

Reyhan Bitkisinin (*Ocimum basilicum* L.) Adventif Kök Kültürlerinde Rosmarinik Asit Üretim Olanaklarının ve Antioksidan Kapasitenin Araştırılması

İlhami KARATAŞ¹

¹Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Almus Meslek Yüksekokulu, Ormancılık Bölümü, Tokat, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-7965-7878>

✉: ilhmi.karatas@gop.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, reyhan bitkisinin (*Ocimum basilicum* L.) adventif kök süspansiyon ve katı kültürlerinde rosmarinik asit üretim olanakları, toplan fenolik ve flavonoid içerikleri ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Adventif kök katı kültürlerin oluşturulmasında *in vitro* koşullarda yetiştirilen 30 günlük bitkilerin hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar 3.3 g L⁻¹ MS (Murashige ve Skoog), 30 g L⁻¹ sukroz ve 2 g L⁻¹ phytagel ve 2 mg L⁻¹ indol-3-bütirik asit içeren besin ortamında karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Bu ortamda gelişen adventif kökler süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Süspansiyon kültürünün 10, 20 ve 30. günlerinde adventif kökler hasat edilerek analizler yapılmıştır. Adventif köklerin rosmarinik asit içeriği HPLC cihazıyla analiz edilmiştir. Antioksidan kapasiteleri katyon radikali giderme (ABTS), indirgeme gücü (FRAP) ve serbest radikal giderme (DPPH) metotları ile belirlenmiştir. Rosmarinik asit içeriği en yüksek adventif kök süspansiyon kültürünün 30. gününde 32.38 mg g⁻¹ olarak belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik bileşik içeriği süspansiyon kültürünün 20. gününde 32.94 mg GAE g⁻¹ olarak belirlenmiştir. DPPH, ABTS ve FRAP aktivitesi en yüksek süspansiyon kültürünün 30. gününde belirlenmiştir. Sonuç olarak reyhan bitkisinin süspansiyon kültüründen elde edilen adventif köklerin rosmarinik asit üretimi için uygun materyaller olduğu düşünülmektedir.

Biyoloji

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 03.06.2021

Kabul Tarihi : 16.07.2021

Anahtar Kelimeler

Adventif kök
Antioksidan aktivite
Fenolik bileşik
Ocimum basilicum
Rosmarinik asit

Investigation of Rosmarinic Acid Production Possibilities and Antioxidant Capacities in Adventitious Root Cultures of Basil (*Ocimum basilicum* L.)

ABSTRACT

In this study, It was aimed to determine the rosmarinic acid production possibilities, total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of adventitious root suspension and solid cultures of basil (*Ocimum basilicum* L.). The hypocotyl parts of 30-day-old plants grown under *in vitro* conditions were used as the source of explants for the establishment of adventitious root solid culture. The explants were cultured in dark conditions in nutrient medium containing 3.3 g L⁻¹ MS (Murashige and Skoog), 30 g L⁻¹ sucrose, 2 g L⁻¹ phytagel and 2 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA). Adventitious roots obtained under these conditions were used in the establishment of suspension cultures. Adventitious roots were harvested and analyzed at 10, 20 and 30 days of suspension culture.

The rosmarinic acid content of adventitious roots was analyzed by HPLC. Antioxidant capacities were determined by reducing power (FRAP), free radical scavenging (DPPH) and cation radical scavenging (ABTS) methods. The highest rosmarinic acid content was determined as 32.38 mg g⁻¹ on the 30th day of the adventitious root suspension culture. The highest total phenolic compound content was determined as 32.94 mg GAE g⁻¹ on the 20th day of suspension culture. The highest DPPH, ABTS and FRAP activities were determined on the

Biology

Research Article

Article History

Received : 03.06.2021

Accepted : 16.07.2021

Keywords

Adventitious root
Antioxidant activities
Ocimum basilicum
Phenolic compound
Rosmarinic acid

30th day of the suspension culture. Overall, it can be concluded that adventitious roots obtained from suspension cultures of basil plant are suitable materials to produce rosmarinic acid.

- Atıf İçin:** Karataş İ 2022. Reyhan Bitkisinin (*Ocimum basilicum* L.) Adventif Kök Kültürlerinde Rosmarinik Asit Üretim Olanaklarının ve Antioksidan Kapasitenin Araştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg. 25 (3): 459-466. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.947605>.
- To Cite:** Karataş İ 2022. Investigation of Rosmarinic Acid Production Possibilities and Antioxidant Capacities in Adventitious Root Cultures of Basil (*Ocimum basilicum* L.). KSU J. Agric Nat 25 (3): 459-466. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.947605>.

