



Thamnobryum alopecurum'un *in vitro* Doku Kültürü, Fitokimyasal İçeriği, Biyolojik Aktivitesi

Thamnobryum alopecurum (Hedw.) Gangulee *in vitro* Tissue Culture, Phytochemical Content, Biological Activity

Yasin Hazer^{1*}, Hatice Çölgeçen², Ufuk Koca-Çalışkan³, Güray Uyar⁴

¹Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

²Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak, Türkiye

³Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi, Polatlı Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

Öz

Bu çalışmada, biyolojik ve farmakolojik olarak aktif bileşiklerin potansiyel kaynağı olabilecek olan *Thamnobryum alopecurum*'un sporlarından ve gametofit yapılarından *in vitro* doku kültürü tekniğiyle gametofit üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca doğadan toplanan ve *in vitro* doku kültürü ile üretilen örneklerde, 12 farklı fenolik bileşiğin kantitatif miktarları belirlenmiştir. Aynı zamanda herbarium ve doğadaki taze örneklerinin total fenol içeriği ve antioksidan aktivitesi yönünden değerlendirilmiştir.

Çalışmada *in vitro* doku kültürü, gametofitin klorofilli uç sürgünleri ve sporofit kapsüllerinden elde edilen sporların modifiye MS (Murashige ve Skoog) ortamlarına (farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiş) ekimiyle yapılmıştır. *T. alopecurum*'un spor kültüründe en iyi büyümenin gerçekleştiği ortam MS₃ iken gametofit kültüründe ise bu ortam MS₁'dir.

Total fenol içeriği bakımından gallik asit eşdeğerine göre *T. alopecurum*'un 0,0065±0,0015 mg/g içeriğe sahip olduğu saptanmıştır. Herbarium örnekleri ve *in vitro* doku kültürü ile üretilen örneklerinde, 12 farklı fenolik bileşiğin (gallik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kemferol, genistein, kersetin, biokanin A, daidzein, formononetin, şikimik asit) HPLC-UV ile kantitatif miktar tayinleri yapılmıştır. *T. alopecurum* spor ve gametofit kültürlerinde en yüksek miktarda şikimik asit MS₈ ortamında 120,92±41,4 olarak saptanmıştır. Herbarium örneklerinde ise en yüksek miktarda Nisan ayında toplanan ekstraktlarında şikimik asit 3,52±1,84 mg/g olarak belirlenmiştir.

T. alopecurum etkin bir şekilde *in vitro* doku kültür ortamlarında üretilmiş, bununla beraber kayda değer antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve ayrıca bazı fenolik bileşiklerin bulunması nedeniyle briyofit türlerinin gelecekteki ileri biyoteknolojik çalışmalarda kaynak olacağı kanaatini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Thamnobryum alopecurum*, *in vitro* doku kültürü, Antioksidan aktivite, Total fenol içeriği

Abstract

In this study, gametophyte production was performed from *T. alopecurum* spores which have a potential source of biologically and pharmacologically active compounds, and gametophyte structures by *in vitro* tissue culture technique. In addition, quantitative amounts of 12 different phenolic compounds were determined in samples both collected from nature and produced by *in vitro* tissue culture. At the same time, fresh samples of *T. alopecurum* and herbarium specimens were evaluated in terms of their total phenol content and antioxidant activities.

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: yasin_hzr@hotmail.com

Yasin Hazer orcid.org/0000-0001-8870-0017

Hatice Çölgeçen orcid.org/0000-0001-8246-4279

Ufuk Koca-Çalışkan orcid.org/0000-0002-5216-7588,

Güray Uyar orcid.org/0000-0003-4038-6107

The *in vitro* tissue culture was implemented by planting the terminal shoots of gametophyte and spores of mature capsules into modified MS (Murashige and Skoog Media (plant growth regulators added at different concentrations) medium. While the best growth in *T. alopecurum* spores culture was observed in MS₃ medium, in gametophyte culture it was MS₁ medium.

In terms of total phenol content, according to gallic acid equivalents, it was defined that *T. alopecurum* had the content of 0,0065±0,0015 mg/g on the average. On the herbarium samples of *T. alopecurum* and the other ones that were produced by *in vitro* tissue culture techniques, quantitative analyses of 12 different phenolic compounds (gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, taxifolin, rosmarinic acid, kaempferol, genistein, quercetin, biochanin A, daidzein, formononetin, shikimic acid) were determined by means of HPLC-UV. The highest amount of shikimic acid of *in vitro* spores and gametophyte culture was in MS₈ medium as 120,92±41,4 mg/g. However, in herbarium samples collected in April, the highest amount of shikimic acid was determined as 3,52±1,84 mg/g.

With this study, *T. alopecurum* is effectively produced in *in vitro* tissue culture media. The results also show that it has considerable antioxidant activity, which suggests that because of the presence of some phenolic compounds bryophyte species will be the source of future biotechnological studies.

Keywords: *Thamnobryum alopecurum*, *in vitro* tissue culture, Antioxidant activity, Total phenol content

1. Giriş

Tohumlu bitkilerden sonra bitkiler aleminin en büyük ikinci grubu olan bryofitler ile ilgili yapılan moleküler çalışmalar sonucunda, briyofitler Bryobiotina alt alemi (subkingdom) altında 3 bölüme (divisio) ayrılmıştır. Bu bölümler; Bryophyta (yapraklı karayosunları, yaklaşık 13.000 tür), Marchantiophyta (çiğeroğulları, yaklaşık 7200 tür) ve Anthocerotophyta (boynuzotları, yaklaşık 215 tür)'den oluşmaktadır (Konrat vd. 2008, Glime 2009, Goffinet ve Shaw 2009, Villarreal vd. 2010, Söderström vd. 2016). Çalışma materyali *Thamnobryum alopecurum* (Hedw.) Gangulee dendroid şekilli bir yapıya sahiptir. Bincil gövdeler substrata paralel olarak gelişirken, dallanma yapan ikincil gövdeler substrata diktir. Sporofit ana gövde veya dallar üzerinde küçük tomurcuk benzeri cüce yan dallarda gametofite dik olarak bulunur (Smith 2004).

