Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 7 (2): 10-14, 2014
ISSN: 1308-3961, E-ISSN: 1308-0261, www.nobel.gen.tr

Hypericum retusum Aucher'in Proliferasyonu ve Hiperisin İçerikleri Üzerine Farklı BAP Konsantrasyonlarının Etkisi

Hilal SURMUŞ ASAN[1]* Hasan Çetin ÖZEN[1] Ahmet ONAY[1] Nurettin ASAN[1]
[1]Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Diyarbakır

*Sorumlu Yazar:
E-mail: hilalsur@dicle.edu.tr

Geliş Tarihi: Haziran 28, 2014
Kabul Tarihi: Ağustos 03, 2014

Özet

Bu çalışmamızda, *Hypericum retusum* Aucher'in tohumları *in-vitro* ortamda çimlendirilmiştir. Çimlendirilen bu bitkicikler, farklı BAP (Benzilaminopürin) konsantrasyonlarının (0.1 -0.25- 0.5-1.0 mg/L BAP) bulunduğu MS (Murashige & Skoog) ortamlarında kültüre alınmıştır. Sürgün sayısı (52 sürgün/eksplant) ve uzunluğu (2.58 cm) bakımından en yüksek değer 0.5 mg/L BAP kullanılan gruptan elde edilmiştir. Fenolik bileşik (kuersetin, klorogenik asit, hiperosid, psödohiperisin, hiperisin ve rutin) analizleri LC-MS/MS metoduyla yapılmıştır. En yüksek fenolik bileşen içeriği ise 0.25 mg/L BAP ortamında prolifere edilen sürgünlerden elde edilmiştir. Kullanılan BAP konsantrasyonu arttırıldıkça fenolik bileşen içeriğinde düşüş meydana gelmiştir. En düşük fenolik bileşen içeriği 1.0 mg/L BAP ilaveli MS besi ortamından elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: BAP, Doku Kültürü, Fenolik Bileşik, *Hypericum*, LC-MS/MS.

Effect of Different Concentration of BAP on Proliferation and Hypericin Contents of *Hypericum retusum* Aucher

Abstract

In this study, the seeds of *Hypericum retusum* Aucher germinated in the *in-vitro* medium. This plantlets cultured in the MS medium with supplemented different concentrarions (0.1 -0.25- 0.5-1.0 mg/L) of BAP (Benzylaminopurin). In view of number (52 shoot/explant) and length of shoot (2.58 cm) the best result was obtained on the medium supplemented with 0.5 mg/L BAP. Phenolic compounds(quercetin, clorogenic acid, hyperosid, pseudohyperisin, hyperisin and rutin) analyses was performed by LC-MS/MS method. The highest phenolic compound contents were obtained from shoots proliferated in MS medium in presence of 0.25 mg/L BAP. When the used BAP concentrations were increased the phenolic compound contents were decreased. The lowest phenolic compound contents were obtained from MS medium supplemented with 1.0 mg/L BAP.

Keywords: BAP, Hypericum, LC-MS/MS, Phenolic compound, Tissue culture.

GİRİŞ

Bitkiler yüzyıllardır tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadırlar. *Hypericum* türleri de sahip oldukları tıbbi olarak önemli kimyasallar nedeniyle üzerinde oldukça fazla ilgi toplamaktadır. *Hypericum* cinsi *Guttiferae* familyasına aittir ve yaklaşık 484 türü bulunmaktadır [1].

Bugün dünya nüfusunun % 60'ı ve gelişmekte olan ülkeler nüfusunun % 80'i tedavi gereksinimlerini büyük ölçüde tıbbi bitkilerden sağlamaktadır [2]. Bugüne kadar bitkilerden üretilen yaklaşık 100.000 adet biyolojik aktif bileşen tanımlanmış olup bu sayı her geçen yıl artmaktadır [3]. Dünya çapında kabul görmüş ilaçların % 25'i ve 121 etken madde bitkisel kökenlidir [4].

