

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hypericum retusum Aucher'in KALLUS VE HÜCRE SÜSPANSİYON
KÜLTÜRLERİNDE HİPERİSİN TÜREVLERİNİN ÜRETİLMESİ

Hilal SURMUŞ ASAN

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Aralık-2013

T.C



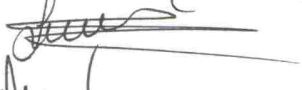


DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Hilal SURMUŞ ASAN tarafından yapılan “*Hypericum retusum* Aucher’in Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Hiperisin Türevlerinin Üretilmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>	
Başkan: Prof.Dr.	Ahmet ONAY	
Üye : Prof.Dr.	Hasan Çetin ÖZEN (Danışman)	
Üye : Doç.Dr.	Süreyya NAMLI	
Üye : Doç.Dr.	Engin TILKAT	
Üye : Yrd. Doç.Dr.	Hakan YILDIRIM	

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 13/12/2013

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20...

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Doktora çalıőmamda değerli bilgilerini, yardımlarını esirgemeyen, ve yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr.Hasan ÇETİN ÖZEN'e;

Tecrübeleriyle bilgileriyle bana yol gösteren sayın hocam Prof. Dr.Ahmet ONAY'a,

Çalıőmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve Ziraat Fakóltesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nın tüm imkanlarını kullanmamı sağlayan Sayın Yrd.Doç. Dr. Hakan YILDIRIM'a

Çalıőmam süresince beni sabırla ve koőulsuz destekleyen eőim Nurettin ASAN'a ve aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Son olarak çalıőmamıza vermiş olduğu maddi destekten dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüęü'ne (DÜBAP/10-FF-111 ve 13-FF-110) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
KISALTMA VE SİMGELER.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Guttiferae Familyasının Özellikleri ve Yayılışı.....	5
2.2. <i>Hypericum</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	5
2.3. Sekonder Metabolitler.....	6
2.3.1. <i>Hypericum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşenleri ve Biyolojik Aktivitesi.....	7
2.3.1.1. <i>Hypericum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşenleri ve Biyolojik Aktivitesi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	10
Kimyasal Bileşenler.....	10
Antidepresan Aktivitesi.....	15
Antimikrobiyal Etkisi.....	16
Antioksidan Etkisi.....	18
Yara İyileştirici Etkisi.....	19
Antienflamatuar Etkisi (iltihap giderici).....	20
Analjezik Etkisi.....	21
Antikanser Etkisi.....	21
2.4. Doku Kültürleri.....	22
2.4.1. Doku Kültürleriyle Sekonder Metabolit Üretimi ile İlgili Çalışmalar.....	23
2.5. Hücre Süspansiyon Kültürleri.....	34
2.6. LC-MS/MS Analizi Yöntemi.....	41
3. MATERYAL VE METOT.....	45

3.1. Materyal	45
3.1.1. Çalışma materyalinin sistematığı	45
3.1.2. <i>Hypericum retusum</i> Aucher Türünün Dış Morfolojisi ve Yayılışı	45
3.1.3. Kallus Kültürlerinin Başlatılması için Uygun Eksplantın Seçilmesi	46
3.2. Metot	46
3.2.1. Kültür Ortamının ve Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması	46
3.2.1.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	47
Kullanılan Besi Ortamı İçeriği	47
Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	49
3.2.1.1. Sterilizasyon İşlemleri	49
Cam Malzemelerin Sterilizasyonu	49
Kültür Kaplarının Sterilizasyonu	50
Pens ve Bisturilerin Sterilizasyonu	50
Transfer Odasının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	50
Kültür Odasının Şartları	51
3.2.2. Doku Kültürü Aşamaları	51
3.2.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi	51
3.2.2.2. Proliferasyon Aşaması	51
3.2.2.3. Kallus Kültürleri	52
Kallus Kültürlerinin Başlatılması	52
Bitki Büyüme Düzenleyicileri Uygulaması	52
Farklı Şeker ve Konsantrasyonları Uygulaması	53
pH Uygulaması	53
Aydınlık Uygulaması	54
3.2.2.4. Süspansiyon Kültürleri	54
Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması	54
Sukroz Uygulaması	56
Işık Uygulaması	57
3.2.3. Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri	57
3.2.4. Analiz İşlemleri	58

3.2.4.1. Ekstraksiyon İşlemleri.....	58
Bitki Örneklerin Hazırlanması.....	58
Ekstraksiyon.....	58
3.2.4.2. Analizler.....	59
Kullanılan Cihaz ve Kromatografik Şartlar.....	59
3.2.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	61
Kullanılan Kimyasallar.....	61
Kullanılan Cihazlar.....	61
3.2.6. İstatiksel Analiz.....	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. Doğal Ortamda Yetişen <i>Hypericum retusum</i> 'un Farklı Organlarının Fenolik Bileşen İçerikleri.....	63
4.2. Kallus Dokularının Geliştirilmesi.....	64
4.2.1. Yaprak Eksplantlarından Kallus oluşturulması ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine BBD'lerinin Farklı Kombinasyonlarının Etkisi.....	64
4.2.2. Kallus Kültürlerinin Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Sukroz ve Glukozun Farklı konsantrasyonlarının Etkisi.....	69
4.2.3. Kallus Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Farklı pH Değerlerinin Etkisi.....	73
4.2.4. Kallus Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Farklı Işık Uygulamalarının Etkisi.....	77
4.3. Süspansiyon Kültürü Çalışmaları.....	80
4.3.1. Kalluslardan Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması.....	80
4.3.2. BBD'lerinin Farklı Kombinasyonlarının Süspansiyon Kültürlerinin Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Etkisi.....	82
4.3.3. Farklı pH Değerlerinin Süspansiyon Kültürlerinin Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Etkisi.....	88
4.3.4. Farklı Işık Uygulamalarının Süspansiyon Kültürlerinin Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Etkisi.....	94

4.3.5. Farklı Sukroz Konsantrasyonlarının Süspansiyon Kùltürlerinin Gelişimi Üzerine ve Fenolik Bileşen İçeriği Etkisi	100
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	105
5.1. Doğal Ortamdan Toplanan Örnekler.....	105
5.2. Çimlendirme ve Proliferasyon Aşaması	107
5.3. Kallus Çalışmaları.....	108
5.3.1. Kallus Başlatılması	108
5.3.2. Kallusta Şeker	110
5.3.3. Kallusta pH	112
5.3.4. Kallusta Işık	113
5.4. Süspansiyon Kùltürü Çalışmaları.....	115
5.4.1. Süspansiyon Kùltürlerinin Başlatılması.....	115
5.4.2. Süspansiyon Kùltürlerinde BBD.....	116
5.4.3. Süspansiyon Kùltürlerinde pH	117
5.4.4. Süspansiyon Kùltüründe Işık	118
5.4.5. Süspansiyon Kùltüründe Sukroz.....	119
6. KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	143

ÖZET

Hypericum retusum Aucher'in KALLUS VE HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE HİPERİSİN TÜREVLERİNİN ÜRETİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Hilal SURMUŞ ASAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2013

Bu çalışmada, tıbbi bitki olarak potansiyel önemi olan *Hypericum retusum* Aucher'in kallus ve süspansiyon kültürleri ile çoğaltımı için uygun bir çalışma prosedürü tanımlanması ve bu kallus ve süspansiyon kültürlerinde bu bitkinin farmakolojik olarak önemli altı fenolik bileşiminin (hiperisin, hiperosid, klorojenik asit, psödohiperisin kuersetin ve rutin) içeriklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Fenolik bileşen miktarlarının belirlenmesi LC-MS/MS aracılığı ile yapılmıştır.

İlk olarak kallus kültürünün oluşturulması için en uygun eksplant belirlendi. Bunun için doğal yetiştirme ortamından toplanan *H. retusum*'un yaprak, gövde ve kök kısımlarının fenolik bileşen içerikleri araştırılmıştır. *H. retusum*'un farklı kısımları arasında en yüksek fenolik bileşen içerikleri bitkinin yaprak kısmından elde edilirken en düşük miktarlar da köklerden elde edilmiştir. *H. retusum*'un tohumları, bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) içermeyen MS besi ortamında çimlendirildi ve 0.5 mg/L BAP içeren MS besi ortamında proliferasyon edildi. Bu sürgünlerin yaprakları kallus oluşumu için kullanılmıştır.

Kallus üretimi ve hücre süspansiyon kültürlerinin kurulmasında en iyi kültür gelişimi ve en yüksek fenolik bileşen miktarlarını elde etmek amacıyla farklı şeker ve kombinasyonları (15, 30 ve 50 g/L sukroz ve glukoz), farklı pH değerleri (pH 4.5, 5.8, 6.5) ve farklı ışık uygulamalarının (sürekli aydınlık, kontrol (16 saat aydınlık 8 saat karanlık) ve sürekli karanlık) etkileri araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi kallus oluşum yüzdesi (%70) 0.5 mg/L KİN + 1.0 mg/L 2,4-D ilaveli ortamdan elde edilmiştir. Kallus gelişiminde 30 g/L sukroz, pH 5.8 ortamı ve kontrol grubundaki ışık koşullarının (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) kullanıldığı MS ortamlarının pozitif etkiye sahip olduğu görülmüştür. Işık uygulamalarında kontrol grubunun en yüksek fenolik bileşen içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Farklı pH değerleri ve şekerlerin kullanıldığı uygulamalarda fenolik bileşen içerikleri uygulama grupları arasında değişkenlik göstermiştir. En iyi süspansiyon kültürleri 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında gelişen kalluslardan elde edilmiş ve süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında bu ortamlar kullanılmıştır. Süspansiyon kültürleri üzerine yapılan uygulamalar sonucunda en iyi kültür gelişimi gösteren ortamların, 0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D, pH 5.8, karanlık koşullarındaki ve 30 g/L sukroz içeren MS ortamları olmuştur. En yüksek fenolik bileşen miktarlarının, 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D hormon ilaveli, pH 4.5 (hiperisin ve hiperosid hariç) ve 15 g/L sukroz içeren kültürlerden elde edilmiştir. Işık uygulamalarında ise fenolik bileşen içerikleri uygulanan gruplar arasında değişkenlik göstermiştir.

Bu tez çalışmasıyla elde edilen bulguların, *H. retusum* 'daki sekonder metabolitlerin ayrıntılı analizleri ve üretimlerinin artırılmasına yönelik ileri iyileştirme çalışmalarına temel oluşturabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fenolik bileşikler, *Hypericum retusum* Aucher, kallus kültürü, LC-MS/MS, süspansiyon kültürü.

ABSTRACT

PRODUCTION OF HYPERICIN DERIVATES FROM CALLUS AND CELL SUSPENSION CULTURE OF *Hypericum retusum* Aucher

PhD THESIS

Hilal SURMUŞ ASAN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2013

In this study, it has been aimed to describe a working procedure for callus and suspension culture of *H. retusum* which has a potential value as a medicinal plant, and to study the contents of seven pharmacologically important phenolic constituents (pseudohypericin, hypericin, hyperforin, rutin, hyperoside and quercetin) in callus and suspension culture. The determination of phenolic compounds was performed by LC-MS/MS.

To start with, the most convenient explant type was determined for the establishment of callogenesis. To do this, the phenolic compounds of leaves, stems and roots *H. retusum* Aucher grown in nature were investigated. Among the different parts of *H. retusum*, the least phenolic compound was obtained from the roots, while the leaf showed the highest phenolic compounds. Seeds of *H. retusum* were germinated in plant growth regulators (PGR) free Murashige and Skoog (MS) medium, and axenic apical tips were proliferated in MS medium containing 0.5 mg/L BAP. Leaves of these shoots were used for callus induction.

Effect of different sugar combinations (15, 30 ve 50 g/L sucrose and glucose), effect of medium pH (pH 4.5, 5.8, 6.5) and different light applications (constant light, control (16 h light 8 h dark) and constant dark) were investigated on the callus production and the establishment of suspension cultures in order to obtain the optimum culture condition and the highest amount of phenolic contents.

In this study, the best percentage of callus formation (%70) was obtained from 0.5 mg/L KIN + 1.0 mg/L 2,4-D supplemented MS medium. The MS medium containing a 30 g/L sucrose with, pH 5.8 and under 16 h light 8 h dark of light conditions was found to have a positive effect on the callus growth. The highest phenolic compounds of the light applications was found on the control group (16 h light 8 h dark). Phenolic compounds of callus grown in MS medium with different pH value and sugars varied among the treatments.

The better suspension cultures were obtained from callus grown on a MS medium supplemented with 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/l KIN+1.0 mg/L 2,4-D and these media were used for the initiation of suspension cultures. As a result of the treatments applied the best growth of suspension cultures was on MS medium supplemented with 30 g/L sucrose 0.5 mg/L KIN+1.0 mg/L 2,4-D at pH 5.8 under constant dark conditions. The highest phenolic compounds obtained from a MS medium containing 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D at pH 4.5 (except hypericin and hyperoside) and 15 g/L sucrose. The phenolic compounds of suspension culture under the different light conditions varied among the treatments.

The results reported from this study are thought to provide a basic knowledge for detailed analysis and the production of secondary metabolites of *H. retusum* Aucher.

Keywords: Callus culture, *Hypericum retusum* Aucher, LC-MS/MS, phenolic compounds, suspension culture.

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. <i>Hypericum</i> türlerinden izole edilen maddeler	8
Çizelge 3.1. MS Besi Ortamında Kullanılan Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	48
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kültür kapları ve özellikleri	50
Çizelge 3.3. Kallus oluşumu için kullanılan ortamlar	52
Çizelge 3.4. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması için kullanılan ortamlar	55
Çizelge 3.5.Çalışmada kullanılan LC-MS/MS Koşulları	59
Çizelge 3.6.Gradient UHPLC metot zaman çizelgesi	60
Çizelge 3.7.MRM Metot parametreleri	60
Çizelge 4.1. Doğal ortamda yetişen <i>H. retusum</i> 'un farklı organlarının fenolik bileşen içerikleri (ng/mg).	63
Çizelge 4.2. Yaprak eksplanlarından kallus oluşturulması üzerine farklı BBD kombinasyonlarının etkisi	65
Çizelge 4.3. Yaprak eksplantlarından oluşturulan kallus dokularının fenolik bileşen içerikleri üzerine farklı BBD kombinasyonlarının etkisi(ng/mg)	68
Çizelge 4.4. Kallus gelişimi üzerine farklı şeker konsantrasyonlarının etkisi	70
Çizelge 4.5. Kallus gelişimi üzerine farklı şeker konsantrasyonlarının etkisi	72
Çizelge 4.6. Kallus gelişimi üzerine farklı pH değerlerinin etkisi	74
Çizelge 4.7. Farklı pH değerlerinde gelişen kallus kültürlerin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)	75
Çizelge 4.8. Kallus gelişimi üzerine ışık uygulamasının etkisi	77
Çizelge 4.9. Farklı ışık uygulamalarında gelişen kallusların fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)	78
Çizelge 4.10. Süspansiyon kültürü oluşumu için kullanılan ortamlar	80
Çizelge 4.11. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin 28 günlük PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri	82
Çizelge 4.12. BBD'lerinin Farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)	86
Çizelge 4.13. Farklı pH değerlerinde gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH, taze ve kuru ağırlık değerlerindeki değişimler	88
Çizelge 4.14. Farklı pH gruplarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)	92
Çizelge 4.15. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin 28 günlük PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri	94
Çizelge 4.16. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşen içerikleri (ng/mg)	98

Çizelge 4.17. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin 28 günlük PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri	100
Çizelge 4.18. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)	103

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.Hiperisin' in moleküler yapısı	7
Şekil 3.1. <i>H. retusum</i> Aucher	46
Şekil 3.2. Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri	55
Şekil 4.1. <i>H. retusum</i> 'un değişik organlarının fenolik bileşen içerikleri.	64
Şekil 4.2. BBD'nin farklı kombinasyonlarında gelişen kallus dokuları.	67
Şekil 4.3. Kallus dokularının fenolik bileşen içerikleri üzerine BBD'lerinin farklı kombinasyonlarının etkisi.	69
Şekil 4.4. Farklı şeker konsantrasyonlarında gelişen kallus dokuları.	71
Şekil 4.5. Kallusların fenolik bileşen içerikleri üzerine farklı şeker konsantrasyonlarının etkisi.	73
Şekil 4.6. Farklı pH ortamlarında gelişen kallus dokuları.	74
Şekil 4.7. Kallus kültürlerinin fenolik bileşen içeriği üzerine farklı pH değerlerinin etkisi.	76
Şekil 4.8. Farklı ışık uygulamalarında gelişen kallus dokuları	77
Şekil 4.9. Farklı ışık uygulamalarında gelişen kalluslarının fenolik bileşik içerikleri.	79
Şekil 4.10. <i>H. retusum</i> 'un süspansiyon kültürü aşamaları.	81
Şekil 4.11. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH değerlerindeki değişimler.	83
Şekil 4.12. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin taze ağırlık değerlerindeki değişimler.	84
Şekil 4.13. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin kuru ağırlık değerlerindeki değişimler.	85
Şekil 4.14. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg).	87
Şekil 4.15. Farklı pH değerlerinde gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH değerlerindeki değişimler.	89
Şekil 4.16. Farklı pH gruplarında gelişen kültürlerin taze ağırlık değerlerindeki değişimler.	90
Şekil 4.17. Farklı pH gruplarında gelişen kültürlerin kuru ağırlık değerlerindeki değişimler.	91
Şekil 4.18. Farklı pH gruplarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri.	93
Şekil 4.19. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH değerlerindeki değişimler.	95

- Şekil 4.20. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin taze ağırlık değerlerindeki değişimler. 96
- Şekil 4.21. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin kuru ağırlık değerlerindeki değişimler. 97
- Şekil 4.22. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşen içerikleri. 99
- Şekil 4.23. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH değerlerindeki değişimler. 101
- Şekil 4.24. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin taze ağırlık değerlerindeki değişimler. 102
- Şekil 4.25. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin kuru ağırlık değerlerindeki değişimler. 102
- Şekil 4.26. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri. 104

KISALTMA VE SİMGELER

BBD	:Bitki Büyüme Düzenleyicileri
BAP	:Benzilaminopürin
NAA	:1 α -Naftalen asetik asit
2,4-D	:2,4-Diklorofenoksi asetik asit
GA ₃	:Giberellik asit
KİN	:Kinetin, 6-Furfurilaminopürin
ZT	:Zeatin
MS	:Murashige And Skoog
THA	:Taze Hücre Ağırlığı
PHH	:Paketlenmiş Hücre Hacmi
KA	:Kuru Ağırlık
MeOH	:Metanol
EtOH	:Etanol
IAA	:İndol-3-asetik asit
IBA	:İndol-3-bütirik asit
2-İP	:N-İzopentenilaminopürin
TDZ	:Thidiazuron
NaOH	:Sodyum hidroksit
NaOCl	:Sodyum hipoklorit
LC-MS/MS	:Sıvı kromatografi-kütle spektrofotometresi

1. GİRİŞ

Tedavi edici özelliğe sahip doğal ürünlerin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanlar ilk çağlardan bu yana karşılaştıkları sağlıkla ilgili problemler karşısında öncelikli olarak bitkilerle tedavi yoluna gitmişlerdir. Bu sayede bitkilerle tedavi gözlemler sonucu elde edilen deneyimlerin nesiller boyu kuşaktan kuşağa aktarılmasıyla günümüze kadar geliştirilerek gelmiştir.

Bugün dünya nüfusunun % 60'ı ve gelişmekte olan ülkeler nüfusunun % 80'i tedavi gereksinimlerini büyük ölçüde tıbbi bitkilerden sağlamaktadır (Dhillion ve ark., 2002). Bugüne kadar bitkilerden üretilen yaklaşık 100.000 adet biyolojik aktif bileşen tanımlanmış olup bu sayı her geçen yıl artmaktadır (DellaPenna, 2001). Dünya çapında kabul görmüş ilaçların % 25'i ve 121 etken madde bitkisel kökenlidir. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) tarafından temel ve esas olarak kabul edilen 252 ilacın 28'i (% 11.1) bitkisel orijinlidir ve önemli bir kısmı da doğal ham maddelerden elde edilen sentetik ilaçlardır (Hoareau ve DaSilva, 1999).

Bu bitkiler arasında önemli yeri olan *Hypericum perforatum*, Guttiferae familyasından çok yıllık bir bitki olup 2000 yıldan daha uzun süredir tedavide kullanılmaktadır. “*Hypericum*” adı yunanca hyper (üstünde) ve eikon (ikon ya da resim) kelimelerinden oluşmaktadır. Eski Yunan ve Roma’da mistik bir gücü olduğuna, kötü ruhlardan ve kötülüklerden koruduğuna dair gelişen inanışlar nedeniyle heykellerin üzerinde motif olarak kullanılmıştır (Toker ve ark. 2002). Tür ismi olan “perforatum” ise yaprakları üzerinde bulunan küçük, yarı saydam salgı ceplerinin oluşturduğu delikli görünüşü tanımlamaktadır (Bombardelli ve Morazzoni 1995; Blumenthal ve ark.2000). En yaygın türü olan *H. perforatum*'dur ve Saint John's Wort adı ile tüm dünyada tanınmaktadır. Saint John'un bitkisi anlamına gelen bu isim bitkinin çiçeklenme döneminin her yıl Saint John's günü olarak kutlanan 24 Haziran'a denk gelmesi nedeniyle verilmiştir (Di Carlo ve ark. 2001).

Dünyanın çeşitli ılıman bölgelerinde yetişen bu bitki 25-60 cm boyunda olup, otsu veya alçak çalımıdır. Çok yıllık olup, saçak kök sistemine sahiptir, yapraklar tam yaprak formundadırlar ve sap üzerinde karşılıklı olarak dizilmişlerdir (Seçmen, 1986). *Hypericum* türlerinin yeryüzündeki sayısı yaklaşık 400 adet olup Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'da geniş yayılım gösterir. Ülkemizde 84 türü bulunan *Hypericum*,

1. GİRİŞ

Marmara, Karadeniz, Ege, Orta ve Doğu Anadolu, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde 13 türü bulunmaktadır. Kantaron, kantarum, koyunkıran ve binbirdelik otu adlarıyla da bilinir (Baytop 1984; Baytop, 1999; Kaçar, 2004)

Geleneksel tedavide *Hypericum*'un yapraklı, çiçekli ve meyvalı dalları ile köklerinden elde edilen özütleri kullanılmaktadır. Bu özütler, mide rahatsızlıklarında (gastrit, ülser), iştah açıcı, sarılıkta, dıştan yaralarda iltihap kurutucu olarak (merhem yapılarak), ayak mantarında, diş eti iltihaplanmasında (gargara yaparak), balgam söktürücü, sinüzitte, barsak iltihabında, basurda, ateşli hastalıklarda ateş düşürücü ve kan yapıcı özellikleri ile geleneksel olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Volz,1997).

Hypericum türlerinde çok sayıda biyolojik aktif kimyasal gruplar tespit edilmiştir. Bunlardan en önemlileri naftodiantronlar (hiperisin, psödohiperisin, protohiperisin v.b.); flavonoidler (kamferol, kersetin, luteolin, hiperin, hiperosid v.b.); floroglusinoller (hiperforin, furohiperforin v.b.) ve uçucu yağlardır. Hiperisin ve hiperforin, *Hypericum*'un gösterdiği klinik etkilerin çoğundan sorumlu olup üzerinde en çok çalışılan bileşenleridir. *H. perforatum*' da çiçeklerin ve yaprakların çevresinde gözle açıkça görülebilen siyah oval noktacıklar *H. perforatum* için karakteristiktir. Bu oval noktacıklar (salgı cepleri), hiperisin toplama ve özel flavonoid moleküllerini içeren kısımlardır (Baytop, 1972, 1999; Kaçar 2004). Hiperisin, *H. perfaratum*'dan elde edilen bilinen en güçlü ışığa duyarlı doğal pigmenttir.

Bu türün anti depresan (Wentworth ve ark., 2000; Oztürk, 1997), anti viral, anti bakteriyal (Meral ve Karabay, 2002; Keleş ve ark. 2001), kanser (Cooper, 2006; Ali ve ark., 2001), yara ve yanıklarda iyileştirici etkileri vardır (Neves ve ark., 2009; Vollmer ve Rosenson, 2004).

Hypericum 'lara bütün bu özellikleri veren hiperisin ve hiperforin birer sekonder metabolittir. Sekonder metabolitler, bitkiler tarafından üretilen, onların yaşamsal fonksiyonları üzerinde primer metabolitler gibi etkileri bulunmayan fakat en az bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili primer metabolitler kadar önemli maddelerdir (Endress 1994).

Geniş biyolojik aktivitelerinden dolayı, çeşitli sekonder metabolitleri içeren bitkiler, yüzyıllardır geleneksel halk ilacı olarak kullanılmakta olup günümüzde de başta ilaç olmak üzere; gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan oldukça önemli kimyasallar olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda bitki sekonder metabolitlerinin ekonomik önemindeki artış, sekonder metabolizma ve özellikle sekonder metabolitlerin hücre ve doku kültürleri ile üretimine büyük bir akademik ve ticari ilginin doğmasına sebep olmuştur.

Bitki biyoteknolojisinin kullandığı temel yöntemlerden biri olan doku kültürü, steril koşullarda yapay bir besi ortamı kullanarak, bütün bir bitki veya bitkinin çeşitli kısımlarından yeni bitki, doku, hücre veya bitkisel ürünlerin elde edilmesine olanak verir. Doku kültürü yöntemleri kullanılarak günümüzde birçok bitkinin hücre, doku ve organ kültürleri yapılabilmektedir. Bu kültürlerde, sekonder metabolit üretimi de gerçekleştirilebilmektedir (Endress 1994). Doku kültürü yöntemleri sekonder metabolitlerin doğal yollardan eldesi sırasında karşılaşılan sorunların aşılması için de önemli bir alternatif sunmaktadır. Doku kültürü yöntemlerinin bu amaçlar için kullanımı çalışmalarında, öncelikle üretici bitki materyalinin bol miktarda eldesi, daha sonra ise metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamalarla (kültür koşullarının optimizasyonu, metabolik yolda genetik değişimler vb.) sekonder metabolitlerin endüstriyel boyutlarda ve düşük maliyetle üretilmesi amaçlanır.

Bitkisel sekonder metabolitlerin üretilmesi için kullanılan önemli bir doku kültürü yöntemi de, hücre süspansiyon kültürleridir. Bu kültür sistemlerinde sekonder metabolit üretimine yönelik optimizasyon çalışmaları, bu metabolitlerin endüstriyel boyutta, standart kalitede, bol miktarda ve sürekli olarak üretilmelerine temel sağlamak için yapılan çalışmalardır.

Hücre süspansiyon kültürleri, uygun sistem sağlanabildiğinde, sekonder metabolit üretiminde son derece etkili bir teknik olarak kullanılabilir. Bu kültürlerde sekonder metabolit üretimini arttırmak amacıyla bazı kimyasal madde uygulamalarının tek ya da birbirleri ile kombine olarak kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde en yaygın olarak kullanılanları ağır metal (bakır, civa, kadmiyum, kurşun vb.), ışık radyasyonu, UV, jasmonik asit, metil jasmonat, ozon ve etilen gibi bitki üzerinde stres oluşturabilme potansiyeli olan uygulamalardır. Nitekim bitkilerin

kendilerini biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı korumak için farklı stratejiler geliştirdikleri bilinmektedir (Commun ve ark.2003).

Çeşitli sekonder metabolitlerin üretim düzeylerinin artırılmasının sağlanmasıyla beraber endüstriyel boyutta üretilmeleri amacına yönelik biyoreaktörlerin tasarlanma çalışmaları başlamıştır (Endress 1994). Bu çalışmalar sonucunda biyoreaktör kullanımının esas amacı olan, kaynak bitkide az miktarda üretilen sekonder metabolitlerin düşük maliyetlerle bol miktarda üretilebilmeleri başarılabilmiştir.

Bu çalışmada, *H. retusum* 'un kallus ve hücre süspansiyon kültürleri oluşturularak bu kültürlerin gelişimi üzerinde pozitif etki gösterecek parametrelerin bulunması amaçlanmıştır. Bunun için oluşturulan kallus ve hücre süspansiyon kültürleri üzerine farklı BBD ve kombinasyonları, farklı şeker ve konsantrasyonları, farklı başlangıç pH değerleri ve farklı ışık uygulamalarının etkileri çalışılmıştır. Aynı şekilde bu ortamların, kültürlerin fenolik madde içerikleri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Çalışmada araştırılan bileşikler hypericumların tıbbi özelliklerinde önemli rol oynayan bileşiklerden olan hiperisin, hiperosid, klorogenik asit, kuersetin psödohiperisin ve rutin'dir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Guttiferae Familyasının Özellikleri ve Yayılışı

Çalı veya otsu bitkilerdir. Temel yağ içeren şeffaf ve hiperisin içeren kırmızı veya siyah renkli bezler bulundururlar. Yapraklar basit, karşılıklı nadiren sarmal şekildedir. Çok yıllık olup, saçak kök sistemine sahiptir. Sepaller 5 tanedir ve reseptakulum üzerinde kiremit şeklinde sıralanmıştır. Petaller 5, ayrı reseptakulum üzerinde bükülüdür. Stamenler demetler halindedir. Ovaryum üst durumlu veya çepersel plasentasyon gösterirler. Tohumlar endospermsizdir (Davis, 1967).

Hypericum türlerinin yeryüzündeki sayısı yaklaşık 400 adet olup Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'da geniş yayılış gösterir. Ülkemizde 84 türü bulunan *Hypericum*, Marmara, Karadeniz, Ege, Orta ve Doğu Anadolu, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde 13 türü bulunmaktadır. Kantaron, kantarum, koyunkıran ve binbirdelik otu adlarıyla da bilinir (Baytop 1984; Baytop, 1999; Kaçar, 2004).

2.2. *Hypericum* Cinsinin Genel Özellikleri

Bu cinsin bitkileri otsu ya da alçak çalimsıdırlar. Yaprakları genellikle karşılıklı veya dairesel dizilişlidir. Yaprak yüzeylerinde yarı saydam ya da siyah benekler bulunur. Çiçekleri biseksüel, aktinomorf simetridir. Ginekeum, 3-5 odalıdır. Stamenler genellikle demetler şeklindedir. Bir petale karşılık, dört stamen demeti bulunur. Sepaller ve petaller beş tanedir. Petaller sarı renkli olup, bazen kırmızı damarlardan dolayı hafif kırmızı renkte görünürler. Nektar içeren çiçeklerin sepalleri ve petalleri çoğunlukla beneklidirler. Stamenler genellikle demetler şeklindedir. Bir petale karşılık, dört stamen demeti bulunur. Nadir olarak steril demetler de görülür. Meyva, kapsül, bakka veya drupa tipindedir. Tohumlar, genellikle çok sayıdadır (Seçmen, 1986).

2.3. Sekonder Metabolitler

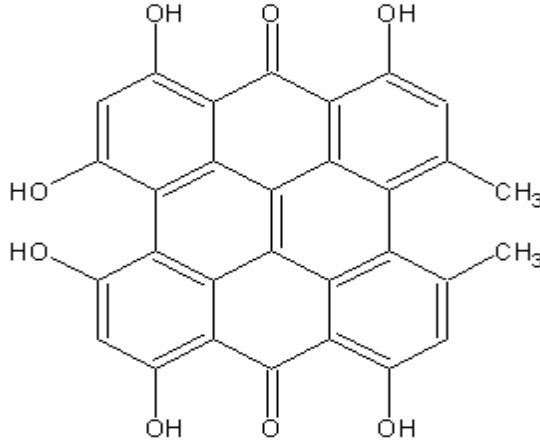
Sekonder metabolitler, bitkilerde kuraklık, tuzluluk, ultraviyole (UV) ışınları gibi farklı stres ortamlarından korunma, mikroorganizmalar ile herbivorlara karşı savunma ve böceklerle tozlanan bitkilerde tozlanma sırasında böcekleri cezbetme gibi birçok önemli olayda görev alan önemli bileşiklerdir. Bu bileşikler bitkilerin yaşamsal fonksiyonları üzerinde primer metabolitler gibi etkileri bulunmayan, buna karşın insanlar açısından ilaç, gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli kimyasallardır (Wink, 1999). Sekonder bileşiklerin çoğu güçlü biyolojik aktivite gösterirler. Bundan dolayı bu bileşikler doğal ilaçlar olarak değerlendirilirler. Sekonder bileşikler birçok maddenin ham ya da öncül formları oldukları için bu bileşikler içeren bitkiler yaygın olarak tedavide kullanılırlar.

Bitkilerin sahip olduğu sekonder metabolitlerin biyosentez yollarının araştırılması, izolasyonları, bugüne kadar izole edilmiş olanların yapılarının aydınlatılması ve bu maddelerin biyolojik aktivitelerinin ortaya konması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sayesinde bitkilerin çeşitli biyolojik aktivitelerinden sorumlu çok geniş bir sekonder metabolit spektrumuna sahip oldukları bulunmuştur. Ayrıca bunlardan yalnızca 100.000 kadarının tanımlandığı ve her yıl bu sayıya 4.000 civarında yeni metabolitin eklendiği ortaya konmuştur (Verpoorte ve ark.1999). Sekonder metabolitlerin antikanser (taksol, vinkristin, vinblastin), kardiovasküler (digitoksin), kardiotonik (digoksin), antibakteriyel (şikoinin), yatıştırıcı (kodein, morfin), antimalarial (artemisin, kinin) etkileri tıpta kullanılmalarına neden olan bazı önemli biyolojik aktivitelere örnek olarak verilebilir. Ayrıca sekonder metabolitler gıda sektöründe renklendirici (antosiyenin, naftokinonlar, betalain, likopen), acılaştırıcı (kinin), koku verici (vanilin), tatlandırıcı (meyan, mirakulin, taumatin) olarak kullanılırlar. Yasemin, gül ve lavanta yağları parfüm ve çeşitli kozmetik ürünlerin yapımında kullanılır. İnsektisit olarak kullanılan piretrin, sinerin, jasmolin ve nikotin tarımda kullanılan bitkisel sekonder metabolitlere ait örneklerdendir (Dicosmo ve Misawa 1995, Kurtney 1998). İlaç sektöründe halen kullanılmakta olan sentetik maddelerin zararlı yan etkileri ve pahalı olmaları, bitkilerden elde edilen doğal sekonder metabolitlere olan ilgiyi giderek artırmıştır (Sökmen ve Gürel 2001).

2.3.1. *Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşenleri ve Biyolojik Aktivitesi

Son yıllarda, farklı biyolojik özelliklere sahip birçok sekonder metabolit içeren *Hypericum* cinsi, bilimsel dikkatleri üzerine çekmektedir (Fornasiero, 2003). *Hypericum* türlerinde en az on farklı madde grubunun biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Bombardelli ve Morazzoni 1995; Blumenthal ve ark.2000; Di Carlo ve ark.2001).

Hypericum türleri içerisinde tıbbi amaçlı kullanımı en yaygın olan *H. perforatum*'dur. Bu bitkinin yapısında çok sayıda biyolojik aktif kimyasal gruplar tespit edilmiştir. Bunlardan en önemlileri naftodiantronlar (hiperisin, psödohiperisin, protohiperisin v.b.); flavonoidler (kamferol, kersetin, luteolin, hiperin, hiperosid v.b.); floroglusinoller (hiperforin, furohiperforin v.b.) ve uçucu yağlardır. Bu bileşikler içinde hiperisin ve hiperforin, *H. perforatum*'un gösterdiği klinik etkilerin çoğundan sorumlu olup üzerinde en çok çalışılan bileşenlerdir. Hiperisin, *H. perforatum*'dan elde edilen ve bilinen en güçlü ışığa duyarlı doğal pigmenttir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1.Hiperisin'in moleküler yapısı

Hypericum türlerinde yer alan bileşiklerin çeşitlilikleri ve miktarları bitkinin türüne, yetişme ortamına, toplanma zamanına, kurutma ve saklama koşullarına göre değişiklik göstermesine rağmen yapılan çalışmalar sonucu bitki özütündeki biyoaktif bileşik oranının % 20 civarında olduğu tespit edilmiştir (Bombardelli ve Morazzoni 1995). *Hypericum* türlerinden izole edilen maddeler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Çizelge 2.1. *Hypericum* türlerinden izole edilen maddeler

Kimyasal Grup	Bulunduğu Kısım	Bileşik
Naftodiantronlar	Çiçek/dallar	Emodin-antranol Hiperisin Psödohiperisin Protohiperisin Protopsödohiperisin Siklopsödohiperisin İzohiperisin
Floroglusinoller	Çiçek/dallar	Hiperforin Adhiperforin Furohiperforin
Flavonoitler Biflavonoitler	Yaprak, çiçek sapı, dallar	Kersetin Hiperozit Kersitrin İsokersitrin Rutin Kemferol Mirsetin Hiperin Luteolin I 3' , II 8'' biapigenin (Amentoflavon) I 3 , II 8'' biapigenin
Proantosiyanidinler	Toprak üstü kısmı, Çiçek/dallar	Prosiyanidin Kateşin Epikateşin polimerleri Lökosiyanidin
Tanenler	Çiçekli topraküstü kısmı	Tannik asit Kateşik tanen
Uçucu Yağlar	Çiçek/yaprak	α-pinen β-pinen Metil-2-oktan n-nonan Metil-2-dekan n-undekan α-terpinol Geraniol Mirsen Limonen Karyofilen Humulen
Ksantonlar	Kök, yaprak, gövde	Kielkorin Noratirol 1,3,6,7 tetrahidroksi ksanton
Aminoasitler	Tüm bitki	GABA Sistein Glutamin Lösin Lizin Ornitin Prolin Treonin
Fenil propanlar	Tüm bitki	Kafeik asit Klorojenik asit p-Kumarik asit Ferulik asit İzoferulik asit Vanillik asit p-Hidroksibenzoik asit Hiperfolin

Diğer bileşikler	Tüm bitki	Organik asitler Peptidler Polisakkaritler Karatenooidler β -Sitosterol Nikotinamid Pektin Doymuş hidrokarbonlar Vitamin A Vitamin C Kolin Alkoller
------------------	-----------	---

Bu türün antidepresan (Wentworth ve ark. 2000; Oztürk 1997), antiviral, antibakteriyel (Meral ve Karabay 2002; Keleş ve ark. 2001), kanser (Coopper 2006; Ali ve ark. 2001), yara ve yanıklarda iyileştirici etkileri vardır (Neves ve ark. 2009; Vollmer ve Rosenson, 2004).

Fenolik bileşikler, antioksidan özellikler taşıyan en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. *Hypericum*'larda bulunan fenolik bileşikler, üstlenmiş oldukları roller nedeniyle son derece büyük önem taşımaktadırlar. Bu bileşiklerin düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oluşumunu engellediği (Frankel 1995), kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin olduğu (Renaud ve ark.1999; Gronbaek ve ark.2000), antikanserojen (Zhao ve ark.1999) ve antimikrobiyal (Toker ve ark. 2006, Baydar ve ark. 2004, Nychas ve ark.2003,) özellikleri ile insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu tespit edilmiştir. Fenolik bileşikler ayrıca nükleik asitlere, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldırarak çeşitli zararlara neden olan serbest radikalleri kendilerine bağlayarak güçlü antioksidan etkiler gösteren bileşiklerdir (Han, 1997; Khalil ve ark. 2007). Fenolik bileşiklerin bazı meyveler ile onlardan elde edilen içeceklerde ve tıbbi bitkilerde fazla miktarlarda buldukları bilinmektedir (Haslam, 1996; Tanaka,1999).

2.3.1.1. *Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşenleri ve Biyolojik Aktivitesi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Kimyasal Bileşenler

Hypericum türleri üzerine, *H. perforatum*'un çeşitli biyolojik aktivite çalışmalarının dışında ayrıca farklı *Hypericum* türleri ile gerçekleştirilmiş pek çok fitokimyasal çalışma da mevcuttur.

Bagdonaite ve ark. (2012) *H. perforatum*'daki biyoaktif bileşiklerin soxhlet özütleme yöntemiyle daha yüksek verimlilik elde edildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca rutin tomurcuklanma aşamasında, kuersitrin, kuersetin, ve 3,8''-biapigenin bileşiklerinin çiçeklenme aşamasında ve hiperosid içeriğinde her iki aşamada aynı oranda olduğunu bulmuşlardır.

Filippini ve ark (2010), farklı gelişim evrelerinin hipericumlardaki kimyasalların değişimi üzerindeki etkisini araştırmak için *H. perforatum*'un üç alt türünü seçmiş, HPLC analizlerinde *H. perforatum*'un alt türlerinin sekonder metabolit içerikleri bakımından diğer alt türlerden daha zengin olduğunu ve bu alt türlerin gelişim evreleri boyunca farklı profil gösterdiğini, ayrıca hiperisinler, hiperforinler ve flavonoidlerin farklı evrelerde pik yaptığını saptamışlardır.

Brezilya'da yetişen 13 *Hypericum* türünün fenolik bileşik içeriklerine bakarak bu bileşiklerin *Hypericum* türlerinin dağılımlarında taksonomik bir özellik olarak kullanılıp kullanılmayacağı üzerine yapılan çalışmada tüm *Hypericum*'larda değişen oranlarda flavonoid, hiperosid, kuersitrin, izokuersitrin, gujaverin, klorojenik asit bulunmasına rağmen rutin ve ksanton bileşiklerini içermedikleri tespit edilmiştir(Nunes ve ark. 2010).

Akgöz (2009), *H. retusum* bitkisinin toprak üstü kısımlarının, petrol eter, hegzan, etilasetat ve metanol özütlerinin antioksidan etkilerini araştırmıştır. Bunun için, antioksidan aktivite; toplam fenolik bileşen miktarı (Folin & Ciocalteu reaktif yöntemi), toplam flavonoid miktarı, DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) radikalini, hidroksi radikalini söndürme, indirgeme gücü ve metal şelatlama aktivitelerini ölçerek belirlemiştir. Çalışma sonucunda, *H. retusum*'un özütlerinin DPPH radikal sisteminde antioksidan aktivite sergilediğini ve diğer bir antioksidan test olarak metal şelatlama aktivitesinde bitki özütlerinin değerinin EDTA'dan düşük olduğunu bulmuştur. Bu

sonuçlara dayanarak, *H. retusum*'un yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Türkiye'den iki *Hypericum* türü *Hypericum scabrum* L. ve *Hypericum bupleuroides* Gris floroglusinol türevi hiperforin, naftodiantronlar hiperisin ve psödohiperisin, fenilpropan klorogenik asit ve flavonoidler rutin, hiperoside, apigenin-7-O-glukozid, kaempferol, kuersitrin, kuersetin ve amentoflavon sekonder metabolit konsantrasyonları HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Araştırılan bütün sekonder metabolitler, hiperforin bulunmayan *H. scabrum* dışında, her iki bitki türünde de bitki dokusuna bağlı olarak çeşitli konsantrasyonlarda bulunmuştur (Ayan ve ark. 2009).

Türkiye'de yetişen bazı *Hypericum* türlerinin (*H. heterophyllum* Vent, *H. hyssopifolium* L., *H. linarioides* Bosse, *H. monbretii* Spach, *H. orientale* L., *H. organifolium* Willd., *H. perforatum* L., *H. scabrum* L., ve *H. triquetrifolium* Turra) yaprak, gövde ve çiçek kısımlarının hiperisin ve psödohiperisin içerikleri HPLC yöntemi ile tespit edilmiş ve hem bitkiler hemde bitki kısımları arasında bu bileşiklerin farklı miktarlarda bulunduğu tesbit edilmiştir (Ayan ve Çırak, 2008).

Türkiye'den iki *hypericum* türü olan *H. perforatum* L. ve *H. organifolium*'un vejetatif dönemde çiçek tomurcukları, çiçekleri, taze meyve ve olgun meyve aşamaları doğadan toplanmış ve kök, yaprak ve üretken dokular disekte edildikten sonra, HPLC metodu kullanılarak kimyasal içerik analizleri yapılmıştır. Her iki türde de psödohiperisin ve hiperforin miktarı tam bitkinin ontogenesis döneminde artış gösterdiği tesbit edilmiştir. Kimyasallar en yüksek seviyelerine tam çiçeklenme döneminde ulaşmıştır (*H. perforatum* L. için; 2.62 mg/g kuru ağırlık (DW) psödohiperisin ve 1.84 mg/g DW hiperforin ve *H. organifolium* için; 0.93 mg/g DW psödohiperisin ve 1.63 mg/g DW hiperforin). *H. organifolium*'da farklı üretken dokular arasında, tamamen kapalı çiçekler en yüksek psödohiperisin (1.18 mg/g DW) ve hiperforin (4.36 mg/g DW) üretirken, *H. perforatum*'da da (7.41 mg/g DW) en yüksek psödohiperisin oranı tamamen kapalı çiçeklerde bulunmuş ve yine bu türün çiçek tomurcukları da en yüksek orandaki hiperforini (7.80 mg/g DW) üretmiştir (Çırak ve ark. 2008).

Kornfeld ve ark.(2007), Ermenistan'da yetişen *H. perforatum*'un HP3 olarak adlandırılan ve hiperisini 6 kat ve HP1 olarak adlandırılan ve psödohiperisini 14 kat

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

fazla üreten iki tohum hattı bulmuşlardır. LM (ışık mikroskobu), SEM (elektron görüntüleme mikroskobisi), ve TEM (elektron iletim mikroskobisi) yöntemleri ile yaptıkları analizlerde, tipik olarak olgunlukta ölü olan iç hücrelerin özünü çevreleyen düzleşmiş hücre tabakalarından oluşan ve yaprakların kenarı boyunca yerleşen hiperisin/psödohiperisin içeren koyu bezelerin varlığını ortaya çıkarmışlardır. HP3 bezelerinin periferel hücrelerinin HP1 bezelerinden daha düzleşmiş olduğunu görmüş ve bunun sonucunda periferel hücrelerin hiperisin/psödohiperisin üretimiyle ilgili olduğunu gösterdiğini bildirmişlerdir.

Eroğlu (2007), Antalya-Alarahan'da endemik bir tür olarak yetişen *Hypericum pamphylicum*'un meyveli ve çiçekli örneklerini hiperisin ve hiperforin miktarı, flavonoidleri, antimikrobiyal ve serbest radikal süpürücü etkileri açısından incelemiştir. Meyveli örneğin % 0,000003, çiçekli örneğin % 0,000016 oranında hiperisin içerdiği saptanmıştır. Meyveli örnekte bulunmadığı belirlenen hiperforinin çiçekli örnekte eser miktarda bulunduğu belirlenmiştir. İncelenen bitki örneklerinin flavonoidler açısından zengin olduğu görülmüştür.

