

***In Vivo* ve *In Vitro* Koşullarında Bazı *Alkanna* Taksonlarının Sekonder Metabolit İçerikleri ve Antioksidan Aktiviteleri**

Cennet YAMAN^{1*}, Serkan URANBEY², Muhammet ER³, Dilek BAŞALMA²

¹Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 66900 Yozgat/Türkiye

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 06100 Ankara/ Türkiye

³Bozok Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 66900 Yozgat/ Türkiye

*Sorumlu yazar:cennet.yaman@bozok.edu.tr

Geliş Tarihi: 09.01.2020 Düzeltme Geliş Tarihi: 22.05.2020 Kabul Tarihi: 27.05.2020

Öz

Bu çalışmada *in vivo* koşullarda yetişmiş ve *in vitro* koşullarda büyütülen *Alkanna orientalis* (L.) Boiss. var. *orientalis* ve endemik *Alkanna sieheana* Rech. Fil. taksona ait bitki örneklerinde toplam alkanin/şikonin (A/Ş), toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ile DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Her iki taksona ait doğadan toplanan tohumlar *in vitro* koşullarda farklı büyüme düzenleyicileri içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında sekonder metabolit üretimine uygun çoğaltım ve rejenerasyon ortamında kültüre alınmıştır. *A. orientalis*'de en yüksek sürgün sayısı (6.53 adet/bitki) 0.25 mg L⁻¹ 6-benzil amino purin (BAP), 0.5 mg L⁻¹ kinetin (KIN), 1.0 mg L⁻¹ indol 3 asetik asit (IAA), *A. sieheana*'da ise 5.57 adet/bitki ile 0.25 mg L⁻¹ BAP, 0.5 mg L⁻¹ KIN, 1.0 mg L⁻¹ indol 3 butirik asit. (IBA) içeren besin ortamında elde edilmiştir. Her iki taksonda en yüksek ekstrakt verimi *in vivo* dan toplanan örneklerde saptanmıştır. *A. orientalis* taksonunda en yüksek toplam fenolik içerik 172.80 mg gallik asit eşdeğer (GAE) g⁻¹ ekstrakt ile *in vivo* koşullarında kök ekstraktında, *A. sieheana* için ise 122.99 mg GAE g⁻¹ ekstrakt ile *in vivo* koşullarda herba ekstraktında gözlenmiştir. Her iki takson için de en yüksek toplam flavonoid içerik yine *in vivo* koşullarındaki ekstraktlarda belirlenmiştir. *A. sieheana* türünde en yüksek toplam A/Ş içeriği (61.45 µg g⁻¹ ekstrakt) *in vivo* koşullarındaki köklerden elde edilmiş ve *A. orientalis* köklerinden 23 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. En yüksek radikal kovucu aktivite ise *A. orientalis* için 1000 µg ml⁻¹ konsantrasyonda *in vivo* koşullarında köklerden, *A. sieheana* için 1500 µg ml⁻¹ konsantrasyonda yine *in vivo* koşullarındaki herba kısmında belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Alkanna*, Alkanin/Şikonin, DPPH, Fenolik, Flavonoid

Secondary Metabolite Contents and Antioxidant Activities of Some *Alkanna* Taxa Under *In Vivo* And *In Vitro* Conditions

Abstract

The goal of this study was to investigate total phenolic and flavonoid contents, total Alkannin/Shikonin (A/S) and DPPH (2,2-diphenyl-1-pikrilhidrazil) activity of plant samples of *A. orientalis* and endemic *Alkanna sieheana* under *in vitro* and *in vivo* conditions. The seeds of both species were cultured on MS medium containing different growth regulators under *in vitro* conditions for suitable metabolite production. The highest number of shoot (6.53 number/plant) in *A. orientalis* on was obtained on MS medium containing 0.25 mg L⁻¹ 6-benzyl amino purin (BAP), 0.5 mg L⁻¹ kinetin (KIN), 1.0 mg L⁻¹ indole 3 acetic acid (IAA) and 5.57 number/plant in *A. sieheana* on 0.25 mg L⁻¹ BAP, 0.5 mg L⁻¹ KIN and 1.0 mg L⁻¹ indole 3 butyric acid. (IBA). The highest extract yields were determined on samples obtained from *in vivo* conditions. The highest total phenolic content was observed the root extract *in vivo* with 172.80 mg gallic acid equivalent (GAE) g⁻¹ extract for *A. orientalis*, and shoot extract *in vitro* with 122.99 mg GAE g⁻¹ extract for *A. sieheana*. The highest total flavonoid content was determined from obtained from *in vivo* conditions. The highest total A/S content with 61.45 µg g⁻¹ ekstrakt was obtained from roots of *A. sieheana* and found about 23 times higher than content in root of *A. orientalis* from *in vivo* conditions The highest radical scavenging activity was determined under *in vivo* conditions from root at

1500 µg ml⁻¹ concentration for *A. orientalis* and from shoot *in vivo* at 1500 µg ml⁻¹ concentration for *A. sieheana*.

Keywords: *Alkanna*, Alkannin/Shikonin, DPPH, Fenolic, Flavonoid

Giriş

Alkanna cinsi Boraginaceae (Hodangiller) familyasına ait otsu yapıda ve dünyada yaklaşık 50 tür ile temsil edilmektedir (Mahmoudi ve ark., 2012). Türkiye florasında 36 tür ve 32'si endemik 41 takson ile yaklaşık %80 endemizm oranı sahip önemli bir cindir (Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2012). *Alkanna* cinsi, 1500 m yükseklikte yayılış gösteren yarı çalimsı formda ve Nisan-Ağustos aylarında çiçeklenen çok yıllık türlere sahiptir. Çiçek renkleri sarı, mavi, beyaz tonlarında ve hoş kokuludur. Yaprakları tüylüdür. (Davis ve ark., 1988). *Alkanna* cinsi genel olarak ülkemizde havacıvaotu olarak bilinmesine rağmen taksonları ülkemizde değişik yöresel isimlerle tanınmaktadır. *A. orientalis* (L.) Boiss. var. *orientalis* sarı çiçekli ve sarı somuk olarak bilinen yaygın bir taksondur. *A. sieheana* Rech. fil. türü ise mavi çiçekli olup, yerineği ismi ile bilinen endemik bir türdür (Güner ve ark., 2012).

