

Rubia tinctorum L. (Kökboya) Bitkisinin *in vitro* Kök Kültürlerinde Hormon ve Eksplant Kaynaklarının Sekonder Metabolit Üretimi ve Antioksidan Aktivitelerine Etkileri

İlhami KARATAŞ

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Almus Meslek Yüksekokulu, Ormancılık Bölümü, Tokat, Türkiye

<https://orcid.org/0000-0002-7965-7878>

✉: ilhami.karatas@gop.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, kökboya (*Rubia tinctorum* L.) bitkisinde kök ve adventif kök indüksiyonuna eksplant kaynağı ve oksin grubu hormonların etkilerinin belirlenmesi ve elde edilen köklerin sekonder metabolit içeriği ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kök ve adventif kök kültürünün oluşturulmasında *in vitro* koşullarda yetiştirilen 45 günlük bitkilerin gövde, yaprak ve kök kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar 4.4 g L⁻¹ MS (Murashige ve Skoog), 30 g L⁻¹ sukroz ve 2 g L⁻¹ phytagel ve 2 mg L⁻¹ oksin içeren besin ortamında karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Besin ortamına oksin grubu hormonlardan indol-3-bütirik asit (IBA), naftalenasetik asit (NAA) ve indol-3-asetik asit (IAA) ilave edilmiştir. Bu ortamda gelişen kök ve adventif kökler 30. gün hasat edilerek kök gelişim parametreleri belirlendikten sonra kökler kurutularak toplam antrakınon, fenolik ve flavonoid içeriği belirlenmiştir. Ayrıca köklerin antioksidan kapasiteleri katyon radikali giderme (ABTS), indirgeme gücü (FRAP) ve serbest radikal giderme (DPPH) metotları ile belirlenmiştir. Toplam antrakınon, toplam fenolik ve flavonoid içeriği en yüksek IAA besin ortamında gövde eksplantlarından gelişen adventif köklerde sırasıyla 9.83 ± 0.11 mg g⁻¹, 14.45 ± 0.29 mg GAE g⁻¹ ve 3.85 ± 0.03 mg KUE g⁻¹ olarak belirlenmiştir. En yüksek DPPH, ABTS ve FRAP aktivitesi de IAA besin ortamında gövde eksplantlarından gelişen adventif köklerde belirlenmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 15.01.2021

Kabul Tarihi : 01.03.2021

Anahtar Kelimeler

Adventif kök
Antioksidan aktivite
Antrakınon
Fenolik bileşik
Rubia tinctorum

Effects of Hormone and Explant Sources on Secondary Metabolite Production and Antioxidant Activities in *in vitro* Root Cultures of *Rubia tinctorum* L. (Madder)

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the effects of explant source and hormones on root and adventitious root induction in madder (*Rubia tinctorum* L.) plant and to determine the secondary metabolite content and antioxidant activities of the obtained roots. The stem, leaf, and root parts of 45-day-old plants grown under *in vitro* conditions were used as the source of explants for the establishment of root and adventitious root culture. The explants were cultured in dark conditions in nutrient medium containing 4.4 g L⁻¹ MS (Murashige and Skoog), 30 g L⁻¹ sucrose, 2 g L⁻¹ phytagel and 2 mg L⁻¹ auxin. Among the auxin group hormones, indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA) and naphthaleneacetic acid (NAA) were added to the nutrient medium. Root and adventitious roots growing in this nutrient medium were harvested on the 30th day and their root growth parameters were determined. These roots were dried and total anthraquinone, total phenolic and flavonoid contents were determined. In addition, the antioxidant capacities of the roots were determined by reducing power (FRAP), free radical scavenging (DPPH) and cation radical scavenging (ABTS) methods. The highest total anthraquinone, total phenolic and flavonoid contents were determined as 9.83 ± 0.11 mg g⁻¹, 14.45 ± 0.29 mg GAE g⁻¹ and 3.85 ± 0.03 mg KUE g⁻¹ in adventitious roots growing from stem explants in

Research Article

Article History

Received : 15.01.2021

Accepted : 01.03.2021

Keywords

Adventitious root
Antioxidant activities
Anthraquinone
Phenolic compound
Rubia tinctorum

IAA nutrient medium, respectively. The highest DPPH, ABTS and FRAP activities were also determined in adventitious roots growing from stem explants in IAA nutrient medium.

- Atıf İçin :** Karataş İ. 2021. *Rubia tinctorum* L. (Kökboya) Bitkisinin in vitro Kök Kültürlerinde Hormon ve Eksplant Kaynaklarının Sekonder Metabolit Üretimi ve Antioksidan Aktivitelerine Etkileri . KSÜ Tarım ve Doğa Derg. 24 (5): 939-947. DOI:10.18016/ksutarimdog.vi.861997.
- To Cite :** Karataş İ. 2021. Effects of Hormone and Explant Sources on Secondary Metabolite Production and Antioxidant Activities in in vitro Root Cultures of *Rubia tinctorum* L. (Madder). KSU J. Agric Nat 24 (5): 939-947. DOI:10.18016/ksutarimdog.vi.861997.

GİRİŞ

Kökboya (*Rubia tinctorum* L.) Rubiaceae familyasına ait çok yıllık bir bitkidir. Köklerinde ve rizomlarında bulunan antrakinon pigmentleri nedeniyle tekstil ürünlerinin ve halıların boyanmasında doğal boya kaynağı olarak binlerce yıldır kullanılmaktadır (Ba'nyai ve ark., 2006; Mouri ve Laursen, 2012). Kökboya bitkisi Osmanlı İmparatorluğu döneminde Türkiye'de en çok yetiştirilen ve ihraç edilen bitkiler arasında yer almış, bitkiden 'Türk kırmızısı' olarak adlandırılan boya elde edilmiştir (Baydar ve Karadoğan, 2006; Genç, 2014).