Çırak ve ark. (2007), Türkiye'nin kuzeyindeki *H. perforatum* örnekleri kimyasal ve morfolojik çeşitliliklerini saptamak amacıyla farklı bölgelerinden örnekler toplanmışlardır. Hiperisin, klorogenik asit, rutin, hiperosid, apigenin-7-O-glukozid, kuersitrin ve kuersetin içerikleri ile koyu yaprak bezeleri, yaprak alanı, yaprak uzunluk/ağırlık oranı ve bitki ağırlığını da içeren morfolojik özellikleri bakımından karşılaştırdıklarında, bu popülasyonlarda belirli kimyasal ve morfolojik değişimler olduğunu belirlemişlerdir. Çalışma sonunda hiperisin içerikleri ile, koyu yaprak bezeleri arasında pozitif korelasyon görülürken, yaprak alanı ile negatif korelasyon görülmüş ve araştırılan diğer morfolojik özellikler ile biyoaktif bileşikler arasında herhangi bir ilişki olmadığı tesbit edilmiştir.

Smelcerovic ve ark. (2006), Sırbistan'ın farklı bölgelerinden topladıkları altı farklı *Hypericum* türünü (*H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. linarioides* Bosse, *H. maculatum* Crantz, *H. rumeliacum* Boiss. ve *H. tetrapterum* Fries), sekonder metabolit içerikleri ve genetik profilleri bakımından çalışmışlardır. LC-MS/MS analizleri sonucunda, en yüksek hiperisin ve psödohiperisin içeriklerinin *H. barbatum* ekstraktlarından, en yüksek hiperforin ve kuersitrin içeriğinin *H. tetrapterum*

exstraktlarından ve en yüksek hiperosid içeriğinin *H. maculatum* exstraktlarından elde edilmiştir. Bu türlerin kimyasal içerikleri ile genetik özellikleri arasındaki ilişkiyi göstermek için, bu türlerin genetik profilleri, polimorfik DNA'nın rastgele açıklanması (RAPD) ve tekli sekans tekrar (SSR) profilleri çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda elde edilen veriler, bu altı *hypericum* türü arasında sekonder metabolit içeriklerinin SSR verilerinden çok RAPD verileri ile daha güçlü bir bağlantı gösterdiğini ortaya koymuştur.

H. perforatum'un direkt sonikasyon metoduyla ekstraksiyonu çalışılmış ve bu metodun geleneksel ıslatma, indirekt sonikasyon, soxhlet ekstraksiyonu ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu metodlarıyla karşılaştırılmıştır. Yüksek seçici sıvı kromatografisi/sıralı kütle spektrometresi analizleri, araştırılan altı aktif bileşik (hiperisin, psödohiperisin, hiperosid, rutin, kuersitrin ve hiperforin) içeriklerinin direkt sonikasyon metoduyla elde edilen içeriklerde diğer ekstraksiyon metodlarından belirgin bir şekilde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Direkt sonikasyon kullanıldığında ultrasonik güç 40'tan 60 W'a yükseltildiğinde aktif bileşik içerikleri artmıştır. Geleneksel ıslatma aktif bileşik analizinde en düşük oranı vermiştir. Soxhlet ekstraksiyonu, indirekt sonikasyon ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu metodlarından daha iyi sonuçlar vermiştir (Smelcerovic 2006).

İbova (2006), *Hypericum origanifolium* Willd, *Hypericum montbretii* Spach ve *H. perforatum*'un kurutulmuş çiçek ve yapraklarından farklı polaritede çözücüler kullanarak hazırladığı bitki özütlerinde çeşitli kimyasal ve spektrofotometrik yöntemlerle fenolik madde içeriği ve serbest radikal süpürücü ve antioksidan potansiyellerini değerlendirmiştir. Bu çalışmada, her üç tür için de en yüksek aktivite değerlerini etil asetat özütlerinde tayin etmiştir ve bu türlerin yapraklarının çiçeklere oranla daha fazla fenolik madde içerdiğini, dolayısıyla antioksidan potansiyellerinin daha fazla olduğunu tesbit etmiştir. *H. origanifolium*'un çiçek ve yapraklarının daha fazla fenolik madde içerdiğini ve Ransimat yöntemiyle tayin edilen lipid peroksidasyonunu diğer türlere ve sentetik antioksidan BHT'ye oranla daha fazla inhibe ettiğini tesbit etmiştir. *H. montbretii* ve *H. origanifolium*'un çiçek özütleri b-karoten-linoleik asit sisteminde sentetik antioksidan, bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve *H. perforatum* özütlerinden daha aktif olduğunu bulmuş. Ayrıca *H. montbretii* ve *H.*

perforatum yapraklarının antioksidan potansiyellerinin BHT' den belirgin oranda fazla olduğunu tesbit etmiştir.

H. perforatum'un *in vitro* yetiştirilen sürgünleri hiperisin ve floroglusinollerini sentezleyebilme kabiliyetleri bakımından çalışılmıştır. HPLC analizleri, hiperisin, psödohiperisin ve onların öncülleri protohiperisin ve protopsödohiperisin ile floroglusinoller, hiperforin ve adhiperforinin büyük intra spesifik çeşitlilik ortaya çıkardığını göstermiştir. Total hiperisin ve floroglusinol ile hiperisin/ protohiperisin ve psödohiperisin/ protopsödohiperisin içeriği arasında belirgin bir orantı bulunmuştur. *H. perforatum* sürgünlerinin erken gelişim aşamasında hiperforin ve adhiperforin olduğu ilk kez ortaya konmuştur (Kosuth 2003).

H. perforatum'un superkritik sıvı ekstraktları GC-MS, HPLC-DAD ve HPLC-DAD-MS metoduyla analiz edilmiştir. Genel floroglusinoller hiperforin (36.5±1.1%) ve adhiperforin (4.6±0.1%)'in yanında, özütler genel olarak alkanlar, yağ asitleri ve esterleri içerir. Apolar bileşenler hiperforinin zengin olduğu fazın uç noktasının dayandığı bir fazda toplanmaya meyillidir. Nafthodianthronlar gibi yüksek polariteli bileşenler bulunmamıştır. Bir dizi hiperforin oksidasyon ürünleri tespit edildi ve HPLC-MS kullanılarak belirlenmiştir (Seger ve ark. 2003).

H. triquetrifolium'un topraküstü kısımlarının etilasetatlı ekstresinden bir biflavonoid, bir flavonol-glikozid, bir flavonol ve bir fenolik asit yani; 3-8-biapigenin, kuersetin, rutin ve klorojenik asit elde edilmiştir (Conforti ve ark. 2002).

H. perforatum'un hiperisin içeriğinin geniş yapraklarda kışın minimum hiperisin-psödohiperisin miktarı 100 ppm. iken yazın 3000 ppm, dar yapraklarda ise bu miktar, kış mevsiminde geniş yaprağına yakın bir değerdeyken yaz mevsiminde maksimum yani 5000 ppm kadar olduğu dolayısıyla hiperisin içeriğinin mevsimlere bağlı olarak değişebildiği saptanmıştır (Southwell ve Bourke 2001).

Antidepresan Aktivitesi

Hypericum bitkisi ekstraktları günümüzde, daha çok hafif ve orta şiddetteki depresyon tedavisinde kullanılmaktadır. Ağız yoluyla verilen fotosensitif özellikteki hiperisinin, deri fototoksitesine yol açmadığı ve yapılan çeşitli klinik çalışmalar sonucunda bilinen sentetik antidepresanlar kadar etkili olduğunu göstermektedir (Hışıl ve ark. 2005).

Bu konudaki birçok otorite bu bitkiyi özellikle menapozun oluşturduğu ruhsal bozuklukları önlemek için uygun bir bitki olarak görmektedir. Antidepresan özelliği hayvan deneylerinde ve çeşitli klinik deneylerde de kanıtlanmıştır. Depresyon için etkili olan *Hypericum* özütünün canlıların beynindeki kortiko-limbik bölgesinde düzenleyici bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Müller 2005).

H. perforatum'dan elde edilen farklı dozlardaki alkolik özütleri fareler üzerinde antidepresan etki gösterdiği görülmüş ve bu etkinin *Hypericum*'un özütlerinde bulunan hiperisin ve hiperforin bileşiklerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Mennini ve Gobbi, 2004)

Hypericum özütleri son zamanlarda dünyanın birçok yerinde özellikle de Amerika, Almanya ve diğer Avrupa ülkelerinde antidepresan ilaç olarak, doğal, güvenli ve daha az yan etkiye sahip olduğu için, sentetik antidepresanlara tercih edilmektedir (Butterweck 2003).

Linde ve Mulrow (2003), *H. perforatum*'un yan etkilerinin olmamasından dolayı etanolik özütlerinin depresyon durumlarının hafifletilmesinde ve belirtilerin giderilmesinde diğer antidepresanlara göre daha güvenli bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Antidepresan etki *Hypericum* özütlerinde bulunan hiperisin ve hiperforin bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca hiperisinin anlama ve algılama gücünü arttırdığı, yorgunluk, donukluk ve uyku halini giderdiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Okpanyı ve Weischer 1990, Hubner ve ark. 1994). Antidepresan yönüyle önemli bir etkiye sahip olan bu bileşiğin hiç bir yan etkisinin saptanmamış olması hiperisinin önemini daha da arttırmaktadır (Sommer ve Harrer 1994, Linde ve ark.1996). Dünyanın birçok yerinde *Hypericum* türlerinden elde edilen özütlerin, Hyperiforce (Lenoir ve

ark.1999) ve Jarsin 300 (Franklin ve ark. 1999) adı altında tabletleri hazırlanarak ticari olarak satılmaktadır.

Antimikrobiyal Etkisi

H. perforatum'un eski zamanlardan günümüze kadar kullanım alanlarına bakıldığında antimikrobiyal etkisinin uzun yıllardır bilindiği görülmektedir.

H. perforatum özütünün içerdiği maddelerin antiviral aktivitesi, seksenlerin ikinci yarısından beri kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır.

Yine farklı *Hypericum* türleriyle ilgili bir çalışmada *H. alpinum*, *H. barbatum*, *H.rumeliacum*, *H. maculatum*, *H. perforatum*, *H. hirsutum* uçucu yağlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitesine *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas tolaasii*, *Salmonella enteritidis*, *Candida albicans*'a karşı bakılmıştır. En yüksek aktivite *H.barbatum*'dan elde edilen uçucu yağda görülmüş, *H. alpinum* ve *H. hirsutum*'un *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'a karşı hiç etkisinin olmadığı saptanmıştır (Saroglou ve ark.2007).

Eroğlu (2007), Antalya-Alarahan'da endemik bir tür olarak yetişen *Hipericum pamphylicum*'un meyveli ve çiçekli örneklerini hiperisin ve hiperforin miktarı, flavonoidleri, antimikrobiyel ve serbest radikal süpürücü etkileri açısından incelemiştir. Antimikrobiyal etki tayini sonucuna göre meyveli bitki örneklerinin bazı özütleri *Salmonella thypi*'ye ve *Shigella flexneri*'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Çiçekli bitki örneklerinin neredeyse tüm özütlerinin *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thypi*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*'e karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Aseton özütü haricindeki tüm özütlerin ise *Candida albicans*'a karşı antifungal etki gösterdiğini saptamıştır.

Türkiye'de yapılan iki ayrı çalışmada *Hypericum hyssopifolium* ve *Hypericum lysimachioides*'in uçucu yağlarının 9 farklı mikroorganizma üzerinde çok iyi aktivite gösterdiği fakat *C. albicans* üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur (Toker ve ark 2006).

Dülger ve Gönüz (2005) endemik türlerden *Hypericum kazdagensis*'in aseton, kloroform ve metanol özütlerinin *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesini gentamisinle karşılaştırmışlardır. Bunun sonucunda *H. kazdagensis*'in tüm özütlerinin çok güçlü antibakteriyel etki gösterdiğini, ayrıca *P. aeruginosa* ve *B. subtilis*'e karşı duyarlı olduklarını saptamışlardır.

Vajs ve ark. (2003) tarafından yapılan diğer bir çalışmada *H. perforatum*'dan deoksihiperforin, furohiperforin, furoadhiperforin, furohiperforin A, piranohiperforin gibi hiperforin türevi bileşikler izole edilmiştir. Bu bileşiklerin Gram pozitiflerden *S. aureus*, *B. subtilis* spor formu ile Gram negatiflerden *Escherichia coli* ve mantarlardan *Candida albicans*'a karşı agar difüzyon metodu kullanılarak antibakteriyel aktivitelerine bakılmıştır. Bu bileşiklerin Gram negatiflere ve Gram pozitiflerden *B. subtilis* spor formuna karşı hiçbir bileşik etki göstermediği fakat furohiperforin A bileşiğinin *S. aureus*'a karşı etkili olduğu bulunmuştur. Hiperforin ve furohiperforinin *C. albicans*'a karşı etkili olmadığı görülmüş, ancak metabolitlerinden piranohiperforinin anlamlı, furohiperforin A'nın ise zayıf etki gösterdiği saptanmıştır.

Hypericum rumeliacum'un toprak üstü organlarından GC/MS yöntemi kullanılarak elde edilen bazı uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmış bu bileşiklerin (-pinen ve β -pinen) *in vitro* şartlarda hem bazı negatif hemde bazı pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Couladis ve ark.2003).

H. perforatum'un antimikrobiyal aktiviteye sahip olması farklı *Hypericum* türleri üzerinde de araştırmalar yapılmasına neden olmuştur. *H. brasiliense*, *H. scabrum* L., *H. hircinum*, *H. hookerianum*, *H. canariense*, *H. maculatum*, *H. Mysorensense* ve *H. patulum*'un özütlerine ve bunlardan elde edilen saf bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır. Sonuç olarak ekstrelerin çoğunda aktivite gözlenmiş saf bileşiklerde ise ya çok zayıf aktivite görülmüş ya da hiç görülmemiştir (Mukherjee ve ark.2001; Mukherjee ve ark.2002).

Antioksidan Etkisi

Serbest radikaller bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve diğer moleküllerden elektron koparma eğiliminde olan atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı reaktif yapıya sahip olduklarından biyolojik sistemde lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli unsurlara geri dönüşümsüz zarar verebilirler. Antioksidan özellikteki maddeler peroksit, hidroperoksit veya lipid peroksit gibi serbest radikalleri süpürerek hasara neden olan oksidatif mekanizmayı inhibe ederler. Bu nedenle antioksidan maddeler hastalıklardan korunmada önemli rol üstlenirler. Yapılan araştırmalar antioksidan kullanımının kronik hastalıklara yakalanma olasılığını azalttığını göstermiştir (Buttke ve Sandstrom 1994, Akkuş 1995; Koleva ve ark. 2002).

H. triquetrifolium ve *Hypericum scabroides*'in DPPH, metal şelatlama, indirgeme gücü, OH radikali, lipid peroksidasyon testlerinde antioksidan etkisi olduğu bulunmuştur (Kızıl ve ark.2008).

H. triquetrifolium'un metanol özütlerinde bulunan I3,I18-biapigenin, kuersetin-3-O-galaktozid, kamferol-3-O-glikozid, (y)-epikateşin ve hiperisin bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve IC50 değerinin 0.062 mg/L - 1 mg/L arasında olduğu bulunmuştur (Conforti ve ark.2007).

H. perforatum'un sahip olduğu antioksidan etki nedeniyle demans hastalarında kullanılabileceği, genelde depresyonla birlikte gelişen demans durumu varlığında depresyon tedavisinde de etkili olan *H. perforatum* kullanımının uygun olduğu düşünülmektedir. *H. perforatum* yan etki profilinin düşük olması ve antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle yaşlı hastalarda diğer antidepresanlara karşı iyi bir alternatif oluşturmaktadır (El-Sherbiny ve ark. 2003).

I3,I18-biapigenin, kuersetin-3-O-galactoside, kaempferol-3-O-glikozid, (-) epikateşin ve hiperisin gibi flavonoidlerin, (0,062 ve 1mg/mL arasında) güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca ilk kez *H. triquetrifolium*'un topraküstü kısımlarının metanolik özütlerinin önemli miktarda antioksidan aktiviteye sahip olduğu bunun da içindeki flavonoidler ve özellikle de I3,I18-biapigenin ile ilgili olduğu anlaşılmıştır (Conforti ve ark. 2002).

Yara İyileştirici Etkisi

H. perforatum'un halk arasındaki geleneksel kullanımları içerisinde yara ve yanık tedavisi de yer almaktadır (Schempp ve ark. 2002). Bitkinin taze çiçeklerinin zeytinyağı ile güneş ışığında bekletilmesiyle hazırlanan yağın cilt hastalıklarında topikal olarak kullanıldığı ve bu yağın aktivitesinin içerdiği hiperforinden kaynaklandığı bilinmektedir (Blumenthal ve ark. 2000; Maisenbacher ve Kovar 1992).

Peşin (2007), halk tıbbında pek çok hastalığın tedavisinde kullanımı oldukça yaygın olan *H. perforatum* ve Anadolu' da geniş yayılım gösteren bir başka *Hypericum* türü olan *H. scabrum*'un toprak üstü kısımlarının yara iyileştirici ve antienflamatuar etkilerini çeşitli *in vivo* deney modelleri kullanarak araştırmış. *H. perforatum*' un etanollü özütünün doza bağlı kuvvetli antienflamatuar ve yara iyileştirici etkisi olduğunu tespit etmiştir. *H. scabrum*'un etanollü ekstresinin ise bu yöntemler üzerinde etkisiz olduğunu bulmuştur. *H. perforatum*'un etanollü ekstresinin yara iyileştirici ve antienflamatuar etkisinin yüksek çıkmasına bağlı olarak bu ekstre sıvı ekstraksiyon tekniği ile fraksiyonlanmış ve elde edilen ekstrelerden etil asetat ekstresinin yüksek antienflamatuar ve yara iyileştirici etkisi bulunmuştur. Naftodiantronların yara iyileştirici etkisi, flavonoit bileşenlerinin ise antienflamatuar etkisinin daha kuvvetli olduğu saptanmıştır. *H. perforatum* etanollü özütünün etil asetat fraksiyonu içerisinde bulunan naftodiantron ve flavonoidlerin, birlikte yara iyileştirici etkiyi kuvvetlendirdiğini belirlemiştir.

Schempp ve ark. (2002) atopik dermatitte *H. perforatum* özütünün etkisini araştırmışlardır. % 1.5 hiperforin içeren standardize *H. perforatum* özütüyle hazırlanan kremin plaseboya karşı aktivitesini değerlendirmiş, plaseboya karşı anlamlı bir üstünlük gösterdiğini belirlemişlerdir.

Farklı bir *Hypericum* türüyle *in vivo* olarak yürütülen bir çalışmada *Hypericum patulum* bitkisinin yapraklarından hazırlanan metanol ekstresi % 5 ve % 10 oranlarında taşıyıcı merhem içine alınmış standart bir etken madde olan nitrofurazon içeren merhemle karşılaştırılmıştır. % 10 oranında özüt içeren merhem standart ilaç gibi etkisini 4 günde göstermeye başlayıp 18 gün sonunda tam bir iyileşme sağlarken %5 oranında ekstre içeren merhem etkisini 8 gün içinde göstermeye başlayıp 20 günde yaraların tam olarak iyileşmesini sağlamıştır (Mukherjee ve ark. 2000).

Halk arasında yaygın kullanımı olan *Hypericum* türlerinin yara iyileştirici etkileri yapılan çalışmalarla da onaylanmış görünmektedir.

Antienflamatuar Etkisi (iltihap giderici)

H. perforatum'un antienflamatuar etkisi de vardır. Birçok antienflamatuar ilaçtan farklı olarak mide üzerinde olumsuz etkilerinin bulunmadığı, hatta ülser tedavisinde de etkili olduğu rapor edilmiştir (Ernst 2003).

Enflamasyon, organizmanın zararlı ve yabancı yıkıcı etkilere karşı verdiği, birçok hücre ve mediyatörlerin karıştığı doğal bir savunma mekanizmasıdır. Enflamatuar yanıt, organizmayı korumaya yönelik fizyolojik ve yararlı bir reaksiyon olmasına karşın, bazen enflamasyonun kontrol edilememesi ve başlatan neden ortadan kalktıktan sonra da olayın devam etmesi sürekli bir enflamatuar cevaba ve organizmada hasar meydana gelmesine yol açmaktadır. Enflamatuar reaksiyonlarda, o bölgede salınan mediyatörlerin etkisiyle, kızarıklık, şişlik, ısı artışı, ağrı ve fonksiyonlarda azalma semptomları ortaya çıkmaktadır. Miyoleperoksidaz (MPO) enzimi enflamasyonun oluşmasında ve devamında önemli rol oynar. Çoğu ilacın antienflamatuar aktivitesi MPO'un inhibisyonuna bağlanmaktadır. Bu bilgiye dayanılarak *in vitro* koşullarda *H. perforatum*, *Hypericum empetrifolium* ve *H. triquetrifolium*'a ait metanol özütlerinin MPO üzerine etkisine bakılmıştır. Sonuç olarak bu üç bitkinin antienflamatuar aktivitesinin MPO enzim inhibisyonuyla bağlantılı olduğu saptanmıştır (Pabuçcuoğlu ve ark. 2003).

H. triquetrifolium'un farklı dozlardaki ekstraktları farklı sürelerde ratlara uygulanmış ve bu ekstraktların ratlar üzerinde antienflamatuar etki gösterdiği tespit edilmiştir (Öztürk ve ark; 2002).

Analjezik Etkisi

Ağrı meydana getiren uyarıların beyindeki ilgili merkeze iletimini durduran ajanlara antinosiseptif adı verilir.

Hypericum reflexum ile yapılan daha kapsamlı bir çalışmada bitkinin çiçeklerinin metanol özütü hazırlanmış ve sıçanlar üzerindeki analjezik etkisine bakılmıştır. Merkezi ve periferik analjezik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş olmasına rağmen etki mekanizması çözümlenememiştir (Sánchez ve ark.2006).

İran’da doğal olarak yetişen *H. perforatum*’dan elde edilen metanol ekstresi kullanılarak 3 farklı yöntemle analjezik aktivite tayini yapılmış, sonuç olarak antinosiseptif etki görülmüş ancak etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Morteza ve ark. 2003).

Antikanser Etkisi

Kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak öne sürülen fotodinamik tedavi kanser hücrelerini öldürmek için ilaç ve belirli tipte lazer ışığı kullanılan bir tedavidir. Tedavinin esası kanser hücrelerinin normal hücrelerden daha fazla ilaç biriktirmesine dayanır. İlaç toplardamardan enjekte edildikten sonra ışıkla karşılaşmaya kadar aktif değildir. Kanser hücrelerine lazer ışığı gönderildiğinde ilaç aktive olarak hücreleri öldürür. Kanser hücreleri üzerinde öldürücü etki meydana getiren fotodinamik tedavi sağlıklı dokuda küçük bir hasara yol açar. Tedavinin, bulaşıcı olmaması, yan etkilerinin yok denecek kadar az olması ve uygulanabilirliğinin kolaylığı ile kemoterapi, radyoterapi ve cerrahiye alternatif bir kanser tedavisi yöntemidir. *H. perforatum* özütünde bulunan hiperisinin fotosensibilizan yapıda olması fotodinamik tedavide etkili olabileceğini göstermektedir (Agostinis ve ark.2002).

H. triquetrifolium özütlerinin *in vitro* şartlarda insan monosit hücrelerindeki tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin (IL-6)’nın üretimi üzerindeki baskılayıcı etkisi araştırılmıştır (Saad ve ark.2008).

Hiperisin ile farklı kanser hücreleri modellerinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar olumlu sonuçlar vermiştir. Ovaryum kanseri tedavisinde sıçanlarda yapılan

bir çalışmada etkinliği görülmüş, mesane kanseri tedavisinde yüksek hassasiyet ve spesifiklik gösterdiği belirlenmiştir (Zeisser ve ark.2006).

Martarelli ve ark.(2004), *H. perforatum* özütü içerisindeki hiperisin ve hiperforinin prostat kanseri üzerindeki sitotoksik aktivitesine baktıkları bir çalışmada ise bitki özütünün kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini ve apoptozise neden olduğunu görmüşlerdir.

Vanisree ve Tsay (2004)'ın bildirdiğine göre son yıllarda bitki sekonder metabolitlerinin ekonomik önemindeki artış sekonder metabolizma ve bilhassa sekonder metabolitlerin hücre ve doku kültürleri ile üretimine büyük bir akademik ve ticari ilginin doğmasına sebep olmuştur. Sekonder metabolitlerin *in vitro* teknikler ile üretiminde temel avantaj üretimdeki devamlılık standardizasyondur. Ayrıca, hücre ve doku kültürü teknolojisi hem çevresel stres etmenlerine daha dayanıklı hem de daha yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesine olan katkılarıyla küresel açlık probleminin çözümünde de anahtar faktör olmaya adaydır.

2.4. Doku Kültürleri

Bitkiler tarafından üretilen değerli bileşiklere olan gereksinim her geçen gün artmaktadır. Buna karşılık doğal yollardan elde edilen sekonder metabolitler artan bu gereksinimi karşılamaya yeterli değildir. Bunun nedenleri sekonder metabolitlerin bitkiler tarafından çok az miktarlarda ve belli gelişim evrelerinde üretilmeleri, bitkinin cinsine hatta bazen tek bir türe özgü olmaları, diğer bitkiler tarafından üretilmemeleridir (Rao ve Ravishankar 2002). Ayrıca yeteri kadar metabolitin elde edilebilmesi için fazla sayıda bitkinin doğadan toplanması ve bunun sonucunda bu bitki türlerinin zamanla soylarının tükenmesi tehlikesi bulunmaktadır. Bunun yanında zorlu çevre koşullarında yetişen bitkilerin toplanmasındaki güçlükler ve yüksek maliyetler, metabolit miktarının ve kalitesinin değişen çevresel ve iklimsel koşullara göre farklılık göstermesi, bitkisel sekonder metabolitlerin doğal yollardan elde edilmesindeki diğer olumsuz yönleri oluşturmaktadır (Alfermann ve Petersen 1995, Masanaru 2002).

Birçok alanda olduğu gibi sekonder bitki metabolitlerinin üretilmesi ve bunların sentezlenmesine ait temel bilgilere ulaşılması konularında da, bitki doku kültürleri araştırmacılara büyük olanaklar sunmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark. 1998).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspanسیون veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir.

Bitki doku kültürleri steril koşullarda, bir bitkinin tohumu, yaprağı, hipokotil veya nodal segmenti kullanılarak başlatılabilir. Şu ana kadar *in vitro* kültürleri yapılan çok sayıda bitki türü arasında *Hypericum* türleri önemli bir yere sahiptir.

Sekonder metabolitlerin *in vitro* teknikler ile üretiminde temel avantaj üretimdeki devamlılık standardizasyonudur. Ayrıca, hücre ve doku kültürü teknolojisi hem çevresel stres etmenlerine daha dayanıklı hem de daha yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesine olan katkılarıyla küresel açlık probleminin çözümünde de anahtar faktör olmaya adaydır (Vanisree ve Tsay 2004).

2.4.1. Doku Kültürleriyle Sekonder Metabolit Üretimi ile İlgili Çalışmalar

Savio ve ark.(2012), sıvı ortam kullanarak *in vitro* propagasyonun maliyetini düşürecek bir sistem geliştirmek ve aynı zamanda test edilen sistemlerde sekonder metabolizmayı geliştirmek amacıyla, *H. perforatum*'un *in vitro* da yetiştirilen ve üç sıvı kültür; total daldırma (TI), kısmi daldırma(PI) ve köprü destek (PB) sisteminde yetiştirilen sürgünlerden nodal segmentler elde etmişlerdir. Yarı katı ortamı (3 g/L fitajel TM) , kontrol grubu (SS) olarak kullanmışlardır. Organogenik cevapları araştırarak, fenolik bileşikler, hiperisin ve polifenol oksidazlar (PPO) ve peroksidazların (POX) aktivitelerini hesaplamışlardır. Kültürden 80 gün sonra, adventif sürgün proliferasyonu ve uyarılması, PI ve SS sistemlerinde benzerken (65.3 ve 71.3 sürgün) ,PB sisteminde eksplant başına sürgün en az olduğunu (29.5 sürgün) görmüşlerdir. En uzun sürgünleri, PI ortamından elde etmişlerdir. TI sistemindeki sürgünlerde hiperhidrisite olduğunu, TI ve PB sistemindeki sürgünlerde kahverengileşmeler olduğunu gözlemlemişlerdir. En yüksek fenolik bileşik ve hiperisin konsantrasyonunu PI ve PB sistemlerindeki sürgünlerden 80. günlerde elde etmişlerdir. POX aktivitesi PI de kültüre alınan sürgünlerde 40. günde en yüksekken, PPO kültürün 80.gününde biraz daha aktif olduğunu bulmuşlardır. Benzer şekilde POX sürgün gelişimi ile daha bağlantılıyken, PPO ortam stresi ve kültür şartlarına cevapta daha geç rol oynadığını bildirmişlerdir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Rainha ve ark. (2012), *H. undulatum* 'un sürgün kültürleri ve doğadan toplanan bitkilerinin su ekstraktlarının fenolik bileşimini, LC–UV ve LC–MS analizlerini kullanarak çalışmışlardır. Total fenolik içerikleri Folin–Ciocalteu metoduyla belirlenmiş ve antioksidan aktivitesi, her bir örnek için de çalışılan iki tamamlayıcı metod kullanılarak ölçülmüştür. Kütle spektrometresi, kuinik asit parçaları, flavonoller, çoğunluklu kuersetin, luteolin ve apigenin glikozides, flavan-3-oller (kateşin ve epikateşin) ve ksantonoid mangiferin ile çeşitli fenolik asitleri ortaya çıkarmıştır. Örnekler arasında fenolik bileşik profili ve TPC’de farklılıklar bulunmuştur. *H. undulatum*’un kültürde yetişen örneklerinde büyük fenolikler, klorojenik asit; epikateşin, kuersitrin ve izokuersitrin ile takip edildiğini bulmuşlardır. Doğadan toplanan örneklerinde ana bileşik olarak hiperosid bulunduğunu ve klorojenik asit, kuersitrin ve izokuersitrin ile takip edildiğini belirlemişlerdir. TPC ve antioksidan aktivitenin doğadan toplanan örneklerde daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Franklin ve Dias (2011), klorojenik asit (CGA)’in, sürgün, kök ve kök tüylerinin gelişiminde potansiyel bir role sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada önce, tekli hücre ve bütünlüğü bozulmamış bir bitki arasında bütün *in vitro* morfolojik aşamalarda köprü olabilen *H. perforatum* için etkili ve yeni ince hücre hattı (TCL) regenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Farklı morfogenez aşamalarındaki dokular, onların CGA üretiminin başlangıcına eşlik eden *H. perforatum*’un kallus dokularından sürgünlerin farklılaştığını ortaya çıkaran fenolik profilleri için analiz edilmiştir. CGA’ın çeşitli konsantrasyonlarıyla artırılan ortamlardaki yüksek derece organojenik kök eksplantları kültüre alınarak CGA’ın organogenesisinde varlığı ortaya çıkarılmıştır. Sonuçları, CGA 10.0 mg/L’den daha düşük konsantrasyonlarının sürgün organogenesisini etkilemediğini, fakat daha yüksek konsantrasyonlarının uygulamaya bağlı bir konsantrasyonda bu işlemi belirgin bir şekilde azalttığını göstermiştir. CGA, lateral kökler ve kök tüylerinin üretiminde herhangi bir etki göstermemiştir, fakat NAA varlığında, CGA lateral kökler ve kök tüylerinin üretiminde konsantrasyona bağlı pozitif bir orantı göstermiştir. Kültür ortamı, bir fenilalanin amonyum liyaz inhibitörü, 2-aminoindan-2-fosfonik asit (AIP) ile artırıldığında, eksplantlardan, sürgünlerin lateral kökler ve kök tüylerinin uyarılması belirgin bir şekilde etkilenmiştir. Ayrıca bu organojenik kültürlerin tümünde CGA’ın optimum konsantrasyonları kısmi olarak yeniden düzenlenmiştir.

H. maculatum bitkisinin nodal segmentleri, 0.5 mg/L 2iP + 0.2 mg/L BAP + 0.1 mg/L K + 0.05 mg/L NAA içeren MS besi ortamında kültüre alınarak sürgün oluşturulmuş ve elde edilen bitkiler 0.5 mg/L GA₃ ve 1 mg/L IAA içeren MS ortamında köklendirilerek toprağa aktarılmışlardır (Bacila ve ark. 2010).

H. retusum'un *in vitro* teknikler yoluyla çoklu sürgünlerini üretmek amacıyla, hormonsuz ortamda çimlendirmeye elde edilen bitkicikleri, sürgün başlatılmasını teşvik etmek amacıyla BAP ve KİN hormonlarının 6 farklı konsantrasyonlarının bulunduğu MS besiyeri ortamlarında kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün miktarı 0.5 mg/L BAP (64.25 sürgün/eksplant) ortamından elde edilirken, KİN'de en iyi ortam 1.5 mg/L KİN (27.87 sürgün/eksplant) olarak bulunmuştur. Bunun dışında sürgünler, BAP (0.5 mg/L) ve KİN (1.5 mg/L) hormonları, oksinlerle (0.25 mg/L IAA, IBA, NAA) kombine edilerek 6 farklı ortamda denenmiştir. Sürgün sayısı ve uzunluğu göz önüne alındığında en iyi ortamın 0.5 mg/L BAP + 0.25 mg/L IBA (54.12 sürgün/eksplant, 3.36 sürgün uzunluğu) olduğu bulunmuştur. Sürgün gelişimi için en iyi ortamın BAP'ın yalnız kullanıldığı ortamlar olduğu sonucuna varılmıştır (Namlı ve ark.2010).

Farklı konsantrasyonlardaki azot kaynağının (NH₄⁺; NO₃⁻) *H. perforatum*'un adventif kök kültürlerinde sekonder metabolit ve biyokütle toplanmasındaki etkileri araştırmak için, yarı güçlendirilmiş Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında, B5 vitaminleri, 1.0 mg/L IBA, 0.1 mg/L KİN, 3 % (w/v) sukroz, ve amonyum ve nitratın farklı oranları (0:30, 5:25, 10:20, 15:15, 20:10, 25:5, ve 30:0 mM, NH₄Cl ve KNO₃ kullanılarak) ilave edilerek hazırlanan ve karanlıkta geliştirilen kültürlerde; 5:25 (mM) oranında NH₄⁺/NO₃⁻ eklene ortamın total fenol ve flavonoid bileşikleri ve biyokütle artışı için uygun oran olduğu bulunmuş. Metanolik ekstraktların antioksidant potansiyelleri 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil ve 2, 2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal yakalama kapasitesi olarak ölçülmüş. *H. perforatum*'un adventif köklerinin, NO₃⁻ azotun (15, 20, ve 25 mM) yüksek konsantrasyonlarında gelişen köklerden daha yüksek antioksidant aktivite gösterdiğini, kök ekstraktlarının hidrojen peroksit (H₂O₂) ve malondialdehit değerlendirilmesi, NO₃⁻ azotun daha yüksek seviyelerinin (15, 20, ve 25 mM) eklendiği kültürlerde, adventif köklerdeki sekonder metabolit içeriğini artıran oksidatif stres altında olduğunu ortaya çıkarmıştır. Adventif köklerde biyokütle artışı için MS ortamına eklenmesi gereken en iyi azot oranının 5:25 olduğu ortaya konmuştur (Cui ve ark.2010).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Danova ve ark. (2010), Balkan endemik türü olan *Hypericum rumeliacum*'da 2,4-D, NAA, BAP ve BAP ile NAA'in kombinasyonları ile bu bitki büyüme düzenleyicilerinin morforegulator etkilerini ayrıca fenolik ve flavonoid bileşiklerinin üretimi üzerindeki etkilerini, Murashige – Skoog'un besi ortamında; yaprak laminası, gövde internod segmentleri, gövde nodları ve kök parçalarını kullanarak çalışmışlardır. Primer eksplantlardan rejeneren olan yapıların histolojik analizleri, embrioid ve meristemoidlerin her ikisinin varlığını kanıtlamıştır. Meristemoidler içerisinde regenerasyon için en uygun olanları, BAP ilaveli ortamlarda kültüre alınan nod eksplantları olmuştur. Bunun yanında çift aşamalı kültür yaklaşımı, gelişmiş olan kültürün biyosentetik kapasitesinin kültürün devamlılığı ile birlikte, *in vitro* bitki sürgünlerinin büyük miktarının etkili bir şekilde çoğalmasına izin vermiştir. Sitokin kullanılmayan MS ortamında uyarılmış çoklu sürgünlerin alt kültürleriyle devam ettirilen, 0.2 mg/L BAP ilaveli MS ortamındaki sürgün kültürü stoğunun kullanılarak türetilen üç nodal gövde eksplantının bir alt kültürü oluşturulmuştur. Total flavonoid ve fenoliklerin belirlenmesi bu sekonder metabolit seviyelerinin azalmasının geçişi, bunların total içeriklerinin bir artışıyla sonuçlanan ortamdan BAP'ın çıkarılması olduğunu göstermiştir.

H. triquetrifolium'un kotiledonları 0.5 mg/L IAA ve 2 mg/L BAP içeren yarıkatı MS besi ortamında kültüre alınarak kallus oluşturulmuş ve kültürün ilerleyen günlerinde elde edilen embriyojenik kallusların hiperisin oranları 48 µM /g olarak bulunmuştur. Seraya aktarılan bitkilerde en yüksek hayatta kalma oranı (% 94) kumperlit-turba (1:1:1 v:v:v), karışım oranında yetiştirilen bitkilerde sınırlandırıldığı görülmüştür (Oluk ve ark.2010).

Karakaş ve ark.(2009), *in vitro* da BAP (0.5, 1.0 and 2.0), % 3 sukroz ve % 5.5 agar içeren MS besi ortamında kültüre aldıkları *H. triquetrifolium*'un tohumlarının çimlenmesiyle elde ettikleri sürgünleri, farklı BAP (0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L) konsantrasyonlarının bulunduğu MS ortamlarında kültüre alarak BAP'in farklı konsantrasyonlarının sürgün sayısı ve hiperisin toplanması üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda, en yüksek sürgün sayısını 2.0 mg/L BAP ilaveli ortamdan ve en yüksek hiperisin oranını da 1.0 mg/L BAP ilaveli ortamdan elde etmişlerdir.

Kaz Dağları'ndan toplanan *H. triquetrifolium* bitkilerinin 1.25 mg/L TDZ ve 0.5 mg/L IAA içeren MS ortamında sürgün oluşumu, 1 mg/L IAA eklenen ortamda da kök oluşumu sağlanarak bu bitkiler sera ortamına alıştırılmışlardır (Oluk ve Orhan 2009).

H. perforatum var. *angustifolium*' un farklı *in vitro* sistemlerde ksanton ve antosiyanin üretimini araştırmak için yapılan çalışmada, farklı gelişim aşamalarındaki farklılaşmamış kalluslar ve rejenere sürgünler, antosiyanin belirlenmesi ve miktar tayinini yapabilen bir ekstraksiyon ve analitik prosedür ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada *H. perforatum*' un sürgün başlangıcı ve ileriki gelişim aşamalarında hiperisin ve antosiyaninlerin birlikte varlığı gösterilmiştir. Ayrıca farklılaşmamış kalluslarda ksantonların yüksek miktarda üretildiği de bulunmuştur (Mulinacci ve ark. 2008).

Liu ve ark. (2007), BAP, ZT ve TDZ'un bitki gelişimi ve hiperisinler (psödohiperisin ve hiperisin) ve hiperforin üzerindeki etkilerini araştırmışlar. *H. perforatum*'un modifiye edilmiş MS ortamlarına % 50 azaltılmış amonyum nitrat ve potasyum nitrat ve BAP (0.44 μ M) ve IBA (0.049 μ M) eklenmesi, hiperisinlerin üretiminde artışa neden olmuştur. Benzer sonuçlar *H. sampsonii*'nin besi ortamındaki çok küçük değişikliklerle (0.46 μ M ZT ve 0.049 μ M IBA) de elde edilmiştir. *H. perforatum*'da ortama TDZ (0.45 μ M) ilavesiyle psödohiperisin ve hiperisin üretiminde kontrole oranla yaklaşık 2.95 - 2.62 kat artış olmuştur. *H. sampsonii*'de TDZ ilavesi psödohiperisin ve hiperisin üretiminde bir değişiklik yapmamıştır. Bu türlerin sürgünlerinde elisitörler metil jasmonat (MJA, 50 μ M) ve onun analogu 2,3-dihidroksipropil jasmonat (DHPJA, 50 μ M) ilavesi de denenmiş, MJA uygulanan kültürlerde yaprak senesensi ve biyokütle inhibisyonu gözlenirken, DHPJA uygulamasının herhangi bir etki yapmadığı gözlenmiştir.

H. perforatum'un yaprak kısımları farklı konsantrasyonlarda hazırlanan oksin ve sitokinin eklenmiş MS ortamına aktarılarak *in vitro* şartlarda kültüre alınarak sürgün oluşumu sağlanmış, elde edilen sürgün kısımları IAA içeren ortamlarda başarılı bir şekilde köklendirilmiştir (Wojcik ve Podstolski 2007).

Charchoglyan ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, *H. perforatum* sürgün kültüründe hiperforin'in polifreniletid aşilfloroglisinol grubundan üç türevini bulmuşlardır. Bu bileşiklerin birikimi seko-hiperforinlerin oluşumu için morfogjenik kültürlerin önemli bir özelliğidir. Seko-hiperforinin yapısı LC-DAD, -MS ve -NMR ile

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

doğrudan açıklanmıştır. Çoklu sürgün kültürlerinde, hiperforinden seko-hiperforin oluşumu fitohormon olan BAP ve NAA'ten güçlü bir şekilde etkilendiği, BAP'ın artan oranlarının hiperforin düzeyini uyardığı ve NAA'in düzeyindeki artışın ise seko-hiperforin düzeyini artırdığı saptanmıştır.

Çırak (2006), *H. perforatum* ve *H. bupleuroides* türlerinde, steril fidelerden sağlanan sap eksplantlarından kallus gelişimi için BAP (1, 2.5 ve 5 mg/L), 2,4-D ve KİN (0.5, 1 ve 1.5 mg/L) ile desteklenmiş MS ortamlarında kültüre almış ve denenen tüm ortamlarda her iki türde de kallus oluşumunu gözlemiştir. Oluşan kalluslar *H. perforatum* için 1 mg/L BAP, *H. bupleuroides* için ise 2 mg/L BAP ile desteklenmiş MS besi ortamlarında alt kültüre alındıklarında yoğun bir sürgün gelişimi sergilemişlerdir. Kallus gelişim ortamında kullanılan hormonların kallus başına sürgün sayısına etkilerinin $P<0.01$ düzeyinde önemli olmuştur. *H. bupleuroides* sürgünleri hormon içermeyen temel MS ortamında köklendirebilmişler ve bu bitkinin kallus geliştirilmesinde kullanılan hormonların *in vitro* *H. bupleuroides* bitkiciklerinin hiperisin ve toplam fenolik oranları ile sürgün yaş ve kuru ağırlıkları üzerine bir etkileri olmadığını bulmuştur. Kök gelişimini tamamlayan bu bitkiler dış şartlara kolaylıkla uyum sağlamıştır. *H. perforatum* sürgünlerini ise kök gelişimini teşvik etmek üzere 1 mg/L IAA'in yanı sıra JA (0.1, 0.15 ve 0.2 mg/L) ve mannan (0.05, 0.1 ve 0.15 mg/L) elisitörleri ile desteklenmiş MS ortamlarına transfer etmiş, hormon ve elisitör uygulamalarının köklenme üzerine etkilerinin önemsiz olduğunu gözlemiştir. Bu ortamlarda köklendirilen bitkicikler saksılara alınarak 3 ay boyunca sera şartlarında yetiştirilmişlerdir. Hormon ve elisitör uygulamalarının *in vitro* ve *ex vitro* bitkiciklerin toplam fenolik oranlarına etkileri önemsiz olmuştur. Elisitör uygulamaları *in vitro* bitkiciklerde yaş ve kuru ağırlığı önemli seviyede düşürürken ($P<0.01$), *in vivo* bitkiciklerin yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkilerinin önemsiz olduğu belirlenmiştir.

H. perforatum'un hipokotil kısımları 5 $\mu\text{mol/L}$ TDZ içeren MS ortamında kültüre alınarak sürgün oluşumu sağlanmış ayrıca hipokotil kısımları üzerine BAP ve IAA'nın etkili olmadığı bulunmuştur (Murch ve ark 2006).

In vitro şartlarda *Hypericum* ile yapılan bir çalışmada, yaprak diskleri ve gövde segmentleri KİN, 2,4-D (0.5, 1 ve 1.5 mg /L) ve sukroz (30, 40 ve 50 g/L) içeren Murashige ve Skoog ortamlarında, karanlık şartlarda ve 26 ± 2 °C de sekiz hafta

boyunca kültüre alınmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri içeren bütün ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Ancak, kallus oluşum sıklığı bakımından en yüksek değerler 30 g/L sukroz, 0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN içeren MS ortamından elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar sürgün oluşumu için 1 mg/L BAP; kök oluşumu için ise 1 mg/L IAA içeren MS ortamlarında alt kültüre alınmışlardır. Kallus başına sürgün sayısı ve hiperisin içeriği bu sürgünlerde araştırılmış, yaprak disklerinden gelişen kallusların oluşturduğu rejenerantlarda bu değerler daha yüksek olup sırasıyla 19 sürgün/kallus ve % 0.048 olarak tespit edilmiştir (Ayan ve ark., 2005).

Hypericum'un *in vitro* kültürlerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin hiperisin ve psödohiperisin içeriği üzerine etkilerini bulmak için yaptığı çalışmada, naftadiantronların miktar tayinleri için HPLC kullanılmış ve sonuçlar ESI-MS ile doğrulanmıştır. BAP ilaveli katı MS/B5 ortamında yetiştirilen sürgünlerden bitkiler çoğaltılmış ve kalluslar geliştirilmiştir. Sürgünlerin regeneratif potansiyelleri oksin, IAA veya IBA eklenmiş ortamlarda araştırılmıştır. *H. perforatum*'un kallus sürgün ve bitkileri hiperisin ve psödohiperisin üretmişlerdir. Kallus kültürlerinde BAP hiperisin içeriklerini değiştirmemiştir. *Hypericum* bitkileri oksin (IAA ve IBA) varlığında hiperisin ve psödohiperisin üretmişlerdir. Bitkilerde IAA varlığı naftadiantronların üretimini etkilememiş fakat IBA hiperisin ve psödohiperisin miktarını azaltmıştır. *In vitro* kültürlerinde besi ortamlarına fitohormonal ilaveler spesifik naftadiantronların birikimini etkilemektedir. *Hypericum*'un *in vitro* kültürleri hiperisin ve psödohiperisin üretimi için gelecek vaad eden sistemlerdir. (Gadzovska ve ark., 2005).