Her iki tür de köklerinde ticari önemi olan enantiyomerik izohekzenilnaftazarin (Alkanin/Shikonin (A/Ş) ve türevleri) renk pigmentleri içermektedirler (Assimopoulou ve ark., 2006). Uzun yıllardır A/Ş ve türevleri tekstil, gıda, kozmetik gibi alanlarda boyama amaçlı kullanılmaktadır. Tıp ve farmakoloji alanlarında güçlü bir yara iyileştirici (Papageorgiou ve ark., 2008), antimikrobial (Haghbeen ve ark., 2011), anti inflamatuvar (Mahmoudi ve ark., 2012), antitrombotik, sitotoksik (Gür ve ark., 2010), antioksidant (Assimopoulou ve Papageorgiou, 2005), enzim inhibitörü (Kajimoto ve ark., 2008) gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. En son araştırmalarda da anti tümör özelliği olduğu ortaya konmuştur (Han ve ark., 2019; Xu ve ark., 2019).

A/Ş ve türevleri Boraginaceae familyasının *Alkanna*, *Onosma*, *Arnebia*, *Lithospermum* ve *Echium* cinslerine ait yaklaşık 150 türünün köklerinde doğal olarak bulunduğu bilinmektedir (Kumar ve ark., 2011). Köklerinde A/Ş bulunduran cinslere ait türler genellikle doğada yabancı formları bulunan kültüre henüz alınmamış doğal bitkilerdir. Ayrıca birçoğunun köklerindeki A/Ş miktarları ile ilgili literatür hemen hemen bulunmamaktadır. Bazı türlerin çok yıllık olması ve optimum ticari A/Ş üretiminin 6-7 yıl sonra köklerde birikmesi (Hunter ve Kilby 1990) gibi sebeplerden dolayı kültüre alınarak bileşiklerin ticari üretimini zorlaştırmaktadır. Ayrıca, farklı lokalite ve

ortamlardan toplandığı için ticari anlamda anlamlı ve stabil bir madde temini elde edilmemektedir. Bilindiği üzere bitki doku kültürü teknikleri ile sekonder metabolit üretimini teşvik edilebilmektedir. Farklı bitki kısımları kullanılarak, kültür koşulları, besin ortamları, elisitörler ve diğer abiyotik ve biyotik stres faktörleri modifiye edilerek daha fazla, daha kısa sürede, daha steril ve stabil sekonder metabolit üretimi yapılabilmektedir. Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* koşullarda sekonder metabolit üretimi ve antioksidan içeriğinde değişimler meydana gelebilmektedir (Tošić ve ark., 2019). Bu çalışmada da *A. orientalis* ve *A. sieheana* taksonların *in vitro* ve *in vivo* örneklerinde ekonomik önemi yüksek olan A/Ş içerikleri ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Alkanna sieheana Rech. fil. taksonu (endemik) Konyanın Çumra ilçesi Apasaraycık köyünden 1090 m'den ve *Alkanna orientalis* (L.) Boiss var. *orientalis* taksonu ise Yozgat Bozok Üniversitesi Kampüsü 1399 m'den toplanmıştır. Tür teşhisi Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Osman TUGAY tarafından yapılmıştır. Taksonların tohumları ve bitki örnekleri 2015 yılında *A. sieheana* taksonu Mayıs ayında, *A. orientalis* türü ise Haziran ayında doğadan toplanmıştır. Bitkiler Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, KNYA herbaryumda *A. sieheana* ve *A. orientalis*, sırasıyla 26.095 ve 26.088 herbaryum numarası ile numaralandırılmış ve toplama yerleri kaydedilmiştir.

In vitro tohumların yüzey sterilizasyonu çoğaltımı

Denemede her iki türe ait koyu kahve renkli (olgun) tohumlar kullanılmıştır. Her iki taksonun tohumları da %20 NaOCl'de 20 dk bekletilerek, tohumların yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Sterilizasyon sonrası tohumlar steril saf su ile 3-4 kez durulanmış, son durulamada tohumlar steril saf su da 1 saat bekletilmiştir. *In vitro* çalışmalarda kullanılan temel besin ortamları 121 °C'de ve 1.2 atm basınçta 20 dk steril edilmiştir.

In vitro çalışmalarda taksonlarının olgunlaşmış tohumlarının tohum kabukları çıkartılarak elde edilen sürgünler 0.25 mg L⁻¹ BAP, 0.5 mg L⁻¹ KIN, 1.0 mg L⁻¹ IAA içeren ortamda 15 günde bir alt kültüre alınmış ve gelişen sürgünler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 1). Eksplant

kaynağı olarak tercih edilen sürgünlerin yaşların 4 haftalık ve 4-5 yapraklı olmasına dikkat edilmiştir. Elde edilen sürgünlerden Şekil 1B’de gösterildiği gibi sürgün eksplantları farklı dozlarda büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamında 24 ± 1 °C de ve 16000 lüks altında 16/8 saat ışıklandırma koşullarında kültüre alınmıştır. Kültürden 30 gün sonra elde edilen örneklerde ekstrakt hazırlanmıştır.

