

**T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***HYPERICUM triquetrifolium* TURRA.'NİN KALLUS VE  
HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE TOTAL  
HİPERİSİN İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ**

**Özgür KARAKAŞ**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR  
KASIM 2010**

T.C  
DICLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DIYARBAKIR

Özgür KARAKAŞ tarafından yapılan "*Hypericum triquetrifolium* Turra.'nın Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Total Hiperisin İçeriğinin Belirlenmesi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı    Adı Soyadı

Başkan            : Prof.Dr.Hasan Çetin ÖZEN

Üye                : Prof.Dr. Ahmet ONAY

Üye                : Prof.Dr. A.Selçuk ERTEKİN

Üye                : Doç.Dr. Eyüp BAĞCI

Üye                : Doç.Dr.Zuhal TOKER



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 05/11/2010

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

05/11/2010

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

## ÖZ

Bu çalışmanın amacı, *Hypericum triquetrifolium* Turra.'nın in vitro kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinden toplam hiperisin üretimini arttırmak için etkili bir süspansiyon kültürü yöntemi geliştirmektir. Kallus ve süspansiyon kültürlerinin paketlenmiş hücre hacmi, taze ağırlık ve kuru ağırlıkları gibi büyüme parametreleri ölçülmüştür. Süspansiyon kültürlerinin gelişmesi üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri özellikle çalışılmıştır.

İlk olarak kallus kültürü çalışmalarında ana materyal olarak kullanılacak olan en uygun eksplantın (bitki parçası) tespiti için; doğal yetiştirme ortamından toplanan *H. triquetrifolium*'un yaprak, çiçek, gövde ve kök kısımlarının total hiperisin içerikleri araştırılmıştır. En yüksek total hiperisin içeriği bitkinin yaprak kısmından elde edilirken ( $1.95 \pm 0.0027$  mg/g) en düşük hiperisin içeriği de köklerden elde edilmiştir ( $0.08 \pm 0.0015$  mg/g). Daha yüksek total hiperisin içeren yaprak parçalarından kallus oluşturmak için çeşitli hormon kombinasyonları çalışıldı. En uygun kallus oluşum oranı (% 92.3) 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren MS besi ortamından elde edildi. Bu ortamdan elde edilen kalluslar, hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında ana materyal olarak kullanıldı.

Kalluslar, 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren sıvı MS ortamına alınarak süspansiyon çalışmaları başlatıldı. Hücrelerin birbirinden ayrılmasının sağlamak için süspansiyon kültürü ortamı sırasıyla 500 µm, 250 µm ve 100 µm por çapındaki süzgeçlerden geçirildi. Süspansiyon kültürlerinin büyüme parametrelerinin araştırılması için iki farklı hormon kombinasyonu kullanıldı. 1 mg/l BA+ 2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gelişen hücreler, kültürün 20. gününde en yüksek

büyüme oranı seviyesine ulaştı, paketlenmiş hücre hacmi (PHH) 2.33 kat, yaş ağırlık 5.5 kat ve kuru ağırlık 6.30 kat artış gösterdi. 1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında gelişen hücrelerin büyüme parametreleri 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA ortamına paralel bir artış gösterdi.

*H. triquetrifolium*'un in vitro kültürlerinden elde edilen total hiperisin içerikleri ( $0.0018 \pm 0.00026$  mg/g) doğada yetişen bitkilerin yapraklarından ( $1.95 \pm 0.0027$  mg/g) çok daha düşük olmasına rağmen, in vitro adapte edilmiş kültürlerin hiperisin üretmeleri bu tür çalışmaların ümitvar bir sistem olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Hypericum triquetrifolium* Turra., Hiperisin, Kallus kültürü, Süspansiyon kültürü, UV -Spektrofotometresi.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate an efficient suspension culture allowing to improve total hypericin production from calli and cell suspension cultures in *Hypericum triquetrifolium* Turra. in vitro cultures. Growth parameters such as packed cell volume (PCV), fresh weight and dry weight were determined. The role of plant growth regulator treatments has been particularly studied on suspension culture development.

To start with, it was determined that what is the most convenient explant type for the establishment of callogenesis. To do this, total hypericin content of leaves, flowers, stems and root of grown in natural habitat wild *H. triquetrifolium* was investigated. Among the different parts of *H. triquetrifolium*, the leaf showed the highest hypericin content with a concentration of  $1.95 \pm 0.0027$  mg/g. The least hypericin content with a concentration of  $0.08 \pm 0.0015$  mg/g was obtained from the roots of *H. triquetrifolium*. To induce callus formation, leaf explant excised from sterile germinated seedlings were cultured in MS medium containing the following PGR combinations: 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA, BA (1 mg/l) + NAA (0.5 mg/l), 1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D, BA (0.06 mg/l) + 2,4-D (0.1 mg/l), Kinetin (0.9 mg/l) + 2,4-D (3 mg/l) and Kinetin (0.4 mg/l) + 2,4-D (2 mg/l). The most suitable rate of calli formation (92.3 %) obtained from MS medium containing 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA. Calli obtained from this medium was used as main material for the initiation of cell suspension cultures.

After 3-5 subcultures, calli were inoculated into 100 ml flasks containing 25 ml MS medium without agar containing 3% sucrose, 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA and

they were maintained on a rotary shaker at 100 rpm. After 14 days in liquid culture cell aggregates were separated into three different size groups using the test sieves of mesh sizes 500  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$ . Cell growth was measured by determining the packed cell volume (PCV-v/v). Two different PGR combinations were used to investigate growth parameters at 4, 8, 12, 16 and 20 days of suspension cultures. Growing cells in MS medium containing 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA reached the highest growth rate on 20th day of culture and it was determined that there is an increase approximately 2.33-fold for PCV, 5.5-fold for wet weight and 6.30-fold for dry weight. MS medium containing 1mg/l BA + 0.4 mg/l 2, 4-D showed a similar increase in the growth parameters of cells in MS medium containing 1mg/ BA + 2 mg/g NAA.

Although in the in vitro adapted cultures of *H. triquetrifolium* contain much lower amount of total hypericin ( $0.0018 \pm 0.00026$  mg/g) than in vivo grown leaves ( $1.95 \pm 0.0027$  mg/g), they appear to be promising system for hypericin production.

**Key words:** *Hypericum triquetrifolium* Turra., Hypericin, Callus culture, Suspension culture, UV –Spectrophotometer.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde yardımcı olan ve çalışmalarında bilgi ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Hasan etin ÖZEN'e, çalışmalarında büyük desteğini gördüğüm ve özellikle biyoteknolojik çalışmalarda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Ahmet ONAY'a,

Dicle üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvar'ının tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Vedat PİRİNÇ, Yrd. Doç. Dr. Hakan YILDIRIM ve Yrd. Doç. Dr. Zafer AKTÜRK'e,

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve çalıőmalarım sırasında yeterince ilgi gösteremediğim biricik kızım İrem'e ve eşime,

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP)'ne (Proje no: 08-FF-06), desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

## AMAÇ

Bu çalışmada, doğada yaygın olarak yetişen ve tıbbi alanda büyük bir öneme sahip olan *Hypericum triquetrifolium* Turra.'nın in vitro kültürlerinin yapılması, farklı MS besi ortamlarının ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kültürlerin gelişimleri üzerine etkisi ve bu kültürlerin total hiperisin içeriğinin araştırılması amaçlanmıştır.



## KISALTMALAR

BA, BAP	Benziladenin, 6-Benzilaminopürin
NAA	1 $\alpha$ -Naftalen asetikasit
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
GA <sub>3</sub>	Giberellik asit
Kin	Kinetin, 6-Furfurilaminopürin
MS	Murashige-Skoog
PHH	Paketlenmiş hücre hacmi
MeOH	Metanol
EtOH	Etanol
TDZ	Taydiazuron
IAA	İndol-3-asetikasit
IBA	İndol-3-bütirikasit
2-İP	N-İzopentenilaminopürin
NaOH	Sodyum hidroksit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
UV	Ultraviyole
BBD	Bitki büyüme düzenleyicisi

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

<b>ÖZ</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>v</b>
<b>AMAÇ</b>	<b>vi</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. KAYNAKLAR	7
<b>2.KAYNAK ARAŞTIRMASI</b>	<b>13</b>
2.1. GENEL BİLGİLER	13
2.1.1. <i>Hypericum</i> Türlerinin Genel Özellikleri	13
2.1.2. <i>Hypericum</i> Türlerinin Geleneksel ve Modern Tedavide Kullanımı	13
2.1.3. Sekonder (İkincil) Metabolitler	14
2.1.3.1. <i>Hypericum</i> Türlerinde Bulunan Sekonder (İkincil) Metabolitler	15
2.1.4. Bitki Doku Kültürlerinin Tanımı ve Önemi	18
2.1.5. Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürleri	19
2.1.5.1. Süspansiyon Kültürü Kalitesinin Belirlenmesinde Önemli Etkenler	<b>20</b>
2.1.5.2. Bitki Hücre Kültürlerinde Sekonder Metabolit Birikimi	22
2.2. KAYNAKLAR	24
<b>2.3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b>	<b>32</b>
2.3.1. KAYNAKLAR	42
<b>3.MATERYAL ve METOT</b>	<b>48</b>
3.1. <i>H. triquetrifolium</i> 'un Tanımı ve Yayılışı	48
3.2. Bitkinin Toplanması	48
3.3. Uygun Eksplantın Seçilmesi	48
3.4. Kullanılan Besi Ortamlarının Sterilizasyonu ve Hazırlanması	49
3.4.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	52
3.4.2 Sterilizasyon İşlemleri ve Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması	52
3.4.2.1. Genel Doku Kültürü Teknikleri	52
3.4.2.2. Olgun Tohumların Sterilizasyonu	53
3.4.2.3. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu	53
3.4.2.4. Kültür Kaplarının Sterilizasyonu	53
3.4.2.5. Pens ve Bisturilerin Sterilizasyonu	54
3.4.2.6. Transfer Odasının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	54
3.4.2.7. Kültür Odasının Şartları	54
3.4.2.8. Tohumların Çimlendirilmesi Aşaması	55
3.4.2.9. Proliferasyon Aşaması	55
3.5. Kallus Kültürlerinin Başlatılması ve Devamlılığı	55
3.5.1. Kültürlerin Başlatılması	55
3.5.2. Kültürlerin Devamlılığı	57
3.5.3. Farklı MS Besi Ortamlarının Kallus Gelişimi Üzerine Etkisi	57
3.5.4. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kallus Gelişimi Üzerine Etkisi	57
3.5.5. Kallus Renginin Farklılaşmasında Ortamların Etkisi	57

3.6. Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması ve Devamlılığı	58
3.6.1. Kültürlerinin Başlatılması	58
3.6.2. Kültürlerinin Devamlılığı	59
3.6.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Süspansiyon Kültürlerinin Büyümesi Üzerine Etkisi	59
3.6.4. Ortamların Farklı Sükroz İçeriğinin Kültürlerin Gelişimi Üzerine Etkisi	60
3.6.5. Süspansiyon Kültürlerindeki Hücrelerden Bitki Rejenerasyonu	60
3.1.4.6. Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri	60
3.7. Total Hiperisin Tayini	62
3.7.1. Kullanılan Kimyasallar ve Aletler	62
3.7.1.1. Kullanılan Kimyasallar	62
3.7.1.2. Kullanılan Aletler	62
3.7.2. <i>H. triquetrifolium</i> 'dan Hiperisin Bileşiklerinin Özütlenmesi	62
3.7.3. Kallus Kültürlerinden Hiperisin Bileşiklerinin Ekstraksiyonu	63
3.7.4. Süspansiyon Kültürlerinden Hiperisin Bileşiklerinin Özütlenmesi	63
3.8. ŞEKİLLER	65
3.9. KAYNAKLAR	66
<b>4.BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	<b>67</b>
4.1. Doğal Ortamdaki <i>H. triquetrifolium</i> 'un Farklı Organlarının Total Hiperisin İçeriklerinin Belirlenmesi	67
4.2. <i>H. triquetrifolium</i> 'un Olgun Tohumlarının Çimlendirilmesi	69
4.3. Proliferasyon Aşaması	70
4.4. Kallus Kültürlerinin Başlatılması ve Devamlılığı	72
4.4.1. Kültürlerin Başlatılması	72
4.4.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kallus Gelişimi Üzerine Etkisi	72
4.4.3. Farklı MS Besi Ortamlarının Kallus Gelişimi Üzerine Etkisi	75
4.4.4. Kallus Renginin Farklılaşmasında Ortamların Etkisi	76
4.5. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması ve Devamlılığı	77
4.5.1. Sükroz Miktarının Süspansiyon Kültürü Gelişimi Üzerine Etkisi	78
4.5.2. Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri	79
4.6. Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Total Hiperisin Ekstraksiyonu	83
4.6.1. Kallus Kültürlerinden Total Hiperisin Ekstraksiyonu	83
4.6.2. Hücre Süspansiyon Kültürlerin Total Hiperisin Ekstraksiyonu	85
4.7. Süspansiyon Kültürlerindeki Hücrelerden Bitki Rejenerasyonu	87
4.8. KAYNAKLAR	90
4.9. ŞEKİLLER	95
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>100</b>
5.1. KAYNAKLAR	103

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmada kullanılan kültür kapları ve özellikleri	54
<b>Çizelge 4.1.1.</b> Doğal ortamda yetişen <i>H. triquetrifolium</i> 'un yaprak, çiçek, gövde ve kök kısımlarının total hiperisin içeriği	67
<b>Çizelge 4.2.1.</b> Farklı BA ortamlarında kültüre alınan tohumların çimlenme oranı (%)	70
<b>Çizelge 4.3.1.</b> Farklı BA ortamlarında yetiştirilen bitkilerin sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu	71
<b>Çizelge 4.4.2.1.</b> Farklı konsantrasyonlarda BBD içeren kültür ortamlarındaki yaprak eksplantlarından kallus oluşum oranları.	73
<b>Çizelge 4.5.1.1</b> Sükroz miktarının süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine etkisi	78
<b>Çizelge 4.5.2.1.</b> Süspansiyon kültürü ortamındaki hücrelerin PHH değerlerindeki değişimler	80
<b>Çizelge 4.5.2.2.</b> Süspansiyon kültürü ortamındaki hücrelerin yaş ağırlıklarındaki değişimler	81
<b>Çizelge 4.5.2.3.</b> Süspansiyon kültürü ortamındaki hücrelerin kuru ağırlıklarındaki değişimler	82
<b>Çizelge 4.6.1.1.</b> Farklı ortamlarda gelişen kallusların total hiperisin içerikleri	84
<b>Çizelge 4.6.2.1</b> Hücre süspansiyon kültürlerinin total hiperisin içerikleri	85
<b>Çizelge 4.7.1.</b> Süspansiyon kültürü hücrelerinden sürgün rejenerasyonu	88

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.2.1. Doğal ortamda yetişen <i>H. triquetrifolium</i> 'un genel görünüşü.	65
Şekil 3.1.2.2. <i>H. triquetrifolium</i> 'un çiçek ve yapraklarının genel görünüşü.	65
Şekil 4.4.2.1. Farklı BBD konsantrasyonlarının kallus gelişimi üzerine etkisi	95
Şekil 4.1. <i>H. triquetrifolium</i> 'un in vitro kültürleri	96
Şekil 4.7.1. Süspansiyon kültürü hücrelerinden bitki rejenerasyonu	97
Şekil 4.4.3.1. 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren farklı MS besin ortamlarında kallusların gelişimleri	98
Şekil 4.4.4.1. 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gelişen kalluslarda kırmızı renk pigment oluşumu	99

## 1.GİRİŞ

*Hypericum* türleri, *Clusiaceae* (*Guttiferae*, *Hypericaceae*) familyasına ait bitkiler olup dünyada yaklaşık 400 türle temsil edilmektedir. Bu cinsin Türkiye’de 89 türü bulunmaktadır ve bunların 43’ü endemiktir. Çalı ya da otsu formda olan bu bitkilerin toprak üstü organlarında yağ bezeleri bulunur<sup>1</sup>. Türkiye’de sarı kantaron, binbirdelik otu, koyunkıran ve kılıç otu adlarıyla bilinmektedirler<sup>2</sup>. Tıbbi açıdan, uzun yıllardan beri oldukça yaygın kullanım alanlarına sahip olan *Hypericum*’un cins adı Yunanca kökenli olup ‘‘Hayalet ve kötü ruhları uzaklaştıran’’ anlamına gelmektedir. Eski zamanlarda bu bitkilerin şeytani ve kötü ruhları kovmakla birlikte koruyucu gücünün olduğuna inanılırdı<sup>3</sup>. Bu bitkilerin bazı türleri, süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Besin olarak sadece bazı tırtıl ve kelebekler tarafından tüketilmektedir<sup>4</sup>.

Tıbbi bitkiler arasında önemli bir yere sahip olan *Hypericum* türleri, uzun zamandan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ve iyileştirici özelliğe sahip olan bitkilerdir<sup>5</sup>. *Hypericum* türleri, biyolojik özelliklere sahip çok sayıda biyoaktif bileşik içermektedir<sup>6</sup>. Bunların başlıcaları; naftodiantron grubu bileşikleri olarak bilinen hiperisin ve psödohiperisin<sup>7-11</sup>, floroglusinol türevleri olarak bilinen, hiperforin ve adhiperforin<sup>12,13</sup>, flavonoidler<sup>14</sup>, ksantonlar<sup>15,16</sup> ve prosiyanidin<sup>17</sup> bileşikleridir.

*Hypericum* türlerinden elde edilen özütler; depresyon tedavisinde<sup>18</sup>, 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<sup>19</sup>.

*Hypericum* bitkileri, yapılarında (yaprak ve çiçekte) bulunan koyu bezeler ve salgı kanalları gibi farklı türlerdeki salgı dokularının varlığı ile karakterize edilirler. Bu salgı yapıları, biyoaktif maddelerin biriktiği ya da sentezlendiği alanlar olup bitki dokularına bağlı olarak farklı yerlere yerleşmişlerdir<sup>20</sup>. Bu salgı dokularında sadece *Hypericum* türlerine ait bitkiler tarafından sentezlenebilen hiperisin bileşikleri bulunur. Bu bileşikler; antiviral, antiretroviral, antibakteriyel ve antidepresan özellik gibi önemli biyolojik aktivitelere sahiptirler<sup>21-23</sup>.

*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<sup>24</sup>. Antidepresan etki *Hypericum* özütlerinde bulunan hiperisin ve hiperforin bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Hiperisin, monoamin oksidaz (MAO) inhibitörü olarak çalışır. Bu etkiyi; merkezi sinir sistemindeki postsinaptik reseptörler tarafından, serotonin hormonunun geri alınımını engelleyerek yapmaktadır<sup>25-28</sup>. Ayrıca hiperisinin anlama ve algılama gücünü arttırdığı, yorgunluk, donukluk ve uyku halini giderdiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır<sup>29-31</sup>. Antidepresan yönüyle önemli bir etkiye sahip olan bu bileşiğin hiç bir yan etkisinin saptanmamış olması hiperisinin önemini daha da arttırmaktadır<sup>32-34</sup>. Dünyanın birçok yerinde *Hypericum* türlerinden elde edilen özütlerin, Hyperiforce<sup>35</sup> ve Jarsin 300<sup>36</sup> adı altında tabletleri hazırlanarak ticari olarak satılmaktadır.

Hiperisinin fotodinamik özeliği birçok kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır. Hiperisin bu etkiyi hem hücre büyümesinde rol oynayan bazı

enzimlerin üretimini engelleyerek hem de reaktif oksijen türleri oluşturarak doğrudan tümörlü bölgedeki hücre ve dokuların yıkımını sağlamaktadır. *Hypericum* özütlerinden elde edilen hiperisin bileşikleri viral enfeksiyonların tedavisinde de kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca virüslerde ters transkriptaz ve protein kinaz-C enzimlerinin aktivitesini inhibe etme özellikleri sayesinde HIV tedavisinde bir antiretroviral ajan olarak kullanılabilceği birçok çalışmada bildirilmiştir<sup>37-39</sup>.

Bu özellikler *Hypericum* türlerinin ticari önemini büyük ölçüde arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu türlerden elde edilen ham maddelerle üretilen ilaçların, Amerika'da yıllık yaklaşık 210 milyon dolar, dünyanın geri kalan kısmında ise yıllık yaklaşık 570 milyon dolarlık pazarlık payına sahip olduğu tespit edilmiştir<sup>40</sup>.

Tıbbi ve ekonomik öneme sahip olan bitkilerin tedavide kullanımları bu bitkilerin içerdikleri sekonder bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Sekonder bileşikler, bitkilerin çevreye adaptasyonunda önemli rol oynadıkları gibi patojenlere ve zararlı diğer mikroorganizmalara karşı savunmasında da rol oynarlar<sup>41</sup>. Geniş biyolojik aktivitelerinden dolayı, çeşitli sekonder metabolitleri içeren bitkiler, yüzyıllardır geleneksel halk ilacı olarak kullanılmakta olup günümüzde de başta ilaç ve kozmetik olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>42</sup>.

Bitkiler, sekonder metabolitlerin önemli kaynağıdır. Ancak bazı nedenlerden dolayı, tıbbi ve endüstriyel alanlarda kullanılan sekonder bileşikleri içeren bitkilerin yeterli düzeyde elde edilmesi oldukça zordur.



Bunlar nedenler arasında;

1. Bazı bitkilerin patojenlere duyarlılıklarından dolayı geniş tarla kültürlerinde yetiştirilememesi (*Hypericum perforatum*, *Arnica montana*),
2. Bazılarının siyasal nedenlerden dolayı arazide ekilmesinin sınırlandırılması (*Papaver somniferum*-haşhaş)
3. Bazılarının da kendi ekosistemleri dışında yetişmelerinin zor olması (endemik türler) başta gelmektedir<sup>43</sup>.

Bütün bu ve benzeri sebeplerden ve bazı avantajlarından dolayı bitki doku kültürlerinin kullanımı birçok araştırmacı tarafından alternatif bir yaklaşım olarak düşünülmektedir.

Bitki doku kültürlerinin, kontrollü şartlar altında yapılması, iklimsel değişikliklerden ve toprak şartlarından bağımsız olması ve aseptik şartlarda yapılması, bu tekniğin kullanımını daha da etkili hale getirmiştir<sup>44</sup>.

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon 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 aseptik şartlarda, 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.

Son zamanlarda özellikle sekonder bileşiklerin üretiminde büyük avantajlar sağlayan kallus ve hücre süspansiyon kültürü yöntemlerinin kullanımı büyük ölçüde artmıştır. Özellikle de hücre süspansiyon kültürleri, diğer doku kültürü

tekniklerinden daha yeni bir teknik olduğundan, endüstriyel ve ticari kullanımı daha yaygındır. Hücre süspansiyon kültürlerini oluşturan hücrelerin, farklılaşmamış özellikte olmaları, hızlı büyümeleri ve aynı zamanda morfolojik olarak daha homojen olmaları nedeniyle diğer doku kültürü yöntemlerine göre daha avantajlıdır<sup>45</sup>.

Bitki hücre kültürlerinin diğer bir avantajı da, sekonder metabolit miktarının bazen normal bitkideki içeriğinden daha fazla olabilmesidir. Örneğin yapılan çalışmalarda, *Hypericum perforatum* ve *Hypericum pruinatum*' da hiperisin<sup>46</sup>, *Catharanthus roseus*'ta ajmalisin ve serpentin, *Coptis japonica*'da berberin, *Galium aparine* ve *Morinda citrifolia*'da antrakınon miktarı süspansiyon kültürlerindeki hücrelerde büyük oranda artış göstermiştir<sup>47</sup>.

Bitki hücre kültürü teknolojisinin en önemli uygulama alanlarından biri bitkilerde bulunan biyoaktif bileşiklerin miktarının artırılmasıdır. Bitki hücre kültürleri kullanılarak sekonder metabolit üretimini arttıran bazı faktörler vardır. Bunlar; verimli hücre hatlarının seçimi, kültür şartlarının optimizasyonu, öncül maddeler ve elisitörlerin kullanımı gibi faktörlerdir<sup>48</sup>. Bitki hücre kültürleri, normal bir bitkide bulunmayan yeni bileşiklerin sentezlenmesinde de önemli bir kaynaktır. *Capsicum frutescens*'in hücre süspansiyon kültürlerinde, protokateşik aldehit ve kafeik asit'in biyotransformasyonu sonucu vanillin ve kapsaisin bileşikleri elde edilmiştir<sup>49</sup>.

*Actinidia deliciosa*'nın hücre süspansiyon kültürlerinde ambroks bileşiğinin biyotransformasyonu sonucu normal bitkide bulunmayan 1 $\alpha$ , 6 $\beta$ -dihidroksiambroks ve 1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihidroksiambroks olarak bilinen iki yeni bileşik üretilmiştir<sup>50</sup>.

İstenilen özelliklerde bitkilerin elde edilmesinde ve hem ticari hem de endüstriyel alanlarda uygulanabilirliği açısından, kallus ve hücre süspansiyon kültürleri gibi farklılaşmamış hücrelerin kültürleri daha çok yapılmaktadır.