Bu bitkiler arasında önemli yeri olan *Hypericum perforatum*, Guttiferae familyasından çok yıllık bir bitki olup 2000 yıldan daha uzun süredir tedavide kullanılmaktadır. Dünyanın çeşitli ılıman bölgelerinde yetişen bu bitki 25-60 cm boyunda olup, otsu veya alçak çalımsıdır. Çok yıllık olup, saçak kök sistemine sahiptir, yapraklar tam yaprak formundadırlar ve sap üzerinde karşılıklı olarak dizilmişlerdir [5]. *Hypericum* türleri yeryüzünde Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'da geniş yayılış gösterir. Ülkemizde 84 türü bulunan *Hypericum*, Marmara, Karadeniz, Ege, Orta ve Doğu Anadolu, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde 13 türü bulunmaktadır. Kantaron, kantarum, koyunkıran ve binbirdelik otu adlarıyla da bilinir [6, 7, 8].

Hypericum türlerinde çok sayıda biyolojik aktif kimyasal gruplar tespit edilmiştir. Özellikle *H. perforatum* çok sayıda sekonder metabolit sınıfı içermektedir. Bunlardan en önemlileri naftodiantronlar (hiperisin, psödohiperisin, protohiperisin v.b.); flavonoidler (kamferol, kersetin, luteolin, hiperin, hiperosid v,b.); floroglusinoller (hiperforin, furohiperforin v,b.) ve uçucu yağlardır [9]. Hiperisin ve hiperforin, *Hypericum*'un gösterdiği klinik etkilerin çoğundan sorumlu olup üzerinde en çok çalışılan bileşenleridir. *H. perforatum*' da çiçeklerin ve yaprakların çevresinde gözle açıkça görülebilen siyah oval noktacıklar *H. perforatum* için karakteristiktir. Bu oval noktacıklar (salgı cepleri), hiperisin toplama ve özel flavonoid moleküllerini içeren kısımlardır [7, 8, 10]. Hiperisin, *H. perfaratum*'dan elde edilen bilinen en güçlü ışığa duyarlı doğal pigmenttir.

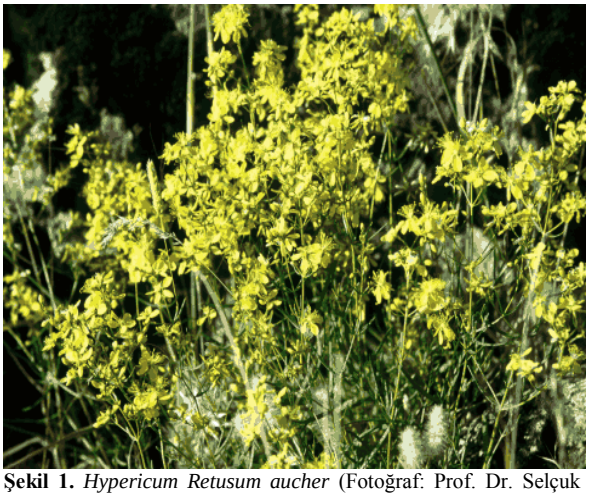
Bu türün anti depresan [11, 12], anti viral, anti bakteriyal [13, 14] antikanser [15, 16], yara ve yanıklarda iyileştirici etkileri vardır [17, 18].

Bitki biyoteknolojisinin kullandığı temel yöntemlerden biri olan doku kültürü, steril koşullarda yapay bir besi ortamı kullanarak, bütün bir bitki veya bitkinin çeşitli kısımlarından yeni bitki, doku, hücre veya bitkisel ürünlerin elde edilmesine olanak verir. Doku kültürü yöntemleri kullanılarak günümüzde birçok bitkinin hücre, doku ve organ kültürleri yapılabilmektedir. Bu kültürlerde, sekonder metabolit üretimi de gerçekleştirilebilmektedir [19].

Biz de bu çalışmamızda doku kültürü tekniğini kullanarak *H.retusum*'un sürgün gelişim parametresine ek olarak BAP konsantrasyonlarının bu bitkideki sekonder metabolitlerden, fenolik bileşen içerikleri üzerine etkilerini de araştıracağız.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan *Hypericum retusum* Aucher'in bitkileri (Şekil 1.), 2001 tarihinde Diyarbakır ilinden toplanmıştır. Bu bitkilere ait örnekler Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi herbaryumunda tutulmaktadır [*A.S.Ertekin 2001-326* (DUF)].



Şekil 1. *Hypericum Retusum aucher* (Fotoğraf: Prof. Dr. Selçuk Ertekin)

Çimlenme ve Proliferasyon

Bu aşamada *Hypericum Retusum* aucher bitkisinin tohumları steril edildi. Daha sonra tohumlar, çimlenmesi için hormonsuz MS besi ortamına aktarıldı [20].

