liu, X., Yang, Y., Li, M., Wang, J. (2016). Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells. *Clinical and Experimental Medicine*, 16(1), 37–47.

Szkudelska, K., & Szkudelski, T. (2022). The anti-diabetic potential of betaine. Mechanisms of action in rodent models of type 2 diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 112946.

Tabandeh, M. R., Davoodi, E., Bayati, V., & Dayer, D. (2023). Betaine regulates steroidogenesis, endoplasmic reticulum stress response and Nrf2/HO-1 antioxidant pathways in mouse Leydig cells under hyperglycaemia condition. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-11.

Thao, K. C., El-Alfy, A. T., & Busse, K. (2023). Cannabidiol. *WMJ : Official Publication of the State Medical Society of Wisconsin*, 122, P2.

Tohidi, B., Rahimmalek, M., Arzani, A., & Sabzalian, M. R. (2020). Thymol, carvacrol, and antioxidant accumulation in Thymus species in response to different light spectra emitted by light-emitting diodes. *Food chemistry*, 307, 125521.

Tran, N., Pham, B., & Le, L. (2020). Bioactive Compounds in Anti-Diabetic Plants: From Herbal Medicine to Modern Drug Discovery. *Biology 2020, Vol. 9, Page 252*, 9(9), 252.

Utegenova, G. A., Pallister, K. B., Kushnarenko, S. V., Özek, G., Özek, T., Abidkulova, K. T., ... & Voyich, J. M. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Ferula L.* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 23(7), 1679.

Waly, Amany Hussien, Ragab, A. A., AboEl-Azayem, E. H., A. H., Q. E., & Mobarez, S. M. (2020). Carcass Characteristics, Meat Quality And Cecal Activity Of Growing New Zealand Rabbits Fed Eucalyptus inclusion As Non-Traditional Feed Additives. *Egyptian Poultry Science Journal*, 40(2), 481–491.

Wang, C., Ma, C., Gong, L., Dai, S., & Li, Y. (2021). Preventive and therapeutic role of betaine in liver disease: A review on molecular mechanisms. *European journal of pharmacology*, 912, 174604.

Wang, Y., Xu, Q., & Feng, Z. Q. (2020). A network pharmacology approach to investigate the mechanisms of Huangqin decoction in the treatment of irinotecan-induced gastrointestinal toxicity. *Asian Toxicology Research*, 2(1), 8-21.

Yang, J. I. A. N., Afaisen, S. J., & Gadi, R. A. M. A. (2016). Antimicrobial activity of noni fruit essential oil on Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Enteritidis. *Micronesica*, 5, 1-10.

Zafar, F., & Lio, P. (2021). Complementary and Alternative Medicine and Dermatooncology. *Dermato-Oncology Study Guide*, 359–389.

Zhang, S., Wang, Y., Cai, J., Liu, D., Yan, Y., Zhang, H., & Zhang, J. (2022). Discovery of febrifugine with specific anti-Phytophthora oomycete activity isolated from Dichroa febrifuga Lour. *Industrial Crops and Products*, 178, 114651.