Rubia tinctorum L. bitkisinde 36 farklı antrakinon bileşiği bulunmakta olup (Derksen ve ark., 2002) ana bileşenlerini alizarin, purpurin, di ve tri hidroksiantrakinonlar, ruberitrik asit, lusidin primeverozit ve psödopurpurin oluşturmaktadır (Ba'nyai ve ark., 2006). Antrakinonlar yapısal olarak 9,10-dioksoantrasen ve bunun glikozitlerinden oluşan sekonder metabolitlerdir. Antrakinonlar bitkiler, likenler ve mantarlar tarafından üretilen yaklaşık 700 bileşik ile en büyük doğal pigment grubunu oluşturmaktadır (Duval ve ark., 2016). Doğal olarak oluşan antrakinonların antikanser, antiinflamatuvar, diüretik, damar gevşetici (Chien ve ark., 2015), antiartritik, antifungal, antibakteriyel, antiviral, antiplatelet ve nöroprotektif gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir (Malik ve Müller, 2016).

Bitki hücre, doku ve organ kültürleri sekonder metabolitlerin üretimi için önemli yöntemlerdir (Murthy ve ark., 2008; Karataş ve ark., 2018). Bu yöntemlerle sekonder metabolitlerin üretiminde metabolit verimini artırmak için besin ortamının optimizasyonu, uygun kültür yönteminin seçimi (saçak kök, süspansiyon, kallus), elisitasyon ve öncüllerin eklenmesi gibi çok çeşitli stratejiler uygulanabilmektedir (Perassolo ve ark., 2011; Karataş ve ark., 2016; Perassolo ve ark., 2017). Bir organ kültürü yöntemi olan adventif kök kültürleri bitkilerin kök dışındaki yaprak ve gövde gibi kısımlarından kök gelişimi yönünde uyarılmasıyla elde edilen kökler olarak tanımlanmaktadır (Steffens ve Rasmussen, 2016; Rahmat ve Kang, 2019). Adventif köklerin indüksiyonu yüksek oksin ve düşük sitokinin seviyelerinde sağlanabilmektedir (Steffens ve Rasmussen, 2016). Bu kökler; hızlı büyümeleri ve

biyoaktif bileşiklerin istikrarlı üretkenliği nedeniyle biyomas üretimi için uygun materyallerdir (Le ve ark., 2018; Rahmat ve Kang, 2019). Ayrıca adventif kök kültürleri yabancı gen içermeyen değerli sekonder metabolitlerin ticari boyutta üretimine olanak sağlamaktadır (Cui ve ark., 2013). Bu amaçla birçok bitki türünde farmasötik, nutrasötik ve endüstriyel öneme sahip değerli sekonder metabolitlerin üretimi için adventif kök kültürleri oluşturulmuştur (Murthy ve ark., 2008). Bu bağlamda ginsenosidler (*Panax ginseng*), hipersin (*Hypericum perforatum*) fenolikler (*Oplopanax elatus*) ve eleutherosidler (*Eleutherococcus koreanum*) gibi birçok biyolojik aktif bileşik adventif kök kültürlerinde biyoreaktör sistemleriyle üretilmektedir (Wu ve ark., 2017).

Kökboya (*Rubia tinctorum* L.) bitkisinin köklerinin boya üretiminde kullanmak amacıyla doğal kaynaklardan yoğun bir şekilde toplanması bitkinin doğal popülasyonlarının küçülmesine ve genetik erozyonuna neden olmuştur (Baydar ve Karadoğan, 2006). Ayrıca kökboya bitkisinde en iyi boya ve kök veriminin üç yaşındaki bitkilerden elde edildiği bildirilmiştir (Baydar ve Karadoğan, 2006; Orba'n ve ark., 2008). Bu nedenlerden dolayı antrakinonlara olan ihtiyacın karşılanabilmesi için alternatif üretim yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla süspansiyon kültürleri (Nartop ve ark., 2013), saçak kök kültürleri (Perassolo ve ark., 2017) ve kallus (Orbán ve ark., 2007) kültürlerinde üretim, optimizasyon ve elisitasyon üzerine çok sayıda araştırma yürütülmüştür. Ancak adventif kök kültürlerinin oluşturulması ve optimizasyonu üzerine çalışmalar oldukça yetersiz kalmıştır. Özellikle kökboya bitkisinin *in vitro* kök kültürlerinde eksplant kaynağı ve oksinlerin metabolit üretimine ve antioksidan aktiviteye etkilerinin belirlenmesi üzerine çalışmalara rastlanmamıştır. Bu çalışmada, kökboya (*Rubia tinctorum* L.) bitkisinde kök ve adventif kök indüksiyonuna eksplant kaynağı ve oksin grubu hormonların etkilerinin belirlenmesi ve elde edilen köklerin sekonder metabolit içeriği ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda IAA, IBA ve NAA hormonlarının gövde, yaprak ve kök eksplantlarında kök ve adventif kök gelişimine etkileri belirlenmiştir. Bu uygulamalardan elde edilen kök ve adventif köklerin toplam antrakinon, toplam fenolik, flavonoid içeriği ve DPPH, ABTS ve FRAP yöntemlerine göre antioksidan

aktiviteleri belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOD

Steril Koşullarda Bitkilerin Yetiştirilmesi

Araştırmada bitkisel materyal olarak *in vitro* koşullarda yetiştirilen kökboya (*Rubia tinctorum* L.) bitkisi kullanılmıştır. Bitkiler yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumların çimlendirilmesiyle elde edilmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonu %75'lik etil alkol içerisinde bir dakika ve %3'lük sodyum hipoklorit çözeltisinde 40 dakika karıştırılmasıyla sağlanmıştır. Tohumlar MS besin ortamı [4.4 g L⁻¹ MS (Murashige ve Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ sukroz ve 2 g L⁻¹ phytigel] içeren petri kaplarında çimlendirmiştir. Bu tohumlardan gelişen fideler aynı besin içerikli kavanozlara aktararak 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta 25 ± 2 °C'de yetiştirilmiştir (Şekil 1).

