

Hypericum retusum Aucher'in Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Optimizasyonu ve Fenolik Bileşen İçeriğinin İncelenmesi

Hilal SURMUŞ ASAN¹, Özen HASAN ÇETİN¹, Ahmet ONAY¹

ÖZET: *Hypericum retusum* tıbbi bitki olarak potansiyel bir öneme sahiptir. Bu çalışmada, 6-benziladenin (BAP) ve kinetin (KİN)'in 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ile kombinasyonlarının, farklı sukroz konsantrasyonlarının (15, 30 ve 50 g L⁻¹), farklı ışık uygulamalarının (Sürekli karanlık, Sürekli aydınlık ve kontrol) ve farklı başlangıç pH değerlerinin (pH 4.5, 5.8 ve 6.5), *H. retusum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi ve farmakolojik olarak önemli beş adet fenolik bileşiğin (hiperisin, hiperosid, klorojenik asit, kuersetin ve psödohiperisin) miktarları üzerine etkisini araştırdık. Verilerimiz, *H. retusum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde en iyi biyokütle birikiminin, 0.5 mg L⁻¹ KİN+ 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D ve 30 g L⁻¹ ilaveli MS besi ortamında, pH'sı 5.8 ve sürekli karanlık şartlar altında olan ortamdaki elde edildiğini ortaya koymuştur. En yüksek fenolik bileşik içeriği, 0.1 mg L⁻¹ BAP+ 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D ve 15 g L⁻¹ sukroz ilaveli ve pH'sı 4.5 olan ortamdaki elde edilmiştir. Farklı ışık uygulamalarına tabi tutulan kültürlerdeki fenolik bileşen içeriği ise uygulamalar arasında farklılık göstermiştir. Bu çalışmayla, *H. retusum* için, fenolik bileşiklerin geniş ölçekli üretimi için muhtemel bir teknoloji sunan yeni bir hücre süspansiyon kültür sistemi geliştirdik.

Anahtar Kelimeler: Fenolik bileşik, Hücre süspansiyon kültürü, *Hypericum retusum* Aucher, LC-MS/MS



Medium Optimization and Investigation of Phenolic Contents in Cell Suspension Culture of *Hypericum retusum* Aucher

ABSTRACT: *Hypericum retusum* has a potential value as a medicinal plant. In this study, we investigated the effects of different combination of 6-benzyladenine (BAP) and kinetin (KIN) with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), different sucrose concentrations (15, 30 and 50 g L⁻¹) and different light conditions (continuous dark, continuous light and control) and initial pH values (pH 4.5, 5.8 ve 6.5) on the accumulation of biomass and the production of five pharmacologically important phenolic constituents (hypericin, hyperoside, chlorogenic acid, quercetin and pseudohypericin) in cell suspension culture of *H. retusum*. Our data suggested that the best biomass accumulations obtained from on MS medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ KİN+1.0 mg L⁻¹ 2,4-D, 30 g L⁻¹ sucrose, 5.8 pH and under the darkness conditions in cell suspension culture of *H. retusum*. The highest phenolic compound contents were obtained from on MS medium containing 0.1 mg L⁻¹ BAP+ 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D at and 15 g L⁻¹ sucrose. The phenolic compound contents of suspension culture under the different light conditions varied among the treatments. With this study, we have developed a novel cell suspension culture system for *H. retusum*, suggesting a possible technology for large-scale production of phenolics.

Keywords: Cell suspension culture, *Hypericum retusum* Aucher, Phenolic compounds, LC-MS/MS

¹ Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji, Diyarbakir, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Hilal SURMUŞ ASAN, hilalsuran@gmail.com

GİRİŞ

Hypericum cinsi, Hypericaceae (Clusiaceae) familyasına aittir ve yaklaşık 460 tür içermektedir (Bertoli ve ark., 2011). Türkiye, 43'ü endemik olmak üzere sahip olduğu yaklaşık 89 türle *Hypericum* cinsi için önemli bir yetişme bölgesidir (Davis, 1988). *Hypericum* türlerinin içerdiği temel bileşikler; hiperisin, tanenler, flavonoidler, fenolik asitler, kuersitrin, hiperosid, izokuersitrin, klorogenik asit ve rutin'dir (Barnes ve ark., 2001; Dall'Agnol ve ark., 2003). Bu türlerin, antimikrobiyal (Dall'Agnol ve ark., 2003; Crockett, 2010), antikanser (Agostinis ve ark., 2002), antidepresan (Butterweck ve ark., 2002), antiviral (Meruelo ve ark., 1988), antioksidant (Cakir ve ark., 2004) ve antifungal (Cakir ve ark., 2005) aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Fenolik bileşikler, antioksidan özellikler taşıyan en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. *Hypericum*'larda bulunan fenolik bileşikler, sahip oldukları özellikler nedeniyle son derece büyük önem taşımaktadırlar. Hiperisinler (hiperisin ve psödohiperisin) sadece *Hypericum* türlerinde bulunmaktadır (Kitanov, 2001). *Hypericum perforatum* (St. John's) *Hypericum* cinsinin en iyi bilinen türüdür. *H. perforatum*'un yapraklarından elde edilen ekstraktlar farmasötik endüstride yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Tatsis ve ark., 2007).

Son yıllarda hiperisin bileşiklerine olan talep gittikçe artmaktadır. Ticari hiperisin üretimi için tarlada yetiştirilen bitkiler kullanılmaktadır fakat bu şekilde elde edilen ürünler, çevresel şartlar, bakteri, mantar, virüs, böcek gibi verim kaybı ve tıbbi içeriğin değişmesine neden olan etkenlerle karşı karşıyadır. *Hypericum*'un sekonder metabolitlerinin büyüyen ticari öneminden dolayı bu bitkinin biyoteknolojik yolla üretimi üzerinde ilgi yoğunlaşmıştır. Son yıllarda, bitki hücre kültürü teknolojisi yöntemleri, çok sayıda faydalı sekonder bileşiğin üretiminde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Verpoorte ve ark., 2002).