GİRİŞ

Lamiaceae familyasının *Ocimum* cinsine ait türleri Türkiye’de yaygın olarak reyhan veya fesleğen olarak adlandırılmaktadır (Günay ve Telci, 2017). Reyhan bitkisi (*Ocimum basilicum* L.) tıbbi ve aromatik bir bitki olup aromaterapi, kozmetik, parfüm ve gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ekmekci ve Aasim, 2014). Ayrıca reyhan bitkisinin antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan, antiülser, antiviral, insektisidal, solucan düşürücü, hipoglisemik, hipolipidemik, kardiyak uyarıcı ve yara iyileştirici gibi farmakolojik aktivitelere sahip olduğu da bildirilmiştir (Marwat ve ark., 2011). Çok sayıda genotipi bulunan reyhan bitkisinin kalitesinin belirlenmesinde kimyasal bileşimi çok önemli bir yer tutmakta ve başlıca fenilpropanoid bileşiğini rosmarinik asit oluşturmaktadır (Zeljковиć ve ark., 2020). Bu bitkiye ait genotiplerin yüksek miktarda fenolik bileşik içerdiği ve en fazla bulunan fenolik bileşiklerin sırası ile rosmarinik asit, rutin, sisorik asit, kaftarik asit, 4-hidroksibezoik asit ve kafeik asit olduğu belirlenmiştir (Genç, 2016). Rosmarinik asit; kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asit esteri olan fenolik bir bileşik olup biyosentezi fenilpropanoid yolu ile tirozin türevli yol aracılığıyla ile gerçekleşmektedir (Zhang ve ark., 2014; Jiang ve ark., 2016). Rosmarinik asit ve türevlerinin antienflamatuar, antioksidan, antialerjik, antianjiyojenik, antitümör, antimikrobiyal, antiviral ve nöroprotektif gibi biyolojik aktivitelerin belirlenmesi nedeniyle son zamanlarda yoğun ilgi görmektedir (Kim ve ark., 2015). Ancak doğal kaynakların sınırlı olması ve kimyasal sentezinin kompleksliği nedeni ile bu bileşiği olan talep karşılanamamaktadır (Jiang ve ark., 2016). Rosmarinik aside olan talebi karşılamak için bitki hücre kültürü ve saçak kök kültürleri gibi biyoteknolojik yöntemlerle üretim olanakları yoğun bir şekilde araştırılmıştır (Khojasteh ve ark., 2014). Bu bağlamda *Salvia miltiorrhiza*, *Agastache rugosa*, *Coleus forskohlii* ve *Coleus blumei* gibi Lamiaceae familyasına ait türlerden elde edilen saçak köklerde rosmarinik asit üretimi, elistasyonu, biyosentezi ve biyoaktivitesi kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Srivastava ve ark., 2016). Ayrıca rosmarinik asit üretimi *Salvia officinalis* L. bitkisinin *in vitro* sürgün

kültürlerinde (Krac’un-Kolarevic’ ve ark., 2015), *Satureja khuzistanica* Jamzad bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerinde (Sahraroo ve ark., 2016) ve *Coleus blumei* bitkisinin kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde (Qian ve ark., 2009) araştırılmıştır.

Reyhan bitkisinin (*Ocimum basilicum*) saçak kök kültüründe (Srivastava ve ark., 2016), kallus kültüründe (Nazir ve ark., 2019; Duran ve ark., 2019) ve hücre süspansiyon kültürlerinde (Kintzios ve ark., 2004) rosmarinik asit üretimi önemli ölçüde incelenmiştir. Ancak adventif kök kültürlerinde üretim olanakları üzerine çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır. Adventif kökler bitkilerin kök dışındaki yaprak ve gövde gibi kısımlarından kök gelişimi yönünde uyarılmasıyla elde edilen kökler olarak tanımlanmaktadır (Steffens ve Rasmussen, 2016; Rahmat ve Kang, 2019). Bu kökler; hızlı büyümeleri ve biyoaktif bileşiklerin istikrarlı üretkenliği nedeniyle ticari boyutta metabolit üretimine olanak sağlayan uygun materyallerdir (Cui ve ark., 2013; Le ve ark., 2018; Rahmat ve Kang, 2019). Bu çalışmada reyhan (*Ocimum basilicum*) bitkisinden elde edilen adventif köklerin katı ve sıvı süspansiyon kültür koşullarında rosmarinik asit üretim olanakları, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ve antioksidan kapasitelerinin (DPPH, ABTS ve FRAP yöntemlerine göre) belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Adventif Kök Katı Kültürlerin Oluşturulması