Çimlendirilen tohumlardan elde edilen bitkicikler, iyi sürgünler elde etmek ve fenolik bileşenlerdeki değişimleri incelemek üzere farklı BAP (6-benziladeninaminopürin) konsantrasyonlarının (0.1, 0.25, 0.5 ve 1 mg/L) bulunduğu MS ortamlarında kültüre alınarak sürgün oluşumu sağlandı. Sürgün oluşumuna ait veriler tablo halinde gösterildi.

Çizelge 1. Farklı BAP Konsantrasyonlarında Yetiştirilen Bitkilerin Ortalama Sürgün Sayısı ve Uzunluğu

BAP Konsantrasyonu (mg/L)	Ortalama Sürgün Sayısı	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm)
0.1 BAP	10.25±1.802a	2.066±0.433a
0.25 BAP	23.58±2.625b	2.240±0.930b
0.5 BAP	52.00±4.828c	2.580±0.820c
1.0 BAP	20.25±1.520d	1.614±0.675d

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

Analiz

İn vitro ortamdan elde edilen *H.retusum*'un sürgünleri besiyerlerinden alındıktan sonra pens ve bisturilerle istenmeyen kısımları kesilerek uzaklaştırıldı ve dokular daha sonra oda sıcaklığında, kurutma kağıtları üzerinde kurutuldu. Kurutulan örnekler bir öğütme makinesinde toz haline getirildi. Kuru örneklerin her birinden alınan 0.20 g bitki materyali üzerine 10 mL metanol eklenip çözelti 5 dakika süre ile sonikatörde (Sanyo MSE-Soniprep 150, U.K.) özütlendi. Özütleme işleminden sonra elde edilen çözelti vakum ile süzüldü. Bu işlemler 3 kez tekrarlandı. Üç işlem sonunda elde edilen metanol kısımları 50 mL'lik cam balonlarda toplandı. Çözeltideki metanol evaporatör (IKA, RV 10 DS 99) yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra kabın içinde, hiperisin bileşiklerini içeren renkli bir tortu oluştu. Bu tortu metanolle çözülerek seyreltildikten sonra 0,2 µm filtreden geçirildi ve LC-MS/MS'e (Shimadzu, LC-MS 8040 - üçlü kuadrupol) enjekte edildi

İstatiksel Analiz

Kültürler üzerinde çalışılan farklı BAP uygulamalarıyla oluşturulan gruplar ve fenolik bileşen analizleri sonucunda elde edilen bulgular 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.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sürgün Proliferasyonu

*H. perforatum'*un ticari üretiminde bugüne kadar tarla tarımı ya da doğadan toplama yöntemleri kullanılmaktaydı. Fakat bu yöntemlerde, değişik çevresel faktörler, kirleticiler, bakteriler, mantarlar, virüsler ve böcekler gibi etkenlere maruz kaldığından dolayı bu bitkilerin sahip olduğu etkili madde içeriğinin büyük ölçüde değiştiği bildirilmiştir [21].

Örneğin Southwell ve Bourke (2001), *H. perforatum* bitkilerinde hiperisin ve psedohiperisin içeriği bakımından yazın ve kışın yetişen bitkiler arasında 50 misli fark olduğunu bildirmişlerdir [22]. Benzer şekilde ABD'de ticari olarak üretilen *H. perforatum* kapsüllerinde en düşük ve en yüksek hiperisin derişimleri arasında 13-17 kat fark olduğu tespit edilmiştir [23]. Çırak ve ark.(2006), *H. perforatum, H. aviculariifolium* ve *H. Pruinatum* bitkilerinde hiperisin oranının gün içerisinde bile önemli seviyede değişim gösterdiğini bildirmişlerdir [24]. Bu gibi sebeplerden ötürü, tıbbi bitkilerin *in vitro* teknikleri kullanarak uniform ve steril bir sekonder metabolit üretiminde değişik dış şartlardan kaynaklanan kalite problemlerinin çözülmesinde anahtar faktör olacağı düşünülmektedir [25].

Biz de bu amaçla çalışmamızda *Hypericum retusum Aucher* bitkisini doku kültüründe yetiştirdik.