H. retusum türü üzerine yapılmış birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, doku kültüründe yetiştirilen bu türün UV-B uygulamasına maruz bırakıldığında, total fenolik, flavonoid ve hiperisin içeriklerinin (Namlı ve ark., 2014) aynı şekilde linolenik asit, oleik asit ve linoleik asit miktarlarının da

arttığını (Isikalan ve ark., 2013) tesbit etmişlerdir. Bunun yanında, *H. retusum*'un antioksidatif ve antimikrobiyal (Kızıl ve ark., 2011; Akgöz ve Toker, 2013) aktivitelere sahip olduğu da ortaya çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalarda Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin (BBD) *Hypericum* türlerinde bitki gelişimi ve fenolik bileşen içeriğini etkilediği bildirilmiştir (Dias ve ark., 2000; Liu ve ark., 2007; Coste ve ark., 2011). Aynı şekilde, sukroz konsantrasyonları, ışık ve pH uygulamaları da bu türlerde bitki gelişimi ve fenolik bileşen içeriğini artırmak amacıyla çalışılan parametrelerdir (Bais ve ark., 2002; Chui ve ark., 2010; Çetin, 2010). Bu çalışmayla, *H. retusum* bitkisi için ilk kez bir hücre süspansiyon kültürü protokolü geliştirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitki Materyali

H. retusum Aucher bitki örnekleri Diyarbakır İli'nden toplanmıştır. Örneklerin teşhisleri Prof. Dr. A.S. Ertekin tarafından yapılmıştır. Çalışmada kullanılan bitkilere ait örnekler, Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi herbaryumunda tutulmaktadır (Herbaryum No: DUF-326).

Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması

H. retusum tohumları, BBD içermeyen MS besi ortamında çimlendirildi. Çimlendirilen tohumlardan elde edilen sürgünler, 0.5 mg L⁻¹ BAP bulunan MS besi ortamına aktararak sürgünlerin geliştirilmesi ve çoğaltılması sağlandı (Namlı ve ark., 2010). Gelişen bitkiciklere ait yapraklar, kallus oluşumunu sağlamak için 30 gL⁻¹ sukroz, 0.1 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mg L⁻¹ KİN+ 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D ilaveli MS besi ortamında 25±2 °C sıcaklıkta ve 16/8 saat (ışık/karanlık) ışık şartlarında kültüre alındı. Besi ortamlarının pH'sı 5.8 olacak şekilde ayarlandı. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması için dağılabilen özellikteki kalluslardan yaklaşık 0.5 g olacak şekilde alınarak içinde 50 mL sıvı besi yeri bulunan 250'lik erlenlerde kültüre alındı. Besi ortamının içeriği kallus ortamı ile aynı olacak şekilde ayarlandı. Süspansiyon kültürleri 100 rpm'e ayarlanan çalkalayıcı (J.P. Selecta, s.a, Spain) üzerinde 5 hafta süreyle (Ellialtıoğlu ve ark., 1998) gelişime bırakıldı. Hücrelerin birbirlerinden ayrılmasını sağlamak için süspansiyon kültürü ortamları por çapları 500 µm,

250 µm ve 100 µm olan eleklerden (stainless steel süzgeç-cole parmer) geçirilerek her 14 günde bir alt kültürleri yapıldı.

Kültür Koşullarının Optimizasyonu

Bitki büyüme düzenleyicileri: Daha önce yaptığımız çalışmalarda en iyi kallus oluşturduğu tesbit edilen 0.1 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mg L⁻¹ KİN+ 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D ortamlarının süspansiyon kültürünün gelişimi ve fenolik bileşen içeriği üzerine etkisi araştırıldı.

Sukroz konsantrasyonları: Oluşturulan *H. retusum* süspansiyon kültürleri sukroz konsantrasyonlarının kültür üzerine etkisini araştırmak amacıyla 15, 30 ve 50 g L⁻¹ sukroz bulunan MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır.

Işık uygulamaları: Kültürler farklı ışık uygulamalarına (kontrol(16/8 aydınlık karanlık), sürekli aydınlık ve sürekli karanlık) maruz bırakılarak ışığın kültürler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

pH uygulamaları: *H. retusum* süspansiyon kültürleri farklı başlangıç pH değerlerinin kültür gelişimi ve fenolik bileşen miktarı üzerine etkisini araştırmak amacıyla kültür ortamları; başlangıç pH'ları 4.5, 5.8 ve 6.5 olarak ayarlanan ortamlarda kültüre alınmıştır.

Hücre Gelişiminin Belirlenmesi

Hücre süspansiyon kültürlerinin gelişimini belirlemek amacıyla hücrelerin bulunduğu sıvı besiyerleri 0.45 µm'lik süzgeçten geçirilerek süzülmesi sağlanmıştır. Daha sonra etüvde 60 °C'de kurutularak kuru ağırlıkları alınmıştır.

İstatiksel Analiz

Kültürler üzerinde çalışılan farklı uygulamalarla oluşturulan farklı gruplar arasında, parametreler arasındaki farklılığın belirlenmesi için Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Kruskal Wallis testi sonrası ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Sonuçlar üç tekrarın ortalaması olarak verilmiştir. Testlerde anlamlılık düzeyi p≤0.05 olarak kabul edilmiştir.