Araştırmada bitkisel materyal olarak *in vitro* koşullarda yetiştirilen reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisi kullanılmıştır. Adventif kök kültürlerinin oluşturulmasında steril şartlarda yetiştirilen bir aylık bitkilerin hipokotil kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar 3.3 g L⁻¹ MS (Murashige ve Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ sukroz ve 2 g L⁻¹ phytagel ve 2 mg L⁻¹ indol-3-bütirik asit (IBA) içeren besin ortamında karanlık ortam koşullarında inkübatörde (25 °C) kültüre alınmıştır. Eksplantlar 15. günde aynı içerikli besin ortamına alt kültüre alınmıştır. Kültürün 30. gününde adventif kökler eksplant kaynaklarından ayrılarak süspansiyon kültürünün oluşturulmasında kullanılmıştır. Ayrıca bir kısım adventif kök kurutularak metabolit içeriği ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Adventif Kök Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması

Katı besin ortamında gelişen adventif kökler kültürünün 30. gününde eksplant kaynaklarından ayrılarak süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Sıvı kültürlerin oluşturulmasında kullanılan besi ortamı 3.3 g L⁻¹ MS (Murashige ve Skoog, 1962), 2 mg L⁻¹ IBA ve 30 g L⁻¹ sukrozdan oluşmaktadır. Besiyerinin pH'sı 1 M NaOH veya 1 M HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandıktan sonra 121°C, 1.2 atmosfer basınçta 20 dakika otoklav edilmiştir. Adventif kökler (3 g) 100 mL besin ortamı içeren 250 mL'lik erlenmayerlerde kültüre alınmıştır. Erlenmayerler 120 devir dak⁻¹ hızla çalışan çalkayıcı üzerinde, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve karanlık ortam koşullarında inkübe edilmiştir. Bu kökler süspansiyon kültürünün 10, 20 ve 30. günlerinde hasat edilerek 35 °C'de inkübatör koşullarında kurutulmuştur.

Ekstraktların Hazırlanması

Sekonder metabolit içeriği (rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid) ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde 0.2 g kurutulmuş adventif kök numuneleri kullanılmıştır. Bu numuneler metanol-diklorometan (4:1) çözeltisinde ekstrakte edildikten sonra filtre (0.22 µm) edilerek analizlerde kullanılmıştır.

Rosmarinik Asit Miktarının HPLC ile Belirlenmesi

Adventif köklerin rosmarinik asit içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) (Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus, Shimadzu, Japan) cihazı ile analiz edilmiştir. HPLC uygulamalarında reverse phase C18 Phenylhexyl 4.6 x 150 mm kolon (GL Sciences InterSustain, Japan) kullanılmıştır. Analiz aşamasında cihaz ve kolon koşulları; akış hızı 1 mL dak⁻¹, kolon sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi 10 µL, analiz süresi 25 dakika ve dalga boyu 330 nm olarak ayarlanmıştır. Mobil fazlar çözücü A (deiyonize suda % 0.1 formik asit) ve çözücü B (asetonitril)'den oluşmuştur. Çözücüler 0 dak, % 100 A ve % 0 B; 5 dak, % 80 A ve % 20 B; 10 dak, % 50 A ve % 50; 15 dak, % 30 A ve % 70 B ve 20 dak, % 100 A ve % 0 B ayarlı gradient programına göre yürütülmüştür. Adventif köklerin rosmarinik asit içerikleri standart bileşik kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğinin denklemi ile belirlenmiştir.

Total Fenolik Bileşik Miktarının Belirlenmesi

Adventif köklerin toplam fenolik bileşik içeriği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Adventif kök ekstraktlarından 100 µL alınarak üzerine sırasıyla 4,5 mL saf su, 100 µL Folin-Ciocalteus reaktifi ve 300 µL Na₂CO₃ (%2'lik) ilave edilmiştir. Elde edilen karışımlar oda sıcaklığında iki saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda numunelerin absorbanları

spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) 720 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Numunelerin toplam fenolik bileşik içerikleri gallik asit (mg GAE g⁻¹) kullanılarak hazırlanan standart grafik ile belirlenmiştir (Slinkard ve Singleton, 1977).

Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Adventif köklerin toplam flavonoid içerikleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Numune ekstraktlarından 200 µL içeren deney tüplerinin üzerine sırasıyla 1.5 mL etanol, 100 µL AlCl₃ (%10'luk), 100 µL NaCH₃COO (1 M) ve 3.1 mL saf su ilave edilmiştir. Elde edilen karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda numunelerin absorbanları spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) 427 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Adventif köklerin toplam flavonoid içerikleri kuersetin (mg KUE g⁻¹) kullanılarak hazırlanan standart grafik ile belirlenmiştir (Pekal ve Pyrzynska, 2014).