Bu çalışmada; *Hypericum triquetrifolium* Turra'nın, kallus ve hücre süspansiyon kültürü yöntemleriyle elde edilen hücrelerin büyüme parametreleri, kültürlerin gelişmesinde etkili olan faktörler ve total hiperisin içeriklerinin tespiti amaçlanmıştır.

## 1.1. KAYNAKLAR

1. Davis, P. H. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, **1988**.
2. Baytop, T. *Therapy with medicinal plants in Turkey*, Istanbul University Press, Istanbul, **1999**, 166–167
3. Toker, Z. *Bazı Hypericum türlerinin uçucu yağ bileşenleri ve bu yağların antimikrobiyal etkileri*, Dicle üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, biyoloji anabilim dalı, Doktora Tezi, Diyarbakır, **2002**.
4. [Http://en.wikipedia.org/wiki/Hypericum](http://en.wikipedia.org/wiki/Hypericum), 25.09.2010.
5. Dias, A.C.P.; Francisco, A.; Barberan, T.; Ferreria, F.; Ferreres, F. *Unusual flavanoids produced by callus of Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, **1998**, *48*, 1165–1168.
6. Patocka, J. *The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb Hypericum perforatum L.* *J Appl Biomed*, **2003**, *1*, 61–73.
7. Freytag, W. E. *Bestimmung von Hypericin und Nachweis von Pseudohypericin in Hypericum perforatum L. durch HPLC*. *Dtsch Apoth Ztg*, **1984**, *124*, 2383–2386.
8. Krämer, W.; Wiartalla, R. *Bestimmung von Naphthodianthronen (Gesamthypericin) in Johanniskraut (Hypericum perforatum L.)*, *Pharm Ztg Wiss*, **1992**, *137*, 202–206.
9. Gaedcke, F. *Johanniskraut und dessen Zubereitungen*, *DtschApoth Ztg*, **1997**, *137*, 117–121.

10. Sirvent, T.; Gibson, D. M. *Rapid isocratic analysis of hypericins*, *J Liq Chromatogr Relat Technol*, **2000**, *23*, 251–259.
11. Kitanov, G.M. *Hypericin and pseudohypericin in some Hypericum species*, *Biochem Syst Ecol*, **2001**, *29*: 171–178.
12. Maggi, F.; Ferretti, G.; Pocceschi, N.; Menghini, L.; Ricciutelli, M. *Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus Hypericum of the Central Italy*. *Fitoterapia*, **2004**, *75*, 702–711.
13. Smelcerovic, A.; Verma, V.; Spitteller, M.; Ahmad, M. S.; Puri, S.C.; Qazi, G. N. *Phytochemical analysis and genetic characterization of six Hypericum species from Serbia*, *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 171–177.
14. Radusiene, J.; Bagdonaite, E.; Kazlauskas, S. *Morphological and chemical evaluation on Hypericum perforatum and H.maculatum in Lithuania*, *Acta Hort*, **2004**, (ISHS) 629, 55–62.
15. Hong, D.; Yin, F.; Hu, L. H.; Lu, P. *Sulfonated xanthenes from Hypericum sampsonii*, *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 2595-2598.
16. Tanaka, N.; Takaishi, Y. *Xanthenes from Hypericum chinense*. *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 2146–2151.
17. Greeson, J.; Sanford, B.; Monti, D. A. *St. John's wort (Hypericum perforatum L.) A review of the current pharmacological, toxicological and clinical literature*. *Psychopharmacology*, **2001**, *054 153*, 402–414.
18. Saya, O.; Selcuk, A. E.; Ozen, H. C.; Hosguren, H.; Toker, Z. *Medicinal Plants of GAP Area*, Environment Foundation of Turkey, Ankara, 2001, 143.
19. Volz, H. P. *Controlled clinical trials of Hypericum extracts in depressed patients – an overview*, *Pharmacopsychiatry*, **1997**, *30*, Suppl, 2, 72–76.

20. Ciccarelli, D.; Andreucci, A. C.; Pagni, A. M. *Translucent glands and secretory canals in Hypericum perforatum. Morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis, Ann. Bot.*, **2001**, 88: 637 – 644.
21. Bombardelli, E.; Morazzoni, P. *Hypericum perforatum. Fitoterapia*, **1995**, 66, 43–68.
22. Gadzovska, S.; Maury, S.; Ounnar, S.; Righezza, M.; Kascakova, S.; Refregiers, M.; Spasenoski, M.; Joseph, C.; Hag`ege, D. *Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different Hypericum perforatum L. in vitro cultures, Plant Physiol Biochem*, **2005**, 43, 591–601.
23. Guedes, R. C.; Eriksson, L. A. *Theoretical study of hypericin J. Photochem, Photobiol A Chem*, **2005**, 172, 293–299.
24. Butterweck, V. *Mechanism of action of St. John's wort in depression: what is known?, CNS Drugs*, **2003**, 17, 539–562.
25. Perovic, S.; Muller, W.E.; *Pharmacological profile of Hypericum Extracts. Effect on Serotonin uptake by postsynaptic receptors, Arzneimittelforschung Drug Research*, **1995**, 11, 1145-1148.
26. Bol'shakova, I.V.; Lozovskaia, E.L.; Sapezhinski I. *Antioxidant Properties of A series of Extracts from Medicinal Plants, Biofizika*, **1997**, 2, 480-483
27. Muller, W.E.; Russol, R.; *Effects of Hypericum Extract on the Expression of Serotonin Receptors, J. Geriatr Psychiatry Neurol*, 7 Suppl, **1994**, 63-64.
28. Bladt, S.; Wagner, H.; *Inhibition of MAO by fractions and Constituents of Hypericum Extract, J. Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl, **1994**, 57-59.

29. Okpanyi, S.N.; Weischer, M.L. *Animal Experiments on the Psychotropic Action of a Hypericum Extract, Arzneimittelforschung Drug Research*, **1990**, *1*, 10-13.
30. Jhonson, D.; Ksciuk, H.; Woelk, H.; Sauerwein-giese, E.; Frauendorf, A. *Effects of Hypericum Extract LI 160 Compared with Maprotiline on Resting EEG and Evoked Potentials in 24 Volunteers, J. Geriatr Psychiatry Neurol*, *7 Suppl* , **1994**, 44-46.
31. Hubner, W.D.; Lande, S.; Podzuweit, H. *Hypericum Treatment of Mild Depression with Somatic Symptoms, J. Geriatr Psychiatry Neurol*, *1994*, *7*, 12-14.
32. Linde, K.; Ramirez, G.; Mulrow, C.D.; Pauls, A., Weidenhammer, W.; Melchart, D. *St John's wort for Depression an Overview and Meta-analysis of Randomised Clinical Trials, BMJ (Clinical Research Ed.)*, *1996*, 253-258.
33. Witte, B.; Harrer, G.; Kaptan, T.; Podzuweit, H.; Schmidet, U. *Treatment of Depressive Symptoms with a High Concentration Hypericum Preparation. A Multicenter Placebo-controlled Double-blind Study, Fortschritte Der Medizin*, **1995** *28*, 404-408.
34. Sommer, H.; Harrer, G. *Placebo-controlled Double-blind Study Examining the Effectiveness of an Hypericum Preparation in 105 mildly depressed patients, J. Geriatr Psychiatry Neurol*, *1994*, *7*, 9-11.
35. Lenoir, S.; Degenring, F. H.; Saller, R. A. *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*, **1999**, *6(3)*:141-6.

36. Franklin, M.; Chi, J.; McGavin, C.; Hockney, R.; Reed, A.; Campling, G.; Whale R.W.; Cowen, P. J. *Neuroendocrine evidence for dopaminergic actions of Hypericum extract (LI 160) in healthy volunteers, Biol Psychiatry*. **1999**, *15*, 46(4), 581-4.
37. Vonsover, A.; Steinbeck, K.A.; Rudic, C.; Mazur, Y.; Lavie, D.; Mandel, M. *HIV-1 Virus Load in the Serum of AIDS Patients Undergoing Long Term Therapy with Hypericin, International Conferece on AIDS*, **1996** *1*, 120.
38. Takahashi, I.; Nakanishi, S.; Kobayashi, E.; Nakano, H.; Suzuki, K.; Tamaoki, T. *Hypericin and Pseudohypericin Specifically Inhibit Protein Kinase C: Possible Relation to Their Antiretroviral Activity, Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1989**, *3*, 1207-1212.
39. Meruelo, D.; Lavie, G.; Lavie, D. *Terapeutic Agents with Dramatic Antiretroviral Activity and Little Toxicity at Effective Doses: Aromatic polycyclic Dions Hypericin and Pseudohypericin, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States*, **1988**, *14*, 5230-5234.
40. Sirvent, T.; Walker, L.; Vance, N.; Donna G. *Variation in hypericins from wild populations of Hypericum perforatum L. in the Pasific Northwest of the U.S.A. Econ., Bot.*, **2002**, *56*, 41– 49.
41. Shaib, M. J. *Studies on the biosynthesis of betalains in cell cultures of Beta vulgaris*, M. Phill. Thesis, *University of Edinburgh*, 1992.15.
42. Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E. *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, Plant Sci*, **2001**, 161:839–851.



43. Memişoğlu, M. *Ecbalium elaterium* bitkisinde hücre süspansiyon kültürü tekniği ile sekonder metabolit (Kukurbitasin B) üretimi, doktora tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara 2005.
44. Gürel, S.; Gürel, E.; Kaya, Z. *Establishment of Cell Suspension Cultures and Plant Regeneration in Sugar Beet (Beta vulgaris L.)*, *Turk J Bot*, **2002**, 26, 197-205.
45. Babaoğlu, M.; Gürel, E.; Özcan, S. (Ed.) Bitki Biyoteknolojisi I. Selçuk Üniv. Vakfı Yay. ss. 89-136, **2002**.
46. Çırak, C.; Aksoy, H. M.; Ayan, A. K.; Sağlam, B. ; Kevseroğlu, K. *Enhanced Hypericin Production in Hypericum perforatum and Hypericum pruinatum in Response to Inoculation with Two Fungal Pathogens*, *Plant Protect. Sci.*, **2005**, 3, 109–114.
47. Zhong, J.J. *Biochemical engineering of the production plant specific secondary metabolites by cell suspension cultures*, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2001**, 72, 1-26.
48. Roberts, S. C. Shuler, M. L. *Large-scale plant cell culture*. *Curr Op Biotechnol*, **1997**, 8, 154—159.
49. Ramachandra, R. S.; Ravishankar, G. A. *Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freshly suspended and immobilized cell cultures of capsicum frutescens*, *J. Biotechnol.*, **2000**, 76, 137-146.
50. Nasib, A.; Musharraf, S.G.; Hussain, S.; Khan, S.; Anjum, S.; Atta-ur-Rahman, S. A; Choudhary, M. I. *Biotransformation of (-) Ambrox by Cell Suspension Cultures of Actinidia deliciosa*, *J. of Nat. Prod.*, **2006**, 69, 957-959.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. GENEL BİLGİLER

#### 2.1.1. *Hypericum* Türlerinin Genel Özellikleri

Çok yıllık otsu bitkiler sınıfından olan *Hypericum* cinsine ait taksonların yaprakları basit veya tam kenarlı olup çoğunlukla şeffaf noktalıdır. Çiçekler ersellik olup 5 çanak ve 5 taç yapraktan oluşur. Genellikle sarı renklidir ve üzerinde siyah noktalar bulunur. Stamenler 5'li demetler halinde taç yaprakların karşısında yer alır, her birinde 3 ile 125 arası stamen, ender olarak steril demetlere değişirler. Ovaryum, her birinde 2 veya daha çok tohum taslağı 3-5 adet serbest veya ince bitişiktir. Meyve, kapsül tipinde olup septisid olarak açılır<sup>1</sup>.

#### 2.1.2. *Hypericum* Türlerinin Geleneksel ve Modern Tedavide Kullanımı

Eski zamanlardan beri *Hypericum* türlerinden elde edilen 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.

Geleneksel tedavide; *Hypericum* bitkilerinin yapraklı, çiçekli ve meyvalı dalları ile kökleri kullanılmaktadır<sup>2</sup>.

Modern tıbbın gelişmesi ile birlikte *Hypericum* türlerinin antidepresan, antiviral, antikanser, ve antioksidan özelliklerinden dolayı tıbbi kullanımı daha da artmıştır<sup>3-5</sup>. *Hypericum* özütleri son zamanlarda dünyanın birçok yerinde özellikle de

Amerika, Almanya ve diğ er Avrupa ÷lkelerinde antidepresan ilaç olarak, doğal, g÷venli ve daha az yan etkiye sahip olduğu için, sentetik antidepresanlara tercih edilmektedir<sup>6</sup>.

Hiperisin, monoamin oksidaz (MAO) inhibit÷r÷ olarak çalışır. Bu etkiyi; merkezi sinir sistemindeki postsinaptik resept÷rler tarafından, serotoninin geri alınımını engelleyerek yapar<sup>7-10</sup>. Ayrıca hiperisinin anlama ve algılama g÷cünü arttırdığı, yorgunluk, donukluk ve uyku halini giderdiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır<sup>11-13</sup>. Antidepresan y÷n÷yle önemli bir etkiye sahip olan bu bileşiğin hiç bir yan etkisinin saptanmamış olması hiperisinin önemini daha da arttırmaktadır<sup>14-16</sup>.

Hiperisinin fotodinamik özeliği birçok kanser t÷r÷n÷n tedavisinde kullanılmaktadır. Hiperisin bu etkiyi hem h÷cre b÷y÷mesinde rol oynayan bazı enzimlerin üretimini engelleyerek hem de reaktif oksijen t÷rleri oluşturarak doğrudan t÷m÷rl÷ b÷lgedeki h÷cre ve dokuların yıkımını sağlayarak gerçekleştirmektedir.

*Hypericum* z÷tlerinden elde edilen hiperisin bileşikleri viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca vir÷slerde ters transkriptaz ve protein kinaz-C enzimlerinin aktivitesini inhibe etme özellikleri sayesinde HIV tedavisinde bir antiretroviral ajan olarak kullanılabilereği birçok çalışmada bildirilmiştir<sup>17-19</sup>.

### 2.1.3. Sekonder (İkincil) Metabolitler

Sekonder Metabolitler bitkiler tarafından üretilen ve günümüzde birçok sektörde hammadde olarak kullanılan bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili olan primer (birincil) metabolitler (protein, yağ, karbonhidrat) kadar önemli olan

kimyasal maddelerdir<sup>20</sup>. Sekonder metabolitler başta ilaç sanayisinin hammaddesi olup kozmetik, besin katkı maddesi, zirai ilaç sanayiinde ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır. Ayrıca sekonder metabolitlerin bitkide; savunma, korunma, ortama uyum sağlama, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olarak ortaya çıkmaktadır<sup>21</sup>.

Sekonder bileşiklerin çoğu güçlü biyolojik aktivite gösterirler. Bundan dolayı bu bileşikler doğal ilaçlar olarak değerlendirilir. Sekonder bileşikler, birçok maddenin ham ya da öncül formları oldukları için bu bileşikleri içeren bitkiler yaygın olarak tedavide kullanılırlar. Birçok durumda bu tür biyoaktif doğal bileşiklerin üretimi bitkinin organına ve fizyolojik gelişim aşamasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir<sup>22</sup>.

#### 2.1.3.1. *Hypericum* Türlerinde Bulunan Sekonder (İkincil) Metabolitler

*Hypericum* bitkileri, floroglusinol türevleri (hiperforin ve adhiperforin), naftodiantronları (hiperisin ve psödohiperisin), flavonoidleri (hiperosid, rutin, quersitrin ve biapigenin), ve fenilpropanları (kafeik asit ve klorojenik asit) içermektedir<sup>23</sup>. Hiperisin bileşikleri, *Hypericum* bitkilerinin taşıdığı sekonder bileşiklerin önemli bir grubunu oluşturur ve bu bileşikler üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır.

## **Naftodiantronlar**

### ***Hiperisin ve Psödohiperisin***

*Hypericum* özütlerinde bulunan hiperisin ve psödohiperisin güçlü farmakolojik aktivitelere sahiptir<sup>24-26</sup>. Özellikle, hiperisin bileşiklerinin fotodinamik özelliği HIV ve kanser<sup>27</sup> tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hiperisin ve psödohiperisin bileşikleri ilk kez *H. perforatum* L. bitkisinden izole edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda, bu bileşiklerin *Hypericum* cinsine ait çoğu bitkilerde bulunduğu tespit edilmiştir<sup>28</sup>. Hiperisin bileşikleri, *Hypericum* cinsine ait bitkilerde bulunan doğal bileşikler olup sentetik olarak da elde edilebilmektedir.

Hiperisin, hem hidrosillenmiş hem de metillenmiş bir kimyasal yapıya sahip, ışığa duyarlı, naftodiantron grubu bileşikler sınıfına dahil edilmektedir<sup>29</sup>.

Naftodiantronlar, hiperisin, psödohiperisin onların öncül yapıları olan protohiperisin, protopsödohiperisin ve siklohiperisin bileşiklerini içerir. Bu bileşikler ışığa duyarlı olduklarından, bu bileşiklerin öncül (proto) formlarının aktif formlarına dönüştürülmesi ancak bir ışık kaynağının varlığında gerçekleşir<sup>30</sup>.

Hiperisin ve psödohiperisin bileşikleri, DMSO, etanol, metanol, aseton, etilmetilketon, pridin gibi organik çözücülerde çözünür<sup>31</sup>.

### ***Floroglusinoller***

Floroglusinol bileşikleri, *Hypericum* türlerinde yaygın bir dağılım gösterirler ancak naftodiantronların aksine *Hypericum* türlerinin dışında *Rosaceae*, *Euphorbiaceae* ve *Cannabidaceae* (*Cannabaceae*) gibi diğer bitki gruplarında da bulunan bileşiklerdir. Floroglusinollerin en önemli iki bileşiği olan hiperforin ve adhiperforin birbirlerine yapı bakımından çok benzer bileşikler olup sadece birkaç

metil grubu içeriği bakımından farklılık göstermektedirler<sup>32</sup>. Her iki bileşik de bitkilerin üretken kısımlarında üretilmekte olup çiçek kısımlarında az miktarda bulunmasına rağmen olgun meyvelerde fazla miktarda bulunmaktadır. Bu bileşiklerin toplam miktarı çiçeklerde %0.2-%2 arasında, olgun meyvelerde ise %1.8-%4.4 oranında bulunmaktadır.

Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda hiperforin bileşiklerinin de hiperisin ve psödohiperisin gibi antidepresan özelliğinin yanında<sup>33</sup> antineoplastik özellik<sup>34</sup> gösteren bileşikler olduğu bildirilmiştir.

### ***Flavonoidler***

Flavonoidler, *Hypericum* türlerinde bulunan biyoaktif bileşiklerin önemli bir grubunu oluşturur. Hiperozit, rutin, kuersitrin ve flavonol glikozitler, flavonoid grubu bileşikleridir. *H. perforatum* L.'de rutin ve hiperozitler, kuersitrin ve flavonol glikozitlere göre daha fazla miktarlarda bulunmakta olup bunlar yaklaşık %2-4 oranındadır. Birçok bitkinin yenen kısımlarında bulunan flavonoidlerin<sup>35</sup> fazla miktarda alınması genotoksik etkiye sebep olduğu<sup>36</sup> ancak düşük miktarlarda alınmasının antikanser ve antidepresan özellikler gösterdiği bildirilmiştir.

### ***Biflavonlar***

Biflavonlar, bazı bitkilerde nadiren bulunan ve yaygın olmayan dimerik flavon grubudurlar. Bu grubun en önemli bileşikleri 3,8-biapigenin ve amentoflavonlardır. Bunların *H. perforatum* L.'deki miktarı %0.01-%0.05 arasındadır<sup>37,38</sup>.

Bu bileşiklerin tedavideki kullanımları ile ilgili pek fazla veri bulunmamakta ancak son zamanlarda yapılan in vitro çalışmalarda amentoflavonun beyindeki benzodiazepin reseptörlerine bağlandığı ve bazı çalışmalarda da amentoflavonun yara iyileştirici ve ağrı kesici olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Amentoflavonların bu etkileri fosfolipaz A2 ve siklooksijenaz aktivitesini inhibe etmekte gösterdikleri düşünülmektedir<sup>39</sup>.

### ***Fenilpropanlar***

Bu bileşikler, bazı bitkilerde bulunan hidroksisinnamik asit'in esterleri olan bileşiklerdir<sup>40</sup>. P-kumarik asit ve kafeik asit gibi bazı fenilpropanlar temel yağların yapısında bulunabildiği gibi lokal anestetik aktiviteye sahiptirler. Fenilpropanlara ait diğer bir bileşik de klorojenik asittir. Klorojenik asitin bazı bitkilerindeki miktarı %1 civarındadır ancak *Hypericum* bitkilerinde çok az miktarda bulunan bu bileşiklerin farmakolojik aktivitelerine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır<sup>41</sup>.

Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda klorojenik asitin kolon kanserine karşı etkili olduğu bildirilmiştir<sup>42</sup>.

#### 2.1.4. Bitki Doku Kültürlerinin Tanımı ve Önemi

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon 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;

1. Bitkilerin klonal olarak hızlı çoğaltılmasında
2. Kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve Geleneksel yöntemlerle kolay çoğaltılmayan bitkilerin çoğaltılmasında
3. Patojenlerden arı bitkilerin elde edilmesinde
4. Islah amaçlı çalışmaların yapılmasında
5. Somaklonal varyasyonların oluşturulmasında
6. Haploid bitkilerin elde edilmesinde
7. Bitki gen kaynaklarının korunmasında
8. Biyokimyasal ürünlerin (sekonder metabolitlerin) elde edilmesinde rutin olarak uygulanan yöntemlerdir<sup>20</sup>.

#### 2.1.5. Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürleri

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<sup>43</sup>.

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<sup>44</sup>.

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 her hangi 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<sup>45</sup>.

#### 2.1.5.1. Süspansiyon Kültürü Kalitesinin Belirlenmesinde Önemli Etkenler

Kültürü yapılmış hücrelerin kalitesinin belirlenmesinde; renk, büyüme oranı, şekil, agregat (hücre kümeleri) dağılımı ve makroskobik özellik gibi bazı faktörler esas alınmaktadır.

#### ***Hücrelerin Şekli***

Şekil analizinin yapılmasında mikroskobik ve floresans analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Buradaki amaç kültüre alınmış ya da kültüre alınacak hücrelerin seçilmesinde kalitelerinin belirlenmesidir. Bu tür özelliklerin belirlenmesi özellikle somatik embriyo kültürü gibi büyük hücre kümelerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir kriterdir. Şekil analizi yapılarak gelişim aşamasında anormal somatik

embriyolar elimine edilerek uygun özellikteki somatik embriyonun seçilmesi sağlanır<sup>46-48</sup>.

### ***Hücrelerin Rengi***

Renk, süspansiyon kültürleri ve somatik embriyo kültürlerinin esas kaynağı olan kallus yapılarının özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir etkidir. Ortamın kompozisyonunun değiştirilmesi (kültür şartlarının değiştirilmesi), kallus renginin belirlenmesini sağlar. Kallus rengi çeşitli pigmentlerin oluşumu ile ilgili bir özellik olup pigment üretimi için kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin yapılmasında önemli bir ölçüt olarak kullanılmaktadır<sup>49,50</sup>.

### ***Hücrelerin Büyüme Oranı***

Büyüme oranı, hücrelerin canlılık, büyüme ve çoğalma durumu ile ilgili özelliklerin belirlenmesinde kullanılan önemli bir ölçüm tekniğidir. Çünkü hücrelerin büyüme özellikleri, süspansiyon kültürlerinin kalitesini yansıtır. Bunun için yaş hücre ağırlığı, kuru hücre ağırlığı, paketlenmiş hücre hacmi (PHH) ve hücre sayım yöntemleri kullanılmaktadır<sup>51,52</sup>.

### ***Hücre Agregatlarının (Kümelerinin) Dağılımı***

Süspansiyon kültürlerinde hücre kümelerinin dağılımı, kültür şartlarına, kültürün yaşına ve oluşan hücre hatlarının büyüklüğüne bağlı olarak çok büyük farklılıklar gösterir. Hücre kümelerinin büyüklüğü, kültüre alınan hücrelerin seçiminde kullanılmaktadır<sup>53,54</sup>.

### ***Hücrelerin Makroskopik Özellikleri***

Makroskopik özellik, hücre süspansiyon kültürlerinde hücre kümelerinin dağılımını ve bu kümelerin renklerinin değerlendirilmesinde kullanılır. Bu özellik de süspansiyon kültürlerinin kalitelerinin belirlenmesinde kullanılan bir ölçüttür<sup>55</sup>.