Ekstraksiyon

Kuru örneklerin her birinden alınan 0.20 g bitki materyali üzerine 10 mL metanol eklenip çözelti 5 dakika süre ile sonikatörde özütlendi. Özütleme işleminden sonra elde edilen çözelti vakumla süzüldü. Bu işlemler 3 kez tekrarlandı ve 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 metanolle çözülüp uygun seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra LC-MS/MS'e enjekte edildi. Numuneler metanolde çözülerek seyreltikten sonra 0,2 µm filtreden geçirildi ve cihaza enjekte edildi. Fenolik bileşen analizi Ertaş (2014)'e göre yapıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

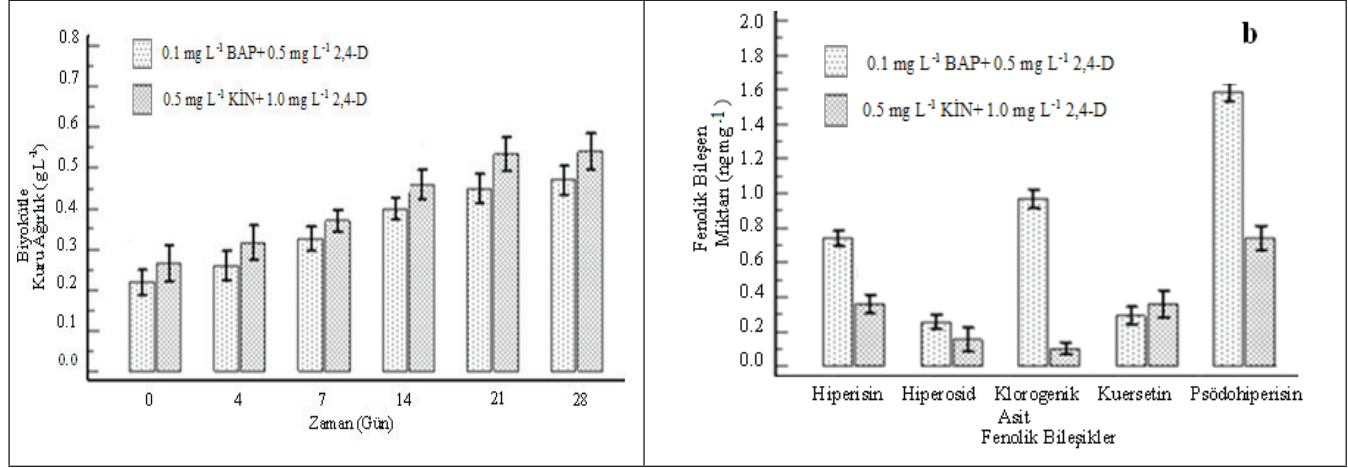
Süspansiyon Kültürlerinin Kurulması Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında başlangıç materyali olarak kullanılan eksplantlardan elde edilecek kallusların, yeterli miktarda ve istenilen özelliklerde olması da sekonder metabolit üretiminde başarıyı büyük ölçüde etkilemektedir. Bu amaçla beyaz renkli, kolay dağılabilen ve yumuşak dokulu kalluslar, hücre kültürlerinin oluşturulmasında en uygun kalluslar olarak kabul edilmektedir (Romulo ve ark., 1999). *H. retusum*'un kallus kültürleri, 0.5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında gelişen sürgünlerden elde edilen yapraklar kullanılarak oluşturuldu. Çalışmamızda, istenilen tipte kallus oluşturan, 0.1 mg L⁻¹ BAP+ 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mg L⁻¹ KİN+ 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D ilaveli MS ortamlarında gelişen kalluslar süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında da kullanıldı. Ortamın sıvı olabilmesi için agar ilavesi yapılmadı ve kültürler, çalkalayıcı (100 rpm) üzerinde 25 ± 2 °C'de ve 16/8 s ışık periyodunda gelişmeye bırakıldı ve her 14 günde bir alt kültürleri yapıldı. Praveen ve Murthy (2010), *Withania somnifera*'nın hücre süspansiyon kültürlerini, 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mg L⁻¹ KİN ilaveli MS besi ortamını kullanarak başlatmıştır.

Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Büyüme Kinetikleri ve BBD'nin Etkisi

H. retusum'un sahip olduğu tıbbi olarak önemli bileşikler süspansiyon kültüründe geniş olarak elde

etmenin ilk aşaması, kültürlerde hücre proliferasyonu için optimizasyonu sağlamaktır. BBD sekonder metabolizmayı düzenleyen, ayrıca hücre kültürlerinde de büyüme ve sekonder metabolit üretimini etkileyen faktörlerdendir. Oluşturulan süspansiyon kültürleri

kallus kültür çalışmalarında iyi sonuç veren 0.5 mg L⁻¹ KİN+ 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.1 mg L⁻¹ BAP+ 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D ortamlarında kültüre alındı. Kültürlerin gelişimlerini izlemek amacıyla 0, 4, 7, 14, 21 ve 28. günlerde kuru ağırlıkları alındı.



Şekil 1. Farklı hormon konsantrasyonlarında gelişen kültürlerin kuru ağırlık değişimleri(a) ve 28 gün sonundaki fenolik bileşen miktarları (b)

Çalışma sonucunda, 0.5 mg L⁻¹ KİN+ 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.1 mg L⁻¹ BAP+ 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D hücre kültürlerinin gelişimleri izlendiğinde, 4 ve 14. günler arasında lag fazında olduğu, 21 günde logaritmik büyüme gösterdiği ve 28. günde durağan büyüme fazına ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 1a).