Kök ve Adventif Kök Kültürlerinin Oluşturulması

Advetif kök kültürlerinin oluşturulmasında steril koşullarda yetiştirilen 45 günlük bitkilerin gövde ve yaprak kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılırken kök kültürlerinin oluşturulmasında kök kısımları kullanılmıştır. Kök ve adventif kök kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamı 4.4 g L⁻¹ MS (Murashige ve Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ sukroz ve 2 g L⁻¹ phytigel ve oksin grubu bitki hormonlarını içermektedir. Besin ortamına oksin grubu hormonlardan indol-3-bütirik asit (IBA), naftalen asetik asit (NAA) ve indol-3-asetik asit (IAA) 2 mg L⁻¹ olarak ilave edilmiştir. Eksplantlar 25 ± 2 °C'de karanlık koşullarda kültüre alınmıştır (Şekil 1). Eksplantlar 15. günde aynı içerikli besin ortamına alt kültüre alınmıştır. Eksplantlardan gelişen kökler 30. gün hasat edilerek kök gelişim parametrelerinden eksplant başına kök sayısı, kök gelişim oranları ve kök uzunlukları belirlemiştir. Kök gelişim parametreleri belirlenen kökler kurutularak metabolit içerikleri ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Toplam Antrakinon Miktarının Belirlenmesi

Kök ve adventif köklerin toplam antrakinon içeriği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 50 mg kök numuneleri %80'lik etanol içerisinde renksiz hale gelene kadar iki kez kaynatılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar filtre (0.45 µm por çaplı) edildikten sonra absorbansları spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) 434 nm'de ölçülmüştür. Köklerin toplam antrakinon içerikleri alizarinin molar ekstinksiyon katsayısı ($E_{434}=5.5 \times 10^{-3}$) kullanılarak mg g⁻¹ kuru doku olarak belirlenmiştir (Vasconsuelo ve ark., 2004).

Analizler İçin Ekstraktların Hazırlanması

Toplam fenolik içeriği, flavonoid miktarı ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde

kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 50 mg kök numuneleri kullanılmıştır. Kök numuneleri % 0.2 HCl içeren metanol-diklorometan (4:1) çözeltisinde ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar filtre (0.45 µm) edildikten sonra analizlerde kullanılmıştır.

Total Fenolik Bileşik Miktarının Belirlenmesi

Kök ve adventif köklerin toplam fenolik bileşik içeriği Folin-Ciocalteus reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Kök ekstraktlarından 100 µl alınarak üzerine sırasıyla saf su (4,5 ml), Folin-Ciocalteus reaktifi (100 µl) ve Na₂CO₃ (300 µl, %2'lik) ilave edilmiştir. Karışımlar oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra absorbansları (720 nm) spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) ölçülmüştür. Köklerin toplam fenolik bileşik içerikleri gallik asitten (mg GAE g⁻¹) hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak belirlenmiştir (Slinkard ve Singleton, 1977).

Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Kök ve adventif köklerin flavonoid miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kök ekstraktlarından 300 µl (50 mg kök numuneleri 10 ml'de ekstrakte edildi) alınarak üzerine sırasıyla 1.5 ml etanol, 100 µl AlCl₃ (%10'luk), 100 µl 1 M NaCH₃COO ve 3 ml saf su ilave edilmiştir. Karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 427 nm'deki absorbansları spektrofotometrede ölçülmüştür. Köklerin flavonoid içerikleri kuersetin'den (mg KUE g⁻¹) hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak belirlenmiştir (Pekal ve Pyrzyńska, 2014).

Antioksidan Aktivite Analizleri

Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH)

Kök ve adventif köklerin serbest radikal giderme aktivitesi, ekstraktların 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH•) radikalini giderme kapasitelerinin spektrofotometrede ölçülmesiyle belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0.25 mg ml⁻¹, 0.5 mg ml⁻¹, 0.75 mg ml⁻¹, 1 mg ml⁻¹) numune ekstraktları alınarak hacimleri etanol ile 3 ml'ye tamamlanmıştır. Bu karışımın üzerine 0,26 mM DPPH• (1 ml, etanolde hazırlanmış) radikali ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı güçlü bir şekilde vortekslendikten sonra karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bu süreni sonunda numunelerin 517 nm'deki absorbansları spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) ölçülmüştür. Sonuçlar radikalın başlangıç konsantrasyonunu %50 oranında azaltan örnek konsantrasyonu (IC₅₀) olarak verilmiştir. Her numunenin serbest radikalleri giderme aktivitesi (%) aşağıda verilen formül aracılığıyla belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri ise konsantrasyon/aktivite grafiğinin denklemi kullanılarak belirlenmiştir (Blois, 1958).

DPPH aktivitesi (%) = [(A_k - A_n)/A_k * 100]

A_k: Kontrol absorbanısı
A_n: Numune absorbanısı

İndirgeme Gücü Aktivitesi (FRAP)

Kök ve adventif köklerin indirgeme gücü aktivitelerinin belirlenmesinde Oyaizu metodu kullanılmıştır (Oyaizu, 1986). Numune ekstraktlarından farklı konsantrasyonlarda (100 µg ml⁻¹, 200 µg ml⁻¹, 400 µg ml⁻¹) alınarak son hacimleri fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ile 1.25 ml'ye tamamlanmıştır. Bu numunelerin üzerine 1.25 ml potasyum ferrik siyanür K₃Fe(CN)₆ (%1) ilave edilerek 20 dakika etüde (50 °C) inkübe edilmiştir. Bu süresinin bitiminde reaksiyon karışımına sırasıyla 1.25 ml TCA (%10) ve 0.25 ml FeCl₃ (%0.1) ilave edilerek vortekslenmiştir. Reaksiyon karışımının 700 nm'deki absorbanları spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) ölçülmüştür. Sonuçlar troloks standart antioksidan bileşiğinden hazırlanan standart grafiğin denklemi kullanılarak (µmol TE g⁻¹ doku) belirlenmiştir.

Kasyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS)

Kök ve adventif köklerin ABTS^{•+} kasyon radikali giderme kapasitesi Re ve ark. (1999)'nın yöntemine göre belirlenmiştir. Fosfat tamponu (0.1 M pH'ı 7.4) içerisinde hazırlanan 2 mM ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit) çözeltisi ile 2.45 mM K₂S₂O₈ çözeltisinin 1:2 oranında karıştırılarak oda sıcaklığında karanlıkta altı saat inkübe edilmiştir. Numune ekstraktlarından farklı konsantrasyonlarda (20 µg ml⁻¹, 40 µg ml⁻¹, 80 µg ml⁻¹, 160 µg ml⁻¹) alınarak hacimleri fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.4) ile 3 ml'ye tamamlanmıştır. Bu numunelerin üzerine 1 ml ABTS-K₂S₂O₈ çözeltisi ilave edilerek vortekslenildikten sonra karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süreni sonunda numunelerin 734 nm'deki absorbanları spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) ölçülmüştür. Sonuçlar radikalın başlangıç konsantrasyonunu %50 oranında azaltan örnek konsantrasyonu (IC₅₀) olarak verilmiştir. Her numunenin kasyon radikali giderme aktivitesi (%)

aşağıda verilen formül aracılığıyla belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri ise konsantrasyon/aktivite grafiğinin denklemi kullanılarak belirlenmiştir

$$ABTS \text{ aktivitesi (\%)} = [(A_k - A_n)/A_k * 100]$$

A_k: Kontrol absorbanısı
A_n: Numune absorbanısı

İstatistik Analizler

Bu çalışmadaki her uygulama ve analiz üç tekrarlı olarak yapılmış sonuçlar ortalama ve standart hata olarak verilmiştir. Verilerin istatistiki analizi SPSS 20 (Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılarak yapılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu aralık testine göre belirlenmiştir (Duncan, 1955).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kök Gelişim Parametreleri

Bu çalışmada kökboya bitkisinde kök ve adventif kök indüksiyonuna IAA, IBA ve NAA hormonlarının etkileri belirlenmiştir. Adventif köklerin indüksiyonunda gövde ve yapraklar eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kök kültürlerinin oluşturulmasında ise kökler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kök ve adventif kökler 30. gün hasat edilerek eksplant başına kök sayısı, kök gelişim oranları ve kök uzunlukları belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir. Ayrıca kök ve adventif kök kültürün farklı aşamalarına ait resimler Şekil 1'de verilmiştir.

Kök ve adventif köklerin gelişme oranları (%) hormon çeşidi ve eksplant kaynağına göre önemli ölçüde değişmiştir (P<0.05). IAA ve IBA hormonları tüm eksplant kaynaklarında yüksek oranlarda kök gelişimini teşvik ederken, NAA içeren besin ortamlarında kök ve adventif kök gelişimi gerçekleşmemiştir. IBA içeren besin ortamlarında kültüre alınan eksplantların adventif kök gelişim oranları IAA içerenlerden önemli ölçüde yüksektir (P<0.05).

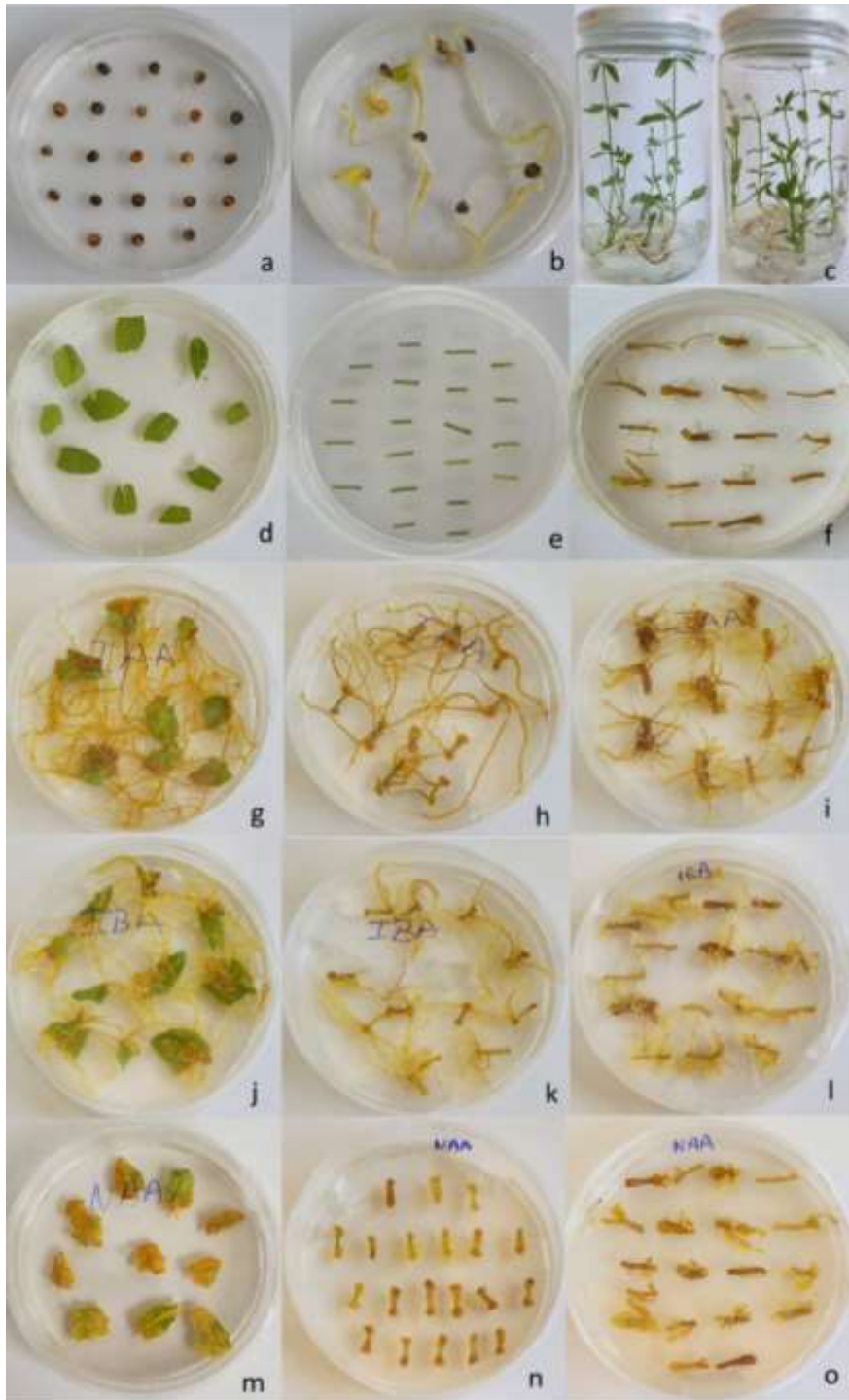
Çizelge 1. Hormon çeşidi ve eksplant kaynağının kök ve adventif kök gelişim parametrelerine etkisi