Briyofitlerdeki *in vitro* doku kültürü üzerine yapılan çalışmalar, IUCN kriterlerine göre kırmızı liste kategorisinde yer alan türlerin korunması, biyolojik aktif bileşiklerin belirlenmesi ve yeni bileşiklerin tespiti için son zamanlarda hızla artmaktadır (Gonzalez vd. 2006). Geçmişte, bitki büyüme düzenleyicilerinin briyofitlerin gelişimi üzerindeki etkisi ile ilgili birkaç çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda yalnızca *in vitro* kültürü yapılan karayosunu türleri üzerinde, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi araştırılmıştır (Sabovljević vd. 2010a, b).

Geçmişte fenolik bileşiklerle yapılan çalışmalar karmaşık yapılarından dolayı ertelenmiş, günümüzde ise hız kazanmıştır. Hayvan model deneyleriyle yapılan çok sayıda araştırma, diyetle eklendiklerinde kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve osteoporoz gelişimini sınırladıklarını göstermiştir (Scalbert vd. 2005).

Sabovljević vd. 2012 *T. alopecurum*'un *in vitro* kültürü çalışmasında, 10 farklı besin ortamı, 2 farklı ışık periyodu (16/8 ve 8/16), 18, 20, 25±2 °C sıcaklıklarda ve yüzey sterilizasyonu için 6 farklı NaOCl (%3, %5, %7, %10, %13 ve %15) konsantrasyonlarında denemeler yapmıştır. Yüzey sterilizasyonu için en iyi %10'luk konsantrasyonda, en iyi MS ortamları arasında MS₇'de (MS mineral tuzları, 0.1µM IBA ve 0.03µM BAP), 16/8 gündüz/karanlık ışık periyodunda ve 20±2 °C'de elde etmiştir. Ayrıca, ortamlara şeker eklendiğinde spor çimlenmesini teşvik ettiği fakat gametofit gelişimini durduğunu gözlemlemiştir.

Bu çalışmada, biyolojik ve farmakolojik olarak aktif bileşiklerin potansiyel kaynağı olabilecek *T. alopecurum*'a ait sporlardan ve gametofit yapılarından *in vitro* doku kültürü teknikleriyle çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu aşamada doğadan toplanan taze ve herbaryum örneklerinin farklı büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiş MS ortamlarında gelişimi gözlenmiştir. Sonraki aşamada doğadan toplanan örnekler ile doku kültürü ile üretilen örneklerde 12 farklı fenolik bileşiğin kantitatif miktarı kromatografik yöntemlerle belirlenmiştir. Ayrıca, herbaryum örnekleri ile doku kültürü örneklerinin antioksidan aktivitesi ve total fenol içeriği de saptanmıştır. *T. alopecurum* spor ve gametofitlerinden doku kültürü teknikleriyle üretilmesi ve potansiyeli yüksek biyolojik aktif bileşiklerin bir kaynağı olabileceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Bitki Materyali

Thamnobryum alopecurum'un taze örnekleri (2012 Nisan ve Kasım aylarında) Zonguldak'ın Değirmenağzı mevkiinden toplanmıştır. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Briyofit

Herbaryumu'nda (ZNG) kesin teşhisi yapıldıktan sonra bir kısmı bitki doku kültür materyali olarak buzdolabında -20 °C'de saklanmıştır.

2.2. *T. alopecurum in vitro* Doku Kültürü

T. alopecurum'un *in vitro* kültür denemeleri gametofitin klorofilli vejetatif sürgünleri ve açılmamış olgun kapsüllerindeki sporlar ile yapılmıştır. Sporofit ve gametofit kısımları ince uçlu pens yardımıyla dikkatlice ayrılarak çeşme suyunda 30 dak. bol suyla yıkanmıştır. Laboratuvarında yıkanan dokular bir damla tween 20 damlatılmış ve %5'lük sodyum hipoklorid çözeltisinde 5 dk. steril edilmiştir. Daha sonra laminar flow kabin içinde kapsüller ve gametofit sürgünleri, 4 kez distile steril su ile durulanmıştır. 8 farklı MS (Murashige ve Skoog) ortamı, B5 gamborg vitamin, farklı konsantrasyonlarda 2,4 D (2,4-diklorofenoksiasetik asit), Kinetin, 30 g/l sükröz veya şekeriz, 6 g/l agar içerecek şekilde modifiye edilmiştir (Murashige ve Skoog 1962, Gamborg vd. 1968) (Çizelge 1). Her petriye beşer adet 2-5 mm boyunda gametofit sürgün uçları ekilmiştir. Sporlar ise her petriye 5 farklı noktaya serpilerek ekimleri yapılmıştır. 4 haftalık periyotlarla alt kültüre alınmıştır. Büyüme odasının ışığı 27,5 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ (yaklaşık 2200 lüks) ışık yoğunluğunda olacak şekilde cool floresans lambalarla (Serin beyaz ışık) 24 \pm 2 °C'de 16/8 saat fotoperiyodunda sağlanmıştır.

Çizelge 1. 8 farklı MS ortamı içeriği.