#### **2.1.5.2. Bitki Hücre Kültürlerinde Sekonder Metabolit Birikimi**

Bitki hücre kültürü teknolojisinin en önemli uygulama alanlarından biri bitkilerde bulunan biyoaktif bileşiklerin miktarının artırılmasıdır. Bitki hücre kültürleri kullanılarak sekonder metabolit üretimini arttıran bazı faktörler vardır. Bu faktörler, verimli hücre hatlarının seçimi, kültür şartlarının optimizasyonu, öncül maddelerin ve elisitörlerin kullanımı gibi faktörlerdir.

#### ***Verimli hücre hatlarının seçimi***

Hücre süspansiyon kültürlerinde bulunan bitki hücreleri farklı fiziksel özelliklere sahiptirler. Seleksiyon yöntemleri ile kültürlerdeki verimli ve sağlıklı fiziksel yapıya sahip hücreler izole edilerek, bu hücrelerin klonlanması ile ürün veriminin artırılması sağlanabilir<sup>56</sup>. Seleksiyon yöntemleri kullanılarak *Euphorbia milli* bitkisinin kültüre alınan hücrelerinde antosiyanin maddesi, ana bitkideki miktarından yaklaşık 7 kat fazla bulunmuş. Bu yöntemle *Coptis japonica*'nın hücrelerinin daha hızlı büyüme gösterdiği ve berberin maddesinin 6 kat daha fazla biriktiği görülmüş<sup>57</sup>.

### ***Öncül maddelerin kullanılması***

Süspansiyon kültürü ortamına öncül ya da ara maddelerin eklenmesi kültüre alınan hücrelerde sekonder bileşiklerin artmasına neden olmaktadır. Örneğin hücre süspansiyon kültürü ortamına bazı aminoasitlerin eklenmesi tropan ve indol alkaloidlerinin üretimini sağlamaktadır. Kültür ortamına fenilalanin aminoasidinin eklenmesi *Salvia officinalis*'in hücrelerinde rosmarinik asit üretimini<sup>58</sup>, *Taxus*'un hücrelerinde ise taxol üretimini teşvik etmiştir<sup>59</sup>. Aynı şekilde ferrulik asit, *Vanilla planifolia*'nın kültür hücrelerinde vanilin birikimini arttırmıştır. Bu yöntem özellikle pahalı olmayan öncül maddeler kullanıldığında oldukça etkili olmaktadır<sup>60</sup>.

### ***Kültür ortamının optimizasyonu***

Ortam bileşenleri, bitkisel hormonlar, pH, sıcaklık, havalandırma, çalkalama ve ışık gibi kimyasal ve fiziksel faktörlerin sekonder metabolit üretimini etkilediğine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kültür ortamının optimizasyonunun sağlanması ile, *Panax ginseng*'de ginsenoidlerin<sup>61</sup>, *Coleus blumei*'de rosmarinik asit<sup>62</sup>, *Nicotiana tabacum*'da ubikinon-10<sup>63</sup> ve *H. triquetrifolium*'da hiperisin bileşiklerinin kültüre alınan hücrelerde, normal bitkilerdekinden daha fazla birikmesine sebep olmuştur<sup>64</sup>.

## 2.2. KAYNAKLAR

1. Davis, P. H. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, 1988.
2. Saya, O.; Selçuk, A. E.; Özen, H. C.; Hoşgören, H.; Toker, Z. *Medicinal Plants of GAP Area, Environment Foundation of Turkey, Ankara*, 2001, 143.
3. Schinazi, R. F.; Chu, C.K.; Babu, J.R.; Oswald, B. V.; Saalman, D.L.; Cannon, B.; Ericksson, F.; Nasr, H. M. *Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus*, *Antiviral Res.*, **1990**, *13*, 265–272.
4. Agostinis, P.; Vantieghem,; A. Merlevede,; W. Peter, A.M. *Hypericin in cancer treatment: more light on the way*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2002, *34*, 221–241.
5. Silva, B. A.; Ferreres, F.; Malva, J. O.; Dias, A. C. P. *Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts*, *Food Chem.* **2005**, *90*, 157–167.
6. Butterweck, V. *Mechanism of action of St. John's wort in depression: what is known?*, *CNS Drugs*, **2003**, *17*, 539–562.
7. Perovic, S.; Muller, W.E.; *Pharmacological profile of Hypericum Extracts. Effect on Serotonin uptake by postsynaptic receptors*, *Arzneimittelforschung Drug Research*, **1995**,*11*, 1145-1148.
8. Bol'shakova, I.V.; Lozovskaya, E.L.; Sapezhinskiy I. *Antioxidant Properties of A series of Extracts from Medicinal Plants*, *Biofizika*, **1997**, *2*, 480-483
9. Muller, W.E.; Russol, R.; *Effects of Hypericum Extract on the Expression of Serotonin Receptors*, *J. Geriatr Psychiatry Neurol*, *7 Suppl*, **1994**, 63-64.

10. Blatt, S.; Wagner, H.; *Inhibition of MAO by fractions and Constituents of Hypericum Extract, J. Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl, **1994**, 57-59.
11. Okpanyi, S.N.; Weischer, M.L. *Animal Experiments on the Psychotropic Action of a Hypericum Extract, Arzneimittelforschung Drug Research*, **1990**, 1, 10-13.
12. Jhonson, D.; Ksciuk, H.; Woelk, H.; Sauerwein-giese, E.; Frauendorf, A. *Effects of Hypericum Extract LI 160 Compared with Maprotiline on Resting EEG and Evoked Potentials in 24 Volunteers, J. Geriatr Psychiatry Neurol*, 7 Suppl , **1994**, 44-46.
13. Hubner, W.D.; Lande, S.; Podzuweit, H.; *Hypericum Treatment of Mild Depression with Somatic Symptoms, J. Geriatr Psychiatry Neurol*, 1994, 7,12-14.
14. Linde, K.; Ramirez, G.; Mulrow, C.D.; Pauls, A.; Weidenhammer, W.; Melchart, D. *St John's wort for Depression an Overview and Meta-analysis of Randomised Clinical Trials, BMJ (Clinical Research Ed.)*, 313(7052), **1996**, 253-258.
15. Witte, B.; Harrer, G.; Kaptan, T.; Podzuweit, H.; Schmidet, U. *Treatment of Depressive Symptoms with a High Concentration Hypericum Preparation. A Multicenter Placebo-controlled Double-blind Study, Fortschritte Der Medizin*, **1995**, 28, 404-408.
16. Sommer, H.; Harrer, G. *Placebo-controlled Double-blind Study Examining the Effectiveness of an Hypericum Preparation in 105 mildly depressed patients, J. Geriatr Psychiatry Neurol*, **1994**, 7, 9-11.

17. Vonsover, A.; Steinbeck, K.A.; Rudic, C.; Mazur, Y.; Lavie, D.; Mandel, M. *HIV-1 Virus Load in the Serum of AIDS Patients Undergoing Long Term Therapy with Hypericin, International Conference on AIDS, 1996 1*, 120.
18. Takahashi, I.; Nakanishi, S.; Kobayashi, E.; Nakano, H.; Suzuki, K.; Tamaoki, T. *Hypericin and Pseudohypericin Specifically Inhibit Protein Kinase C: Possible Relation to Their Antiretroviral Activity, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989, 3*, 1207-1212.
19. Meruelo, D.; Lavie, G.; Lavie, D. *Therapeutic Agents with Dramatic Antiretroviral Activity and Little Toxicity at Effective Doses: Aromatic polycyclic Diones Hypericin and Pseudohypericin, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States, 1988, 14*, 5230-5234.
20. Babaoğlu, M.; Gürel, E.; Özcan, S. (Ed.) *Bitki Biyoteknolojisi I. Selçuk Üniv. Vakfi Yay. ss. 89-136, 2002*.
21. Yazaki, K. *FEBS. Lett. 2006, 580*, 1183-1191.
22. Marja, K.; Caldentey, O.; Inze', D. *Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites, Trends in Plant Science, 2004, 9*, 1360-1385.
23. Patocka, J. The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *J Appl Biomed, 2003, 1*, 61-73.
24. Uzdensky A., Iani V., Ma L.W. and Moan J. *On hypericin application in fluorescence diagnosis and cancer treatment: Pharmacokinetics and photosensitizing efficiency in nude mice bearing WiDr carcinoma, Med. Laser Appl, 2006, 21*, 271 – 276.

25. Wada, A.; Sakaeda, T.; Takara, K.; Hirai, M.; Kimura, T.; Ohmoto, N.; Zhou, J.; Nakamura, T.; Kobayashi, H.; Okamura, N.; Yagami, T.; Okumura, K. *Effects of St John's wort and hypericin on cytotoxicity of anticancer drugs*, *Drug Metab Pharmacokinet.* **2002**, *17*(5), 467-74.
26. Karioti, A.; Bilia, A. R., *Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics*, *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 562-594.
27. Blank, M.; Lavie, G.; Mandel, M.; Hazan, S.; Orenstein, A.; Meruelo, D.; Keisari, Y. *Antimetastatic activity of photodynamic agent hypericin in the dark*, *Int. J. Cancer*, **2004**, *111*, 596-603.
28. Kitanov, G.M. *Hypericin and pseudohypericin in some Hypericum species*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 171 – 178. Medina, M. A.; Martynez, P. B.; Amores, S.; Zanchez, M. I.; Quesada, A. R. *Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound?*, *Life Sci*, **2006**, *79*, 105–111.
29. Skalkos, D.; Tatsis, E.; Gerothanassis, I. P.; Troganis, A. *Towards a consensus structure of hypericin in solution: direct evidence for a single tautomer and different ionization states in protic and nonprotic solvents by the use of variable temperature gradient <sup>1</sup>H NMR*, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 4925-4929.
30. Poutaraud, A.; Gregorio, D. F.; Chan, F. T. V.; Girardin, P. *Effect of light on hypericin content in fresh flowering top parts and in an extract of St. John's wort (Hypericum perforatum)*, *Planta Med*, **2001**, *67*, 254–259.
31. Guedes, R. C.; Eriksson, L. A. *Theoretical study of hypericin* *J. Photochem, Photobiol A Chem*, **2005**, *172*, 293–299.
32. Maisenbacher, P.; Kovar K. A.; *Adhyperforin: A homologue of hyperforin from Hypericum perforatum*. *Planta Med*, **1992**, *58*, 291–293.



33. Chatterjee, S.S.; Bhattacharya, S.K.; Wonnemann, M.; Singer, A.; Muller, W.E. *Hyperforin as a possible antidepressant component of Hypericum extracts. Life Sci.* **1998**, *63* 499–510.
34. Schempp, C.M.; Kirkin, V.; Simon-Haarhaus, B.; Kersten, A.; Kiss, J.; Termeer, C.C.; Gilb, B.; Kaufmann, T.; Borner, C.; Sleeman, J.P.; Simon, J.C. *Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. Oncogene* , **2002**, *21*, 1242–1250.
35. MacGregor J.T.: Genetic toxicology of dietary flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1986**, *206*, 33–43,
36. Stavrik, B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin. Biochem.* **1994**, *27*, 245-248.
37. Berghoefler, R.; Hoelzl, J. *Biflavonoids in Hypericum perforatum; Part I. Isolation of I3,II8-biapigenin. Planta Med.* 1987, *53*, 216–217.
38. Baureithel, K.H; Buter, K.B.; Engesser, A.; Burkard, W.; Schaffner, W. *Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of Hypericum. Pharm. Acta Helv.* **1997**, *72*, 153–157.
39. Kim, H.K.; Son K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S.; Kim, H.P. *Amentoflavone, a plant biflavone: a new potential anti-inflammatory agent. Arch. Pharm. Res.* **1998**, *21*, 406–410.
40. Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Mazzanti, G. *Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. Planta Med.* **2001**, *67*, 564–566.
41. Nahrstedt, A.; Butterweck, V. *Biologically active and other chemical constituents of the herb of Hypericum perforatum L. Pharmacopsychiatry* *30, Suppl* *2*, 129–134, **1997**.

42. Mori, H.; Kawabata, K.; Matsunaga, K.; Ushida, J.; Fujii, K.; Hara, A.; Tanaka, T.; Murai, H. *Chemopreventive effects of coffee bean and rice constituents on colorectal carcinogenesis. Biofactors*, **2000**, *12*, 101–105.
43. Allan, E. *Plant cell culture*. In: Stafford, A.; Warren, G. *Plant Cell and Tissue Culture, John Wiley and Sons, Chichester*, **1996**, 1-23.
44. Phillips, G. C.; Hubstenberger, J. F.; Hansen, E. E. 1995. *Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures, Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Gamborg, O. L.; Phillips, G. C. Edt.; Springer and Verlag, Heidelberg, 2007, pp. 67-78.:
45. Shaib, M. J. *Studies on the biosynthesis of betalains in cell cultures of Beta vulgaris, M. Phill Thesis, University of Edinburgh*.
46. Uozumi, N.; Yoshino, T.; Shiotani, S.; Suehara, K.I.; Arai, F.; Fukuda, T.; Kobayashi, T. *Application of image analysis with neural network for plant somatic embryo culture. J. Ferment Bioeng*, **1993**, *76*, 505–509.
47. Harrell, R.C.; Bieniek, M.; Hood, C.F.; Munilla, R.; Cantliffe, D.J. *Automated, in vitro harvest of somatic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1994**, *39*, 171–183.
48. Ibaraki, Y.; Kenji, K. *Application of image analysis to plant cell suspension cultures, Computers and Electronics in Agriculture*, **2001 (a)**, *30*, 193–203.
49. Oinam, G.S.; Kothari, S.L. *Totipotency of coleoptile tissue in indica rice (Oryza sativa L. cv. CHI039). Plant Cell Rep.* **1995**, *14*, 245–248.
50. Remotti, P.C.; Löffler, H.J.M. *Callus induction and plant regeneration from gladiolus. Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1995**, *42*, 171–178.

51. Choi, K. T., Ahn, I. O., and Park, J. C. *Production of ginseng saponin in tissue culture of ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer, Russian Journal of Plant Physiology, 1994, 41, 784-788.*
52. Stirn, S.; Hopstock, A.; Lorz, H. *Bioreactor cultures of embryogenic suspensions of barley (Hordeum bulgare L.) and maize (Zea mays L.). J. Plant Physiol. 1994, 144, 209–214.*
53. Kieran, P.M.; Macloughlin, P.F.; Malone, D.M. *Plant cell suspension cultures: some engineering considerations, J. Biotechnol. 1997, 59, 39-52.*
54. Van Boxtel, J.; Berthouly, M.; *High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1996, 44, 7–17.*
55. Molle, F.; Dupuis, J.M.; Ducos, J.P.; Anselm, A.; Crolus-Savidan, I.; Petiard, Y.; Freyssinet, G.; *Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. 1993, In: Redenbaugh, K. (Ed.), Synseeds. CRC Press, Boca Raton, FL, 257–287.*
56. Berlin, J.; Sasse, F. *Selection and screening techniques for plant cell cultures. Advanced Biochemistry and Engeneering, 1985, 31, 99-132.*
57. Yamamoto, Y.; Mizuguchi, R.; Yamada, Y. *Selection of a high and stable pigment-producing strain in cultured Euforbia millii cells. Theoretical and Applied Genetics, 1982, 61, 113-116.*
58. Ellis, B. E.; Towers, G. H. N. *Biogenesis of rosamrinic acid in Mentha. Journal of Biochemistry, 1970.118, 291-297.*
59. Fett-Neto, A. G.; Stewart, J. M.; Nicholson, S. A.; Pennington, J. J.; Di-Cosmo, F. *Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid*

- feeding to cell cultures of T. cuspidata. Biotechnology Bioengineering*, **1994**, *44*, 967-971.
60. Romagnoli, L. G.; Knorr, D.; *Effects of ferulic acid treatment on growth and flavour development of cultured Vanilla planifolia cells. Food Biotechnology*, **1988**, *2*, 93-104.
61. Choi, K. T., Ahn, I. O., and Park, J. C. *Production of ginseng saponin in tissue culture of ginseng (Panax ginseng) C.A. Mayer, Russian Journal of Plant Physiology*, **1994**, *41*, 784-788.
62. Ulbrich, B., Weisner, W., and Arens, H. *In primary and secondary metabolism of plant cell cultures, (Neumann, K. H. and Reinhard, E., editors), Springer-Verlag (Berlin)*, 293-303, **1985**.
63. Fontanel, A.; Tabata, M. *Production of secondary metabolites from plant tissue and cell cultures. Nestle Research News*: **1987**, 92-103.
64. Karakas, O.; Toker, Z.; Tilkat, E.; Ozen, H.C.; Onay, A. *Effects of different concentrations of benzylaminopurine on shoot regeneration and hypericin content in Hypericum triquetrifolium Turra. Nat. Prod. Res.* **2008**, *3*, 1-7.

### 2.3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mennini ve Gobbi (2004), *H. perforatum* L.'den elde ettikleri farklı dozlardaki alkolik özütlerinin fareler üzerinde antidepresan etki gösterdiğini ve bu etkinin *Hypericum*'un özütlerinde bulunan hiperisin ve hiperforin bileşiklerinden kaynaklandığını tespit etmişler<sup>1</sup>.

Linde ve Mulrow (2003), *H. perforatum* L.'nin etanolik özütlerinin depresyon durumlarının hafifletilmesinde kullanılabileceğini ve bu semptomların giderilmesinde yan etkilerinin olmamasından dolayı diğer antidepresanlara göre daha güvenli bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişler<sup>2</sup>.

Öztürk ve ark (2002), Farklı dozlarda hazırladıkları *H. triquetrifolium* Turra ekstraktlarını farklı sürelerde ratlara uygulamış ve bu ekstraktların ratlar üzerinde antiinflamatuvar etki gösterdiğini tespit etmişler<sup>3</sup>.

Saad ve ark (2008), *H. triquetrifolium*'dan elde ettikleri özütlerin in vitro şatlarda insan monosit hücrelerindeki tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin (IL-6)'nın üretimi üzerindeki baskılayıcı etkisi ile ilgili bir çalışma yapmışlar<sup>4</sup>.

Sökmen ve ark (1999), Doku kültürü yöntemiyle yetiştirdikleri *Hypericum capitatum* bitkilerinden elde ettikleri metanol (MeOH) özütlerinin düşük oranda HIV-1'e karşı antiretroviral aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır<sup>5</sup>.

Taylor ve ark (1996), *H. Perforatum* L. özütlerinin virüsler üzerindeki etkilerini çalışmışlar, *Herpes simplex*, Sindbis ve poliovirüsüne karşı etkili olduğunu bildirmiş ve elde edilen özütlerden hiperisinin 1.7  $\mu$ g. ve psödohiperisinin 1.5  $\mu$ g.'nin HIV'de proteinkinaz-C aktivitesini inhibe ettiğini gözlemişler. Böylece HIV için bir antiretroviral ajan olarak kullanılabileceği saptanmıştır<sup>6</sup>.

Takahashi ve ark (1989), yaptıkları çalışmada, lipofilik bir bileşik olan hiperisin, virüsün lipid örtüsüne bağlanabildiği ve fotodinamik özelliğe sahip olan bu molekülün enerjisi absorblayıp enfeksiyon yapacak viral kapsüle kovalent bağlanarak zararlı etkisini ortadan kaldırdığını ve HIV'li dokuya uygulama yapıldığında antiretroviral oranında artış ayrıca HIV taşıyan hastalara uygulandığında oportunist enfeksiyonlara karşı koruma sağladığını gözlemişler<sup>7</sup>.

Apaydın ve ark (1999), *H. triquetrifolium*'un MeOH (metanol) özütünün fareler üzerinde antinosiseptif aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu bitkiden elde edilen özütün ratlara uygulanması sonucu uygulama miktarına bağlı olarak iltihaplanmayı önlediğini saptamışlardır<sup>8</sup>.

Jakovljevic ve ark (2000), *H. perforatum* L.'nin etanolik, etilasetat ve sulu özütlerinin farmakodinamik etkilerini araştırmışlar. Çalışmalarında özütlerin analjezik ve spazmolitik aktivite gösterdiğini ayrıca uygulama sürelerine bağlı olarak antidepresan etkilerinin olduğunu tespit etmişler<sup>9</sup>.

Nunes ve ark (2010), Brezilya'da yetişen 13 *Hypericum* türünün fenolik bileşik içeriklerine bakarak bu bileşiklerin *Hypericum* türlerinin dağılımlarında taksonomik bir özellik olarak kullanılıp kullanılmayacağı üzerine bir çalışma yapmışlar. Çalışmada tüm *Hypericum*'larda değişen oranlarda flavonoid, hiperozid, kuersitrin, izokuersitrin, gujaverin, klorojenik asit bulunmasına rağmen rutin ve ksanton bileşiklerini içermedikleri tespit etmişler<sup>10</sup>.

Conforti ve ark (2007), *H. triquetrifolium*'un metanol özütlerinde bulunan I3,II8-biapigenin, kuersetin-3- *O*-galaktozid, kamferol-3-*O*-glikozid, (y)-epikateşin ve hiperisin bileşiklerinin antioksidan aktiviteleri üzerine çalışmışlar ve IC<sub>50</sub> değerinin 0.062 mg/l - 1 mg/l arasında olduğunu bulmuşlar<sup>11</sup>.

Pasqua ve ark (2003), in vitro şartlarda yetiştirdikleri *Hypericum perforatum* L. bitkilerinin kallus, hücre süspansiyon kültürleri ve rejenere edilen organlarından elde ettikleri metanol ekstraktlarından hiperforin, hiperisin, flavonoid ve ksanton bileşiklerini izole etmişler<sup>12</sup>.

Nör ve ark (2004), *H. carinatum* ve *H. polyanthemon*'un petrol eter özütlerinde hiperbrasilol, *H. caprifoliatum* ve *H. connatum*'un petrol eter özütlerinde uliginozin B bileşiklerini tespit etmişler<sup>13</sup>.

Pretto ve santarem (2000), *H. perforatum* L.'nin yaprak eksplantlarını, MS besi ortamına farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 2,4-D, BA ve kinetin ekleyerek in vitro kültüre aldıktan sonra bu eksplantlardan aydınlık ve karanlık ortamlarda, kallus oluşumunu sağlamış. Elde edilen kalluslardan sürgün ve kök oluşturduktan sonra sera ortamına aktarmışlar<sup>14</sup>.

Couladis ve ark (2003), *Hypericum rumeliacum*'un toprak üstü organlarından GC/MS yöntemini kullanarak elde ettikleri bazı esansiyel yağların antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bir çalışma yapmışlar ve bu bileşiklerin ( $\alpha$ -pinen ve  $\beta$ -pinen) in vitro şartlarda hem bazı negatif hemde bazı pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğunu bulmuşlar<sup>15</sup>.

Tada ve ark (1992), *H. chines*'de floroglisinol türevi bileşiklerini izole ederek bu bileşiklerin farmakolojik etkilerini çalışmışlar. Bu bileşikler Tromboksan-A2 (trombositlerden sentezlenen, trombositlerin kümeleşmesini ve kanın pıhtılaşmasını sağlayan, damarları daraltan madde) ve Lökotrien-D4 (damarları kasmaya yarıyan madde) antagonisti olarak çalışırlar ve damarları genişleterek kanın akışkanlığını arttırdığını bildirmişler<sup>16</sup>.

Lin ve ark (1997), İn vitro şartlarda yetiştirdikleri *Alstroemeria* bitkilerinin yaprak eksplantlarını 0.5 µM TDZ ve 8 µM BAP içeren MS ortamında kültüre almış ve yaprak kısımlarından sürgün oluşumu için yeni bir protokol geliştirmişler<sup>17</sup>.

Wojcik ve Podstolski (2007), *H. perforatum* L.'nin yaprak kısımlarını farklı konsantrasyonlarda hazırlanan oksin ve sitokinin eklenmiş MS ortamına aktararak in vitro şartlarda kültüre almış ve sürgün oluşumunu sağlamışlar. Elde ettikleri sürgün kısımlarını IAA içeren ortamlarda başarılı bir şekilde köklendirmişler<sup>18</sup>.

Oluk ve Orhan (2009), Kaz Dağları'ndan topladıkları *H. triquetrifolium* Turra. bitkilerini, 1.25 mg/l Thidiazuron (TDZ) ve 0.5 mg/l Indol-3-asetik asit (IAA) içeren MS ortamında kültüre alarak sürgün oluşumunu, 1 mg/l IAA eklenen ortamda da kök oluşumunu sağlayarak bu bitkileri sera ortamına alıştırmayı başarmışlar<sup>19</sup>.

Kai ve ark (2008), *Ophiorrhiza japonica*'nın yaprak segmentlerini kullanarak in vitro şartlarda hem NAA'yı tek başına hem de BA ile kombinasyonlarını MS kültür ortamına ekleyerek kallus oluşturmuş ve kalluslardan da bitki rejenerasyonunu gerçekleştiren ilk araştırmacılar<sup>20</sup>.

Bacila ve ark (2010), aseptik şartlarda yetiştirdiği, *Hypericum maculatum cranz* bitkisinin nodal segmentlerini kullanarak, 0.5 mg/l 2iP + 0.2 mg/l BA + 0.1 mg/l K + 0.05 mg/l NAA içeren MS besi ortamında kültüre alarak sürgün oluşumunu sağlamışlar ve elde ettikleri bitkileri 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> ve 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirerek toprağa aktarmışlar<sup>21</sup>.