Ekstraktların hazırlanması

In vivo ortamdan toplanan bitki örneklerinin toprak üstü ve kök kısımları gölgede kurutulmuş ve sonra kesilerek öğütülmüştür. *In vitro* şartlarda elde edilen sürgünler ise sıvı azot ile toz haline getirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 5 g örnek üzerine 50 ml metanol eklenmiştir. Her örnek için uygulamalar 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Örnekler etüvde 40 °C’de 24 saat bekletilmiştir. Elde edilen çözeltiler santrifüj cihazında toprak üstü ve kök çözeltileri 4.500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Doku kültüründen alınan örnekler ise 9.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernat kısımları alınmış ve evaporatör yardımı ile organik çözücü uzaklaştırılmış, ekstrakt verimi % (w/w) olarak elde edilmiştir. Antioksidan çalışmaları için ekstraktlar +4 °C’de muhafaza edilmiştir. A/Ş analizi için elde edilen ekstraktlar 0.22 µm delik çapına sahip filtreden geçirilmiş, -20 °C’de bekletilmiştir.

Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi (folin yöntemi)

Ekstraktların toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu Reaktif (FCR) ile Singleton ve ark. (1999) metodu modifiye edilerek yapılmıştır. Analizde (2 mg/ml) örnek çözeltilerinden 0.2 ml alınmış ve üzerine 9 ml distile su ilave edildikten sonra 0.2 ml Folin-Ciocalteu ve 0.6 ml Na₂CO₃ (%20) eklenmiş ve toplam hacim 10 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 2 saat karanlıkta inkübe ettikten sonra, 760 nm’de absorptans ölçümü yapılmıştır. Standart kalibrasyon eğrisi oluşturmada gallik asit kullanılmıştır. Gallik asit standart grafiğine göre tüm bitki ekstraktlardaki toplam fenolik madde mg gallik asit eşdeğeri (GAE) g⁻¹ ekstrakt olarak hesaplanmıştır ($y=0,0098x+0,0253$; $R^2 = 0,9989$). Her bir deneme 4 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Toplam flavonoid içeriğin belirlenmesi

Ekstraktların toplam flavonoid içeriği Arvouet-Grand ve ark. (1994) yöntemine göre saptanmıştır. Deneyde %10’luk alüminyum nitrat 100 µl, 1 M potasyum asetat 100 µl alınıp, bitki ekstraktının son konsantrasyonu 100 µg ml⁻¹ olacak şekilde ekstrakt ilave edilmiştir. Deney etanol ile 5 ml’ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında 40 dk karanlıkta inkübe ettikten sonra 417 nm’de

absorptans ölçümü yapılmıştır. Standart kalibrasyon eğrisi oluşturmada kuersetin kullanılmıştır. Toplam flavonoid madde içeriği mg kuarsetin eşdeğeri (KE) g⁻¹ ekstrakt olarak ifade edilmiştir ($y=0,0055x+0,0063$; $R^2 = 0,9995$). Her bir deneme 4 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Toplam alkanin/şikonin tayini

Ekstraktların toplam A/Ş miktarı LC-20A model (Shimadzu, Japan) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı tarafından yapılmıştır. Kolon olarak Inertsil C₁₈ ODS-3 (5µm, 4.6 mm×250 mm, Japan) kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz organik düzenleyici %90 asetonitril ile %10 su ve hareketli fazın akış hızı 0.80 ml/dk olarak ayarlanmıştır. SPD-M20A photodiode array (PDA) detektörü (Shimadzu, Japan) ile 520 nm’de absorptans ölçümü yapılmıştır. Miktar tayini standart olarak kullanılan alkanin maddesinin kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Assimopoulou ve ark., 2006). Alkanin miktarı $R^2 = 0,9964$ olan $y = 139385x + 8384,9$ denklemine göre hesaplanmıştır (Rt:5.28).

Radikal kovucu aktivitesi

Ekstraktların serbest radikal kovucu aktiviteleri bilinen bir radikal olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir (Gezer ve ark., 2006). DPPH radikali süpürücü aktivite tayini için 4 mg DPPH, 100 ml metanol içerisinde çözülmüştür. Örneklerden ana stok olarak 2 mg/ml ekstrakt çözeltisi hazırlanmış ve bu stoktan farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml) seyreltmeler hazırlanmıştır. Her bir örnek için 3.2 ml DPPH radikali ve farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt çözeltilerinden 200 µl ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta inkübe ettikten sonra 517 nm’de absorptans ölçümü yapılmıştır. Standart antioksidan olarak askorbik asit ve bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) kullanılmıştır. Kontrol için deney tüpüne ekstrakt çözelti miktarı kadar metanol ilave edilmiştir. Her bir deneme 3 tekerrürlü olarak yapılmış, her tekerrür iki tekrarlı olarak yapılmıştır. Örneklerin DPPH radikal kovucu aktivitesi % olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPPH radikal kovucu aktivitesi} = \left[\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{ekstrakt}}}{A_{\text{kontrol}}} \right] \times 100$$

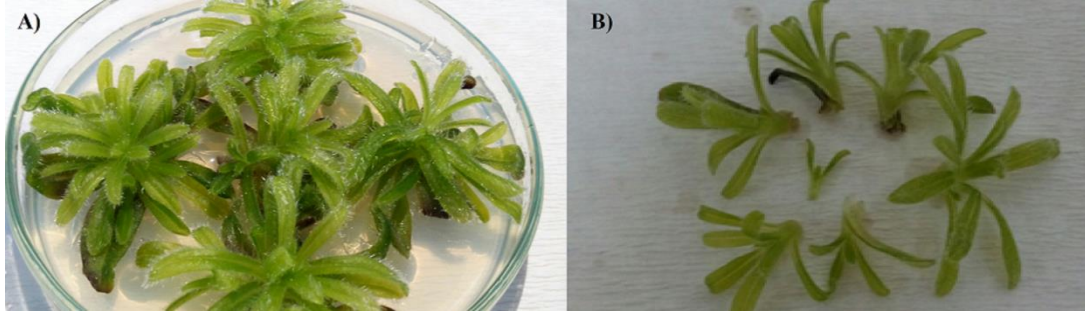
Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi

Veriler Düzgüneş vd. (1983) tarafından bildirildiği şekilde varyans analizi yapılmış ve ortalamalar arasındaki fark Duncan çoklu karşılaştırma testi ile kıyaslanmıştır. Her bir örneğin standart hataları ortalama değerlerinin yanında \pm ile verilmiştir.