Her iki BBD ortamında da maksimum kütle birikiminin (0.047±0.034 ve 0.54±0.043 g L⁻¹) 28. günde olduğu kaydedilmiştir (Şekil 1a). Fakat büyüme sürecine bakıldığı zaman biyokütle büyümesinin 0.5 mg L⁻¹ KİN +1.0 mg L⁻¹ 2,4-D içeren MS besi ortamında daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Kültürlerin gelişimi için ortama ilave edilen 2,4-D'nin, kullanıldığı konsantrasyona ve bitkinin kültür özelliklerine bağlı olarak hücrelerin aktif proliferasyonu ile kallus ve süspansiyon kültürlerinin sürekli olarak büyümesini tetiklediği bilinmektedir (Butenko, 1999).

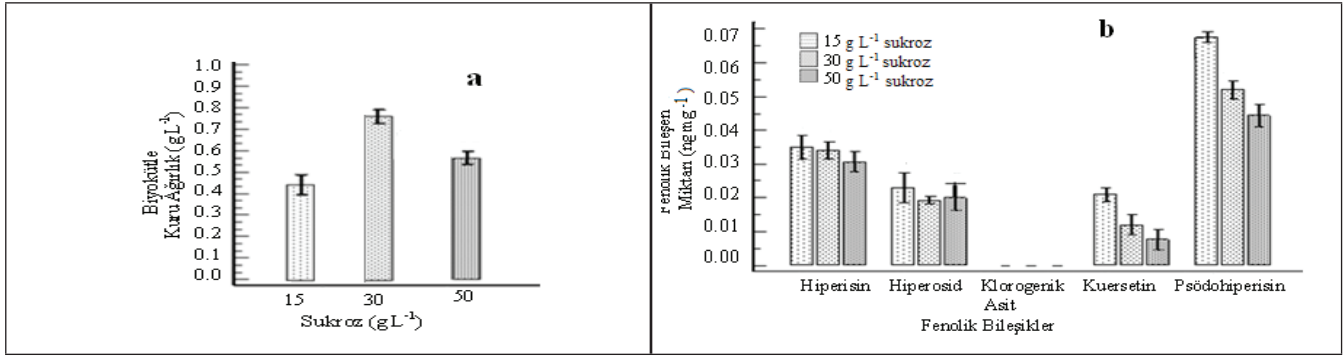
Kültürlerin fenolik madde içerikleri incelendiğinde, en yüksek hiperisin (0.743 ng mg⁻¹),

klorojenik asit (0.970 ng mg⁻¹) ve psödohiperisin (1.587 ng mg⁻¹) içeriklerinin 0.1 mg L⁻¹ BAP+ 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D ilaveli MS besi ortamından elde edildiği görülmektedir (Şekil 1b). Dolayısıyla biyokütle olarak daha düşük yoğunluktaki grubun içerdiği fenolik madde miktarı daha yüksek düzeylerde bulunmuştur. Birçok sekonder metabolitin kültürlerde hücre bölünmesinin yavaşladığı hatta durduğu evrelerde üretildiği bilinmektedir (Glick ve Pasternak, 2003; Yeoman ve ark., 1990). Çalışmamızda da biyokütle miktarı düşük olan kültürlerdeki fenolik madde miktarının daha fazla çıkması bu bilgiyle örtüşmektedir.

Sukroz Konsantrasyonlarının Etkisi

Sukroz, bitki doku kültürleri için genellikle tercih edilen karbon kaynağıdır.

H. retusum'un hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi ve sekonder metabolit içeriğini artırmak amacıyla sukroz 15 ve 50 g L⁻¹ konsantrasyonlarında çalışıldı, kontrol grubu olarak ta 30 g L⁻¹ sukroz kullanıldı.



Şekil 2. *H. retusum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi(a) ve sekonder metabolit içeriği (b) üzerine farklı sukroz konsantrasyonlarının etkisi

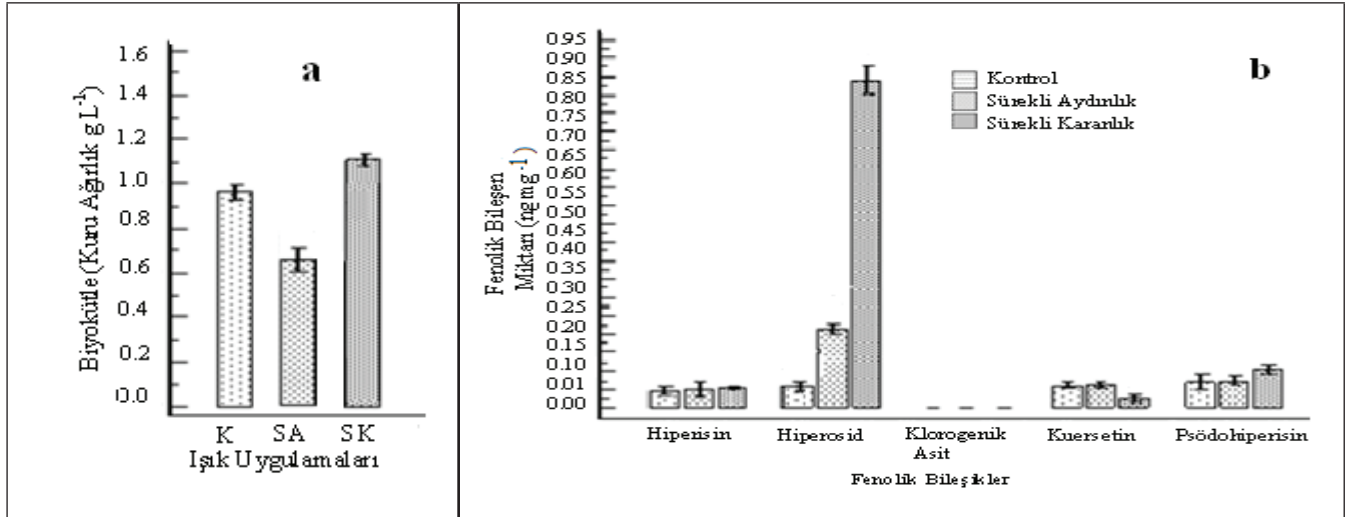
Çalışma Sukroz, bitki doku kültürleri için genellikle tercih edilen karbon kaynağıdır. *H. retusum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde biyokütle birikimi ve sekonder metabolit içeriğini artırmak amacıyla sukroz 15 ve 50 g L⁻¹ konsantrasyonlarında çalışıldı, kontrol grubu olarak da 30 L⁻¹ sukroz kullanıldı.