Murch ve ark (2006), *H. Perforatum* L. 'nin hipokotil kısımlarını, 5 µmol/l thidiazuron içeren MS ortamında kültüre almış ve sürgün oluşumunu sağlamışlar. Ayrıca çalışmalarında hipokotil kısımları üzerine BA ve IAA'nın etkili olmadığını bildirmişler<sup>22</sup>.



Morris ve Fowler (1981), saf hücre süspansiyon kültürleri oluşturmak için hem kallus dokularını parçalayarak elde ettikleri hücre yığınlarını hem de süspansiyon kültürlerinden elde ettikleri hücre yığınlarını, 4-5 mm çapındaki kalsiyum alijinat boncukları ile tutuklayarak yeni bir süspansiyon kültürü tekniği geliştirmişler. Hücreler, boncukların içinde ve yüzeyinde bölünmeye devam ederken kültürden 2-3 hafta sonra sıvı ortam filtre edilip, filtratlar taze ortama aktarılmış ve 1-2 hafta sonra saf hücre kültürleri oluşturarak, bu tekniği *catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* ve *Daucus carota*'ya başarılı bir şekilde uygulamışlar<sup>23</sup>.

Ogita (2005), farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 2,4-D ve BAP içeren modifiye ½ MS besi ortamına *Phyllostachys nigra*'nın sürgün kısımlarını aktararak, bu kısımlardan kallus elde etmiş. Kültürden 2-3 hafta sonra 2,4-D ortamında geliştirilen kallusların beyazımsı ve hızlı büyüme gösterdiklerini ancak birkaç alt kültürden sonra bu özelliklerini kaybettiklerini tespit etmişler. BAP içeren ortamda gelişen kallusların ise ilk kültür aşamasında bile kahverengimsi ve çoğalma yeteneğinin az olduğunu bu nedenle BAP'ın kallus üzerine negatif etki gösterdiğini saptamış<sup>24</sup>.

Falko ve ark (1996), *Saccharum sp.*'nin genç yapraklarını % 5 hindistan cevizi suyu, 500 mg/l kazein hidrolizat ve 3 mg/l 2,4-D eklenen MS ortamında kültüre alarak kallus oluşturmuşlar. Gelişen bu kallusları sıvı ortama aktarıp hücre süspansiyon kültürlerini yaparak, süspansiyon kültürü ortamında gelişen hücrelerden bitki rejenerasyonunu sağlamışlar<sup>25</sup>.

Ngara ve ark (2008), MS besi ortamına 3 mg/l 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) ve 2.5 mg/l NAA (1-naphthaleneacetic asit) ekleyerek hazırladıkları kültür ortamına, *Sorgum*'un genç sürgünlerini aktararak karanlık

ortamda kallus oluşturmuş ve bu kallusları aynı bitkisel hormonları içeren sıvı ortama aktarıp hücre süspansiyon kültürlerini yapmış ve bu ortamda geliştirilen hücreler üzerine proteomik çalışmaları yapmışlar<sup>26</sup>.

Iantcheva ve ark (2006), *M. Truncatula* bitkisini, in vitro şartlarda tohumdan itibaren yetiştirerek elde ettikleri 30 günlük bitkilerin, yaprak kısımlarının kenarlarını, steril şartlarda, bisturilerle kesip 1 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l Zeatin içeren MS kültür ortamında kallus oluşumunu sağladılar. Elde edilen kalluslar sıvı ortamda yetiştirildikten sonra sıvı ortam 150, 100, 80 ve 60 meş'lik filtrelerden geçirilerek saf hücre kültürleri elde etmişler ve bu ortamdaki hücrelerden kallus oluşturmadan somatik embriyo geliştirmeyi başarmışlar<sup>27</sup>.

Ono ve Harashima (1983), *Peony* bitkisinin polenlerinden oluşturdukları kallusları sıvı ortama aktararak 620 günlük kültür süresinden sonra bu bitkiye ait 6 hücre süspansiyon hattı geliştirmiş ve bu hatlardan elde ettikleri haploid ve diploid hücre hatlarının gelişimini ve kromozomal davranışlarını araştırmışlar<sup>28</sup>.

Bais ve ark (2002), *H. perforatum* L.'nin yaprak ekplantlarını, oksin olarak 2,4-D ve sitokin olarak da BA ile Kinetin'in farklı konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alarak bu bitkinin kallus ve hücre süspansiyon kültürlerini yapmışlar. Daha sonra elde ettikleri bu hücre kültürlerini hem karanlık hem de aydınlık ortamda bekleterek her iki ortamda gelişen hücrelerin hiperisin içeriklerini araştırmışlar<sup>29</sup>.

Pasqua ve ark (2003), *H. perforatum* L.'nin tohumlarını farklı miktarlarda oksin ve sitokin içeren MS besi ortamında çimlendirerek elde ettikleri bitkilerin yaprak kısımlarını kullanarak kallus oluşturmuş ve bu kalluslardan hücre süspansiyon kültürünü başlatmışlar. Daha sonra bu bitkinin kök, gövde, kallus ve

süspansiyon kültüründeki hücrelerin metanolik ekstraktlarında bulunan aktif metabolitleri (hiperisin, hiperforin ve flavonoidler) üretme yeteneğini değerlendirmişler. Çalışma sonunda hiperisinlerin, salgı yapılarının oluşumu ile ilgili olduğunu, ksantonların, tüm kültürlerde temel metabolit olduklarını ve flavonoid ve hiperforinlerin üretiminin de yaprak gelişimi ile ilgili olduklarını tespit etmişler<sup>30</sup>.

Gadzovska ve ark (2007), *H. perforatum* L.'nin hücre süspansiyon kültürlerine casmonik asit elisitasyonunun fenilpropanoidler ve naftodiantronların üretimi üzerine etkisini araştırmışlar. Araştırma sonunda metil casmonat'ın fenolik bileşik üretimini 6 kat arttırdığı, fenilpropanoidlerin üretiminin 6-8 kat arttığını ve naftodiantronlardan hiperisin ve psödohiperisini ise yaklaşık 2 kat arttırdığını gözlemlemişler<sup>31</sup>.

Yu ve ark (2005), *Cistanche deserticola* Y.C.'nin hücre süspansiyon kültürü ortamına elisitör olarak maya bırakmış ve mayaların hücrelerdeki feniletanoid üretimini üzerine etkisini araştırmışlar. Çalışmalarında maya elisitasyonunu 3 gün boyunca uygulamışlar ve kültürün 21.gününde elde ettikleri analiz sonuçlarına göre bu bileşiklerin önemli oranda artış gösterdiğini saptamışlar<sup>32</sup>.

Chong ve ark (2005), *Morinda elliptica*'nın hücre süspansiyon kültürlerinin farklı büyüme aşamalarında farklı tip elisitör eklemişler ve bu elisitörlerin antrakininon üretimi üzerine etkisini araştırmışlar. Kültürün 15. gününde elisitör eklenen gruptaki hücrelerin kontrol grubuna göre antrakininon içeriğinin ve büyüme oranlarının önemli ölçüde arttığını gözlemlemişler<sup>33</sup>.

Madrid ve Corchete (2010), *Silybum marianum*'un süspansiyon kültürlerine metil casmonat ve bütanol türevlerini ekleyerek, bu bileşiklerin bir flavonolignan olan silimarin bileşiğinin üretimi üzerine etkisini çalışmışlar. Çalışma sonunda

araştırmacılar metil casmonatın hücre süspansiyon ortamına eklenmesinin salınan silimarin maddesinin miktarında artış olduğunu ve bu bileşimin artmasında fosfatidik asitin rol oynadığını ancak ortama bütanol türevlerinin silimarin üzerine etkisinin bulunmadığını saptamışlar<sup>34</sup>.

Kretzschma ve ark (2007), *Rudgea jasminoides* bitkisinin hücre süspansiyon kültürü ortamlarına, karbon kaynağı olarak, Sükroz, glikoz, fruktoz, glikoz + fruktoz ekleyerek bu şekerlerin süspansiyon kültürü ortamlarındaki hücrelerin gelişimleri üzerine etkilerini araştırmışlar. Kültür süresince, sadece sükroz içeren ortamlardaki hücrelerin kuru ağırlıklarında bir artış olduğu ancak diğer ortamların hücre büyümesi üzerine aynı etkiyi gösterdiklerini tespit etmişler<sup>35</sup>.

Ono ve ark (1987), MS ortamına  $10^{-6}$  M 2,4-D ve % 4 glikoz ekleyerek hazırladıkları sıvı kültür ortamına *Atrichum undulatum*'un sporlarını aktarmışlar ve kültür ortamında spor benzeri yeşil renkli hücrelerin oluştuğunu saptamışlar<sup>36</sup>.

Gürel ve ark (2002), Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) ıslah hatlarından elde edilen kallustan süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve süspansiyon-kökenli kallustan bitki rejenerasyonunu tanımlamışlar. BAP ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını kullanarak, değişik inkübasyon süreleri boyunca kültürlerin büyüme motiflerini incelemişler. Süspansiyon kültüründeki hücrelerin büyüme oranları, kültür başlangıcında bütün hatlarda yavaş olmuş fakat takip eden günlerde önemli artışlar gösterdiğini gözlemişler<sup>37</sup>.

Franklin ve ark (1999), *H. perforatum* L.'nin yaprak ekplantlarından beyaz ve yeşil renkli olmak üzere farklı iki kompakt kallus oluşturmuş ve bu kallusların hücre süspansiyon kültürlerinden elde ettikleri hücrelere *Agrobacterium tumefaciens* ve *A. rhizogenes* vektörleri aracılığıyla partikül bombardımanı uygulayarak transgenik

özelikte *H. perforatum* L.bitkilerini üretmeyi sağlayarak yeni bir teknik geliştirmişler<sup>38</sup>.

Ishiguro ve ark (1999), *Hypericum patulum*'un hücre süspansiyon kültürlerinden, patulozit-A ve patulozit-B adlı iki yeni ksanton glikosid bileşilerini izole etmişlerdir<sup>39</sup>.

Southwell ve Bourke (2001), *H. perforatum* L.'nin hiperisin içeriğinin mevsimlere bağlı olarak değiştiğini saptamışlardır. Geniş yapraklarda kışın minimum hiperisin–södohiperisin miktarı 100 ppm. iken yazın 3000 ppm. dar yapraklarda ise bu miktar, kış evsiminde geniş yaprağına yakın bir değerdeyken yaz mevsiminde maksimum yani 5000 ppm kadar olduğunu saptamışlardır<sup>40</sup>.

Ayan ve Çırak (2008), 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., and *H. triquetrifolium* Turra.) yaprak, gövde ve çiçek kısımlarının Hiperisin ve psödohiperisin içeriğini HPLC yöntemi ile tespit ederek hem bitkiler hemde bitki kısımları arasında bu bileşiklerin farklı miktarlarda bulunduğunu saptamışlar<sup>41</sup>.

Alali ve ark (2004), Ürdün'de yetişen *H. triquetrifolium*'un çiçek, yaprak, gövde ve kök kısımlarının metanolik özütlerinin total hiperisin içeriğini HPLC yöntemi ile tespit etmeye yönelik yaptıkları çalışmada hiperisinin bitki dokularındaki dağılımının farklılık gösterdiğini bildirmişler<sup>42</sup>.

Evstatieva ve ark (2000), Bulgaristan'daki *H. Perforatum* L'bitkilerinin hiperisin miktarlarını belirlemeye yönelik olarak yaptıkları çalışmada, 20 floristik bölgeden toplanan toplam 65 populasyon içinde en fazla hiperisin içeriğinin Güney

Bulgaristan'ın dağlık bölgesinde yetişen *H. perforatum* L.de bulunduğunu saptamışlardır<sup>43</sup>.

Sırvant ve Gibson (2000), *H. perforatum* L.'de bulunan hiperisin, psödohiperisin ve diğer bileşiklerin elde edilmesi için yeni bir teknik geliştirmişler<sup>44</sup>.

Oluk ve ark (2010), *H. triquetrifolium*'un kotiledonlarını 0.5 mg/l IAA ve 2 mg/l BA içeren yarı-katı MS besi ortamında kültüre almış ve kallus oluşturmuşlar ve kültürün ilerleyen günlerinde elde ettikleri ebriyojenik kallusların hiperisin içeriğinin tespitine yönelik bir çalışma yapmışlar<sup>45</sup>.

Martínez-Juárez ve ark (2004), *Capsicum annum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde capsaisin bileşiğinin transformasyonu ile, daha önce bu bitkinin meyvelerinde ve in vitro kültürlerinde bulunmayan, 5,5-dikapsaisin bileşiğini elde etmişler ve bu bileşiğin sadece süspansiyon ortamına kapsaisin bileşiği eklendiği durumlarda sentezlendiğini tespit etmişler<sup>46</sup>.

Kawazu ve ark (1998), *Tectona grandis*'te bulunan ve antibakteriyel özelliğe sahip olan bazı triterpen asitlerinin üretimi üzerine bir çalışma yapmışlar. Araştırmalarında, bu bitkinin çok az miktarda bu bileşikleri içerdiğini ancak hücre süspansiyon kültürleri yardımıyla bu bileşiklerin miktarlarının önemli ölçüde (yaklaşık 70 kat) arttırılabildiğini saptamışlar<sup>47</sup>.

## 2.4. KAYNAKLAR

1. Mennini, T.; Gobbi, M. *The antidepressant mechanism of Hypericum perforatum*, life sciences, **2004**, 75, 1021-1027.
2. Linde, K.; Mulrow, C.D. *St John's wort for depression. Cochrane Database Systematic Reviews 2*, **2003**, CD000448.
3. Öztürk, B.; Apaydın, S.; Goldeli, E.; İnce, İ.; Zeybek, U. *Hypericum triquetrifolium Turra. extract exhibits antiinflammatory activity in the rat, journal of ethnopharmacology*, **2002**, 80, 207-209.
4. Saad, B.; Abouatta, B.S.; Basha, W.; Hmade, A.; Kmail, A.; Khasib, S.; Said, O. *Hypericum triquetrifolium—Derived Factors Downregulate the Production Levels of LPS-Induced Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in THP-1 Cells, eCAM*, **2008**, 1-7.
5. Sökmen, A.; Jones, B.M.; Ertürk, M. *Antimicrobial Activity Of Extracts from the Cell Cultures of Some Turkish Medicinal Plants, Phytotherapy Research*, **1999**, 13, 355-357.
6. Taylor, R.S.; Manandhar, N.P.; Hudson, J.B.; Towers, G.H., *Antiviral Activities of Nepales Medicinal Plants, J. Ethnopharmacol*, **1996**, 3, 157-163.
7. Takahashi, I.; Nakanishi, S.; Kobayashi, E.; Nakano, H.; Suzuki, K.; Tamaoki, T. *Hypericin and Pseudohypericin Specifically Inhibit Protein Kinase C: Possible Relation to Their Antiretroviral Activity, Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1989**, 3, 1207-1212.

8. Apaydın, Ş.; Zeybek, U.; İnce, i.; Elgin, G.; Karamenderes, C.; Öztürk, B.; Tuğlular, I. *Hypericum triquetrifolium Turra. Extract Exhibits Anticiceptive Activity in the Mouse, J. Ethnopharmacology*, **1999**, *67*, 307-312.
9. Jakovljevic, V., Popovic, M.; Mimica-Dukic, N.; Sabo, A.; Gvozdencovic, I. *Pharmacodynamic study of Hypericum perforatum L. Phytomedicine*, **2000**, *7*, 449-453.
10. Nunes, J.M.; Pinto, P.S.; Bordignon, S.A.L.; Rech, S.B.; Poser, G.L. *Phenolic compounds in Hypericum species from the Trigynobrathys section, Biochemical Systematics and Ecology*, **2010**, *38*, 224–228
11. Conforti, F.; Loizzo, M.R.; Statti, A.G.; Menichini, F. *Cytotoxic activity of antioxidant constituents from Hypericum triquetrifolium Turra. Nat Prod Res*, **2007** *21*, 42-46.
12. Pasqua, G.; Pinarosa, A.; Monacelli, B.; Santamaria, A. R.; Argenti, M. P. *Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of Hypericum perforatum cv. Topas, Plant Science*, **2003**, *165*, 977-982.
13. Nör, C.; Albring, D.; Ferraz, A.B.F.; Schripsema, J.V.; Pires, P.; Sonnet, D.; Von Poser, G.L. *Phloroglucinol derivatives from four Hypericum species belonging to the Trigynobrathys section, Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 517–519.
14. Pretto F. R.; Santar’em E. R. *Callus formation and plant regeneration from Hypericum perforatum leaves, Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **2000**, *62*, 107–113.
15. Couladis, M.; Chinou, I.B.; Tzakou, O.; Petrakis, P.V. *Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Hypericum rumeliacum subsp. apollinis (Boiss. & Heldr.), phytoterapy research*, **2003**, *2*, 152-154.



16. Tada, M.; Chiba, K.; Takakuwa, T.; Kojima, E. *Analogues of Natural Phloroglucinol as Antagonists Both Thromboxane A<sub>2</sub> and Leukotriene D<sub>4</sub>*, *J. Medicinal Chemistry*, **1992**, 7, 1209-1212.
17. Lin, H. S.; De Jeu, M. J.; Jacobsen, E. *Direct shoot regeneration from excised leaf explants of in vitro grown seedlings of Alstroemeria L.*, *Plant Cell Reports*, **1997**, 16, 770–774.
18. Wojcik, A.; Podstolski, A. *Leaf explant response in in vitro culture of St. John's wort (Hypericum perforatum L.)*. *Acta Physiol. Plant*, **2007**, 29, 151-156.
19. Oluk, E. A.; Orhan, S. *Thidiazuron induced micropropagation of Hypericum triquetrifolium Turra*, *African Journal of Biotechnology*, **2009**, 15, 3506-3510.
20. Kai, G. Y.; Dai, L. M.; Mei, X. Y.; Zheng, J. G.; Wang, W.; Lu, Y.; Qian, Z. Y.; Zhou, Y. G. *In vitro plant regeneration from leaf explants of Ophiorrhiza japonica*, *Biologia Plantarum*, **2008**, 3, 557-560.
21. Băcilă, I.; Coste, A.; Halmagyi, A.; Deliu, C. *Micropropagation of Hypericum maculatum Cranz an important medicinal plant*, *Romanian Biotechnological Letters*, **2010**, 1, Printed in Romania.
22. Murch, S.J.; Saxena, P.K. *St. John's wort (Hypericum perforatum L.): Challenges and strategies for production of chemically-consistent plants*, *Can. J. Plant Sci*, **2006**, 86, 765-771.
23. Morris, P.; Fowler, M. W. *A new method for the production of fine plant cell suspension cultures*, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **1981**, 1, 15-24.
24. Ogita, S. *Callus and cell suspension culture of bamboo plant, Phyllostachys nigra*, *Plant Biotechnology*, **2005**, 2, 119–125.

25. Falco, M. C.; Mendes, B. M. J.; Neto, A. T. *Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration*, R. Bras. Fisiol. Veg, **1996**, 1,1-6.
26. Ngara, R.; Rees, J.; Ndimba, B. K. *Establishment of sorghum cell suspension culture system for proteomics studies*, African Journal of Biotechnology, **2008**, 6, 744-749,
27. Iantcheva, A.; Vlahova, M.; Atanassov, A.; Duque, A. S.; Araújo, S.; Santos, D. F. D.; Fevereiro, P. *Cell suspension cultures*, Lisboa, Portugal, 2006.
28. Ono, K.; Harashima, S. *Growth characteristics and chromosomal behavior of cell suspension lines established from pollen callus of peony*, Jpn. J. Genet. **1983**, 58, 209-218
29. Bais, H. P.; Walker, T. S.; McGrew, J. J.; Vivanco, M. H. *Factors affecting growth of cell suspension cultures of Hypericum perforatum L. (st. john's wort) and production of hypericin*, In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant, **2002**, 38, 58–65.
30. Pasqua, G.; Pinarosa, A.; Monacelli, B.; Santamaria, A. R.; Argenti, M. P. *Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of Hypericum perforatum cv. Topas*, Plant Science, **2003**, 165, 977-982.
31. Gadzovska, S.; Maury, S.; Delaunay, A.; Spasenovski, M.; Joseph, C.; Hagege, D. *Jasmonic acid elicitation of Hypericum perforatum L. Cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones*, Plant Cell Tiss Organ Cult, **2007**, 89,1–13.
32. Yu, X.C.; Guo, B.; Zhou, H.Y.; Ni, W. *Repeated elicitation enhances phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension cultures of Cistanche deserticola*, Biochemical Engineering Journal, **2005**, 24, 203–207.

33. Chong, T. M.; Abdullah, M. A.; Lai, O. M.; Nor'Aini, F. M.; Lajis, N. H. *Effective elicitation factors in Morinda elliptica cell suspension culture*, *Process Biochemistry*, **2005**, *40*, 3397–3405.
34. Madrid, E.; Corchete, P. *Silymarin secretion and its elicitation by methyl jasmonate in cell cultures of Silybum marianum is mediated by phospholipase D-phosphatidic acid*, *Journal of Experimental Botany*, **2010**, *3*, 747–754.
35. Kretzschmar, S. F.; Clovis, J. F.; Oliveira, J.; Braga, R. M. *Differential sugar uptake by cell suspension cultures of Rudgea jasminoides, a tropical woody Rubiaceae*, *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, **2007**, *43*, 71–78.
36. Ono, K.; Murasaki, Y.; Kawauchi, K. *Establishment and characteristics of a cell suspension culture from a Moss, Atrichum undulatum*, *The Botanical Magazine*, **1987**, *100*, 217-221.
37. Gürel, S.; Gürel, E.; Kaya, Z. *Establishment of Cell Suspension Cultures and Plant Regeneration in Sugar Beet (Beta vulgaris L.)*, *Turkish Journal of Botany*, **2002**, *26*, 197-205.
38. Franklin, M.; Chi, J.; McGavin, C.; Hockney, R.; Reed, A.; Campling, G.; Whale R.W.; Cowen, P. J. *Neuroendocrine evidence for dopaminergic actions of Hypericum extract (LI 160) in healthy volunteers*, *Biol Psychiatry*. **1999**, *15*, 46(4), 581-4.
39. Ishiguro, K.; Yamamoto, R.; Oku, H. *Patulosid A and B, Novel Xanthones Glycosides from Cell Suspension Cultures of Hypericum patulum*, *J. Natural Products*, **1999**, *62*, 906-908.
40. Southweell, A. I.; Bourke, C. A.. *Seasonal variation in hypericin content of Hypericum perforatum L.*, *Phytochemistry*, **2001**, *56*, 437-441.

41. Ayan, A.K.; Çırak, C. *Hypericin and Pseudohypericin Contents in Some Hypericum Species Growing in Turkey*, *pharmaceutical biology*, **2008**, *4*, 288-291
42. Alali, F.; Tawaha, K.; Al-Eleimat, T. *Determination of hypericin content in Hypericum triquetrifolium Turra. (hypericaceae) growing wild in Jordan*, *Natural product research*, **2004**, *2*, 147-151.
43. Evstatieva, I.; Popova, I.; Maslenkova, I.; Skerleva, M. *Content of Hypericin in Hypericum perforatum L. from Bulgaria*, *Proceedings of the 2nd Balkan Botanical Congress Plants of the Balkan Peninsula into the Next Millennium*, İstanbul, 2000.
44. Sirvent, T.; Gibson, D. M. *Rapid Isocratic HPLC Analysis of Hypericins*, *J. Liq. Chrom and Rel. Technol*, **2000**, *2*, 251-259.
45. Oluk, E. A.; Orhan, S.; Karakaş, O.; Çakır, A.; Gönüz, A. *High efficiency indirect shoot regeneration and hypericin content in embryogenic callus of Hypericum triquetrifolium Turra*. *African Journal of Biotechnology*, **2010**, *15*, 2229-2233.
46. Martínez-Juárez, V.M.; Ochoa-Alejo, N.; Lozoya-Gloria, E.; Villarreal-Ortega, M. L.; Ariza-Castolo, A.; Esparza-García, F. J.; Calva-Calva, G. *Specific Synthesis of 5,5'-Dicapsaicin by Cell Suspension Cultures of Capsicum annum Var. annum (Chili Jalapeño Chigol) and Their Soluble and NaCl-Extracted Cell Wall Protein Fractions*, *J. Agric. Food Chem*, **2004**, *4*, 972-979.
47. Kawazu, K.; Marwani, E.; Kobayashi, A.; Nitoda, T.; Kanzaki, H. *production of antibacterial triterpene acids not detected in the native plant by cell suspension culture of tectona grandis*, *scientific reports of the faculty of agriculture, okayama university*, **1998**, *87*, 9-12.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. *H. triquetrifolium* 'un Tanımı ve Yayılışı

Gövde 15-55 cm, dik veya yatık, iki çizgili, dallar genişçe yaygın genellikle piramit şeklindedir. Yapraklar 3-20 mm olup, üç köşeli-mızraksı ya da nadiren dar yumurtamsıdan şeritsi dikdörtgenimsiye kadar değişen şekilde, kenarı ondüleli dalgalı bazen orta büyüklükten küçüğe doğru saydam şeffaf beneklidir. Sepaller, dikdörtgenimsi, yumurtamsı-dikdörtgenimsi, ucu yuvarlağımsı veya tepecikli, düz veya dişçikli, siyah salgı benekleri bulunmaz. Petaller 5-7 mm, genellikle salgı benekleri yok veya salgı beneği vardır. Kapsül 3-5 mm, yumurtamsı. Çiçeklenme dönemi 5-9 aylar. Türkiye'de yayılış gösterdiği bölgeler Marmara, Ege, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleridir<sup>1</sup>.