Bulgular ve Tartışma***In vitro* çoğaltım ve sürgün rejenerasyonu**

Farklı besin ortamlarında kültüre alınan *A. orientalis* türünde en yüksek sürgün sayısına (6.53 adet/bitki) ve sürgün boyuna (5.37 cm) 0.25 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ KIN, 1.0 mg l⁻¹ IAA içeren MS besin

ortamında saptanmıştır. *A. sieheana* türünde ise en yüksek sürgün sayısına (5.57 adet/bitki) ve sürgün boyuna (5.37 cm) 0.25 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ KIN, 1.0 mg l⁻¹ IBA içeren MS besin ortamında bulunmuştur (Çizelge 1).



Şekil 1. *A. orientalis* sürgünlerin 0.25 mg L⁻¹ BAP, 0.5 mg L⁻¹ KIN, 1.0 mg L⁻¹ IAA ortamında: A) 30 gün sonraki görüntüsü, B) 30 günlük bitkilerden elde edilen tek sürgünler (eksplant kaynağı).

Çizelge 1. *A. orientalis* ve *A. sieheana* taksonlarının farklı büyüme düzenleyici uygulamalarının *in vitro* şartlarda sürgün sayısı ve sürgün boyuna etkisi

Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)				<i>A. orientalis</i>		<i>A. sieheana</i>	
KIN	BAP	IBA	IAA	Sürgün sayısı (adet)	Sürgün boyu (cm)	Sürgün sayısı (adet)	Sürgün boyu (cm)
0.5	0.25	-	1.0	6.53±0.82	5.37±0.06a	4.67±0.53	4.97±0.12a
0.5	0.25	1.0	-	4.50±0.17	4.10±0.11b	5.57±0.12	5.37±0.06a
-	-	2.0	-	5.20±0.23	5.00±0.34a	4.67±0.14	4.40±0.09b

Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 düzeyinde önemlidir.

Sürgün oluşumunda her iki tür içinde en etkili ortamın 0.25 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ KIN, 1.0 mg l⁻¹ IAA içeren MS besin ortamının uygun olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, Pal ve Chaudhury (2010) çalışmalarında Boraginaceae familyasına ait ve köklerinde A/Ş içeren *Arnebia hispidissima* türünün BAP, KIN, IAA içeren ortamlarda sürgün gelişiminin daha iyi olduğu bildirilmiştir.

Ekstraksiyon verimi

Çizelge 2 incelendiğinde, örneklerin ekstrakt verimleri %9.3 ile 1.1 arasında değişmiştir. *A. orientalis* ve *A. sieheana* en yüksek ekstrakt verimi, her iki taksonda da bitkinin herba kısmından (sırasıyla %9.3, %5.5) elde edilmiştir. Özer ve ark.

(2010) *Alkanna tinctoria* türünün kuru herbal kısımlarından metanollü ekstrakt verimini %5.29 rapor etmiştir. En düşük ekstrakt verimi ise yine her iki taksonda da 0.25 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ KIN, 1.0 mg l⁻¹ IBA içeren sürgün örneklerinde (sırasıyla %1.1, %1.6) tespit edilmiştir. Chang ve ark. (2008) *Arnebia euchroma* ve *Lithospermum erythrorhizon* türlerinin köklerinin metanollü ekstrakt verimlerini sırasıyla %7.21 ve %6.58 olarak bulmuşlardır. *A. orientalis* ve *A. sieheana* taksonlarının kök ekstrakt verimi sırayla %3.7 ve %5.3 olarak kaydedilmiştir. Her iki taksonun *in vitro* örneklerin ekstrakt verimleri *in vivo* örneklerinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 2. *A. orientalis* ve *A. sieheana* taksonlarının *in vivo* ve *in vitro* örneklerinin ekstrakt verimi

No	Eksplant	Büyüme düzenleyiciler (mg L ⁻¹)					Ekstrakt örneği	Elde edilen ekstrakt yüzdesi (%)	
		BAP	KIN	NAA	IAA	IBA		A.O	A.S
1	Sürgün	0.25	0.5	-	1.0	-	Sürgün	2.8	2.2
2	Sürgün	0.25	0.5	-	-	1.0	Sürgün	1.1	1.6
3	Sürgün	-	-	-	-	2.0	Tam Bitki	2.6	3.7
4		<i>In vivo</i> ortamdaki					Herba	9.3	5.5
5		<i>In vivo</i> ortamdaki					Kök	3.7	5.3

* A.O: *A. orientalis* var. *orientalis*, A.S: *A. sieheana* Rech. fil.

Toplam fenolik içerik

A. orientalis taksonuna ait örneklerde toplam fenolik değerleri 5.08-172.80 mg GAE g⁻¹ ekstrakt arasında, *A. sieheana* taksonunda ise 5.11-122.99 mg GAE g⁻¹ ekstrakt arasında değiştiği gözlenmiştir (Çizelge 3). En yüksek toplam fenolik içeriğin 172.80 mg GAE g⁻¹ ekstrakt ile *A. orientalis* taksonunun kök ekstraktından elde edilmiştir. *A. sieheana* taksonunda ise 122.99 mg GAE g⁻¹ ekstrakt ile gövde ekstraktında tespit edilmiştir. Her iki taksonun *in vitro* örnekleri *in vivo* örneklerinden daha düşük toplam fenolik içeriğe sahip olduğu gözlenmiştir.