Table 1. The effect of hormone type and explant source on root and adventitious root growth parameters

Hormon Hormone Types	Çeşidi Explant Source	Kaynağı Growth Rate (%)	*Kök Gelişim Oranı (%) *Root Growth Rate (%)	*Root Kök Uzunluğu (cm) *Root Root Length (cm)	Kök Sayısı Root Number
IAA	Kök/ Root	100.00 ± 0.00 ^a	0.82 ± 0.04 ^c	5.66 ± 0.39 ^a	
	Gövde/ Stem	76.66 ± 7.26 ^b	2.31 ± 0.03 ^a	4.87 ± 0.35 ^{bc}	
	Yaprak/ Leaf	78.65 ± 8.30 ^b	2.63 ± 0.26 ^a	4.32 ± 0.17 ^c	
IBA	Kök/ Root	97.43 ± 2.56 ^a	0.47 ± 0.04 ^c	2.96 ± 0.08 ^d	
	Gövde/ Stem	88.33 ± 4.40 ^{ab}	1.64 ± 0.02 ^b	4.13 ± 0.15 ^c	
	Yaprak/ Leaf	96.97 ± 3.03 ^a	2.60 ± 0.15 ^a	5.35 ± 0.14 ^{ab}	
NAA	Kök/ Root	-	-	-	
	Gövde/ Stem	-	-	-	
	Yaprak/ Leaf	-	-	-	

Aynı sütunda verilen farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir (p<0.01, *p<0.05).

Different letters given in the same columns show statistically significant differences (p<0.01, *p<0.05).



Şekil 1. Kök ve adventif kök kültürünün farklı aşamaları: a- tohumlar, b- çimlenmiş tohumlar, c- kök boya bitkisi, d- yaprak eksplantı, e- gövde eksplantı, f- kök eksplantı, IAA ortamında yaprak (g), gövde (h) ve kök (i) eksplantından gelişen kök/adventif kökler, IBA ortamında yaprak (j), gövde (k) ve kök (l) eksplantından gelişen kök/adventif kökler, NAA ortamında yaprak (m), gövde (n) ve kök (o) eksplantları (d-f kültürün 1. günü, g-o kültürün 30. günü)

Figure 1. Different stages of root and adventitious root culture: a- seeds, b- germinated seeds, c- madder plant, d- leaf explant, e- stem explant, f- root explant, Root/adventitious roots developing from leaf (g), stem (h) and root (i) explants in medium containing IAA, Root/adventitious roots developing from leaf (j), stem (k) and root (l) explants in medium containing IBA, Leaf (m), stem (n) and root (o) explants in medium containing NAA (d-f 1st day of culture, g-o 30th day of culture)

En yüksek adventif kök gelişim oranı (96.97 ± 3.03)
IBA besin ortamındaki yaprak eksplantlarında

belirlenmiştir. Kök kültürlerinde ise IAA ve IBA
hormonları önemli farklılıklar meydana

getirmemiştir. Sreeranjini ve Siril (2013) kökboyasigiller familyasına ait *Morinda citrifolia* bitkisinde adventif kök indüksiyonu çalışılan oksin (IAA, IBA, NAA) hormonları içerisinde en yüksek IBA içeren besin ortamından elde edildiğini ifade edilmiştir. *Centella asiatica* bitkisinde hormonların adventif kök gelişimine etkilerinin incelendiği benzer bir çalışmada, IBA içeren besin ortamında adventif kök gelişimi IAA ve NAA içerenlerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Ling ve ark., 2009). Yürütülen bu çalışmadan elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Artemisia vulgaris* bitkisinde de maksimum adventif kök gelişimi yaprak eksplantlarında belirlenmiştir (Sujatha ve Ranjitha Kumari, 2012).

Kök ve adventif köklerin uzunluğunda ve sayısında (eksplant başına) besin ortamına ilave edilen hormonunun çeşidine ve kullanılan ekspant kaynağına göre önemli farklılıklar belirlenmiştir ($P<0.01$). Adventif köklerin uzunluğu kök kültüründen elde edilen köklerden 2-5 kat daha uzun olduğu belirlenmiştir. En uzun adventif kökler yaprak eksplantlarından (2.63 ± 0.26 cm) elde edilmiştir. IAA besin ortamında gelişen kök ve adventif köklerin boyları IBA ortamındakilerden oldukça uzun olduğu görülmüştür. Ekspant başına adventif kök sayısı en fazla IBA içeren besin ortamında yaprak eksplantlarından (5.35 ± 0.14) elde edilmiştir. Kök kültürlerinde ise ekspant başına kök sayısı (5.66 ± 0.39) en fazla IAA içeren besin ortamından elde edilmiştir. *Artemisia vulgaris* bitkisinin yaprak ve kök eksplantlarında kök gelişiminde maksimum kök uzunluğu ve sayısı IAA ve IBA hormonlarını birlikte içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bireysel uygulamalar da ise bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer şekilde IAA ortamındaki köklerin daha uzun olduğu bildirilmiştir (Sujatha ve Ranjitha Kumari, 2012). *Psoralea coryfolia* bitkisinde yapılan

bir benzer çalışmada ise hipokotil eksplantlarından adventif kök gelişimine IAA, IBA ve NAA hormonlarının etkisi incelenmiştir. Kök uzunluğu ve eksplant başına kök sayısı en fazla IBA içeren besin ortamından elde edildiği ifade edilmiştir (Baskaran ve Jayabalan, 2009).