Çalışma sonucunda sukrozun 30 g L⁻¹ (0.76 g L⁻¹) ve daha sonra 50 g L⁻¹ (0.56 g L⁻¹) oranında kullanıldığı grupların en fazla biyokütle birikimini sağladığı bulunmuştur. En düşük biyokütle birikimi ise 15 g L⁻¹ (0.44 g L⁻¹) sukroz ilaveli ortamdan elde edilmiştir. Çalışmamızda, sukroz konsantrasyonu 15 L⁻¹'den 30 L⁻¹'ye artırıldığında kültürdeki hücrelerin kuru ağırlıklarında (0.44 g L⁻¹'den - 0.76 g L⁻¹'ye) artış meydana gelmiş yani artan şeker konsantrasyonu kültürdeki hücrelerin gelişimini de artırmıştır. Fakat daha yüksek sukroz konsantrasyonunda (50 g L⁻¹) kültür gelişiminin gerilediği tesbit edilmiştir (Şekil 2a). İn vitro kültürlerde artan sukroz konsantrasyonlarının osmotik strese yol açtığı bilinmektedir. Çalışmamızda da sukroz konsantrasyonunun artmasıyla kuru ağırlıkta meydana gelen düşüş, süspansiyondaki hücrelerde osmotik stresin meydana geldiğini göstermektedir. Chui ve ark. (2010), *H. perforatum*'un adventif kök kültürlerinde denedikleri artan sukroz seviyelerinde (% 0, 1, 3, 5, 7, ve 9 in w/v) maksimum taze ve kuru ağırlığı % 3 sukroz oranından elde etmiş, %3'ten daha yüksek sukroz konsantrasyonlarında (% 5,7 ve 9 w/v) kuru ağırlığın sırasıyla düştüğünü, bu düşüşün % 3 ten daha yüksek sukroz konsantrasyonlarının kök gelişimini inhibe ettiğini ve bunun da hücre ve organ kültürlerinde oluşan osmotik stresten kaynaklandığını bildirmişlerdir. Farklı sukroz

konsantrasyonlarının kullanıldığı grupların fenolik bileşen içerikleri karşılaştırıldığında, hiperisin(0.035 ng mg⁻¹), hiperosid miktarlarının (0.023 ng mg⁻¹) kuersetin (0.021 ng mg⁻¹) ve psödohiperisin (0.067 ng mg⁻¹) içeriklerinin 15 g L⁻¹ sukroz destekli ortamda diğer iki gruptan daha yüksek miktarlarda olduğu bulunmuştur. Bu bileşikler içerisinde en yüksek miktarlarda bulunanlar psödohiperisin ve hiperisindir. Klorogenik asit ise çalışılan ortamlarda tesbit edilememiştir (Şekil 2b). Kültür ortamlarında sukrozla artan osmotik basıncın, antosiyaninler ve betasiyaninler gibi bazı sekonder metabolitlerin üretimini artırdığı bildirilmektedir (Sakuta ve ark., 1986; İlker, 1987). Başlangıç sukroz konsantrasyonunun bitki hücre kültürlerinde, kültürlerin büyüme oranı ve sekonder metabolit üretimi gibi çoğu parametreleri etkilediği bildirilmiştir (Akalezi ve ark., 1999; Zhong ve Yoshida, 1995). Iranbakhsh ve ark.(2007), *Datura stramonium* bitkisinin hücre süspansiyon kültüründe, 20 g L⁻¹ sukroz konsantrasyonunun en yüksek alkaloid üretimini sağladığını tesbit etmişlerdir. Sukroz konsantrasyonunun normal olarak kullanılan % 2-3 seviyelerinin altına düşmesinin *Panax notoginseng*'in süspansiyon kültürlerinde ginseng saponin ve polisakkaritlerin üretimini uyardığı bildirilmiştir (Zhang ve ark.,1996).

Işığın Etkisi

Hücre süspansiyon kültürlerinde farklı ışık uygulamalarının kültürler üzerindeki etkisini araştırmak üzere, *H. retusum* kültürleri sürekli aydınlık, sürekli karanlık ve kontrol(16 s aydınlık, 8 s karanlık) olmak üzere üç farklı ışık ortamına maruz bırakılmıştır.