Boraginaceae familyasının köklerinde A/Ş içeren türleri incelendiğinde, *Alkanna tinctoria*

türünün herba kısmının toplam fenolik miktarını Şengül ve ark. (2009) 11.57 mg GAE g⁻¹ kuru ağırlık, Özer ve ark. (2010) ise 58.56 µg GAE mg⁻¹ ekstrakt bulmuşlardır. Fakat *A. orientalis* ve *A. sieheana* taksonlarının herba (sırasıyla 102.66 ve 122.99 mg GAE g⁻¹ ekstrakt) kısımlarında daha yüksek toplam fenolik içerik tespit edilmiştir. Chang ve ark. (2008) *Arnebia euchroma* ve *Lithospermum erythrorhizon* türlerinin köklerindeki toplam fenolik içeriklerini sırasıyla 150.70 ve 138.60 mg KE g⁻¹ ekstrakt olarak kaydetmişlerdir. Bu değerlerin *A. orientalis* köklerindeki toplam fenolik içeriğinden düşük, *A. sieheana* taksonunkinden ise yüksek olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3. *A. orientalis* ve *A. sieheana* taksonuna ait örneklerin toplam fenolik, toplam flavonoid ve A/Ş içerikleri

No	Eksplant	Büyüme düzenleyiciler (mg L ⁻¹)					Ekstrakt örneği	Toplam fenolik içerik (mg GAE g ⁻¹ ekstrakt)		Toplam flavonoid içerik (mg KE g ⁻¹ ekstrakt)		Alkanin/Şikonin miktarı (µg g ⁻¹ ekstrakt)	
		BAP	KIN	NAA	IAA	IBA		A.O	A.S	A.O	A.S	A.O	A.S
1	Sürgün	0.25	0.5	-	1.0	-	Sürgün	75.32	109.61	138.44	2.32	nd	14.678
2	Sürgün	0.25	0.5	-	-	1.0	Sürgün	123.58	110.56	95.62	139.89	nd	nd
3	Sürgün	-	-	-	-	2.0	Tam Bitki	49.15	20.65	9.07	7.38	nd	nd
4		<i>In vivo</i> ortamdaki					Herba	102.66	122.99	67.31	10.22	nd	nd
5		<i>In vivo</i> ortamdaki					Kök	172.80	93.48	22.07	11.44	2.705	61.457

* A.O: *A. orientalis* var. *orientalis*, A.S: *A. sieheana* Rech. fil.* nd, belirlenemedi

Toplam flavonoid içerik

Toplam flavonoid değerleri *A. orientalis* taksonuna ait örneklerde 9.07-138.44 mg KE g⁻¹ ekstrakt arasında değişirken, *A. sieheana* taksonunda ise 2.32-139.89 mg KE g⁻¹ ekstrakt arasında değiştiği gözlenmiştir. Çizelge 3 incelendiğinde, her iki taksonun *in vitro* uygulamalarından elde edilen bazı örneklerindeki toplam flavonoid içeriklerinin *in vivo* kök ve herba kısımlarından daha yüksek bulunmuştur. En yüksek toplam flavonoid içerik *A. orientalis* için 138.44 mg KE g⁻¹ ekstrakt ile 0.25 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ KIN, 1.0 mg l⁻¹ IAA ortamından elde edilen sürgün örneklerinde, *A. sieheana* için ise 139.89 mg KE g⁻¹ ekstrakt ile 0.25 mg l⁻¹ BAP, 0.5 mg l⁻¹ KIN, 1.0 mg l⁻¹ IBA ortamından elde edilen sürgün örneklerinde tespit edilmiştir. *A. orientalis* ve *A. sieheana* taksonlarının toplam flavonoid içerikleri için büyüme düzenleyicilerinin pozitif etki yapabileceği tespit edilmiştir. Hatta toplam fenolik içerikten daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Benzer olarak Vinothini ve ark. (2017) çalışmalarında bazı *in vitro* örneklerinden elde ettikleri toplam flavonoid içeriklerin toplam fenolik içeriğinden yüksek olduğunu rapor etmiştir.

Toplam alkanin/şikonin (A/Ş) tayini

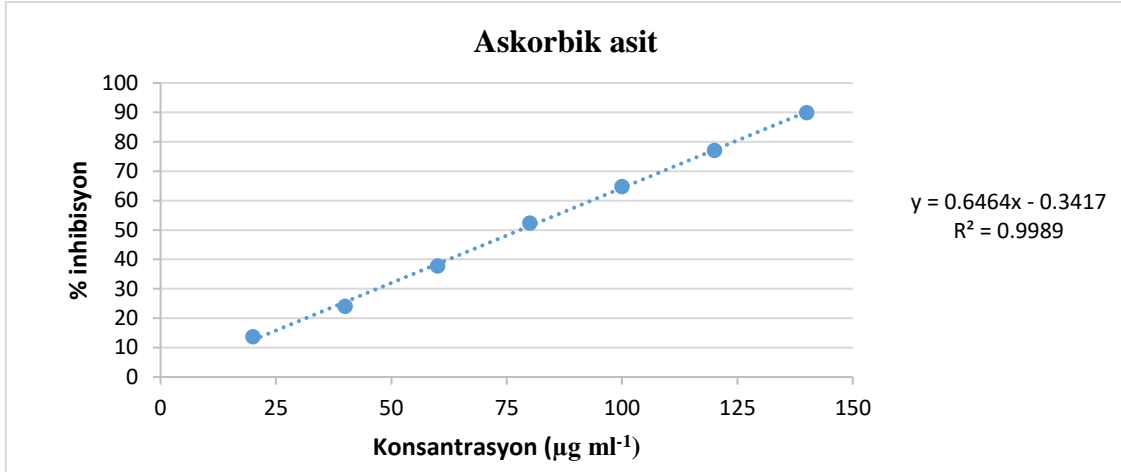
A. orientalis ve *A. sieheana* taksonlarının *in vivo* ve *in vitro* örneklerinin toplam A/Ş miktarı alkanin standart kalibrasyon eğrisine göre µg/g ekstrakt cinsinden hesaplanmış ve sonuçlar çizelge 3'de verilmiştir. Sonuçlara göre *A. sieheana* taksonunun doğal ortamdaki köklerinden (61.457 µg/g ekstrakt) elde edilen A/Ş miktarının *A. orientalis* taksonunun doğal ortamdan elde edilen köklerinden (2.705 µg/g ekstrakt) yaklaşık olarak 23 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *A. sieheana* bitkisinin *in vitro* şartlarda 0.5 mg L⁻¹ KIN, 0.25 mg L⁻¹ BAP, 1.0 mg L⁻¹ IAA ortamından elde edilen sürgün örneklerinde A/Ş miktarı 14.678 µg/g ekstrakt olarak bulunmuş ve *A. orientalis* taksonunun doğal ortamındaki köklerinden yaklaşık 6 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuçlara göre, *A. sieheana* taksonunun A/Ş üretiminde önemli bir takson olduğunu düşündürmektedir. Köklerinde A/Ş içeren türler üzerinde yapılan çalışmalarda, IAA büyüme düzenleyici destekli besin ortamlarında fazla hücre artış olduğu (Bageri ve ark., 2011), fakat karanlık şartlarda ise alkanin miktarında artış olduğu bildirilmiştir (Haghbeen ve ark., 2011). BAP ve IAA içeren besin ortamlarında da kallus gelişiminin ve