Antioksidan Aktivite Analizleri

Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH)

Adventif köklerin serbest radikal giderme aktivitesi, ekstraktların DPPH• radikalini (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) temizleme kapasitelerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Farklı miktarlarda (50 µg mL⁻¹, 100 µg mL⁻¹, 150 µg mL⁻¹) numune ekstraktları bulunan deney tüplerinin hacimleri etanol ile 3 mL'ye tamamlanmıştır. Bu karışımın üzerine 1 mL DPPH• (0,26 mM, etanolde hazırlanmış) radikali ilave edilerek güçlü bir şekilde vortekslenmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 30 dakika (karanlıkta) bekletildikten sonra 517 nm'deki absorbanları spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) ölçülmüştür. Adventif köklerin serbest radikal giderme kapasiteleri radikalin başlangıç konsantrasyonunu %50 oranında azaltan örnek konsantrasyonu (IC₅₀) olarak verilmiştir. Numunelerin IC₅₀ değerleri derişim/aktivite (% aktivite) grafiğinin denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Blois, 1958).

$$\text{DPPH aktivitesi (\%)} = [(A_k - A_n)/A_k * 100]$$

A_k: Kontrol absorbanı

A_n: Numune absorbanı

İndirgeme Gücü Aktivitesi (FRAP)

Adventif köklerin indirgeme gücü aktiviteleri Oyaizu metoduna göre belirlenmiştir (Oyaizu, 1986). Numune ekstraktlarından farklı derişimlerde (100 µg mL⁻¹, 200 µg mL⁻¹, 400 µg mL⁻¹) alınarak son hacimleri 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ile 1.25 mL'ye tamamlanmıştır. Bu karışımın üzerine 1.25 mL K₃Fe(CN)₆ (%1) ilave edilerek 50 °C'de etüvde 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda karışımın üzerine sırasıyla 1.25 mL TCA

(%10) ve 0.25 mL FeCl₃ (% 0.1) ilave edilerek absorbansları (700 nm) spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) ölçülmüştür. Adventif köklerin indirgeme gücü kapasiteleri troloks standart antioksidan bileşiğinden hazırlanan standart grafiğin denklemi ile (μmol TE g⁻¹ doku) belirlenmiştir.

Kasyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS)

Adventif köklerin kasyon radikali giderme aktivitesi, ekstraktların ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit) kasyon radikalini temizleme kapasitelerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Numune ekstraktlarından farklı miktarlarda (20 μg mL⁻¹, 40 μg mL⁻¹, 80 μg mL⁻¹) alınarak son hacimleri 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) ile 3 mL'ye tamamlanmıştır. Bu karışımların üzerine 1 ml ABTS-K₂S₂O₈ çözeltisi ilave edilerek vortekslenmiştir. ABTS-K₂S₂O₈ çözeltisi 2 mM ABTS çözeltisi ile 2.45 mM K₂S₂O₈ çözeltisinin 1:2 oranında karıştırılarak karanlık koşullarda altı saat inkübe edilmesiyle elde edilmiştir. Reaksiyon karışımları karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbansları (734 nm) spektrofotometrede (Shimadzu UVmini-1240) ölçülmüştür. Adventif köklerin kasyon

radikali giderme kapasiteleri radikalın başlangıç konsantrasyonunu %50 oranında azaltan örnek konsantrasyonu (IC₅₀) olarak verilmiştir. Numunelerin IC₅₀ değerleri derişim/aktivite (% aktivite) grafiğinin denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Re ve ark., 1999).