Bais ve ark. (2002)'nin rapor etiklerine göre son yıllarda *H. perforatum*'un kullanımı, yaprak ve çiçeklerinde bulunan hiperisinin farmakolojik özelliklerinden dolayı artmıştır. Adı geçen araştırmacılar hiperisinin geniş çapta üretimini mümkün kılmak amacıyla bu bitkinin *in vitro* şartlarda üretimi ve yetiştirilmesi için yeni bir hücre kültür sistemi geliştirmişlerdir. 2,4-D ve KİN ile modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilen yaprak eksplantları, denemede kullanılan diğer ortamlarla karşılaştırıldığında en yüksek kallus oluşum oranını vermişlerdir. Hiperisinin hücre fazında ve yapraklardaki lokalizasyonu çeşitlilik göstermiştir. Bu madde hücre içerisinde özel organellerde ve yapraklarda ise vakuollerde birikim göstermiştir. Ayrıca ışık ve karanlık şartlar da büyüme ve hiperisin üretimi üzerine etkili olmuştur.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sekonder metabolit elde etmek amacıyla kullanılan yöntemlerden birisi de kallus kültürleridir. Kallus kültürleri, katı (agarlı) besi ortamında elde edilen farklılaşmamış hücre topluluklarıdır. Kallusta bulunan sekonder metabolit içeriğini değiştirmek için çeşitli uygulamalar yapılmıştır. Bunlardan biri, kalluslara farklı hormon tipi ve konsantrasyonlarının uygulanmasıdır.

Legha ve ark. (2012), *Calendula officinalis L.*'nin çiçek eksplantlarından 2.0 mg/L 2,4-D ilaveli Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında ve tamamen karanlık şartlar altında en iyi kallusları elde etmiştir. Sukroz konsantrasyonunun artırılmasıyla karotenoid pigmentlerinin uyarımı belirgin bir şekilde artırılmıştır. Düşük sukroz konsantrasyonları, pigment üretiminin başlatılmasını ertelettiği ve karotenoid pigmentlerinin üretim seviyelerini azalttığı görülmüştür. En yüksek karotenoid pigmentleri miktarı amonyum nitrojensiz besi ortamındaki kalluslardan elde edilmiş. Yarı katı ortamdaki kalluslardaki karotenoid pigmentleri miktarı sıvı ortamda gelişenlerden daha düşük çıkmıştır. *In vitro* ortamdaki karotenoid miktarı amonyum nitrojenin nitrat nitrojene değişimi ve ortamdaki sukroz konsantrasyonlarındaki gelişimlerle optimize edilmiştir.

Pasqua ve ark. (2008), *H. perforatum var. angustifolium* Borkh'un yapraklarından türetilen kalluslardan somatik embriyogenesis ve sürgün rejenerasyonunu uyararak, morfojenik programlarla, somatik embriyogenesis ve sürgün rejenerasyonu ile iyi şekillenmiş bitkicikler elde etmişler ve bu bitkicikleri kullanarak 5.8 mM 2,4-D, 1.34 mM NAA ve 1.16 mM KİN ilaveli sıvı MS ve B5 besi ortamlarında proembriyonik kütleler elde etmişlerdir. Daha sonra bunları hormonsuz ortama transfer etmişler ve bunların beyazımsı ve yuvarlak yapılar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, 2 mM IBA ile birleştirilmiş farklı konsantrasyonlarda (3, 6, 9, 12 mM) TDZ içeren agarlı MS ortamında sadece sürgün regenerasyonu ve somatik olmayan embriyogenesis elde edildiğini ve 3 mM TDZ konsantrasyonunda sürgün sayısında belirgin bir artış olduğunu da gözlemlemişlerdir.

Kirakosyan ve ark. (2000), *H. perforatum* stamenlerinden geliştirilen hücre süspansiyon kültürleri ve kallus dokularında morfogenez, rejenerasyon ve hiperisin sentezini incelemişlerdir. İlk kalluslar, MS'e ilaveten BAP ve NAA'nın yanı sıra makro ve mikro besinleri ihtiva eden agar ortamından elde edilmişlerdir. Hiperisin ve

psödohiperisin içerikleri, rejenerasyonun ve morfogenezinin farklı aşamalarında ölçülmüştür. Bu iki bileşen aseton ve metanol ile saflaştırılmıştır. Normal yapraklara göre oldukça büyük olan farklılaşmış yapraklarda toplam hiperisin ve psödohiperisin içeriği ile birlikte yeni gelişmekte olan rejenere yapraklarda multiple hücreler arası yapıların ve hiperisin depolarının gelişmekte olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak farklılaşmış hücre yapılarındaki toplam hiperisin ve psödohiperisin içeriğinin hücrelerin farklılaşma derecesi ile ilgili olduğunu ve en yüksek değerlerine yaprak morfogenezisi boyunca ulaştıklarını bildirmişlerdir.

Sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla yapılan uygulamalardan en sık rastlanılanı sukroz uygulaması olup; Sakuta ve ark. (1986) ve İlker (1987) kültür ortamında sukrozla artan osmotik basıncın, antosiyaninler ve betasiyaninler gibi bazı sekonder metabolitleri artırdığını belirtmişlerdir. Kültür başlangıcında yeşil olan dokuların yeşil pigmentlerini zamanla kaybettiği ve bu doku yeşilliğinin dışarıdan verilen bir karbon kaynağına bağlı olduğu bilinmektedir. Yani, kültür ortamına kullanılabilir bir karbon kaynağının eklenmesi gereklidir. En genel kullanılan karbon kaynağı % 2-5 konsantrasyonunda sukrozdur. Sukroz kültür ortamında çeşitli metabolik aktiviteler için gereklidir. Glukoz ve fruktozunda bazı dokuların iyi gelişimi için destek olduğu bilinmektedir. Şekerler ayrıca ortamın büyük osmotik komponentleridir.

Ortamda artan sukroz konsantrasyonunun antosiyanin birikimini teşvik ettiği daha önce bu alanda çalışmalar yapmış olan Ozeki ve Komamine (1985), Nozue ve ark. (1987) ve Cormier ve ark. (1990) tarafından da ifade edilmiştir. Bununla birlikte sukrozun dışında glukoz ve mannitolün (Tholakalabavi ve ark. 1994) de kullanıldığı bilinmektedir.

Motallebi ve ark. (2011), hidrolize kazein (0.0 ve 500 mg/L), mannitol (0.0,5 ve 10 g/L) ve sukroz (20 ve 30 g/L)'un sürgün uyarımı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *In vitro* bitkiciklerin yaprak diskleri, sürgün uyarımını sağlamak için 0.5 mg/L BAP ilaveli MS ortamında kültüre alınmışlar. Bütün kültürler karanlıkta 25±°C de 1 ay boyunca kültüre alınmışlardır. Bütün uygulamalarda kallus ve sürgün uyarımı gözlenmiştir. Kallus çapı ve sürgün sayısı mannitol ve sukroz konsantrasyonlarından ve bunların etkileşiminden belirgin bir şekilde etkilenmiştir. En yüksek kallus çapı 5 g/L mannitol ve 20 g/L sukroz ilaveli besi ortamından elde edilmiştir. En yüksek sürgün

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

sayısı 20 veya 30 g/L sukroz ve 5 veya 10 g/L mannitol ilaveli ortamdan elde edilmiştir. Sürgün topluluklarının taze ağırlıkları mannitol, sukroz ve hidrolize kazein konsantrasyonları değişiminden belirgin bir şekilde etkilenmiştir. En yüksek taze ağırlığı 20 g/L ve 0.0 g/L mannitol ilaveli ortamdan elde edilmiştir.

Gopitha ve ark. (2010), şeker kamışında, kallus oluşumu ve sürgün ve kök proliferasyonunda 2,4-D, oksin, sitokinin sukroz ve farklı pH seviyelerinin etkilerini saptamak için yaptıkları çalışmada en iyi kallus uyarımını 3.0 mg/L, 2,4-D ve % 10 hindistan cevizi sütü ortamında, en iyi sürgün rejenerasyonu 1.0 mg/L BAP ve 0.5 mg/L IBA ilaveli MS ortamında elde etmiş, kök proliferasyonu için en iyi ortamın 3 mg/L NAA ve 5 % sukroz ilaveli ortamdan elde etmişlerdir.

Işık bitki büyümesi ve gelişimi yanında primer ve sekonder bileşiklerin biyosentezinde de düzenleyici rol oynayan faktörlerdendir (Kurata ve ark., 1997; Zhong ve ark.,1991). Bitkilerdeki tıbbi bileşiklerin sentezi ışık yoğunluğundan bitkideki morfolojik ve fizyolojik karakterlerle etkilenmektedir (Kurata ve ark, .1997; Jaafar ve Rahmat. 2008; Briskin ve Gawienowski, 2001). Briskin ve ark., (2001), *H. Perforatum* 'un yüksek ışık yoğunluğu ($400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) altında geliştiğinde hiperisin sentezinin belirgin bir şekilde arttığını bildirmişlerdir.

Yüksek ışık yoğunluğu altında gelişen yüksek fotosentetik oranın yaprak dokularında sekonder metabolit artışı ve karbon asimilasyon miktarında artışla sonuçlandığı düşünülmektedir. Fenolik biyosentezi ışığa veya ışık tarafından geliştirilmeye ihtiyaç duyar fakat flavonoid oluşumu kesinlikle ışığa bağlıdır ve onun biyosentetik oranı ışık şiddeti ve yoğunluğuna bağlıdır (Xie ve Wang, 2006). Daha önceki çalışmalar ışık şiddetindeki değişimlerin bitkilerdeki total fenollerin ve flavonoidlerin üretimini değiştirebildiğini göstermiştir (Graham, 1998). Michel ve ark. (2001), total fenollerin üretiminin bitki pigmentleri (klorofil ve karotenoid) ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Flavonoidlerin aksine ksantofil döngüsünün, ışık şiddetindeki ani artışlara karşı fotosentezin korunması ile ilgili olduğu görülmüştür.

Farklı ışık şiddeti ve yoğunluklarının kullanımı kalluslarda sekonder metabolit içeriğinin değişimi üzerindeki etkilerinin araştırılması için kullanılan uygulamalardandır. Işık varlığında IAA-oksidadın aktivitesinin artarak sitokinin ve

oksin arasındaki iç dengeyi değiştirmekte ve kallus büyümesini azaltmaktadır (Gaspar ve ark., 1982).

H. perforatum için yapraklardaki hiperisin seviyelerine ışık yoğunluğu ve kök azot gereksinimlerinin etkileri kumlu kültürde yapay ışık kullanılarak araştırılmıştır. *H.perforatum*'un $106 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dan $402 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ye doğru artan ışık yoğunluklarıyla aydınlatılmasının yaprak hiperisinlerinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Yaprak diseksiyonu metodu kullanılarak, yapraklardaki koyu bezelerle hiperisinler arasında ilişki olduğu ve ışık yoğunluğunun artışıyla yapraklardaki koyu beze sayısının bir paralellik gösterdiği bulunmuştur. Yani yaprak koyu salgı bezleri ile hiperisin miktarı arasında doğrusal bir orantı bulunmaktadır. Azot alımındaki azalma, yaprak hiperisinlerinde artışla sonuçlanırken, test edilen azot seviyeleri üzerinde düzensiz bir hareket meydana gelmiş ve yaprak hiperisinleri üzerinde belli bir etkisi görülmemiştir. Işık yoğunluğunun artırılması ve nitrojen alımının azaltılmasının, yaprak hiperisinleri üzerinde geliştirici etkisi olduğu bulunmuş ve bu çevresel parametrelerin, fitokimyasalların üretimini etkilediği süreçler ve bölgelerdeki farklılıkları yansıttığı bildirilmiştir (Briskin ve Gawienowski, 2001).

Pretto ve Santarem (2000), *H. perforatum*'un yaprak eksplantlarını, kallus oluşumunu başlatmak için, 2,4-D (0.45 veya 4.5 μM) ve BAP (0.44 veya 4.4 μM) veya KİN (0.46 veya 4.6 μM) ilave edilen MS ortamında, karanlık ve ışık şartları altında kültüre almış, çalışılan bütün ortamlarda kallus oluştuğunu ve en yüksek hücre proliferasyonunun 4.4 μM BAP ve 4.5 μM 2,4-D ilave edilen karanlık ortamdan elde edildiğini bulmuşlardır. Kallus oluşturan 4.6 μM KİN ve 0.45 μM 2,4-D ortamındaki kallusların 6 hafta sonra 4.4 μM BAP ilave edilen MS besi ortamına aktarılmasıyla sürgün oluşumu sağlanmış, IBA, 4.9 μM bulunan veya bulunmayan, yarım veya tam güçlendirilmiş MS besi ortamlarında sürgünlerden kök oluşturulmuş ve en yüksek köklenme oranının IBA bulunmayan yarı güçlendirilmiş MS ortamından elde edilmiş ve bu bitkiler sera şartlarına kolayca alıştırmıştır.

Ortam pH'sındaki değişiklikler de kullanılan uygulamalar arasındadır. pH gibi değişiklikler, çeşitli mineral iyonlarının ortamda bulunmalarını ve bunların bitki tarafından alınmalarını etkilemektedir.

Doku kültürlerinde kullanılan besi ortamlarının pH'sı genellikle sterilizasyondan önce 5.0 ve 6.0 arasında ayarlanmaktadır. Straus ve La Rue (1954), mısır endosperm kalluslarında en iyi taze ağırlık miktarını pH 7.0 ve kuru ağırlıkta en iyi miktarı pH 6.1 de elde etmiştir.

Genellikle 6.0'dan daha yüksek bir pH, besi ortamının daha sertleşmesine ,5.0' dan daha düşük pH ise besi ortamında, agarın yeteri miktarda jelleşmesine izin vermemektedir. Ortamın pH'sı hazırlık ve kültürün çeşitli aşamalarında değişebilmektedir. Ortam pH'sının jelleştirici faktörün ilavesinden sonra ayarlanması otoklavlamada ciddi bir düşüş gösterir. Bitki dokusu ve ortam arasında başlangıç pH'sına bakmaksızın bir denge pH sı ayarlanır (Skirvin ve ark. 1986; Williams ve ark .,1990). Ortamdaki NH_4^+ ve NO_3^- iyonları da pH'yı etkiler. NH_4^+ oranı baskın olduğunda H^+ iyonlarının açığa çıkmasından dolayı ortam asitleşmekte, NO_3^- iyonları daha fazla olduğunda OH^- iyonlarından dolayı pH artmaktadır (Dougall, 1980; Congard ve ark. 1986).

2.5. Hücre Süspansiyon Kültürleri

Hücre süspansiyon kültürleri tıbbi ve ekonomik açıdan değerli sekonder metabolitlerin üretilmesine yönelik kullanılan yöntemlerden biridir. Hücre süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin diğer kültür sistemlerindeki gibi hızlı bölünmeleri ve hücre süspansiyon kültürlerinin mikrobiyal sistemlere benzerlik göstermeleri, büyük ölçekli kültür sistemlerinin kurulmasına olanak tanır. Böylece kütle olarak daha yüksek miktarda hücre topluluğu elde edilir. Sekonder metabolit üretimine ilişkin deneysel yaklaşımların kolay uygulanabilmesi, araştırma konusuna uygun olarak istenen hücre hatlarının oluşturulması ve seçimi, bu kültür sistemlerinin diğer avantajlarını oluşturmaktadır.

Bitki hücre kültürlerinin yani süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında ilk adım, kallus kültürlerinin yapılmasıdır. Kallus kültürleri, katı (agarlı) besi ortamında elde edilen farklılaşmamış hücre topluluklarıdır. İstenilen özelliklerdeki bir süspansiyon kültürünün elde edilmesi kallus dokusunun niteliğine bağlıdır. Bunun için kallus dokusunun kolayca dağılabilmesi gerekir. Bu özellikteki kallusların elde edilmesi ancak

kültür ortamındaki kallus dokularının birkaç kez alt kültüre alınması ile mümkündür (Allan, 1996).

Kallus dokuları sıvı çalkalamalı ortama aktarıldıklarında hücreler bu ortamda tek ya da küçük hücre kümeleri halinde dağılım gösterirler. Bu durum hücrelerin sıvı ortamla doğrudan etkileşimine olanak sağladığından dolayı besinlerin hücreler tarafından kolaylıkla alınmasını ve dolayısıyla hızlı bir büyüme ve çoğalma olayının gerçekleşmesi sağlanır. Bu özelliklerden dolayı büyüme parametrelerinin izlenmesi ve biyokimyasal olayların araştırılmasında süspansiyon kültürleri, kallus kültürlerine göre daha avantajlıdır (Phillips ve ark. 2007).

Süspansiyon kültürleri, besi ortamında düzgünce dağılan otonom hücrelerden oluşurlar. Süspansiyon ortamındaki hücreler fizyolojik olarak bütün bitkiden daha homojen bir özellikte olup (bu yüzden potansiyel olarak kontrol edilebilir) kimyasal maddelerin üretimi için birçok avantaj sunar. Yani totipotent olan bitki hücreleri sekonder bileşiklerin herhangi birini sentezleme potansiyeline sahiptir. Bitki hücre kültürleri ile sekonder bileşiklerin sentezi genellikle, büyüme yavaşladığı zaman oluşur ve büyüme ile sekonder ürün birikimi arasında ters bir ilişki vardır. Yavaş büyüyen organize hücreler bitkilerde primer metabolizmayı sınırlarken sekonder metabolit üretiminin daha fazla olmasına olanak sağlar.

Pasqua ve ark. (2003), *H. perforatum* bitkisinin hücre süspansiyon kültürleri, kallusları ve *in vitro* sürgün ve köklerinden hazırlanan metanol ekstraktlarının hiperisinler, hiperforinler ve flavonoidleri üretebilme kabiliyetlerini araştırmışlardır. Rejenere sürgünlerde hiperisinlerin sentezi, yaprak yüzeyinde ve kenarlarındaki siyah bezeler olarak fark edilen salgı yapılarının oluşumu ile ilgili bulunmuştur. Hiperforinlerin ve flavonoidlerin üretiminin uyarılabilmesi için de yaprak gelişiminin artması gerektiği tespit edilmiştir. Ksantonlar, hücre süspansiyon kültürleri, farklılaşmamış kalluslar ve bitkiciklerden ya da kalluslardan gelişen köklerdeki temel metabolitler olarak tespit edilmiştir. Hiperisinler, hiperforinler ve flavonoidlerin aksine, bitkiciklerin kök hariç diğer kısımlarında ksantonların varlığı saptanamamıştır.

Hücre ve organ kültürleri, sınırlı bir zaman ve alanda fitokimyasalların biyosentezi için önemli bir metod olarak kullanılmaktadır (Jeong ve ark. 2009). Geniş

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

ölçekte bir kültür oluşumu için bitki türlerine göre değişen fiziksel ve kimyasal şartlar, kültür dokuları ve kültür materyalleri gereklidir.

Coste ve ark. (2011), *H. hirsutum* ve *H. maculatum*'un bitki gelişimi ve hiperisin ve psödohiperisin ve hiperforin birikimi üzerinde bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, KİN, 2iP, TDZ ve NAA), 10 mM NH₄ ve 5 mM NO₃ içeren modifiye MS besi ortamı ve 2iP, BAP, KİN ve NAA içeren (MSM ortamı) ve iki elisitör [jasmonik asit (JA), ve salisilik asit (SA)] ortamlarının etkilerini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışma sonucunda, BAP (0.4 mg/L) veya KİN (0.4 mg/L) ilaveli sürgün kültürü ortamlarının hiperisin ve hiperforin üretimini artırdığını, ortama TDZ (0.4 mg/L) eklendiğinde hiperisin ve hiperforin konsantrasyonlarının azaldığı, TDZ'nin aynı zamanda rejenerasyon sürgünlerde nekrozisi ve hiperhidrik malformasyonları tetiklediğini göstermişlerdir. *H. maculatum*'un MSM ortamında kültüre alınması, hiperisin üretimini kontrol grubuna oranla yaklaşık iki kat artırmış, *H. hirsutum* sürgünlerinin aynı ortamda yetiştirilmesi de hiperforin üretiminde 6.16 kat artışa yol açmıştır. SA hiperisinlerin birikiminde fazla etkili olmazken, SA *H. hirsutum*'da 50 µM konsantrasyonunda hiperisin (7.98 kat) ve psödohiperisin (13.58 kat) ve *H. maculatum*'da 200 µM konsantrasyonunda hiperisin (2.2 kat) ve psödohiperisin (3.94 kat) üretimini artırdığını bulmuşlardır.

Karakaş (2010), *H. triquetrifolium*'un *in vitro* kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinden toplam hiperisin üretimini artırmak amacıyla etkili bir süspansiyon kültürü yöntemi geliştirmek için yaptığı çalışmada, en uygun kallus oluşum oranı (% 92.3) 1.0 mg/L BAP + 0.0 mg/L NAA içeren MS besi ortamından elde etmiştir. Bu ortamdan elde edilen kallusları, yine aynı hormon oranlarını içeren sıvı ortamlara alarak hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında kullanmış ve hücre süspansiyon kültürlerinde 1.0 mg/L BAP + 2.0 mg/L NAA içeren MS besin ortamında gelişen hücrelerin, kültürün 20. gününde en yüksek büyüme oranı seviyesine ulaştığını, paketlenmiş hücre hacmi (PHH) 2.33 kat, yaş ağırlık 5.5 kat ve kuru ağırlık 6.30 kat artış gösterdiğini ve 1.0 mg/L BAP + 0.4 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında gelişen hücrelerin büyüme parametrelerinin 1.0 mg/L BAP + 2.0 mg/L NAA ortamına paralel bir artış gösterdiğini tesbit etmiştir.

Dias ve ark. (2000), *H. androsaemum*'un kallus ve süspansiyon hücrelerinde 1, 3, 5, 6 ve 1, 3, 6, 7 yüksek seviyelerde oksijenli ksantonların biriktiğini tesbit

etmişlerdir. Bu büyük bileşiklerin, dördünün yeni doğal bileşik olan oksijenlenmiş fenil, pıran türevleri veya ksantonlar veya fenil gruplarını içerdiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda ksanton birikiminin ortamdaki hormonlardan önemli bir şekilde etkilendiğini belirlemişlerdir. Kallus gelişiminde, 4.5 mM NAA + 2.3 mM KİN ilaveli ortamın en yüksek spesifik ksanton üretimini (% 1.3 kuru ağırlık kütlesi (DW)) sağlarken, süspansiyon hücrelerinde aynı ortamın en düşük miktarı (0.87% DW) verdiğini tesbit etmişlerdir. Kallusların, ksanton birikimi ve NAA konsantrasyonu arasında 4.5–22.5 mM seviyelerinde negatif doğrusal bir orantı gösterdiğini fakat yine bu seviyelerde ksanton 1,3,6,7:1,3,5,6 oranı ve biyokütle üretiminin NAA konsantrasyonu ile pozitif bir doğrusal ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ortamda 4.5 mM NAA yerine aynı molar 2,4-D, 2.3 mM KİN varlığının ise kalluslarda ksanton birikiminde bir azalmaya neden olduğunu, KİN yerine BAP kullanımının ksanton üretimini azalttığını bildirmişlerdir.

Hücre süspansiyon kültürlerinin büyüme ve sekonder metabolit üretiminde ışığın etkisi de pek çok çalışmada uygulanmıştır.

Hypericum bitkilerinde, hiperisin biyosentezinin, bütünlüğü bozulmamış bitkilerin yapraklarındaki koyu kırmızı renkli yağ bezelerinin oluşumu ve morfogenez ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Zdunek ve Alfermann, 1992). Önceki çalışmalar, süspansiyon kültürlerinde hiperisin üretimi ve büyümenin önemli ölçüde karanlık şartlar tarafından kontrol edildiğini bildirmektedir (Bais ve ark. 2002).

Yousefzadi ve ark.(2012), *Linum album*'da üretilen anti tümör özelliğine sahip, fenolik bir bileşik olan podopillotoksin (PTOX)'in hücre kültürlerinde büyüme ve PTOX birikimi üzerine ışığın etkisini araştırmışlardır. Bunun için normal floresan lambalarla ışığın tipini ve periyodunu değiştirerek bir takım denemeler yapmış ve bunun sonucunda, PTOX birikiminin ışığın kalitesiyle önemli ölçüde değiştiğini gözlemlemişler. PTOX birikimi üzerine kırmızı ışığın etkisinin artmasının, fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enziminin aktivitesinin artışıyla bağlantılı olduğunu ve bazı anahtar genlerin ekspresyonu bu PAL geninin kendisi ve sinneril-CoA reduktaz (CCR) bileşiğinin biyosenteziyle ilgili olduğunu gözlemlemişler. Mavi ışığın da benzer etkilere sahip olduğunu bulmuşlardır.

Klingauf ve ark. (2005), *H. calycinum* hücre kültürlerinde hiperforinlerin oluşumunu inceledikleri araştırmalarında yüzey sterilizasyonuna tabi tuttıkları gövde

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

segmentlerini MS (Murashige ve skoog, 1962), LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) ve BDS (Gamborg ve Eveleigh, 1968) temel besi ortamlarında kültüre almışlardır. Bu ortamlarda gelişen kalluslardan başlattıkları hücre kültürlerinde hiperforinlerin sentezini incelemek üzere kültürleri ışık ve karanlık şartlarda devam ettirmişler ve dört günlük kültürlerine 100 µmol/L metil jasmonat ve jasmonil-izolösün ilave etmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, *H. calycinum* hücre kültürlerinin hiperforinden çok bu maddenin homoloğu olan adhiperforin ürettiğini ve bu bağlamda hücre kültürlerinin hiperforinlerin sentezinin incelenmesi için elverişli bir yöntem olduğunu, ışık şartlarının hiperforin üretimini olumsuz yönde etkilediğini ve ortama metil jasmonat ve jasmonil-izolösün elisitörlerinin ilave edilmesinin hiperforin verimini artırmadığını bildirmişlerdir.

H. perforatum'un yaprak ekplantları, 2,4-D, BAP ve KİN'in farklı konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alınarak bu bitkinin kallus ve hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuş ve bu hücre kültürlerinde karanlık ortamda, aydınlık ortama kıyasla daha fazla hiperisin içerdiği tesbit edilmiştir (Bais ve ark.2002).

Hücre süspansiyon kültürlerinde sukroz önemli bir karbon ve enerji kaynağıdır ve onun başlangıç konsantrasyonu sekonder metabolitlerde ürün verimliliği ve gelişim gibi parametrelerini etkileyebilmektedir.

Karwasara ve Dixit (2013), *Nothapodytes nimmoniana*'nın hücre kültürlerinin gelişimi ve alkaloid (özellikle, antikanser özelliğe sahip kamptotesin bileşiğinin), üretimi üzerine çeşitli kültür ortamı besleyicilerinin etkisini araştırmışlardır. Test ettikleri glukoz, fruktoz, maltoz ve sukroz gibi şeker çeşitleri içerisinde en yüksek kamptotesin birikiminin sukrozda gözlendiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda yüksek miktarda amonyumun kamptotesin birikimini ve yüksek miktardaki nitratın da biyokütleyi artırdığını tesbit etmişlerdir. Sukroz miktarındaki değişikliklerin hücre biyokütlesi ve kamptotesin üretimi üzerinde önemli değişikliklere neden olduğunu bulmuşlardır.

Grover ve ark.(2012), *Camellia sinensis*'in hücre süspansiyon kültürlerini, MS, N/5 MS ve Heller besi ortamlarında, BAP (0.05–2 mg/L), 2,4-D (1–10 mg/L) ve sukroz (10–50 g/L) ilave ederek geliştirmişlerdir. Ayrıca ortamın pH'sını 5.2 ile 6.2 aralığında değiştirmiş ve kültürleri tamamen karanlığın yanında ışık aydınlatmasına da maruz

bırakmışlardır. Aroma ve terpenoid ekstraksiyon metodlarının optimizasyonunu takiben, hücre kültürleri uçucu bileşikler GC/MS kullanılarak analiz edilmişlerdir. Bu araştırmacılar, mikro SDE cihazını kullanarak, 43 bileşiği total olarak hesaplamışlardır. Büyük monoterpenoidler arasında olan a-terpineol ve nerol bileşiklerini elde etmişlerdir. Bunun yanında 2-etil hegzanol, benzil alkol, benzen asetaldehit nonanal ve feniletilalkolü de içeren, diğer yüksek aroma değerli bileşikleri de tesbit etmişlerdir. Bu bileşiklerin en yüksek seviyelerini, 5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP ve 30 g/L sukroz içeren ve pH of 5.8 olan, tamamen karanlıkta kültüre alınan ve MS besi ortamında gelişen hücre süspansiyon kültürlerinden elde etmişlerdir.

Srivastava ve ark. (2011), *Lantana camara*'nın hücre süspansiyon kültürlerinde, MS+ BAP+ 2,4-D+ NAA besi ortamındaki süspansiyon hücrelerinin özelliklerini anlamak amacıyla kültür sisteminde bazı parametrelerde değişiklikler yapmışlardır. Çalışmaları sonunda, fosfat tüketiminin hücre kültüründe durağan fazı başlattığını belirlemişlerdir. Karbon kaynağı olarak kullandıkları maltozun maksimum triterpenoid içeriği (31.08 mg/L) sağlarken, glukozun en düşük içeriği (10.69 mg/L) sağlandığını, fakat her iki şekerin de betulinik asit birikimini desteklemediğini bulmuşlardır. Sukroz, her üç triterpenoid; oleanolik, ursolik ve betulinik asit üretimini desteklemiştir. Maksimum canlı kültür miktarını ise 120 rpm çalkalama hızında elde etmişlerdir.

Nagella ve Murthy (2010), *Withania somnifera*'nın hücre süspansiyon kültürlerinde ortamın withanolide A. üretimini belirlemek amacıyla, farklı BBD (oksinler, oksin ve sitokinin kombinasyonları), materyalin kültüre alınma yoğunluğu (2.5–20 g/L), farklı besi ortamları (MS, B5, NN ve N6), MS ortamının güçlendirilmesi (0.25–2.0 x), sukroz konsantrasyonu (% 1–8 (w/v)) ve ortamın başlangıç pH'sı (4.0–6.5) uygulamalarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda, biyokütle birikimi ve withanolid A. üretimi bakımından optimize edilmiş şartları, 10 g/L kültüre alınan taze materyal, tam güçlendirilmiş MS ortamı, % 3 (w/v) sukroz, dört hafta kültür periyodu ve kültür başlangıç pH'sını 5.8 olarak belirlemişlerdir.

Rudgea jasminoides'in hücre süspansiyon kültürü ortamlarına, karbon kaynağı olarak, sukroz, glukoz, fruktoz, glukoz + fruktoz eklenerek bu şekerlerin süspansiyon kültürü ortamlarındaki hücrelerin gelişimleri üzerine etkileri araştırılmış ve kültür süresince, sadece sukroz içeren ortamlardaki hücrelerin kuru ağırlıklarında bir artış

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

olduğu saptanmıştır. Diğer ortamların da hücre büyümesi üzerine benzer etki gösterdikleri tespit edilmiştir (Kretzschma ve ark.2007).

Iranbakhsh ve ark.(2007), *Datura stramonium* bitkisinin hücre süspansiyon kültüründe, tropan alkaloidlerinin üretimini ve gelişimi optimize etmek amacıyla, glukoz, sukroz, potasyum nitrat amonyum nitrat ve kalsiyum kloridin farklı konsantrasyonları ile farklı sıcaklık değerleri gibi farklı fizikokimyasal şartları test etmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda, 30 ve 40 g/L glukozun sırasıyla en yüksek alkaloid seviyelerine ve biyokütle üretimine neden olduğunu, ayrıca 20 ve 40 g/L sukroz konsantrasyonlarının alkaloid ve biyokütle üretimlerinin en yüksek oranlarını sağladığını tesbit etmişlerdir. Nitrat konsantrasyonunun artışının alkaloidlerin azalmasına neden olduğunu ve tropan alkaloidleri ve biyokütle üretimi için en iyi potasyum nitrat konsantrasyonunun 9.4 ve 3.76 mM olduğunu bulmuşlardır. Amonyum nitrat konsantrasyonunu alkaloid üretimi için 10.3 mM ve biyokütle üretimi için 41.22 mM olarak optimize etmişlerdir. Test edilen sıcaklıklar içerisinde ise alkaloid üretimi için 20 °C ve biyokütle için 25 °C değerlerini en iyi sıcaklıklar olarak bulmuşlardır.

Echinacea angustifolia'nın adventif kök kültürlerinde % 7(w/v) lik yüksek sukroz konsantrasyonu biyokütle toplanması için daha yararlı olurken, % 5(w/v) lik sukrozun fenoller ve flavonoidlerin üretimi için en iyi konsantrasyon olduğu bulunmuştur (Wu ve ark. 2006).

Bitki hücrelerinde bulunan biyolojik moleküller, karboksil ve amino gibi birçok işlevsel gruplar bulundukları için asit veya baz gibi davranarak ortamın pH'sını etkilerler. Ortamın değişen pH'sı enzimatik reaksiyonlar üzerinde etkili olabilir. Birçok reaksiyon belli pH aralıklarında gerçekleşir, çünkü enzimlerin katalitik aktivitesiyle ilişkili aminoasit gruplarının ve substratların iyonizasyon durumları farklı pH'larda değişkenlik gösterir (Voet ve ark.1999). Doku kültüründe pH, kültür başlatılmadan önce çoğu zaman 5-6 arasındaki değerlere ayarlanır. Bu, bölünme için en iyi pH aralığı olarak bilinmektedir. Buna karşılık, ortamın pH'sındaki değişiklikler sekonder metabolizmada değişmelere neden olabilir. Örneğin *Ipomea* türlerinin hücre kültürlerinde triptofanın triptofol gibi indol metabolitlerine dönüşümü pH 6.3'te iki katına çıkarken, pH 4.8'de bu dönüşüm baskılanmaktadır (Sökmen ve Gürel 2001).

Sukroz konsantrasyonunun normal olarak kullanılan % 2-3 seviyelerinin altına düşmesi, *Panax notoginseng*'in süspansiyon kültürlerinde ginseng saponin ve polisakkaritlerin üretimini uyardığı bildirilmiştir (Zhang ve ark. 1996).

Süspansiyon kültürlerinin sekonder metabolit üretimi üzerindeki olumlu etkilerinin olmasına rağmen, bu sistemlerde de bazı sorunlarla karşılaşılabilir. Bu sorunlar kültürlerdeki hücrelerin diğer kültür sistemlerine göre genetik ve biyokimyasal kararlılıklarını daha az koruyabilmeleri ve bu nedenle birçok sekonder metabolitin istenilen düzeyde üretilmemesidir.

2.6. LC-MS/MS Analizi Yöntemi

Kromatografi, farklı fazlardaki denge esasına dayanarak, bir hareketli faz ile bir sabit faz yardımıyla karışımın bileşenlerine ayrılması işlemidir. Kromatografi için hareketli faz, sabit faz ve bileşenlerine ayrılacak karışım ile kimyasal tepkimeye girmeyen uygun bir çözelti olabilir; sabit faz olarak da genellikle farklı çaplarda tanecik büyüklükleri olan kristal veya amorf yapıdaki maddeler kullanılır. İşlem sırasında, bileşenlerine ayrılacak konsantre haldeki karışım, sabit fazın başlangıç bölgesine konur; sonra sabit fazın başlangıç bölgesinden ileriye doğru hareketli faz ilerletilir. Hareketli faz, ilerleyişi sırasında çözdüğü karışımdaki maddeleri de sabit faz üzerinde değişik hızlarda ilerletir; bileşenler, sabit fazın farklı bölgelerinde tutulurlar ve böylece birbirlerinden ayrılırlar:

Ayrırma mekanizmalarına göre kromatografi çeşitleri şunlardır:

İyon değiştirme kromatografisi,

Jel filtrasyon kromatografisi,

Adsorpsiyon kromatografisi,

Partisyon kromatografisi,

Affinite kromatografisi

Ayrılcı materyale göre kromatografi çeşitleri şunlardır:

a) Düzeyssel kromatografi:

- İnce tabaka kromatografisi

- Kağıt kromatografisi

b) Kolon kromatografisi:

- Gaz kromatografisi (GC)
- Likit kromatografisi (LC)
- Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC'nin en önemli avantajı ayırma gücü, duyarlılığı ve geri kazanımın yüksek, hızlı bir yöntem olmasıdır. Bu yöntemde hareketli faz 10-400 atm basınç altında kolondan 0.1-5 cm/s gibi yüksek bir hızla geçirilir. Bunun sonucu ayırma hızı çok daha düşük olan ve hidrostatik basınçla çalışan açık sıvı kolon kromatografisine göre çok daha yüksek olur. Böylece günler süren bir ayırma işlemi HPLC'de birkaç saatte tamamlanabilir.

MS (Kütle Spektrometrisi)

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışmaktadır. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütle ve yüke sahiptir ve m/z değerlerinin yoğunluğa (intensite) karşı gösterildiği bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır.

Kütle spektrometresi, analizlerin hızı, seçiciliği ve hassasiyeti gibi değerlerin analitik özelliklerine ait verileri sunmasıyla ileri bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

LC/MS, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kütle spektrometresi (MS) analiz metodlarının birleşiminden oluşan bir methodur.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) nin kütle spektrometresi ile birleşimi, farmosötik keşiflerin ve ilaç metabolizması ve farmakokinetik ve ilaç adaylarının fizikokimyasal özelliklerinin karakterizasyonu, biyolojik testler için yüksek veri görüntüleme ve biyolojik amaçlı keşifleri de içeren gelişim işlemleri ve farmasötik keşiflerin her aşamasında uygulanan oldukça güçlü ve gerekli bir yöntemdir.

HPLC'nin kütle spektrometresiyle birleşimi (HPLC/MS veya LC/MS) farmosötik endüstrisinde analitik bir metod olarak kabul edilmekte ve ilaç geliştirilmesinin her aşamasında kullanılmaktadır. HPLC komplike karışımlardan bileşenlerin ayrılmasını sağlar ve farmosötik araştırma ve geliştirme işlemlerinde temel analitik metod olarak kabul edilmektedir(Guttman ve ark., 2004; Andersson ve ark., 2003).

LC/MS metodu, farmosötik endüstride tanımlama, yüksek veri görüntüleme, kombinatoriyal kimya ilaç kimyası ve işlemleri araştırması, ADME (absorbsiyon, dağıtım, metabolizma, atılım) alanlarında uygulanmaktadır (Warnock ve ark.,2004; Lee ve Kerns,1999).

LC-MS metodu,

1-LC-MS teki teknolojik avantajlar

2-HPLC ve kütle spektrofotometresinin performansını artırması ve

3-İz karışımların analizlerini yüksek veri hızlı olarak karşılanmasını artırması gibi avantajları dolayısıyla oldukça verimli bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

LC-MS tekniği *H. perforatum* fraksiyonlarının büyük bileşenlerinin tanımlanması ve hızlı bir şekilde ayrılması için kullanılmaktadır. Tesbit edilen bileşikler, flavonoidler, naftadiantronlar ve floroglusinoller olmak üzere üç grupta temsil edilmektedir.

Son zamanlarda verilen çalışmalara göre piklerin tanımlanması kütle spektrumu ve alikonma zamanının karşılaştırılmasıyla yapılmaktadır (Tastis ve ark., 2007).

Dört naftadiantron (protopsödohiperisin, psödohiperisin, protohiperisin ve hiperisin), dört floroglusinol (hiperfirin, adhiperfirin, hiperforin, adhiperforin), çeşitli flavonoidler (hiperosid, rutin, kuersetin ve kuersitirin) ve kafeolikuinik asitin küçük bir miktarı ile birlikte tanımlanmışlardır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hypericum türlerinden flavonoidler, floroglusinoller ve naftodiantronların analizi için, LC/UV (Brolis ve ark., 1998), LC/MS (Ganzera ve ark., 2002) ve LC/SPE/NMR (Tatsis ve ark., 2007) gibi LC metodlarının kullanıldığı birçok çalışmada bildirilmiştir.

Pek çok tür, LC/UV (Umek ve ark., 1999; Maggi ve ark., 2004; Crockett ve ark., 2005) ve LC/MS (Smelcerovic ve Spiteller, 2006; Smelcerovic ve ark., 2006) yöntemleri ile çalışılmıştır.

Smelcerovic ve ark.(2008), Türkiye'nin kuzeyinde doğal olarak yetişen 17 *hypericum* türünün LC-MS kullanarak, farmakolojik olarak önemli 6 fenolik bileşik (psödohiperisin, hiperisin, hiperforin, rutin, hiperosid, kuersitrin ve kuersetin) içeriklerini ve kemotaksonomik önemlerini araştırmışlar. Bu türlerde hiperisin ve psödohiperisin içerikleri arasında pozitif bir orantı olduğunu tesbit etmiş ve bu ilişkiyi biyosentetik yollardaki genel öncüllerin paralel gelişimiyle açıklamışlardır.

Estonya'nın üç farklı habitatından toplanan *H. perforatum*'un toprak üstü kısımlarının kimyasal bileşiminin araştırılması için, bitkinin su ve etanol ekstraktlarının fenolik bileşen içerikleri sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) ve kapillar tabaka elektroforezi ile analiz edilmiştir (Heljma ve ark.2011).

Spiteller ve ark.(2008), Türkiye'de toplanan *Hypericum venustum* çiçeklerinin su ve etanol ekstraktlarının antioksidant aktivitesi ve fenolik içeriklerini araştırmışlar. Ekstraktların bileşimini LC-MS/MS metodunu kullanarak analiz etmişler.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Hypericum retusum'da kallus ve süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamaların etkilerinin incelendiği bu çalışmada materyal olarak kullandığımız örnekler, 2001 tarihinde Diyarbakır ilinden toplanmıştır.

3.1.1. Çalışma materyalinin sistematigi

Familya: Hypericaceae(Guttiferae)

Cins: *Hypericum* L.

Tür: *Hypericum retusum* Aucher

Çalışmada kullanılan bitkilere ait örnekler(Şekil 3.1.), Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi herbaryumunda tutulmaktadır [*A.S.Ertekin 2001-326* (DUF)].

3.1.2. *Hypericum retusum* Aucher Türünün Dış Morfolojisi ve Yayılışı

Çok yıllık, ot formunda bir bitkidir. Kalkerli step ve tepe kenarları, tarla kenarları gibi alanlarda daha sık yetişirler. Boyları 360-1150 cm yüksekliğinde olabilir.

Yapraklarının üst kısımlarda siyah salgı bezleri vardır. Gövde, yaprak ve petaller genellikle bu siyah bezlerle benekli görünür, sepallerde genellikle iki siyah damar bulunur. Gövdesi 15-30 cm, dik tüysüz, düzensiz siyah salgı bezlerine sahiptir. Ana gövde üzerindeki yapraklar 10-30 mm, şeritsi, kenarları geriye veya aşağı doğru kıvrılmış, tepesi yuvarlak ve hafif girintili, üst kısım siyah salgı bezli ve genellikle yüzeysel durumlu, tüysüz bazen sarımsı yeşil renktedir. Çiçek durumu, silindirik veya nadiren piramidalıdır. Çok çiçeklidir. Sepaller yumurta biçiminde yuvarlak, saplı veya sapsız olup, genellikle 2 boylamsal siyah salgı bezli damar bulundurur. Petaller 7-10 mm, genellikle siyah salgı bezleriyle benekli fakat kenarsal salgı bezleri bulunmaz. Kapsül 5-7 mm, oval, ucu çok kısa kıvrıktır.

Genel Coğrafi Yayılışı: Türkiye'de; Gaziantep, Kahramanmaraş, Diyarbakır, Mardin ve Şanlıurfa'da bulunur. Dünya'da: Suriye Çölü'nde de bulunur. (Robson,1975).



Şekil 3.1. *H. retusum* Aucher

3.1.3. Kallus Kùltürlerinin Başlatılması için Uygun Eksplantın Seçilmesi

Doğal ortamlarından toplanan bitkiler, öncelikle laboratuvara getirildikten sonra kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımları ayrı ayrı kesildi. Bu bitki kısımları oda sıcaklığında kurutulduktan sonra hiperisin içerikleri tespit edilip sonuçlar kaydedildi. Bitkilerden ayıklanan tohumlar ağız kapalı film kutularına konulup, çalışma zamanına kadar, buzdolabında (+4 °C'de) tutuldu. Daha sonra bitkinin olgun tohumları çimlendirilip sürgün oluşturuldu ve *in vivo* koşullarda yetişen *hypericum* bitkisinin farklı organlarındaki fenolik bileşen içerikleri göz önüne alınarak kallus kùltürleri başlatıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Kùltür Ortamının ve Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması

Doku kùltürü çalışmalarında kullanılan laboratuvar teknikleri, aslında rutin ve standart olarak yapılan işlemlerden oluşmaktadır. Ancak araştırmanın yöntemini ortaya koymak amacıyla, sterilizasyon işlemleri, besi ortamlarının hazırlanması ve kùltür şartları aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.2.1.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Kullanılan Besi Ortamı İçeriği

Çalışmada besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanıldı.

MS besi ortamı aşağıdaki şekilde hazırlandı:

MS ana çözeltisi (Makro elementler)	100 cc
MS mikro elementler-1	10 cc
MS mikro elementler-2	1 cc
Kompleks kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
B1 vitamini ana çözeltisi	1 cc
Sukroz	30 g
Distile su	1000 cc

Kallus başlatma, çimlendirme ve proliferasyon aşamalarında ortamın katılaştırılması için 7 gr/L agar (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Ancak hücre süspansiyon kültürü ortamının sıvı olması gerektiğinden agar kullanılmadı. Bütün kültür ortamlarında pH 5.8'e ayarlandı.

MS besi ortamı hazırlanırken, öncelikle aşağıda içerikleri verilen 6 stok çözelti oluşturulmuş ve ihtiyaç duyuldukça kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlanırken, ölçülü balon joje içerisindeki bir miktar steril saf suya, belirtilen bileşikler konulmuş ve manyetik karıştırıcıda çözdürülerek steril saf su ile istenilen hacme tamamlanmıştır. Bu stok çözeltiler, renkli şişelerde buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmiş ve periyodik aralıklarla yenilenmiştir.