Öncelikle çimlendirmiş olduğumuz bitkiciklerden iyi sürgünler elde etmek üzere apikal sürgünler (yaklaşık 1cm) farklı BAP konsantrasyonlarının (0.1, 0.25, 0.5 ve 1.0 mg/L) bulunduğu MS ortamlarında kültüre alındı.

Çalışma sonucunda, proliferasyon için kullanılan ortamlarda yetiştirilen bitkilerin gelişimine bakıldığında, 0.1 mg/L BAP kullanılan ortamda gelişen bitkiciklerin bir veya iki sürgün halinde gelişirken, sürgün sayısı ve uzunluğu kullanılan BAP konsantrasyonu yükseldikçe arttığı ve 0.5 mg/L BAP kullanılan ortamda en fazla sayıda ve en uzun sürgünlerin (52.00 sürgün/eksplant, 2.5 cm)

oluştuğu gözlenmiştir. BAP konsantrasyonunun daha da arttırılmasıyla (1.0 mg/L) ise daha az sayıda ve kısa sürgünler oluşmuştur. (Çizelge 1.). Benzer bir çalışmada, Namlı ve ark. (2010), *H.retusum'*da sürgün proliferasyonu için BAP ve Kinetin BBD (bitki büyüme düzenleyicilerinin) farklı konsantrasyonları içerisinde içerisinde, en yüksek sürgün sayısını (64.25sürgün/eksplant) 0.5 mg/L BAP kullandıkları MS ortamında elde etmişlerdir [20].

Hypericum triquetrifolium Turra.'nın tohumlarının *in vitro* da çimlenmesiyle elde edilen sürgünlerinde, farklı BAP (0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L) uygulamaları içerisinde en yüksek sürgün sayısı 2.0 mg/L BAP ilaveli ortamdan elde edilmiştir [26].

Ayrıca daha önceki bir çalışmada, BAP (0.4 mg/L) uygulamasının sürgün morfolojisini değiştirdiğini internodların kısaldığını daha küçük yaprakların farklılaştığını, köklenmenin baskılandığını ve proliferasyon oranını arttırdığını saptamışlardır [27]. Bu da çalışmamızda sürgün gelişiminin BAP uygulamasıyla değiştiği sonucunu doğrulamaktadır.

Fenolik Bileşen İçeriği

Hypericum türlerinde in vitro ortamda elde edilen sürgünler üzerine yapılan farklı uygulamalarla sürgün gelişimi ve fenolik bileşen içeriğini attırmaya yönelik pek çok çalışma mevcuttur.

Yamaner (2013*), in vitro'*da geliştirdiği *Hypericum adenotrichum* Spach.'ın sürgünlerini, 15 ve 30 gün boyunca MS ortamında mannan (10, 50 ve 100 mg/L) veya pektin (10, 50 ve 100 mg/L) elisitörlerine maruz bırakmış, bu sürgünlerin HPLC analizleri sonucu, en iyi sonuçların 50 mg/L mannan veya pektine 15 gün boyunca uygulamasından elde edildiğini, ayrıca mannanın, psödohiperisin üretimini 2.8 kat ve hiperisin üretimini de 1.7 kat uyarırken, pektinin, psödohiperisin üretimini 4.8 kat ve hiperisin üretimini de 2.7 kat uyardığı tesbit etmiştir [28].

Coste ve ark.(2011), BAP (0.4 mg/L) veya Kinetin (0.4 mg/L) uygulamasının *H. maculatum*'da hiperisinlerin, *H.hirsutum*'da ise hiperforin üretimini arttırdığını bulmuşlardır [27].

Liu ve ark. (2007), *H. perforatum*'un modifiye edilmiş MS ortamlarına % 50 azaltılmış amonyum nitrat ve potasyum nitrat, BAP (0.44 µM) ve IBA (0.049 µM) eklenmesi, hiperisinlerin üretiminde artışa neden olmuştur. Benzer sonuçlar *H. sampsonii*'nin besi ortamındaki çok küçük değişikliklerle (0.46 µM ZT ve 0.049 µM IBA) de elde edilmiştir. *H. perforatum*'da ortama TDZ (0.45 µM) ilavesiyle psödohiperisin ve hiperisin üretiminde kontrole oranla yaklaşık 2.95 - 2.62 kat artış olmuştur [29].