$$\text{ABTS aktivitesi (\%)} = [(A_k - A_n)/A_k * 100]$$

A_k: Kontrol absorbansı

A_n: Numune absorbansı

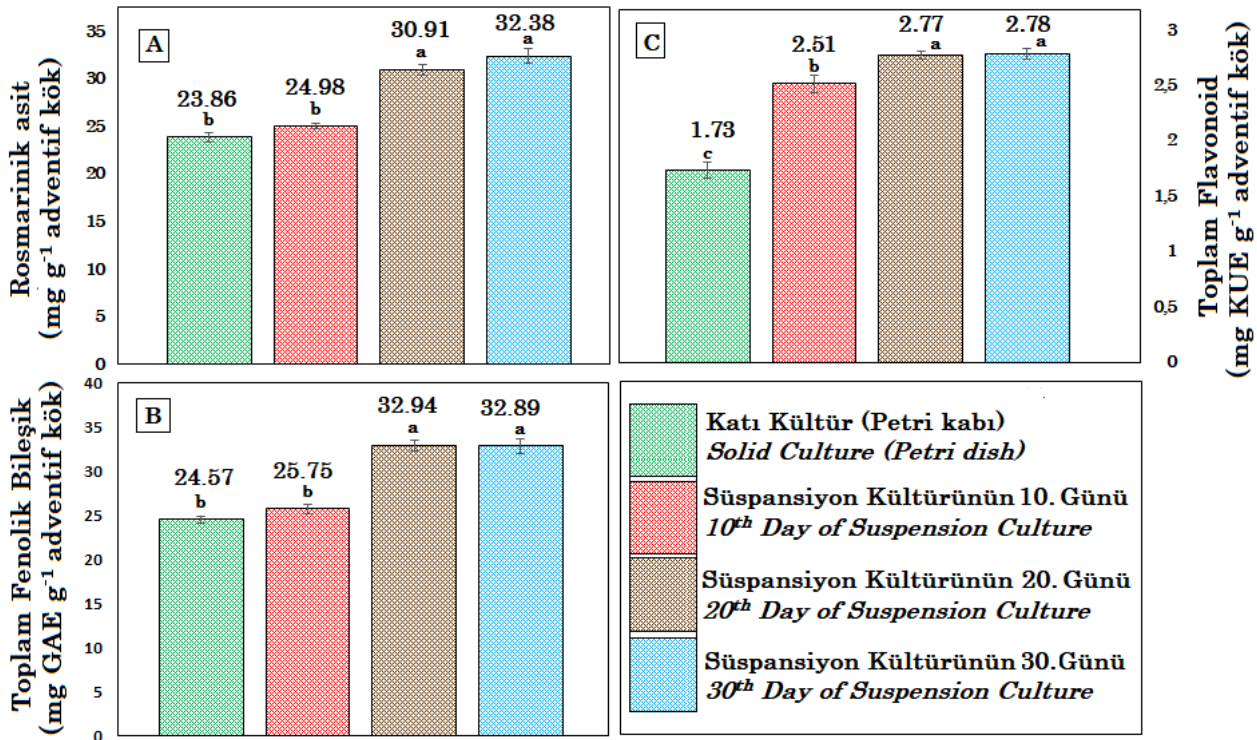
İstatistik Analizler

Bu çalışmadaki her uygulama ve analiz üç tekrarlı olarak yapılmış olup elde edilen verilerin istatistiki analizleri SPSS 20 (Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney grupları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu aralık testine göre belirlenmiştir (Duncan, 1955).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sekonder Metabolit İçeriği

Katı ve süspansiyon kültüründen elde edilen adventif köklerin rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriği Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Farklı kültür koşullarından elde edilen adventif köklerin rosmarinik asit (A), toplam fenolik bileşik (B) ve flavonoid (C) içerikleri (Şekil üzerinde verilen farklı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir)

Figure 1. Rosmarinic acid (A), total phenolic compound (B) and flavonoid (C) content of adventitious roots obtained from different culture conditions (The different letters given on the figure show that the difference between the applications is statistically significant)

Katı kültüründen elde edilen adventif köklerin metabolit içeriği kültürün 30. günde belirlenirken süspansiyon kültürünün metabolit içeriği 10, 20 ve 30.

günlerde belirlenmiştir. Rosmarinik asit miktarı HPLC cihazı ile belirlenirken toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriği spektrofotometrik olarak

belirlenmiştir. Adventif köklerin toplam fenolik bileşik içeriği gallik aside (mg GAE g^{-1}) eşdeğer olarak verilirken flavonoid içeriği kuersetine (mg KUE g^{-1}) eşdeğer olarak ifade edilmiştir.

Adventif köklerin rosmarinik asit içeriği katı kültürde 23.86 mg g^{-1} olarak belirlenirken süspansiyon kültürlerinde 24.98 ile 32.38 mg g^{-1} arasında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek rosmarinik asit içeriği süspansiyon kültürün 30. gününde 32.38 mg g^{-1} olarak belirlenmiştir. Süspansiyon kültürünün 30. günündeki rosmarinik asit içeriği katı kültürden ve süspansiyon kültürünün 10. gününden önemli ölçüde yüksektir ($P<0.01$). Ancak süspansiyon kültürünün 30. ve 20. günleri arasındaki farkın istatistikî olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