#### 3.2. Bitkinin Toplanması

Çalışmada materyal olarak kullanılan *H. triquetrifolium* (*Guttiferae*) bitkileri (Şekil 3.1.2.1-2) Eylül 2008'de, Diyarbakır-Merkez, Alçık Köyü civarı, yol kenarından toplandı. Bitkilerden ayıklanan tohumlar ağzı kapalı film kutularına konulup, çalışma zamanına kadar, buzdolabında (4<sup>0</sup>C'de) tutuldu.

Çalışmada kullanılan bitkilere ait örnekler, Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi herbaryumunda tutulmaktadır.

#### 3.3. Uygun Eksplantın Seçilmesi

Bu aşamada, kallus kültürü çalışmalarında ana materyal olarak kullanılan en uygun eksplant (bitki parçası) tespit edildi. Bunun için öncelikle bitkiler, Bölüm

3.1.2’de anlatıldığı gibi toplanıp laboratuara getirildikten sonra kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımları ayrı ayrı kesildi. Bu bitki kısımları oda sıcaklığında kurutulduktan sonra hiperisin içerikleri tespit edilip sonuçlar kaydedildi. Daha sonra bitkinin olgun tohumları çimlendirilip sürgün oluşturuldu ve en fazla hiperisin içeren bitki kısmının kallus kültürü yapıldı.

#### 3.4. Kullanılan Besi Ortamlarının Sterilizasyonu ve Hazırlanması

Çalışmada besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanıldı<sup>2</sup>. 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 aşağıda açıklandığı gibidir.

##### *MS (makro elementler) Ana Çözeltisi*

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5 g
KNO <sub>3</sub>	19.0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.4 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g

Distile su ile 1000 cc’ye tamamlanır.

##### *MS Mikro Elementler 1 Ana Çözeltisi*

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2230 mg

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 860 mg

KI 83 mg

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 25 mg

Distile su ile 1000 cc'ye tamamlanır.

***MS Mikro 2 Elementler Ana Çözeltisi***

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 25 mg

CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 25 mg

Distile su ile 100 cc'ye tamamlanır.

***Kompleks Kelatör Ana Çözeltisi***

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2.78 g

Na<sub>2</sub>EDTA 2.00 g

Distile su ile 1000 cc'ye tamamlanır.

***Vitamin Karışımı Ana Çözeltisi***

Nikotinic asit 50 mg

Glisin 2.0 mg

Pridoksin HCl 50 mg

Distile su ile 100 cc'ye tamamlanır

***B1 Vitamini Ana Çözeltisi***

Tiamin HCl 100 mg

Distile su ile 100 cc'ye tamamlanır.

***MS besi ortamı aşağıdaki şekilde hazırlandı***

MS ana solüsyonu (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 solüsyonu	1 cc
Sükroz	30 g

Distile su ile 1000 cc'ye tamamlandı.

Kallus, çimlendirme ve proliferasyon aşamalarında ortamın katılaştırılması için 7 gr/l agar kullanıldı ancak hücre süspansiyon kültürü ortamının sıvı olması gerektiğinden agar kullanılmadı. Bütün kültür ortamlarında pH 5.8'e ayarlandı.

MS besi ortamı hazırlanırken, öncelikle yukarıda 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. "Makro element", "mikro element-I", "Jelat", "myo-inositol", "mikro element-II" ve "vitamin" olarak adlandırılan bu stok çözeltiler, renkli şişelerde buzdolabında 4 °C'de muhafaza edilmiş ve periyodik aralıklarla yenilenmiştir.



### 3.4.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

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

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

BAP (6-benzil aminopürin)

NAA ( $\alpha$ -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 josedeki 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 renkli şişelerde muhafaza edilmiş ve periyodik olarak yeniden hazırlanmıştır.

BA ve Kinetin bileşiklerinin çözdürülmesinde 0,1 N'lik NaOH, 2,4-D ve NAA bileşiklerinin çözdürülmesinde ise etil alkol (CH<sub>2</sub>OH) kullanıldı. Hazırlanan stok çözeltiler 4<sup>0</sup>C'de buzdolabında saklandı.

### 3.4.2. Sterilizasyon İşlemleri ve Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması

#### 3.4.2.1. Genel Doku Kültürü Teknikleri

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan laboratuvar teknikleri, aslında rutin ve standart olarak yapılan işlemlerden oluşmaktadır. Ancak araştırmanın yöntemini

ortaya koymak amacıyla, sterilizasyon işlemleri, besi ortamlarının hazırlanması ve kültür şartları gibi konular ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir.

#### 3.4.2.2. Olgun Tohumların Sterilizasyonu

*H. triquetrifolium*'un olgun tohumlarının, çimlenme sırasında enfekte olmasını önlemek için yüzey sterilizasyonu yapıldı ve tohumlar aşağıdaki aşamalardan geçirildi. Tohumlar önce musluk suyunda yıkandıktan sonra % 70'lik etilalkolde 30 saniye bekletildi. Daha sonra tohumlar % 5'lik NaOCI (sodyum hipoklorit) çözeltisi içinde 10 dakika süre ile bekletildi. Ön sterilizasyonu yapılan tohumlar, steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanarak, tohumların sodyum hipoklorit (NaOCI) ten arındırılması sağlandı.

#### 3.4.2.3. 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.

#### 3.4.2.4. Kültür Kaplarının Sterilizasyonu

Kültür kabı olarak cam şişeler ve Magenda GA-7'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 GA-7'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 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan kültür kapları ve özellikleri

<b>Kültür kapları</b>	<b>Özellikleri</b>
Magenta <sup>®</sup> vessel GA-7 kültür kabı	77x77x97 mm, polikarbonat gövde, polipropilen kapak
Cam kavanoz	Şişecam (kod:102921), Ø66x81 mm, metal kapak

#### 3.4.2.5. Pens ve Bisturilerin Sterilizasyonu

Pens ve bisturiler önce % 96’lık alkol ile silinip 10’arlı gruplar halinde alüminyum folyolarla sarılarak 200 °C’de kuru bir sterilizatörde, 20 dakika süre ile steril edildi.

#### 3.4.2.6. Transfer Odasının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Kültür odasında, bir ultraviyole lambası, içinde ekim işlemlerinin gerçekleştirildiği bir laminar air flow kabini, 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 bulunmakla birlikte, odaya yerleştirilen ayrı bir lambasının kültürden önceki gece 3 saat süreyle çalışması sağlanarak ortam dezenfekte edildi.

#### 3.4.2.7. Kültür Odasının Şartları

Kültür odası, beyaz floresan lamba ile aydınlatılmış ve kültür kaplarındaki eksplantlar için 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu sağlanmıştır. Sıcaklık, klima yardımı

ile  $25 \pm 2$  °C’de tutulmuş ve muhtemel klima arızalarına karşı, sıcaklığın 30 °C’nin üzerine çıkması durumunda lambaları kapatan bir termostat yerleştirilmiştir. Bitkisel materyalin gelişimi için gerekli olan fotoperiyot, ışıklandırma sisteminin 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır.

#### 3.4.2.8. Tohumların Çimlendirilmesi Aşaması

Bu aşamada tohumlar, bölüm 3.1.4.3’te anlatıldığı şekilde sterilizasyon işlemlerinden geçirildikten sonra çimlenmesi için en uygun (BBD içermeyen) MS besi ortamında kültüre alındı. Kültür belirli günlerinde, tohumların çimlenmelerine ait veriler değerlendirilerek tablo halinde sunuldu.

#### 3.4.2.9. Proliferasyon Aşaması

Bu aşamada çimlendirilen tohumlardan elde edilen sürgünlerden, bitkilerin proliferasyonunda kullandığımız MS besi ortamına 1 mg/l BA (6-benziladenin aminopürin) ilave edilerek sürgün oluşumu sağlandı. Sürgün oluşumuna ait veriler tablo halinde gösterildi.

### 3.5. Kallus Kültürlerinin Başlatılması ve Devamlılığı

#### 3.5.1. Kültürlerin Başlatılması

Kallus kültürlerinin başlatılmasında, doku kültüründe yetiştirilen 21 günlük bitkilerin yaprak kısımları kullanıldı. Yapraklar bitkiden koparılıp, steril pens ve bisturiler kullanılarak, steril kurutma kağıtları üzerinde 2-4 parçaya bölündükten sonra kallus oluşum ortamı olarak kullanılan BA (1 mg/l) + NAA (2 mg/l), BA (1 mg/l) + NAA (0.5 mg/l), BA (1 mg/l) + 2,4-D (0.4 mg/l), BA (0.06 mg/l) + 2,4-D

(0.1 mg/l), Kinetin (0.9 mg/l) + 2,4-D (3 mg/l), Kinetin (0.4 mg/l) + 2,4-D (2 mg/l) farklı hormon konsantrasyonlarını ve kombinasyonlarını içeren katı MS besi ortamları hazırlandı. Ortam pH'sı 5.8 olacak şekilde ayarlandı. Her bir magenda GA-7 kabına 20-25 ml besi ortamı bırakıldı ve yaprak parçaları, her bir kaba 6-8 parça olacak şekilde, kültür ortamlarına aktarılarak, büyüme odasında bekletildi. Yaprak eksplantlarından kallus oluşturmak için 6 farklı ortam kullanıldı.

Kullanılan ortamların içeriklerine ait bilgiler aşağıda verilmiştir;

<u>1.ortam</u>	<u>2.ortam</u>	<u>3.ortam</u>
MS	MS	MS
% 3 süzkroz	% 3 süzkroz	% 3 süzkroz
<b>1 mg/l BA</b>	<b>1 mg/l BA</b>	<b>1 mg/l BA</b>
<b>2 mg/l NAA</b>	<b>0.5 mg/l NAA</b>	<b>0.4 mg/l 2,4-D</b>
% 0.7 agar	% 0.7 agar	% 0.7 agar
pH= 5.8	pH= 5.8	pH= 5.8
<u>4.ortam</u>	<u>5.ortam</u>	<u>6.ortam</u>
MS	MS	MS
% 3 süzkroz	% 3 süzkroz	% 3 süzkroz
<b>0.06 mg/l BA</b>	<b>0.9 mg/l Kinetin</b>	<b>0.4 mg/l Kinetin</b>
<b>0.1 mg/l 2,4-D</b>	<b>3 mg/l 2,4-D</b>	<b>2 mg/l 2,4-D</b>
% 0.7 agar	% 0.7 agar	% 0.7 agar
pH= 5.8	pH= 5.8	pH= 5.8

### 3.5.2. Kùltùrlerin Devamlılığı

Kùltùrlerin bu aşamasında, kalluslar, 3.1.4.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan MS besi ortamlarına aktarıldı. Gelişen kalluslar, 5-6 hafta aralıklarla içinde 20-25 ml taze besiyerleri bulunan her bir magenda GA-7 kùltùr kabına, 4-5 parça olacak şekilde aktarılarak alt kùltùre alındı.

### 3.5.3. Farklı MS Besi Ortamlarının Kallus Gelişimi Ùzerine Etkisi

Bu aşamada, besi ortamı içeriği birbirinden farklı olan üç kùltùr ortamı hazırlandı. Her üç ortamda da sùkroz (% 3), agar (% 0.7) ve bitki bùyùme hormonları (1 mg/l BAP – 2 mg/l NAA)'nın miktarları aynı tutuldu.

Daha önceden elde edilen kalluslar, farklı besin içeriklerine sahip,  $\frac{1}{2}$  MS,  $\frac{3}{4}$  MS ve MS besi ortamlarına aktarılarak kùltùrlerin 5. haftasında kallusların gelişimlerine ait sonuçlar değerlendirildi.

### 3.5.4. Bitki Bùyùme Düzeyicilerinin Kallus Gelişimi Ùzerine Etkisi

Bu alışmada, MS kùltùr ortamına farklı kombinasyonlarda ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki bùyùme maddeleri eklenerek, bu maddelerin kallus gelişimi ùzerine etkisi araştırıldı. Güzlemler sonucunda kùltùrlerin 5. haftasında kallus gelişiminin ortamlar arasında farklılık gösterdiği tespit edilerek gözlem sonuçları kaydedildi.

### 3.5.5. Kallus Renginin Farklılaşmasında Ortamların Etkisi

Kùltùr ortamlarının farklılığı ve alt kùltùr sùreleri kallus özelliklerinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Bu özelliklerden bir tanesi de elde edilen

kallusların renklerinin farklı olmasıdır. Yaptığımız çalışmada MS besi ortamlarına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme maddeleri eklenerek ve alt kültür süreleri farklı tutularak bu ortamlarda gelişen kallusların renklerinde meydana gelen değişiklikler tespit edilip gözlem sonuçları kaydedildi.

### 3.6. Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması ve Devamlılığı

#### 3.6.1. Kültürlerinin Başlatılması

Kallus kültürü için tespit edilen en uygun ortam süspansiyon kültürü ortamı için de kullanıldı. Ancak kallus ortamından farklı olarak hazırlanan MS besin ortamının sıvı olması için agar ilavesi yapılmadı. Kültürlerin 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. Kültürlerin kontamine olmasını önlemek için erlenlerin ağzı iki kat steril alüminyum folyo ile en dış kısmı da parafilmle sarılarak kapatıldı. Süspansiyon ortamındaki hücrelerin dağılmasını ve birbirinden ayrılmasını sağlamak amacıyla hücre süspansiyon kültürü ortamları 100 rpm'e ayarlanan çalkalayıcıya bırakılarak büyüme odasında bekletildi. Süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında iki farklı ortam hazırlandı.

Bu ortamların içerikleri aşağıda gösterildiği gibidir;

MS	MS
% 3 süzkroz	% 3 süzkroz
<b>1 mg/l BA</b>	<b>1 mg/l BA</b>
<b>2 mg/l NAA</b>	<b>0.5 mg/l NAA</b>

### 3.6.2. Kültürlerinin Devamlılığı

Hücre kültürleri belirli bir biyomasa ulaştıktan sonra 1 mg/l BAP + 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP + 0.4 mg/l 2,4-D hormonlarının farklı kombinasyonlarını içeren sıvı MS besi ortamları hazırlandı. Daha sonra kültürler içerisinde 50 ml sıvı ortam bulunan 250 ml'lik erlenlere aktararak, 14 günlük aralıklarla alt kültürleri yapıldı.

Hücrelerin birbirlerinden ayrılmasını sağlamak için süspansiyon kültürü ortamları, por çapları sırasıyla 500 µm, 250 µm ve 100 µm olan eleklerden geçirildi.

### 3.6.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Süspansiyon Kültürlerinin Büyümesi Üzerine Etkisi

Farklı kombinasyonlarda oksin ve sitokinin hormonlarını içeren iki farklı sıvı MS ortamı hazırlandı. Bu ortamlara, hücre süspansiyonlarını içeren sıvı kültürlerden eşit miktarda bırakıldı. Kültürlerin büyümesindeki değişikliklerin tespit edilebilmesi için 20 gün boyunca hücrelerin yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve paketlenmiş hücre hacmi hesaplanarak ortamların büyümesine ilişkin veriler değerlendirilerek tablo halinde sunuldu.



#### 3.6.4. Ortamların Farklı Sükroz İçeriğinin Kùltürlerin Gelişimi Üzerine Etkisi

Süspansiyon kùltürlerinde gelişen hücrelerin kùltüre alınması için, farklı miktarlarda (%30, %32, %35 ve %40) sükroz eklenerek hazırlanan MS besi ortamları hazırlandı. Ortam şartları yukarıda belirtildiği şekilde ayarlandı ancak ortamın sıvı olabilmesi için agar ilavesi yapılmadı. Kùltürlerin yapılmasından 5 haftalık süre sonrasında hücrelerin gelişimine ait gözlemler yapılarak sonuçlar kaydedildi.

#### 3.6.5. Süspansiyon Kùltürlerindeki Hücrelerden Bitki Rejenerasyonu

Süspansiyon kùltürlerindeki hücrelerin bulunduğu sıvı ortamdan, mikropipetle 10 µl alınıp kallus oluşturma ortamında kullanılan hormon konsantrasyonları (1 mg/l BAP – 2 mg/l NAA), 30 gr/l sükroz ve 7 gr/l agar eklenerek hazırlanan katı MS besi ortamlarının bulunduğu kùltür kaplarına aktarıldı. Çalışmada toplam beş kap kullanıldı ve her bir kaba yaklaşık 15-20 ml besi ortamı bırakıldı. Sıvı kùltürden alınan örnekler, her bir kabın iki bölgesine spot edilerek kùltürler büyüme odasında inkübe edildi. Kallus oluşturulduktan sonra materyaller, bitki rejenerasyonu için kullanılan 1 mg/l BAP, 30 gr/l sükroz ve 7 gr/l agar eklenerek hazırlanan katı MS besi ortamlarına aktarıldı ve 5-6 hafta aralıklarla alt kùltürlere alındı.

#### 3.1.4.6. Süspansiyon Kùltürlerinin Büyüme Parametreleri

##### ***Taze Ağırlık Tayini***

Süspansiyon kùltürü hücrelerinin bulunduğu sıvı ortamdan 10 ml alınarak, 22 µm por çapındaki Millipor filtrelerden süzöldü 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;

$$\text{Yaş Ağırlık (g/l)} = \frac{\text{Yaş Hücre Ağırlığı (g)}}{\text{Örnek Hacmi (ml)}} \times 1000$$

### ***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 300 xg hızda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki peletin hacmi PHH olarak hesaplandı.

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

### 3.7. Total Hiperisin Tayini

#### 3.7.1. Kullanılan Kimyasallar ve Aletler

##### 3.7.1.1. 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 sükröz ve ortamın katılaştırılmasında kullanılan agar Merck'den alındı. Hiperisinin özütlenmesi ve UV analizinde kullanılan metanol ve kloroform Sigma-Aldrich'den satın alındı.

Bitki büyüme maddesi olarak kullanılan 2,4-D (2,4- diklorofenoksi asetik asit), BA (6-benzilaminopürin), Kinetin, GA<sub>3</sub>, NAA (Naftalen asetik asit) ve total hiperisin analizinde standart olarak kullanılan Hiperisin Sigma-Aldrich'den satın alındı.

##### 3.7.1.2. Kullanılan Aletler

Total hiperisinin özütlenmesinde sonikatör (Sanyo MSE-Soniprep 150, U.K.), 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) kullanıldı.

#### 3.7.2. *H. triquetrifolium*'dan Hiperisin Bileşiklerinin Özütlenmesi

*H. triquetrifolium*'un kök, gövde, yaprak ve çiçek 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 100 mg alınıp üzerine 10 ml kloroform eklendi. Oluşan çözeltideki klorofil molekülerini uzaklaştırmak için 5 dakika süre ile sonikatörde

özütlendi. Özütleme işleminden sonra çözelti, sonikatörden alınıp süzüldü Bu işlem üç kez tekrarlandı.

Kloroform kısmı atıldıktan sonra geriye kalan kuru materyal üzerine 10 ml metanol eklenip çözelti 5 dakika süre ile sonikatörde yeniden 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 589 nm'de, UV spektrofotometresinde, absorbansı ölçüldü.

### 3.7.3. Kallus Kültürlerinden Hiperisin Bileşiklerinin Ekstraksiyonu

Kallus dokuları besiyerlerinden alındıktan sonra pens ve bisturilerle istenmeyen kısımları kesildi. Kallusların üzerindeki agarın uzaklaştırılması için de örnekler öncelikle musluk suyunda yıkandı daha sonra oda sıcaklığında, kurutma kağıtları üzerinde kurutuldu. Kurutulan örnekler bir öğütme makinesinde toz haline getirildi ve örnekten 100 mg alınarak yukarıda anlatıldığı gibi hiperisin özütlenerek, 589 nm de UV spektrofotometresinde absorbans ölçümü yapılarak sonuçlar kaydedildi.

### 3.7.4. Süspansiyon Kültürlerinden Hiperisin Bileşiklerinin Özütlenmesi

Süspansiyon kültürü ortamındaki hücreleri sıvı ortamdan ayırmak için kültürler, vakum altında Whatman No.1 filtre kağıtlarından süzüldü. Hücrelerin yaş ağırlıkları kaydedildi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan örnekler porselen bir

havanda dövülerek toz haline getirildi ve örnekten 100 mg alınarak yukarıda anlatıldığı şekilde özütlendikten sonra 589 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde absorbans ölçümü yapılarak hiperisin miktarlarına ait sonuçlar kaydedildi.

### 3.8. ŞEKİLLER



Şekil 3.1.2.1. Doğal ortamda yetişen *H. triquetrifolium* 'un genel görünüşü.



Şekil 3.1.2.2. *H. triquetrifolium* 'un iek ve yapraklarının genel görünüşü.

### 3.9. KAYNAKLAR

1. Davis, P. H. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, **1988**.
2. Murashige, T.; Skoog, F. *A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures*, *Physiol. Plant*, **1962**, 15, 473-497.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Doğal Ortamdaki *H. triquetrifolium* 'un Farklı Organlarının Total Hiperisin İçeriklerinin Belirlenmesi

Kallus kültürünün başlatılmasında kullanılacak en uygun eksplantın belirlenmesi amacıyla; *H. triquetrifolium* 'un farklı organlarının total hiperisin içerikleri araştırılmıştır. Doğal ortamdan toplanan bitkilerin yaprak, çiçek, gövde ve kök kısımları ayrı ayrı olarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bitkiye ait her bir organın total hiperisin içeriği UV-spektrofotometresi ile belirlenmiştir. *H. triquetrifolium* 'un farklı organlarının total hiperisin içeriklerine ait veriler Çizelge 4.1.1.' de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.1.** Doğal ortamda yetişen *H. triquetrifolium* 'un yaprak, çiçek, gövde ve kök kısımlarının total hiperisin içeriği

Bitki kısmı	Total Hiperisin içeriği (mg/g)
Yaprak	1.95 ± 0.0027 a
Çiçek	1.59 ± 0.0048 b
Gövde	0.14 ± 0.0022 c
Kök	0.08 ± 0.0015 d

Veriler üç tekrarın ortalamasıdır, Çizelgede her bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların DUNCAN testine göre  $P \leq 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. ± standart sapma.

Çalışılan bitki organları arasında total hiperisin içeriği bakımından istatistiksel olarak farklılıklar gözlenmiştir. Çizelge 4.4.1.' den de görülebileceği



gibi; en yüksek total hiperisin içeriği bitkinin yaprak kısmından elde edilirken ( $1.95 \pm 0.0027$  mg/g) en düşük hiperisin içeriği köklerden elde edilmiştir ( $0.08 \pm 0.0015$  mg/g). Bitkinin çiçek kısmının  $1.59 \pm 0.048$  mg/g, gövde kısmının  $0.14 \pm 0.0022$  mg/g oranında total hiperisin içerdiği saptanmıştır.

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<sup>1</sup>. Sonuçlar karşılaştırıldığında Alali ve arkadaşları'nın yaprak ve çiçek kısmından elde ettikleri hiperisin miktarları bu çalışmada elde edilen sonuçlardan yüksek olmasına rağmen, en yüksek hiperisin içeriğinin yaprak eksplantlarında bulunması çalışmamızdaki bulgularla paralellik göstermektedir.

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., and *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, *H. triquetrifolium*'un yapraklarında 2.07 mg/g, çiçek kısımlarında 0.822 mg/g ve gövdede 0.046 mg/g hiperisin saptamışlar<sup>2</sup>.

Kazlauskas ve ark (2004), *H. perforatum* L.'nin yaprak ve çiçek kısımlarının total hiperisin içeriğinin farklı olduğunu ve hiperisin bileşiklerinin bitkinin yaprak kısmında daha fazla biriktiğini tespit etmişlerdir. Bitki organlarının farklı miktarda hiperisin içermesinin bu kısımlar üzerinde bulunan koyu beneklerin miktarına bağlı

olduğunu bu bölgelerde hiperisin bileşiklerinin depolandığını gözlemişler<sup>3</sup>. Benzer bir çalışmayı Radusiene (2004)<sup>4</sup>de yapmış ve çalışmada elde ettiği sonuçlar Kazlauskas ve ark.'nın çalışmalarındaki sonuçları desteklemiştir.