Stok çözeltilerin ve besi ortamının hazırlanmasında, kuru hava sterilizatöründe 180 °C'de 2 saat süreyle steril edilen saf su kullanılmıştır. MS (Murashige ve Skoog) besi ortamında kullanılan stok çözeltilerin hazırlanışı çizelge 3.1.'de verilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

Çizelge 3.1. MS Besi Ortamında Kullanılan Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

Stok Çözelti	Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar	Distile Su ile Tamamlanan Miktarı
MS (makro elementler) Ana Çözeltisi	NH ₄ NO ₃	16.5 g	1000 cc
	KNO ₃	19.0 g	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4 g	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7 g	
	KH ₂ PO ₄	1.7 g	
MS Mikro Elementler 1 Ana Çözeltisi	H ₃ BO ₃	620 mg	1000 cc
	MnSO ₄ .4H ₂ O	2230 mg	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg	
	KI	83 mg	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg	
MS Mikro 2 Elementler Ana Çözeltisi	CuSO ₄ .5H ₂ O	25 mg	100 cc
	CoCl ₂ .6H ₂ O	25 mg	
Kompleks Kelatör Ana Çözeltisi	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.78 g	1000 cc
	Na ₂ EDTA	3.73 g	
Vitamin Karışımı Ana Çözeltisi	Nikotinic asit	50 mg	100 cc
	Glisin	2.0 mg	
	Pridoksin HCl	50 mg	
B1 Vitamini Ana Çözeltisi	Tiamin HCl	100 mg	100 cc

Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmalarımızda kullandığımız bitki büyüme düzenleyicileri ve bunların stok çözeltilerinin hazırlanması ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir;

Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyicileri:

2,4-D (2,4- diklorofenoksi asetik asit)

BAP (benzil aminopürin)

NAA (α -naftalen asetik asit)

Kinetin (6-furfuril aminopürin)

Çalışmada kullanılan bütün bitki büyüme düzenleyicileri, 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmış ve ihtiyaç duyuldukça besi ortamlarına gerekli miktarlarda ilave edilmiştir. Stok çözeltiler hazırlanırken, 100 mg olarak tartılan bitki büyüme düzenleyicileri, 100 mL'lik ölçülü balon jodedeki birkaç mL çözücü içinde manyetik karıştırıcı ile çözdürülmüştür. Ardından steril saf su ile istenilen hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, renkli şişeler içerisinde, buzdolabında 4 °C'de muhafaza edilmiş ve periyodik olarak yeniden hazırlanmıştır.

BAP ve KİN gibi sitokininlerin stok çözeltilerinin hazırlanmasında 0.1 N'lik NaOH, 2,4-D ve NAA gibi oksinlerin çözdürülmesinde ise etil alkol (CH₂OH) kullanıldı. Hazırlanan stok çözeltiler 4°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.1.1. Sterilizasyon İşlemleri**Cam Malzemelerin Sterilizasyonu**

Cam malzemeler (erlenmayer, mezür, balon joje, pipet, beher) sıcak su kullanılarak fırça yardımı ile temizlendi. Daha sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180 °C'de etüv de iki saat bekletilerek steril edildi.

Kültür Kaplarının Sterilizasyonu

Kültür kabı olarak cam şişeler ve Magenda GA₇'ler kullanıldı. Kaplar, sıcak su kullanılarak fırça yardımı ile temizlendikten sonra bulaşık makinesinde yıkandı. Daha sonra kaplar makineden çıkarılarak önce sıcak sudan sonra da 3 defa saf sudan geçirilerek cam şişeler 180 °C'de 2 saat süreyle etüvde, Magenda GA₇'ler ise 121°C'de ve 1 atm. basınçta 20 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Çalışmanın farklı aşamalarında değişik kültür kaplarından yararlanılmış, bu kültür kapları ve özellikleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kültür kapları ve özellikleri

Kültür Kapları	Özellikleri
Magenta® GA-7 kültür kabı	77x77x97 mm, polikarbonat gövde, polipropilen kapaklı
Cam kavanoz	Şişecam (kod:102921), Ø66x81 mm, Metal kapaklı

Pens ve Bisturilerin Sterilizasyonu

Pens ve bisturiler önce % 96'lık alkol ile silinip 10'arlı gruplar halinde alüminyum folyolarla sarılarak 300 °C'de kuru bir sterilizatörde, 30 dakika süre ile sterilizasyonu yapılır.

Transfer Odasının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Kültür odasında, bir ultraviyole lambası, içinde ekim işlemlerinin gerçekleştirildiği bir laminar hava akışlı kabin, sehpa ve dolaplar bulunmaktadır. Kültür işlemlerinin gerçekleştirildiği transfer odasında, kültürden 1 gün önce seyreltilmiş ticari çamaşır suyu kullanılarak zemin ve diğer yüzeyler temizlenmiş ve steril kabin % 96'lık alkol ile silinmiştir. Kullanılan yatay üflemlerli steril kabinde ultraviyole (UV) lambası ve odaya yerleştirilen ayrı bir UV lambasının kültürden önceki gece 3 saat süreyle çalışması sağlanarak ortam dezenfekte edildi.

Kültür Odasının Şartları

Kültür odası, beyaz floresan lamba ile aydınlatılmış ve bitkisel materyalin gelişimi için gerekli olan fotoperiyot, ışıklandırma sisteminin 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde zaman ayarlayıcısı ile ayarlanmıştır. Sıcaklık, klima yardımı ile 25 ± 2 °C’de tutulmuş ve muhtemel klima arızalarına karşı, sıcaklığın 30 °C’nin üzerine çıkması durumunda lambaları kapatan bir termostat yerleştirilmiştir

3.2.2. Doku Kültürü Aşamaları

H.retusum’da doku kültürlerinin başlatılması, süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik çalışmaların aşamaları ve bu aşamalarda yapılan çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

3.2.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi

Bu aşamada tohumlar ön sterilizasyon için akan çeşme suyunda yıkandı ve % 70’lik etanol (w/v) çözeltisine 30 s. daldırılıp çıkarıldı. Daha sonra % 5’lik sodyum hipoklorid (NaOCI) çözeltisiyle 10 d. çalkalandı. Tohumlar her biri 5’er d. olmak üzere 3 kez sterilize saf su ile durulanarak yüzey sterilizasyonları yapıldı. Tohumlar besi ortamına aktarılmadan önce steril kurutma kağıtları üzerinde kurumaları için bekletildiler. Yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra tohumlar, çimlenmesi için hormonsuz MS besi ortamına aktarıldı (Namlı ve ark.2010).

3.2.2.2. Proliferasyon Aşaması

Bu aşamada çimlendirilen tohumlardan elde edilen sürgünler alınarak, 0.5 mg/L BAP’ın bulunduğu MS besi ortamına aktarılarak sürgünlerin geliştirilmesi sağlandı (Namlı ve ark.2010).

3.2.2.3. Kallus Kùltürleri

Kallus Kùltürlerinin Başlatılması

Kallus kùltürlerinin başlatılmasında, doku kùltüründe yetiştirilen 21 günlük bitkilerin yaprakları kullanıldı. Yapraklar bitkiden koparılıp, steril pens ve bisturiler kullanılarak, steril kurutma kağıtları üzerinde 2-4 parçaya bölündükten sonra kallus oluşumu için hazırlanan Çizelge 3.2.'de belirtilen farklı hormon kombinasyonlarının bulunduğu MS besi ortamlarına aktarıldılar. Ortam pH'sı 5.8 olacak şekilde ayarlandı. Her bir Magenta GA₇ kabına 20-25 mL MS besi ortamı bırakıldı ve yaprak parçaları, her bir kaba 6-8 parça olacak şekilde aktararak, büyüme odasında bekletildi. Beşinci haftanın sonunda kallus oluşum sıklığı (%), renkleri ve kallusların morfolojik özelliklerine ait gözlemler kaydedildi.

Bitki Büyüme Düzenleyicileri Uygulaması

Bu çalışmada, MS kùltür ortamına farklı kombinasyonlarda ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki büyüme düzenleyicileri (Çizelge 3.2.) eklenerek, kallus gelişimi üzerine etkileri araştırıldı. Besi ortamları pH ları 5.8'e ayarlandıktan sonra 121 °C de 20 dakika boyunca otoklavlanmışlardır. Kùltürler 25± 2 °C de ve 16/8 saat ışık/karanlık şartlarda alt-kùltür yapılmaksızın muhafaza edilmişlerdir. Her Magenta kabına 5 adet eksplant ekilmiş ve her ortam için 4 tekrar yapılmıştır. Beşinci haftanın sonunda kallus oluşum sıklığı, taze ağırlık ve oluşan kallusların renk ve morfolojik özelliklerine ait gözlemler kaydedilmiştir. Kullanılan ortamların oksin/sitokinin içeriklerine ait bilgiler çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kallus oluşumu için kullanılan ortamlar

MS+KİN+NAA	MS+ BAP +NAA
MS + 0.1 mg/L KİN + 0.05 mg/L NAA	MS + 0.1 mg/LBAP + 0.05 mg/L NAA
MS + 0.1 mg/L KİN + 0.1 mg/L NAA	MS + 0.1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 33NAA
MS + 0.1 mg/L KİN + 0.2 mg/L NAA	MS + 0.1 mg/L BAP + 0.2 mg/L NAA
MS + 0.1 mg/L KİN + 0.5 mg/L NAA	MS + 0.1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA
MS + 0.5 mg/L KİN + 0.25 mg/L NAA	MS + 0.5 mg/L BAP+ 0.25 mg/L NAA
MS + 0.5 mg/L KİN + 0.5mg/L NAA	MS + 0.5 mg/L BAP + 0.5mg/L NAA
MS + 0.5 mg/L KİN + 1.0 mg/L NAA	MS + 0.5 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA
MS + 1.0 mg/L KİN + 0.5 mg/L NAA	MS + 1.0 mg/LBAP + 0.5 mg/L NAA
MS + 1.0 mg/L KİN + 1.0 mg/L NAA	MS + 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA
MS + 1.0 mg/L KİN + 2.0 mg/L NAA	MS + 1.0 mg/L BAP + 2.0 mg/L NAA

MS+KİN+2,4-D	MS+ BAP +2,4-D
MS + 0.1 mg/L KİN + 0.05 mg/L 2,4-D	MS + 0.1 mg/L BAP + 0.05 mg/L 2,4-D
MS + 0.1 mg/L KİN + 0.1 mg/L 2,4-D	MS + 0.1 mg/L BAP + 0.1 mg/L 2,4-D
MS + 0.1 mg/L KİN + 0.2 mg/L 2,4-D	MS + 0.1 mg/L BAP + 0.2 mg/L 2,4-D
MS + 0.1 mg/L KİN + 0.5 mg/L 2,4-D	MS + 0.1 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D
MS + 0.5 mg/L KİN + 0.25 mg/L 2,4-D	MS + 0.5 mg/L BAP + 0.25 mg/L 2,4-D
MS + 0.5 mg/L KİN + 0.5mg/L 2,4-D	MS + 0.5 mg/L BAP + 0.5mg/L 2,4-D
MS + 0.5 mg/L KİN + 1.0 mg/L 2,4-D	MS + 0.5 mg/L BAP + 1.0 mg/L 2,4-D
MS + 1.0 mg/L KİN + 0.5 mg/L 2,4-D	MS + 1.0 mg/LBAP + 0.5 mg/L 2,4-D
MS + 1.0 mg/L KİN + 1.0 mg/L 2,4-D	MS + 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L 2,4-D
MS + 1.0 mg/L KİN + 2.0 mg/L 2,4-D	MS + 1.0 mg/L BAP+ 2.0 mg/L 2,4-D

Farklı Şeker ve Konsantrasyonları Uygulaması

Bu aşamada kallus oluşumu için kullanılan ortamlardan elde edilen kallusların alt kültürlerle çoğaltılmasıyla elde edilen kalluslar kullanılmıştır. Elde edilen bu kalluslar farklı sukroz ve glukoz konsantrasyonlarının kallus gelişimi ve fenolik bileşen içeriği üzerindeki etkilerinin tesbit edilmesi amacıyla, sukroz ve glukoz şekerleri sırasıyla 15, 30 ve 50 g/L konsantrasyonlarında kullanılmıştır.

Beşinci haftanın sonunda kalluslar besi ortamlarından alındıktan sonra hassas terazide tartılarak kallus taze ağırlığı ve gelişen kallusların renk ve morfolojik özelliklerine ait gözlemler kaydedilmiştir. Taze ağırlıkları tesbit edilen örnekler fenolik bileşen içeriklerinin tespiti için, oda koşullarında kurutularak +4 °C’de analiz yapılacak zamana kadar bekletildi.

pH Uygulaması

Farklı pH değerlerinin kallus gelişimi ve fenolik bileşen içeriği üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, sırasıyla pH 3.5, 4.5, 5.8, 6.0, 6.5 ve 7.0 olan MS besi ortamlarında kalluslar kültüre alındı.

Beşinci haftanın sonunda kalluslar besi ortamlarından alındıktan sonra hassas terazide tartılarak kallus taze ağırlığı ve gelişen kallusların renk ve morfolojik özelliklerine ait gözlemler kaydedilmiştir. Taze ağırlıkları tesbit edilen örnekler fenolik bileşen içeriklerinin tespiti için, oda koşullarında kurutularak +4 °C’de analiz yapılacak zamana kadar bekletildi.

Aydınlık Uygulaması

Farklı ışık yoğunluklarının kallus gelişimi ve fenolik bileşen içeriği üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla kallus dokuları MS besi ortamına aktarıldı.

Hazırlanan MS Besi ortamı ışık şartları sırasıyla; karanlık ortam, kontrol (normal büyüme odası ışık koşulları) ve sürekli aydınlık şartlarına ayarlanmış ortamlarda büyümeye bırakıldı. Beşinci haftanın sonunda kalluslar besi ortamlarından alındıktan sonra hassas terazide tartılarak kallus taze ağırlığı ve gelişen kallusların renk ve morfolojik özelliklerine ait gözlemler kaydedilmiştir. Taze ağırlıkları tesbit edilen örnekler fenolik bileşen içeriklerinin tespiti için, oda koşullarında kurutularak +4 °C’de analiz yapılacak zamana kadar bekletildi.

3.2.2.4. Süspansiyon Kùltürleri

Süspansiyon Kùltürlerinin Başlatılması

Kallus kùltürü için tespit edilen optimize edilmiş besi ortamı koşulları süspansiyon kùltürü ortamı için de kullanıldı. Ancak kallus ortamından farklı olarak MS besi ortamına agar ilavesi yapılmadı. Kùltürlerin başlatılmasında, 100 mL’lik erlenlere 20 mL ve 250 mL’lik erlenlere 50 mL olacak şekilde sıvı besi ortamları bırakıldı. Daha sonra bu ortamlara, steril şartlar altında, kolayca dağılabilen ve granüler özellikteki kalluslar, istenmeyen kısımlarından arındırıldıktan sonra steril kabin içerisinde ve steril kurutma kağıtları üzerinde yaklaşık 0.5 gr olacak şekilde tartılarak, 20 mL sıvı MS besi ortamı içeren 100 mL’lik erlenlere konuldu. Kùltürlerin kontamine olmasını önlemek için erlenlerin ağzı iki kat steril alüminyum folyo ile en dış kısmı da parafilmle sarılarak kapatıldı. Hücre süspansiyonlarını bulunduran erlenmayerler 25±2 °C dereceye ayarlanmış çalkalayıcı üzerine yerleştirildi (Şekil 3.2.). Süspansiyon ortamındaki hücrelerin dağılmasını ve birbirinden ayrılmasını sağlamak amacıyla hücre süspansiyon kùltürü ortamları 100 rpm’e ayarlanan çalkalayıcıya bırakılarak büyüme odasında bekletildi (Ellialtıoğlu ve ark.. 1998).

Bu aşamada, süspansiyon kùltürlerinin başlatılması için gerekli özellikleri (Yeşil ve sarı renkli, iri, granüler yapı) taşıyan kallus tiplerinin üretildiği besi ortamları (Çizelge 3.3.) ve bu ortamlardan elde edilen kalluslar kullanıldı.

Çizelge 3.4. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması için kullanılan ortamlar

0.1 mg/L BAP+0.05 mg/L 2,4-D	0.1 mg/L KİN+0.2 mg/L 2,4-D
0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D	0.5 mg/L KİN+0.5 mg/L 2,4-D
1.0 mg/L BAP+2.0 mg/L 2,4-D	0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D

Bu kalluslar katı besi ortamından alındıktan sonra steril kurutma kağıtları üzerinde bistüri yardımıyla 4-5 parçaya ayrılarak, içerisinde 20 mL sıvı besi ortamı bulunan 100 mL'lik erlenlere aktarılarak, 14 günlük aralıklarla alt kültürleri yapıldı.

Hücrelerin birbirlerinden ayrılmasını sağlamak için süspansiyon kültürü ortamları, her 14 günde bir yapılan alt kültürlerde por çapları daha küçük olandan geçirilmek üzere, por çapları 500 µm, 250 µm ve 100 µm olan eleklerden (stainless steel süzgeç-cole parmer) geçirildi.

**Şekil 3.2.** Çalkalayıcı üzerindeki hücre süspansiyon kültürleri

Kültürlerin Devamlılığı

Hücre kültürleri belirli bir biyokütleyle ulaştıktan sonra 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ile 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D BBD kombinasyonlarını içeren sıvı MS besi ortamları hazırlandı. Daha sonra kültürler içerisinde 100 mL sıvı besi ortamı bulunacak şekilde 250 mL'lik erlenlere aktarılarak, 14 günlük aralıklarla alt kültürleri yapıldı.

Kültürdeki yalnızca hücrelerin süzüntüye geçmesini sağlamak için süspansiyon kültürü ortamları, por çapı 100 µm olan elekten geçirilmiştir. Hücrelerin birbirlerinden ayrılmasını sağlamak için kültürler 100 rpm hıza sahip çalkalayıcı (rotary shaker) üzerinde sıcaklığı 25±2 °C, gün uzunluğu 16 saat olan iklim odalarında kültüre alınmışlardır.

Bitki Büyüme Düzenleyicileri Uygulaması

Süspansiyon kültürlerinin gelişimi ve fenolik bileşik içeriği üzerine farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının etkilerini bulmak üzere süspansiyon kültürü başlatma çalışmalarında iyi bir şekilde dağılarak kaliteli süspansiyon kültürü oluşturabilen iki ortam kullanıldı. Bu ortam içerikleri aşağıdaki gibidir.

MS+0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D

MS+0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D

Farklı BBD kombinasyonlarında hazırlanan bu ortamlar,

Ortam şartları yukarıda belirtildiği şekilde ayarlandı ancak ortamın sıvı olabilmesi için agar ilavesi yapılmadı. Kültürler hücre gelişimlerini takip etmek amacıyla 0., 4., 7., 14., 21. ve 28. günlerde olmak üzere toplam 6 kez örnek alınarak (Bölüm 3.2.3.), kültürlerin PHH (paketlenmiş hücre hacmi), taze ağırlık ve kuru ağırlık değerlerine ait veriler kaydedilmiştir. 28 günlük süre sonrasında kültürler süspansiyondan ayrılarak (Bölüm 3.2.4.1) fenolik bileşen analizlerinin yapılacağı zamana kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

pH Uygulaması

Kültür ortamının pH değişikliklerinin kültürdeki hücrelerin gelişimi üzerine etkisini araştırmak için pH değerleri farklı MS besi ortamları hazırlandı. Bu amaçla pH kallus kültürü çalışmalarında kullanılan farklı pH ortamları içerisinde, kallus gelişiminin devam ettirilebildiği pH 4.5, 5.8, 6.5 değerleri süspansiyon kültürleri için de kullanıldı.

Kültür şartları ve örnek alımları yukarıda belirtilen şekilde yapılmıştır.

Sukroz Uygulaması

Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini teşvik etmek amacıyla yapılmış olan uygulamalardan biri de sukroz uygulaması olup, bu uygulama 1 kontrol (30 g/L sukroz) ve 2 farklı sukroz konsantrasyonu (15 g/L ve 50 g/L) olmak üzere 3 farklı gruptan oluşmuştur.

Kültür şartları ile kültürlerdeki hücre gelişimlerinin takibi ve fenolik bileşen içeriklerinin tayini için kültürlerin saklanması daha önce belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Işık Uygulaması

Süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin en iyi gelişim göstereceği ışık ortamını araştırmak için yaptığımız bu çalışmada beşer kaptan oluşan her bir süspansiyon grubu sırasıyla sürekli karanlık, sürekli aydınlık ve kontrol (16 saat aydınlık 8 saat karanlık) ışık yoğunluğuna tabi tutuldu.

Kültür şartları ile kültürlerdeki hücre gelişimlerinin takibi ve fenolik bileşen içeriklerinin tayini için kültürlerin saklanması daha önce belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.2.3. Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri

Taze Ağırlık Tayini

Süspansiyon kültürü hücrelerinin bulunduğu sıvı ortamdan 10 mL alınarak, 22 µm por çapındaki Millipor filtrelerden süzülür ve hücrelerle sıvı ortamın birbirinden ayrılması sağlandı. Sıvı ortamın uzaklaştırılmasıyla elde edilen hücreler, hassas terazide tartılarak taze ağırlığı ölçüldü. Taze ağırlık ölçümünde aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\text{Taze Ağırlık (g/L)} = \frac{\text{Taze Hücre Ağırlığı (g)}}{\text{Örnek Hacmi (mL)}} \times 1000$$

Kuru Ağırlık Tayini

Taze ağırlığı ölçülen hücreler, ısısı önceden 60 °C'ye ayarlanmış etüvde 16 saat bekletilerek kurutuldu. Kurutulmuş hücreler sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar tartılarak ölçüm sonuçları kaydedildi. Kuru ağırlık hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\text{Kuru Ağırlık (g/L)} = \frac{\text{Kuru Hücre Ağırlığı (g)}}{\text{Örnek Hacmi (mL)}} \times 1000$$

Paketlenmiş Hücre Hacmi Tayini

Hücre süspansiyonlarının bulunduğu sıvı ortamdan 10 mL alınarak 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 5 dakika süre ile 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki peletin hacmi PHH olarak hesaplandı.

Paketlenmiş Hücre Hacmi (mL)

$$\text{PHH (mL/L)} = \frac{\text{Paketlenmiş Hücre Hacmi (mL)}}{\text{Örnek Hacmi (mL)}} \times 1000$$

3.2.4. Analiz İşlemleri

3.2.4.1. Ekstraksiyon İşlemleri

Bitki Örneklerin Hazırlanması

H.retusum'un doğadan toplanan örnekleri, öncelikle laboratuvara getirildikten sonra kök, gövde ve yaprak kısımları ayrıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutma kağıtları üzerinde kurutuldu. Kurutulan materyaller, bir öğütme makinesinde toz haline getirildi. Her bir bitki kısmına ait toz halindeki örneklerden yaklaşık 200 mg kuru materyal tartıldı.

In vitro ortamdan elde edilen kallus dokuları besiyerlerinden alındıktan sonra pens ve bisturilerle istenmeyen kısımları kesilerek uzaklaştırıldı ve dokular daha sonra oda sıcaklığında, kurutma kağıtları üzerinde kurutuldu. Kurutulan örnekler bir öğütme makinesinde toz haline getirildi.

Süspansiyon kültürü ortamındaki hücreleri sıvı ortamdan ayırmak için kültürler, vakum altında Whatman No.1 filtre kâğıtlarından süzüldü. Hücrelerin yaş ağırlıkları kaydedildi. Daha sonra örnekler sıvı azotla donduruldu. Dondurulan Örnekler dondurarak kurutma yöntemi olan liyofilizatörde 18 saat boyunca kurutuldu. Örnekler kullanılacağı zamana kadar buzdolabında -20 °C'de tutuldu.

Ekstraksiyon

Kuru örneklerin her birinden alınan 0.20 g bitki materyali üzerine 10 mL metanol eklenip çözelti 5 dakika süre ile sonikatörde özütlendi. Özütleme işleminden sonra elde edilen çözelti vakum süzüldü. Bu işlemler 3 kez tekrarlandı Üç işlem sonunda elde edilen metanol kısımları 50 mL'lik cam balonlarda toplandı. Çözeltideki metanol evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra kabın içinde, hiperisin bileşiklerini içeren renkli bir tortu oluştu. Bu tortu metanolla çözülüp uygun seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra LC-MS/MS'e enjekte edildi.

3.2.4.2. Analizler

Fenolik bileşen içerikleri analizlerinin tümü Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kimyasal Analiz Laboratuvarı, Kütle Spektrometre ve Kromatografi Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan Cihaz ve Kromatografik Şartlar

Çalışmada Shimadzu marka LC-MS 8040 model üçlü kuadrupol kütle spektrometresi (LC MS/MS) kullanıldı. Bu cihaza bağlı olan kromatografi ünitesi, Shimadzu Nexera serisi binary gradient pompalı (max basınç 130 mPa) UHPLC dır.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan LC-MS/MS Koşulları

Parametreler	
UHPLC modülleri	
Online degasser	(DGU-20A3R)
Binary gradient pump	(LC-30AD)
Oto örnekleyici	(SIL-30AC)
Kolon Fırını	(CTO-10ASvp)
UHPLC gradient metot parametreleri	
Mobil faz akış hızı	0,35 mL/dk
Kolon	Inertsil ODS-4 C-18 (2µm, 2.1 mm×50 mm)
Numune enjeksiyon hacmi	5 µL
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C
Mobil Faz A	% 0.1 Formik asit/H ₂ O
Mobil Faz B	% 0.1 Formik asit/Metanol
Gradient pompa başlangıç konsantrasyonu	% 45 B
Kütle Spektrometre parametreleri	
Interface Sıcaklığı	350 °C
DL Sıcaklığı	250 °C
Heat Block Sıcaklığı	400 °C
Nebulizing Gaz (N ₂) akış hızı	3.00 l/dk
Drying Gaz (N ₂) akış hızı	15.00 l/dk
CID (Ar) gaz basıncı	17 kPa

3. MATERYAL ve METOT

Çizelge 3.6. Gradient UHPLC metot zaman çizelgesi

Zaman (dk)	Pompa	Değer
0,01	B	% 45
1,50	B	% 95
3,50	B	% 95
3,51	B	% 45
6,00	B	Bitiş

Çizelge 3.7. MRM Metot parametreleri

Bileşik	Öncü iyon(M-H ⁺)	Ürün iyonlar (CE Voltajı)
Hiperisin	503.20	433.00 (53V), 405.00 (61V)
Hiperosid	462.80	299.90 (28V), 271.00 (46V)
Klorogenik Asit	353.20	191.10 (18V), 85.00 (47V)
Kuersetin	300.80	179.00 (19V), 151.00 (22V)
Pseudohypericin	518.80	487.10 (54V), 475.00 (48V)
Rutin	608.90	300.00 (40V), 271.00 (61V)

Numuneler metanolde çözülerek seyreltikten sonra 0,2 µm filtreden geçirildi ve cihaza enjekte edildi.

UHPLC için UV veya DAD dedektörü kullanılmadı, doğrudan kütle dedektörüne gönderildi. UHPLC-ESI-MS/MS MRM metodu negatif iyon modunda oluşturuldu.

3.2.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Kullanılan Kimyasallar

Büyüme ortamı olarak kullanılan MS (Murashige-Skoog) besi ortamının tüm elemanları (makro elementler, mikro elementler ve vitamin elementleri) Sigma-Aldrich'den satın alındı. Karbon kaynağı olarak kullanılan sukroz ve glukoz ayrıca ortamın katılaştırılmasında kullanılan agar Sigma-Aldrich'den satın alındı. Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan metanol ve kloroform Sıal'den alındı.

Bitki büyüme maddesi olarak kullanılan 2,4-D, BAP, KİN, GA₃, NAA ve standart olarak kullanılan hiperisin, hiperosid, klorogenik asit, rutin, kuersetin, psödohiperisin standartları Sigma-Aldrich'den satın alındı.

Kullanılan Cihazlar

Sterilizasyon işlemlerinde etüv (J.P. Selecta, s.a, Spain) ve otoklav (ALP-CL-40M, Japan), süspansiyon kültürlerinin karıştırılmasında çalkalayıcı (J.P. Selecta, s.a, Spain), tartım işlemlerinde hassas terazi (Precisa, XT-320M, Spain) kullanılmıştır. Süspansiyon kültürlerinin çökeltilmesi işleminde santrifüj (Thermo Scientific, Heraeus Labofuge 200), süspansiyon kültüründeki hücrelerin dondurularak kurutulması işlemlerinde liyofilizatör (Christ, Alpha 2-4 LD plus), fenolik bileşiklerin özütlenmesinde sonikatör (Sanyo MSE-Soniprep 150, U.K.), ekstraksiyon çalışmalarında fazla metanolün uçurulması işlemlerinde evaporatör (IKA, RV 10 DS 99) kullanılmıştır.

3.2.6. İstatiksel Analiz

Fenolik bileşen analizleri sonucunda elde edilen bulgular ile kültürlerin PHH (paketlenmiş hücre hacmi), taze ağırlık ve kuru ağırlık ölçümlerinden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapılmıştır. Kùltürler üzerinde çalışılan farklı uygulamalarla oluşturulan farklı gruplar arasında, parametreler arasındaki farklılığın belirlenmesi için Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Kruskal Wallis testi sonrası ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Sonuçlar üç tekrarın ortalaması olarak verilmiştir. Testlerde anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Doğal Ortamda Yetişen *Hypericum retusum*'un Farklı Organlarının Fenolik Bileşen İçerikleri

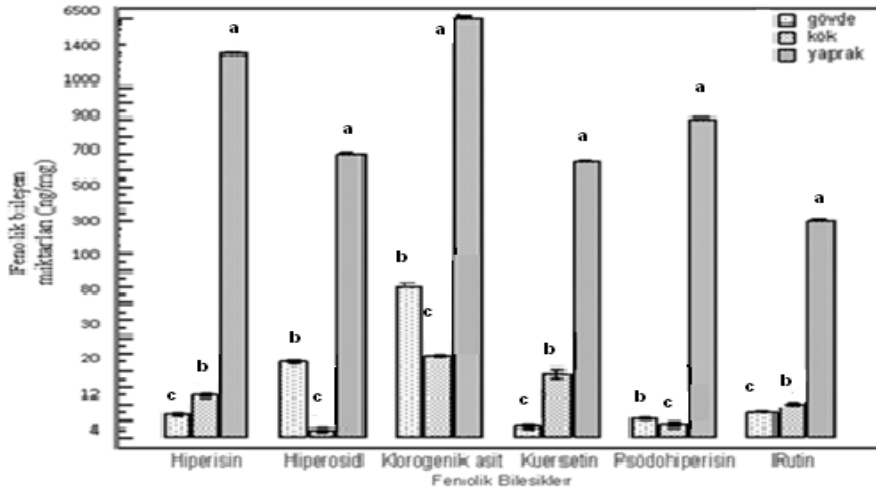
Kallus kültürünün başlatılmasında kullanılacak en uygun eksplantın belirlenmesi amacıyla; *H. retusum*'un farklı organlarının fenolik bileşen içerikleri araştırıldı. Doğal ortamdan toplanan bitkilerin kök, gövde ve yaprak kısımları ayrı ayrı oda sıcaklığında kurutuldu ve her bir organın fenolik bileşen içeriği LC-MS/MS ile belirlendi. *H. retusum*'un farklı organlarının fenolik bileşen içerikleri aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Doğal ortamda yetişen *H. retusum*'un farklı organlarının fenolik bileşen içerikleri (ng/mg).

Fenolik bileşenler						
	Hiperisin	Hiperosid	Klorogenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
Gövde	5.305±0.356c	17.846±0.398b	81.489±0.677b	2.661±0.496c	4.403±0.266b	6.008±0.085c
Kök	9.986 ±0.296b	1.826±0.475c	19.283±0.202c	15.181±1.001b	2.972±0.467c	7.996±0.389b
Yaprak	1411.206±11.48a	797.992±11.175a	6534.252±7.882a	573.598±8.659a	933.862±6.058a	347.141±1.003a

Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak $P \leq 0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Verilere uygulanan istatistiksel analizler sonucu kök, gövde ve yapraktaki fenolik bileşen miktarları arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu tesbit edilmiştir. Fenolik bileşik miktarları en yüksek, yaprakta elde edilmiştir. Yapraktaki bu bileşikler içerisinde en yüksek oranda bulunan bileşik, klorogenik asit (6534.252 ng/mg) en düşük oranda ise rutindir (347.141 ng/mg). Ayrıca hiperisin miktarı (1411.206 ng/mg) da yüksek seviyede bulunmuştur. Gövdede en yüksek miktardaki bileşik, klorogenik asit (81.489 ng/mg), en düşük miktardaki bileşik ise kuersetindir (2.661 ng/mg). Klorogenik asit (19.283 ng/mg) ve hiperosid (1.826 ng/mg) kökte sırasıyla en yüksek ve en düşük miktarlarda tesbit edilen bileşiklerdir. Hiperisin bileşiği kök ve gövdede de bulunmuş fakat yapraktaki hiperisin miktarına göre oldukça düşük oranda (% 1'in altında) kalmıştır (Çizelge 4.1.).



Şekil 4.1. *H. retusum*'un değişik organlarının fenolik bileşen içerikleri. Grafikte kök, gövde ve yaprak dokuları her fenolik bileşen grubunda kendi içinde karşılaştırılmıştır ($P \leq 0.05$).

H. retusum'un farklı organlarına ait özütlerin LC-MS/MS analizleri sonucu hiperisin, hiperosid, klorogenik asit, kuersetin, psödohiperisin ve rutin, bileşiklerinin tümü en yüksek değeri yaprakta vermiştir.

Kök ve gövde fenolik içerikleri karşılaştırıldığında, hiperisin, kuersetin ve rutin içerikleri kökte daha fazla miktarda bulunurken, hiperosid, klorogenik asit ve psödohiperisin içerikleri gövdede daha fazla miktarda tesbit edilmiştir (Şekil 4.1).

4.2. Kallus Dokularının Geliştirilmesi

H. retusum'un tohumları hormonsuz ortamda çimlendirildikten sonra oluşan bitkicikler sürgün elde etmek üzere 0.5 mg/L BAP ilaveli MS besi ortamında kültüre alınarak stok kültürler üretildi (Namlı ve ark. 2010). Stok kültürlerin yaprak eksplantları kallus oluşturmak için kullanıldı.

4.2.1. Yaprak Eksplantlarından Kallus oluşturulması ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine BBD'lerinin Farklı Kombinasyonlarının Etkisi

Proliferasyon ortamında çoğaltılan sürgünlerden elde edilen yaprak eksplantları dört parçaya ayrılarak kallus oluşturmak üzere kültüre alındı. Kallus oluşumu için kullanılan ortamlar ile kallus oluşum oranları ve oluşan kallus tipi çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Yaprak eksplanlarından kallus oluşturulması üzerine farklı BBD kombinasyonlarının etkisi

Sitokininler	Oksinler	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı	Kallus oluşum oranı (%)	Kallus tipi
BAP (mg/L)	NAA (mg/L)			
0.1	0.05	40	5	Kahverengi, ufak
0.1	0.1	40	7.5	Kahverengi, ufak
0.1	0.2	40	–	
0.1	0.5	40	–	
0.5	0.25	40	–	
0.5	0.5	40	–	
0.5	1.0	40	20	Kahverengi, ufak-sürgünler oluştu
1.0	0.5	40	–	
1.0	1.0	40	5	
1.0	2.0	40	35	Yeşil, iri, sert -sürgünler oluştu
BAP (mg/L)	2,4D(mg/L)			
0.1	0.05	40	55	Koyu yeşil, iri, sert
0.1	0.1	40	–	
0.1	0.2	40	–	
0.1	0.5	40	20	Açık yeşil, iri, granüler
0.5	0.25	40	–	
0.5	0.5	40	7.5	Koyu yeşil, iri, sert
0.5	1.0	40	2.5	Koyu yeşil, iri, sert
1.0	0.5	40	–	
1.0	1.0	40	12.5	Koyu yeşil, iri, sert
1.0	2.0	40	32.5	Açık yeşil, iri, dağılmayan
KİN(mg/L)	NAA(mg/L)	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı	Kallus oluşum oranı(%)	Kallus tipi
0.1	0.05	40	–	
0.1	0.1	40	–	
0.1	0.2	40	25	Kahverengi, ufak
0.1	0.5	40	50	Kahverengi, ufak
0.5	0.25	40	–	
0.5	0.5	40	–	
0.5	1.0	40	–	
1.0	0.5	40	–	
1.0	1.0	40	–	
1.0	2.0	40	–	
KİN(mg/L)	2,4-D(mg/L)			
0.1	0.05	40	15	Ufak, sert, kahverengileşmiş
0.1	0.1	40	17.5	Kırmızı, kahverengi, ufak, yumuşak
0.1	0.2	40	37.5	Açık yeşil, iri, yumuşak
0.1	0.5	40	32.5	Kahverengi, ufak, yumuşak
0.5	0.25	40	5	Kahverengi, ufak, yumuşak
0.5	0.5	40	30	Açık yeşil, ufak, granüler
0.5	1.0	40	70	Yeşil, iri, granüler
1.0	0.5	40	–	
1.0	1.0	40	20	Kahverengi, ufak, sert
1.0	2.0	40	40	Koyu yeşil, iri, sert, yer yer kahverengi, kırmızılıklar

4. BULGULAR

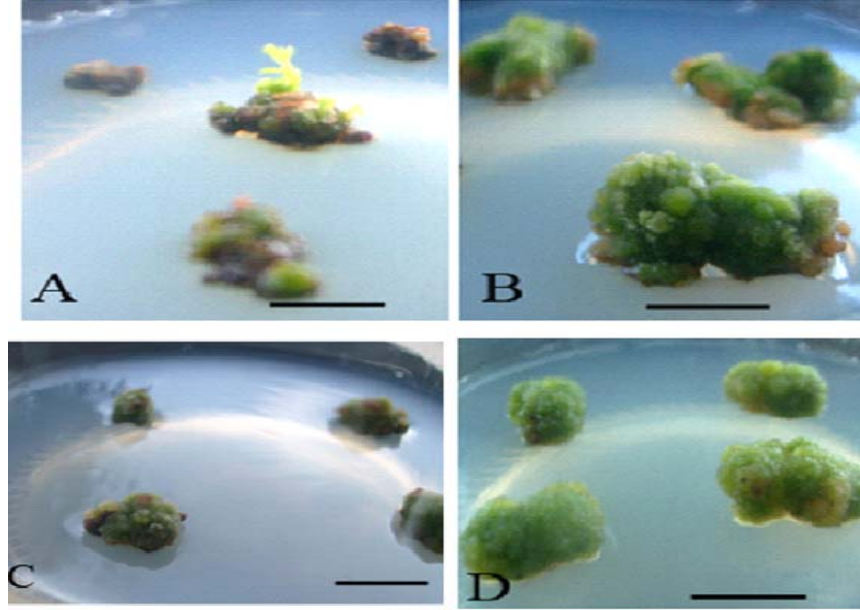
Kültürün 4. haftasında yaprak eksplantlarından kallus dokuları belirmeye başladı.

BAP ve NAA kombinasyonlarının kullanıldığı MS besi ortamlarında en yüksek kallus oluşum oranları 1.0 mg/L BAP+ 2.0 mg/L NAA (% 35) ve 0.5 mg/L BAP+1.0 mg/L NAA (% 20) ortamlarından elde edilmiştir. 0.1 mg/L BAP+0.05 mg/L NAA ve 0.1 mg/L BAP+0.1 mg/L NAA kullanılan MS besi ortamlarında ise kallus oluşum oranı (% 5 ve % 7.5) oldukça düşük düzeylerde kalmıştır. Aynı BBD'lerinin diğer kombinasyonlarında ise kallus oluşumu gözlenmemiştir.

BAP ve 2,4-D'nin farklı kombinasyonlarının kullanıldığı MS besi ortamlarında en yüksek kallus oluşum oranları (% 55 ve % 32.5) 0.1 mg/L BAP +0.05 mg/L 2,4-D ve 1.0 mg/L BAP +2.0 mg/L 2,4-D kullanılan ortamlardan elde edilmiştir. Bu BBD kombinasyonunun kullanıldığı bazı ortamlarda (0.1 mg/L BAP +0.1 mg/L 2,4-D; 0.1 mg/L BAP +0.2 mg/L 2,4-D; 0.5 mg/L BAP+0.25 mg/L 2,4-D; 1.0 mg/L BAP +0.5 mg/L 2,4-D) da kallus oluşumu gözlenmemiştir.

KİN ve NAA'nın farklı kombinasyonlarının kullanıldığı MS besi ortamlarında sadece, 0.1 mg/L KİN + 0.5 mg/L NAA (% 50) ve 0.1 mg/L KİN + 0.2 mg/L NAA(% 25) gruplarında kallus oluşmuştur.

KİN ve 2,4-D'nin farklı kombinasyonlarının kullanıldığı MS besi ortamlarında, en yüksek kallus oluşum oranı, 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D (% 70) ortamından elde edilmiştir. Bunun yanında 1.0 mg/L KİN +2.0 mg/L 2,4-D (% 40) 0.1 mg/L KİN +0.2 mg/L 2,4-D (% 37.5) ve 0.1 mg/L KİN +0.5 mg/L 2,4-D (% 32.5) ortamlarında da yine kallus oluşum oranları yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2.).



Şekil 4.2. BBD'nin farklı kombinasyonlarında gelişen kallus dokuları. A: 0.5 mg/L BAP+ 1 mg/L NAA, B: 0.1 mg/L BAP+ 0.05 mg/L 2,4-D, C: 0.1 mg/L KİN+0.2 mg/L 2,4-D, D:0.5 mg/L KİN+1 mg/L 2,4-D, (Bar:1 cm)

BAP ve NAA kombinasyonlarının kullanıldığı ortamda (0.1 mg/L BAP +0.05 mg/L NAA) oluşan kallusların oldukça küçük olduğu ve gelişimin ilk haftalarından itibaren görülen kahverengileşmenin ileriki haftalarda daha da arttığı gözlemlendi. 0.5 mg/L BAP +1.0 mg/L NAA içeren MS ortamındaki kalluslarda da aynı şekilde kahverengileşmeler görüldü fakat bu grup kalluslarda sürgün oluşumu da gözlemlendi. Bu kombinasyonlar içinde en iyi gelişim gösteren ortam, yeşil renkli ve iri kallusların oluştuğu, 1.0 mg/L BAP+2.0 mg/L NAA olmuştur. BAP+2,4-D kombinasyonlarını içeren besi ortamlarında genellikle yeşil renkte ve iri yapıda kalluslar oluşmuştur.

KİN ve NAA kullanılan ortamlarda gelişen kallusların kahverengi ve oldukça küçük yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Bu gruptaki kallusların 4. haftadan sonra karararak gelişimleri durmuştur. KİN+2,4-D kombinasyonlarında, 0.1 mg/L KİN +0.2 mg/L 2,4-D kullanılan ortamdaki kalluslar yeşil, iri fakat kolay dağılmayan yumuşak yapıdayken, 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D kullanılarak hazırlanan besi ortamlarında gelişen kallusların yeşil renkte, büyük ve kolay dağılabilen yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 0.5 mg/L KİN +0.5 mg/L 2,4-D kullanılan ortamdaki kalluslar da yeşil renk göstermiş fakat kalluslar daha ufak yapıda kalmışlardır. Bu kombinasyonun kullanıldığı diğer ortamlardaki kalluslar üzerinde 4. haftadan sonra kahverengileşmelerin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).

4. BULGULAR

Çalışmamızda ayrıca BBD'lerinin farklı kombinasyonları kullanılarak hazırlanan besi ortamları içerisinde en iyi kallus oluşumunu sağlayan A, B, C ve D ortamlarında gelişen kallusların ve bu ortamların, kallus dokularının fenolik bileşen içerikleri üzerindeki etkilerinin de araştırılması amacıyla, LC-MS/MS analizleri yapılmıştır. Bu gruplara ait fenolik madde çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Yaprak eksplantlarından oluşturulan kallus dokularının fenolik bileşen içerikleri üzerine farklı BBD kombinasyonlarının etkisi(ng/mg)

Fenolik Bileşikler						
BBD	Hiperisin	Hiperosid	Klorogenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
A	2.843± 0.836a	3.354± 0.666c	1.236±0.485c	0.389±0.077b	3.549 ±0.521a	T.E.*
B	1.560 ± 0.515b	13.898 ± 0.327a	2.324 ±0.345b	0.964±0.289b	1.529 ±0.279b	0.323± 0.174a
C	1.364 ±0.337b	6.770±1.139b	1.472 ± 0.596c	0.790±0.0419b	1.566± 0.954b	0.525 ± 0.365a
D	2.955 ±0.752a	2.404±0.614c	3.316±1.652a	1.466±0.826a	4.733±0.882a	T.E.*

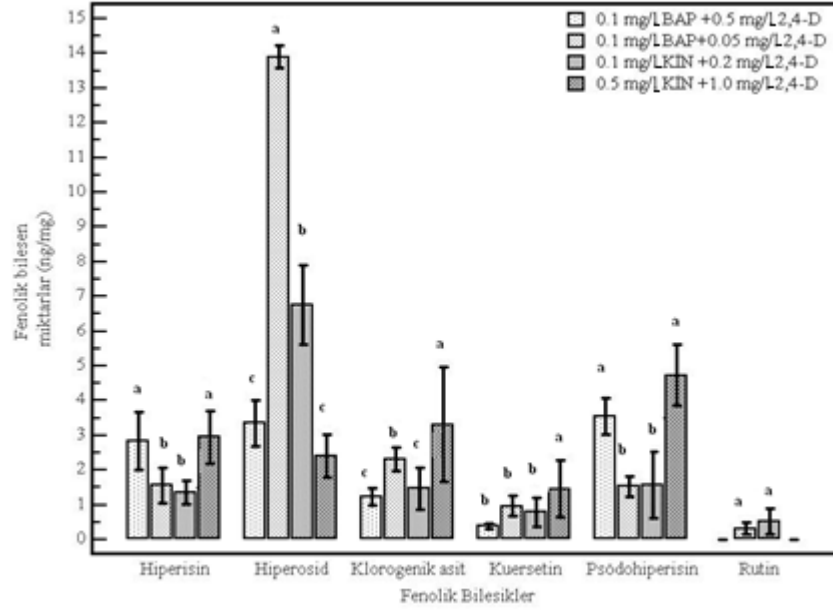
A: 0.1 mg/L BAP +0.5 mg/L 2,4-D, B:0.1 mg/L BAP+0.05 mg/L 2,4-D; C:0.1 mg/L KİN +0.2 mg/L 2,4-D; D:0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D. T.E*.tesbit edilemedi. Bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların istatistiksel olarak $P \leq 0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir. ± standart sapma.

En yüksek hiperisin içeriği (2.955 ng/mg) 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ilaveli ortamda gelişen kalluslardan elde edilmiştir. Hiperosid içeriği 0.1 mg/L BAP + 0.05 mg/L 2,4-D ilaveli ortamda gelişen kalluslarda en yüksek miktarda (13.898 ng/mg) bulunmuştur. Klorogenik asit, kuersetin ve psödohiperisin bileşiklerinin en yüksek miktarları (3.316 ng/mg, 1.466 ng/mg ve 4.733 ng/mg) yine 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ilaveli ortamda gelişen kalluslardan elde edilmiştir. Rutin içeriği sadece 0.1 mg/L BAP + 0.05 mg/L 2,4-D (0.323 ng/mg) ve 0.1 mg/L KİN + 0.2 mg/L 2,4-D (0.525 ng/mg) içeren ortamlardaki kalluslarda bulunmuş, diğer ortamlardan gelişen kalluslarda ise tesbit edilememiştir.