Srivastava ve ark. (2016), *Ocimum basilicum* bitkisinden elde edilen yedi saçak kök hattının rosmarinik asit içeriğinin 3.13 ile 28.83 mg g^{-1} kuru ağırlık (20. gün) arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Genç ve ark. (2020) reyhan bitkisinin tarla koşullarında yetiştirilen dört çeşidinin rosmarinik asit içeriğinin 2610.15 ile $18460.56 \text{ mg kg}^{-1}$ kuru ağırlık (2.61015 - $18.46056 \text{ mg g}^{-1}$ kuru ağırlık) arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinde yapılan bir diğer çalışmada ise hücre süspansiyon ve kallus kültüründe rosmarinik asit üretim olanakları incelenmiştir. Bu çalışmada hücre süspansiyon kültürlerinin rosmarinik asit içeriğinin en yüksek 10 mg g^{-1} kuru ağırlık olarak belirlendiği ve bu değer in kallus kültüründen ve eksplant kaynağı olarak kullanılan bitkinin yapraklarından 11 kat daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (Kintzios ve ark., 2003). Verma ve ark., (2016) farklı kültür koşullarında (*in vitro*, *ex vitro*) yetiştirilen reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkilerinde en yüksek rosmarinik asit içeriğinin çiçeklenme dönemindeki yapraklarda (13.0 mg g^{-1}) olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada süspansiyon kültüründen elde edilen rosmarinik asit miktarının reyhan bitkisinde daha önce yapılan kallus, hücre süspansiyon, saçak kök, *in vitro* koşullarda yetiştirme ve tarla koşullarında yetiştiricilikten elde edilen sonuçlardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu bağlamda reyhan bitkisinin adventif kök süspansiyon kültürleri rosmarinik asit üretimi için uygun biyoteknolojik yöntemler olduğu anlaşılmaktadır.

Adventif köklerin toplam fenolik ve flavonoid içeriği kültür süresi ve tipine göre önemli ölçüde değişmiştir. En yüksek toplam fenolik bileşik içeriği süspansiyon kültürünün 20. gününde $32.94 \text{ mg GAE g}^{-1}$ olarak belirlenirken en yüksek flavonoid içeriği süspansiyon kültürünün 30. gününde $2.78 \text{ mg KUE g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Süspansiyon kültürünün 20. ve 30. günlerinde elde edilen sonuçlar katı kültürden ve süspansiyon kültürünün 10. gününden önemli ölçüde yüksektir ($P<0.01$). Ancak süspansiyon kültürünün 20. ve 30. günleri arasında önemli farklılıklar meydana

gelmemiştir.

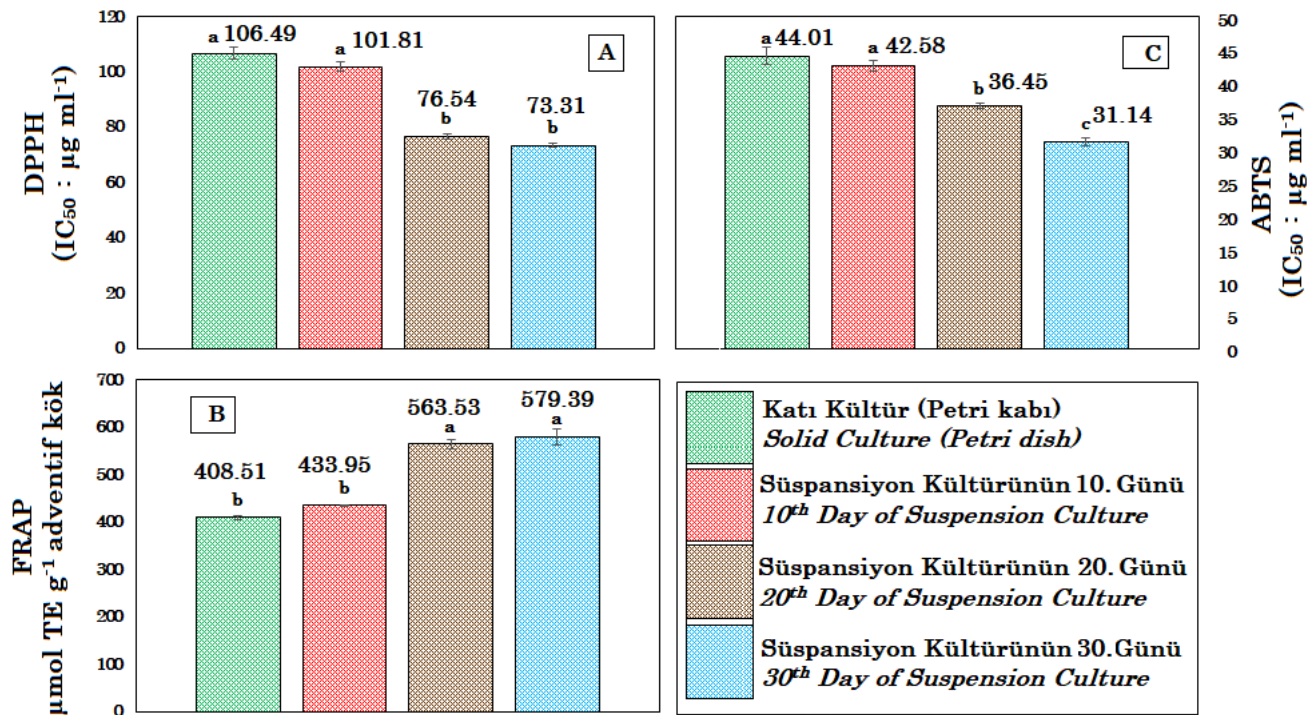
Srivastava ve ark., (2016) reyhan bitkisinden elde edilen saçak kök hatlarının toplam fenolik bileşik içeriği 55.75 ile 161.47 mg g^{-1} kuru ağırlık (20. gün) arasında değiştiğini ifade etmişlerdir.