Bu ve benzer çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasındaki farklılıklar eksplant kaynağı, donör bitkinin yetiştirilme koşulları, kültür tipi, hormon çeşit ve konsantrasyonu ve değerlendirme süreleri gibi faktörlerden ileri gelmektedir. Tüm bu faktörler adventif kök indüksiyonunu ve köklerin biyolojik özelliklerini önemli ölçüde değiştirmektedir. Rahmat ve Kang (2019) oksin grubu hormonların adventif kök gelişimine etkileri bitki familya ve türüne göre önemli ölçüde değiştiğini bildirmiştir. Ayrıca besin ortamına ilave edilen oksin çeşidinin de adventif kök indüksiyonunu büyük ölçüde etkilediği ifade edilmiştir. Bu bağlamda bitki doku ve organ kültürü yöntemleriyle sekonder metabolitlerin yüksek verim ve sabit kalitede üretimlerinin sağlanabilmesi için tür bazında eksplant kaynağı, besin ortamı, kültür tipi ve ortam koşullarının optimizasyonu ile ilgili çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sekonder Metabolit İçeriği

Kök ve adventif köklerin toplam antrakinin, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriği Çizelge 2'de verilmiştir. Toplam fenolik bileşik içeriği Folin-Ciocalteu metodu ile belirlenerek sonuçlar gallik aside eşdeğer olarak verilmiştir. Flavonoid içeriği ise alüminyum klorür metodu ile belirlenerek sonuçlar kuersetine eşdeğer olarak ifade edilmiştir. Toplam antrakinin içeriği ise alizarinin molar ekstinksiyon katsayısı kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 2. Kök ve adventif köklerin toplam antrakinin, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriğine hormon ve eksplant kaynağının etkisi

Table 2 Effect of hormone and explant source on total anthraquinone, total phenolic compound and flavonoid content of root and adventitious roots

Hormon <i>Hormone Types</i>	Çeşidi <i>Explant Source</i>	Toplam Antrakinin <i>Total Anthraquinone</i> (mg g ⁻¹)	Toplam Fenolik Bileşik <i>Total Phenolic Compound</i> (mg GAE g ⁻¹)	Flavonoid <i>Flavonoid</i> (mg KUE g ⁻¹)
IAA	Kök/ <i>Root</i>	6.34 ± 0.06^c	5.45 ± 0.14^{bc}	2.25 ± 0.04^c
	Gövde/ <i>Stem</i>	9.83 ± 0.11^a	14.45 ± 0.29^a	3.85 ± 0.03^a
	Yaprak/ <i>Leaf</i>	6.68 ± 0.07^b	6.20 ± 0.58^b	2.71 ± 0.06^b
IBA	Kök/ <i>Root</i>	4.15 ± 0.06^d	3.62 ± 0.08^e	1.41 ± 0.04^e
	Gövde/ <i>Stem</i>	3.62 ± 0.09^e	5.20 ± 0.14^{cd}	1.57 ± 0.09^{de}
	Yaprak/ <i>Leaf</i>	3.59 ± 0.05^e	4.37 ± 0.17^{de}	1.73 ± 0.02^d

Aynı sütunda verilen farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ($p<0.01$).

Different letters given in the same columns show statistically significant differences ($p<0.01$).

Kök ve adventif köklerin toplam antrakinin içeriği 3.59 ± 0.05 ile 9.83 ± 0.11 mg g⁻¹ arasında değişmektedir. IAA besin ortamından elde edilen kök

ve adventif köklerin antrakinin içeriği IBA ortamındakilerden önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$). En yüksek antrakinin içeriği

IAA besin ortamında gövde eksplantlarından elde edilen adventif köklerde belirlenmiştir. Kökboyasigiller familyasına ait *Oldenlandia umbellata* L. bitkisinde yapılan benzer bir çalışmada IAA, IBA ve NAA'nın adventif kök kültürlerinde antrakınon üretimine etkisi incelenmiştir. Kullanılan oksinler arasında en yüksek toplam antrakınon içeriği IAA içeren besin ortamlarından elde edildiği bildirilmiştir. (Saranya Krishnan ve Siril, 2018). *Morinda citrifolia* (Rubiaceae) bitkisinde oksin grubu hormonlarının (NAA, IBA) adventif kök kültüründe toplam antrakınon üretimine etkisinin belirlendiği bir diğer çalışmada ise en yüksek antrakınon içeriği IBA ortamından elde edilmiştir. Özellikle kullanılan oksin ve sitokinin seviyeleri hücre metabolizmasının düzenlenmesi ve metabolit oluşumunu etkileyen en önemli faktör olduğunu ifade edilmiştir (Baque ve ark., 2010). Baydar ve Karadoğan (2006) kökboya bitkisinin boya içeriği ve kalitesinin genotip, agronomik uygulamalar, kök kalitesi, yetiştirme bölgesi, büyüme sezonu ve hasat zamanından önemli ölçüde etkilendiği bildirilmiştir.

Kök ve adventif köklerin toplam fenolik ve flavonoid içeriğinde eksplant kaynağı ve hormon çeşidine göre önemli farklılıklar meydana gelmiştir. IAA besin ortamında gelişen kök ve adventif köklerin toplam fenolik ve flavonoid içeriği IBA ortamındakinden önemli ölçüde yüksektir ($P<0.01$). Toplam fenolik ve flavonoid içeriği en yüksek IAA besin ortamında kültüre alınan gövde eksplantlarından gelişen

adventif köklerde belirlenmiştir. Bu besin ortamında gelişen adventif köklerin toplam fenolik ve flavonoid içeriği sırasıyla 14.45 ± 0.29 mg GAE g^{-1} ve 3.85 ± 0.03 mg KUE g^{-1} olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda gövde eksplantlarından geliştirilen adventif köklerin antrakınon ve fenolik bileşik üretimi için uygun materyaller olduğu belirlenmiştir. Kökboya bitkisinde yapılan benzer bir çalışmada belirlenen toplam fenolik bileşik içeriği bu çalışmadan elde edilen sonuçlara örtüşmektedir. Aras Aşçı ve ark., (2018) üç yaşındaki kökboyası bitkisinin internot kısımlarının IAA ve kinetin içeren besin ortamında kültüre alınmasıyla elde edilen adventif köklerin toplam fenolik bileşik içeriğinin 13.19 mg g^{-1} olduğunu ifade etmişlerdir. Demirci ve ark., (2020) kökboya bitkisinin *in vitro* kök kültürleri alizarin, purpurin ve fenolik bileşiklerindeki doğadaki bitkileri tahrip etmeden ve mevsimsel kısıtlamalar olmaksızın bütün bir yıl boyunca standart miktar ve kalitede üretime imkan veren önemli bir potansiyel olduğunu bildirmişlerdir.