0.1 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D ortamında gelişen kalluslarda psödohiperisin (3.549 ng/mg) en yüksek miktarlarda, kuersetin (0.389 ng/mg) en düşük miktarlardaki bileşikler olarak bulunmuştur. Rutin bileşiği tesbit edilememiştir.

0.1 mg/L BAP+ 0.05 mg/L 2,4-D ilaveli MS ortamındaki kalluslarda, en yüksek miktarda bulunan bileşen hiperosid (13.898 ng/mg), en düşük miktarda bulunan bileşen ise rutin (0.323 ng/mg) olmuştur.

0.1 mg/L KİN +0.2 mg/L 2,4-D ilaveli MS ortamındaki kalluslarda hiperosid (6.770 ng/mg) içeriği en yüksek miktarlarda bulunurken, rutin (0.525 ng/mg) en düşük miktarlarda tesbit edilmiştir. 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ortamında gelişen kalluslarda, psödohiperisin (4.733 ng/mg) en yüksek miktarlarda, kuersetin (1.466 ng/mg) en düşük miktarlardaki bileşikler olarak saptanmıştır. Rutin bileşiği tesbit edilememiştir(Çizelge 4.3).



Şekil 4.3. Kallus dokularının fenolik bileşen içerikleri üzerine BBD'lerinin farklı kombinasyonlarının etkisi. Grafikte farklı BBD grupları, her bir fenolik bileşen grubunda kendi aralarında karşılaştırılmıştır ($P \leq 0.05$).

Şekil 4.3'te farklı BBD kombinasyonlarında geliştirilen kallusların fenolik bileşen içerikleri gösterilmektedir. Çalışılan bu gruplar içerisinde, en yüksek miktarda bulunan bileşenin hiperosid, en düşük miktarda bulunan bileşenin ise rutin olduğu belirlenmiştir.

Bu ortamlar içerisinde, araştırılan bileşikler (hiperosid hariç) için en iyi ortam, 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D BBD'lerinin kullanıldığı MS besi ortamı olarak tesbit edildi.

4.2.2. Kallus Kültürlerinin Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Sukroz ve Glukozun Farklı konsantrasyonlarının Etkisi

Hem kallus gelişimi hem de fenolik bileşen açısından iyi sonuçlar veren 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D konsantrasyonlarının kullanıldığı besi ortamında

4. BULGULAR

yetişen kalluslar üzerine, farklı şeker konsantrasyonlarının etkileri de araştırıldı. Bu çalışma için glukoz ve sukrozun farklı konsantrasyonları kullanıldı.

Gelişen kallus dokularına ait, kallus taze ağırlığı ve kallus tipleri çizelge 4.4'te verilmiştir.

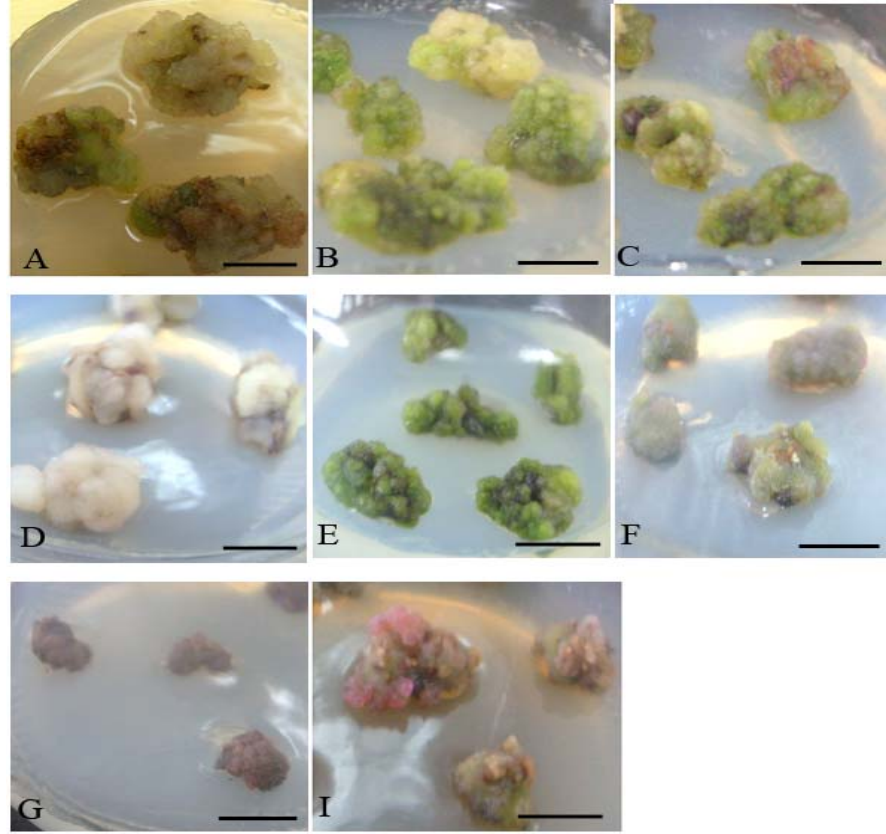
Çizelge 4.4. Kallus gelişimi üzerine farklı şeker konsantrasyonlarının etkisi

Şeker Tipi ve Konsantrasyonları	Kallus Ortalama Taze Ağırlığı (mg/Kallus)	Kallus Tipi
Şeker içermeyen	83.2±7.563 d	Kahverengi, ufak, yumuşak
Sukroz 15 (g/L)	452.2±14.307 a	Sarımsı, iri, granüler
Sukroz 30 (g/L)	362.8±10.084 b	Yeşil, iri, granüler
Sukroz 50 (g/L)	231.4±9.864 c	Yeşil, daha küçük, dağılmayan
Glukoz 15 (g/L)	430.4±18.420 a	Beyaz, iri, granüler
Glukoz 30 (g/L)	339.8±12.153b	Yeşil, iri, granüler
Glukoz 50 (g/L)	208.6±8.532 c	Koyu yeşil, küçük, dağılmayan

Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$). ± standart sapma.

Sukroz ve glukoz şekerlerinin kullanıldığı ortamlarda gelişen kalluslarda en yüksek taze ağırlık artışının sukroz kullanılan ortamlarda gerçekleştiği bulunmuştur. Şeker ilave edilmeyen kontrol grubunda taze ağırlık değerinde (83.2 mg/kallus) fazla bir artış sağlanamamıştır.

Sukroz içeren besi ortamlarında en yüksek taze ağırlık miktarı (452.2 mg/kallus), 15 g/L sukroz içeren besi ortamındaki kalluslardan elde edilmiştir. 15 g/L glukoz ilave edilen besi ortamında gelişen kallusların da glukoz kullanılan ortamlar arasında en yüksek taze ağırlık miktarına (430.4 mg/kallus) sahip olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.4. Farklı şeker konsantrasyonlarında gelişen kallus dokuları; A:Sukroz 15 g/L, B:Sukroz 30 g/L, C:Sukroz 50 g/L, D:Glukoz 15 g/L, E: Glukoz 30 g/L, F: Glukoz 50 g/L, G:Şeker kullanılmayan MS ortamı I: Yüksek şeker konsantrasyonunda gelişen kırmızı renkli kalluslar

Şeker ilave edilmeyen kontrol grubunda kallusların ilk haftadan sonra gelişme göstermediği ve kahverengileşmelerin yoğun olduğu gözlenmiştir.

15 g/L sukroz içeren ortamdaki kallusların oldukça iri sarımsı ve granüler yapıda, 30 g/L sukroz içeren ortamda gelişen kallusların yine iri granüler ve yeşil renkte olduğu gözlenmiştir. 15 g/L glukoz ilave edilen besi ortamında da iri beyaz ve granüler yapıda kalluslar oluşmuştur. 30 g/L glukoz grubunda yine iri fakat daha yeşil renkli kalluslar görülürken, 50 g/L glukoz'lu gruplardaki kallusların daha küçük koyu yeşil renkte ve dağılmayan bir yapıda olduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca sukroz ve glukozun yüksek konsantrasyonlarında gelişen kallus dokularında kırmızı renkli oluşumlar görülmüştür (Şekil 4.4).

Çalışılan bu ortamlar içerisinde kallus taze ağırlığı ile kallusların doku, büyüklük ve renk özellikleri dikkate alındığında en iyi ortamın 30 g/L sukroz kullanılan ortam olduğu tesbit edildi.

4. BULGULAR

Araştırılan farklı şeker ve konsantrasyonlarında, gelişimin en iyi olduğu 15, 30 ve 50 g/L sukroz ve glukoz konsantrasyonlarında gelişen kallusların LS-MS/MS ile fenolik bileşen içerikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

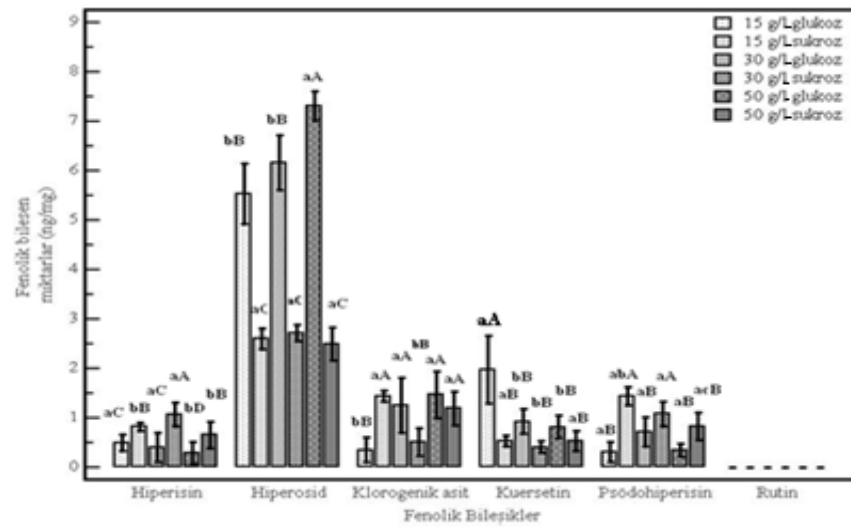
Çizelge 4.5. Kallus gelişimi üzerine farklı şeker konsantrasyonlarının etkisi

		Fenolik Bileşikler					
Şeker(g/L)		Hiperisin	Hiperosid	Klorogenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	R*
	K*	—	—	—	—	—	—
Sukroz	15	0.827±0.083bB	2.608±0.212aC	1.441±0.107aA	0.529±0.111aB	1.447±0.181abA	T.E.
	30	1.074±0.242aA	2.724±0.162aC	0.519±0.283bB	0.414±0.125bB	1.086±0.249aA	T.E.
	50	0.658±0.267bB	2.505±0.331aC	1.198±0.337aA	0.535±0.200aB	0.827±0.275acB	T.E.
Glukoz	15	0.499±0.162aC	5.539±0.607bB	0.358±0.251bB	1.987±0.682aA	0.315±0.195aB	T.E.
	30	0.401±0.299aC	6.164±0.561bB	1.258±0.559aA	0.933±0.253bB	0.721±0.303aB	T.E.
	50	0.297±0.223bD	7.312±0.298aA	1.473±0.472aA	0.822±0.227bB	0.346±0.129aB	T.E.

K*:Kontrol, R*:Rutin, T.E.:Tesbit edilemedi. Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir. Küçük harfler şeker gruplarının kendi içinde, Büyük harfler iki şeker grubu arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir (P≤0.05). ± standart sapma.

Sukroz kullanılan ortamlar içerisinde, hiperisin içeriği 30 g/L sukroz kullanılan ortamda geliştirilen kalluslarda yüksek miktarda bulunurken, hiperosid içeriklerinin kendi aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir. Klorogenik asit 15 g/L sukroz kullanılan ortamda geliştirilen kalluslarda yüksek miktarda (1.441 ng/mg) elde edilmiştir. Kuersetin miktarları 15 ve 50 g/L sukroz sukroz kullanılan ortamlarda yakın değerlerde (0.529 ve 0.535 ng/mg) bulundu. Psödohiperisin içeriğinin 15 g/L sukroz bulunan besi ortamındaki kalluslarda en yüksek miktarda(1.447 ng/mg) bulunduğu tesbit edilmiştir.

Glukoz gruplarında, hiperisin miktarlarında, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir. Hiperosid miktarı en yüksek (7.312 ng/mg) 50 g/L glukoz içeren besi ortamındaki kalluslarda elde edilmiştir. Klorogenik asit miktarının ise 50 g/L glukoz içeren besi ortamındaki kalluslarda en yüksek içeriğe (1.473 ng/mg) sahip olduğu tesbit edilmiştir. Kuersetin miktarları 15 g/L glukoz içeren besi ortamındaki kalluslarda en yüksek miktarda (1.987 ng/mg) bulunurken, psödohiperisin miktarlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.5.).



Şekil 4.5. Kallusların fenolik bileşen içerikleri üzerine farklı şeker konsantrasyonlarının etkisi. Grafikte farklı şeker grupları, her bir fenolik bileşen grubunda kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Küçük harfler şeker gruplarının kendi içinde, Büyük harfler iki şeker grubu arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Hiperisin ve psödohiperisin içerikleri sukroz gruplarında daha yüksek değerde bulunmuştur. Hiperosid ve kuersetin içerikleri ise glukoz gruplarında daha fazla miktarda elde edilmiştir. Klorogenik asit içerikleri birbirine yakın değerler göstermiştir. Bu gruplar içerisinde en fazla miktarda elde edilen bileşik hiperosid olmuştur. Rutin bu ortamlarda gelişen kalluslarda tespit edilememiştir (Şekil 4.5).

Çizelge ve Şekil 4.5.'ten de anlaşıldığı gibi, fenolik bileşen içeriklerinin miktarları, çalışılan şeker tipi ve konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Fakat kallus gelişinde iyi sonuçlar elde edilen 30 g/L sukroz ortamında gelişen kallusların fenolik bileşen içerikleri de iyi sonuçlar vermiştir.

4.2.3. Kallus Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Farklı pH Değerlerinin Etkisi

H. retusum'un kallus gelişimi üzerinde farklı pH değerlerinin etkilerini araştırmak amacıyla kalluslar pH değerleri sırasıyla 3.5, 4.5, 5.8, 6.0, 6.5 ve 7.0 olarak ayarlanan MS besi ortamlarında kültüre alındı. Kallusların gelişimleri izlenerek 5 hafta sonunda taze ağırlık tayini yapıldı. Kallusların gelişim özellikleri ve taze ağırlıklarına ait veriler çizelge 4.6'da verilmiştir.

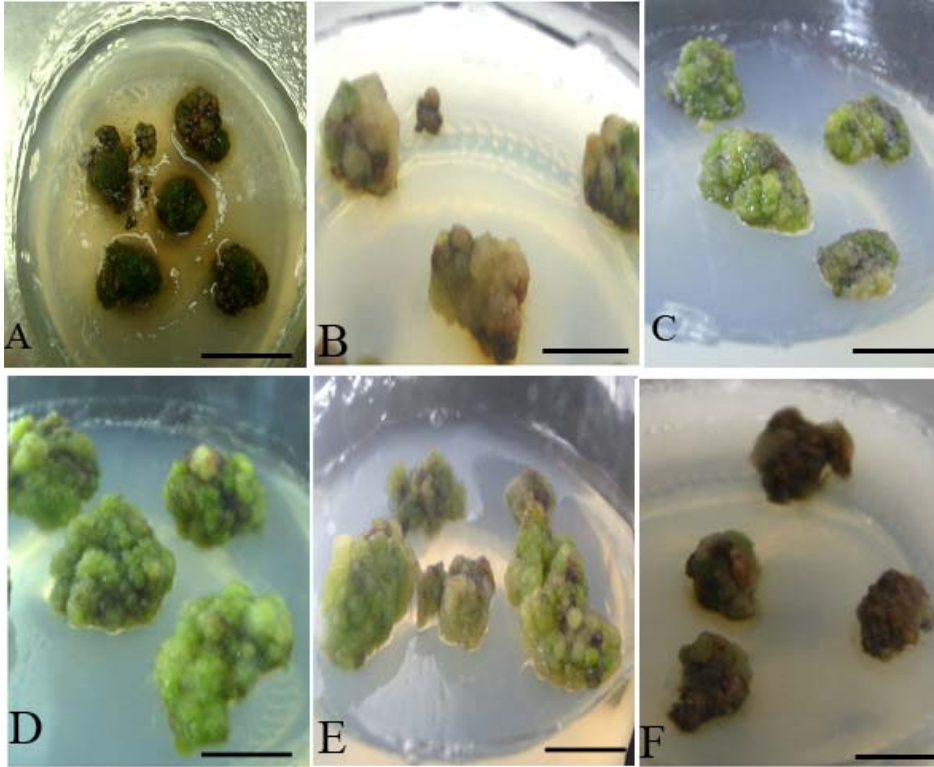
4. BULGULAR

Çizelge 4.6. Kallus gelişimi üzerine farklı pH değerlerinin etkisi

pH Değerleri	Ortalama Taze Ağırlık (mg/kallus)	Kallus özelliği
3.5	166.7±6.652e	Ufak,kahverengi yumuşak
4.5	204.5±8.266d	Sarımsı, yeşil, yumuşak
5.8	253.5±9.327c	Yeşil, granüler
6.0	301.2±7.675b	Koyu yeşil, sert
6.5	510.2±9.569a	Koyu yeşil, Sert, iri
7.0	201.7±7.410d	Kahverengi, sert

Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir($P \leq 0.05$). \pm standart sapma.

Çizelge 4.6' da görüldüğü gibi, en yüksek ortalama kallus taze ağırlık değeri (510.2 mg) pH 6.5 olarak ayarlanan ortamda gelişen kalluslardan elde edilmiştir. En düşük ortalama kallus taze ağırlığı (166.7 mg) pH 3.5 ortamından elde edilmiş pH 7.0 ortamında ise ortalama kallus taze ağırlık değeri (201.7 mg) düşmüştür.



Şekil 4.6. Farklı pH ortamlarında gelişen kallus dokuları: A: pH 3.5, B: pH 4.5, C: pH 5.8, D: pH 6.0, E: pH 6.5 ve F: pH 7.0 ortamında gelişen kalluslar(Bar: 1 cm)

pH 3.5 asidik formda bir besi ortamı olması nedeniyle kallusların da oldukça yumuşak ve küçük yapılı olduğu gözlemlendi.

Bu ortamdaki kalluslarda 3. haftadan sonra kararmalar ve kallus dokusunun oldukça yumuşak bir yapı göstermesi şeklinde görülen bozulmalar ortaya çıkmıştır. PH değeri 4.5' ten 6.5'e doğru arttıkça kallus büyüklüğü ve yeşil renk oranı artmış, pH 6.5 grubundaki dokular daha yeşil, granüler ve iri kallus özelliği göstermişlerdir, ancak pH 7.0'de kallus yapısı ve rengi değişmiştir. pH 7.0' ye ayarlanan besi ortamındaki kalluslar oldukça sert nisbeten ufak yapıda olup, 6.haftadan sonra kahverengileşmeler gösterip gelişimleri durmuştur (Şekil 4.6).

Kallus taze ağırlığı ile kallusların doku, büyüklük ve renk özellikleri birlikte değerlendirildiğinde başlangıç pH'sı 5.8 olarak ayarlanan MS besi ortamında gelişen kallusların kullanılan diğer ortamlar içerisinde daha iyi sonuçlar verdiği bulunmuştur.

H. retusum'un fenolik bileşen içeriği üzerinde farklı pH değerlerinin etkilerini araştırmak amacıyla kallusların iyi gelişim gösterdiği 4.5, 5.8, 6.0 ve 6.5 pH ortamlarında gelişen kallusların LC-MS/MS analizleri yapılarak fenolik bileşen içerikleri tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı pH değerlerinde gelişen kallus kültürlerin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)

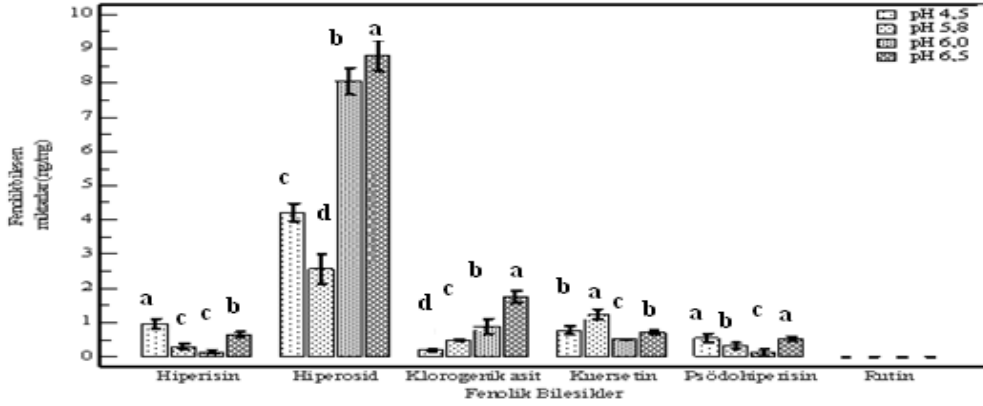
Fenolik Bileşikler						
pH Değeri	Hiperisin	Hiperosid	Klorojenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
pH 4.5	0.965±0.149a	4.228±0.248c	0.201± 0.034d	0.783±0.117b	0.559±0.120a	T.E*
pH 5.8	0.317±0.083c	2.565±0.434d	0.493±0.024c	1.237 ±0.153a	0.333±0.077b	T.E*
pH 6.0	0.151±0.057c	8.047±0.392b	0.891±0.212b	0.508±0.014c	0.129±0.089c	T.E*
pH 6.5	0.657±0.075b	8.804±0.460a	1.758±0.177a	0.723±0.063b	0.517±0.073a	T.E*

T.E.:Tesbit edilemedi. Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir($P \leq 0.05$). ± standart sapma.

En yüksek hiperisin içeriği (0.965 ng/mg), pH 4.5'e ayarlanan besi ortamındaki kallus dokularından elde edilirken, pH'ları 5.8 ve 6.0 olan besi ortamında gelişen kallusların hiperisin içerikleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tesbit edilemedi. En yüksek hiperosid içeriği pH 6.5 (8.804 ng/mg) ortamındaki kalluslarda bulunurken, en düşük hiperosid miktarı (2.565 ng/mg) da pH 5.8 olan ortamdaki kalluslardan elde edildi.

4. BULGULAR

Çalışılan pH gruplarının hiperosid içeriklerinin istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü. Klorojenik asitin en yüksek değeri (1.758 ng/mg) pH 6.5 ortamından, en düşük miktarı ise pH'sı 4.5 (0.201 ng/mg) olan kalluslardan elde edildi. Grupların klorojenik asit miktarları arasında istatistiksel olarak farklılık bulundu. Kuersetin içeriğinin en yüksek değeri (1.237 ng/mg) pH 5.8 ortamından, en düşük değeri ise pH'sı 6.0 olan ortamdaki kalluslardan elde edildi. PH 4.5 ve 6.5 olan ortamlardaki kallusların kuersetin miktarları ise istatistiksel olarak birbirine yakın değerlerde bulundu. Psödohiperisin en yüksek değeri (0.559 ng/mg) pH 4.5, en düşük değeri ise (0.129 ng/mg) pH 6.0 ortamında elde edilmiştir. Rutin çalışılan pH ortamlarının hiç birinde tesbit edilemedi (Çizelge 4.7).



Şekil 4.7. Kallus kültürlerinin fenolik bileşen içeriği üzerine farklı pH değerlerinin etkisi. Grafikte farklı pH grupları, her bir fenolik bileşen grubunda kendi aralarında karşılaştırılmıştır ($P \leq 0.05$).

Kullanılan pH gruplarında hiperosid en yüksek miktarlarda bulunmuştur. Bunun yanında hiperisin, klorojenik asit, kuersetin ve psödohiperisin düşük miktarlarda bulunurken, rutin hiçbir grupta tesbit edilememiştir (Şekil 4.7).

Çizelge ve Şekil 4.7' den de anlaşıldığı gibi fenolik bileşenlerin en yüksek miktarları, kullanılan pH ortamları arasında değişkenlik göstermiştir.

4.2.4. Kallus Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Farklı Işık Uygulamalarının Etkisi

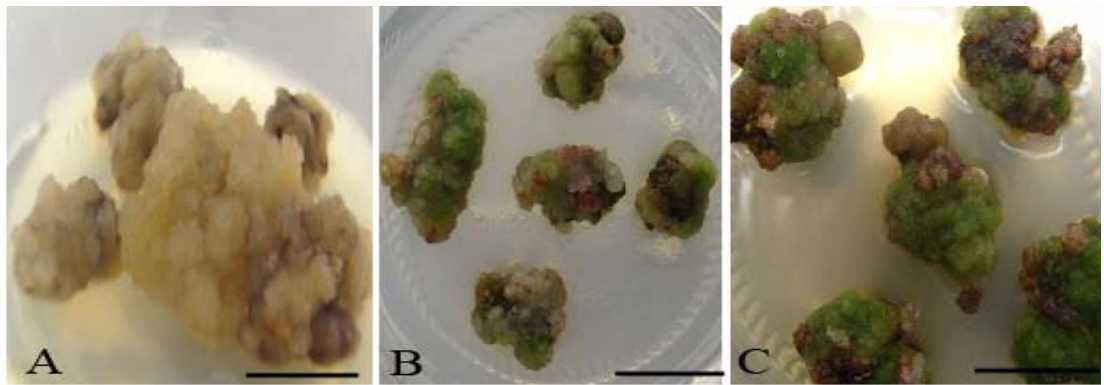
H. retusum'un kallus gelişimi üzerinde ışık uygulamasının etkilerini araştırmak amacıyla kalluslar MS besi ortamlarına aktarıldıktan sonra ışık şartları sırasıyla; sürekli aydınlık, sürekli karanlık ve kontrol (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) şartlarına ayarlanmış ortamlarda büyümeye bırakıldı. Kallusların gelişimleri izlenerek 5 hafta sonunda taze ağırlık miktarları belirlendi. Kallusların gelişim özellikleri ve taze ağırlıklarına ait veriler çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kallus gelişimi üzerine ışık uygulamasının etkisi

Işık Şartları	Ort.Taze Ağır.(mg)±SD	Kallus Özelliği
Kontrol	345.50±17.078b	Yeşil,Ufak,yumuşak
Sürekli Karanlık	496.25±18.08a	sarımsı, İri, Çabuk dağılan
Sürekli aydınlık	305.25±16.37c	Yeşil, Sert, dağılmayan

Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir($P \leq 0.05$). ± standart sapma.

Farklı ışık şartlarında geliştirilen kallusların 5. hafta sonundaki gelişimleri değerlendirildiğinde, en yüksek kallus taze ağırlık ortalaması (496.25 mg) sürekli karanlık şartlarda yetiştirilen kalluslardan elde edildi. Sürekli aydınlık şartlarında geliştirilen kallusların taze ağırlık ortalaması (305.25 mg) en düşük değerleri vermiştir (Çizelge 4.8).



Şekil 4.8. Farklı ışık uygulamalarında gelişen kallus dokuları A:Sürekli karanlık B:Sürekli aydınlık C:Kontrol (Bar:1 cm)

4. BULGULAR

Sürekli karanlık şartlarda yetiştirilen kallusların, oldukça büyük, sarımsı renkte ve çabuk dağılabilen bir yapıda olduğu gözlemlendi. Kontrol ortamında geliştirilen kallusların sürekli karanlık ortamda gelişenlere göre, daha yeşil renkte olduğu ve kolay dağılabilen yapıda olmadığı, sürekli aydınlık şartlarında geliştirilen kallusların ise yeşil renkte ve kompakt bir yapıda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).

Farklı ışık değerlerinin *H. retusum*'un kallus kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla; sürekli aydınlık, sürekli karanlık ve kontrol (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) şartlarına ayarlanmış ortamlarda geliştirilen kallusların 5. hafta sonunda LC-MS/MS analizleri yapılarak fenolik bileşik içerikleri araştırıldı. Analizler sonucunda elde edilen veriler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı ışık uygulamalarında gelişen kallusların fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)

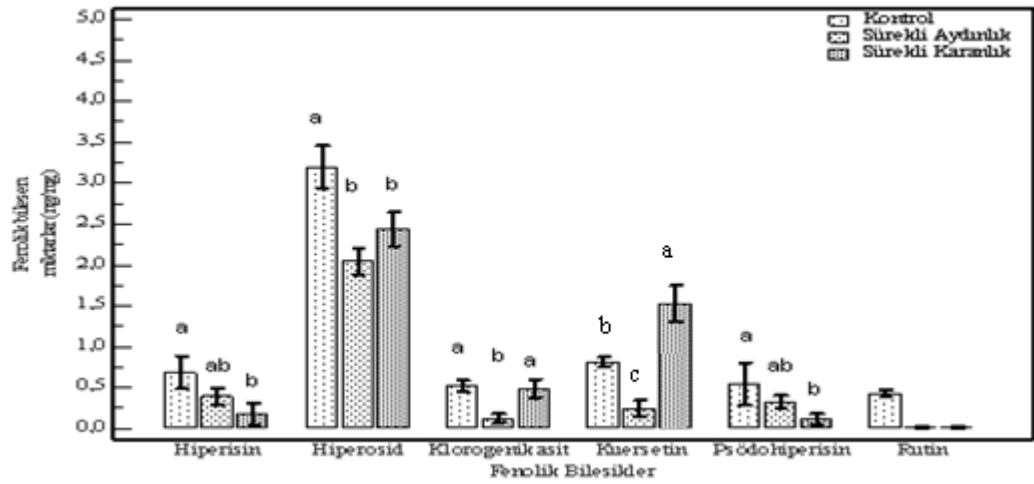
Fenolik Bileşikler						
Işık Ortamları	Hiperisin	Hiperosid	Klorogenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
Kontrol	0.683±0.204a	3.195±0.259a	0.517±0.070a	0.809±0.061b	0.536±0.262a	0.424±0.044a
Sürekli Aydınlık	0.387±0.103ab	2.042±0.158b	0.125±0.050b	0.239±0.097c	0.323±0.080ab	0.017±0.014b
Sürekli Karanlık	0.177 ± 0.129b	2.433± 0.211b	0.483±0.112a	1.520±0.224a	0.115± 0.059b	0.010± 0.011b

Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$). ± standart sapma.

En yüksek hiperisin içeriği (0.683 ng/mg) kontrol ortamındaki kalluslardan, en düşük miktarı (0.177 ng/mg) ise sürekli karanlık ortamdaki kalluslardan elde edilmiştir. Hiperosid içeriği en yüksek (3.195 ng/mg) kontrol ortamındaki kalluslardan, en düşük (2.042 ng/mg) sürekli aydınlık şartlardaki kalluslardan elde edilmiş ve aydınlık ortamdaki kallusların hiperosid içeriği ile aralarında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Klorogenik asit içeriği yine en yüksek (0.517 ng/mg) kontrol grubundaki kalluslardan elde edilirken, istatistiksel olarak karanlık ortamdaki kallusların klorogenik asit içeriği ile yakın bulunmuş ve aydınlık ortamdaki kalluslarda ise en düşük miktarda (0.125 ng/mg) bulunmuştur. Kuersetin içeriği en yüksek sürekli karanlık ortamdaki kalluslardan (1.520 ng/mg) elde edilirken, en düşük miktarı (0.239 ng/mg) aydınlık ortamdaki kalluslardan elde edilmiştir. Kuersetin miktarları üç grup arasında istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur.

Psödohiperisin (0.536 ng/mg) ve rutin (0.424 ng/mg) içerikleri kontrol grubunda daha yüksek oranlarda bulunmuştur. Bu bileşiklerin en düşük miktarları (0.115 ng/mg ve 0.010 ng/mg) da karanlık ortamdaki kalluslarda bulunmuştur. Ayrıca rutin sürekli aydınlık ve sürekli karanlık ortamlardaki kalluslarda birbirine yakın miktarlarda bulunmuştur.

Kontrol, sürekli aydınlık ve sürekli karanlık koşullarda gelişen kalluslarda en yüksek bileşik içeriği hiperosid ve en düşük bileşik içeriği de rutinde tesbit edilmiştir (Çizelge 4.9).



Şekil 4.9. Farklı ışık uygulamalarında gelişen kalluslarının fenolik bileşik içerikleri. Grafikte farklı ışık grupları, her bir fenolik bileşen grubunda kendi aralarında karşılaştırılmıştır ($P \leq 0.05$).

Bu ortamlar içerisinde en yüksek miktarlarda elde edilen bileşik, hiperosid; en düşük miktarlarda bulunan bileşik ise rutin olmuştur. Kuersetin hariç diğer bütün bileşik miktarları kontrol grubunda daha yüksek miktarlarda elde edilmiştir (Şekil 4.9).

4.3. Süspansiyon Kültürü Çalışmaları

Bu alt bölümde bölüm 4.4.'te kallus gelişimi için elde edilen veriler ışığında süspansiyon kültürü başlatmak için aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

4.3.1. Kalluslardan Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması

H. retusum'un süspansiyon kültürlerini oluşturmak için yaprak eksplantlarından türetilmiş olan kallus dokuları kullanıldı. İyi özellikte kallus veren ve süspansiyon kültürlerinin başlatılması çalışmaları için de kullanılan BBD kombinasyonlarının bulunduğu besi ortamları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.10.).

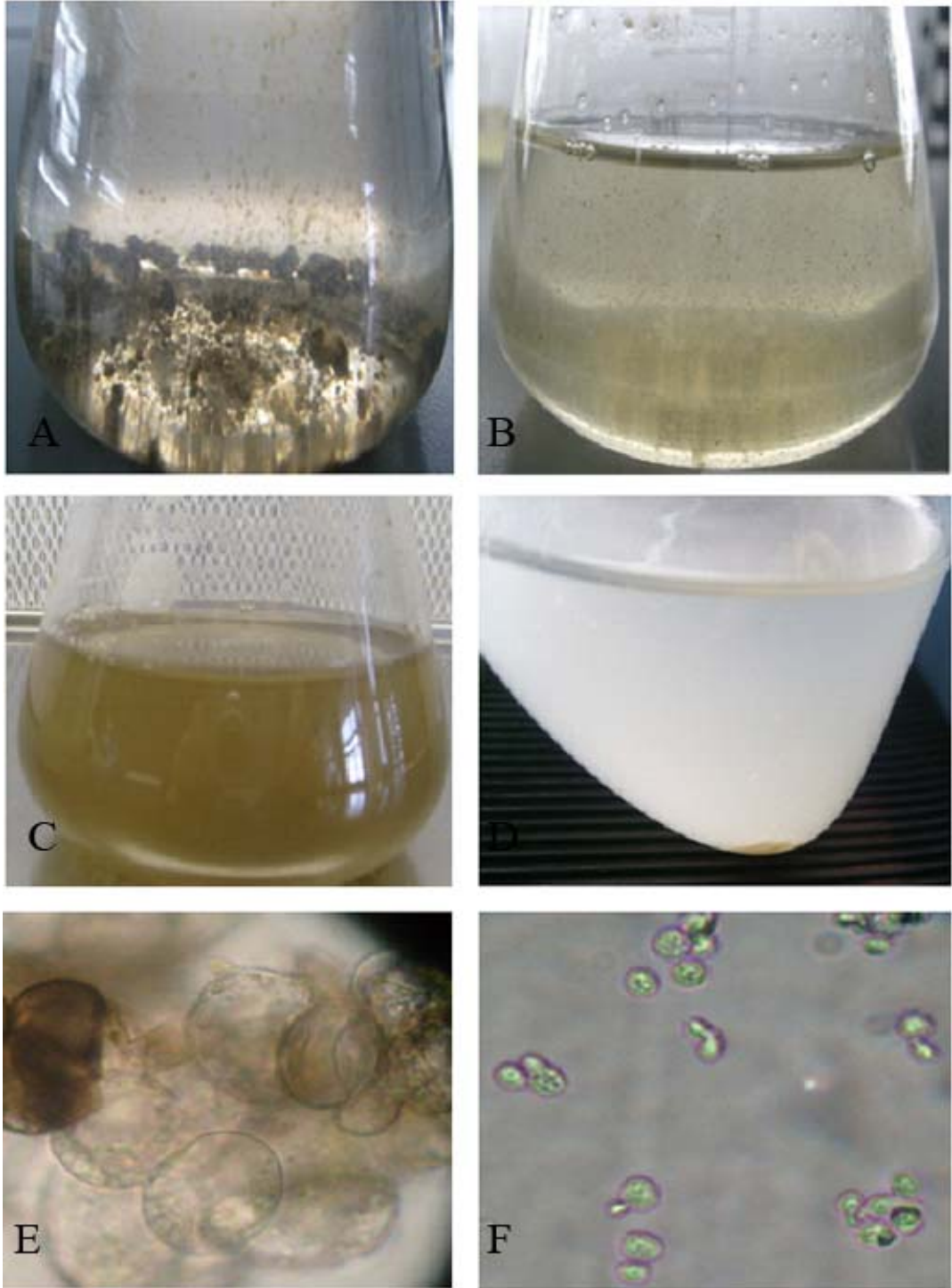
Çizelge 4.10. Süspansiyon kültürü oluşumu için kullanılan ortamlar

0.1 mg/L BAP+0.05 mg/L 2,4-D	0.1 mg/L KİN+0.2 mg/L 2,4-D
0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D	0.5 mg/L KİN+0.5 mg/L 2,4-D
1.0 mg/L BAP+2.0 mg/L 2,4-D	0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D

Yapılan alt kültür denemeleri sonucunda 0.1 mg/L BAP+0.05 mg/L 2,4-D ve 1.0 mg/L BAP+2.0 mg/L 2,4-D ile 0.1 mg/L KİN+0.2 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN+0.5 mg/L 2,4-D kombinasyonlarını içeren sıvı MS besin ortamında kültüre alınan kallus parçalarının 3-5 alt kültür boyunca gelişimleri değerlendirilmiştir. Kültüre alınan kallus parçalarının, alt kültür aşamalarında süspansiyon kültürünü oluşturacak şekilde bir dağılım göstermediği yapılan gözlemler ve mikroskop incelemeleri sonucunda bulunmuştur. Aynı zamanda bu besi ortamlarının bulunduğu erlenlerin dışardan yapılan gözlemlerinde, süspansiyon kültürü geliştiğinin belirtisi olan sıvı ortamın bulanıklaşmasının ortaya çıkmadığı da gözlenmiştir.

Aynı şekilde, 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D kombinasyonlarını içeren sıvı MS besin ortamında kültüre alınan kallus parçalarının gelişimleri değerlendirilmiş ve bu kallus parçalarının bu ortamlarda düzenli bir şekilde dağılmaya başladığı ve birkaç alt kültür sonunda sıvı besin ortamının yapılan mikroskop incelemeleri sonucunda besi ortamında dağılmış bulunan hücre ve hücre agregatlarının belirdiği gözlenmiştir. Bu BBD kombinasyonlarını kullanıldığı besi ortamlarının bulunduğu erlenlerin dışardan

yapılan gözlemler ile bu erlenlerde süspansiyon kültürü oluştuğunun bir belirtisi olan sıvı ortamda bulanıklaşmanın ortaya çıktığı da gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *H. retusum*'un süspansiyon kültürü aşamaları. A:Sıvı ortamda kültüre alınan kallus parçaları B:İlk süzütüden geçen kallus parçaları C ve D: Oluşan süspansiyon kültürleri ile sıvı besi ortamında görülen bulanıklaşma E: Süspansiyon kültüründeki kümeleşmiş hücreler F:Süspansiyon kültüründeki tekli hücreler

4. BULGULAR

4.3.2. BBD'lerinin Farklı Kombinasyonlarının Süspansiyon Kültürlerinin Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Etkisi

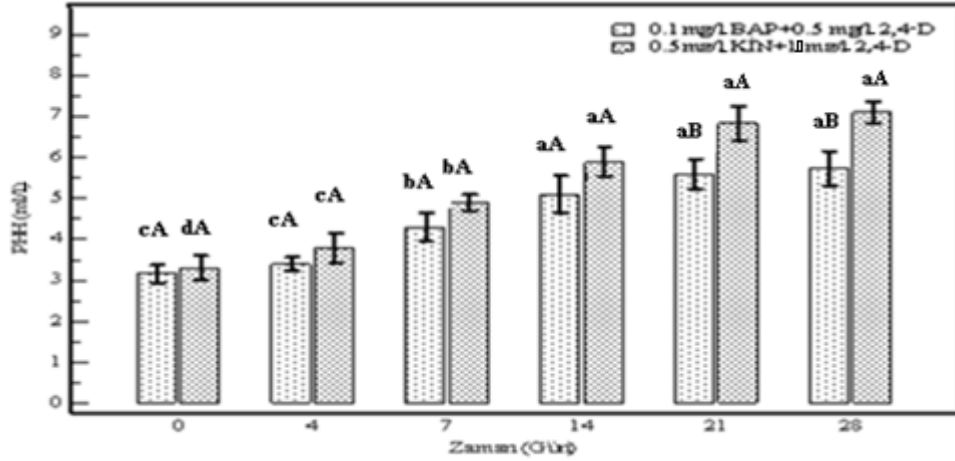
0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ilaveli sıvı besi ortamlarında geliştirilen hücre süspansiyon kültürlerinin 0., 4., 7., 14., 21. ve 28. günlerindeki paketlenmiş hücre hacimleri (PHH), taze ve kuru ağırlıklarına ait sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin 28 günlük PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri

BBD Ortamları	Örnek alım Zamanları (gün)	PHH (mL/L)	Taze Ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)
0.1mg/LBAP+0.5mg/L2,4-D	0	3.1±0.208cA	2.7±0.346cA	0.22±0.030cA
	4	3.4±0.173cA	2.9±0.265cA	0.26±0.036cA
	7	4.3±0.360bA	3.7±0.264bB	0.32±0.028bA
	14	5.1±0.458aA	4.7±0.346aB	0.40±0.026aA
	21	5.6±0.360aB	4.9±0.251aB	0.45±0.036aA
	28	5.7±0.416aB	5.1±0.200aB	0.047±0.034aA
0.5mg/LKİN+1.0 mg/L2,4-D	0	3.3±0.300dA	3.0±0.305cA	0.26±0.045aA
	4	3.8±0.360cA	3.4±0.251cA	0.31±0.041dA
	7	4.9±0.200bA	4.4±0.351bA	0.37±0.026cdA
	14	5.9±0.360aA	5.5±0.264aA	0.46±0.036aA
	21	6.8±0.416aA	6.0±0.360aA	0.53±0.040abA
	28	7.1±0.264aA	6.1±0.251aA	0.54±0.043aA

Çizelgede her bir stunda farklı harfle gösterilen iki değer, bu ortalamaların istatistiksel açıdan $P \leq 0.05$ seviyesinde birbirinden farklı olduğunu gösterir. Küçük harfler her bir grubun kendi içindeki, büyük harfler ise gruplar arası karşılaştırmayı göstermektedir. \pm standart sapma.

Çizelge 4.11'de farklı BBD kombinasyonları içeren besin ortamlarında geliştirilen kültürlerin PHH, taze ağırlık ve kuru ağırlık değerleri arasında istatistiksel açıdan farklılıklar olduğu görülmektedir.



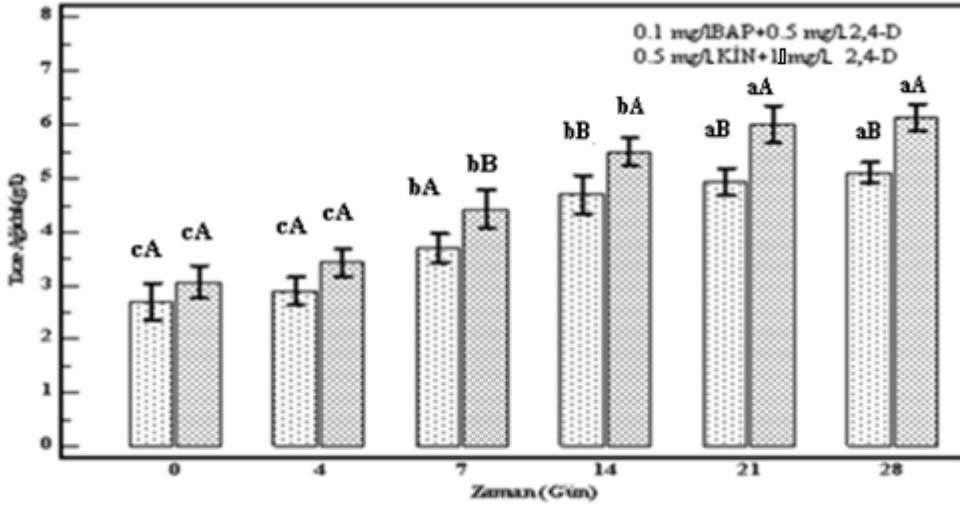
Şekil 4.11. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her BBD grubunun kendi içindeki, büyük harfler iki grup arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Şekil 4.11.'de gösterildiği gibi, 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D içeren BBD grubunda PHH değerleri 28 günlük kültür boyunca düzenli bir artış göstermiştir. Bu ortamda kültüre alınan hücrelerin 7. günde ölçülen PHH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür.

0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D grubundaki hücrelerin PHH miktarlarının 14. güne kadar düzenli bir şekilde artmıştır. Bu günlerde elde edilen PHH değerleri arasında istatistiksel açıdan fark olduğu görülmektedir. Sonraki ölçümlerde bu artış miktarının durağan hale geldiği görülmüştür.

En yüksek PHH miktarının (7.1 mL/L) 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ilaveli MS ortamında 28. gündeki kültürlerde elde edildiği saptanmıştır (Şekil 4.11).

4. BULGULAR



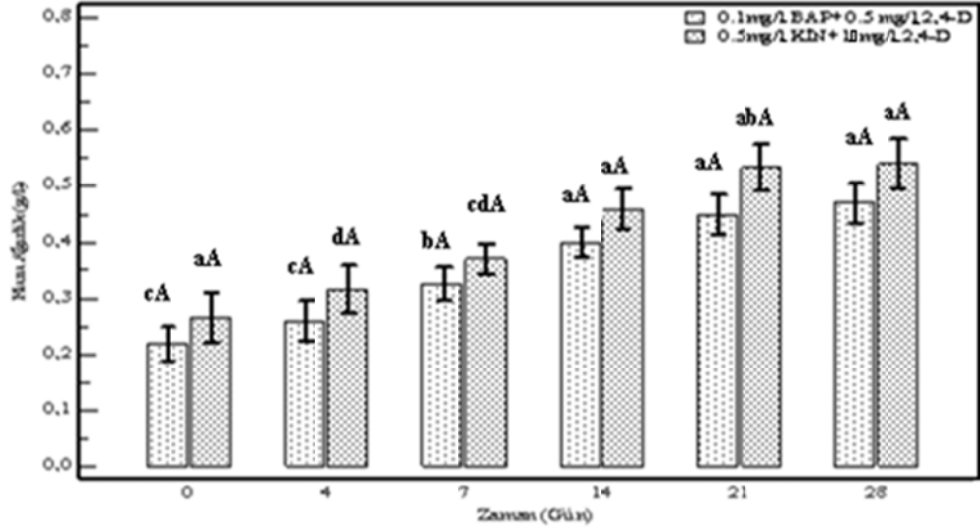
Şekil 4.12. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin taze ağırlık değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her BBD grubunun kendi içindeki, büyük harfler iki grup arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Süspansiyon kültüründeki hücrelerin gelişimini takip etmek amacıyla kullandığımız bir diğer parametre de taze ağırlıklarının tayini olmuştur.