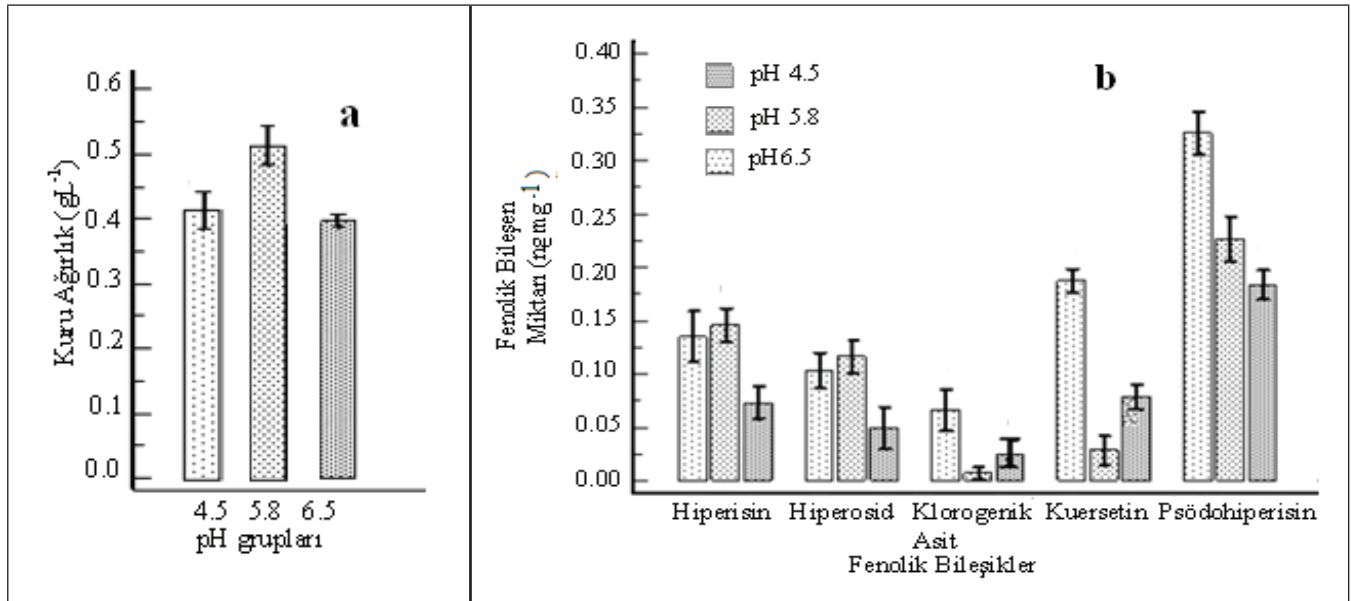
Şekil 3. Farklı ışık uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin 28. gün sonundaki kuru ağırlık (a) ve fenolik bileşik içerikleri (b)

Çalışılan bu ortamlar içerisinde 28. günün sonunda, en yüksek ortalama kuru ağırlık değeri (1.12 g L^{-1}) sürekli karanlık ortamda gelişen kültürlerden ve en düşük kuru ağırlık değeri ise (0.66 g L^{-1}) sürekli olarak aydınlık şartlara maruz bırakılan kültürlerden elde edilmiştir (Şekil 3a). Işık varlığında IAA-oksidadın aktivitesinin artarak sitokin ve oksin arasındaki iç dengeyi değiştirdiği ve kültürlerde büyümeyi azalttığı bildirilmiştir (Gaspar ve ark., 1982). Yani aydınlık koşullarda elde edilen başarının, karanlıkta tutulan kültürler göre düşük olması, besin ortamına ilave edilen oksinlerin aydınlık koşullarda parçalanarak, kültürün gelişimini engellemesi şeklinde açıklanabilmektedir (Westwood, 1993). Çetin (2010), asma hücre süspansiyon kültüründe denediği üzüm çeşitlerinde ortalama hücre sayısı ve ortalama hücre kuru ağırlığı bakımından en yüksek değerleri karanlık ortamda kültüre aldığı hücrelerden elde etmiştir. Bais ve ark. (2002), *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde karanlık şartlardaki biyokütle miktarının, aydınlıktaki kültürlerden daha fazla olduğunu tesbit etmişlerdir. Bu ortamların fenolik bileşik içerikleri karşılaştırıldığında, hiperisin içeriklerinin her üç ortamdaki kültürlerde birbirine yakın değerlerde olduğu bulunmuştur. Hiperosid miktarı (0.215 ng mg^{-1}) sürekli aydınlık ortamdaki kültürlerde en yüksek değerde bulunurken, klorogenik asit (0.012 ng mg^{-1}) sadece kontrol ortamındaki kültürlerde ve oldukça düşük miktarlarda tesbit edilmiştir. Kuersetin içeriği sürekli aydınlık ortamında gelişen kültürlerde daha fazla miktarda (0.063 ng mg^{-1}) bulunmuştur. Psödohiperisin (0.105 ng mg^{-1}) miktarı sürekli karanlık ortamda

gelişen kültürlerde en yüksek miktarda bulunmuştur (Şekil 3b). Walker ve ark. (2002), *H. perforatum* hücre süspansiyon kültürlerinin karanlık ortamda ürettikleri hiperisin içeriğinin aydınlık ortamdakinden daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Bais ve ark.(2002), yaptıkları çalışmada *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde total hiperisin içeriğinin karanlık şartlarda (ışıklı ortamdakinin 2.5 katı) maksimuma ulaştığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar, sürekli ışık şartları altında, *H. perforatum*'da pigmentlerin daha az birikimiyle sonuçlanan hiperisinin etkili bir şekilde dönüşümünün arttığını gözlemlemişlerdir (Poutaraud ve ark., 2001). Önceki çalışmalar, süspansiyon kültürlerinde hiperisin üretimi ve büyümenin önemli ölçüde karanlık şartlar tarafından kontrol edildiğini bildirmektedir (Bais ve ark. 2002). Sekonder metabolitlerin, özellikle fenolik bileşiklerin, sürekli ışık şartları altında foto-dönüşümü engelleyen bir foto-blok oluşturabilmeleri muhtemeldir (Hahlbrock ve Scheel, 1989).