Antioksidan Aktivite

Kök ve adventif köklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde DPPH, FRAP ve ABTS metotları kullanılmıştır. FRAP aktivitesinin sonuçları troloks'a eşdeğer olarak verilirken DPPH ve ABTS sonuçları ise radikalın % 50'sini gideren doku miktarı (IC_{50}) olarak belirlenmiş ve Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. Kök ve adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktivitelerine hormon ve eksplant kaynağının etkisi
Table 3. Effect of hormone and explant source on DPPH, ABTS and FRAP activities of root and adventitious roots

Hormon <i>Hormone Types</i>	Çeşidi <i>Explant Source</i>	Eksplant <i>Explant Source</i>	Kaynağı <i>Explant Source</i>	DPPH IC_{50} (mg ml^{-1})	ABTS IC_{50} (μ g ml^{-1})	FRAP μ mol TE g^{-1}
IAA	Kök/ <i>Root</i>			0.77 ± 0.006^a	71.57 ± 0.43^c	231.93 ± 1.31^c
	Gövde/ <i>Stem</i>			0.29 ± 0.003^e	31.61 ± 0.06^e	409.13 ± 3.85^a
	Yaprak/ <i>Leaf</i>			0.71 ± 0.008^c	71.89 ± 0.34^c	259.46 ± 1.57^b
IBA	Kök/ <i>Root</i>			0.73 ± 0.003^b	91.31 ± 0.32^a	154.95 ± 7.34^e
	Gövde/ <i>Stem</i>			0.44 ± 0.003^d	60.75 ± 0.39^d	219.39 ± 5.45^c
	Yaprak/ <i>Leaf</i>			0.72 ± 0.004^{bc}	85.45 ± 0.35^b	194.05 ± 3.44^d

Aynı sütunda verilen farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir ($p<0.01$).

Different letters given in the same columns show statistically significant differences ($p<0.01$).

Kök ve adventif köklerin antioksidan aktivitelerinde eksplant kaynağı ve hormon çeşidine göre önemli farklılıklar meydana gelmiştir ($P<0.01$). IAA besin ortamında gelişen adventif köklerin antioksidan aktivitesi IBA ortamındakilerden önemi ölçüde yüksektir. En yüksek antioksidan aktivite IAA besin ortamında gövde eksplantlarından gelişen adventif köklerde belirlenmiştir. Bu köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktivitesi sırasıyla IC_{50} : 0.29 ± 0.003 mg ml^{-1} , IC_{50} : 31.61 ± 0.06 μ g ml^{-1} , 409.13 ± 3.85 μ mol TE g^{-1} olarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktiviteye sahip adventif köklerin antrakınon, fenolik ve flavonoid içeriğinin bakımından da en yüksek

değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Essaidi ve ark., (2017) *Rubia tinctorum* ekstraktlarının yüksek FRAP ve ABTS radikal giderme aktivitesine sahip olduğu ifade etmiştir. Bu yüksek antioksidan aktivitenin fenolik bileşik, antrakınon ve flavonoid içeriğinden ileri geldiğini bildirilmiştir. ,

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada kökboya bitkisinde eksplant kaynağı ve oksin grubu hormonlarının kök ve adventif kök gelişimine etkisi ve elde edilen bu köklerin, toplam antrakınon, toplam fenolik ve flavonoid içeriği ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan bu

çalışma neticesinde yaprak ve gövde eksplantlarında oluşturulan adventif köklerin kök eksplantları kullanılarak oluşturulan kök kültürlerinden metabolit ve antioksidan aktivite bakımından oldukça üstün olduğu belirlenmiştir. Kök kültürlerinde kök gelişim oranları yüksek olsa da elde edilen köklerin boyları her iki hormon koşullarında oldukça yetersizdir. IBA içeren besin ortamlarında eksplantlardan adventif kök gelişim oranları IAA içerenlerden yüksek olsa da elde edilen adventif köklerin antrakınon, fenolik ve flavonid içeriği ve antioksidan aktivitesi önemli ölçüde düşüktür. NAA içeren besin ortamlarında ise tüm eksplantlardan kök gelişimi sağlanamamıştır. IAA besin ortamında yaprak ve gövde eksplantlarının kök gelişim oranları ve elde edilen köklerin uzunlukları bakımından önemli bir farklılık meydana gelmemiştir. En yüksek antioksidan aktivite ve metabolit içeriği IAA besin ortamında gövde eksplantlarından gelişen adventif köklerde belirlenmiştir. Sonuç olarak IBA'nın adventif kök gelişim oranları açısından uygun olsa da metabolit üretimi ve antioksidan aktivite bakımından IAA'nın daha uygun olduğu görülmektedir. Bu alanda yapılacak sonraki çalışmalarda adventif kök indüksiyonunun IBA ortamında sağlandıktan sonra metabolit üretimin artırmak için IAA ortamında alt kültüre almanın faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca iki hormonun besin ortamına birlikte ilave edileceği kombinasyonların oluşturulması kök indüksiyonu ve metabolit verimi açısından avantaj sağlanabileceği ön görülmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Aras Aşçı Ö, Demirci T, Göktürk Baydar N 2018. Effects of NaCl Applications on Root Growth and Secondary Metabolite Production in Madder (*Rubia tinctorum* L.) Root Cultures. International Journal of Secondary Metabolite 3:210-216.
- Ba'nyai P, Kuzovkina IN, Kursinszki L, Szőke E' 2006. HPLC Analysis of Alizarin and Purpurin Produced by *Rubia tinctorum* L. Hairy Root Cultures. Chromatographia Supplement 63: 111-114.
- Baque MA, Hahn EJ, Paek KY 2010. Growth, Secondary Metabolite Production and Antioxidant Enzyme Response of *Morinda Citrifolia* Adventitious Root as Affected by Auxin and Cytokinin. Plant Biotechnol Rep 4:109-116.
- Baskaran P, Jayabalan N 2009. Psoralen Production in Hairy Roots and Adventitious Roots Cultures of *Psoralea corylifolia*. Biotechnol Lett 31:1073-1077.
- Baydar H, Karadoğan T 2006. Agronomic Potential and Industrial Value of Madder (*Rubia tinctorum* L.) as a Dye Crop. Turk J Agric for 30:287-293.
- Blois MS 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, 26 1199-1200.
- Chien SC, Wu YC, Chen ZG, Yang WC 2015. Naturally Occurring Anthraquinones: Chemistry and Therapeutic Potential in Autoimmune Diabetes. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 357357, 13.
- Cui HY, Baque MA, Lee EJ, Paek KY 2013. Scale-up of Adventitious Root Cultures of *Echinacea angustifolia* in a Pilot-Scale Bioreactor for the Production of Biomass and Caffeic acid Derivatives. Plant Biotechnol Rep 7:297-308.
- Demirci T, Aras Aşçı Ö, Göktürk Baydar N 2020. Influence of Salicylic Acid and L- Phenylalanine on The Accumulation of Anthraquinone and Phenolic Compounds in Adventitious Root Cultures of Madder (*Rubia tinctorum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01952-w>.
- Derksen GCH, Niederländer HAG, van Beek TA 2002. Analysis of Anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by Liquid Chromatography Coupled with Diode-Array UV and Mass Spectrometric Detection. Journal of Chromatography A 978:119-127.
- Duncan BD 1955. Multiple Range and Multiple Ftests. Biometrics. P.1-42.
- Duval J, Pecher V, Poujol M, Lesellier E 2016. Research Advances for The Extraction, Analysis and Uses of Anthraquinones: A review. Industrial Crops and Products 94: 812-833.
- Essaidi I, Snoussi A, Koubaier HBH, Casabianca H, Bouzouita N 2017. Effect of Acid Hydrolysis on Alizarin Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rubia tinctorum* Extracts. Pigment & Resin Technology 46/5 379-384.
- Genç M 2014. Başbakanlık Osmanlı Arşiv Belgelerinde Kökboya ve Cehri ile İlgili Kayıtlar. Art-e Sanat Dergisi 7(13)174-212.
- Karataş İ, Polat F, Karataş R, Dal T, Elmastaş M 2018. Determination of Antioxidant Activity and Phenolic Compound Content of Black Carrot Callus Culture, Ecological Life Sciences (NWSAELS), 13(2):87-93. DOI: 10.12739/NWSA.2018.13.2.5A0097.
- Karataş İ, Karataş R, Elmastaş M 2016. Antosiyaninlerin Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürüyle Üretimi. Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi (12): 80-91.
- Le KC, Im WT, Paek KY, Park SY 2018. Biotic Elicitation of Ginsenoside Metabolism of Mutant Adventitious Root Culture in *Panax ginseng*. Applied Microbiology and Biotechnology 102:1687-1697.
- Ling APK, Chin MF, Hussein S 2009. Adventitious Root Production of *Centella asiatica* in Response to Plant Growth Regulators and Sucrose Concentration. Medicinal Aromatic Plant Science Biotechnol 3(1):36-41.
- Malik EM, Müller CE 2016. Anthraquinones as Pharmacological Tools and Drugs. Medicinal