Kitanov (2001), *Hypericum* cinsine ait 36 türün total hiperisin içeriğini değerlendirmiş ve bunlardan 27'sinde hiperisin bileşiklerinin bulunduğunu, hiperisin içeren türlerde total hiperisin içeriğinin % 0.009 - % 0.512 aralığında olduğunu saptamıştır. Bu türlerden *H. triquetrifolium* Turra'nın çiçek kısmının % 0.090 *H. perforatum* L.'nin çiçek kısmının ise % 0.125 oranında total hiperisin içerdiğini saptamışlar<sup>5</sup>. Daha önceki çalışmalardan ve bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar gözönüne alınarak, kallus başlatılması için en uygun eksplantın yaprak olduğu kanısına varılmıştır.

#### 4.2. *H. triquetrifolium* 'un Olgun Tohumlarının Çimlendirilmesi

Bitkinin tohumları bitki büyüme hormonu içermeyen (kontrol) MS kültür ortamlarında çimlendirildi (Şekil 4.1 A).

*H. triquetrifolium* 'un olgun tohumlarının çimlenmelerine ait veriler Çizelge 4.2.1.'de gösterildiği şekildedir. Kültürün 3. gününde tüm ortamlardaki tohumların çimlenmeye başladığı görüldü. Kültürün 4. haftasında farklı ortamlara ekilen tohumların çimlenme oranları saptandı. En yüksek çimlenme oranının kontrol grubunda olduğu saptandı (% 66.2). 0.5 mg/l, 1.0 mg/l, 2.0 mg/l, 4.0 mg/l ve hormon içermeyen (kontrol grubu) MS besi ortamlarında kültüre alınan tohumların çimlenme oranlarına ait veriler çizelge 4.2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.1.**Farklı BA ortamlarında kültüre alınan tohumların çimlenme oranı (%)

<b>Ortamın BA içeriği (mg/l BA)</b>	<b>Tohumların Çimlenme oranı (%)</b>
Kontrol (hormonsuz)	66.2 ±5.101 a
0.5	19.7 ± 2.241 b
1.0	35.4 ±4.722 c
2.0	29.1 ±2.526 d
4.0	34.9 ±1.496 c

Çizelgede her bir sütunda, farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların DUNCAN testine göre  $P \leq 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Veriler üç tekrarın ortalamasıdır,  $\pm$  standart sapma.

### **4.3. Proliferasyon Aşaması**

Çimlenme oranının yüksek olduğu hormonsuz ortamdaki bitkilerde sürgün gelişiminin yavaş olduğu gözlemlendi. Sürgün gelişimini hızlandırmak ve sürgün sayısını arttırmak için; çimlenme ortamındaki sürgünler, 1, 2 ve 4 mg/l konsantrasyonlarda BA içeren MS kültür ortamlarına aktarıldı. Kültürün 10. gününden itibaren adventif sürgün gelişimi gözle görülebilir hale geldi. 1 mg/l BA içeren ortam, sürgün sayısının en fazla olduğu ortam olarak tespit edildi (Şekil 4.1 A,F). Önceki bir çalışmada 1 mg/l BA içeren MS besi ortamında yetiştirilen bitkilerin yüksek oranda hiperisin içerdiği saptanmıştır<sup>6</sup>.

Bu nedenle kallus başlatılmasında kullanılacak materyaller 1 mg/l BA içeren MS besi ortamında yetiştirilen bitkilerden alındı. Farklı konsantrasyonlarda BA içeren MS ortamlarında yetiştirilen bitkilerin sürgün oluşum oranı Çizelge 4.3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.1.** Farklı BA ortamlarında yetiştirilen bitkilerin sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu

Ortamın BA içeriği (mg/l BA)	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)
1.0	83.5 ± 7.9 a	4.74 ± 1.10 a
2.0	57.3 ± 6.8 b	3.42 ± 0.92 b
4.0	44.7 ± 5.2 c	1.87 ± 0.67 c

Çizelgede her bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların DUNCAN testine göre  $P \leq 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Veriler üç tekrarın ortalamasıdır,  $\pm$  standart sapma.

Çizelge 4.3.1.'deki sonuçlar, 1 mg/l BA içeren MS besi ortamında sürgün oluşumunun en fazla olduğunu (% 83.5 ± 7.9) ancak BA oranı arttığında sürgün oluşum miktarının düştüğünü göstermektedir.

Shilpashree ve Ravishankar (2009), *H. mysorensis*'nin nodal kısımlarını farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu MS ortamına aktararak sürgün oluşumunu sağlamışlar<sup>7</sup>. Çalışmada 1 mg/l BA'nın tek başına bulunduğu ortamın en iyi sonuç verdiğini saptamışlar. Ana Paula ve ark (2007), *H. polyanthemum*'da<sup>8</sup>, Moura (1998), *H. foliosum*'da<sup>9</sup> ve Cellarova (1992), *H. perforatum*'da<sup>10</sup> benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Farklı *Hypericum* türlerinin sürgün oluşumu ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda da elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermesi sürgün oluşumu ile ilgili kullanılan yöntemin uygun olduğunu göstermektedir.

#### 4.4. Kallus Kùltürlerinin Başlatılması ve Devamlılığı

##### 4.4.1. Kùltürlerin Başlatılması

Çalışmanın bu aşamasında kallus oluşumunun en iyi olduğu kùltür ortamının bulunması için bir seri deney yapıldı. Yapılan çalışmada ana materyal olarak 1 mg/l BA içeren MS besi ortamında yetiştirilen bitkilerin yaprakları kullanıldı. Yapraklar 2-4 parça olacak şekilde bölünüp 20-25 ml'lik kùltür ortamlarına aktarıldı. Daha sonra kallusların birkaç alt kùltürü yapılarak kalluslar sürgün oluşturma ortamına (1 mg/l BA) aktarılıp sürgün rejenerasyonu sağlandı (Şekil 4.4.1.1. A-F).

##### 4.4.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kallus Gelişimi Üzerine Etkisi

Kallus yapısının yumuşak ve sıvı ortamda kolayca dağılabilen özelliklerde olması için yaprak eksplantları, Bölüm 3.1.4.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kùltür ortamlarına aktarıldı. Bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus gelişimi üzerine etkisiyle ilgili veriler Tablo 4.4.2.1.'de gösterilmiştir. Çalışılan hormon kombinasyonları içinde kallus, 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren MS besi ortamında kùltüre alınan yaprak parçalarından yaklaşık bir hafta sonra gelişmeye başladı.

**Çizelge 4.4.2.1.** Farklı konsantrasyonlarda BBD içeren kültür ortamlarındaki yaprak eksplantlarından kallus oluşum oranları.

<b>Ortam içeriği (mg/l)</b>	<b>Kallus oluşturan eksplant oranı (%)</b>	<b>Kallus görünümü*</b>
BA (1 mg/l) + NAA (2 mg/l)	92.3 ±4.63 a	Y, G
BA (1 mg/l) + NAA (0.5 mg/l)	81.7 ±6.21 b	Y, C
BA (1 mg/l) + 2,4-D (0.4 mg/l)	56.2 ±3.42 c	B,C
BA (0.06 mg/l) + 2,4-D (0.1 mg/l)	43.8 ±4.39 d	B, G
Kinetin (0.9 mg/l) + 2,4-D (3 mg/l)	27.5 ±2.91 e	K, C
Kinetin (0.4 mg/l) + 2,4-D (2 mg/l)	14.4 ±1.73 f	K, C

\*Y=Yeşil, B=Beyaz, S=Sarı, K=Kahverengi, C=Sert, G= Granüler

Çizelgede her bir sütunda, farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların DUNCAN testine göre  $P \leq 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Veriler üç tekrarın ortalamasıdır,  $\pm$  standart sapma.

Çizelge 4.4.2.1. 'deki sonuçlara bakıldığında test edilen besi ortamları arasında istatistiksel farklılıkların olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre BA ve NAA bileşimlerinin bulunduğu ortamlarda kallus oluşumunun oldukça yüksek olduğu ancak BA ve 2,4-D bileşimlerinin bulunduğu ortamlardaki kallus oluşumunun daha düşük olduğu görülmektedir. Kinetin ve 2,4-D içeren ortamlarda hem kallus oluşumu hem de kallusların görünümünde istenmeyen özellikler ortaya çıkmıştır. Tablo 4.4.2.1.'deki veriler değerlendirildiğinde, kallus oluşum oranı ve kallus özellikleri bakımından en uygun ortamın 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA (% 92.3) içeren MS besi ortamı olduğu saptandı (şekil 4.4.2.1-A). Kallus oluşum oranı, 1mg/l BA + 0.5 mg/l NAA (% 81.7) içeren ortam (şekil 4.4.2.1-B) ile 1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda (şekil 4.4.2.1-C) da yüksek olmasına rağmen diğer ortamlarda bu oran düşüktü ve özellikle de Kinetin ve 2,4-D kombinasyonlarının bulunduğu ortamlarda bu oranın büyük ölçüde düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.4.2.1-D).

Kallusların görünümü karşılaştırıldığında sadece 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA (Y,G) ve 0.06 mg/l BA + 0.1 mg/l 2,4-D (B,G) içeren ortamlarda (Şekil 4.4.2.1-E) kolayca dağılabilen (gevrek) özelliklerde olduğu diğer ortamlarda ise sert yani gevrek ve dağılma özelliği göstermeyen yapıda olduğu gözlemlendi.

Çalışmada elde edilen diğer bir sonuç da besi ortamındaki oksin ve sitokinin oranının kallus oluşumuna etkisinin araştırılmasıydı. Ortamda oksin miktarının sitokinin miktarına göre fazla olması durumunda kolayca dağılabilen kallus yapısının oluştuğu, sitokinin miktarının oksin miktarından fazla olduğu durumlarda ise; kalluslar üzerinde organojenik yapıların ve sürgün oluşumunun gerçekleştiği gözlemlendi. BA konsantrasyonlarının çok yüksek, NAA'nın ise çok düşük konsantrasyonlarındaki kombinasyonlarında (2 mg/l BA + 0.2 mg/l NAA) sürgün oluşumunun daha yoğun olduğu saptandı. Kültürün 3.haftasında gelişimin normal olduğu ancak yapının kompakt (sert) halde ve yeşil renkte olduğu gözlemlendi. 5. haftadan sonraki periyotlarda kalluslaşmış yapılarda renk kahverengine dönmüş ve materyallerde nekrozun başladığı tespit edildi (Şekil 4.4.2.1-F).

Yaprak eksplantlarından kallus oluşumu üzerine farklı oksin ve sitokinin oranlarının etkisi konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin, Kai ve ark. (2008), yaprak eksplantlarını, 0.2 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA içeren besi ortamında kültüre almışlar ve % 97.8 oranında kallus oluşumunun sağlandığını ve elde edilen kallusların dağılabilen (gevrek) yapıda olduğunu saptamışlar<sup>11</sup>. Benzer bir çalışma Pretto ve Santarem (2000) tarafından yapılmış ve çalışmalarında *H. perforatum* L.'nin yaprak eksplantlarını 0.46 µM kinetin + 4.5 µM 2,4-D bulunan MS ortamında kültüre almış ve % 11.1 oranında kallus oluştuğunu ve bu oranın oldukça düşük olduğunu saptamışlardır<sup>12</sup>. Chen ve ark. (1995), farklı konsantrasyonlarda oksin ve

sitokinin hormonlarını içeren MS ortamına *Avena sativa*'nın yaprak eksplantlarını aktararak bu eksplantlardan kallus oluşumunu sağlamışlar<sup>13</sup>.

Bu çalışmalardan elde edilen veriler önceki çalışmalardan elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. Aynı çalışmada, yüksek BA oranlarının bulunduğu ortamlarda oluşturulan kalluslardan sürgün gelişim oranı (% 78.9), yüksek NAA bulunan ortamdakinden (% 4.4) daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, yüksek BA oranlarında gelişen kalluslardan oluşan sürgün miktarının fazla olması çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

Çalışmada, kinetin ve 2,4-D kombinasyonlarını içeren MS besi ortamları, NAA ve BA kombinasyonlarını içeren ortamlara göre kallus oluşumunda daha az etkili olduğunu tespit edildi.

#### 4.4.3. Farklı MS Besi Ortamlarının Kallus Gelişimi Üzerine Etkisi

Kallus kültürlerinin gelişimi üzerine en etkili hormon konsantrasyonları ve kombinasyonları tespit edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda besin elementleri içeren MS ortamları hazırlanarak bu ortamların kallus gelişimine etkisinin araştırmasına yönelik bir çalışma yapıldı.

Çalışmada,  $\frac{1}{2}$  MS,  $\frac{3}{4}$  MS ve MS ortamlarında geliştirilen kallusların büyüme hızlarının ve kültürlerin devamlılığında farklılıkların olduğu gözlemlendi. MS ortamında kallus gelişimi 3. haftadan itibaren hızlı bir şekilde artış gösterirken, kültürün 6. haftasında az miktarda nekroz oluşumu ile birlikte kallus renginin yeşil ve kallus yapısının ise dağılabilen özellikte (yumuşak) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4.3.1-A).

$\frac{1}{2}$  MS (Şekil 4.4.3.1-B) ortamında ise 6. haftaya kadar bir gelişme gözlenmezken kallus yapılarında yoğun bir şekilde nekroz oluşumu meydana geldi.



Her iki kültür ortamında da sükröz miktarı (% 3), agar miktarı (% 7), pH (5.8) ve hormon konsantrasyonları (1 mg/l BA + 2 mg/l NAA) aynı olmasına rağmen kallus gelişiminde meydana gelen bu değişiklikler büyüme için gerekli besin elementlerinin miktarının yeterli düzeyde olup olmamasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde kallus gelişimi için en uygun ortam MS besi ortamı olduğundan, çalışmamızın sonraki aşamalarında da bu ortam kullanıldı (Şekil 4.4.3.1-A).

*Hypericum* bitkilerinin farklı kısımlarından kallus oluşturmak için tam güçlendirilmiş MS besi ortamının kullanıldığı çalışmalar arasında; Vardapetyan ve ark. (2006), *H. perforatum* L.'nin yaprak eksplantlarından<sup>14</sup> ve Oluk ve ark (2009), *H. triquetrifolium*'un kotiledonlarından kallus oluşturmak için tam güçlendirilmiş MS besi ortamını kullanmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir<sup>15</sup>.

#### 4.4.4. Kallus Renginin Farklılaşmasında Ortamların Etkisi

Kültürlerin büyüme aşamasında, kallusların büyüme özelliklerinin yanında kallus yapılarının morfolojik yapılarında meydana gelen değişiklikler de göze çarpmıştır. Bu özelliklerden bir tanesi kallusların renklerinin farklılıklar göstermesiydi. Sağlıklı görünüme sahip olan kalluslarda yeşil, sarı ve kırmızı olmak üzere üç farklı renk oluşumu gözlemlendi. Kültürlerin ilk alt kültür aşamalarında (4. Alt kültüre kadar) gelişen kalluslar yeşil ve sarı renkli iken 4.alt kültürden sonraki aşamalarda ise kalluslar üzerinde kırmızı rengin belirginleştiği gözlemlendi (Şekil 4.4.4.1-A-C). 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren MS ortamında gelişen kalluslarda kırmızı renk oluşumu belirgin iken 1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D içeren ortamda daha az kırmızı renk oluşumu gözlemlendi.

Kültürlerin 6. haftasına kadar renk oluşumunun daha da belirginleştiği ancak 6. haftadan itibaren ortamdaki besin maddelerinin azalması ve kallus dokularının yeterli miktarda besin maddelerini alamamasından dolayı materyallerin bozulduğu (nekroz oluşumu) ve kırmızı renk görünümünün de kaybolduğu tespit edildi.

Kallus dokularında meydana gelen renk değişimi, kallusların özelliklerinin belirlenmesinde ve bu yapıların ortam şartlarına karşı verdikleri bir yanıt olarak düşünülmektedir. Oinam ve Kothari (1995), *Oryza sativa* L. bitkisini, 2.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alarak elde ettikleri kallusların üzerinde kırmızı renk oluşumu ile birlikte embriyojenik yapıların oluştuğunu bundan dolayı renk oluşumunun kallusların embriyojenik potansiyeli ile bağlantılı olabileceğini belirtmişlerdir<sup>16</sup>.

Remotti ve Löfler (1995), yaptıkları çalışmada kallus renginin ortam bileşenleri gibi çeşitli kültür şartlarına ve özellikle de pigment üretimi ile ilgili olduğunu belirtmişler<sup>17</sup>. Smith ve ark (1995), *Ajuga* bitkisinin kültürlerinde benzer bir sonuç elde etmişler ve renk oluşumunun hücrelerdeki pigment birikimine bağlı olarak meydana geldiğini bildirmişlerdir<sup>18</sup>. Çalışmamızda, 4. haftadan itibaren kallusların üzerinde organojenik yapılarla birlikte renk oluşumunun gözlenmesi önceki çalışmalardaki sonuçlarla desteklenmektedir.

#### 4.5. Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması ve Devamlılığı

Hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında ana materyal olarak kallus kullanıldı. Kallus yapısının özellikleri süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında avantaj sağlamaktadır. Bu amaçla süspansiyon kültürü çalışmamızda kullandığımız kalluslar 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gelişen kalluslardan

seçildi. Bu ortamda geliştirilen hücreler Şekil 4.7.1.E’de görülmektedir. Şekil 4.7.1.E’de de görüldüğü gibi oldukça sağlıklı ve iyi gelişme gösteren hücrelerin elde edildiği bu ortamın süspansiyon kültürlerinin devamlılığı için de uygun olduğunu göstermektedir ve bundan dolayı süspansiyon kültürleri ile ilgili sonraki çalışmalarımızda da bu ortamın kullanılmasına karar verildi.

#### 4.5.1. Sükroz Miktarının Süspansiyon Kültürü Gelişimi Üzerine Etkisi

Süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında kullanılan 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren MS besin ortamına farklı konsantrasyonlarda sükroz eklenerek kültür gelişiminde meydana gelen değişiklikler incelendi. Bunun için % 2, % 3, % 4, % 6 ve % 8 oranında sükroz içeren ortamlar hazırlandı. Sükroz miktarının süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine etkisi ile ilgili veriler Çizelge 4.5.1.1’de gösterildiği şekildedir.

**Çizelge 4.5.1.1** Sükroz miktarının süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerine etkisi

MS ortamının sükroz içeriği (%)	Kültür biyokütlesi (Kuru ağırlık g/l)
% 2 sükroz	1.6 ±0.14 a
% 3 sükroz	2.3 ±0.17 b
% 4 sükroz	2.0 ±0.12 c
% 6 sükroz	1.4 ±0.13 d
% 8 sükroz	1.1 ±0.08 e

Çizelgede her bir sütunda, farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların DUNCAN testine göre  $P \leq 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Veriler üç tekrarın ortalamasıdır,  $\pm$  standart sapma.

Çizelge 4.5.1.1’deki verilere bakıldığında % 3 sükroz içeren MS besi ortamında kültür gelişiminin en yüksek olduğu (1.6 g/l) gözlenirken % 8 sükroz

içeren MS ortamında kültür gelişiminin en düşük (1.1 g/l) olduğu tespit edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışmanın bundan sonraki aşamalarında süspansiyon kültürlerinin en iyi geliştiği ortam olan % 3 süzkroz içeren MS besi ortamının kullanılmasına karar verildi.

Zenk ve ark. (1974), *Catharanthus roseus* bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerinde, besi ortamına % 3'ün üzerindeki konsantrasyonlarda süzkroz eklediklerinde kültür ortamındaki alkoloid miktarının arttığını bildirmişler<sup>19</sup>. Davies (1972) ve ark., *rosa sp.*'nin süspansiyon kültürlerinde yüksek süzkroz miktarlarının kültür ortamındaki polifenol birikimini arttırdığını saptamışlar<sup>20</sup>.

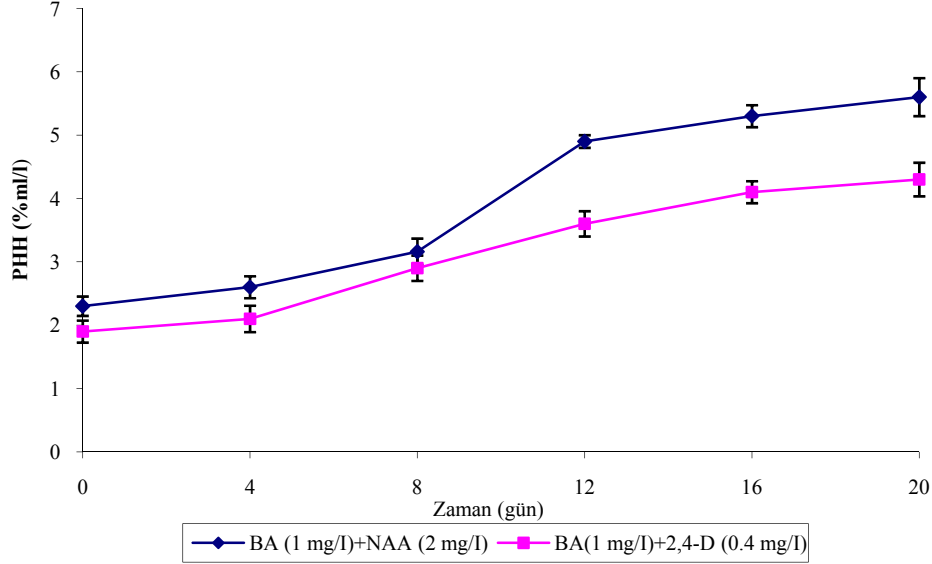
Cui ve ark. (2010), *H. perforatum* L.'nin hücre süspansiyon kültürlerindeki yüksek süzkroz içeriğinin hücrelerde osmotik stres meydana getirdiğini ve bu durumun kültür biyokütlesinin düşüşüne sebep olduğunu bildirmişlerdir<sup>21</sup>. Benzer bir sonuç da Do ve Cormier (1990)'inde çalışmalarında belirtilmiş ve çalışmada besi ortamının yüksek süzkroz içeriği osmotik stres meydana getirdiği için hücrelerin büyüme ve metabolizmaları üzerinde negatif bir etkiye sebep olduğu bildirilmiştir<sup>22</sup>.

Hem stres koşullarının oluşması hemde ortamdaki sekonder metabolit birikimi yüksek süzkroz konsantrasyonlarının büyümeyi etkilediği yukarıda bahsedilen çalışmalarda da bildirilmiştir.

#### 4.5.2. Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Parametreleri

Bu aşamada, 4'er günlük aralıklarla 20 gün boyunca kültürlerin büyüme parametrelerinde meydana gelen değişiklikler gözlemlendi. Çalışmada 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA+ 0.4 mg/l 2,4-D hormon karışımlarının içeren iki farklı

ortam kullanıldı. Bu ortamlardaki hücrelerin büyüme parametrelerine ait PHH (paketlenmiş hücre hacmi), yaş ağırlık ve kuru ağırlık değerleri grafikte gösterildi.



**Çizelge 4.5.2.1.** Süspansiyon kültürü ortamındaki hücrelerin PHH değerlerindeki değişimler

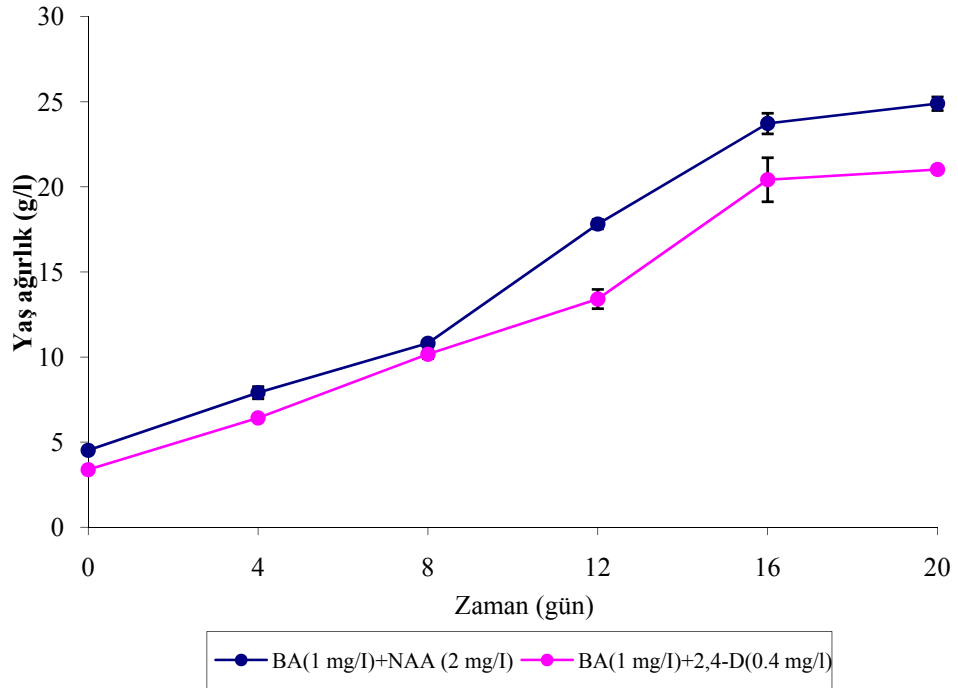
1 mg/l BA + 2 mg/l NAA ve 1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D içeren MS besi ortamlarındaki hücrelerin PHH oranlarına ait sonuçlar Çizelge 4.5.2.1.'de gösterilmiştir. 1 mg/l BA+ 2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gelişen hücrelerin PHH (paketlenmiş hücre hacmi)'leri, kültürün 8.gününde ilk güne oranla 1.185 kat artış gösterdi. Ancak en büyük artış kültürün 8-12 günleri arasında (1.531) meydana geldi. Kültürün 20. gününde PHH'leri 2.33 kat artış göstererek büyüme oranı en yüksek seviyeye ulaştı.