Bu bitkide yapılan benzer bir diğer araştırmada *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkilerin fenolik bileşik içeriğinin 23 ile 71 mg GAE g^{-1} kuru ağırlık arasında değiştiği ifade edilmiştir (Verma ve ark., 2016). Belirtilen sonuçların yürütülen bu çalışmadan elde edilen sonuçlardan oldukça yüksek olduğu anlaşılmıştır. Ancak yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde saçak kök kültüründe ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkilerin rosmarinik asit içeriğinin toplam fenolik bileşik içeriğine oranının oldukça düşük kaldığı görülmüştür. Yürütülen bu çalışmada adventif kök süspansiyon kültürlerinin rosmarinik asit içeriğinin oldukça yüksek olduğu ve miktarının toplam fenolik bileşik içeriğine çok yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir. Bu durumun adventif kök süspansiyon kültürüyle üretilen rosmarinik asidin saflaştırma aşamasında önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Antioksidan Aktivite

Adventif köklerin antioksidan kapasiteleri DPPH, FRAP ve ABTS yöntemlerini kullanılarak belirlenmiştir. FRAP aktivitesinin sonuçları troloks'a eşdeğer olarak verilirken DPPH ve ABTS sonuçları ise radikalın % 50'sini gideren doku miktarı (IC_{50}) olarak belirlenmiş ve Şekil 2'de verilmiştir.

Adventif köklerin antioksidan aktiviteleri kültür tipi ve süresine bağlı olarak önemli ölçüde değişmiştir ($P<0.05$). Analizi yapılan üç antioksidan metoduna göre en yüksek antioksidan aktivite süspansiyon kültürünün 30. gününde belirlenmiştir. Bu köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktivitesi sırasıyla $\text{IC}_{50} : 73.31 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\text{IC}_{50} : 31.14 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $579.39 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. DPPH ve FRAP aktiviteleri kültürün 20 ve 30. günleri arasında önemli ölçüde değişmemiştir. En düşük antioksidan aktivite katı kültürden elde edilen adventif köklerde belirlenmiştir. Antioksidan aktivitesi yüksek olan adventif köklerin rosmarinik asit, fenolik ve flavonoid içeriğinin de önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir. Genç ve ark. (2020) tarla şartlarında yetiştirilen dört reyhan (*Ocimum basilicum* L.) çeşidinin FRAP aktivitesinin 150.8 ile $650.2 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Gülçin ve ark. (2007) reyhan bitkisinin su ve etanol ekstraktlarında DPPH serbest radikal giderme, hidrojen peroksit giderme, süperoksit anyon radikal giderme, ferrik tiyosiyanat yöntemi, toplam indirgeme gücü ve metal şelatlama yöntemlerine göre yaptıkları antioksidan aktivite analiz sonuçlarına göre bitki ekstraktlarının güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ifade etmişlerdir.



Şekil 2. Farklı kültür koşullarından elde edilen adventif köklerin DPPH (A), FRAP (B) ve ABTS (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri (Şekil üzerinde verilen farklı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir)

Figure 2. Antioxidant activities of adventitious roots obtained from different culture conditions according to DPPH (A), FRAP (B) and ABTS (C) methods (The different letters given on the figure show that the difference between the applications is statistically significant)

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada reyhan bitkisinde süspansiyon ve katı kültür koşullarında elde edilen adventif köklerin rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile DPPH, ABTS ve FRAP yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Adventif kök süspansiyon kültürlerinin rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid içeriği katı kültürden oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek rosmarinik asit içeriği süspansiyon kültürünün 30. gününde belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ışığında adventif kök süspansiyon kültürlerinin rosmarinik asit üretimi için uygun biyoteknolojik yöntem olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca reyhan bitkisinden elde edilen adventif köklerin rosmarinik asit içeriğinin toplam fenolik bileşik içeriğine çok yakın değerlerde olması üretilen rosmarinik asidin saflaştırma aşamasında önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Süspansiyon kültüründen elde edilen adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP yöntemlerine göre oldukça yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Kültür süresinin artmasıyla antioksidan aktivitenin de arttığı ve en yüksek antioksidan aktivite süspansiyon kültürünün 30. gününde belirlenmiştir. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda hormon, MS ve sukroz gibi temel besin

ortam koşullarının optimizasyonun sağlanması yüksek verimde metabolit ve biyomas elde etmek için avantaj sağlayacaktır. Ayrıca rosmarinik asidin biyosentez öncüllerinin besin ortamına ilave edilmesi ve elisitasyon çalışmalarının yapılması büyük önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince (Proje Numarası: 2019/38) desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Blois MS 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, 26 1199-1200.
Cui HY, Baque MA, Lee EJ, Paek KY 2013. Scale-up of Adventitious Root Cultures of *Echinacea*