Çalışmamızda kullandığımız farklı BAP konsantrasyonları içerisinde, en yüksek fenolik bileşik miktarları (hiperosid hariç) 0.25 mg/L BAP kullanılan ortamda prolifere edilen sürgünlerden elde edilmiştir.

En yüksek hiperisin klorogenik asit, kuersetin ve psödohiperisin içerikleri (sırasıyla 68.929, 103.051, 9.329 ve 93.759 ng/mg) 0.25 mg/L BAP içeren MS besi ortamında gelişen bitkiciklerden elde edilmiştir. Hiperosid içeriği ise yüksek BAP konsantrasyonunda (1.0 mg/L BAP), en yüksek düzeyde (85.063 ng/mg) bulunmuştur.

BAP konsantrasyonun daha fazla artması fenolik bileşen içeriğinde azalmaya neden olmuştur. 1.0 mg/L BAP konsantrasyonunda en düşük fenolik bileşen içeriği elde edilmiştir. Bu örneklerde rutin bulunamamıştır (Çizelge 2).

Benzer bir çalışmada *İn vitro* da *Hypericum triquetrifolium* Turra.'nın tohumlarının çimlenmesiyle elde edilen sürgünlerin, farklı BAP (0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L) konsantrasyonlarının bulunduğu MS ortamlarında kültüre alınmasıyla yapılan çalışma sonucunda, en yüksek hiperisin oranı 1.0 mg/L BAP ilaveli ortamdan elde edilmiştir [26].

Charchoglyan ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, *H. perforatum* sürgün kültüründe hiperforin'in polifreniletid aşilfloroglisinol grubundan üç türevini bulmuşlardır. Buradaki seko-hiperforinin yapısı LC-DAD, -MS ve –NMR ile doğrudan açıklanmıştır. Çoklu sürgün kültürlerinde, hiperforinden seko-hiperforin oluşumu fitohormon olan BAP ve NAA'ten güçlü bir şekilde etkilendiği, BAP'ın artan oranlarının hiperforin düzeyini uyardığı ve NAA'in düzeyindeki artışın ise seko-hiperforin düzeyini artırdığı saptanmıştır [30].

Çırak (2006), in vitro ortamdan elde ettiği kalluslardan, *H. perforatum*'un 1.0 mg/L BAP, *H. Bupleuroides*'in ise 2.0 mg/L BAP ile desteklenmiş MS besi ortamlarında alt kültüre alındıklarında yoğun bir sürgün gelişimi sergilediğini, *H. bupleuroides* sürgünlerinin BAP (1, 2.5 ve 5 mg/L), 2,4-D ve Kinetin (0.5, 1 ve 1.5 mg/L) içeren MS ortamında geliştirilmesi ile de hiperisin ve toplam fenolik oranları ile sürgün yaş ve kuru ağırlıkları üzerine bir etkileri olmadığını tesbit etmiştir [31].

İn vitro kültürlerinde besi ortamlarına fitohormonal ilaveler spesifik naftadiantronların birikimini etkilemektedir. *Hypericum*'un *in vitro* kültürlerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin hiperisin ve psödohiperisin içeriği üzerine etkilerini bulmak için yaptığı çalışmada, naftadiantronların miktar tayinleri için HPLC kullanılmış ve sonuçlar ESI-MS ile doğrulanmıştır. BAP ilaveli katı MS/B5 ortamında yetiştirilen sürgünlerden bitkiler çoğaltılmış ve kalluslar geliştirilmiştir. *H. perforatum*'un kallus sürgün ve bitkileri hiperisin ve psödohiperisin üretmişlerdir. Kallus kültürlerinde BAP hiperisin içeriklerini değiştirmemiştir. *Hypericum* bitkileri oksin

Çizelge 2. Sürgünlerinin fenolik bileşen miktarı üzerine farklı BAP konsantrasyonlarının etkisi.