1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında gelişen hücrelerin PHH değerleri, kültürün 4. gününde ilk güne oranla 1.105 kat artış gösterdi. Ancak en büyük artış oranı 4-8 günleri arasında (1.380) meydana geldi. Kültürün 20.

gününde hücreler ilk güne oranla yaklaşık 2.26 kat artış göstererek en yüksek seviyeye ulaştı.

Her iki ortam karşılaştırıldığında, kültürlerin 0-20 günleri arasında düzenli bir artış görülürken 20. günün sonunda 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren MS besin ortamındaki PHH oranının, 1 mg/l BA+ 0.4 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamındaki hücrelerin PHH oranından daha yüksek olduğu belirlendi.

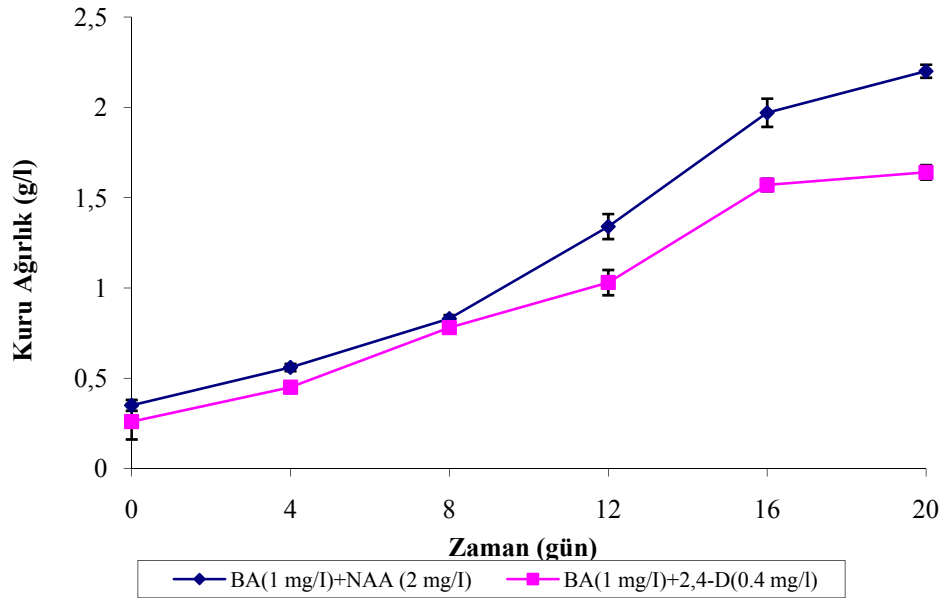
Süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin büyüme parametrelerinde biri olan PHH ile birlikte hücrelerin yaş ağırlıkları ve kuru ağırlıkları da değerlendirildi. NAA ve 2,4-D içeren ortamlardaki yaş ağırlık ve kuru ağırlık oranlarındaki değişim PHH'deki değişime paralel bir sonuç gösterdi. Süspansiyon kültürü ortamlarında gelişen hücrelerin yaş ağırlıklarına ait veriler Çizelge 4.5.2.2.'de gösterilmiştir.



**Çizelge 4.5.2.2.** Süspansiyon kültürü ortamındaki hücrelerin yaş ağırlıklarındaki değişimler

NAA içeren ortamdaki hücrelerin yaş ağırlıkları kültürün 4.gününde ilk güne oranla büyük bir artış gösterdi bu sonuca en yakın değer 12. günde (1.64) ve en düşük artış 20. günde saptandı. Kültürün 20. gününde ilk güne oranla yaklaşık 5.5 kat artış gözlemlendi. 2,4-D içeren ortamda en büyük artış 4. günde (1.9) saptandı. Artış oranının fazla olduğu diğer günler kültürün 8. (1.58) ve 16. günleri (1.52) olduğu ve bu oranların da birbirine yakın olduğu tespit edildi. Deney sonuçlarına bakıldığında, 2,4-D ortamında gelişen hücrelerin yaş ağırlıklarındaki artışın NAA içeren ortamdakinden daha yüksek olduğu saptandı.

Çalışmada elde edilen diğer bir sonuçta, hücrelerin kuru ağırlıklarına ait verilerin değerlendirilmesiydi. Süspansiyon kültürü ortamlarında gelişen hücrelerin kuru ağırlıklarına ait veriler Çizelge 4.5.2.3. de gösterilmiştir.



**Çizelge 4.5.2.3.** Süspansiyon kültürü ortamındaki hücrelerin kuru ağırlıklarındaki değişimler

İki farklı bitki büyüme düzenleyicisi içeren ortamlardaki veriler 20 gün boyunca 4'er gün ara ile kaydedildi. NAA bulunan ortam ile 2,4-D içeren ortamlardaki hücrelerin kuru ağırlıklarına ait veriler Çizelge 4.5.2.3'de verilmiştir. NAA bulunan ortamdaki kültürlerin 4. ve 8. günlerinde hücrelerin kuru ağırlıklarındaki artışlar aynı oranda olmuş ve 1.73 kat artış göstermiştir. En düşük artış ise 20. günde (1.04) görülmüştür. Ancak ilk güne oranla 20. günün sonunda kuru ağırlıkta görülen artış yaklaşık 6.30 kat olduğu gözlenmiştir.

Veriler karşılaştırıldığında, hücrelerin PHH oranları 20. günün sonunda NAA içeren ortamda daha yüksek bulunmasına rağmen, yaş ve kuru ağırlıktaki artışın 2,4-D içeren ortamda daha fazla olduğu görülmüştür.

#### 4.6. Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürlerinden Total Hiperisin Ekstraksiyonu

##### 4.6.1. Kallus Kültürlerinden Total Hiperisin Ekstraksiyonu

*H. triquetrifolium*'un yaprak eksplantlarından, in vitro şartlarda elde edilen kallus ve hücre süspansiyon kültüründeki hücrelerin total hiperisin içeriklerine ait veriler Tablo 4.6.'da verilmiştir. Çalışmada 2,4-D ve NAA içeren ortamlarda oluşturulan 3 farklı kallus yapısına ait total hiperisin içeriği ve NAA içeren ortamda oluşturulan süspansiyon kültürü hücrelerinin total hiperisin içeriği spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hiperisin içerikleri ortamlar arasında farklılık göstermiştir. K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> ve K<sub>3</sub> ortamlarındaki hiperisin içerikleri sırasıyla  $0.0527 \pm 0.0043$ ,  $0.0512 \pm 0.0031$ ,  $0.0339 \pm 0.0028$  ve  $0.0021 \pm 0.0026$  mg/g olarak belirlenmiştir.



**Çizelge 4.6.1.1.** Farklı ortamlarda gelişen kallusların total hiperisin içerikleri

Kültür örnekleri*	Hiperisin içeriği (mg/g)
K <sub>1</sub>	0.0527 ± 0.0043 a
K <sub>2</sub>	0.0485 ± 0.0077 b
K <sub>3</sub>	0.0339 ± 0.0028 c

\*K<sub>1</sub> = BA (1 mg/l) + 2,4-D (0.4 mg/l), sarı renkli kallus      K<sub>2</sub> = BA (1 mg/l) + NAA (2 mg/l), yeşil renkli kallus  
K<sub>3</sub> = BA (1 mg/l) + NAA (2 mg/l), kırmızı renkli kallus

Çizelgede her bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların DUNCAN testine göre P≤0.05 düzeyinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Veriler üç tekrarın ortalamasıdır, ± standart sapma.

En yüksek hiperisin miktarı 1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D (0.0527 ± 0.0043 mg/g) içeren ortamda (K<sub>1</sub> ortamı) bulunmuştur. 1 mg/l BA + NAA içeren ortamdaki (K<sub>2</sub> ortamı) yeşil renkli kallusların hiperisin içeriğinin 2,4-D ortamındakine (K<sub>1</sub> ortamı) oranla biraz daha düşük olduğu gözlemlendi. NAA içeren ortamda gelişen ve kırmızı renk pigment oluşumu gözlenen kallus yapısının (K<sub>3</sub> ortamı) total hiperisin içeriği (0.0339 ± 0.0028 mg/g) ise kallus yapılarının arasındaki en düşük miktar olarak ölçüldü.

Oluk ve ark. (2009), *H. triquetrifolium*'un kotiledonlarını 0.5 mg/l IAA ve 2 mg/l BA içeren yarı-katı MS besisi ortamında kültüre almış ve kallus oluşturmuşlar. Kültürün ilerleyen günlerinde elde ettikleri ebriyojenik kallusların 0.052 mg/l total hiperisin bulunduğunu tespit etmişler<sup>15</sup>.

Gadzovska ve ark. (2007), *H. perforatum* L.'nin kallus kültürlerinde yeşil ve kırmızı renkli pigment oluşumu gözlenen kallusların metanolik ekstraktlarının 0.015-0.020 mg/l arasında hiperisin içerdiğini bildirmişler<sup>23</sup>.

Pasqua ve ark. (2003), aynı bitkinin kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinden elde ettikleri metanolik ekstraktlarında hiperisin içeriğini araştırmışlar. Araştırmacılar bu bitkinin kallus kültürlerinde 0.10-0.015 mg/l arasında hiperisin bulunduğunu bildirmişler<sup>24</sup>.

#### 4.6.2. Hücre Süspansiyon Kültürlerinden Total Hiperisin Ekstraksiyonu

*H. triquetrifolium*'un hücre süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin total hiperisin içeriklerine ait veriler Çizelge 4.6.2.1'de verilmiştir. Çalışmada 2,4-D ve NAA içeren iki farklı süspansiyon kültürü ortamındaki hücrelerin total hiperisin içeriği spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hiperisin içerikleri ortamlar arasında benzerlik göstermiştir.

**Çizelge 4.6.2.1** Hücre süspansiyon kültürlerinin total hiperisin içerikleri

Kültür örnekleri*	Hiperisin içeriği (mg/g)
S <sub>1</sub>	0.0018 ± 0.00026 a
S <sub>2</sub>	0.0016 ± 0.00021 a

\*S<sub>1</sub> = BA (1 mg/l) + 2,4-D (0.4 mg/l) S<sub>2</sub> =BA (1 mg/l) + NAA (2 mg/l)

Çizelgede her bir sütunda, farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların DUNCAN testine göre P≤0.05 düzeyinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Veriler üç tekrarın ortalamasıdır, ± standart sapma.

Çizelge 4.6.2.1.'deki sonuçlara bakarak farklı BBD konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren ortamlardaki (S<sub>1</sub> ve S<sub>2</sub> ortamları) total hiperisin miktarlarının yaklaşık değerlerde olduğu görülmektedir. S<sub>1</sub> kültür ortamında 0.0018 ± 0.00026 ve S<sub>2</sub> ortamındaki hücrelerin total hiperisin içeriğinin 0.0016 ± 0.0021 mg/g olduğu saptandı.

Kallus yapıları gibi süspansiyon kültürlerindeki hücreler de çok az farklılaşma gösterirler. Ancak biyokimyasal çalışmaların yapılmasında hücre süspansiyon kültürlerinin çalışılması daha çok tercih edilmektedir. Çünkü bu kültürler ortam şartlarındaki değişimlere daha çok ve daha hızlı yanıt vermektedirler. Süspansiyon kültürlerindeki hücreler sigmoidal bir eğri ile ifade edilebilen bir büyüme şekli gösterirler. Bu eğride lag (başlangıç) fazı, eksponensiyel (üssel, büyüme) fazı ve stasyonier (durağan) faz olmak üzere üç büyüme safhası fark edilmektedir. Bu büyüme fazları çeşitli aşamalarda meydana gelen metabolik değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Genellikle süspansiyon kültürü hücrelerinde sekonder metabolit birikiminin büyümenin yavaşladığı ve hücre farklılaşmasının başladığı aşamalarda meydana geldiği birçok literatürde bildirilmiştir. Ancak diğer bazı literatürlerde sekonder metabolit birikiminin aktif büyümenin olduğu dönemlerde (eksponensiyel), meydana geldiği bildirilmiştir.

Pasqua ve ark. (2003), aynı bitkinin kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinden elde ettikleri metanolik ekstraktlarında hiperisin içeriğini araştırmışlar. Araştırmacılar bu bitkinin süspansiyon kültürü hücrelerinde hiperisin bulunmadığını ancak kallus kültürlerinde 0.10-0.015 mg/l arasında hiperisin bulunduğunu bildirmişler<sup>24</sup>. Kartnig ve ark. (1996), *Hypericum maculatum*'un hücre süspansiyon kültürlerinin metanolik özütlerindeki hiperisin miktarını 0.047 mg/l olarak ölçmüşlerdir<sup>25</sup>. Yaptığımız çalışmada total hiperisin miktarının ölçümü, daha önceki çalışmalarda da bildirdiği gibi kültürün aktif büyüme gösterdiği dönemlerde yapılmıştır.

Bais ve ark. (2002), *H. perforatum* L.'nin hücre süspansiyon kültürlerinde hiperisin bileşiklerinin<sup>26</sup>, Sakamoto ve ark. (1994), *Aralia cordata*'nın hücre

süspansiyon kültürlerinde antosiyaninlerin<sup>27</sup> ve Hirose ve ark. (1990), *Phytolacca americana*'nın süspansiyon kültürü hücrelerinde betasiyaninlerin aktif büyüme döneminde en fazla miktarda biriktiğini bildirmişlerdir<sup>28</sup>. Bu bileşiklerin lag fazında üretildiğini gösteren bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, *Cassia torossa* kültürlerinde germikrizon bileşikleri<sup>29</sup> ve *Bixa orellana* kültürlerinde karotenoid birikiminin bu fazlarda meydana geldiği bildirilmiştir<sup>30</sup>.

#### 4.7. Süspansiyon Kültürlerindeki Hücrelerden Bitki Rejenerasyonu

Çalışmanın bu kısmı iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada sıvı ortamda gelişen hücreler, daha önce kallus oluşturmak için kullandığımız 1mg/l BA + 2 mg/l NAA, 30 gr/l sükröz ve 7 gr/l agar eklenerek hazırlanan katı MS besi ortamlarının bulunduğu kültür kaplarına aktararak kallus oluşturulması sağlandı (Şekil 4.7.1). Kültürün 7. haftasında süspansiyon kültüründe elde edilen hücrelerin bulunduğu spot bölgelerinde kallus dokularının meydana geldiği gözlemlendi. Daha sonra belirli bir büyüklüğe gelen kalluslar 4-5 hafta aralıklarla aynı ortamda alt kültüre alındı. İkinci alt kültürden sonra oldukça sağlıklı bir görünüme sahip olan kalluslarda büyük oranda pigmentleşmenin meydana geldiği ve pigment oluşumu ile birlikte embriyojenik yapılarında oluştuğu gözlemlendi.

İkinci aşamada, organojenik yapılar oluşturmuş olan kalluslar, proliferasyon ortamı için kullanılan 1 mg/l BA içeren MS besi ortamlarının bulunduğu kültür kaplarına aktarıldı. Kültürün 4. haftasında organojenik yapılardan sürgün oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.7.1-A-K). Daha sonra sürgünler, 1 mg/l BA + 0.2 mg/l GA<sub>3</sub> içeren besi ortamlarına aktararak sürgün uzamasının hızlandırılması sağlandı. Süspansiyon kültürü hücrelerinden bitki rejenerasyonu ile ilgili veriler Çizelge 4.7.1'de

gösterilmiştir. Tablodaki sonuçlarda da görüldüğü gibi kültürlerde meydana gelen kontaminasyonun oldukça düşük olduğu (% 10.4) gözlemlendi. Kültürün 6. haftasında 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren ortamda gelişmeye bırakılan kalluslar belirgin bir şekilde büyüme gösterdi ve kallus oluşumunda % 54.1'lik bir sonuç elde edildi. 1 BA içeren MS ortamına aktarılan kalluslardan gelişen sürgünlerin sağlıklı bir görünüme sahip olduğu ve sürgün oluşum oranının oldukça yüksek olduğu gözlemlendi (% 68.6). Sürgün oluşumu sağlandıktan sonra, sürgünler 1 mg/l BA içeren MS besi ortamına aktarıldı.

Çizelge 4.7.1. Süspansiyon kültürü hücrelerinden sürgün rejenerasyonu

Materyaller	Kültür oluşumu (%)
Kallus oluşumu	% 54.1 ± 3.2 a
Sürgün oluşumu	% 68.6 ± 5.7 b

Çizelgede her bir sütunda, farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer, bu ortalamaların DUNCAN testine göre  $P \leq 0.05$  düzeyinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir. Veriler üç tekrarın ortalamasıdır,  $\pm$  standart sapma.

Pasqua ve ark. (2003), 0.22 mg/l BA, 1 mg/l IBA, % 2 süzkroz ve % 1 agar içeren MS ortamına kallus yapılarını aktararak sürgün oluşumunu sağlamış ve sürgün uzamasını hızlandırmak için 0.5 mg/l BA ve 0.4 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS besi ortamını kullanmışlardır<sup>24</sup>.

Mendez (1994), *Zingiber officinale*'nin süspansiyon kültürü hücrelerinden bitki rejenerasyonunda % 40 ve sürgün gelişiminde de yaklaşık % 26 oranında bir başarı sağlamıştır<sup>31</sup>. Santarem ve Astarita (2003), *H. perforatum* L.'nin in vitro kültürleri ile ilgili yaptıkları çalışmada, 4.5  $\mu$ mol/l BA + 0.05  $\mu$ mol/l NAA içeren MS besi ortamında en fazla sürgün oluşturmayı başarmışlar (% 40.6)<sup>32</sup>.

Daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz değerlerin önceki çalışmalara göre daha başarılı olduğunu göstermektedir.

#### 4.8. KAYNAKLAR

1. Alali, F.; Tawahab, K.; Tamam, A.E. *Determination of hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra (Hypericaceae) growing wild in Jordan. Nat Prod Res, 2004, 18, 147–151*
2. Ayan, A.K.; Çırak, C. *Hypericin and Pseudohypericin Contents in Some *Hypericum* Species Growing in Turkey, pharmaceutical biology, 2008, 4, 288-291.*
3. Kazlauskas, S.; Bagdonaite, E. *Quantitative analysis of active substances in *St. John's wort* (*Hypericum perforatum* L.) by the high performance liquid chromatography method. Medicina (Kaunas), 2004, 40, 975 – 981.*
4. Radusiene, J.; Bagdonaite, E.; Kazlauskas, S. *Morphological and chemical evaluation on *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* in Lithuania. Acta Hort, 2004, 629, 55–62.*
5. Kitanov, G.M. *Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. Biochem. Syst. Ecol. 2001, 29, 171 – 178.*
6. Karakas, O.; Toker, Z.; Tilkat, E.; Ozen, H.C.; Onay, A. *Effects of different concentrations of benzylaminopurine on shoot regeneration and hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra. Nat. Prod. Res, 2008, 3, 1-7*
7. Shilpashree, H.P.; Ravishankar, R. *In vitro plant regeneration and accumulation of flavonoids in *Hypericum mysorensense*, international journal of integrative biology, 2009, 8, 43.*

8. Ana paula, M.B.; Natasha, M. *Benzopyrans in Hypericum polyanthemum klotzsch ex reichardt cultured in vitro*, *Acta Physiol. Plant*, **2007**, 29, 197-204
9. Moura, M. *Conservation of Hypericum foliosum Aiton, an endemic azorean species by micropropagation. In vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, **1998**, 34, 244-248.
10. Cellarova, E.K. *multiple shoot formation and phenotypic changes of RO regenerants in Hypericum perforatum L. Acta Biotechnol.*, 1992, 12, 445-452
11. Kai, G. Y.; Dai l. M; Mei, X. Y.; zheng, J. G.; Wang, W.; Lu, Y.; Qian, Z. Y.; Zhou, Y. G. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Ophiorrhiza japonica*, *Biologia Plantarum*, **2008**, 3,: 557-560.
12. Pretto F. R.; Santar'em E. R. *Callus formation and plant regeneration from Hypericum perforatum leaves, Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **2000**, 62, 107–113.
13. Chen, H.; Xu, G.; Loschke, D.C.; Tomaska, L.; Rolfe, B.G. *Efficient callus formation and plant regeneration from leaves of oats (Avena sativa), plant cell reports*, **1995**, 14, 393-397.
14. Vardapetyan, H. R.; Oganesyanyan, A. A.; Kabasakalyan, E. E.; Tiratsuyan, S. G. *The Influence of Some Elicitors on Growth and Morphogenesis Of Hypericum perforatumL. Callus Cultures, Russian Journal of Developmental Biology*, **2006**, 6, 350–353.

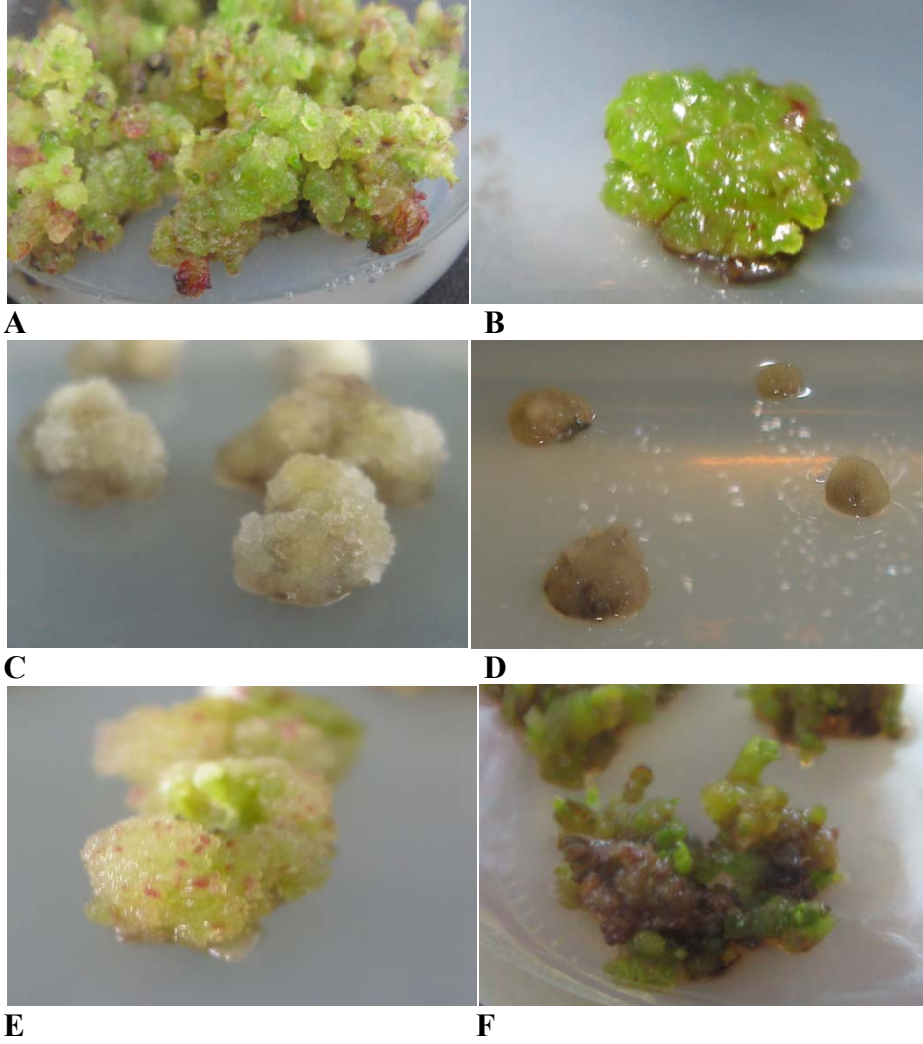


15. Oluk, E. A.; Orhan, S. *Thidiazuron induced micropropagation of Hypericum triquetrifolium Turra, African Journal of Biotechnology*, **2009**, *15*, 3506-3510.
16. Oinam, G.S.; Kothari, S.L. *Totipotency of coleoptile tissue in indica rice (Oryza sativa L. cv. CHI039). Plant Cell Rep.* **1995**, *14*, 245–248.
17. Remotti, P.C.; Löffler, H.J.M. *Callus induction and plant regeneration from gladiolus. Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1995**, *42*, 171–178.
18. Smith, M.A.L.; Reid, J.F.; Hansen, A.C.; Li, Z.; Madhavi, D.L., *Non-destructive machine vision analysis of pigment-producing cell cultures. J. Biotechno*, **1995**, *40*, 1–11.
19. Zenk, M.H.; Elshagi, H; Arens, H.; Stockigt, J.; Weiler, E.W.; Deus, B. *Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of Catharanthus roseus, plant tissue culture and it's biotechnological application, springer verlag*, **1974**, 27-43
20. Davies, M.E. *Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's scarlet rose, planta*, **1972**, *104*, 50-65
21. Cui, X.H.; Murthy, H.N.; Wu, C.H.; Paek, K.Y. *Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of Hypericum perforatum L. Plant Cell Tissue Organ Cult.***2010**.
22. Do, C.B.; Cormier, F. *Accumulation of anthocyanin enhanced by a high osmotic potential in grape (Vitis vinifera) cell suspensions, plant cell reports*, **1990**, *9*, 143-146.