Ortam	Şeker (g/l)	2,4 D (mg/l)	Kinetin (mg/l)
MS ₁	Şekeriz	-	-
MS ₂	30	-	-
MS ₃	30	0,5	0,5
MS ₄	Şekeriz	0,5	0,5
MS ₅	30	0,5	1
MS ₆	Şekeriz	0,5	1
MS ₇	30	0,5	1,5
MS ₈	Şekeriz	0,5	1,5

Tüm ortamlar 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmadan önce pH:5.8 olarak ayarlanmıştır. Kültürlerin aylık olarak büyüme miktarları ise çap olarak ölçülmüştür.

2.3. Ekstraksiyon Metodu

Bitkinin gametofit kısımları topraklarından arındırılıp çeşme suyunda temizlenmiştir. Herbaryum ve *in vitro* kültür örnekleri liyofilizatörde kurutularak toz haline getirildikten sonra 1'er gr tartılmıştır. Örnekler 10 ml %80 MeOH ile 1 saat çalkalayıcıda çalkalanarak filtre edilmiş ve yine örnekler

15 ml %80 MeOH ile 24 saat tekrar çalkalanmış ve filtre edilmiştir. %80 MeOH rota evaporatörde uçurulmuştur. Bütün örnekler %100 MeOH ile 2 ml'ye tamamlanmıştır. Bu ekstraktlar antioksidan aktivite ve total fenol miktarı tayini çalışmasında da kullanılmıştır.

2.4. Standartlar ve Kimyasallar

HPLC'de kullanılan standartlar (Kafeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kemferol, genistein, kersetin, biokanin A) (Şekil 1), DPPH, BHT, BHA, folin reaktifi, gallik asit, asetonitril (Sigma-Aldrich)'ten; Metanol ve Etanol (Merck)'ten temin edilmiştir.

2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analizleri

2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Deneylerde Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Dalgaboylu Dedektör, WPS-3000SL Analitik Otoörnekleyici kullanılmıştır.

2.5.2. Kolon

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Thermo Scientific Acclaim TM 120 C18 3 μl 120 Å 4,6x150 mm kolon kullanılmıştır.

2.5.3. HPLC Gradyent Elüsyon Programları

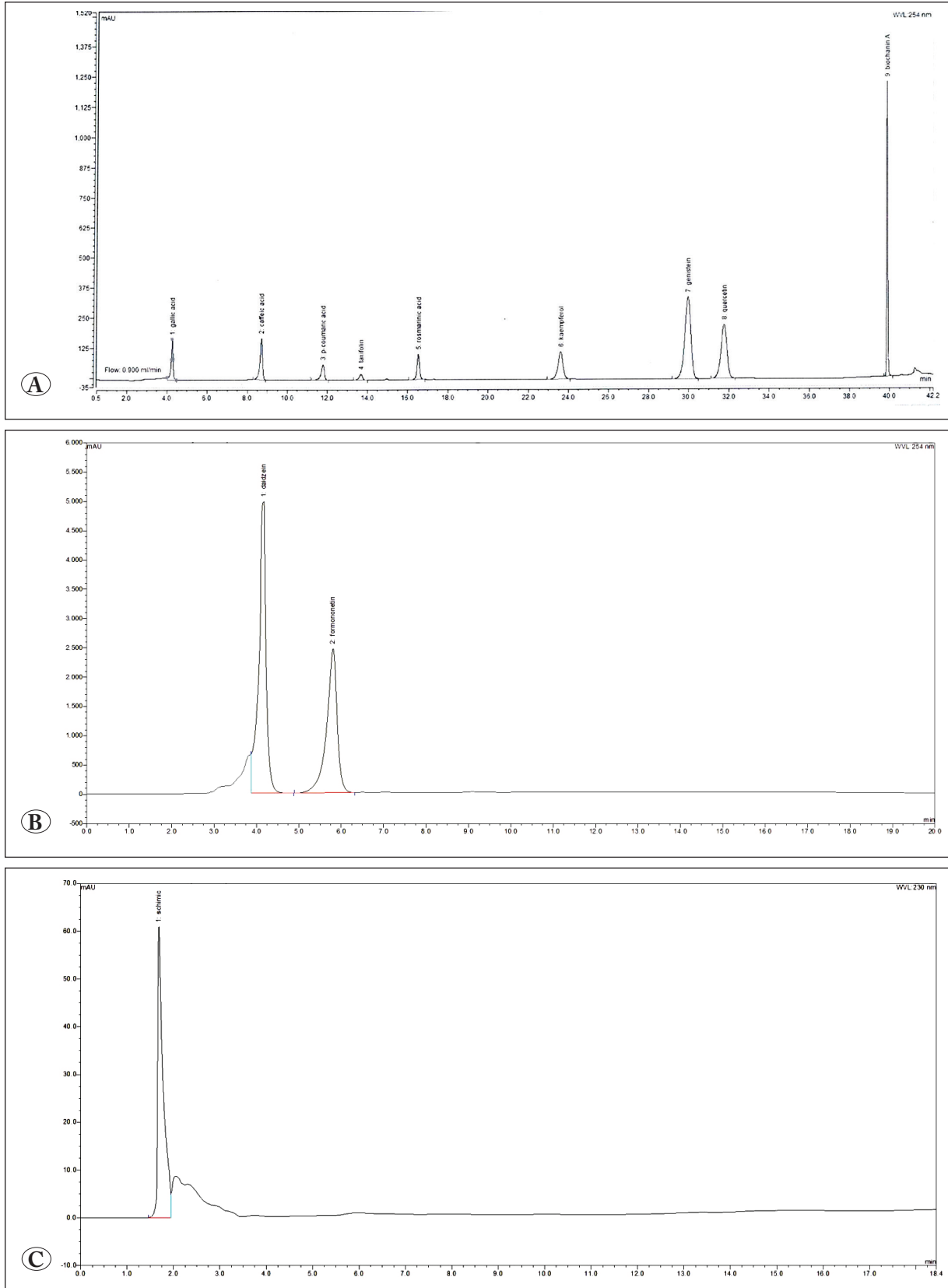
Standartlar için 3 farklı gradyent elüsyon programı uygulanmıştır. RP-HPLC-UV cihazında dokuz fenolik bileşik standardı (kafeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kemferol, genistein, kersetin, biokanin A ve gallik asit) için hazırlanan gradyent elüsyon programı aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 2). HPLC gradyent elüsyon programı akış hızı dakikada 0,9 ml/dk, 20 μl enjekte edilerek maksimum absorbans 254 nm'de ölçülmüştür. Daidzein, formononetin ve şikimik asit için farklı gradyent elüsyon programları kullanılmış ve farklı değerlerde maksimum absorbanslar uygulanmıştır.