Başlangıç Ph Değerinin Etkisi

Hücre süspansiyon kültürlerinde çoğalma ve sekonder metabolit üretimini etkileyen etmenlerden bir diğeri de kültür ortamının pH'sıdır. Kültür ortamlarının başlangıç pH'larında yapılan değişikliklerin, hücrelerde çoğalmayla ilgili bazı enzimatik reaksiyonları etkilediği bildirilmiştir (Sökmen ve Gürel, 2001). Bu amaçla *H. retusum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde farklı pH başlangıç değerlerinin (pH 4.5, 5.8 ve 6.5) etkisini araştırdık.



Şekil 4. Farklı pH uygulamalarında gelişen süspansiyon kültürlerinin 28. gün sonundaki kuru ağırlık (a) ve fenolik bileşik içerikleri (b)

Çalışmamızda denenen pH değerleri içerisinde 28. günün sonunda elde edilen kuru ağırlıklar bakımından en yüksek biyokütle birikimi (0.52 g L^{-1}), kontrol ortamı olan pH 5.8 grubundan elde edilmiştir. Düşük pH değeri olarak kullanılan pH 4.5 ve yüksek pH değeri olarak kullanılan pH 6.5 ortamlarında kuru ağırlık değerleri (0.42 ve 0.40 g L^{-1}) pH 5.8'den daha düşük seviyelerde kalmış dolayısıyla bu pH değerlerinin hücre çoğalmasını olumsuz etkilediği görülmüştür (Şekil 4a). Ortam pH'sının optimum olarak bilinen pH 5.8 değerinde meydana gelen değişiklikler, çeşitli mineral iyonlarının ortamda bulunmalarını ve bunların bitki hücreleri tarafından alınmalarını etkilemektedir. Çakır (2004) *Astragalus chrysochlorus*'un hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç pH'larının 5.7 olduğu kontrol koşullarının, kültürlerin maksimum hücre miktarına ulaştıklarını, bu değerlerin altında ve üstündeki pH değerleri olan pH 4.7 ve 6.7 koşullarının ise çoğalmayı kontrole göre düşürmekle birlikte, çoğalma üzerinde en az olumsuz etki gösteren kültürleme koşulları olduğunu bildirmiştir. Bu ortamların fenolik bileşen içerikleri karşılaştırıldığında, hiperisin ve hiperosid içeriklerinin, pH 5.8 (0.146 ng mg^{-1} - 0.110 ng mg^{-1}) ortamlarındaki kültürlerde en yüksek değerlerde yken klorojenik asit miktarının pH 4.5'te en yüksek miktarda (0.67 ng mg^{-1}) olduğu tespit edilmiştir. Kuersetin ve psödohiperisin miktarları düşük pH (pH 4.5)'da diğer pH gruplarına göre oldukça yüksek düzeyde (0.187 ng mg^{-1}) üretilmiştir. (Şekil 4b). Bu da kültür ortamındaki

hücrelerin gelişimine olumlu yönde katkıda bulunmayan bu stres koşullarında fenolik bileşiklerin daha fazla üretildiğini göstermektedir. Çilek ile yapılan bir çalışmada 3.7-8.7 arasında denenen pH değerlerinden 8.7'nin antosiyanin üretimini kontrol değer olan 5.7'ye göre yaklaşık 2 kat artırdığı bildirilmektedir (Zhang ve Furusaki, 1997).

SONUÇ

Bu çalışma sonucunda *H. retusum* bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerinde en iyi biyokütle birikiminin, 0.5 mg L^{-1} KİN+ 1.0 mg L^{-1} 2,4-D ve 30 g L^{-1} sukroz ilaveli MS besi ortamında, pH'sı 5.8 ve sürekli karanlık şartlar altında olan ortamdaki elde edildiğini ortaya koymuştur. En yüksek fenolik bileşik içeriği, 0.1 mg L^{-1} BAP+ 0.5 mg L^{-1} 2,4-D ve 15 g L^{-1} sukroz ilaveli ve pH'sı 4.5 olan ortamdaki elde edilmiştir. Çalışmamızda yaptığımız çeşitli uygulamalarda, fenolik bileşen miktarlarının uygulanan gruplar arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumun, sekonder metabolit üretiminde, aynı süspansiyon kültüründe yer alan hücrelerin, metaboliti üreten ve üretmeyen hücrelerin karışımından oluşmuş olmaları nedeniyle, sekonder metabolit üretiminde çoğunlukla hücreler arasında farklılıkların bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, sekonder metabolit üretiminin, üretime katkıda bulunan hücreler arasında bile homojen olmayabileceği

ifade edilmiştir (Mukundan ve ark., 1998; Kim ve ark., 2004). Bu nedenle hücre süspansiyon kültürleri ile geniş ölçekli üretim, bitki hücrelerinin yavaş gelişmesi, düşük dayanım göstermeleri ve daha pek çok spesifik özelliklerinden dolayı son derece zor bir süreci içermektedir (Bourgaud ve ark., 2001).

KAYNAKLAR

- Agostinis P, Vantieghe A, Merlevede W, De WPAM, 2002. Hypericin in cancer treatment: More light on the way. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34: 221–41.
- Akgoz Y, Toker Z, 2013. Antioxidant And Antimicrobial Effects Of *Hypericum Retusum* Aucher Plant Extracts Prepared In Various Solvents. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22: 493 – 499.
- Bais HP, Walker TS, McGrew JJ, Vivanco JM, 2002. Factors affecting growth of suspension culture of *Hypericum perforatum* and production of hypericin. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38: 58-65.
- Bais HP, Walker TS, McGrew JJ, Vivanco JM, 2002. Factors affecting growth of suspension culture of *Hypericum perforatum* and production of hypericin. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38: 58-65.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD, 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharm Pharmacology*, 53: 583–600.
- Bertoli A, Cirak C, Teixeira da Silva J.A, 2011. *Hypericum* species as source of valuable essential oils. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5: 29–47.
- Butterweck V, Bockers T, Korte B, 2002. Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. *Brain Research*, 930: 21–9.
- Coste A, Vlase L, Halmagyi A, Deliu C, Coldea G, 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 106: 279–288.
- Crockett SL, 2010. Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). *Natural Product Communications*, 5: 1493–506.
- Cui X H, Murthy HN, Wu CH, Paek KY, 2010. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 103:7–14.
- Çakır Ö, 2004. Kimyasal kültürleme koşullarının *Astragalus chrysochlorus* hücre süspansiyon kültürleri üzerindeki çeşitli etkilerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 57s.
- Çetin ES, 2010. Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimi üzerine Araştırmalar. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 128s.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesine maddi destek sağlayan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP-Proje No: 13-FF-110) Birimi'ne teşekkür ederiz.