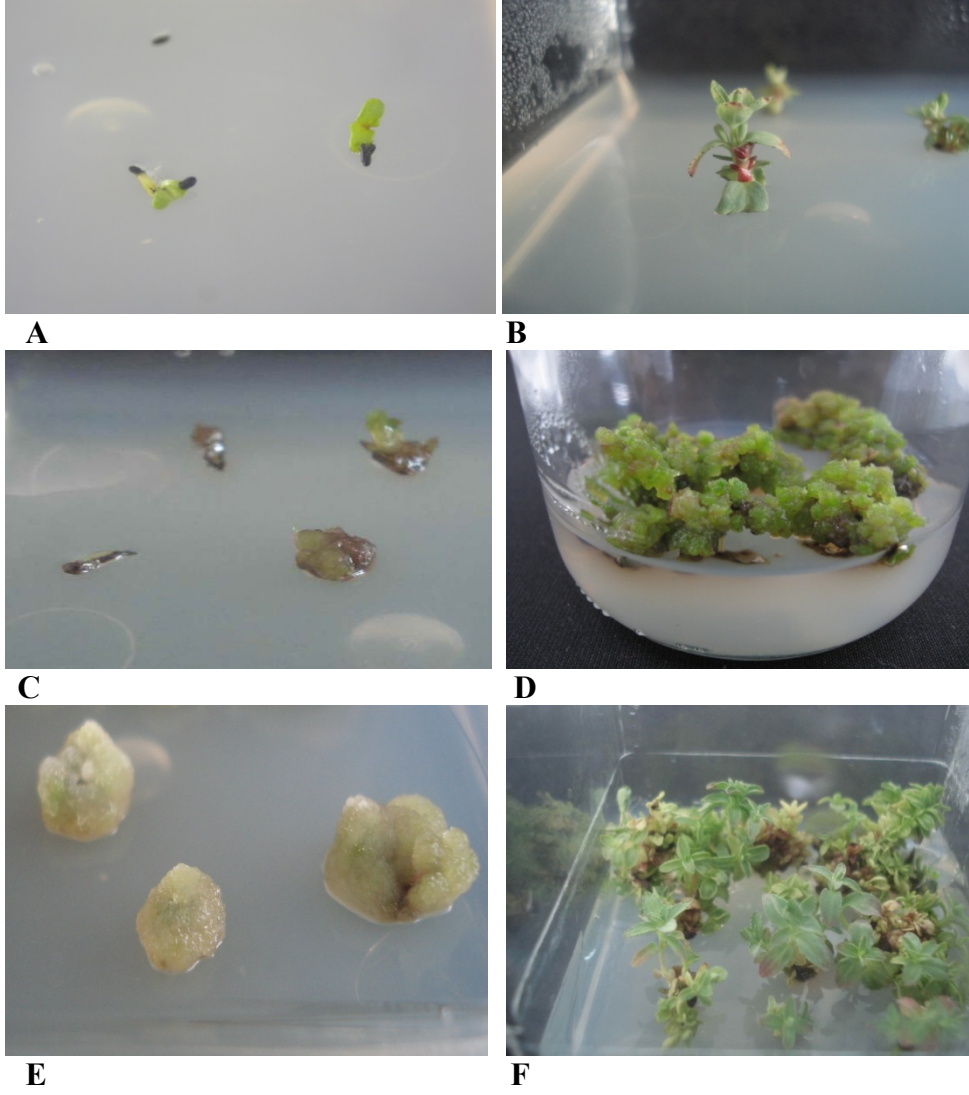
23. Gadzovska, S.; Maury, S.; Delaunay, A.; Spasenoski, M.; Joseph, C.; Hage`ge, D. *Jasmonic acid elicitation of Hypericum perforatum L. Cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones*, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **2007**, 89,1–13.
24. Pasqua, G.; Pinarosa, A.; Monacelli, B.; Santamaria, A. R.; Argentiere, M. P. *Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of Hypericum perforatum cv. Topas*, *Plant Science*, **2003**, 165, 977-982.
25. Kartnig, T.; Göbel, I.; Heydel, B. *Production of Hypericin, Pseudohypericin and Flavonoids in Cell Cultures of Various Hypericum species and their chemotypes*, *planta med*, **1996**, 62, 51-53
26. Bais, H. P.; Walker, T. S.; Mcgrew, J. J.; Vivanco, M. H. *Factors affecting growth of cell suspension cultures of Hypericum perforatum l. (st. john's wort) and production of hypericin*, *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, **2002**, 38, 58–65.
27. Sakamoto, K.; Iida, K.; Hajiro, K.; Asada, Y., Yoshikawa, T.; Furuya, T. *Anthocyanin production in cultured cells of Aralia cordata Thunb*, *Plant cell tissue and organ cult.*, **1994**, 36, 21
28. Hirose, M.; Yamakawa, T.; Kodama, T.; Komamine, A. *Accumulation of betacyanin in Phytolaca americana cells and anthocyanin in Vitis sp. Cells in relation to cell division in suspension cultures*, *plant and cell physiol.***1990**, 31, 267-271.

29. Noguchi, H.; Sankawa, U. *Formation of germichrisome by tissue cultures of Cassia torosa, induction of secondary metabolism in the lag phase, phytochem*, **1982**, *21*, 319-323.
30. Boyd, M.G. *Studies on carotenoid production in cultures of Bixxa orellana*, PhD. Thesis, University of edinburgh **1991**.
31. Mendez, R.Z. *Studies on the phnolic pungent principles in plants and cultures of Zingiber officinale Roscoe*, PhD thesis, University of Edinburgh, 1994.
32. Santarem, E.R.; Astarita, L.V. *Multiple shoot formation in Hypericum perforatum L. and hypericin production. Barz. J. Plant Physiol*, **2003**, *15*, 43-47.

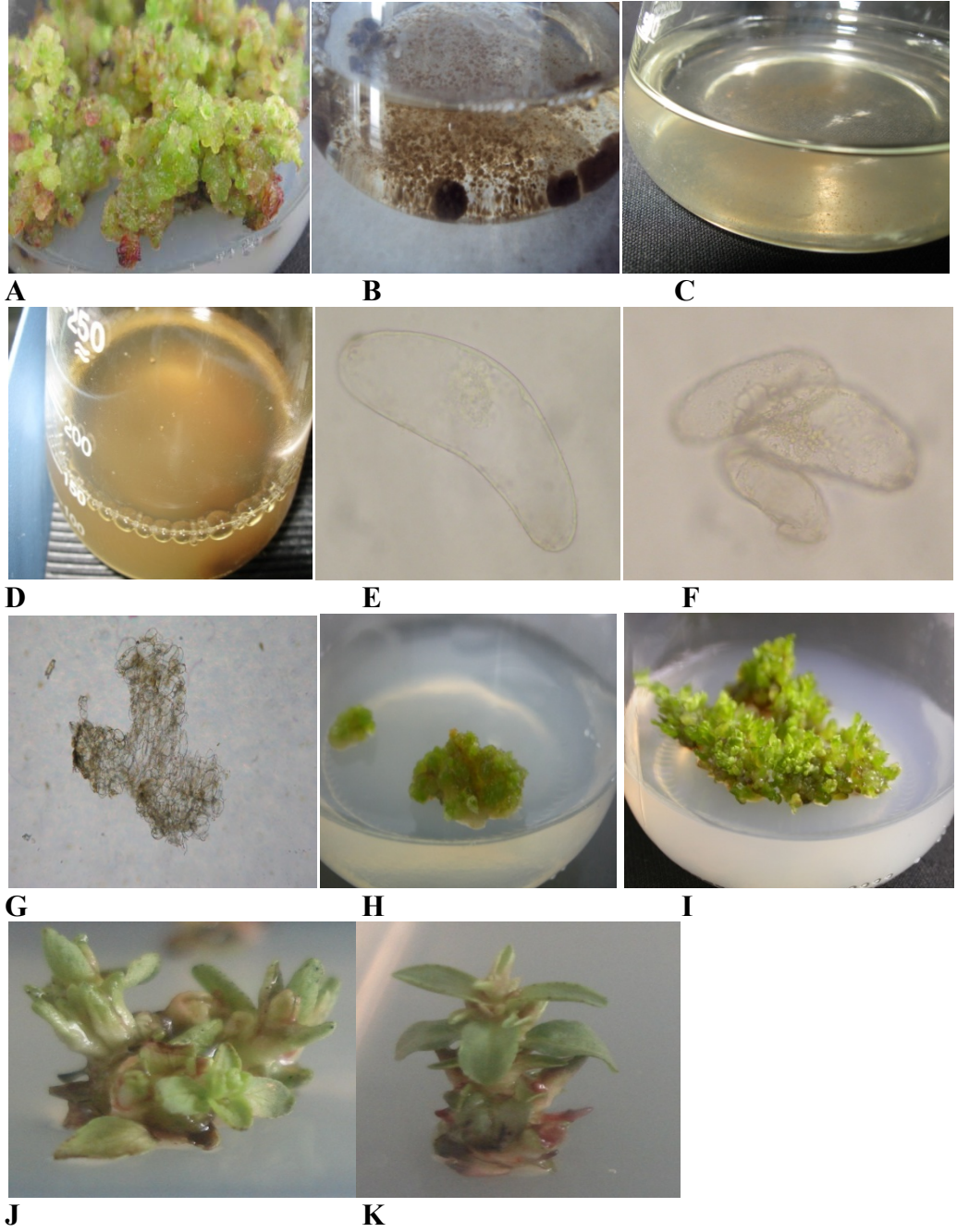
#### 4.9. ŞEKİLLER



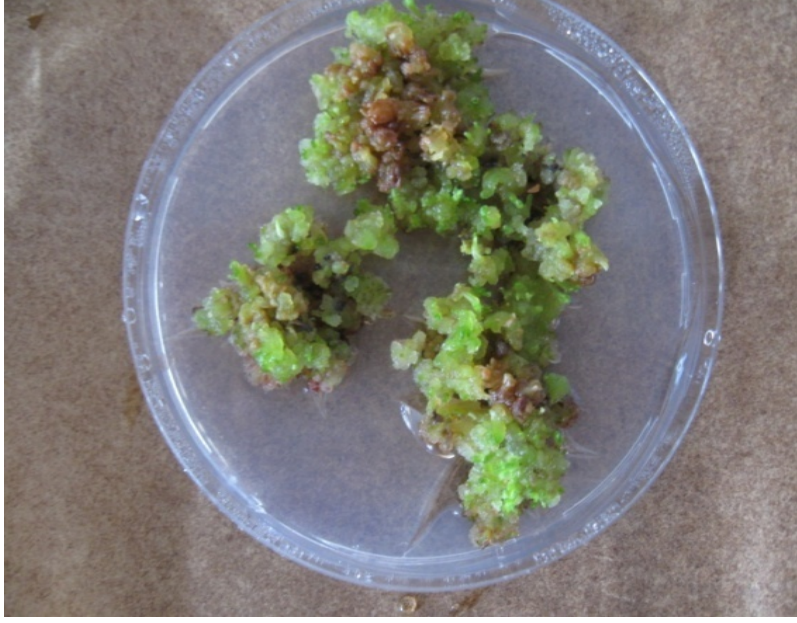
**Şekil 4.4.2.1.** Farklı BBD konsantrasyonlarının kallus gelişimi üzerine etkisi **A.** 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA MS ortamı **B.** 1 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA MS ortamı **C.** 1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D MS ortamı **D.** 2,4-D ve Kinetin kombinasyonları **E.** 0.06 mg/l BA + 0.1 mg/l 2,4-D MS ortamı **F.** Yüksek BA ve Düşük NAA konsantrasyonları içeren MS ortamı



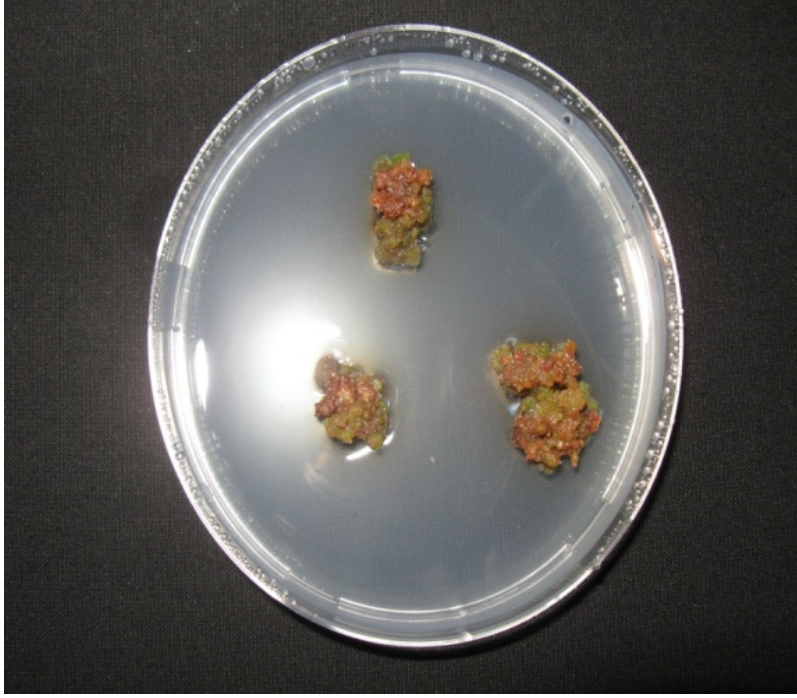
**Şekil 4.1.** *H. triquetrifolium*'un in vitro kültürleri **A.**hormonsuz ortamda çimlenen tohumlar **B.** Sürgün çoğaltılması (1 mg/l BA + 0.2 mg/l GA<sub>3</sub>) **C.** Yapraktan kallus gelişimi **D.** Granüler yapıdaki yeşil pigmentli kallus gelişimi **E.**kompakt (sert) yapıdaki kallus gelişimi **F.**Kallustan sürgün gelişimi (1 mg/l BA)



**Şekil 4.7.1.** Süspansiyon kültürü hücrelerinden bitki rejenerasyonu **A.**Süspansiyon kültürünün başlatılmasında kullanılan kallus yapıları **B.**Granüler kallusların sıvı ortama aktarılması **C.**Süzme işleminden sonraki süspansiyon kültürü hücrelerin dağılımı **D.** Süspansiyon kültürü hücrelerinin alt kültür sonrası gelişimi **E-F.** Süspansiyon kültürü hücrelerinin mikroskopik görüntüleri **G.**Hücre gruplarının mikroskopik görünümü **H.**Süspansiyon kültürü hücrelerinden kallus gelişimi **I.**Kalus yapıları üzerinde gelişen sürgünler **J-K.** Rejenere olmuş bitkiler

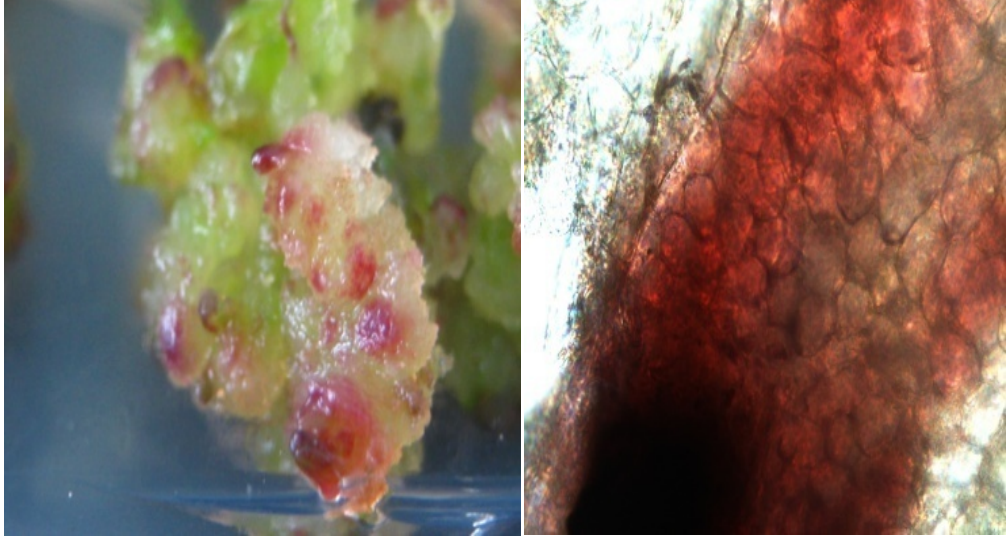


A



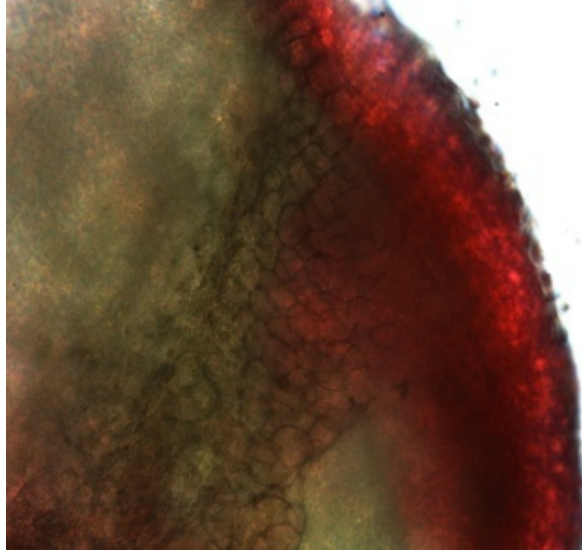
B

**Şekil 4.4.3.1.** 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren farklı MS besin ortamlarında kallusların gelişimleri (40 günlük kültür) **A.1/1** (tam güçlendirilmiş) MS ortamındaki kalluslar **B.1/2** MS ortamındaki kalluslar



**A**

**B**



**C**

**Şekil 4.4.4.1.** 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gelişen kalluslarda kırmızı renk pigment oluşumu **A**. Bütün kallus **B-C**. Kallusun histolojik yapısının mikroskopik görüntüsü



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

*Hypericum* türlerinin antidepresan, analjezik, antiviral ve yara iyileştirici etkilerinin olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir<sup>1,2</sup>. Bu türlerden biri olan *H. triquetrifolium* dünyanın birçok yerinde yetişen yaygın bir tür olup çoğunlukla Doğu Avrupa ve Akdeniz Bölgesinde yayılış gösteren bir bitkidir<sup>3</sup>.

*H. triquetrifolium*'un in vitro mikroçoğaltılması ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Kallus kültürlerine yönelik sadece birkaç çalışma yapılmış olmasına rağmen şimdiye kadar bu bitkinin hücre süspansiyon kültürleri ile ilgili hiçbir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, in vitro şartlarda *H. triquetrifolium* 'un yaprak eksplantlarından kallus ve hücre süspansiyon kültürleri yapılarak bunların total hiperisin içerikleri araştırılmıştır. Doğal ortamdan alınan bitkilerin yaprak, çiçek gövde ve kök kısımlarından elde edilen metanolik özütlerden, yaprağa ait özütlerde en fazla miktarda hiperisin (1.95 mg/l) tespit edildiği için kallus kültürleri bitkinin bu kısmından (yaprak) başlatılmıştır.

Süspansiyon kültürlerinin başlangıç materyali olarak kullanılan kallusların kolayca dağılabilen özellikte olması hücrelerin sıvı ortama daha hızlı ve daha küçük yığınlar halinde dağılmasını sağlamaktadır. Kallus yapılarının bu özellikleri taşıması için uyguladığımız işlemler (alt kültür süreleri ve ortamların optimizasyonu), başarılı sonuçlar elde etmemizi sağlamıştır.

Farklılaşmamış doku özelliğini taşıyan kallus materyallerinde kırmızı renk pigment oluşumu, total hiperisin miktarının düşük olmasına neden olmaktadır.

Çalışmada, hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında kullanılan kallus materyallerinin oluşturulması için farklı hormon konsantrasyonları ve kombinasyonları kullanılmıştır ve en etkili ortamın 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren ortam olduğu tespit edilmiştir. Kallus kültürü için tespit edilen en etkili ortam hücre süspansiyon kültürü için de kullanıldı ancak bu ortamın sıvı olması için agar ilave edilmedi. Süspansiyon kültürlerindeki büyüme parametrelerini (PCV, yaş ağırlık ve kuru ağırlık) ve total hiperisin içeriklerini karşılaştırmak için 1 mg/l BA + 2 mg/l NAA içeren ortamdaki elde edilen hücreler 1 mg/l BA + 0.4 mg/l 2,4-D içeren ortamda da geliştirildi. Ortamlar karşılaştırıldığında total hiperisin içeriği bakımından fazla fark görülmezken, büyüme parametrelerinde (PHH, Yaş ağırlık, Kuru ağırlık) gibi farklılıklar gözlemlendi.

Süspansiyon kültürlerinde gelişen hücrelerin tek veya küçük hücre grupları şeklinde dağılım göstermesi bu kültürlerin kalitesini belirlemede önemli bir ölçüt olarak değerlendirilmekte olup kültürlerin bu özellikleri taşıması için daha önce yapılan çalışmalarda ortama belirli miktarlarda parçalayıcı enzimler (pektinaz, sellüloz vb.) eklenmiştir. Ancak bu tür uygulamalar ekonomik açıdan tercih edilmemektedir. Bizim çalışmamızda hücrelerin sıvı ortamda tek tek ya da küçük hücre grupları şeklinde dağılmasını sağlamak için herhangi bir parçalayıcı enzim kullanılmadı.

Kallus yapısının metanolik ekstraktlarından elde edilen total hiperisin bileşiklerinin miktarı, doğal ortamdaki bitki kısımlarının hiperisin miktarından düşük olduğu ve bu miktarın yapraktakinden yaklaşık 30 kat daha az olduğu tespit edildi. Süspansiyon kültüründeki hücrelerin total hiperisin miktarının ise kallus yapısına göre yaklaşık 25 kat daha az olduğu tespit edildi.

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde, ileriki çalışmalara yönelik verilecek öneriler aşağıda sıralanmıştır;

1. *H. triquetrifolium* 'un süspansiyon kültürlerine yönelik şimdiye kadar hiçbir çalışmanın yapılmamış olması bu çalışmanın sonraki benzer çalışmalara referans olabileceğinin göstergesidir
2. *H. triquetrifolium*'un yaprak eksplantlarından oluşturulan süspansiyon kültüründeki hücrelerin total hiperisin içerikleri oldukça düşük çıkmıştır. Bu hücrelerdeki total hiperisin miktarının artırılması için daha önceki diğer türler üzerinde yapılan çalışmalarda olduğu gibi süspansiyon kültürü ortamına çeşitli elisitör veya öncül maddeler eklenerek çalışma daha da verimli hale getirilebilir.
3. Çalışmamızda küçük ölçekli kültürler (100-250 ml'lik erlenlerde) yapıldı. Ancak sonraki çalışmalarda büyük ölçekli kültürlerin (biyoreaktörlerin) yapılması çalışmayı daha etkili hale getirebileceğini düşünmekteyiz.

### 5.1. KAYNAKLAR

1. Pasqua, G.; Avato, P. *Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of Hypericum perforatum cv. Topas. Plant Sci.* **2003**, *165*, 977-982.
2. Wojcik, A.; Podstolski, A. *Leaf explant response in in vitro culture of St. John's wort (Hypericum perforatum L.). Acta Physiol. Plant,* **2007**, *29*,151-156.
3. Saya, O.; Selcuk, A. E.; Ozen, H. C.; Hosguren, H.; Toker, Z. *Medicinal Plants of GAP Area*, Environment Foundation of Turkey, Ankara, 2001, 143.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özgür KARAKAŞ

Doğum Yeri : Diyarbakır

Doğum Tarihi : 28.02.1980

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Diyarbakır Ziya Gökalp Lisesi, 1998

Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat. Fak. Biyoloji Bölümü, 2003

Yüksek Lisans : Dicle Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

1. İnter-Med Tıbbi Ürünleri San. Tic. Ltd. Şti., 2005

2. Dicle Üniversitesi. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2005-

Yayımları (SCI ve diğer):

1. **Karakaş, Ö.**; Toker, Z.; Tilkat, E.; Özen, H. Ç. (2009). Onay, A. Effects of different concentrations of benzylaminopurine on shoot regeneration and hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra. Natural product research. Volume 23, issue 16, 1459-1465.

2. Oluk, E.A.; Serpil Orhan, S.; **Karakaş, Ö.**; Çakır, A.; Gönüz, A. (2010). High efficiency indirect shoot regeneration and hypericin content in embryogenic callus of *Hypericum triquetrifolium* Turra. African Journal of Biotechnology. Vol. 9 (15), 2229-2233.