2.6. Antioksidan aktivite ve Total fenol içeriği

Antioksidan ve total fenol içeriğini belirlemek için, herbaryum örnek ekstraktları %100 MeOH ile 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çalışmada Tetra Marka T80+ UV/VIS Spectrometer PG Instruments kullanılmıştır.

2.6.1. DPPH Metodu

Doğadan taze toplanan örneklerin antioksidan aktivitesi tayin yöntemi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) kullanılarak ölçülmüştür. Ekstrelerin DPPH üzerindeki



Şekil 1. A) 100 ppm konsantrasyonlarda 9 farklı standardın kromatogramı, B) 250ppm daidzein ve formononetin standardının kromatogramı (254 nm), C) 100 ppm şikimik asit standardının kromatogramı (230 nm).

Çizelge 2. Gradyent Elüsyon Programı

Gradient Elüsyon	Zaman (dakika)	%A (Asetonitril)	%B (Ultra Saf Su)+ %1 Formik Asit (v/v)
Akış Hızı 0,9 ml/dk	0	95	5
Akış Hızı 0,9 ml/dk	3	85	15
Akış Hızı 0,9 ml/dk	13	75	25
Akış Hızı 0,9 ml/dk	25	70	30
Akış Hızı 0,9 ml/dk	35	65	35
Akış Hızı 0,9 ml/dk	39	60	40
Akış Hızı 0,9 ml/dk	42	55	45
Akış Hızı 0,9 ml/dk	44	50	50
Akış Hızı 0,9 ml/dk	47	45	55
Akış Hızı 0,9 ml/dk	50	30	70
Akış Hızı 0,9 ml/dk	56	25	75
Akış Hızı 0,9 ml/dk	60	20	80
Akış Hızı 0,9 ml/dk	70	10	90

serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno metoduna göre yapılmıştır (Wang vd. 1996). Örneklerin absorbansındaki değişimler metanolün kullanıldığı Tetra T80+UV/VIS spektrofotometrede 517nm'de ölçülmüştür. Serbest radikal süpürme aktivitesi DPPH radikalinin yüzde inhibisyonu (%) olarak ifade edilmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Ellnain-Wojtaszek vd. 2003, Yen ve Duh 1994, Abdille vd. 2005).

$$\text{Inhibisyon (\%)} = \frac{Ab_{\text{kontrol}} - Ab_{\text{örnek}}}{Ab_{\text{kontrol}}} \times 100$$

2.6.2. Total Fenol Metodu

Taze örneklerin total fenol miktarı Singleton (1965)'a göre

yapılmıştır. Folin-Ciocalteu stok çözeltisi 1:3 oranında su ile seyreltilmiştir. 20 g sodyum karbonat 250 ml suda çözdürülüp 1 gece bekletilerek filtre edilmiştir. 250 mg gallikasit %10 etanolde çözülerek 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 mg/l konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. 1 g'lık numuneden 2 mg/ml'lik bir çözelti hazırlanmıştır. Numune/Gallik asit çözeltilerinden her birinden 20 µl alınarak üzerine 1,58 ml distile su, 100 µl Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek 5 dk. beklenmiştir. Daha sonra, herbirine 300 µl %20'lik sodyum karbonat eklenerek karanlıkta 2 saat bekletilmiş ve 765 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Gallik asitin absorpsiyonlarına göre kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Singleton ve Rossi 1965).