A/Ş miktarının arttığını rapor edilmiştir (Chung ve ark., 2006; Zare ve ark., 2010).

DPPH radikal kovucu aktivite

A. orientalis ve *A. sieheana* taksonlarının *in vivo* ve *in vitro* örneklerinin 250, 500, 750, 1000, 1500 ve 2000 µg ml⁻¹ konsantrasyonlarındaki DPPH

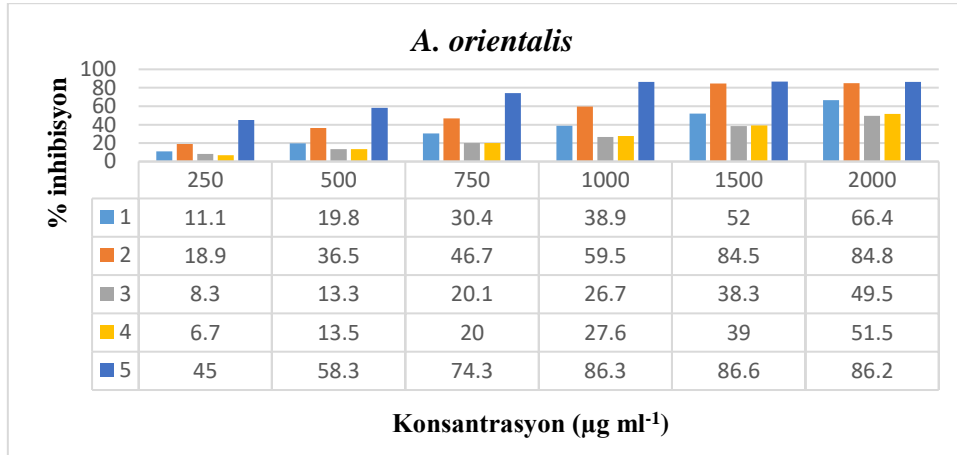
aktiviteleri incelenmiş ve % inhibisyon değerleri Şekil 3 - 4'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Standart antioksidan olarak bilinen askorbik asit'in DPPH radikal kovucu aktivitesi Şekil 2'de verilmiştir. Askorbik asit standartının DPPH aktivitelerinin her iki taksonun örneklerine göre yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 2. Askorbik asit standartının farklı konsantrasyonlarda DPPH aktivitesi

Şekil 3 incelendiğinde, *A. orientalis* taksonunun örnekleri arasında her bir konsantrasyonda en yüksek DPPH aktivitesinde kök örneği sahip olduğu ve herba örneğinin *in vitro* örneklerinden daha düşük aktivite sergilediği kaydedilmiştir. *A. sieheana* taksonunda ise her bir

konsantrasyonda en yüksek aktivite herba örneğinde gözlenmiş ve kök örneğinin 0.5 mg L⁻¹ KIN, 0.25 mg L⁻¹ BAP, 1.0 mg L⁻¹ IAA ile 0.5 mg L⁻¹ KIN, 0.25 mg L⁻¹ BAP, 1.0 mg L⁻¹ IBA ortamlarından elde edilen *in vitro* örneklerinden daha düşük DPPH aktivitesi sergilemiştir (Şekil 4).



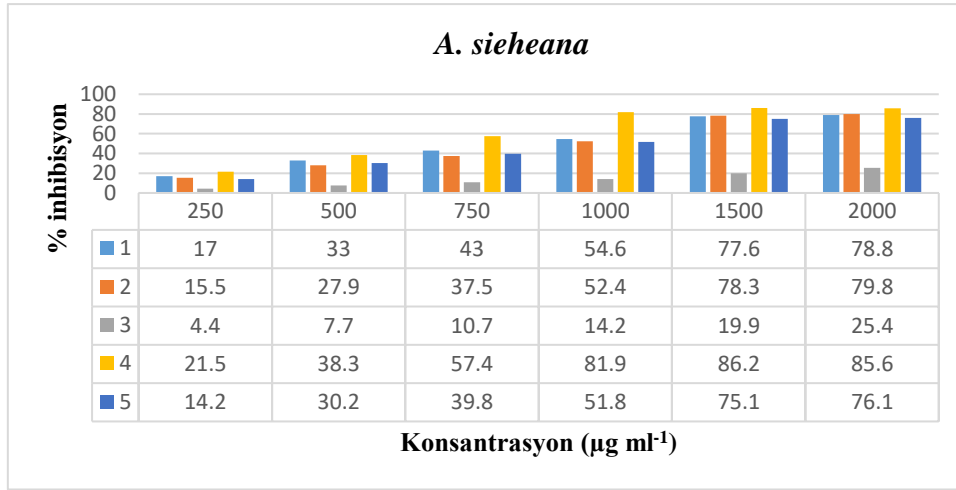
Şekil 3. *A. orientalis*'e ait farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların DPPH süpürme aktivitesinin % inhibisyon değerleri (1, 2, 3, 4, 5 numaraları Çizelge 3'deki No ifadelerin karşılığıdır)