- Research Reviews 36, No. 4: 705–748.
- Mouri C, Laursen R 2012. Identification of Anthraquinone Markers for Distinguishing *Rubia species* in Madder-Dyed Textiles by HPLC. *Microchim Acta* 179:105–113.
- Murashige T, Skoog F 1962. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY 2008. Adventitious Roots and Secondary Metabolism. *Chinese Journal of Biotechnology* 24,5:711-716.
- Nartop P, Akay Ş, Gürel A 2013. Immobilization of *Rubia tinctorum* L. Suspension Cultures and Its Effects on Alizarin and Purpurin Accumulation and Biomass Production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 112:123–128.
- Orba'n N, Boldizsa'r I, Szűcs Z, Da'nos B 2008. Influence of Different Elicitors on The Synthesis of Anthraquinone Derivatives in *Rubia tinctorum* L. Cell Suspension Cultures. *Dyes and Pigments* 77:249-257.
- Orbán N, Boldizsár I, Bóka K 2007. Structural and Chemical Study of Callus Formation from Leaves of *Rubia tinctorum*. *Biologia Plantarum* 51 (3): 421-429.
- Oyaizu M 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine. *Jpn. J. Nutr.*, 44 307.
- Pekal A, Pyrzynska K 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods*, 7:1776–1782.
- Perassolo M, Cardillo AB, Mugas ML, Montoya SCN, Giulietti AM, Talou JR 2017. Enhancement of Anthraquinone Production and Release by Combination of Culture Medium Selection and Methyl Jasmonate Elicitation in Hairy Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Industrial Crops Products* 105: 124–132.
- Perassolo M, Quevedo CV, Giulietti AM, Talou JR 2011. Stimulation of The Proline Cycle and Anthraquinone Accumulation in *Rubia tinctorum* Cell Suspension Cultures in The Presence of Glutamate and Two Proline Analogs. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 106:153–159.
- Rahmat E, Kang Y 2019. Adventitious Root Culture for Secondary Metabolite Production in Medicinal Plants: A Review. *J Plant Biotechnol* 46:143–157.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9- 10) 1231-1237.
- Saranya Krishnan SR, Siril EA 2018. Elicitor Mediated Adventitious Root Culture for The Large-Scale Production of Anthraquinones from *Oldenlandia umbellata* L. *Industrial Crops & Products* 114:173–179.
- Slinkard K, Singleton VL 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am J Enol Viticult* 28:49-55.
- Sreeranjini S, Siril EA 2013. Production of Anthraquinones from Adventitious Root Derived Callus and Suspension Cultures of *Morinda citrifolia* L. in Response to Auxins, Cytokinin and Sucrose Levels. *Asian Journal of Plant Science and Research* 3(3):131-138.
- SPSS 20. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2011.
- Steffens B, Rasmussen A 2016. The Physiology of Adventitious Roots, Topical Review on Adventitious Root Physiology. *Plant Physiology* 170:603–617.
- Sujatha G, Ranjitha Kumari BD 2012. Establishment of Fast growing *in vitro* Root Culture System in *Artemisia vulgaris*. *Journal of Agricultural Technology* 8(5): 1779-1790.
- Vasconsuelo A, Giulietti AM, Boland R 2004. Signal Transduction Events Mediating Chitosan Stimulation of Anthraquinone Synthesis in *Rubia tinctorum*. *Plant Science* 166:405–413.
- Wu CH, An D, Sun LN, Wang M, Chang GN, Zhao CY, Lian ML 2017. A Novel Co-Culture System of Adventitious Roots of Echinacea Species in Bioreactors for High Production of Bioactive Compounds. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 130:301–311.