2.7. İstatistik

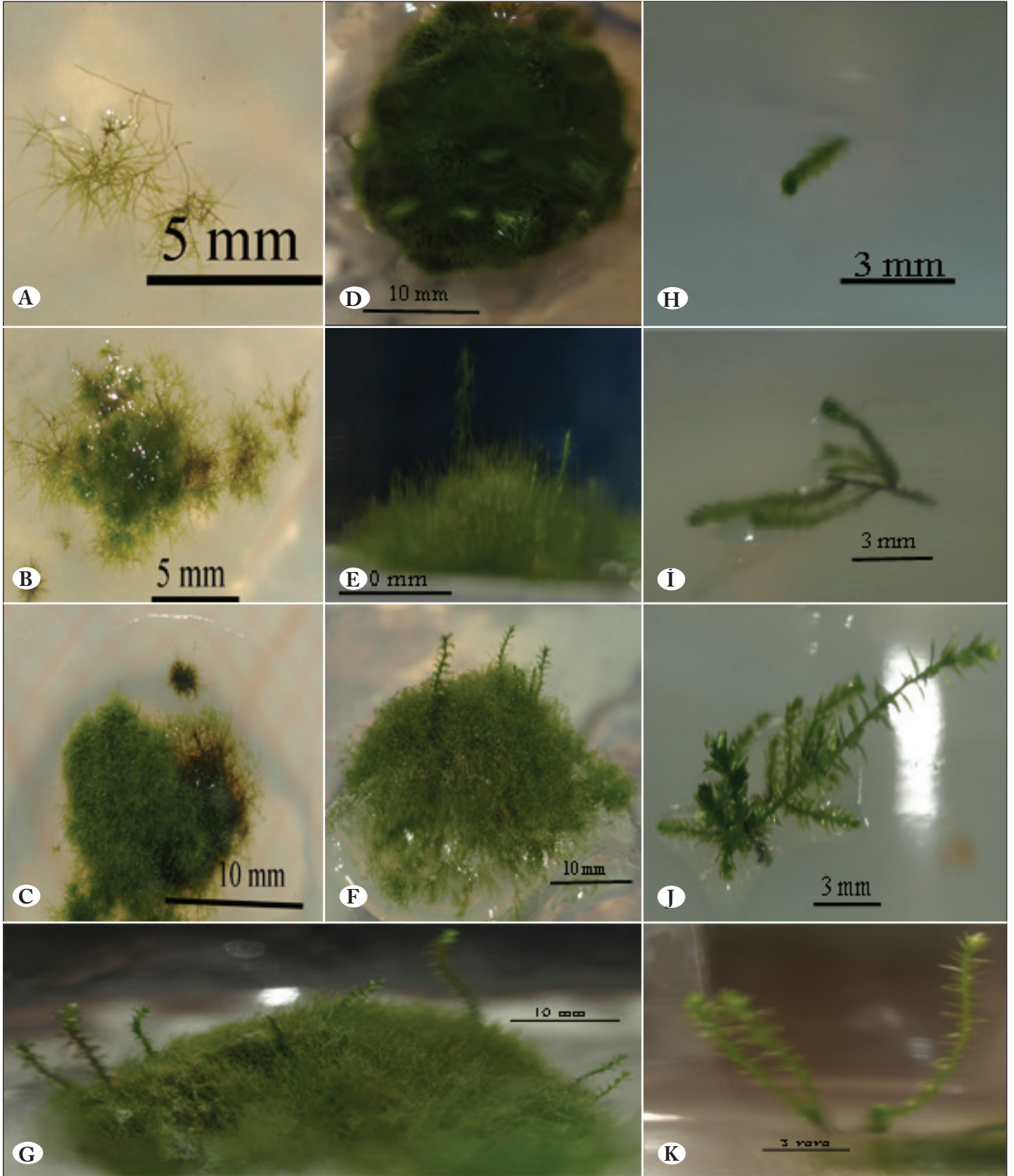
Kültüre alınan bitkilerin büyümeleri, antioksidan aktiviteleri ve içerdiği fenolik bileşiklerin standart sapma hesaplamalarında Microsoft Office 2013 Excel programından yararlanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler aritmetik ortalama±standart sapma biçiminde verildi.

3. Bulgular

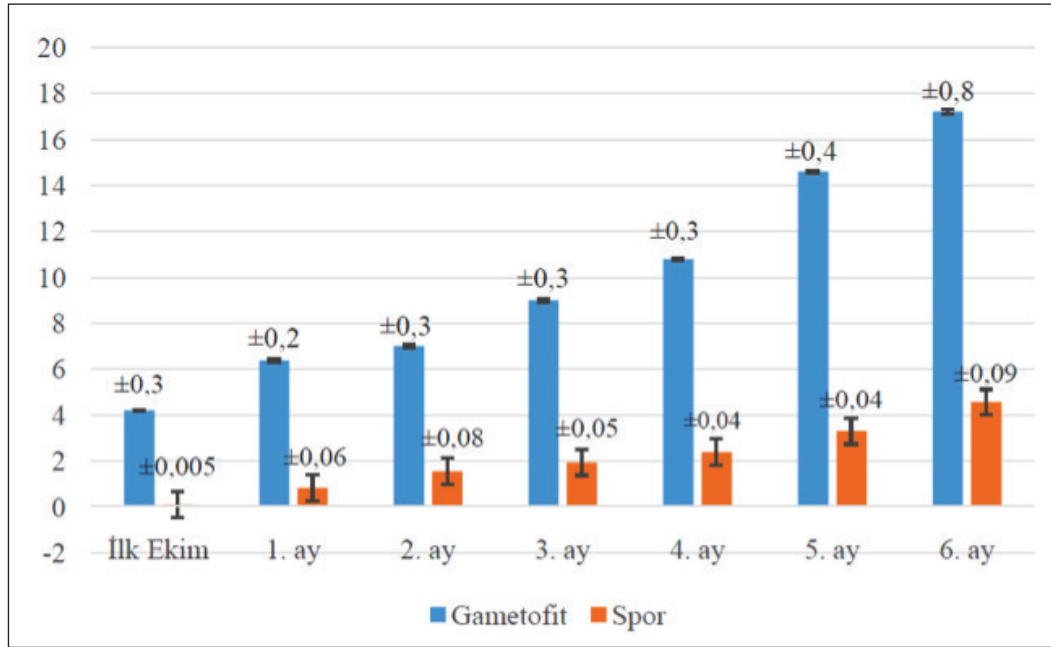
3.1. *T. alopecurum*'un *in vitro* Spor ve Gametofit Kültürü

T. alopecurum'un olgun kapsüllerinin yüzey sterilizasyonu sonrası spor kültürlerinde %100'e yakın başarı sağlanmıştır. Gametofitlerinden hafif sert dokuya sahip apikal uçların filizlenmeye başlayan kısımlarının yüzey sterilizasyonu sonrası *in vitro* kültürlerinde %90-95 civarında mantar, alg ve bakteri kontaminasyonu ile karşılaşmıştır. Kontaminasyon başlayan petrielerde, temiz dokular kurtararak yeniden aynı MS ortamlarına aktarılmıştır. *T. alopecurum*'un spor ve gametofitin apikal uç kültürleri her 4-5 haftalık dönemlerde alt kültüre alınarak 6 aylık süreyle büyüme verileri kaydedilmiştir. Ekimleri yapılan spor kültürlerinin başlangıcından 2-4 haftalık süre içerisinde protonemal fazın başlangıcıyla kloronema ve kaulonema oluşumları gözlenmiştir. Gametofit kültürlerinde ise 8-10 haftalık süre içerisinde direkt olarak sert doku eksplantlarından filizlenerek yan sürgünler gelişmeye başlamıştır (Şekil 2).