BBD	Hiperisin	Hiperosid	Klorogenik asit	Kuersetin	Psödohiperisin	Rutin
0.1 BAP	60.748±0.101a	12.459±0.123a	99.082±0.959a	6.595±0.795a	80.761±1.486a	T.E*
0.25 BAP	68.929±0.163b	13.465± 0.183b	103.051±2.976b	9.329± 0.066b	93.759±0.071b	T.E*
0.50 BAP	36.929±1.149c	6.952 ±0.703c	68.985 ±1.070c	5.614± 1.213a	65.089±0.990c	T.E*
1.00 BAP	10.513±1.336d	85.063±0.650d	21.294±1.894d	2.220±1.279c	13.918±2.116d	T.E*

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

(IAA ve IBA) varlığında hiperisin ve psödohiperisin üretmişlerdir. Bitkilerde IAA varlığı naftadiantronların üretimini etkilememiş fakat IBA hiperisin ve psödohiperisin miktarını azaltmıştır. *Hypericum*'un *in vitro* kültürleri hiperisin ve psödohiperisin üretimi için gelecek vaad eden sistemlerdir [32].

Hypericum perforatum'un *in vitro* yetiştirilen sürgünlerinin HPLC analizleri sonucu, total hiperisin ve floroglucinol ile hiperisin/protohiperisin ve psödohiperisin/ protopsödohiperisin içeriği arasında belirgin bir orantı olduğu bulunurken *Hypericum perforatum* sürgünlerinin erken gelişim aşamasında hiperforin ve adhiperforin olduğu ilk kez ortaya konmuştur [33].

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, farklı BAP konsantrasyonlarının *Hypericum retusum* Aucher'de sürgün boyu ve sayısıyla fenolik bileşen miktarlarında değişikliklere neden olabildiği görülmüştür. İleriki çalışmalarda farklı BBD (bitki büyüme düzenleyicileri) ve bunların faklı konsantrasyonları kullanılarak, bitkilerdeki sekonder metabolit miktarlarını arttırmaya yönelik çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

[1] Crockett SL, Robson NKB. 2011. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus Hypericum. Medicinal and aromatic plant science and biotechnology. Global Sci Books 5:1–13.

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

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

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

[5] Seçmen Ö. 1986. Tohumlu Bitkiler Sistematiği, Ege Üniveritesi Yayınları, İzmir, 224-225.

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

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

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

[9] Nahrstedt A, Butterweck V. 2010. Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's Wort (perpendicular).J Nat Prod 28: 1015–1021.

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

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

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

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

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

[15] Cooper EL. 2006. Ecam 2006; 3(2), P: 167–169.

[16] Ali SM, Olivo M, Yuen GY, Chee S K. 2001. Induction Of Apoptosis By Hypericin Through Activation By Hypericin Through Activation Of Caspase-3 In Human Carcinoma Cells. International Journal Of Molecular Medicine 8: 521-530.

[17] Neves JM, Matos C, Moutinho C, Queiroz G, Gomes LR. 2009. Ethnopharmacological Notes About Ancient Uses Of Medicinal Plants In Trás-Os-Montes (Northern Of Portugal). Journal Of Ethnopharmacology, 124: 270–283.

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

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

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

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

[22] Southweell A I, Bourke C A. 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L.Phytochemstry,56: 437-441.

[23] Anonymous. 1998. New Good Housekeeping Institute study finds drastic discrepancy in potencies of popular herbal supplement, in: Proceedings of the Consumers Safety Symposium on Dietary Supplements and Herbs, Good Housekeeping Institute, New York, 2 March 1998.

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

[25] Zobayed SMA, Saxena PK. 2004. Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 40: 108-114.

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

[27] 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.

[28] Yamaner Ö, Erdağ B, Gökbulut C.2013. Stimulation of the production of hypericins in in vitro seedlings of *Hypericum adenotrichum* by some biotic elicitors. Turk J Bot, 37: 153-159 TUBİTAK

[29] Liu XN, Zhang XQ, Sun JS.2007. Effects of cytokinins and elicitors on the production of hypericins and hyperforin metabolites in Hypericum sampsonii and Hypericum perforatum. Plant Growth Regulators 53: 207–214.

[30] Charchoglyan A, Abrahamyan A, Fujii I, Boubakir Z, Gulder TAM, Kutchan T M, Chong TM, Abdullah MA, Lai OM, Nor'Aini FM, Lajis NH. 2005. Effective elicitation factors in Morinda elliptica cell suspension culture, Process Biochemistry, 40: 3397–3405.

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

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

[33] Kosuth J, Koperdakova A, Hohtola A, Cellarova E.2003. The content of hypericins and phloroglucinols in Hypericum perforatum L. seedlings at early stage of development. Plant Science, 165: 515-521.