- Dall'Agno R, Ferraz A, Bernardi AP, 2003. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 10: 511–16.
- Davis PH, 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press
- Dias ACP, Seabra RM, Andrade PB, Ferreres F, Fernandes M, 2000. Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum*. *Plant Science*, 150: 93–101.
- Elliältioğlu Ş, Üstün A S, Mehmetoğlu Ü, 1998. Hücre süspansiyon kültüründe fitoaleksinin üretimi. *Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri*. E.Ü.Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 22-26 Haziran 1998, Bornova-İZMİR, S: 82- 96.
- Ertas A, Boga M, Yılmaz MA, Yesil Y, Hasimi N, Kaya MS, Kolak U, 2014. Chemical compositions by using LC-MS/MS and GC-MS and biological activities of *Sedum sediforme*, Jacq. Pau. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 62: 4601-4609.
- Gaspar T, Penel C, Greppin H, 1982. Peroxidases 1970–1980. A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. University of Geneva, Geneva
- Glick BR, Pasternak JJ, 2003. *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA 3rd Edition, Large Scale Production of Proteins from Recombinant Microorganisms*, ASM Press, Washington, 481-509. ISBN: 1-55581-269-4.
- Hahlbrock K, Scheel D, 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Molecular Biology*, 40: 347–369.
- Iranbakhsh AR, Oshagi MA, Ebadi M, 2007. Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. *Pakistan journal of Biological Sciences*, 10: 1236-1242.
- Isikalan C, Karakus P, Kuru IS, Celik KS, 2013. The Effect Of Uv-B On Fatty Acid Content And Radical Scavenging Activity Of Methanolic Extracts From *Hypericum Retusum* Aucher Grown Under In Vitro Conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22: 1184 – 1188.
- İlker R, 1987. *In vitro* pigment production: an alternative to color synthesis. *Food Technology*, 41: 70-72.
- Kızıllı G, Kızıllı M, Çeken B, Yavuz M, Demir H, 2011. Protective Ability of Ethanol Extracts of *Hypericum Scabrum* L. and *Hypericum Retusum* Aucher Against the Protein Oxidation and DNA Damage. *International Journal of Food Properties*, 14: 926-940.

- Kitanov GM, 2001. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics And Ecology*, 29: 171-178.
- Liu XN, Zhang Q, Zhang SX, Sun JS, 2007. Effects of cytokinins and elicitors on the production of hypericins and hyperforin metabolites in *Hypericum sampsonii* and *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 9: 1-7.
- Meruelo D, Lavie G, Lavie D, 1988. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proceeding of The National Academy of Science of USA*, 85: 5230-4.
- Namlı S, Akbaş F, Işıkalın Ç, Ayaz Tilkat E, Başaran D, 2010. The effect of different plant hormones (PGRs) on multiple shoots of *Hypericum retusum* Aucher. *Plant Omics Journal*, 3: 12-17.
- Namlı S, Işıkalın C, Akbaş F, Toker Z, Ayaz Tilkat E, 2014. Effects of UV-B radiation on total phenolic, flavonoid and hypericin contents in *Hypericum retusum* Aucher grown under *in vitro* conditions. *Natural Product Research*, 28: 2286-2292.
- Poutaraud A, Gregorio FD, Fook VC, Girardin P, 2001. Effect of light on hypericin content in fresh flowering top parts and in extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Planta Medica*, 67: 254-259.
- Praveen N, Murthy HN, 2010. Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide. *Bioresource Technology*, 101: 6735-6739.
- Romulo MLZ, Studart-Guimarães C, Landsmann J, Campos FAP, 1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 58: 155-157.
- Sakuta M, Takagi T, Komamine A, 1986. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *Journal of Plant Physiology*, 125: 337-343.
- Sökmen A, Gürel E, 2001. Sekonder Metabolit Üretimi, 211-261, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, ISBN: 975-6652-04-7.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J, 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1: 13-25.
- Walker TS, Bais HP, Vivanco JM, 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, 60: 289-293.
- Westwood MN, 1993. Hormones and growth regulators, temperate zone pomology: physiology and culture. Timber Press, Inc. S.W. Wilshire, 124, Portland, Oregon.
- Yeoman MM, Holden MA, Corchet P, Holden PR, Goy JG, Hobbs MC, 1990. Exploitation of Disorganized Plant Cultures for the Production of Secondary Metabolites, 139-166, Secondary Products from Plant Tissue Culture, Oxford University Press, New York, ISBN: 0-19-857717-6.
- Zhang W, Furusaki S, 1997. Regulation of Anthocyanin Synthesis in Suspension Cultures of Strawberry Cell by pH. *Biotechnology Letters*, 11: 1057-1061.
- Zhang YH, Zhong JJ, Yu JT, 1996. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *J Biotechnol*, 51: 49-56. Zhong JJ, Yoshida T, 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme Microbiology Technology*, 17: 1073-1079.