Büyüme sırasında kültürlerin 4-5 haftalık çap ölçümleri yapılmıştır. *T. alopecurum*'un spor kültürlerinde en iyi büyüme MS₃ iken, gametofit kültürlerinde ise en iyi büyüme MS₁ ortamında görülmüştür. Ayrıca en iyi gelişim görülen ortamlardaki aylık ortalama çap büyüme miktarları da aşağıda verilmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. *T. alopecurum* *in vitro* spor kültürü gelişiminin gösterilmesi **A,B)** 2-4 haftalık; **C,D)** 8-10 haftalık; **E,F)** 14-16 haftalık; **G)** 22 haftalık; ve *in vitro* gametofit kültürünün gelişiminin gösterilmesi **H)** ilk ekim; **İ,J)** 8-10 haftalık; **K)** 20 haftalık gametofit kültürleri.



Şekil 3. *T. alopecurum*'un MS₃ ortamındaki spor ve MS₁ ortamındaki gametofitin apikal uç eksplantlarının *in vitro* kültürlerinin aylık ortalama çap büyüme miktarlarının (mm) karşılaştırılması.

3.2. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi ve Total Fenol İçeriği

Antioksidan maddeler ortamdaki serbest radikalleri giderebildiği ölçüde kuvvetlidir. DPPH metoduna göre yapılan radikal giderme deneylerinde 517 nm de ölçülen absorbanslara bağlı olarak DPPH serbest radikal giderme aktivitesi'nin %inhibisyon değerleri Çizelge 3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3. Yüksek antioksidan aktiviteleri olduğu bilinen BHT, BHA, askorbik asidin ve briyofit türleri ekstraksiyon DPPH serbest radikal giderme aktivitesi yüzdeleri (%)

Çözelti	DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (%)
BHT	88,92±0,81
BHA	91,25±0,69
Askorbik Asit	92,81±0,04
<i>T. alopecurum</i> (1. Deneme)	48,24±3,78
<i>T. alopecurum</i> (2. Deneme)	53,79±0,85

Folin-Ciocalteu yöntemine göre yaptığımız toplam fenolik madde konsantrasyonları, gallik aside eşdeğer bazda gallik asidin kalibrasyon grafiğinden hesaplanmıştır ($y=0,00084x+0,06473$, $r^2=0,99$). Bu hesaba göre *T. alopecurum*'un $0,0065\pm0,0015$ mg/l (gallik asit eşdeğeri) olduğu belirlenmiştir.

3.3. Oniki farklı Fenolik Bileşiğin Kantitatif olarak HPLC-UV ile Belirlenmesi

T. alopecurum'un doğadan toplanan taze örnekleri, herbaryum örnekleri ve *in vitro* doku kültürüyle üretilen örneklerinden 12 standarda ait (gallik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, taksifolin, rosmarinik asit, kemferol, genistein, kuersetin, biokanin A, daidzein, formononetin, şikimik asit) lineer cevaplar $r^2>0,97-0,99$ aralığında kantitatif madde miktarları belirlenmiştir.

3.3.1. Taze örnek ve herbaryum örnekleri arasında elde edilen en yüksek miktarlar

- Gallik asit haziran ayında toplanmış herbaryum örneğinde $0,04098\pm0,031$ mg/g
- Kafeik asit temmuz ayında toplanmış herbaryum örneğinde $0,0151\pm0,01$ mg/g
- *p*-kumarik asit nisan ayında toplanmış herbaryum örneğinde $0,02461\pm0,012$ mg/g
- Taksifolin temmuz ayında toplanmış herbaryum örneğinde $0,01418\pm0,014$ mg/g
- Rosmarinik asit nisan ayında toplanmış herbaryum örneğinde $0,0086\pm0,007$ mg/g
- Kemferol nisan ayında toplanmış herbaryum örneğinde $0,00447\pm0,004$ mg/g
- Genistein doğadan toplanmış taze örneğinde $0,00068\pm0,0002$ mg/g

- Kersetin ekim ayında toplanmış herbaryum örneğinde 0,00105±0,001 mg/g
- Biokanin A ekim ayında toplanmış herbaryum örneğinde 0,08053±0,04 mg/g
- Daidzein nisan ayında toplanmış herbaryum örneğinde 0,02558±0,01 mg/g
- Formononetin ekim ayında toplanmış herbaryum örneğinde 0,0139±0,01 mg/g
- Şikimik asit nisan ayında toplanmış herbaryum örneğinde 3,52319±1,84 mg/g olarak belirlenmiştir.

Biyolojik dokulardaki stresin, çeşitli antioksidan bileşiklerin seviyelerinde veya antioksidan metabolitlerin yenilenmesinden sorumlu enzimlerin aktivitesinde bir artış içeren bir biyokimyasal tepkimeye yol açtığı bilinmektedir. Genistein dışında diğer bileşiklerin herbaryum örneklerinde yüksek olması, doğal ortamından uzaklaştırılan örneklerin, strese bağlı olarak biyokimyasal aktiviteler sonucunda fenolik bileşik miktarlarında değişikliğe neden olduğu söylenebilir.