0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ortamında kültüre alınan hücrelerin taze ağırlıklarında 7. günde anlamlı bir artış olduğu gözlenirken diğer günlerde bu artış miktarının daha yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir.

0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamındaki kültürlerde de yine 7. günde elde edilen taze ağırlık değeri diğer günlere göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gösterirken, diğer günlerde taze ağırlıklar birbirine yakın değerler göstermiştir.

Her iki ortamdaki kültürlerin taze ağırlıklarındaki artış miktarları karşılaştırıldığında, taze ağırlıkların 4. günde yakın değerler gösterirken, sonraki günlerde iki ortam arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Taze ağırlık miktarlarının 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ilaveli ortamdaki kültürlerde çalışılan bütün günlerde 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ilaveli ortamdaki kültürlerden elde edilen miktardan daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.13. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin kuru ağırlık değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her BBD grubunun kendi içindeki, büyük harfler iki grup arasındaki karşılaştırılmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Bu iki grubun kültür süresi boyunca kuru ağırlıklarındaki artış miktarları değerlendirildiğinde 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ilaveli MS ortamında kültüre alınan hücrelerin kuru ağırlık miktarlarında 7. gündeki kültürlerde anlamlı bir fark görülmüştür.

0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamlarındaki kültürlerin kuru ağırlık değerlerinde 14. günde alınan kültürlerin kuru ağırlık değerlerinin diğer günlere oranla farklı olduğu gözlenmiştir.

Kuru ağırlık miktarlarının 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamlarındaki kültürlerde bütün günlerde 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ilaveli MS ortamda geliştirilen kültürlerde daha yüksek değerlerde bulunmuştur. Bu kültürlerde en yüksek kuru ağırlık değeri (0.54 g/L) 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ilaveli kültürlerden 28. günde alınan kültürlerden elde edilmiştir (Şekil 4.13).

Kültürler, PHH, taze ağırlık ve kuru ağırlık değerleri bakımından karşılaştırıldığında kültür gelişiminde en iyi ortamın, 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D olduğu tesbit edildi.

H. retusum'un süspansiyon kültürlerini oluşturmada en iyi sonucu veren iki farklı BBD kombinasyonu olan 0.1 mg/L BAP+ 0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D destekli sıvı MS besi ortamlarında geliştirilen hücre süspansiyon

4. BULGULAR

kültürleri 28 günlük gelişim süreci sonunda sıvı ortamdan süzülerek LC-MS/MS analizleri ile fenolik bileşen içerikleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.12. BBD'lerinin Farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)

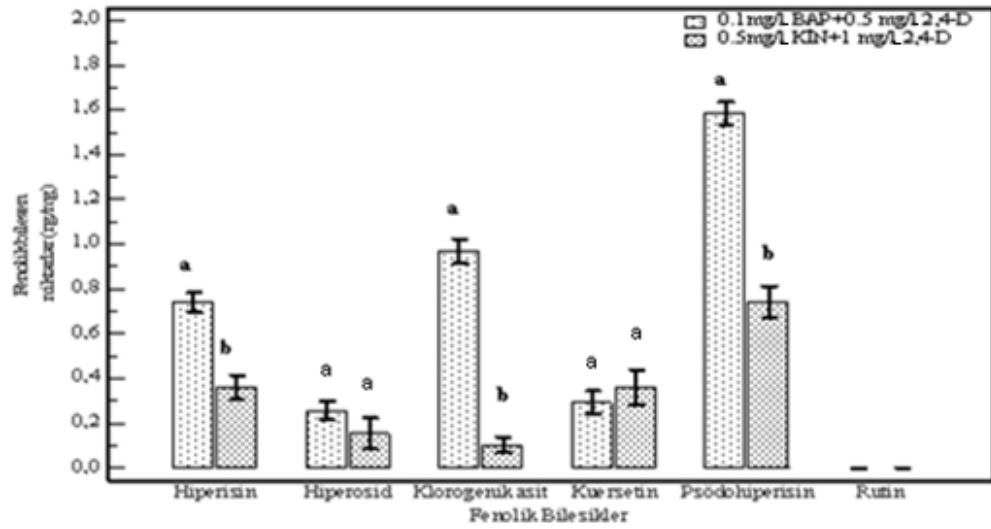
Fenolik Bileşikler						
BBD	Hiperisin	Hiperosid	Klorogenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
A	0.743±0.044a	0.259±0.042a	0.970±0.054a	0.293±0.052a	1.587±0.505a	T.E*
B	0.361±0.054b	0.157±0.070a	0.104±0.034b	0.362±0.078a	0.745±0.070b	T.E*

T.E.:Tesbit edilemedi. A: 0.1 mg/L BAP+ 0.5 mg/L 2,4-D, B: 0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D. Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, her fenolik bileşen grubu kendi içinde karşılaştırılmasını göstermektedir(p≤0.05).± standart sapma.

Kültürler karşılaştırıldığında bu iki ortam arasında hiperisin içerikleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tesbit edilmiştir. 0.1 mg/L BAP+ 0.5 mg/L 2,4-D BBD destekli MS besi ortamındaki kültürlerin hiperisin miktarı (0.743 ng/mg) 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D destekli MS besi ortamında elde edilen miktarın (0.361 ng/mg) yaklaşık iki katı oranda bulunmuştur. Hiperosid içerikleri (0.157-0.259 ng/mg) her iki ortamda birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. Klorogenik asit (0.970 ng/mg) ve psödohiperisin (1.587 ng/mg) içerikleri de yine 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D BBD destekli MS besi ortamında daha yüksek miktarlarda bulunmuştur. Kuersetin miktarları istatistiksel olarak yakın değerlerde bulunmuştur.

0.1 mg/L BAP + 0.5 mg/L 2,4-D destekli MS besi ortamındaki süspansiyon kültüründe en yüksek miktarda bulunan bileşik psödohiperisin (1.587 ng/mg) iken, en düşük miktarda ise hiperosid (0.259 ng/mg) bulunmuştur.

0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D BBD destekli MS besi ortamındaki kültürlerde de en yüksek miktarda bulunan bileşik psödohiperisin (0.745 ng/mg) iken, en düşük miktarda ise klorogenik asit (0.104 ng/mg) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.12).



Şekil 4.14. BBD'lerinin farklı kombinasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg). Grafikte BBD gruplarında her fenolik bileşen grubu kendi aralarında karşılaştırılmıştır ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.14'te görüldüğü gibi kuersetin hariç, diğer bileşiklerin miktarı 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D BBD destekli MS besi ortamında daha yüksek oranda bulunmuştur. Her iki grupta da rutin tesbit edilememiştir.

4. BULGULAR

4.3.3. Farklı pH Değerlerinin Süspansiyon Kültürlerinin Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Etkisi

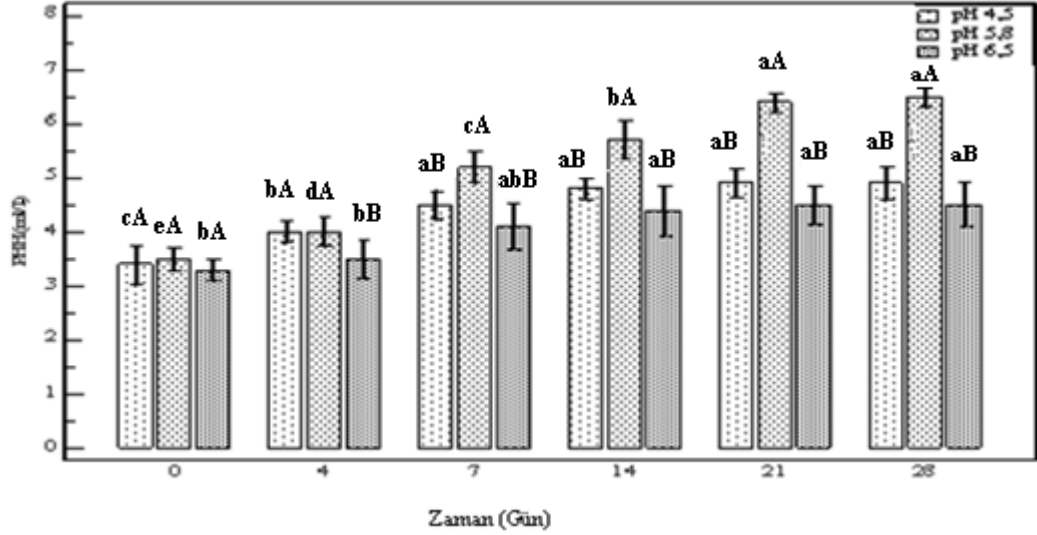
Kültür ortamlarının pH değerlerinin kültürdeki hücrelerin gelişimi üzerine etkisini araştırmak için başlangıç pH'ları pH 4.5, pH 5.8 (kontrol), ve pH 6.5 olmak üzere üç pH ortamı hazırlandı. Kültürlerin 28 günlük gelişimleri değerlendirildi.

Çizelge 4.13. Farklı pH değerlerinde gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH, taze ve kuru ağırlık değerlerindeki değişimler

pH Ortamları	Örnek alım Zamanları(gün)	PHH(mL/L)	Taze Ağırlık(g/L)	Kuru Ağırlık(g/L)
pH 4.5	0	3.4±0.360cA	3.0±0.264bA	0.27±0.026bA
	4	4.0±0.200bA	3.5±0.400bA	0.31±0.015bA
	7	4.5±0.264aB	4.0±0.300aA	0.38±0.030aA
	14	4.8±0.200aB	4.3±0.435aB	0.41±0.036aA
	21	4.9±0.264aB	4.5±0.400aB	0.42±0.026aB
	28	4.9±0.300aB	4.6±0.173aB	0.042±0.03aB
pH 5.8	0	3.5±0.200eA	3.1±0.360dA	0.31±0.023cA
	4	4.0±0.264dA	3.8±0.346cA	0.35±0.030cA
	7	5.2±0.300cA	4.6±0.264bAB	0.41±0.026bA
	14	5.7±0.360bA	5.1±0.200bA	0.47±0.035aA
	21	6.4±0.173aA	5.8±0.400aA	0.51±0.015aA
	28	6.5±0.200aA	5.9±0.435aA	0.52±0.03aA
pH 6.5	0	3.4±0.200bA	2.9±0.400bA	0.24±0.035bA
	4	3.5±0.360bB	3.1±0.360bA	0.29±0.030bA
	7	4.1±0.435abB	3.6±0.435abAC	0.35±0.028aA
	14	4.4±0.458aB	4.0±0.300aB	0.39±0.036aA
	21	4.5±0.360aB	4.2±0.300aB	0.40±0.020aB
	28	4.5±0.400aB	4.2±0.173aB	0.40±0.01aB

Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir($P \leq 0.05$). ± standart sapma.

Çizelge 4.13.'ten de görüldüğü gibi, çalışılan pH gruplarında kültürlerin PHH (paketlenmiş hücre hacmi), taze ve kuru ağırlık değerleri bakımından, en iyi sonuçlar pH 5.8 grubundan elde edilmiştir.



Şekil 4.15. Farklı pH değerlerinde gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her pH grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki karşılaştırılmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

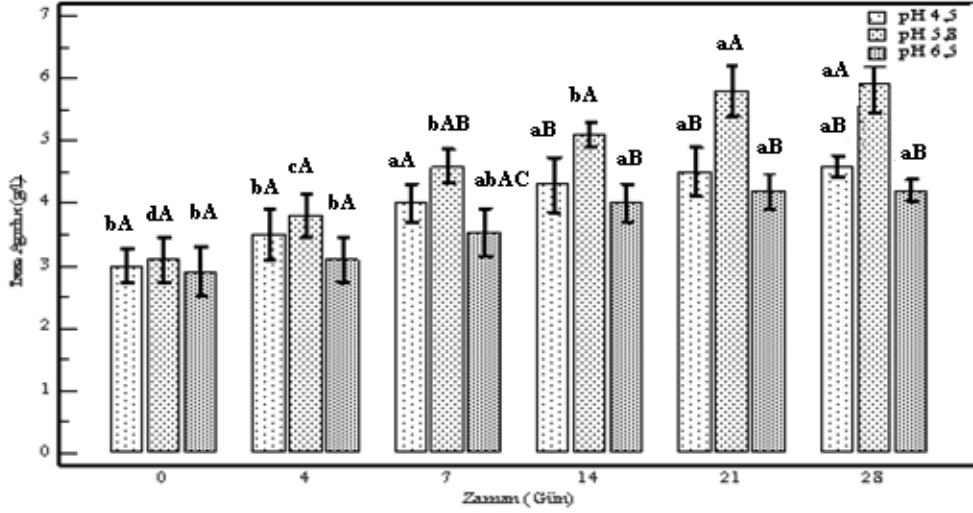
pH 4.5 olarak ayarlanan ortamdaki kültürün PHH miktarı 7. güne kadar düzenli bir artış göstermiştir. Kültürün 7. gününden sonra PHH miktarlarının daha fazla artmadığı, istatistiksel olarak yakın değerler verdiği gözlenmiştir.

Kontrol grubu yani pH 5.8 ortamında kültüre alınan hücrelerin PHH değerlerinin 28 günlük gelişim periyodu boyunca düzenli bir şekilde artış gösterdiği bulunmuştur. Bu grupta farklı günlerde ölçülen PHH değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklar olduğu tesbit edilmiştir.

Yüksek pH ortamı olarak kullanılan pH 6.5'te PHH miktarlarında istatistiki bakımdan en önemli fark 7. günde ölçülen miktarda elde edilmiştir. Sonraki günlerde ölçülen PHH değerlerinde artış gözlenirse de bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ve 21. günden itibaren ise PHH değerlerinin artış göstermediği belirlenmiştir.

Üç farklı pH ortamındaki kültürlerde en yüksek PHH değeri (6.5 mL/L), pH 5.8 ortamında kültüre alınan hücrelerden 28. gündeki ölçümde elde edilmiştir (Şekil 4.15).

4. BULGULAR



Şekil 4.16. Farklı pH gruplarında gelişen kültürlerin taze ağırlık değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her pH grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki karşılaştırılmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

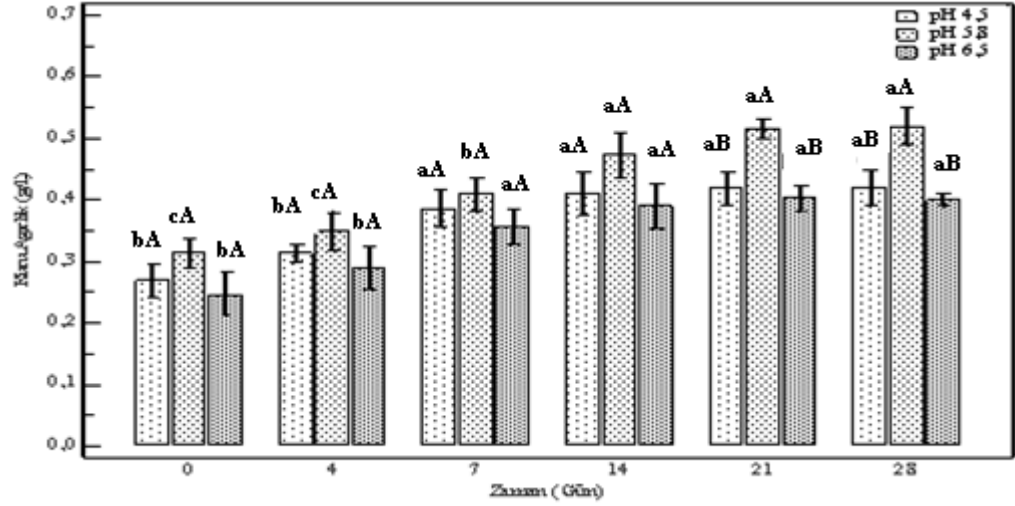
Şekil 4.16 farklı pH ortamlarında gelişen kültürler için taze ağırlık miktarlarının 28 günlük gelişimini göstermektedir.

Düşük pH ortamında (pH 4.5) kültüre alınan hücrelerde en önemli artış miktarı 7. günde ölçülen taze ağırlık değerlerinden elde edilirken, kültürün diğer günlerinde bu değerlerin daha yakın olduğu bulunmuştur.

Kontrol ortamı olarak kullanılan pH 5.8'e ayarlanan kültürlerdeki taze ağırlık değerlerinin istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Bu ortamdaki kültürlerin taze ağırlık miktarları düzenli bir artış göstermiştir.

Yüksek pH ortamındaki (pH 6.5) kültürlerin taze ağırlık değerlerinde en önemli artış değeri 14. günde elde edilmiştir. Kültürün diğer günlerinde taze ağırlıklarda meydana gelen artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmazken, kültürün 21. günden sonraki ölçümünde taze ağırlık miktarındaki bu artışın durduğu tesbit edilmiştir.

Bu kültürlerin taze ağırlık miktarında en fazla artış, pH 5.8 ortamında meydana gelmiştir.



Şekil 4.17. Farklı pH gruplarında gelişen kültürlerin kuru ağırlık değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her pH grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki karşılaştırılmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Farklı pH ortamlarında kültüre alınan hücrelerin gelişimini takip etmek amacıyla kültürlerin kuru ağırlık değerleri de ölçülmüştür.

pH 4.5'e ayarlanan ortamdaki kültürlerde yine 7. gündeki kuru ağırlık değerinde önemli bir artış gözlenirken, pH 5.8'de 14. güne kadar düzenli bir artış olduğu sonraki günlerdeki kuru ağırlık değerlerinin daha yakın olduğu tesbit edilmiştir. pH'sı 6.5 olan kültürlerde 7. günde ölçülen kuru ağırlık değerlerinin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görülmüştür.

Kullanılan bu ortamlar içerisinde en yüksek kuru ağırlık değerleri pH 5.8 olan kontrol ortamındaki kültürlerden elde edilmiştir. Daha düşük ve daha yüksek pH ortamlarındaki kuru ağırlık değerlerinin daha düşük olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 4.17).

4. BULGULAR

Çalışmamızda ayrıca, farklı pH değerlerine sahip gruplar 28 günlük kültür süresinden sonra, besi ortamlarından ayrıldı ve fenolik bileşik içeriklerinin tesbit edilmesi için LC-MS/MS analizleri yapıldı.

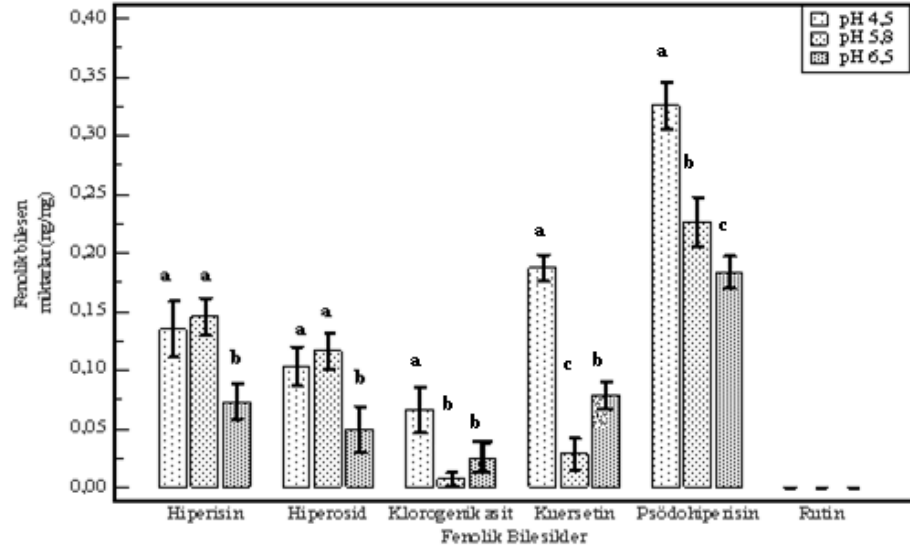
Çizelge 4.14. Farklı pH gruplarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)

Fenolik Bileşikler						
pH ortamı	Hiperisin	Hiperosid	Klorogenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
pH 4.5	0.135±0.023a	0.103±0.016a	0.067±0.019a	0.187±0.011a	0.326±0.019a	T.E
pH 5.8	0.146±0.015a	0.110±0.015a	0.007±0.005b	0.029±0.013c	0.220±0.020b	T.E
pH 6.5	0.078±0.015b	0.049±0.019b	0.025±0.012b	0.079±0.011b	0.183±0.013c	T.E

T.E.:Tesbit Edilemedi. Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, her bir fenolik bileşen grubunun kendi içinde karşılaştırılmasını göstermektedir($P \leq 0.05$). ± standart sapma.

Hiperisin ve hiperosid içerikleri kendi aralarında değerlendirildiğinde, pH 4.5 (0.135 ng/mg- 0.103 ng/mg) ve pH 5.8 (0.146 ng/mg-0.110 ng/mg) ortamlarındaki kültürlerde istatistiksel olarak birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. Bu bileşiklerin miktarları pH 6.5 ortamında oldukça düşük değerlerde (0.078 ng/mg-0.049 ng/mg) bulunmuştur. Klorogenik asit pH 4.5'te en yüksek miktarda (0.67 ng/mg) tespit edilirken, pH 5.8 ve pH 6.5'ta oldukça düşük miktarlarda (0.007 ng/mg-0.025 ng/mg) bulunmuştur. Kuersetin miktarı düşük pH (pH 4.5)'da diğer pH gruplarına göre oldukça yüksek düzeyde (0.187 ng/mg) üretilmiştir ve üç ortamın kuersetin içerikleri istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur. Aynı şekilde psödohiperisin miktarları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. En yüksek psödohiperisin miktarı(0.326 ng/mg) pH 4.5 olarak ayarlanan ortamdan elde edilmiştir.

Bu ortamlarda psödohiperisin yüksek miktarlarda, klorogenik asit ise en düşük miktarlarda tesbit edilen bileşiklerdir (Çizelge 4.14).



Şekil 4.18. Farklı pH gruplarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri. Grafikte farklı pH grupları, her bir fenolik bileşen grubunda kendi aralarında karşılaştırılmıştır ($P \leq 0.05$)

Çalışılan bileşikler içerisinde en yüksek miktarlar psödohiperisin, en düşük miktarlar ise klorojenik asit bileşiklerinde bulunmuştur. Rutin bu ortamlardaki kültürlerde elde edilememiştir (Şekil 4.18).

Görüldüğü gibi fenolik bileşen miktarları, başlangıç pH'sı 4.5 olan ortamdaki kültürlerde daha yüksek düzeylerde elde edilmiştir.

4. BULGULAR

4.3.4. Farklı Işık Uygulamalarının Süspansiyon Kültürlerinin Gelişimi ve Fenolik Bileşen İçeriği Üzerine Etkisi

Hücre süspansiyon kültürlerinde farklı ışık uygulamalarının kültürler üzerindeki etkisini araştırmak üzere, 1 kontrol (16 saat aydınlık,8 saat karanlık), sürekli aydınlık ve sürekli karanlık ortam olmak üzere 3 farklı grup oluşturulmuştur. İncelenen özellikler ve elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

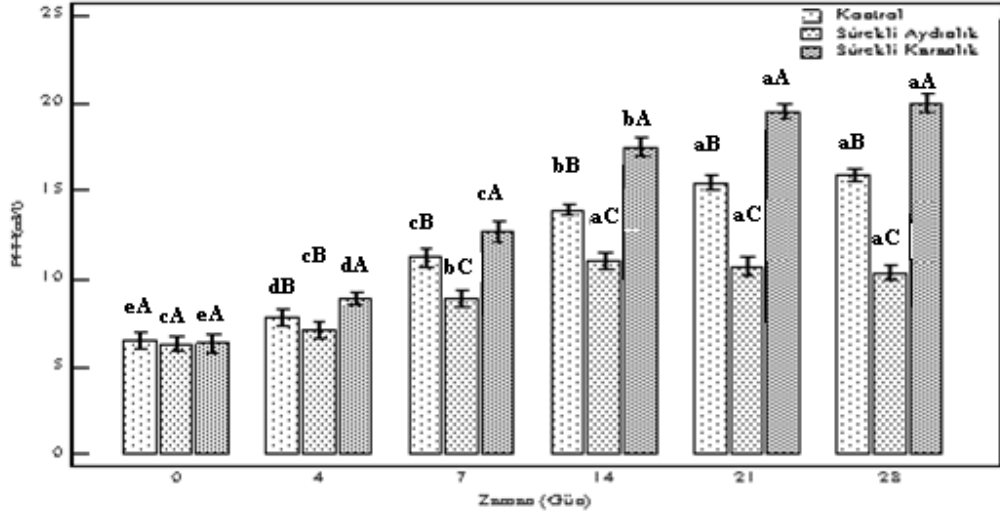
Çizelge 4.15. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin 28 günlük PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri

Işık Koşulları	Örnek alım Zamanları(gün)	PHH(mL/L)	Taze Ağırlık(g/L)	Kuru Ağırlık(g/L)
Kontrol	0	6.5±0.520eA	5.5±0.510eA	0.50±0.050dA
	4	7.8±0.436dB	7.0±0.557dC	0.60±0.036cB
	7	11.2±0.557cB	10.1±0.458cB	0.76±0.050bA
	14	13.9±0.300bB	12.4±0.529bA	0.89±0.046aB
	21	15.5±0.436aB	13.9±0.361aB	0.95±0.044aB
	28	15.9±0.360aB	14.0±0.556aB	0.97±0.036aB
Sürekli Aydınlık	0	6.3±0.400cA	5.4±0.500cA	0.50±0.10bA
	4	7.1±0.500cB	6.2±0.530cAB	0.53±0.05bCB
	7	8.9±0.460bC	7.9±0.460bB	0.60±0.03abB
	14	11.0±0.460aC	9.3±0.610aC	0.69±0.04aC
	21	10.7±0.560aC	9.13±0.500aC	0.69±0.07aC
	28	10.3±0.420aC	9.07±0.400aC	0.66±0.06aC
Sürekli Karanlık	0	6.3±0.510eA	5.4±0.360dA	0.50±0.03eA
	4	8.9±0.361dA	7.7±0.462bdA	0.65±0.02dAB
	7	12.7±0.557cA	11.3±0.451cC	0.84±0.044cA
	14	17.5±0.529bA	16.0±0.557bA	1.02±0.04bA
	21	19.5±0.436aA	18.6±0.458aA	1.10±0.02aA
	28	20.0±0.550aA	19.2±0.590aA	1.12±0.03aA

Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir. Küçük harfler aynı grup içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0.05$). \pm standart sapma.

Çizelge 4.15'te de görüldüğü gibi, farklı ışık uygulamalarına maruz bırakılan kültürler içerisinde hücre gelişimini gösteren PHH, taze ağırlık ve kuru ağırlık değerleri karanlık ortamda geliştirilen kültürlerde en yüksek miktarlarda

tesbit edilmiştir. Üç ortamdaki elde edilen bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermiştir. Sürekli aydınlık şartlarda tutulan kültürler ise en düşük hücre gelişiminin görüldüğü ortamlar olmuştur.



Şekil 4.19. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her ışık grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0.05$).

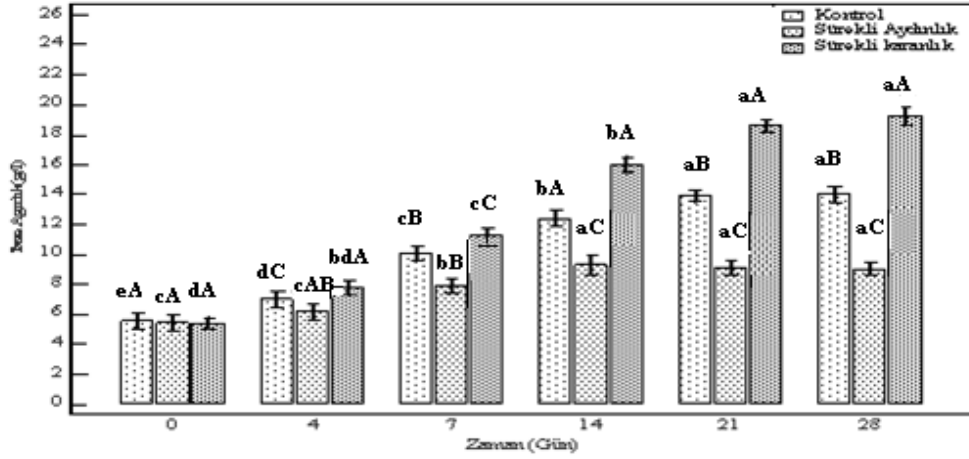
Kontrol grubunda gelişen kültürlerde PHH miktarı düzenli bir artış göstermiştir. Bu ortamdaki kültürlerden bütün günlerde alınan PHH değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği bulunmuştur.

Sürekli aydınlık şartlarda gelişen kültürlerde PHH miktarlarının 7. ve 14. günlerdeki değerleri istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermiştir. Diğer günlerde alınan PHH miktarları yakın değerlerde bulunmuştur. Bu ortamdaki kültürlerde en yüksek PHH değeri (11.0 mL/L) 14. günde elde edilmiştir. Sonraki günlerde PHH miktarının düştüğü görülmüştür.

Sürekli karanlık ortamda gelişen kültürlerde de PHH miktarının düzenli bir şekilde arttığı görülmektedir. Bu şartlarda gelişen kültürlerden alınan PHH miktarları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu tesbit edilmiştir.

Çalışılan farklı ışık uygulamaları içerisinde en yüksek PHH miktarının sürekli karanlık ortamda gelişen kültürlerden elde edilirken, sürekli aydınlık şartlarda gelişen kültürlerin ise daha düşük PHH miktarlarına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.19).

4. BULGULAR

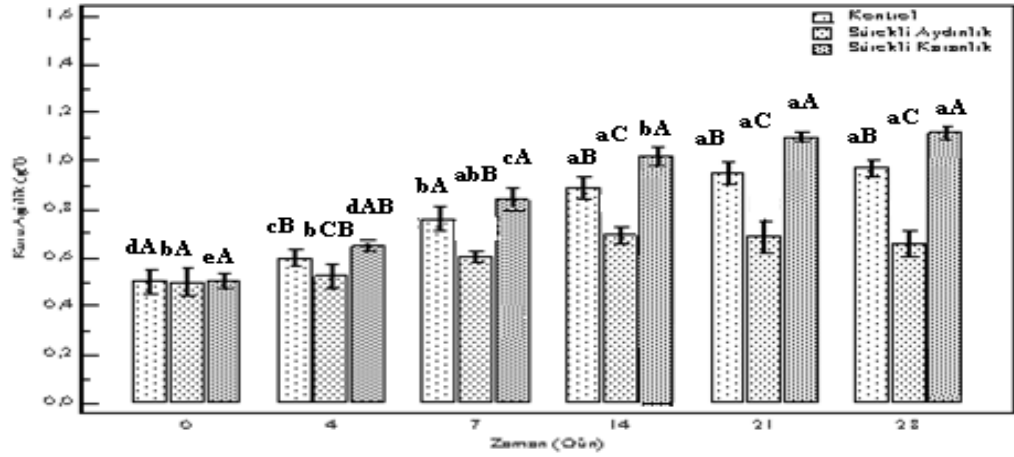


Şekil 4.20. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin taze ağırlık değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her ışık grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Kültürlerin taze ağırlık miktarlarına bakıldığında, kontrol grubundaki ve sürekli karanlık şartlardaki kültürlerin taze ağırlık miktarının düzenli bir artış gösterdiği bulunmuştur. Bu kültürlerde 28. günde alınan değerler istatistiksel olarak bir önceki ölçüm gününde (21. gün) alınan taze ağırlık değerlerine yakın sonuçlar vermiştir.

Sürekli aydınlık ortamda gelişen kültürlerde en yüksek taze ağırlık miktarı 14.günde elde edilirken sonraki günlerde bu miktarın düştüğü tesbit edilmiştir.

Bu ortamlar içerisinde en yüksek taze ağırlık miktarı (19.2 g/L) karanlık ortamda geliştirilen 28. günde alınan kültürlerden elde edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.21. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin kuru ağırlık değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her ışık grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Kontrol şartlarında gelişen kültürlerin kuru ağırlık değerlerinin 14. güne kadar düzenli bir şekilde artarken sonraki günlerde alınan değerlerin istatistiksel olarak yakın oldukları bulunmuştur.

Sürekli aydınlık şartlarda gelişen kültürlerin kuru ağırlık miktarlarında 14. günden itibaren bir azalma görülmüştür fakat bu miktarlar istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim göstermemiştir.

Sürekli karanlık şartlardaki kültürlerin kuru ağırlık değerlerinde de taze ağırlık miktarlarında olduğu gibi yine istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 4.21).

H. retusum'un süspansiyon kültürlerinde farklı ışık uygulamalarının kültürdeki hücrelerin fenolik bileşen miktarları üzerindeki etkilerini tesbit etmek için kültürler 28. gün sonunda sıvı besi ortamından süzülerek LC-MS/MS analizleri yapıldı.

4. BULGULAR

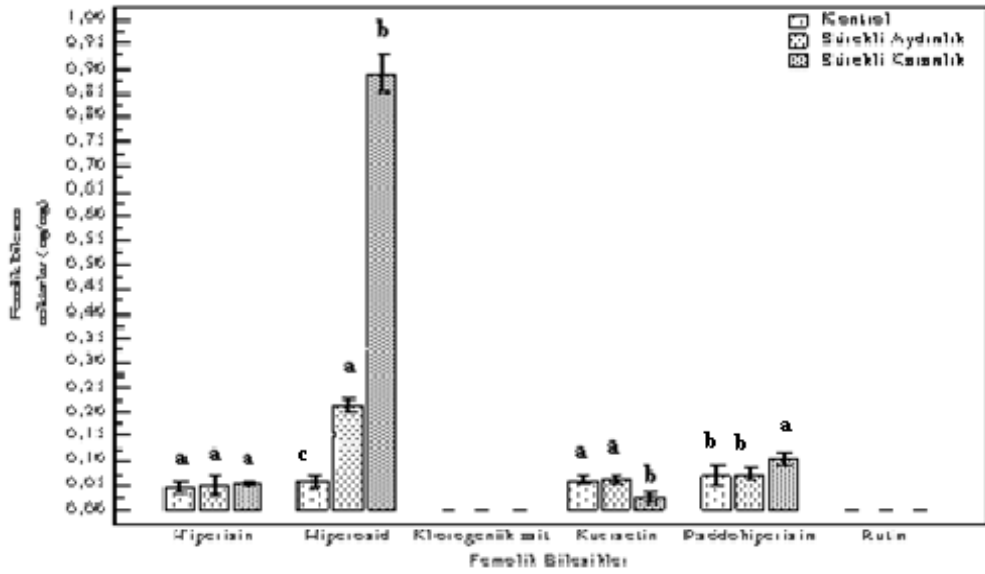
Çizelge 4.16. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşen içerikleri (ng/mg)

Fenolik Bileşikler						
Işık ortamı	Hiperisin	Hiperosid	Klorojenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
Kontrol	0.045±0.012a	0.057±0.015c	0.012±0.025	0.060±0.009a	0.080±0.020b	T.E
Aydınlık	0.050±0.020a	0.215±0.013a	T.E.*	0.063±0.010a	0.075±0.010b	T.E
Karanlık	0.053±0.004a	0.089±0.036b	T.E.*	0.025±0.008b	0.105±0.005a	T.E

T.E.:Tesbit Edilemedi. Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir.(P≤0.05). ± standart sapma.

Hiperisin içerikleri üç ortamda istatistiksel olarak birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. Hiperosid miktarı (0.215 ng/mg) sürekli aydınlık ortamdaki kültürlerde en yüksek değerde bulunurken, sürekli karanlık (0.089 ng/mg) ve kontrol (0.057 ng/mg) ortamlarında birbirine yakın değerler vermiştir. Klorojenik asit (0.012 ng/mg) sadece kontrol ortamındaki kültürlerde ve oldukça düşük miktarlarda tesbit edilmiştir. Kuersetin içeriği sürekli aydınlık ve kontrol grubunda (0.063-0.060 ng/mg) ortamda gelişen kültürlerde daha fazla miktarda bulunmuştur Psödohiperisin (0.105 ng/mg) miktarı sürekli karanlık ortamda gelişen kültürlerde en yüksek miktarda bulunmuştur.

Kontrol ortamında en yüksek miktarda tesbit edilen bileşik psödohiperisin (0.080 ng/mg) en düşük miktardaki bileşik ise klorojenik asit (0.012 ng/mg) olmuştur. Aydınlık koşullarda gelişen kültürlerdeki bileşiklerde en yüksek miktarda (0.215 ng/mg) hiperosid ve en düşük miktarda da (0.050 ng/mg) hiperisin bulunmuştur. Karanlık koşullarda ise en yüksek miktarda (0.105 ng/mg) psödohiperisin, en düşük miktarda da (0.025 ng/mg) kuersetin bulunmuştur (Çizelge 4.16).



Şekil 4.22. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşen içerikleri. Grafikte farklı ışık grupları, her bir fenolik bileşen grubunda kendi aralarında karşılaştırılmıştır ($P \leq 0.05$).

Şekil 4.22’de görüldüğü gibi en yüksek miktarda bulunan bileşik hiperosid olarak tesbit edilmiştir. Klorogenik asit sadece kontrol grubunda bulunurken, rutin ise tesbit edilememiştir. Ayrıca, araştırılan bütün fenolik bileşikler ışık ortamlarının tümü için oldukça düşük ve aynı bileşiğin farklı ortamlarındaki miktarları da yakın değerlerde bulunmuştur.

4. BULGULAR

4.3.5. Farklı Sukroz Konsantrasyonlarının Süspansiyon Kültürlerinin Gelişimi Üzerine ve Fenolik Bileşen İçeriği Etkisi

Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini teşvik etmek amacı ile yapılmış olan uygulamalardan biri de sukroz uygulaması olup, bu uygulama 1 kontrol (30 g/L) ve 2 farklı sukroz konsantrasyonu (15 g/L, ve 50 g/L) olmak üzere 3 farklı gruptan oluşmuştur. Elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

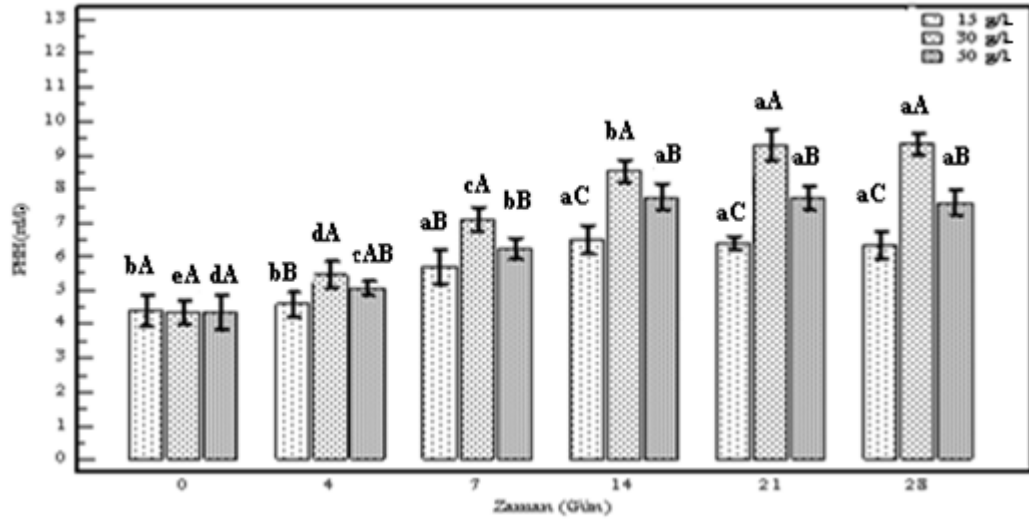
Çizelge 4.17. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin 28 günlük PHH, taze ve kuru ağırlık değerleri

Sukroz Konsantrasyonu	Örnek alım Zamanları (gün)	PHH (mL/L)	Taze Ağırlık (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)
Sukroz 15 g/L	0	4.4±0.458bA	3.2±0.665bA	0.28±0.049bA
	4	4.6±0.360bB	3.5±0.529bA	0.31±0.049bA
	7	5.7±0.500aB	4.5±0.379aC	0.37±0.020abC
	14	6.5±0.500aC	5.6±0.550aB	0.46±0.015aC
	21	6.4±0.200aC	5.6±0.404aB	0.47±0.062aB
	28	6.3±0.400aC	5.5±0.513acB	0.44±0.046aC
Sukroz 30 g/L	0	4.3±0.351eA	3.6±0.404dA	0.33±0.045dA
	4	5.4±0.404dA	4.6±0.651cA	0.39±0.015dA
	7	7.1±0.361cA	6.4±0.458bA	0.54±0.032cA
	14	8.5±0.321bA	7.7±0.556aA	0.65±0.037bA
	21	9.3±0.458aA	8.2±0.473aA	0.74±0.040aA
	28	9.3±0.321aA	8.3±0.351aA	0.76±0.032aA
Sukroz 50 g/L	0	4.3±0.503dA	3.5±0.300cA	0.31±0.045aA
	4	5.0±0.208cAB	4.1±0.252cA	0.35±0.035aA
	7	6.2±0.321bB	5.4±0.503bB	0.45±0.045bB
	14	7.7±0.379aB	6.6±0.586aAB	0.58±0.026aB
	21	7.7±0.351aB	6.5±0.493aB	0.56±0.042aB
	28	7.6±0.361aB	6.4±0.569aB	0.56±0.031aB

Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir. Küçük harfler aynı grup içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir ($P \leq 0.05$). ± standart sapma.

Çizelge 4.17’de görüldüğü gibi, kültürlerdeki hücre gelişimini gösteren PHH, taze ağırlık ve kuru ağırlık değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Kullanılan üç farklı sukroz ortamı içerisinde en yüksek PHH, taze

ağırlık ve kuru ağırlık değerleri 30 g/L sukroz içeren ortamda daha yüksek miktarlarda olduğu tesbit edilmiştir.



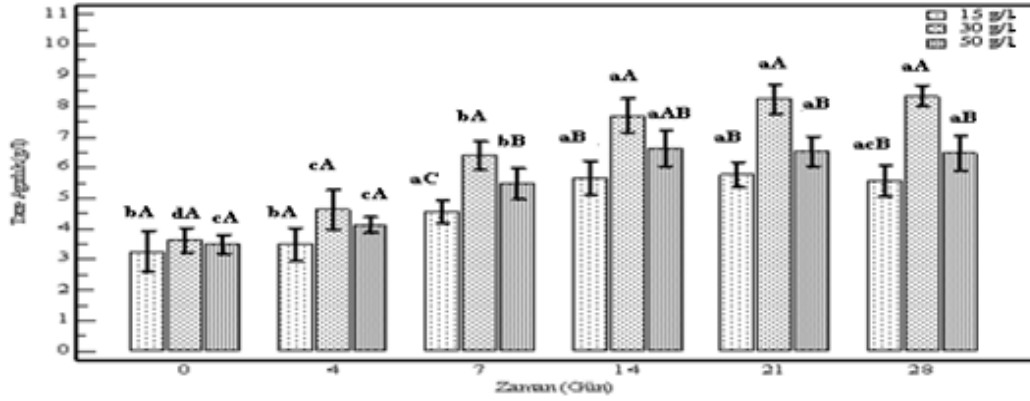
Şekil 4.23. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin PHH değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her sukroz grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

15 g/L sukroz içeren ortamındaki kültürlerin PHH miktarında olarak 7. günde elde edilen değer istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Diğer günlerde ölçülen PHH miktarları yakın değerlerde bulunmuştur. Bu ortamda geliştirilen kültürlerin PHH miktarının 14. güne kadar arttığı sonraki günlerde alınan ölçümlerde bu miktarın düştüğü tesbit edilmiştir. Bu ortamdaki kültürlerde en yüksek PHH miktarı (6.5 mL/L) 14. günde elde edilmiştir.

30 g/L sukroz içeren besi ortamında kültürün PHH miktarlarının düzenli bir şekilde arttığı görülmüştür. Bu ortamdaki kültürlerin PHH miktarlarının farklı günlerde elde edilen değerlerinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

50 g/L sukroz içeren ortamındaki kültürlerin PHH miktarlarındaki artış 14. güne kadar devam etmiştir. Sonraki ölçümlerde bir artış olmadığı görülmüştür (Şekil 4. 23.).

4. BULGULAR

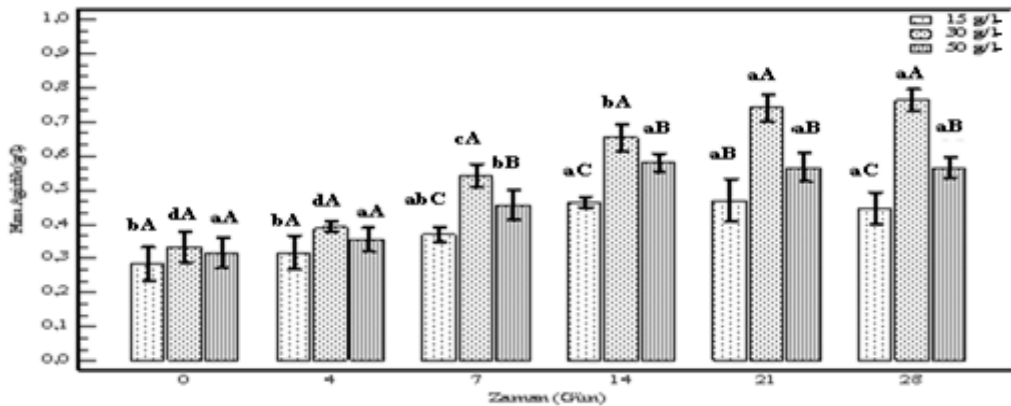


Şekil 4.24. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin taze ağırlık değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her sukroz grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Kültürlerin taze ağırlık miktarları karşılaştırıldığında, 15 g/L sukroz kullanılan ortamdaki kültürlerde en fazla taze ağırlık miktarı (5.6 g/L) 14. günde elde edilmiş, sonraki ölçümlerde taze ağırlık miktarlarının düştüğü gözlenmiştir.