250 µg ml⁻¹ konsantrasyondaki en yüksek DPPH aktivitesi *A. orientalis* taksonunun kök ekstraktlarında %45.0, ikinci sırada *A. sieheana* taksonunun herba kısımlarında %21.1 olarak tespit edilmiştir. Her iki takson içinde en düşük antioksidan aktivitesi 2.0 mg L⁻¹ IBA ortamındaki tam bitki örneklerinde kaydedilmiştir. Fakat, her iki taksonda da 0.25 mg/L BAP, 0.5 mg/L KIN, 1.0 mg/L

IBA içeren ortamda sürgün eksplantlarından elde edilen sürgün ekstraktlarında da yüksek oranda DPPH aktivitesi gözlenmiştir (2000 µg ml⁻¹ ekstraktlarda, *A. orientalis* % 84.8 ve *A. sieheana* %79.8). *In vitro* uygulamaları ile *Alkanna* türlerinden elde edilen örneklerde yüksek antioksidan aktivite sergileyebileceği tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda da doku kültürü

örneklerin *in vivo* örneklerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Roy

ve Mallick, 2017; Prihantini ve ark., 2018).



Şekil 4. *A. sieheana* taksonuna ait farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların DPPH süpürme aktivitesinin % inhibisyon değerleri (1, 2, 3, 4, 5 numaraları Çizelge 3'deki No ifadelerin karşılığıdır)

Köklerinde A/Ş bulunduran diğer türlerin DPPH aktiviteleri incelendiğinde, *A. tinctoria* köklerinin 500 ppm konsantrasyonunda yüksek antioksidan aktivitesine sahip olduğunu bildirilmiştir (Assimopoulou ve Papageorgiou 2005). Benzer olarak, *A. orientalis* bitkisinin sulu ekstraktlarında antioksidan aktivitesi olmadığını ve metanollü ekstraktlarının 500 μl 'lik konsantrasyonunda en yüksek antioksidan aktivitesi (%98) olduğu tespit edilmiştir (Mothana ve ark., 2008). Bu çalışmada ise *A. orientalis* ve *A. sieheana* taksonlarının metanollü kök ekstraktlarının 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarında sırasıyla %58.3 ve %30.2 olarak bulunmuştur. Fakat 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında *A. orientalis* doyum noktasına ulaşarak en yüksek %86.3 inhibisyon değerine ulaşmıştır. *A. sieheana* taksonu ise 2000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda %76.1 en yüksek inhibisyon değeri sergilemiştir. *A. orientalis* taksonunun metanollü kök ekstraktlarının DPPH aktivitesinin *A. sieheana* taksonundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özer ve ark. (2010) *A. tinctoria* türünün kuru herbal kısımlarının 0.4 ve 0.8 mg ml metanol ekstraktlarının en yüksek DPPH aktivitesine sahip olduğunu açıklamışlardır. Salimikia ve ark. (2015) *Alkanna bracteosa*, *A. frigida*, *A. orientalis* ve *A. tricophila* köklerinin antioksidan aktivitelerini farklı çözücüler içerisinde en iyi çözücünün butanol olduğunu, hatta pozitif kontrol olarak kullanılan kuersetin kimyasalından daha yüksek DPPH aktivitesi sergilediğini rapor etmişlerdir.

Sonuç ve Öneriler

Köklerinde A/Ş içeren bitki türleri birçok biyolojik aktivitelere sahip olmasından dolayı çok

önemli türler arasında yer almaktadır. Bu çalışma, endemik bir tür olan *A. sieheana* türünün sekonder metabolit ve antioksidan aktivitesi üzerinde yapılan ilk çalışmadır. *A. sieheana* taksonunun herba örneklerinin yüksek fenolik içerik ve antioksidan aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir. Kök ekstraktında yüksek oranda A/Ş olmasına rağmen düşük aktivite sergilemesi, herba kısmında antioksidan aktivitesi yüksek bileşik olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen verilere göre her iki tür *in vivo* ve *in vitro* koşullarında karşılaştırıldığında A/Ş üretimi bakımından *A. sieheana* türünün potansiyelinin daha yüksek olduğu, ticarileştirme çabalarında daha öne çıkabileceği düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen veriler doğrultusunda gelecekte yapılacak çalışmalarda gıda, kozmetik ve farmakoloji gibi alanlarda kullanılabilecek doğal aktif bileşenlerin elde edilmesi için *A. sieheana* türünün toprak üstü herba kısmının, *Alkanna orientalis* türünde ise kök kısımları üzerinde odaklanılmasının önemli olabileceği öngörülmüştür.

Kaynaklar

- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P. 1994. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. J. de Pharmacie de Belgique, 49: 462-468.
- Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P. 2005. Radical scavenging activity of *Alkanna tinctoria* root extracts and their main constituents hydroxynaphthoquinones. Phytother Res., 19:141–147.
- Assimopoulou, A.N., Karapanagiotis, I., Vasiliou A., Kokkini, S., Papageorgiou, V.P. 2006.