3.3.2. Spor ve Gametofit *in vitro* kültürleri arasında elde edilen en yüksek miktarlar

- Gallik asit MS₄ spor kültüründe 0,02935±0,029 mg/g
- Kafeik asit MS₅ spor kültüründe 0,00365±0,002 mg/g
- *p*-kumarik asit MS₃ spor kültüründe 0,045±0,034 mg/g
- Taksifolin MS₂ spor kültüründe 0,01463±0,012 mg/g
- Rosmarinik asit MS₂ spor kültüründe 0,00493±0,002 mg/g
- Kemferol MS₂ spor kültüründe 0,00992±0,009 mg/g
- Genistein MS spor ve gametofit kültürlerinde rastlanmadı
- Kersetin MS spor ve gametofit kültürlerinde rastlanmadı
- Biokanin A MS₈ spor kültüründe 0,11483±0,081 mg/g
- Daidzein MS₂ spor kültüründe 0,05315±0,042 mg/g
- Formononetin MS₅ spor kültüründe 0,0627±0,05 mg/g
- Şikimik asit MS₈ spor kültüründe 120,92086±41,37 mg/g olarak belirlenmiştir.

MS ortamlarındaki gametofitin, *in vitro* kültürleri ile spor kültürleri karşılaştırıldığında spor kültürlerindeki fenolik bileşik miktarlarının daha fazla olduğu görülmüştür.

4. Tartışma

Sabovljević'in 2012 yılında yaptığı *T. alopecurum*'un *in vitro* kültür çalışmasında, spor kültürleri yüzey sterilizasyonu için %10'luk NaOCl kullanarak başarı sağlarken çalışmamızda %5'lik NaOCl konsantrasyonunda başarılı sonuç elde edilerek alt kültürlerde başarı sağlanmıştır. Yine Sabovljević araştırmasında, MS ortam içeriklerini oksin olarak 0.1µM IBA ve sitokinin olarak 0.03µM BAP ile zenginleştirirken, çalışmamızda spor kültüründe oksin olarak 0,5 mg/l 2,4 D ve sitokinin olarak 0,5 mg/l kinetin, bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmış ve spor kültürlerinde başarılı sonuç elde edilmiştir. Ayrıca Sabovljević araştırmasında gametofit kültürlerinde yaşamış olduğu kontaminasyon problemi dolayısıyla kültürlerini sporlardan başlatmış ve gelişen sporlardan oluşan gametofitlerin uç sürgünlerinden *in vitro* kültür yaparak başarılı sonuç elde etmiştir. Bu çalışmamızda ise doğadan toplanan taze örneğin gametofit uç sürgünleri yüzey sterilizasyonu başarıyla gerçekleştirilerek protonemal evre görülmeden sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Sabovljević *in vitro* kültürlerde büyüme verilerini nitel olarak değerlendirmiş, bizim çalışmamızda ise kantitatif olarak büyüme çapları ölçülmüştür.

Schofield 1981 birçok briyofit türünde iyi bir ortam sağlandığında sporların çimlenmesinin 7-30 gün sonrasında ortaya çıkmasından bahsetmektedir. Çalışmamızda *T. alopecurum* spor kültüründe benzer şekilde spor çimlenmesi şekerli ortama göre şekerli ortamda daha hızlı (7-14 gün) gerçekleşmiştir.

Glime 2009 yeterli miktarda kinetin benzeri bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunmasının sürgün oluşumu veya ipliksi yapıdan meristemal büyüme geçişi sağladığından bahsetmiştir. Çalışmamızda kullandığımız farklı konsantrasyonlardaki kinetin *T. alopecurum* spor kültüründe büyümelerinde protonemal evreden kloronema ve kaulonema, sonra normal gametofiti meydana getirmede etkili olduğu görülmüştür. *T. alopecurum* spor ve gametofit kültürleri doğadaki gelişim evrelerini gösterecek kadar kültür devam ettirilememiştir. Literatür taramasında bu türe ait doğadaki büyüme parametreleri için (spordan → protonema ((kloronema → kaulonema) → gametofit gelişimi → sporofit gelişimi) büyüme sürelerine ilişkin bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle normal doğadaki büyüme ile *in vitro* büyüme gerçek anlamda karşılaştırılamamıştır. Ancak *in vitro* kültürdeki büyüme parametreleri gametofit büyüme çapı olarak ölçülebilmektedir. Araştırmamızda 6 aylık süre sonunda *in vitro* kültürlerde gametofitlerde yaprak ve gövde yapıları oluşumu görülmüştür.

Bulgulara göre, *T. alopecurum*'un kayda değer miktarda antioksidan aktivitesi, ekstraktlarında bulunan çok miktarda fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği gibi, farklı bileşiklerin bulunmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Fenolik bileşikler, bitkilerde en bol bulunan sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler, yüksek bitkilerde ve mikroorganizmalarda sikimat biyosentez yolağı ile meydana gelirler. Bu nedenle şikimik asit merkezi bir metabolittir (Santos-Sánchez vd. 2019). Yapılan HPLC analizleri sonucunda yüksek miktarda bulunan şikimik asit diğer fenollere öncü olacağı anlaşılmaktadır.

Son on yılda dikkat çeken fenolik bileşikler, antioksidan mekanizmalar yoluyla diyet üzerinde farmakolojik etkileri tetiklediği düşünülmektedir. Doğal fenolik bileşiklerin antioksidan etkilerinin yanı sıra kan şekeri üzerinde de terapötik potansiyeli araştırılması gerektiği anlaşılmaktadır.