30 g/L sukroz ile desteklenen MS ortamındaki kültürlerin taze ağırlık miktarları 28. güne kadar düzenli bir artış göstermiştir.

50 g/L sukroz grubunda taze ağırlık artışı 14. güne kadar düzenli şekilde artmış, sonraki günlerde taze ağırlık miktarları azalmıştır. Kültürün 14. gününe kadar elde edilen taze ağırlık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu ortamda en yüksek taze ağırlık miktarı (6.6 g/L) 14. günde kaydedilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.25. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin kuru ağırlık değerlerindeki değişimler. Küçük harfler her sukroz grubunun kendi içindeki, büyük harfler gruplar arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir ($P \leq 0.05$).

Kültürlerin kuru ağırlıklarındaki artış miktarı karşılaştırıldığında, 15 g/L sukroz içeren ortamdaki kültürlerin kuru ağırlık miktarlarında istatistiksel olarak en

önemli farklılık 7. gündeki değerlerde bulunmuştur. Bu ortamda diğer günlerde alınan kuru ağırlık değerleri istatistiksel açıdan yakın bulunurken 21 günden sonra kültürün kuru ağırlık değerinde bir azalma olduğu tesbit edilmiştir.

30 g/L sukroz kullanılan ortamdaki kültürlerin kuru ağırlık değerlerinde yine düzenli bir artış görülmüştür.

50 g/L sukroz kullanılan ortamdaki kültürlerde 14. güne kadar olan kuru ağırlık miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu tesbit edilmiştir.

Bu ortamlardan en yüksek kuru ağırlık miktarı (0.76 g/L) 30 g/L sukroz kullanılan ortamdaki kültürlerden 28. günde alınan değerlerden elde edilmiştir (Şekil 4.25).

Bunun yanında uygulamada kullandığımız şeker konsantrasyonları olan 15, 30 ve 50 g/L sukroz içeriklerine sahip MS besi ortamlarında gelişen kültürler, 28 günlük gelişim süreci sonunda besi ortamından alınarak fenolik bileşik içerikleri araştırılmak üzere LC-MS/MS analizleri yapıldı.

Çizelge 4.18. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri (ng/mg)

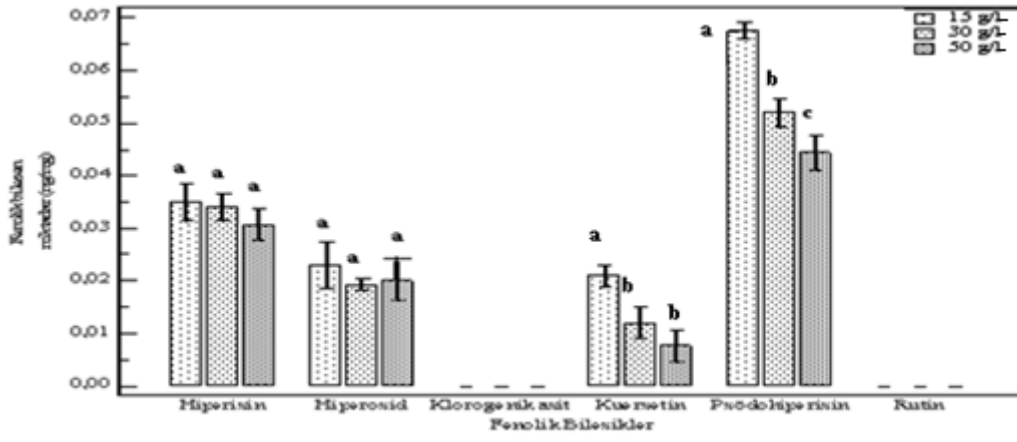
Fenolik Bileşikler						
Sukroz Kons.	Hiperisin	Hiperosid	Klorojenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
15 g/L	0.035±0.0036a	0.023±0.0043a	T.E.*	0.021±0.0020a	0.067±0.0015a	T.E.*
30 g/L	0.034±0.0026a	0.019±0.0011a	T.E.*	0.012±0.0030b	0.052±0.0026b	T.E.*
50g/L	0.030±0.0030a	0.020±0.0036a	T.E.*	0.007±0.0030b	0.044±0.0032c	T.E.*

T.E.:Tesbit Edilemedi. Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiksel gruplandırmayı göstermektedir($P \leq 0.05$). ± standart sapma.

Kullanılan 15 g/L, 30 g/L ve 50 g/L sukroz konsantrasyonlarının bulunduğu besi ortamlarındaki hiperisin miktarları istatistiksel olarak yakın bulunmuştur. Aynı şekilde bu ortamların hiperosid içerikleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilmemiştir. Kuersetin (0.021 ng/mg) ve psödohiperisin (0.067 ng/mg) içerikleri 15 g/L sukroz ilaveli ortamdaki kültürlerde en yüksek miktarlarda bulunmuştur. Rutin ve klorojenik asit bileşikleri ise tesbit edilememiştir (Çizelge 4.18).

4. BULGULAR

15 g/L sukroz kullanılan besi ortamındaki kültürlerde, en yüksek miktarda bulunan bileşik psödohiperisin (0.067 ng/mg), en düşük miktardaki bileşik ise kuersetin (0.021 ng/mg) olmuştur. 30 g/L sukroz ilaveli besi ortamındaki kültürlerde yine en yüksek miktarda bulunan bileşik psödohiperisin (0.052 ng/mg), en düşük miktardaki bileşik ise kuersetin (0.012 ng/mg) dir. Aynı şekilde 50 g/L sukroz ilaveli besi ortamındaki kültürlerde de en yüksek miktarda bulunan bileşik psödohiperisin (0.044 ng/mg), en düşük miktardaki bileşik ise kuersetin (0.007 ng/mg) olmuştur.



Şekil 4.26. Farklı sukroz konsantrasyonlarında gelişen süspansiyon kültürlerinin fenolik bileşik içerikleri. Grafikte farklı sukroz grupları, her bir fenolik bileşen grubunda kendi aralarında karşılaştırılmıştır ($P \leq 0.05$).

Şekil 4.26'da görüldüğü gibi araştırılan gruplar içerisinde 15 g/L sukroz kullanılan ortamdaki kültürlerde bileşik miktarları en yüksek değerini bulmuştur. 30 ve 50 g/L sukroz ortamlarındaki bileşik miktarları daha düşüktür. Bu bileşikler içerisinde en yüksek miktarlarda bulunanlar psödohiperisin ve hiperisindir. Klorojenik asit ve rutin bu ortamlarda tesbit edilememiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hypericum türleri, geniş tıbbi özelliklerinden dolayı yüzyıllardan beri kullanılan bitki türlerinden birisidir. Antidepresan aktivitesi başta olmak üzere antiviral, antimikrobiyal, antitümoral, antiinflammatuar, antianaljezik özellikleri sebebiyle son yıllarda bu tür üzerindeki bilimsel çalışmalar yoğunlaşmış ve sahip olduğu bu sekonder bileşiklerin bitki doku kültürü, kallus, sürgün kültürü, kök kültürü ve süspansiyon kültürleriyle eldesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Biz de bu çalışma kapsamında *H. retusum*'un kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde en iyi gelişimi sağlamak ve sekonder metabolit içeriğini (hiperisin, hiperosid, klorogenik asit, kuersetin, psödohiperisin ve rutin) artırmak amacıyla yönelik çeşitli uygulamaların etkilerini araştırdık.

5.1. Doğal Ortamdan Toplanan Örnekler

Çalışmamızda, *H. retusum*'un kallus kültürlerine bitkinin hangi eksplantını kullanarak başlayacağımıza karar vermek amacıyla doğadan toplanan örneklerinin LC-MS/MS yöntemiyle kök, gövde ve yaprak kısımlarına ait fenolik bileşen içeriklerini araştırdık. Yapılan analizler sonucunda, bitkinin yaprak kısmındaki hiperisin (1411.206 ng/mg), hiperosid (797.992 ng/mg), klorogenik asit (6534.252 ng/mg), kuersetin (573.598 ng/mg), psödohiperisin (933.862 ng/mg) ve rutin (347.141 ng/mg) bileşikleri miktarlarının kök ve gövde kısımlarındakinden çok daha fazla miktarda olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1).

Hypericum'larda yapraklar üzerinde bulunan koyu renkli salgı bezleri karakteristiktir. Yapraklarda bulunan bu salgı bezlerinin hiperisin ve diğer flavonoid bileşiklerinin toplandığı yerler olduğu bildirilmektedir (Baytop,1972,1999; Kaçar 2004). Dolayısıyla fenolik bileşik miktarlarının en fazla yaprakta bulunması gerekmektedir.

Hiperisin biyosentezinin, tam bitkilerin yapraklarındaki koyu kırmızı renkli yağ bezelerinin oluşumu ve morfogenez ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Zdunek ve Alfermann, 1992).

Briskin ve ark. (2001), yaprak diseksiyonu metodu kullanılarak, yapraklardaki koyu bezelerle hiperisinler arasında ilişki olduğunu tesbit etmişlerdir.

Hypericum bitkilerinde genellikle üretken kısımların gelişim ve büyümesi sürerken bunu *H. perforatum* (Kazlauskas ve Bagdonaite, 2004) ve *Hypericum brasiliense*'de (Abreu ve ark., 2004) rutin, kuersetin ve izokuersetin, *H. perforatum*, *Hypericum pruinatum* ve *Hypericum aviculariifolium*'da total fenolikler (Ayan ve ark., 2006) ve hiperisin (Çırak ve ark., 2006), *H. perforatum*'da (Büter ve Büter, 2002; Couceiro ve ark., 2006) hiperforin, gibi farklı kimyasal bileşiklerin birikimine neden olan sekonder metabolizmanın hızlanması takip eder. Bizim bulgularımız yani bitkinin üretken parçası olan yapraklardaki bileşen miktarlarının daha yüksek miktarda olması da bu bilgiyle uyumaktadır.

Smelcerovic ve ark.(2008), Türkiye'de yetişen 17 *hypericum* türünün fenolik bileşenlerini (psödohiperisin, hiperisin, hiperforin, rutin, hiperosid, kuersitrin ve kuersetin), LC-MS/MS ile tayin ettikleri çalışmada, hiperisin ve psödohiperisin içerikleri arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır. Bu ilişki, biyosentetik yolda iki bileşik için genel bir öncünün paralel gelişimiyle açıklanmaktadır.

Alali ve arkadaşları (2004), *H. triquetrifolium*'un farklı kısımlarının total hiperisin içeriği ile ilgili çalışmalarında yaprak eksplantlarında 3.6 mg/g, çiçek kısmında 0.64 mg/g, gövde ve kök kısmında ise düşük miktarda hiperisin bulunduğunu saptamışlardır.

Karakaş (2010), *H. triquetrifolium* Turra'nın UV spektrofotometresi ile yaptığı analizler sonucunda, en yüksek total hiperisin içeriğini bitkinin yaprak kısmından, en düşük hiperisin içeriğini ise köklerden elde etmiştir. Bitkinin çiçek ve gövde kısmında ise total hiperisin oranının daha yüksek olduğunu saptamıştır.

Ayan ve Çırak (2008), Türkiye'de yetişen bazı *Hypericum* türlerinin (*Hypericum heterophyllum* Vent, *Hypericum hyssopifolium* L., *Hypericum linarioides* Bosse, *Hypericum monbretii* Spach, *Hypericum orientale* L., *Hypericum organifolium* Willd., *H. perforatum* L., *Hypericum scabrum* L., ve *H. triquetrifolium* Turra) yaprak, gövde ve çiçek kısımlarının hiperisin ve psödohiperisin içeriğini HPLC yöntemi ile tespit ederek hem bitkiler hem de bitki kısımları arasında bu bileşiklerin farklı miktarlarda bulunduğunu saptamışlar. Çalışmada, en yüksek hiperisin içeriğini, *H. triquetrifolium*'un yapraklarında elde etmişler.

Bu çalışma sonuçları da karşılaştırıldığında, en yüksek hiperisin içeriğinin yaprak eksplantlarında bulunması çalışmamızdaki bulgularla paralellik göstermektedir.

Çırak ve ark. (2007) Türkiye'nin kuzey bölgelerindeki farklı lokalizasyonlardan topladıkları *H. perforatum* örneklerinde, kuru ağırlık baz alınarak hiperisin içeriğini 0.44 ve 2.82 mg/g, klorogenik asit 0.0 ve 1.86 mg/g, rutin 0.0 ve 8.77 mg/g, hiperosid 5.41 ve 22.28 mg/g, kuersitrin 1.64 ve 3.98 mg/g, ve kuersetin içeriğini 1.01 ve 1.76 mg/g aralığında tesbit etmişlerdir. Hiperisin içeriklerinin yapraktaki koyu beze yoğunluğu ile pozitif bir bağlantı sahip olduğunu bulmuşlardır.

5.2. Çimlendirme ve Proliferasyon Aşaması

H. retusum'un tohumları BBD kullanılmayan MS besi ortamında çimlendirilmiştir. Namlı ve ark.(2010), yine *H. retusum* kullandıkları çalışmalarında, doku kültüründe çimlenme ortamı olarak BBD içermeyen ortamı kullanmışlardır. Karakaş (2010), *H. triquetrifolium* Turra'nın tohumlarının çimlendirilmesi üzerine çalıştığı gruplar içerisinde en iyi sonucu (% 66) hormonsuz ortamda çimlendirdiği gruptan elde etmiştir.

H. perforatum'un ticari üretiminde bugüne kadar tarla tarımı ya da doğadan toplama yöntemleri kullanılmaktaydı. Fakat bu tip ürünlerin kalitesi etkili madde içeriğini değiştirebilen değişik çevresel faktörler, kirleticiler, bakteriler, mantarlar, virüsler ve böcekler tarafından büyük ölçüde etkilenebilmektedir (Orth ve ark., 1999). Southwell ve Bourke (2001), yazın ve kışın yetişen *H. perforatum* bitkilerinde hiperisin ve psödohiperisin içeriği bakımından 50 misli fark olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde ABD'de ticari olarak üretilen *H. perforatum* kapsüllerinde en düşük ve en yüksek hiperisin derişimleri arasında 13-17 kat fark olduğu tespit edilmiştir (Anon.,1998). Çırak ve ark.(2006d), *H. perforatum*, *H. aviculariifolium* ve *H. Pruinatum* bitkilerinde hiperisin oranının gün içerisinde bile önemli seviyede değişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu gibi sebeplerden ötürü, tıbbi bitkilerin *in vitro* teknikler kullanılarak uniform ve steril bir çevrede yetiştirilmelerinin sekonder metabolit üretiminde değişik dış şartlardan kaynaklanan kalite problemlerinin çözülmesinde anahtar faktör olacağı düşünülmektedir (Zobayed ve ark., 2004).

Çalışmamızda, *H. retusum* ' un çimlendirdiğimiz tohumlarından elde ettiğimiz bitkicikleri, iyi gelişim gösteren sürgünler elde amacıyla, 0.5 mg/L BAP ile

desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Namlı ve ark.(2010), *H.retusum*'da sürgün proliferasyonu için kullandıkları farklı BAP ve KİN konsantrasyonları içerisinde, en yüksek sürgün sayısını 0.5 mg/L BAP kullandıkları MS ortamından elde etmişlerdir.

5.3. Kallus Çalışmaları

5.3.1. Kallus Başlatılması

Kallus oluşturulması ve proliferasyon sistemlerinin, doğal ürünlerin biyosentezinin çalışılması için yararlı olduğu bilinmekte ve bunu etkileyen faktörler üretimin kontrol edilmesine olanak sağlamaktadır.

Çalışmamızda, en yüksek fenolik bileşen içeriğine sahip olduğunu tesbit ettiğimiz yaprak eksplantlarını kullanarak *H. retusum*'un kallus dokularını oluşturmaya karar verdik. *Hypericum* türlerinde sekonder metabolit üretimi ile ilgili araştırmalarda başlangıç materyali olarak çoğunlukla yaprakların kullanıldığı ve bu kısımlardan kallus oluşumunun başarılı sonuçlar verdiği daha önce yapılmış araştırma sonuçları ile de desteklenmektedir (Karakaş, 2010; Walker ve ark. 2002; Gadzovska ve ark.2007). Bunun için 0.5 mg/L BAP ilaveli ortamda geliştirilen sürgünlerin yaprak eksplantları kullanıldı (Namlı ve ark.2010). Kallus dokularının başlatılması için BAP ve KİN'in 2,4-D ve NAA ile oluşturduğu BBD kombinasyonlarını kullandık. Nitekim, BAP, 2,4-D ve KİN'in farklı *Hypericum* türlerinde kallus oluşturmak için yaygın olarak kullanılan hormonlar olduğu bilinmektedir (Cellarova ve ark., 1992).

BAP kullanılan gruplar içerisinde; 0.1 mg/L BAP+0.05 mg/L 2,4-D ve 1.0 mg/L BAP+2.0 mg/L 2,4-D ilaveli besi ortamları, en iyi kallus oluşturma yüzdelerini (% 55 ve % 32.5) vermişlerdir. Bu ortamlarda gelişen kalluslar, yeşil, iri, sert ve sarımsı granüler şeklindeki morfolojik özellikler göstermişlerdir (Çizelge 4.2. Şekil 4.2). Özellikle yüksek konsantrasyonlardaki BAP kullanımı koyu yeşil, yoğun ve daha iri kallus oluşumu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Cellarova ve ark., 1992). Nitekim bu çalışmada da en iri ve yeşil renkli kalluslar yüksek BAP içeren ortamlarda oluşmuşlardır (Çizelge 4.2. Şekil 4.2). Karakuş (2011), *Hypericum spectabile*'nin yaprak eksplantlarından kallus oluşumu için denediği ortamlar içerisinde kallus oluşumu için 1.0 mg/L BAP+2.0 mg/L 2,4-D ortamını optimum olarak belirlemiştir.

Bunun yanında 0.1 mg/L KİN +0.2 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN +0.5 mg/L 2,4-D BBD kombinasyonları da yüksek kallus oluşum oranları (% 37.5 ve % 30) vermiştir. Bu ortamlarda gelişen kallusların da sırasıyla yeşil, iri, granüler ve yeşil, granüler fakat daha ufak yapıda oldukları gözlenmiştir (Çizelge 4.2. Şekil 4.2). Ayan ve ark.(2005) *in vitro* şartlarda *Hypericum*'un yaprak diskleri ve gövde segmentlerinden kallus oluşturmak için bir çalışma yapmışlar. Bu çalışma sonucunda, kallus oluşum sıklığı bakımından en yüksek değerleri 30 g/L sukroz ve 0.5 mg /L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN içeren MS ortamından elde etmişlerdir.

Görüldüğü gibi *H. retusum*'un yaprak eksplantlarından kallus oluşturmak üzere çalıştığımız BBD kombinasyonlarında en iyi kallus oluşum oranları KİN+2,4-D BBD kombinasyonu kullanılan ortamlardan elde edilmiştir. Bu ortamlar içerisinde en iyi kallus oluşum oranı (% 70) ve en iyi özellikte kallus tipleri (yeşil, iri, granüler) 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D grubundan elde edilmiştir. Bais ve ark. (2002), 2,4-D ve KİN ile modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilen yaprak eksplantlarının, denemede kullanılan diğer ortamlarla karşılaştırıldığında en yüksek kallus oluşum oranını verdiğini görmüşlerdir. Zobayed ve ark.(2004), en yüksek kallus uyarımını 0.5 g/ L KİN ve 0.5 g/L 2,4-D içeren ortamdan elde etmiştir (Çizelge 4.2. Şekil 4.2).

Kullanılan BBD kombinasyonları içerisinde en düşük kallus oluşum oranları NAA destekli MS besi ortamlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.2.). Aynı şekilde NAA kullanılan besi ortamlarının kallus oluşumunda 2,4-D kadar verimli olmadığı bazı çalışmalarda bildirilmiştir. Gopitha ve ark. (2010), maksimum kallus oranını hindistan cevizi sütü ve 3.0 mg/L 2,4-D destekli MS besi ortamından elde ederken, minium kallus oluşum oranını ise 1.0 mg/L NAA destekli MS besi ortamından elde etmişlerdir. IBA'in ise hiçbir konsantrasyonunda kallus elde edememişlerdir. *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) bitkisinde, 0.1 mg/L KİN+ 2.0 mg/L 2,4-D kombinasyonlu MS besi ortamlarında kallus oluşum oranının % 100 iken aynı bitkinin 0.1 mg/L KİN+ 1.0 mg/L NAA kombinasyonlu MS besi ortamlarında kallus oluşumunu gerçekleştirmediği bildirilmiştir (Söylemez, 2006). Bunun yanında 2,4-D kullandığımız ortamlardaki kalluslarının NAA ilaveli ortamlarda gelişen kalluslara nazaran daha granüler yapıda olduklarını tesbit ettik. Benzer şekilde, Sreenivas ve ark. (2011), *B. stipularis*'in kallus kültürlerinde NAA ilaveli ortamda gelişen kalluslar sert veya yarısert iken, 2,4-D'li ortamlardaki kalluslar (BAP veya KİN'li) granüler özellikte olduğunu bildirmişlerdir.

Aynı şekilde BBD'lerinin farklı kombinasyonlarıyla oluşturduğumuz gruplar içerisinde 2,4-D ilave edilen ortamlarda kallus proliferasyonunun arttığını tesbit ettik. Bu durum dışarıdan ilave edilen sitokininlerin IAA-oksidad enziminin aktivitesini azaltarak iç oksin metabolizmasını değiştirmesinden kaynaklanmaktadır (Palni ve ark., 1988). Yüksek IAA seviyeleri, RNA sentezini ve sonuç olarak ta protein sentezini artırarak hücrel büyüme uyarmakta ve bu kallus proliferasyonu ile sonuçlanmaktadır.

Kallus oluşturmak için farklı BBD'lerinin kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur. *H. erectum*'un sürgünleri IAA ve BAP varlığında ve karanlık şartlarda kallus

H. brasiliense'nin nodal eksplantları kullanıldığında, sitokinin ve oksin kombinasyonları kallus gelişimi sağlamamış, kalluslar sadece 2,4-D veya NAA'in varlığında MS veya B5 besi ortamları (Gamborg ve ark.,1968) kullanıldığında ve 16 saat fotoperiyot şartlarında elde edilmiştir (Cardoso ve Oliveira, 1996).

Daha önceki çalışmalarda, yaprak segmentlerinin bitki büyüme düzenleyicisi olarak yalnız 2,4-D varlığında kültüre alınması kallus oluşumuyla sonuçlanmamış 3 hafta sonra eksplantların nekroza neden olmuştur (Pretto ve santarem, 2000).

İyi gelişim gösteren kallus gruplarının fenolik bileşen içeriği analizleri de yapılmıştır. Fenolik madde içeriklerine bakıldığında, hiperisin (2.955 ng/mg), klorogenik asid (3.316 ng/mg), kuersetin (1.466 ng/mg) ve psödohiperisin (4.733 ng/mg) miktarları 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ile desteklenmiş MS besin ortamında geliştirilen kalluslarda daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.3).

5.3.2. Kallusta Şeker

Sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla yapılan uygulamalar arasında en sık rastlanılan uygulamalardan biri sukroz uygulamasıdır. Bununla birlikte sukrozun dışında glukoz (Tholakalabavi ve ark. 1994) ve mannitolün (Do ve Cormier, 1991; Tholakalabavi ve ark. 1994) de kullanıldığı bilinmektedir.

Sukroz ve glukozun farklı konsantrasyonlarının kallus gelişimi ve fenolik bileşen içeriği üzerindeki etkilerini tesbit edebilmek için yaptığımız çalışmada, sukroz ve glukozun 15 g/L konsantrasyonlarının kullanıldığı ortamlarda kallusların daha yüksek taze ağırlıkta (452.2 ve 430.4 mg/kallus) ve granüler bir yapıya sahip olduğu

fakat sarı ve beyaz renklere kallusların oluştuğu gözlemlendi. Düşük sukroz konsantrasyonlarının, pigment üretiminin başlatılmasını ertelediği ve karotenoid pigmentlerinin üretim seviyelerini azalttığı ve sukroz konsantrasyonunun artırılmasıyla karotenoid pigmentlerinin uyarımının belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir (Legha ve ark., 2012). Çalışmamızda, sukroz 30 g/L konsantrasyonuna artırıldığında kallusların yeşil rengini aldığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.4). Legha ve ark. (2012), kültürde sukroz konsantrasyonunun düşük dozlardan artırılmasıyla karotenoid pigmentlerinin uyarımının belirgin bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. Başlangıçta yeşil olan dokuların yeşil pigmentlerini zamanla kaybettiği ve bu doku yeşilliğinin dışarıdan verilen bir karbon kaynağına bağlı olduğu bilinmektedir. Kültürlerdeki tam organize olmuş yeşil sürgünler de, ortama iyi bir karbon kaynağının ilavesiyle daha iyi gelişim ve proliferasyon göstermektedir. Yani kültür ortamına kullanılabilir bir karbon kaynağının eklenmesi gereklidir. En genel kullanılan karbon kaynağı % 2-5 konsantrasyonunda sukrozdur. Sukroz kültür ortamında çeşitli metabolik aktiviteler için gereklidir. Glukoz ve fruktozun da bazı dokuların iyi gelişimi için destek olduğu bilinmektedir.

Şeker oranı 30 g/L'den daha fazla artırıldığında kallus büyüklüğünün nisbeten azaldığı gözlemlenmiştir. Ayan ve ark.(2005), *Hypericum perforatum L.*'nin sukroz (30, 40 ve 50 g/L) içeren MS besi ortamlarında yaprak diskleri ve gövde segmentlerinden kallus oluşumu için en iyi değerleri 30 g/L sukroz kullanılan ortamlardan elde etmişlerdir.

Ayrıca şeker konsantrasyonu daha fazla artırıldığında (50 g/L) kalluslar üzerinde kırmızılıkların oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Bu kırmızı rengin artan şeker konsantrasyonlarıyla birlikte antosiyanin miktarındaki artışı gösterdiği bilinmektedir. Sakuta ve ark. (1986) ve İlker (1987) kültür ortamında sukrozla artan osmotik basıncın, antosiyaninler ve betasiyaninler gibi bazı sekonder metabolitleri artırdığını belirtmişlerdir.

Farklı şeker konsantrasyonlarının kullanıldığı MS besi ortamlarında geliştirilen kallusların fenolik bileşik içeriği analizleri sonucunda, sukroz gruplarında psödohiperisin ve klorojenik asit içeriğinin (1.447 ng/mg ve 1.441 ng/mg) 15 g/L sukroz destekli MS ortamında daha yüksek değerlerde olduğu tesbit edilmiştir. Diğer bileşik miktarları birbirine yakın sonuçlar vermiştir (Çizelge 4.5).

Glukoz gruplarında, hiperisin, kuersetin ve psödohiperisin miktarları araştırılan gruplar içerisinde birbirine yakın değerlerde bulunurken, klorogenik asit ve hiperosid miktarlarının 15 g/L'den 50 g/L glukoza gidildikçe artış gösterdiği (0.358 ng/mg-1.473 ng/mg ve 5.539 ng/mg-7.312 ng/mg) tesbit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Karbon kaynaklarının seviyelerinin artırılmasıyla bitkilerdeki doğal ürünlerin veriminin artırıldığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Stepan-Sarkissian ve Fowler,1986; Ryu,1993).

Gunter ve Ovodov (2002), sukroz konsantrasyonunun 10 g/L'den 50 g/L'ye artırılmasının *Silene vulgaris*'in kalluslarında silenan biyosentezini artırdığını ve en yüksek değerlerin de 30 ve 50 g/Lde oluştuğunu tesbit etmişlerdir.

Hiperisin ve psödohiperisin içerikleri sukroz gruplarında daha yüksek değerde bulunurken, kuersetin, klorogenik asit ve hiperosid içeriklerinin glukoz gruplarında sukroz gruplarındakinden çok daha yüksek düzeylerde olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 4.9). Sreenivas ve ark.(2011), *Bridelia stipularis*'in kallus kültürlerinden antosiyanin üretiminde glukoz'un sukroz'dan daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Antosiyanin üretiminde glukozdan sonra % 3 sukrozun en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir.

Miura ark.(1998), *Glehnia littoralis*'in kalluslarında, antosiyanin üretimi ve hücre büyümesi için araştırdıkları sekiz farklı şeker çeşidi içerisinde en iyi karbon kaynağının sukroz olduğunu tesbit etmişlerdir. Glukoz, mannoz ve galaktoz'un sırasıyla azalmaya neden olduğunu ve ksiloz gibi laktozun da hücre büyümesinde oldukça düşük sonuçlar verdiğini ve optimal sukroz konsantrasyonunun (% 1-2-3- ve 5 konsantrasyonları içerisinde) % 2-3 olduğunu, antosiyanin veriminin % 1 sukroz varlığında % 3 sukroz ortamındaki % 40'ı olarak bulmuşlardır.

5.3.3. Kallusta pH

Ortam pH'sındaki değişiklikler, çeşitli mineral iyonlarının ortamda bulunmalarını ve bunların bitki tarafından alınımını etkilemektedir.

Farklı pH değerlerinin *H. retusum*'un kallus dokularının gelişimi üzerine etkisini saptamak amacıyla gerçekleştirdiğimiz çalışma sonucunda, düşük pH ortamında (pH 3.5 ve pH 4.5) kültüre alınan kallusların gelişimlerini sürdürmediği zamanla kararmaların oluştuğu, yüksek pH değerinde ise (pH 7.0) yine gelişimin sınırlı kaldığı ve kalluslarda

kahverengileşmelerin olduğu gözlenmiştir. Genellikle 6.0 dan daha yüksek bir pH değeri besi ortamının daha sertleşmesine neden olurken, 5.0'dan daha düşük pH değerlerine ayarlanan besi ortamları, agarın yeteri miktarda jelleşmesine izin vermemektedir. Dolayısıyla bu ortamlar kallus gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir.

Burada kullanılan pH ortamları (pH 3.5, 4.5, 5.8, 6.0, 6.5 ve 7.0) içerisinde en yüksek kallus taze ağırlık değeri (510.2 mg/kallus) pH 6.5'ten elde edilmiştir. Fakat çalışmamızda kallus dokusu özelliklerine bakıldığında pH 5.8 ortamında gelişen kallusların daha granüler özellikte olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6). Yine Straus ve LaRue (1954), mısır endosperm kalluslarında en iyi taze ağırlık miktarını pH 7.0 ve kuru ağırlıkta en iyi miktarı pH 6.1 gibi yüksek pH değerlerinden elde ettiklerini bildirmiştir.

Farklı pH ortamlarında geliştirilen kallusların fenolik bileşen içeriklerine bakıldığında; hiperisin ve psödohiperisin içeriklerinin en yüksek değeri (0.965 ng/mg ve 0.559 ng/mg) düşük ph ortamında (pH 4.5) tesbit edilmiştir. Sreenivas ve ark.(2011), *Bridelia stipularis*'in kallus kültürlerinden antosiyanin üretiminde çalıştıkları pH ortamları içerisinde en yüksek antosiyanin miktarını pH 3.5 ve 3.7 de tesbit etmişlerdir.

Çalışmamızda ortamın pH değeri yükseldikçe klorogenik asit ve hiperosid içeriğinin arttığı ve en yüksek değer pH 6.5 olan ortamda gelişen kalluslardan (1.758 ng/mg ve 8.804 ng/mg) elde edildiği, kuersetin içeriğinin ise en yüksek değerinin (1.237 ng/mg) pH 5.8'de elde edildiği bulunmuştur(Çizelge 4.7).

Düşük pH ve yüksek pH ortamlarında fenolik bileşik içeriklerinin fazla olması, dokuların bu ortamlarda strese girmeleri sonucunda bu bileşiklerin üretimini artırdıklarını göstermektedir.

5.3.4. Kallusta Işık

Işık uygulaması, kallus kültürlerinin gelişimi ve fenolik bileşen içeriği üzerine etkisini araştırdığımız bir diğer uygulamadır. Bu çalışma sonucunda, kullandığımız kontrol (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık), sürekli aydınlık ve sürekli karanlık şartlarına ayarlanmış ortamlarda, en fazla kallus taze ağırlığı (496.25 mg/kallus) sürekli karanlık ortamda gelişen kalluslardan elde edilmiştir. Pretto ve santarem (2000), *H.*

Perforatum'un yaprak segmentlerini 4.4 µM BAP + 4.5 µM 2,4-D içeren ortamda karanlık ve aydınlık şartlarda ayrı ayrı kültüre almış ve karanlıkta kültüre alınan eksplantlarda daha yüksek kallus taze ağırlığını elde etmiştir.

Sürekli aydınlık ortamında kültüre alınan kallusların taze ağırlığının (305.25 mg/kallus) karanlıkta kültüre alınan kalluslardan daha düşük olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.8). Işık varlığında IAA-oksidadın aktivitesinin artarak sitokin ve oksin arasındaki iç dengeyi değiştirdiği ve kallus büyümesini azalttığı bildirilmiştir (Gaspar ve ark., 1982). Yani aydınlık koşullarda elde edilen başarının, karanlıkta tutulan kültürlere göre düşük olması, kallus oluşumunu teşvik etmek amacıyla besin ortamına ilave edilen oksinlerin aydınlık koşullarda parçalanarak, kallus oluşumunu engellemesi şeklinde açıklanabilmektedir (Westwood, 1993).

Sürekli karanlık ortamdan elde ettiğimiz kallusların iri yapılı, oldukça kolay dağılabilen ve sarımsı renkte olduğu görülmüştür. Sürekli ışık şartlarında gelişen kallusların oldukça yeşil renkte ve kompakt bir yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8). Pretto ve santarem (2000), yine aynı çalışmalarında, karanlıkta 4.5 µM 2,4-D + 0.46 µM KİN ve 0.44 µM BAP veya 4.4 µM BAP içeren ortamlarda kültüre alınan kallusların çabuk dağılabilen özellikte ve sarı renkte diğer hormon oranlarında ise kahverengi ve dağılmayan yapıda olduğunu, ışık şartlarında kültüre alınan tüm ortamlarda kültüre alınan kallusların ise yeşil ve kompakt olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı ışık uygulanan ortamlarda gelişen kallus gruplarının fenolik içerikleri karşılaştırıldığında, karanlık ortamdaki kallusların sadece kuersetin (1.520 ng/mg) içeriği en yüksek düzeyde bulunmuştur. Araştırılan diğer bileşiklerin en yüksek değerleri ise kontrol ortamındaki kalluslardan elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Yüksek ışık yoğunluğunun kullanıldığı ortamda gelişen kallusların fenolik bileşen içerikleri diğer iki gruba göre oldukça düşük miktarlarda kalmıştır. Sürekli ışık şartları altında sekonder metabolitlerin özellikle fenolik bileşiklerin, foto-dönüşümün engellendiği bir foto-blok oluşturabilmesi muhtemeldir (Hahlbrock and Scheel, 1989).

Pretto ve santarem (2000), kalluslarda ortaya çıkan yoğun yeşil rengin *H. perforatum* türünde ışık uygulamalarının fenolik üretimini uyarmadığı bilgisini desteklediğini bildirmişlerdir.

5.4. Süspansiyon Kültürü Çalışmaları

Hücre süspansiyon kültürleri başta ilaç olmak üzere, gıda, kozmetik ve tarım endüstrileri açısından önemi olan bitkisel sekonder metabolitlerin üretilmesi için kullanılan önemli bir doku kültürü yöntemidir. Bu kültür sistemlerinde sekonder metabolit üretimine yönelik optimizasyon çalışmaları, bu metabolitlerin endüstriyel boyutta, standart kalitede, bol miktarda ve sürekli üretilmelerine temel oluşturan araştırmalardır.

5.4.1. Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması

H. retusum'un süspansiyon kültürlerini başlatmak üzere, kallus oluşturmak için kullandığımız ortamlar içerisinde kallus oluşum oranı yüksek olan kalluslarla ayrıca beyaz ve sarımsı renkli ve kolay dağılabilen özellikte kalluslarla, bu kallusların oluştuğu BBD'lerinin farklı kombinasyonlarını içeren bu MS besi ortamlarını süspansiyon kültürü başlatma çalışmalarında da kullandık.

Süspansiyon hücre kültürü elde etmek için, çalışılan bu ortamlar içerisinde; 0.1 mg/L BAP+0.05 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L BAP+2.0 mg/L 2,4-D ve 0.1 mg/L KİN+0.2 mg/L 2,4-D ilaveli ortamlardaki kalluslar, yüksek kallus oluşum yüzdelerine sahip olmalarına rağmen kolay dağılmayan özellikte olmalarından dolayı, kallus dokuları sıvı ve çalkalayıcı ortamda dağılım gösteremediğinden dolayı bu ortamlardan süspansiyon kültürü elde edilememiştir. 0.5 mg/L KİN+0.5 mg/L 2,4-D içeren ortamdaki kalluslar da yüksek kallus oluşum yüzdesine sahip ve granüler tipteki kalluslardan oluşmuştur fakat bu kalluslar yeterince iri özellikte olmamalarından dolayı iyi bir süspansiyon kültürü oluşturmamıştır. İstenilen özelliklerdeki bir süspansiyon kültürünün elde edilmesi kallus dokusunun niteliğine bağlıdır. Bunun için kallus dokusunun kolayca dağılabilmesi gerekir. (Allan E. 1996).

Süspansiyon hücre kültürü elde etmek için kullandığımız diğer ortamlar olan, 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN+ 1.0 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında gelişen kallusların iyi dağılım gösteren süspansiyon kültürlerini oluşturduklarını tesbit ettik. Bu kalluslar daha açık renkli, iri ve granüler tipte

olduklarından dolayı, bu kallus dokuları sıvı ve çalkalmalı ortamda iyi dağılım göstererek süspansiyon kültürünü oluşturmuşlardır.

Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında başlangıç materyali olarak kullanılan eksplantlardan elde edilecek kallusların, yeterli miktarda ve istenilen özelliklerde olması da sekonder metabolit üretiminde başarıyı büyük ölçüde etkilemektedir. Bu amaçla beyaz renkli, kolay dağılılabilen ve yumuşak dokulu kalluslar, hücre kültürlerinin oluşturulmasında en uygun kalluslar olarak kabul edilmektedir (Romulo ve ark., 1999).

Praveen ve Murthy (2010), *Withania somnifera*'nın hücre süspansiyon kültürlerini, 2.0 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN ilaveli MS besi ortamını kullanarak başlatmıştır.

Walker ve ark.(2001) *H. perforatum*'un hücre süspansiyonlarını kurmak için 2,4-D (0.90 mM), KİN (0.11 mM) ve sukroz (30 g/L) içeren MS besi ortamını kullanmıştır.

5.4.2. Süspansiyon Kültürlerinde BBD

Süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında olumlu sonuçlar veren, 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KİN+ 1.0 mg/L 2,4-D BBD ilaveli MS sıvı besi ortamlarının kültürdeki hücrelerin gelişimi (PHH, taze ve kuru ağırlık) üzerindeki etkilerini araştırdık. PHH değerleri karşılaştırıldığında, her iki grupta 28 günlük hücre artışının düzenli bir artış gösterdiği kaydedilmiştir. Ancak bu artış hızı ve miktarının 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.11). Aynı şekilde ortalama taze ve kuru ağırlık miktarları da 0.5 mg/L KİN +1.0 mg/L 2,4-D ilaveli MS besin ortamında daha yüksek oranlarda bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Çalışılan fenolik bileşenler içerisinde yalnızca kuersetin içeriğini 0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D (0.362 ng/mg) BBD destekli MS besi ortamında gelişen kalluslarda daha yüksek miktarda bulunurken, hiperisin (0.743 ng/mg), hiperosid (0.259 ng/mg), klorojenik asit (0.970 ng/mg) ve psödohiperisin (1.587 ng/mg) içeriklerinin ise, 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D BBD ilaveli grupta daha yüksek miktarlarda bulunduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.12). Hücreleri bölünmeye teşvik etmek için kullanılan 2,4-

D'nin genel olarak sekonder metabolit üretimini baskıladığı bilinmektedir (Rao ve Ravinskar, 2002). Benzer şekilde *H.retusum'un* hücre süspansiyon kültürlerinde de 2,4-D kullanımının hücre biyokütlesinin artırması buna karşın fenolik bileşen oluşumunu engellemesi, 2,4-D'nin bu etkisini doğrulamaktadır.

Dolayısıyla biyokütle olarak daha düşük yoğunluktaki grubun içerdiği fenolik madde miktarı daha yüksek düzeylerde bulunmuştur. Birçok sekonder metabolitin kültürlerde hücre bölünmesinin yavaşladığı hatta durduğu evrelerde üretildiği bilinmektedir (Glick ve Pasternak 2003; Yeoman ve ark.1990). Çalışmamızda da biyokütle miktarı düşük olan kültürlerdeki fenolik madde miktarının daha fazla çıkması bu bilgiyle örtüşmektedir.

5.4.3. Süspansiyon Kültürlerinde pH

Hücre süspansiyon kültürlerinde çoğalma ve sekonder metabolit üretimini etkileyen etmenlerden bir diğeri de kültür ortamının pH'sıdır. Kültür ortamlarının başlangıç pH'larında yapılan değişikliklerin, hücrelerde çoğalmayla ilgili bazı enzimatik reaksiyonları etkilediği bildirilmiştir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Çalışmamızda denenen pH değerleri içerisinde 28. günün sonunda elde edilen gerek PHH (6.5 mL/L) gerekse hücre taze ağırlık (5.9 g/L) ve kuru ağırlıkları (0.52 g/L) bakımından en iyi ortamın kontrol ortamı olan pH 5.8 olduğu belirlenmiştir. Düşük pH değeri olarak kullanılan pH 4.5 ve yüksek pH değeri olarak kullanılan pH 6.5 ortamlarında hücre çoğalmasını gösteren PHH (4.9 ve 4.5 mL/ L), taze ağırlık (4.6 ve 4.2 g/L) ve kuru ağırlık değerleri (0.42 ve 0.40 g/L) pH 5.8'den daha düşük seviyelerde kalmış dolayısıyla hücre çoğalması üzerinde olumlu etkiler göstermemişlerdir (Çizelge 4.13). Ortam pH'sının optimum olarak bilinen pH 5.8 değerinde meydana gelen değişiklikler, çeşitli mineral iyonlarının ortamda bulunmalarını ve bunların bitki hücreleri tarafından alınımını etkilemektedir.

Çakır (2004) *Astragalus chrysochlorus'un* hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç pH'larının 5.7 olduğu kontrol koşullarının, kültürlerin maksimum hücre miktarına (13 mL SCV) ulaştıklarını, bu değer altında ve üstündeki pH değerleri olan pH 4.7 ve 6.7 koşullarının ise çoğalmayı kontrole göre düşürmekle birlikte (sırasıyla 10.33 ve 10 mL SCV), çoğalma üzerinde en az olumsuz etki gösteren kültürleme koşulları olduğunu bildirmiştir.

H. retusum'un hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç pH'larındaki değişimlerin kültürlerin fenolik bileşik içerikleri üzerindeki etkilerine bakıldığında, klorogenik asit (0.067 ng/mg), kuersetin (0.187ng/mg) ve psödohiperisin (0.326 ng/mg) içeriklerinin, düşük pH değeri olarak kullanılan pH 4.5 kültür ortamındaki kültürlerde önemli ölçüde daha fazla miktarlarda üretildiği, aynı şekilde klorogenik asit (0.067 ng/mg) ve kuersetin miktarlarının (0.187 ng/mg) pH 6.5 ortamında da kontrol ortamından daha yüksek miktarlarda olduğu bulunmuştur. Hiperisin ve hiperosid bileşiklerinin pH 4.5 ve 5.8 kontrol şartlarındaki miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.14). Bu da kültür ortamındaki hücrelerin gelişimine olumlu yönde katkıda bulunmayan bu stres koşullarında fenolik bileşiklerin daha fazla üretildiğini göstermektedir.

Çilek ile yapılan bir çalışmada 3.7-8.7 arasında denenen pH değerlerinden 8.7'nin antosiyanin üretimini kontrol değer olan 5.7'ye göre yaklaşık 2 kat artırdığı bildirilmektedir (Zhang ve Furusaki, 1997).

5.4.4. Süspansiyon Kültüründe Işık

Süspansiyon kültüründe farklı ışık uygulamasının kültürün gelişimi üzerindeki etkisini araştırmak için uyguladığımız bir kontrol (16 saat aydınlık, 8 saat karalık) ve sürekli aydınlık ve sürekli karanlık uygulamaları olmak üzere üç farklı ortam oluşturduk. Çalışılan bu ortamlar içerisinde 28. günün sonunda, en yüksek PHH (20.0 mL/L) , ortalama taze (19.2 g/L) ve ortalama kuru ağırlık değerlerini (1.12 g/L) sürekli karanlık ortamda gelişen kültürler vermiş ve dolayısıyla kültür gelişiminde en iyi ortam olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.15). Işık varlığında IAA-oksidadın aktivitesinin artarak sitokinin ve oksin arasındaki iç dengeyi değiştirdiği ve kültürlerde büyümeyi azalttığı bildirilmiştir (Gaspar ve ark., 1982). Yani aydınlık koşullarda elde edilen başarının, karanlıkta tutulan kültürlere göre düşük olması, besin ortamına ilave edilen oksinlerin aydınlık koşullarda parçalanarak, kültürün gelişimini engellemesi şeklinde açıklanabilmektedir (Westwood, 1993). Çetin (2010), asma hücre süspansiyon kültüründe denediği üzüm çeşitlerinde ortalama hücre sayısı ve ortalama hücre kuru ağırlığı bakımından en yüksek değerleri karanlık ortamda kültüre aldığı hücrelerden elde etmiştir.

Baıs ve ark.(2002), *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde karanlık şartlardaki biyokütle miktarının, aydınlıktaki kültürlerden daha fazla olduğunu tesbit etmişlerdir.

Farklı ışık ortamlarının fenolik bileşen içerikleri karşılaştırıldığında, hiperisin içeriklerinin bu ortamlarda birbirine yakın değerler verirken karanlık ortamdaki kültürlerde (0.053 ng/mg) daha yüksek olduğu, psödohiperisin içeriğinin (0.105 ng/mg) ise yine bu ortamdaki kültürlerde çok daha yüksek miktarda olduğu tesbit edilmiştir. Hiperosid (0.215 ng/mg) ve kuersetin (0.063 ng/mg) miktarları sürekli aydınlık ortamdaki kültürlerde daha yüksek bulunmuştur. Klorogenik asit (0.012 ng/mg) sadece kontrol grubunda bulunurken, rutin ise çalışılan gruplar içerisinde tesbit edilememiştir (Çizelge 4.16).