- Analysis of alkannin derivatives from *Alkanna* species by high-performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 20: 1359–1374.
- Bageri, S., Sanjarian, F., Haghbeen, K., Ebrahimi, M.A. 2011. Establishment Of Cell Suspension Culture From *Onosma Dasytrichum* Seed Callus Culture. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 2 (10): 392-397.
- Chang, M.J., Huang, G.J., Ho, Y.L., Lin, I.H., Huang, S.S., Chang, T.N., Chang, H.Y., Chang, Y.S. 2008. Study on the antioxidant activities of crude extracts from the roots of *Arnebia euchroma* and *Lithospermum erythrorhizon*, *Mid-Taiwan J. Med.*, 13: 113-121.
- Chung, B.Y., Lee, Y.B., Baek, M.H., Kim, J.H., Wi, S.G., Kim J.S. 2006. Effects of low-dose gamma-irradiation on production of shikonin derivatives in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *S. Radiation Physics and Chemistry*, 75, 1018–1023.
- Davis, P.H., Mill, R.R., Tan. K. 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 6. Edinburgh University press, Edinburgh, pp.402-434.
- Düzgüneş, O., Kesici, T. ve Gürbüz, F. 1983. İstatistik Metotları 1. A.Ü. Zir.Fak. Yay. No: 862, Ankara.
- Gezer, K., Duru, M.E. Kıvrak, I., Türkoğlu, A., Mercan, N., Türkoğlu, H. and Gülcan, S. 2006. Free-radical Scavenging Capacity and Antimicrobial Activity of Wild Edible Mushroom of Turkey. *African journal of Biotechnology*, 5 (20):1924-1928.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç T. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi. NGBB and Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.
- Gür, C., Akgün, İ.H., Deliloglu-Gurhan, İ., Korkmaz, K.S., Bedir, E. 2010. Cytotoxic Naphthoquinones from *Alkanna cappadocica*, *J. Nat. Prod.*, 7: 860–864.
- Haghbeen, K., Pourmolaei, S., Mareftjo, M.J., Mousavi, A., Akbari Noghabi, K., Hosseini Shirazi, F., Meshkat, A. 2011. Detailed Investigations on the Solid Cell Culture and Antimicrobial Activities of the Iranian *Arnebia euchroma*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2011/165852.
- Han, X., Kang, K.A., Piao, M.J., Zhen, A.X., Hyun, Y.J., Kim, H.M., Ryu, Y.S., Hyun, J.W. 2019. Shikonin Exerts Cytotoxic Effects in Human Colon Cancers by Inducing Apoptotic Cell Death via the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria-Mediated Pathways. *Biomol Ther (Seoul)*, 27(1): 41–47.
- Hunter, C.S., Kilby, N.J., 1990. Betanin Production and Release In Vitro from Suspension Cultures of *Beta vulgaris*. *Methods Mol Biol.*, 6:545-554.
- Kajimoto, S., Hori, M., Manabe, H., Masuda, Y., Shibayama-Imazu, T., Nakajo, S., Gong, X.F., Obama, T., Itabe, H. and Nakaya, K. 2008. A tyrosine kinase inhibitor, β -hydroxyisovalerylshikonin, induced apoptosis in human lung cancer DMS114 cells through reduction of dUTP nucleotidohydrolase activity. *BBA-Mol Basis Dis.*, 1782:241–250.
- Kumar, R., Sharma, N., Malik, S., Bhushan, S., Sharma, U.K., Kumari, D., Sinha, A.U., Sharma, M., Ahuja, P.S. 2011. Cell suspension culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston – A potential source of naphthoquinone pigments. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(25): 6048-6054.
- Mahmoudi, S.Z., Seyedabadi, M., Esfahani, H.R.M., Amanzadeh, Y., Ostad, S.N. 2012. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Alkanna bracteosa* and *Alkanna tricophila*. *Natural Product Research*, 26:6, 564-569.
- Mothana, R.A.A., Abdo, S.A.A., Hasson, S., Althawab, F.M.N., Alaghbari, S.A.Z., Lindequist, U. 2008. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. *Advance Access Publication*, 7(3):323–330.
- Özer, M.S., Sarıkürkcü, C., Tepe, B., Can, S. 2010. Essential oil composition and antioxidant activities of alkanet (*Alkanna tinctoria* subsp. *tinctoria*). *Food Science and Biotechnology*, 19, 1177-1183.
- Pal, M., Chaudhury, A. 2010. High Frequency Direct Plant Regeneration, Micropropagation and Shikonin Induction in *Arnebia hispidissima*. *J. Crop Sci. Biotech.*, 13 (1) : 13-20.
- Prihantini, A.I., Sukito, A., Tachibana, S. 2018. Production of antioxidant compounds from tissue culture of *Artemisia annua*. *Nusantara bioscience*, 10(4): 251-255.
- Roy, D., Mallick, B. 2017. Phytochemical Analysis of Field Grown and Tissue Culture Derived *Mentha arvensis* L. Plants with special reference to Antioxidative Potentials. *International Journal of Engineering Technology Science and Research*, 4(11):2394 – 3386.
- Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N. and Ballis, A.C. 2008. Alkannins and shikonins: a new

- class of wound healing agents. *Curr Med Chem.*, 15:3248–3267.
- Salimikia, I., Yazdinezhad, A.Z., Golfakhrabadi, F., Esfahani, H.R.M. 2015. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of four *Alkanna* species growing in Iran. *Pharmacognosy Res.*, 7(1): 100–104.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Şengül, M., Yıldız, H., Güngör, N., Cetin, B., Eser, Z. Ve. Ercişli, S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(1): 102-106.
- Xu J., Koizumi K., Liu M., Mizuno Y., Suzaki M., Iitsuka H., Inujima A., Fujimoto M., Shibahara N., Shimada Y. 2019. Shikonin induces an anti-tumor effect on murine mammary cancer via p38-dependent apoptosis. *Oncology Reports*, 41(3): 2020-2026.
- Tošić, S., Stojičić, D., Slavkovska, V., Mihailov-Krstev, T., Zlatković, B., Budimir, S., Uzelac, B., 2019. Phytochemical composition and biological activities of native and in vitro-propagated *Micromeria croatica* (Pers.) Schott (Lamiaceae). *Planta*, 249:1365–1377.
- Vinothini, K., Devi, M.S., Shalini, V., Sekar, S., Semwal, R.B., Arjun, P., Semwal K. 2017. *In vitro* micropropagation, total phenolic content and comparative antioxidant activity of different extracts of *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Current Science*, 113(6):1142-1147.
- Zare, K.H., Nazemiyeh, H., Movafeghi, A., Khosrowshahli, M., Motallebi-Azar, A., Dadpour, M., Omid, Y. 2010. Bioprocess engineering of *Echium italicum* L.: induction of shikonin and alkannin derivatives by two-liquid-phase suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 100:157–164.