Mevcut yaptığımız çalışma ile *T. alopecurum* spor ve gametofit kültürü büyüme sonuçları, briyofitlerin *in vitro* doku kültürü tekniğiyle yüksek ölçekte de üretilebilecekleri konusunda bize temel veriler sağlamıştır. Kantitatif sonuçlara göre, *in vitro* kültürler ile de bu fenolik bileşiklerin briyofitlerde üretilebileceği söylenebilir. Briyofitlerin içerdiği bazı bileşikler, bazı tümör hücrelerini baskılamada ve sağlık problemlerinin tedavisinde etkili olmasından dolayı, gelecekte ilaç sanayiinde kullanılması ve yapılacak bilimsel çalışmalara kaynak oluşturması açısından gündemden güne önem kazanmaktadır. Yaptığımız bu çalışmanın sonuçları, briyofit türlerinin ileri biyoteknolojik çalışmalarda kullanılacak türler arasında olacağı kanaatini ortaya koymaktadır.

5. Teşekkür

Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, 2012-10-06-12 kodlu proje ile desteklenmiştir.

6. Kaynaklar

- Abdille, H., Singh, RP., Jayaprakasha, GK., Jena, BS. 2005.** Antioxidant activity of the extracts from dillenia indica fruits. *Food Chem.*, 90: 891-896.
- Ellnain-Wojtaszek, M., Kruczynski, Z., Kasprzak, J. 2003.** Investigation of the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves. *Fitoterapia*, 74: 1-6.
- Gamborg, OL., Miller, RA., Ojima, O. 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell. Res.*, 50: 151-158

- Glime, JM. 2009.** Bryophyte Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. <http://www.bryoecol.mtu.edu/> (28.01.2015).
- Glime, JM. 2007.** Economic and Ethnic Uses of Bryophytes.. In Flora of North America Editorial Committee. Flora of North America North of Mexico. Vol.. Bryophyta, part 1. Oxford University Press, New York; 27: 14-41.
- Goffinet, B., Shaw, AJ. 2009.** Bryophyte Biology, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Gonzalez, ML., Mallon, R., Reinoso, J., Rodriguez-Oubina, J. 2006.** *In vitro* micropropagation and longterm conservation of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. *Biol. Plantarum*, 50: 339-345.
- Konrat, M., Renner, M., Söderström, L., Hagborg, A., Mutke, J. 2008.** Chapter Nine: Early Land Plants Today: Liverwort Species Diversity and the Relationship with Higher Taxonomy and Higher Plants. *Fieldiana Bot.*, 47. Doi: 10.3158/0015-0746-47.1.91.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Sabovljević, A., Sabovljević, M., Grubisic, D. 2010a.** Gibberellin influence on the morphogenesis of the moss *Bryum argenteum* Hedw. In *in vitro* conditions. *Arch. Biol. Sci.*, 62(2): 373-380.
- Sabovljevic, A., Soković, M., Glamoclija, J., Ciric, A., Vujicic, M., Pejcin, B., Sabovljevic, M. 2010b.** Comparison of extract bio-activities of *in situ* and *in vitro* grown selected bryophyte species. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4: 808-812.
- Sabovljević, A., Vujčić, M., Skorić, M., Bajić-Ljubičić, J., Sabovljević, M. 2012.** Axenically Culturing The Bryophytes: Establishment And Propagation of The Pleurocarpous Moss *Thamnobryum alopecurum* Nieuwland Ex Gangulee (Bryophyta, Neckeraceae) In *in vitro* Conditions. *Pak. J. Bot.*, 44(1): 339-344.
- Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado R., Hernandez-Carlos B., Villanueva C. 2019.** Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds [Online First], IntechOpen, Doi: 10.5772/intechopen.83815.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2005.** Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 45(4): 287-306, DOI: 10.1080/1040869059096.
- Schofield, WB. 1981.** Ecological Significance of Morphological Characters in The Moss Gametophyte. *Bryologist.*, 84: 149-165.
- Singleton, VL., Rossi, JA. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16: 144-158.

- Smith, A.JE. 2004.** The Moss Flora of Britain and Ireland. 2nd ed., Cambridge Univ Press; ISBN: 0-521-81640-8.
- Söderström, L., Hagborg, A., von Konrat, M., Bartholomew-Began, S., Bell, D., Briscoe, L., Brown, E., Cargill, DC., Costa, DP., Crandall-Stotler, BJ., Cooper, ED., Dauphin, G., Engel, JJ., Feldberg, K., Glenney, D., Gradstein, SR., He, X., Heinrichs, J., Hentschel, J., Ilkiu-Borges, AL., Katagiri, T., Konstantinova, NA., Larrain, J., Long, DG., Nebel, M., Pócs, T., Felisa Puche, F., Reiner-Drehwald, E., Renner, MAM., Sass-Gyarmati, A., Schäfer-Verwimp, A., Moragues, JGS., Stotler, RE., Sukkharak, P., Thiers, BM., Uribe, J., Vána, J., Villarreal, JC., Wigginton, M., Zhang, L., Zhu, R-L. 2016.** World checklist of hornworts and liverworts. *PhytoKeys*, 59: 1-821. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.59.6261>
- Villarreal, JC., Villarreal, J., Cargill, DC., Hagborg, A., Söderström, L., Renzaglia, K. 2010.** A synthesis of hornwort diversity: Patterns, causes and future work. *Phytotaxa*, 9: 150-166. Doi: 10.11646/phytotaxa.9.1.8.
- Wang, CK., Lee, WH. 1996.** Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit. *J. Agric. Food. Chem.*, 44(8): 2014-2019 DOI: 10.1021/jf950611o
- Yen, GC., Duh, PD. 1994.** Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *J. Agric. Food. Chem.*, 42: 629-32.