Walker ve ark. (2002), *H. perforatum* hücre süspansiyon kültürlerinin karanlık ortamda ürettikleri hiperisin içeriğinin aydınlık ortamdakinden daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Baıs ve ark.(2002), yaptıkları çalışmada *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde total hiperisin içeriğinin karanlık şartlarda (ışığıntakinin 2.5 katı) maksimuma ulaştığını bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar, sürekli ışık şartları altında, *H. perforatum*'da pigmentlerin daha az birikimiyle sonuçlanan hiperisinin etkili bir şekilde dönüşümünün arttığını gözlemlemişlerdir (Poutaraud ve ark.,2001). Sekonder metabolitlerin, özellikle fenolik bileşiklerin, sürekli ışık şartları altında foto-dönüşümü engelleyen bir foto-blok oluşturabilmeleri muhtemeldir (Hahlbrock ve Scheel, 1989).

5.4.5. Süspansiyon Kültüründe Sukroz

Hücre kültürlerinde, sukroz karbon kaynağı olması nedeniyle oldukça sık kullanılan bir uygulamadır. Kültür ortamında sukrozla artan osmotik basıncın, antosiyaninler ve betasiyaninler gibi bazı sekonder metabolitlerin üretimini artırdığı pek çok çalışmada bildirilmektedir (Sakuta ve ark.,1986; İlker, 1987). Başlangıç sukroz konsantrasyonunun bitki hücre kültürlerinde, kültürlerin büyüme oranı ve sekonder metabolit üretimi gibi çoğu parametrelerini etkilediği bildirilmiştir(Akalezi ve ark. 1999; Zhong ve Yoshida 1995).

Sukrozun, hücre süspansiyon kültürlerinde diğer şeker tiplerine göre daha etkili olduğu bildirilmiştir. Karwasara ve Dixit (2013), *Nothapodytes nimmoniana*'nın hücre kültürlerinde, test ettikleri glukoz, fruktoz, maltoz ve sukroz gibi şeker çeşitleri içerisinde en yüksek kamptotesin birikiminin sukrozda gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Karwasara ve Dixit (2013), *Nothapodytes nimmoniana*'nın hücre kültürlerinde, test ettikleri glukoz, fruktoz, maltoz ve sukroz gibi şeker çeşitleri içerisinde en yüksek kamptotesin birikiminin sukroz'da gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, sukroz konsantrasyonu 15 g/L'den 30 g/L'ye artırıldığında kültürdeki hücrelerin PHH (6.3'ten - 9.3 mL/L'ye), taze ağırlık (5.5'tan- 8.3 g/L'ye) ve kuru ağırlıklarında (0.44'ten - 0.76 g/L'ye) artış meydana gelmiş yani artan şeker konsantrasyonu kültürdeki hücrelerin gelişimini de artırmıştır. Fakat daha yüksek sukroz konsantrasyonunda (50 g/L) gelişimin gerilediği tesbit edilmiştir (Çizelge 4.17). *In vitro* kültürlerde artan sukroz konsantrasyonlarının osmotik strese yol açtığı bilinmektedir. Çalışmamızda da sukroz konsantrasyonunun artmasıyla kuru ağırlıkta meydana gelen düşüş, süspansiyondaki hücrelerde osmotik stresin meydana geldiğini göstermektedir. Chui ve ark.(2010), *H. perforatum*'un adventif kök kültürlerinde denedikleri artan sukroz seviyelerinde (% 0, 1, 3, 5, 7, ve 9 in w/v) maksimum taze ve kuru ağırlığı % 3 sukroz oranından elde etmiş, % 3'ten daha yüksek sukroz konsantrasyonlarında (% 5,7,ve 9 w/v) kuru ağırlığın sırasıyla düştüğünü, bu düşüşün % 3 ten daha yüksek sukroz konsantrasyonlarının kök gelişimini inhibe ettiği ve bunun da hücre ve organ kültürlerinde oluşan osmotik stresten kaynaklandığını bildirmişlerdir. Tian ve Russell (1998), tütün hücre süspansiyon kültürlerinde osmotik stres artışıyla birlikte biyokütlede de bir azalma olduğunu kaydetmişlerdir.

H. retusum'un hücre süspansiyon kültürlerinde sukroz gruplarının fenolik bileşikler üzerindeki etkilerini de araştırdığımız çalışmada, hiperisin ve hiperosid miktarları çalışılan gruplarda birbirine yakın değerler verse de 15 g/L sukroz destekli ortamda diğer iki gruptan daha yüksek miktarlarda (0.035 ng/mg ve 0.023 ng/mg) bulunmuştur. Kuersetin (0.021 ng/mg) ve psödohiperisin (0.067 ng/mg) içeriklerinin de yine 15 g/L sukroz içeren ortamda gelişen kültürlerde daha fazla miktarda olduğu tesbit edilmiştir. Bu ortamlarda klorojenik asit ve rutin bileşikleri bulunamamıştır (Çizelge 4.18). Kullanılan başlangıç sukroz konsantrasyonları bitki hücre kültürlerinde,

kültürlerin büyüme oranı yanında sekonder metabolit üretimini de etkilemektedir (Akalezi ve ark. 1999; Zhong ve Yoshida 1995).

Iranbakhsh ve ark.(2007), *Datura stramonium* bitkisinin hücre süspansiyon kültüründe, 20 g/L sukroz konsantrasyonunun en yüksek alkaloid üretimini sağladığını tesbit etmişlerdir.

Sukroz konsantrasyonun normal olarak kullanılan % 2-3 seviyelerinin altına düşmesinin *Panax notoginseng*'in süspansiyon kültürlerinde ginseng saponin ve polisakkaritlerin üretimini uyardığı bildirilmiştir (Zhang ve ark. 1996).

Çalışmamızda yaptığımız çeşitli uygulamalarda, fenolik bileşen miktarlarının uygulanan gruplar arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum ise, sekonder metabolit üretiminde, aynı süspansiyon kültüründe yer alan hücrelerin, metaboliti üreten ve üretmeyen hücrelerin karışımından oluşmuş olmaları nedeniyle, sekonder metabolit üretiminde çoğunlukla hücreler arasında farklılıkların bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, sekonder metabolit üretiminin, üretime katkıda bulunan hücreler arasında bile homojen olmayabileceği ifade edilmektedir (Mukundan ve ark.,1998; Kim ve ark., 2004). Bu nedenle hücre süspansiyon kültürleri ile geniş ölçekli üretim, bitki hücrelerinin yavaş gelişmesi, düşük dayanım göstermeleri ve daha pek çok spesifik özelliklerinden dolayı son derece zor bir süreci içermektedir (Bourgand ve ark., 2001).

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile *H. retusum*'un kallus gelişiminde 30 g/L sukroz, pH 5.8 ortamı ve kontrol grubundaki ışık koşullarının kullanıldığı MS ortamlarının pozitif etkiye sahip olduğu görülmüştür. Fenolik bileşen miktarları ise ışık uygulamalarında kontrol grubunun en yüksek fenolik bileşen içeriğine sahipken, farklı pH değerleri ve şekerlerin kullanıldığı uygulamalarda fenolik bileşen içeriğinin uygulama grupları arasında değişkenlik gösterdiği bulunmuştur.

Süspansiyon kültürlerinde en iyi kültür gelişimi gösteren ortamların, 0.5 mg/L KİN+1.0 mg/L 2,4-D, pH 5.8, karanlık koşullarındaki ve 30 g/L sukroz içeren MS ortamları olduğu saptanmıştır. Yine bu ortamların fenolik bileşen içeriklerine bakıldığında en yüksek bileşen miktarlarının, 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D hormon ilaveli, pH 4.5 (hiperisin ve hiperosid hariç) ve 15 g/L sukroz içeren kültürlerden elde

edilmiştir. Işık uygulamalarında ise fenolik bileşen içerikleri uygulanan gruplar arasında değişkenlik göstermiştir.

Nagella ve Murthy (2010), *Withania somnifera* 'nın hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi ve withanolid A. üretimi bakımından optimize edilmiş şartları, 10 g/L kültüre alınan taze materyal, tam güçlendirilmiş MS ortamı, 3 % (w/v) sukroz, dört hafta kültür periyodu ve kültür başlangıç pH'sını 5.8 olarak belirlemişlerdir.

Grover ve ark.(2012), *Camellia sinensis*'in hücre süspansiyon kültürlerinde 43 bileşiği total olarak hesaplamışlar, bu bileşiklerin en yüksek seviyelerini, 5 mg/L 2,4-D, 1 mg /L BAP ve 30 g/L sukroz içeren ve pH of 5.8 olan, tamamen karanlıkta kültüre alınan ve MS besi ortamında gelişen hücre süspansiyon kültürlerinden elde etmişlerdir.

Bu tez çalışmasıyla elde edilen bulguların, *H. retusum* 'daki sekonder metabolitlerin ayrıntılı analizleri ve üretimlerinin artırılmasına yönelik ileri iyileştirme çalışmalarına temel oluşturabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abreu, I.N., Porto, A.L.M., Marsaioli, A.J., Mazzafera, P., 2004. Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science*, 167: 949-954.
- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., De Witte, P.A. 2002. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,34: 221-241.
- Akalezi C.O., Liu S., Li Q.S., Yu J.T., Zhong J.J. 1999. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. *Process Biochem* 34: 639–642.
- Akgöz, Y.2009. *Hypericum Retusum* Aucher bitkisinin farklı çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının antioksidan etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.47.
- Akkuş, I. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya,1995; 1-32.
- Alali, F., Tawahab, K., Tamam, A.E. 2004. Determination of hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra (Hypericaceae) growing wild in Jordan. *Nat Prod Res*, 18: 147–151.
- Alfermann, A. W. ve Petersen, M., 1995, Natural Products Formation by Plant Cell Biotechnology, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43: 199-205.
- Allan, E. Plant cell culture. In: Stafford, A.; Warren, G. 1996. *Plant Cell and Tissue Culture*, John Wiley and Sons, Chichester, 1-23.
- Ali S. M., Olivo M., Yuen G. Y. ve Chee S. K., 2001. Induction Of Apoptosis By Hypericin Through Activation Of Caspase-3 In Human Carcinoma Cells.*International Journal Of Molecular Medicine* 8: 521-530.
- Andersson, M.E., Aslan, D., Clarke, A.; Roeraade, J., Hagman, G. 2003. Evaluation of generic chiral liquid chromatography screens for pharmaceutical analysis.*J. Chromatogr. A*, 1005, 83–101.
- Anonymous, 1998. New Good Housekeeping Institute study finds drastic discrepancy in potencies of popular herbal supplement, in: *Proceedings of the Consumers Safety Symposium on Dietary Supplements and Herbs*, Good Housekeeping Institute, New York, 2 March 1998.

Ayan A. K., Çırak C., Kevseroğlu K. ve Sökmen A., 2005. Effects Of Explant Types and Different Concentrations Of Sucrose and Phytohormones On Plant Regeneration and Hypericin Content In *Hypericum Perforatum* L. Turk J Agric For 29 P: 197-204 © TÜBİTAK.

Ayan, A.K., Çırak, C., Yanar, O., 2006. Variations in total phenolics during ontogenetic, morphogenetic, and diurnal cycles in *Hypericum* species from Turkey. J. Plant Biol., 49: 432-440.

Ayan, A.K., Radušienė, J., Çırak, C., Ivanauskas, L., Janulis, V. 2009. Secondary metabolites of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum bupleuroides*. Pharmaceutical Biology, 47: 847–853.

Ayan, A.K., Çırak, C. 2008. Hypericin and Pseudohypericin Contents in Some *Hypericum* Species Growing in Turkey, pharmaceutical biology, 4; 288-291

Băcilă, I., Coste, A., Halmagyi, A., Delu, C. 2010. Micropropagation of *Hypericum maculatum* Cranz an important medicinal plant, Romanian Biotechnological Letters, 1, Printed in Romania.

Bagdonaite, E., Martonfi, P., Repcak, M., Labokas, J. 2012. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L. from Lithuania. Industrial Crops and Products, 35: 302–308.

Bais, H.P., Walker, T.S., McGrew, J.J., Vivanco, J.M. 2002. Factors affecting growth of suspension culture of *Hypericum perforatum* and production of hypericin. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 38: 58-65.

Baydar, N.G., Özkan, G., Sağdıç, O., 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. Food Control, 15, 335-339.

Baytop, T., 1999. Therapy with Medicinal Plants in Turkey. Istanbul University press, Istanbul, pp. 66-167.

Baytop A. 1972. Farmasötik Botanik. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. İstanbul. S.246.

Baytop T., 1999. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi (Geçmişte Ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul, S: 166-167.

Baytop, T., 1984: Türkiyede Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları, No:3255, İstanbul.

Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J. Herbal Medicine. 2000, Integrative Medicine Communications, Newton; 359-366.

- Bombardelli, E., Morazzoni, P. *Hypericum perforatum*. 1995. *Fitoterapia*, 66: 43-68.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
- Briskin, D.P., Leroy, A., Gawienowski, M. 2000. Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 413-420.
- Briskin, D.P., Gawienowski, M. C. 2001. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 1075-1081.
- Brolis, M., Gavetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F., Peterlongo, F., 1998. *J. Chromatogr. A* 825, 9.
- Butterweck, V. Mechanism of action of St. John's wort in depression: what is known?, *CNS Drugs*, 2003, 17: 539-562.
- Büter, K.B., Büter, B., 2002. Ontogenetic variation regarding hypericin and hyperforin levels in four accessions of *Hypericum perforatum* *J. Herbs Spices Med. Plants* 9, 95-100.
- Buttke, T.M., Sandstrom, P.A., 1994, Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*; 15: 7-10.
- Cardoso, M.A, de Oliveira DE. 1996. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44: 91-94.
- Cellarova, E., Kimakova, K., Brutovska, R. 1992. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and variability of R0. *Theoretical and Applied Genetic*, 101, 46-50.
- Charchoglyan A., Abrahamyan A., Fujii I., Boubakir Z., Gulder T. A. M., Kutchan T. M., Vardapetyan H., Bringmann G., Ebizuka Y. Ve Beerhues L., 2007. Differential Accumulation Of Hyperforin And Secohyperforin In *Hypericum Perforatum* Tissue Cultures. *Phytochemistry*, 68: 2670-2677.
- 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.
- Conforti, F., Statti, G.A., Tundis, R., Menichini, F., Houghton, P. 2002. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Tura aerial part. *Fitoterapia*, 73: 479-483.

Conforti, F.; Loizzo, M.R.; Statti, A.G.; Menichini, F. 2007. Cytotoxic activity of antioxidant constituents from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Nat Prod Res*, 21: 42-46.

Conforti, M., Statti, G., Loizzo, M.R., Bonesi, M., 2002. Natural antioxidants: current status and future prospects Organized by the Italian society of herbal science, *Fitoterapia*, 73: 479-483.

Congard, B., Beaujard, F. and Viemont, J.D., 1986. Les bruyeres in vitro VI Croissance de *Calluna vulgaris* sur milieu strictement nitrique ammoniacal et cinetique du pH en fonction du development des plantes. *Can. J. Bot.*, 64: 959-964.

Cooper E. L., 2006. *Ecam* 2006; 3(2), P: 167–169.

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.

Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C., Coldea, G. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 106: 279–288.

Couceiro, M.A., Afreen, F., Zobayed, S.M.A., Kozai, T. 2006. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germplasm. *Plant Science*, 170: 128-134.

Couladis, M.; Chinou, I.B.; Tzakou, O.; Petrakis, P.V. 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.), *phytoterapy research*, 2: 152-154.

Crockett, S., Schaneberg, B., Khan, I.A., 2005. *Phytochem. Anal.* 16, 479.

Cui, X. H., Murthy, H.N., Wu, C.H., Paek, K.Y. 2010b. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 103: 7–14.

Cui, X.H., Murthy, H.N., Wu, C.H., Paek, K.Y. 2010a. Adventitious root suspension cultures of *hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 46: 437-444.

Çakır, Ö. 2004. Kimyasal kültürleme koşullarının *Astragalus chrysochlorus* hücre süspansiyon kültürleri üzerindeki çeşitli etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul. 57.

Çetin, E.S. 2010. Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimi üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.128.

Çırak, C., Radusiene, J., Çamas,N.2008. Pseudohypericin and hyperforin in two Turkish *Hypericum* species: Variation among plant parts and phenological stages.Biochemical Systematics and Ecology ,36 :377-382.

Çırak, C.; Sağlam, B.; Ayan, A.K., 2006.Morphogenetic and diurnal variation of hiperisin in some *Hypericum* species from Turkey during the course of ontogenesis, Biochemical Systematics and Ecology ,34;1-13.

Çırak,C.,Radusiene,J.,Karabük,B.,Janulis,V.2007.Variation of bioactive substances and morphological traits in *Hypericum perforatum* populations from Northern Turkey. Biochemical Systematics and Ecology, 35: 403-409.

Çırak, C.2006. Farklı doku kültürü uygulamalarının iki kantaron türünde (*hypericum perforatum* ve *h. bupleuroides*) mikroçoğaltım yeteneği ve hiperisin ile toplam fenolik birikimi üzerine etkileri. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.87.

Danova,K., Čellárová,E., Macková,A., Daxnerová,Z., Toteva,V.K.2010. In vitro culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss.and production of phenolics and flavonoids. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 46: 422–429.

Davis, P.H.(ed.).1967. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburg University Press,1290, Edinburg.

DellaPenna, D. 2001. Plant metabolic engineering. Plant Physiology, 125: 160-163.

Dhillion, S.S., Svarstad, H., Amundsen, C., Bugge, H. C. 2002. Bioprospecting:effects on development and environment. AMBIO, 31: 491–493.

Dicosmo, F. ve Misawa, M., 1995, Plant Cell and Tissue Culture: Alternatives for Metabolite Production, Biotechnology Advances, 13 : 425-453.

Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E., Izzo, A.A. 2001.St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. Trends in Pharmacological Sciences, 22: 292-297.

Dias, A.C.P.,Seabra, R.M.,Andrade P.B. ,Ferrerres F., Fernandes M.2000. Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum*. Plant Science, 150: 93–101.

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.

Dougall, D.K., 1980. Nutrition and metabolism. In: E.J. Staba (Ed.), *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*. CRC Press, FL, pp. 21-58.

Dulger, B. and Gonuz, A. 2005. Antibacterial activity of the endemic *Hypericum kazdaghensis*. *Fitoterapia*, 76: 237-239.

Ellialtıoğlu Ő., Őstũn A. S. ve Mehmetođlu, Ő. 1998. Hũcre sũspansiyon kũltũrũnde fitoaleksinin ũretimi. *Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Molekũler Temelleri*. E.Ő.Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 22-26 Haziran 1998, Bornova-İZMİR, S: 82- 96.

El-Sherbiny, D.A., Khalifa, A.E., Attia, A.S. and Eldenshary, E.S. 2003. *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76: 525-533.

Endress, R., 1994, *Plant Cell Biotechnology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, ISBN: 0-387-56947-2.

Eroğlu, E.2007. *Hypericum pamphylicum* Robson et Davis tũrũnũn hiperisin miktarı ve biyolojik aktivite yũnũnden incelenmesi. Yũksek Lisans Tezi, İstanbul Őniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitũsũ, İstanbul.84.

Filippini, R., Piovan, A., Borsarini, A., Caniato, R.2010. Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, 81: 115–119.

Fornasiero, R.B. 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. *Plant Science*, 165: 507-513.

Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L., 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 890-894.

Franklin, G., Dias, A.C.P.2011. Chlorogenic acid participates in the regulation of shoot, root and root hair development in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 835-842.

Franklin, M.; Chi, J.; McGavin, C.; Hockney, R.; Reed, A.; Campling, G.; Whale R.W.; Cowen, P. J. 1999. Neuroendocrine evidence for dopaminergic actions of *Hypericum* extract (LI 160) in healthy volunteers, *Biol Psychiatry.*, 15: 581-4.

Gadzovska,S., Maury,S., Ounnar,S., Righezza,M., Kascakova,S., Refregiers,M., Spasenoski,M., Joseph,C., Hagège,D.2005. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 591–601.

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

Gamborg, O.L., Eveleigh, D.E. 1968. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry*,46: 417-421.

Ganzera, M., Zhao, J., Khan, I.A., 2002. *J. Pharm. Sci.* 91, 623.

Gaspar, T., Penel, C., Greppin, H.1982. Peroxidases 1970–1980. A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. University of Geneva, Geneva

Glick, B.R., Pasternak, J.J., 2003. *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA 3rd Edition, Large Scale Production of Proteins from Recombinant Microorganisms*, ASM Press, Washington, 481-509. ISBN :1-55581-269-4.

Gopıtha, K., Lakshmi Bhavani, A., Senthılmanıckam, J.2010. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot,root regeneration in sugarcane. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.*,1:1-7.

Graham T.L. 1998. Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36: 135–144.

Gronbaek, M., Becker, U., Johansen, D., Gottschau, A., Schnohr, P., Hein, H.O.,Jensen, G., Sorensen, T.I.A., 2000. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Annual International Medicine*, 133:411-419.

Grover,A.,Yadav, J.S.,Biswas, R., Pavan, C.S.S.,Mishra, P., Bisaria, V.S., Sundar, D.2012. Production of monoterpenoids and aroma compounds from cell suspension cultures of *Camellia sinensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108: 323–331.

Guttman, A.; Varoglu, M.; Khandurina, J. 2004. Multidimensional separations in the pharmaceutical arena. *Drug Disc. Today*, 9: 136–144.

6. KAYNAKLAR

Gunter,E.A., Ovodov,Y.S.2002. An alternate carbon source for enhancing production of polysaccharides by *Silene Vulgaris* callus. Carbohydrate Research, 337: 1641–1645.

Hahlbrock, K., Scheel, D., 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. Molecular Biology, 40, 347–369.

Han, C., 1997. Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols. Cancer Letters, 114: 153-158.

Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicine: Possible modes of action. Journal of Natural Products, 59: 205-215.

Heljma,K.,Vaher,M.,Pussa,T.,Orav,A.,Viitak,A.,Levand,T.,Kaljurand,M.2011. Variation in the composition of the essential oils, phenolic compounds and mineral elements of *Hypericum perforatum* L. growing in Estonia. Natural Product Research,25: 496–510.

Hışıl Y, Şahin F. ve Omay S,B., 2005. Kantaronun (*Hypericum Perforatum* L.) Bileşimi Ve Tıbbi Önemi, Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi, Sayı: 4, Cilt: 15.

Hoareau, L., DaSilva, E. J. 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid.Electronic Journal of Biotechnology, 2: 56-70.

Hubner, W.D.; Lande, S.; Podzuweit, H. 1994. *Hypericum* Treatment of Mild Depression with Somatic Symptoms, J. Geriatr Psychiatry Neurol, 7: 12-14.

Iranbakhsh,A.R., Oshagi,M.A., Ebadi,M.2007.Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. Pakistan journal of Biological Sciences, 10: 1236-1242.

İbova, S.2006. Bazı *hypericum* türlerinin fenolik bileşimi ile antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.52.

İlker, R., 1987. *In vitro* pigment production: an alternative to color synthesis. Food Technology, 41: 70-72.

Jaafar H. and A. Rahmat. 2008. Accumulation of partitioning of total phenols in two varieties of *Labisia pumila benth* under manipulation of greenhouse irradiance. Acta Horticulture, 797:387–392.

Jeong, J.A., Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J., Paek, K.Y .2009.Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. Biotechnol Bioprocess Eng., 14: 91–98.

Kaçar O. ve Azkan N., 2004. Sarı Kantaron' da (*Hypericum Perforatum* L.) Hiperisin Ve Üst Drog Herba Verimi İle Bazı Morfolojik Ve Agronomik Özellikler Arasındaki İlişkiler, Uludağ Üniv. Zir. Fak. Derg., 18: 109-122.

Karakas, O., Toker, Z., Tilkat, E., Ozen H.C., Onay, A.2009.Effects of different concentrations of benzylaminopurine on shoot regeneration and hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra., Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters,23:1459-1465.

Karakaş, Ö.2010.*Hypericum triquetrifolium* turra.'nın kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde total hiperisin içeriğinin belirlenmesi. Doktora tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.104.

Karakuş, P.2011.Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetişen ve endemik bir tür olan *Hypericum spectabile*'nin *in vitro* mikro çoğaltım yollarının araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.73.

Karwasara,V.S., Dixit,V.K.2013. Culture medium optimization for camptothecin production in cell suspension cultures of *Nothapodytes nimmoniana* (J. Grah.)Mabberley. Plant Biotechnology Report,7: 357-369.

Kazlauskas, S., Bagdonaite, E., 2004. Quantitative analysis of active substances in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) by the high performance liquid chromatography method. Medicina (Kaunas), 40: 975-981.

Keleş O., Ak S., Bakirel T. ve Alpınar K., 2001. Türkiye'de Yetişen Bazı Bitkilerin Antibakteriyel Etkisinin İncelenmesi. Turk J Vet Anim Sci 25, S: 559-565 TÜBİTAK.

Khalil, M.Y., Moustafa, A.A., Naguib, N.Y., 2007. Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming condition. World Journal of Agricultural Sciences, 3: 451-457.

Kızıllı, G.; Kızıllı, M.; Yavuz, M.; Emen, S.; Hakimoğlu, F., 2008. Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of *Hypericum triquetrifolium*. and *Hypericum scabroides*. Pharmaceutical Biology, : 46, :231-242.

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.

Kirakosyan, A., Vardapetyan, H., Charchoglyan, A. 2000. The content of hypericin and pseudohypericin in cell culture of *Hypericum perforatum* L. Russian Journal of Plant Physiology, 47: 301-306.

Klingauf, P., Beuerle, T., Mellenthin, A., El-Moghazy, A.M., Boubakir, Z., Beerhues, L. 2005. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. Phytochemistry, 66: 139–145.

Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P., De Groot, A., Evstatieva, L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis, 13: 8-17.

Kornfeld, A., Kaufman, P.B., Lu, C.R., Gibson, D.M., Bolling, S.F., Warber, S.L., Chang, S.C., Kirakosyan, A. 2007. The production of hypericins in two selected *Hypericum perforatum* shoot cultures is related to differences in black gland structure. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 24-32.

Kosuth, J., Jana, K., Ari, T., Anja, H., Cellarova, E. 2003. The content of Hypericins and phloroglucinols in *Hypericum perforatum* L. seedlings at early stage of development. Plant Science, 165: 515-521.

Kurata H., S. Matsumura and S. Furusaki. 1997. Light irradiation causes physiological and metabolic changes for purine alkaloid production by a *Coffea Arabica* cell suspension culture. Plant Science, 123: 197–203.

Kurtney, J. P., 1998, Biotechnology and Synthetic Chemistry Routes to Clinically Import Compounds, Pure and Applied Chemistry, 71: 1025-1032.

Lee, M.S.; Kerns, E.H. 1999. LC/MS Applications in drug development. Mass Spec. Rev., 18:187–270.

Legha, M. R., Prasad, K. V., Singh, S. K., Kaur, C., Arora, A., Kumar, S. 2012. Induction of carotenoid pigments in callus cultures of *Calendula officinalis* L. in response to nitrogen and sucrose levels. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 48: 99–106.

Lenoir, S.; Degenring, F. H.; Saller, R. A. 1999. Double-blind randomised trial to investigate three different concentrations of a standardised fresh plant extract obtained from the shoot tips of *Hypericum perforatum* L. Phytomedicine, 6:141-6.

Linde, K.; Ramirez, G.; Mulrow, C.D.; Pauls, A., Weidenhammer, W.; Melchart, D. 1996. St John's wort for Depression: an Overview and Meta-analysis of Randomised Clinical Trials, BMJ (Clinical Research Ed.), 253-258.

Linde, K.; Mulrow, C.D. 2003. St John's wort for depression. Cochrane Database Systematic Reviews 2, CD000448.

Linsmaier, E.M., Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18: 100–127.

Liu, X.N., Zhang, Q., Zhang, S.X., Sun, J.S. 2007. Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 9: 1–7.

Maggi, F., Ferretti, G., Pocceschi, N., Meneghini, L., Ricciutelli, M., 2004. *Fitoterapia*, 75, 702.

Maisenbacher, P., Kovar, K.A. 1992. Analysis and stability of *Hyperici Oleum*. *Planta Medica*, 58: 351-354.

Martarelli, D., Martarelli, B., Pediconi, D., Nabissi, M.I., Perfumi, M. and Pompei, P. 2004. *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. *Cancer Letters*, 210: 27-33.

Masanaru, M., 2002, *Plant Tissue Culture: an Alternative for Production of Useful Metabolite*, *FAO Agricultural Services Bulletins.*, 108.

Mennini, T.; Gobbi, M. 2004. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*, *life sciences*, 75:1021-1027.

Meral G. ve Karabay N. Ü., 2002. In Vitro Antibacterial Activities Of Three *Hypericum* Species From West Anatolia. *Turkish Electronic Journal Of Biotechnology Special Issue*, P: 6-10.

Miura, H., Kitamura, Y., Kenaga, T., Mizobe, K., Shimizu, T., Nakamura, M., Kato, Y., Yamada, T., Maitani, T., Goda, Y. 1998. Anthocyanin Production Of *Glehnia littoralis* Callus Cultures. *Phytochemistry*, 48: 279-283.

Michel H. and K. Klaus. 2001. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis*. *Planta*, 213: 953–966.

Morteza-Semnani, K., Mahmoudi, M., Saeedi, M. and Javanmardi, A. 2003. Analgesic activity of Iranian *Hypericum perforatum*. *Toxicology Letters*, 144: 88.

Motallebi, Azar, A., Kazemiani, S. 2011. Effect Of Carbon Source And Hydrolised Casein On Callus And Shoot İnduction in *Hypericum Perforatum* cv. Helos. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants.1: 313-318.

Mukherjee, P.K., Saritha, G.S., Suresh, B. 2001. Antibacterial spectrum of *Hypericum hookerianum*. Fitoterapia, 72: 558-560.

Mukherjee, P.K., Saritha, G.S., Suresh, B. 2002. Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India. Phytotherapy Research, 16: 692-695.

Mukherjee, P.K., Verpoorte, R., Suresh, B. 2000. Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. Journal of Ethnopharmacology, 70: 315-321.

Mukundan, U., Bhide, V., Singh, G., Curtis, W.R., 1998. pH mediated release of betalains from transformed root cultures of *Beta vulgaris*. Applied Microbiology and Biotechnology, 50; 241-245.

Mulinacci, N., Giaccherini, C., Santamaria, A.R., Caniato, R., Ferrari, F., Valletta, A., Vincieri, F.F., Pasqua, G., 2008. Anthocyanins and xanthenes in the calli and regenerated shoots of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Fröhlich) Borkh. Plant Physiology and Biochemistry, 46: 414-420.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.

Murch, S.J.; Saxena, P.K. 2006. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): Challenges and strategies for production of chemically-consistent plants, Can. J. Plant Science, 86: 765-771.

Müller, W.E., St. John's Wort and Its Active Principles in Depression and Anxiety, 2005, p.53.

Nagella, P., Murthy, H.N. 2010. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. Bioresource Technology, 101: 6735-6739.

Namlı, S., Akbaş, F., Işıkalın, Ç., Ayaz Tilkat, E., Başaran, D. 2010. The effect of different plant hormones (PGRs) on multiple shoots of *Hypericum retusum* Aucher. Plant Omics Journal, 3: 12-17.

Neves J. M., Matos C., Moutinho C., Queiroz G. ve Gomes L. R., 2009. Ethnopharmacological Notes About Ancient Uses Of Medicinal Plants In Trás-Os-Montes (Northern Of Portugal). Journal Of Ethnopharmacology, 124: 270-283.

Nozue, M., Kazwai, J., Yoshitama, K., 1987. Selection of a high anthocyanin producing cell line of sweet potato cell cultures and identification of pigments. *Journal of Plant Physiology*, 129: 81-88.

Nunes, J.M.; Pinto, P.S.; Bordignon, S.A.L.; Rech, S.B.; Poser, G.L.2010. Phenolic compounds in *Hypericum* species from the Trigynobrathys section, *Biochemical Systematics and Ecology*, 38:224–228.

Nychas, G.J.E., Tassou, C.C., Skandamis, P., 2003. Making the most of herbs, spices and their active components. In: S. Roller (Ed.), *Natural Antimicrobials for The Minimal Processing of Foods*, 176-200.

Okpanyi, S.N.; Weischer, M.L.1990. Animal Experiments on the Psychotropic Action of a *Hypericum* Extract, *Arzneimittelforschung Drug Research*, 1:10-13.

Oluk, E. A.; Orhan, S. 2009.Thidiazuron induced micropropagation of *Hypericum triquetrifolium* Turra, *African Journal of Biotechnology*, 15; 3506-3510.

Oluk, E. A.; Orhan, S.; Karakaş, O.; Çakır, A.; Gönüz, A. 2010. High efficiency indirect shoot regeneration and hypericin content in embryogenic callus of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *African Journal of Biotechnology*, 15;2229-2233.

Orth, H.C., Rentel, C., Schmidt, P.C. 1999. Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 193-200.

Ozeki, Y., Komamine, A., 1985. Changes in activities of enzymes involved in general phenylpropanoid metabolism during the induction and reduction of anthocyanin synthesis in a carrot suspension culture as regulated by 2,4-D. *Plant Cell Physiology*, 26: 903-911.

Öztürk, B.; Apaydın, S.; Goldeli, E.; İnce, İ.; Zeybek, U. 2002. *Hypericum triquetrifolium* Turra.extract exhibits antiinflammatory activity in the rat, *journal of ethnopharmacology*, 80: 207-209.

Oztürk Y., 1997. Testing The Antidepressant Effects Of *Hypericum* Species On Animal Models. *Pharmacopsychiatry*. 30 (SUPPL. 2). P: 125-128.

Pabuçcuoğlu, A., Konyalıoğlu, S., Baş, M. and Meral, G.E. 2003.The in vitro effects of *Hypericum* species on human leukocyte myeloperoxidase activity. *Journal of Ethnopharmacology*; 87: 89-92.

Pasqua, G., Avato, P., Monacelli, B., Sanatmaria, A.R., Argentieri, M. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science*, 165: 977-982.

Pasqua, G., Pinarosa, A., Monacelli, B., Santamaria, A. R., Argentiere, M. P. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas, *Plant Science*, 165: 977-982.

Pasqua, G., Santamaria, A.R., Filippini, R. 2008. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from leaf derived callus of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Frohlich) Borkh. *Plant Biosystems*. 142:106 – 110.

Peşin, İ. 2007. *Hypericum perforatum* L. ve *hypericum scabrum* L. bitkilerinin yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktiviteleri üzerinde çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 202.

Phillips, G. C.; Hubstenberger, J. F.; Hansen, E. E. 2007. Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67-78.

Poutaraud, A., Gregorio, F.D., Fook, V.C., Girardin, P., 2001. Effect of light on hypericin content in fresh flowering top parts and in extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Planta Medica*, 67: 254–259.

Praveen N, Murthy HN. 2010. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide. *Bioresource Technology*, 101:6735–6739.

Pretto F. R.; Santarém E. R. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62:107–113.

Rainha, N., Koci, K., Coelho, A.V., Lima, E., Baptista, J., Ferreira, M.F. 2012. HPLC–UV–ESI-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants. *Phytochemistry*, xxx :xxx–xxx

Rao, S. R. ve Ravishankar, G. A., 2002. *Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites*, *Biotechnology Advances*, 20: 101-153.

Renaud, S.C., Guéguen, R., Schenker, J.D., Houtaud, A., 1999. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*, 9: 184-188.

Robson, N. K. B., 1975. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Vol:2, Edit, P. H. Davis, University Press, Edinburgh.

Romulo, M.L.Z., Studart-Guimarães, C., Landsmann, J., Campos, F.A.P., 1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 58, 155-157.

Ryu D. Y. *Biotechnol. Bioeng.* 1993, 42, 793–799.

Saad, B.; Abouatta, B.S.; Basha, W.; Hmade, A.; Kmail, A.; Khasib, S.; Said, O. 2008. *Hypericum triquetrifolium*—Derived Factors Downregulate the Production Levels of LPS-Induced Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- in THP-1 Cells, *eCAM*, , 1-7.

Sakuta, M., Takagi, T., Komamine, A., 1986. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *Journal of Plant Physiology*, 125: 337-343.

Sánchez-Mateo, C.C., Bonkanka, C.X., Hernández-Pérez, M. and Rabanal, R.M. 2006. Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 1-6.

Saroglou, V., Marin, P.D., Rancic, A., Veljic, M. and Skaltsa, H. 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35:146-152.

Savio, L.E.B., Astarita, L.V., Santarem, E.R. 2012. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 108:465–472.

Schempp, C.M., Müller, K.A., Winghofer, B., Schöpf, E. And Simon, J.C. 2002. Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). *Der Hautarzt*, 53:309-369.

Seçmen, Ö., 1986, Tohumlu Bitkiler Sistematigi, Ege Üniveritesi Yayınları, İzmir, 224-225.

Seger, C., Römpf, H., Sturm, S., Haslinger, E., Schmidt, P.C., Hadacek, F. 2004. Characterization of supercritical fluid extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by HPLC–MS and GC–MS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21: 453–463.

Skirvin, R.M., Chu, M.C., Mann, M.L., Young, H., Sullivan, J. and Fermanian, T., 1986. Stability of tissue culture medium as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Rep.*, 5: 292-294.

Smelcerovic, A., Spiteller, M., 2006. *Pharmazie* 61, 251.

Smelcerovic,A., Spitteller,M., Zuehlke,S.2006. Comparison of methods for the exhaustive extraction of hypericins, flavonoids, and hyperforin from *Hypericum perforatum* L. Journal of Agricultural Food Chemistry,54:2750-2753.

Smelcerovic,A., Verma,V., Spitteller, M., Ahmad, S. M., Puri,S.C., Qazi,G.N.2006. Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. Phytochemistry, 67: 171–177.

Smelcerovic,A., Zuehlke,S., Spitteller,M., Raabe,N., Ozen,T.2008. Phenolic constituents of 17 *Hypericum* species from Turkey. Biochemical Systematics and Ecology, 36: 316-319.

Sommer, H.; Harrer, G. 1994.Placebo-controlled Double-blind Study Examining the Effectiveness of an *Hypericum* Preparation in 105 mildly depressed patients, J. Geriatr Psychiatry Neurol, 7: 9-11.

Spitteller,M., Özen,T., Smelcerovic,A., Zuehlke,S., Mimica-Dukić, N.2008. Phenolic constituents and the in vitro antioxidant activity of the flowers of *Hypericum venustum*. Fitoterapia, 79: 191–193.

Sreenivas, V.K., Jisha, V.N.2011. *Bridelia stipularis*: a new source for anthocyanin production in vitro. Acta Physiol Plant,33: 2051-2056.

Southweell, A. I.; Bourke, C. A.2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L., Phytochemistry,56:437-441.

Sökmen, A. ve Gürel E., 2001. Sekonder Metabolit Üretimi, 211-261, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya,ISBN: 975-6652-04-7.

Söylemez, F.2006. Alkaloid içeren bazı tıbbi bitkilerde kallus kültürü üzerinde bir çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla. 46.

Stepan-Sarkissian, G.; Fowler, M. W. The Metabolism and Utilization of Carbohydrates by Suspension Cultures of Plant Cells. In Carbohydrate Metabolism in Plant Cells; Morgan, M. J., Ed.; Plenum Press: New York and London, 1986: 151–181.

Tanaka, T., 1999. Structure, property and function of plant polyphenol. Foods and Food Ingredients Journal of Japan, 180: 64-70.

Tatsis EC, Boeren S, Exarchou V, Vervoort ANTJ, Gerothanassis IP: Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. Phytochemistry 2007, 68: 383-393.

Tholakalabavi, A., Zwiabek, J.J., Thorpe, R.A., 1994. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cell Developmental Biology*, 30: 164-170.

Tian, H.Q., Russell, S.D. 1998. Culture-induced changes in osmolality of tobacco cell suspensions using four exogenous sugars. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 55: 9–13.

Toker, Z., Kızıllı, G., Özen, H.Ç., Kızıllı, M. and Ertekin, S. 2006. Compositions and antimicrobial activities of the essential oils of two *Hypericum* species from Turkey. *Fitoterapia*; 77: 57-60.

Umek, A., Kreft, S., Karting, T., Heydel, B., 1999. *Planta Med.* 65, 388.

Vajs, V., Vugdelija, S., Trifunovi, S., Karadi, I., Jurani, N., Macura, S., and Milosavljevi, S. 2003. Further degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort). *Fitoterapia*, 74: 439-444.

Vanisree, M, Tsay, H. S. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 1: 29-48.

Vanisree, M., Chen-Yue, L., Shu-Fung, L., Satish, M.N., Chien, Y.L., Hsin-Sheng, T. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45: 1-22.

Vardapetyan H., Bringmann G., Ebizuka Y. Ve Beerhues L., 2007. Differential Accumulation Of Hyperforin And Secohyperforin In *Hypericum Perforatum* Tissue Cultures. *Phytochemistry*, 68: 2670–2677.

Vardapetyan, H. R., Oganesyanyan, A. A., Kabasakalyan, E. E., Tiratsuyan, S. G. 2006. The influence of some elicitors on growth and morphogenesis of *Hypericum perforatum* l. callus cultures. *Russian Journal of Developmental Biology*, 37:350–353.

Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1: 13-25.

Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H. J. G. Ve Memelink, J., 1999, Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolite Pathways for the Production of Fine Chemicals, *Biotechnology Letters*, 21: 467-479.

Vishwakarma, R. A., Kapil, R. S., Popli, S. P., 1983. Chemical constituents of *Hypericum mysorensense*. *Indian Journal of Chemistry*, 22B:612-613.

Vishwakarma, R. A., Kapil, R. S., Popli, S. P., 1985. Novel pyrones from *Hypericum mysorensense*, Indian Journal of Chemistr., 25B:466-468.

Voet, D., Voet, J. G. Ve Pratt C. W., 1999, Fundamentals of Biochemistry,

Vollmer J. J., Rosenson J., 2004. Journal Of Chemical Education • Vol. 81 No. 10.

Volz, H. P. 1997. Controlled clinical trials of *Hypericum* extracts in depressed patients – an overview, Pharmacopsychiatry, 30: 72–76.

Nychas, G.J.E., Tassou, C.C., Skandamis, P., 2003. Making the most of herbs, spices and their active components. In: S. Roller (Ed.), Natural Antimicrobials for The Minimal Processing of Foods, 176-200.

Walker.T.S., Bais,H.P.,Vivanco,J.M. 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort).Phytochemistry, 60: 289-293.

Warnock, D.E.; Fahy, E.; Taylor, S.W. 2004. Identification of protein association in organelles, using mass spectrometry-based proteomics. Mass Spec. Rev.,23: 259–280.

Westwood, M.N., 1993. Hormones and growth regulators, temperate zone pomology:physiology and culture. Timber Press, Inc. S.W. Wilshire, 124, Portland, Oregon.

Wentworth J. M., Agostini M., Love J., Schwabe J. W. ve Chatterjee V. K. K., 2000. St John's Wort, A Herbal Antidepressant, Activates The Steroid X Receptor. Journal Of Endocrinology 166, R11–R16.

Williams, R.R., Taji, A.M. and Winney, K.A., 1990. The effect of *Ptilotus* plant tissue on pH of in vitro media. Plant Cell Tissue Organ Cult., 22: 153-158.

Wink, M., 1999. Biochemistry, Role and Biotechnology of Secondary Metabolites. In: Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Sheffield Academic Press and CRC Press, Annual Plant Reviews, 3: 1-16.

Wojcik, A.; Podstolski, A. 2007. Leaf explant response in in vitro culture of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Acta Physiologiae Plantarum, 29: 151-156.

Wu ,C.H., Dewir, Y.H., Hahn ,E.J., Paek ,K.Y .2006.Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. J Plant Biol, 49: 193–199

Xie B.D. and H.T. Wang. 2006. Effects of light spectrum and photoperiod on contents of flavonoid and terpene in leaves of *Ginkgo biloba* L. Journal of Nanjing Forestry University, 30: 51–54.

Yazaki, K., Okuda, T. 1990. Procyaninins in callus and multiple shoots of *Hypericum erectum*. Planta Medica.,56: 490–491.

Yeoman, M. M., Holden, M. A., Corchet, P., Holden, P. R., Goy, J. G. Ve Hobbs, M. C., 1990. Exploitation of Disorganized Plant Cultures for the Production of Secondary Metabolites, 139-166, Secondary Products from Plant Tissue Culture, Oxford University Press, New York, ISBN: 0-19-857717-6.

Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Ghasempour, A., Moyano, E., Palazon, J. 2012. The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum album* cell culture. Plant Physiology and Biochemistry, 56: 41-46.

Zdunek, K., Alfermann, W., 1992. Initiation of shoot organ cultures of *Hypericum perforatum* and formation of hypericin derivatives. Planta Medica, 58: 621–625.

Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R. and Delie, F. 2006. Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. International Journal of Pharmaceutics, 326: 174-181.

Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., Agarwal, R., 1999. Anti-tumor promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two stage initiation promotion protocol and identification of procyanidin B5-3-gallate as the most effective antioxidant constituent. Carcinogenesis, 20: 1737-1745.

Zhang, W., Furusaki, S., 1997. Regulation of Anthocyanin Synthesis in Suspension Cultures of Strawberry Cell by pH, Biotechnology Letters, 11; 1057-1061.

Zhang, Y.H., Zhong, J.J., Yu, J.T. 1996. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. J Biotechnol, 51: 49–56.

Zhong, J.J., Yoshida T. 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: effects of sucrose concentration and inoculum size. Enzyme Microbiology Technology, 17; 1073–1079

Zhong J.J., T. Seki, S. Kinoshita and T. Yoshida. 1991. Effect of light irradiation on anthocyanin production by suspended culture of *Perilla frutescens*. Biotechnology and Bioengineering, 38: 653-658.

Zobayed, S.M.A., Murch, S.J., Rupasinghe, H.P.V., Saxena, P.K. 2004. In vitro production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). *Plant Science*, 166:333–340.

Zobayed, S.M.A., Saxena, P.K. 2004. Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 40: 108-114.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : Hilal SURMUŞ ASAN
Doğum tarihi ve yeri : 11.05.1980/Diyarbakır-Silvan
Elektronik posta adresi : hilalsuran@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Eğitim derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Dicle Üniv./Fen Bilimleri Enstitüsü	2006
Lisans	Dicle Üniv./ Fen Fak. Biyoloji Bölümü	2003
Lise	Yunus Emre Lisesi	1998

İş Deneyimi

Görev	Yer	Yıl
Araştırma Görevlisi	Dicle Üniversitesi	2007-

Yabancı Dil: İngilizce

Bildiriler

1. SURMUS,H., Ozen H. C. , *In Vitro* Ortamda Yetiştirilen Hypericum Scabroides Türünün Çimlenmesi ve Proliferasyonu Üzerine Farklı Bap Konsantrasyonlarının Etkisi ,19. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2008-TRABZON

Proje Bilgileri

Projenin Adı	Destekleyen Kuruluş	Tarih
1.Hypericum scabroides'in Doku Kültürü ile Yetiştirilmesi ve Hiperisin İçeriklerinin Araştırılması	BAP	2004-2006