- angustifolia* in a Pilot-Scale Bioreactor for the Production of Biomass and Caffeic acid Derivatives. Plant Biotechnol Rep 7:297–308.
- Duncan BD 1955. Multiple Range and Multiple Ftests. Biometrics. P.1-42.
- Duran RE, Kilic S, Coskun Y 2019. Melatonin Influence on *In Vitro* Callus Induction and Phenolic Compound Production in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 55: 468–475.
- Ekmekci H, Aasim M 2014. In vitro Plant Regeneration of Turkish Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) The Journal of Animal & Plant Sciences, 24(6):1758-1765.
- Genç N 2016. Tokat Ekolojik Koşullarında Yetiştirilen Farklı Orijinli Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Genotiplerinin Fenolik Bileşik Kompozisyonları ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Tokat.
- Genc N, Elmastaş M, Telci İ, Erenler R 2020. Quantitative Analysis of Phenolic Compounds of Commercial Basil Cultivars (*Ocimum basilicum* L.) by LC-TOF-MS and Their Antioxidant Effects. International Journal of Chemistry and Technology 4 (2) 179-184.
- Gülçin İ, Elmastaş M, Aboul-Enein H Y 2007. Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) Assayed by Different Methodologies. Phytotherapy Research (21) 354–361.
- Günay E, Telci İ 2017. Isparta Ekolojik Koşullarında Bazı Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Genotiplerinin Verim ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 12 (2):100-109.
- Jiang J, Bi H, Zhuang Y, Liu S, Liu T, Ma Y 2016. Engineered Synthesis of Rosmarinic Acid In *Escherichia coli* Resulting Production of a New Intermediate, Caffeoylphenyllactate. Biotechnol Lett 38:81–88.
- Khojasteh A, Mirjalili MH, Hidalgo D, Corchete P, Palazon J 2014. New Trends in Biotechnological Production of Rosmarinic acid. Biotechnol Lett 36:2393–2406.
- Kim G-D, Park Y S, Jin Y-H, Park C-S 2015. Production and Applications of Rosmarinic Acid and Structurally Related Compounds. Appl Microbiol Biotechnol 99:2083–2092.
- Kintzios S, Kollias H, Straitouris E, Makri O 2004. Scale-up Micropropagation of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) in an Airlift Bioreactor and Accumulation of Rosmarinic Acid. Biotechnology Letters 26: 521–523.
- Kintzios S, Makri O, Panagiotopoulos E, Scapeti M 2003. In Vitro Rosmarinic Acid Accumulation in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). Biotechnology Letters 25: 405–408.
- Kracun-Kolarevic M, Dmitrovic S, Filipovic B, Peric M, Misic D, Simonovic A, Todorovic S 2015. Influence of Sodium Salicylate on Rosmarinic Acid, Carnosol and Carnosic Acid Accumulation by *Salvia officinalis* L. Shoots Grown In Vitro. Biotechnol Lett. 37:1693–1701.
- Le KC, Im WT, Paek KY, Park SY 2018. Biotic Elicitation of Ginsenoside Metabolism of Mutant Adventitious Root Culture in *Panax ginseng*. Applied Microbiology and Biotechnology 102:1687–1697.
- Marwat SK, Rehman FU, Khan MS, Ghulam S, Anwar N, Mustafa G, Usman K 2011. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Sweet Basil-*Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Asian Journal of Chemistry 23 (9) : 3773-3782.
- Murashige T, Skoog F 1962. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant, 15: 473-497.
- Nazir M, Tungmunnithum D, Bose S, Drouet S, Garros L, Giglioli-Guivarc'h N, Abbasi BH, Hano C 2019. Differential Production of Phenylpropanoid Metabolites in Callus Cultures of *Ocimum basilicum* L. with Distinct In Vitro Antioxidant Activities and In Vivo Protective Effects against UV stress. J. Agric. Food Chem. 67: 1847–1859.
- Oyaizu M 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine. Jpn. J. Nutr., 44 307.
- Pekal A, Pyrzynska K 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Anal. Methods, 7:1776–1782.
- Qian J, Guiping L, Xiujun L, Xincan H, Hongmei L 2009. Influence of Growth Regulators and Sucrose Concentrations on Growth and Rosmarinic Acid Production in Calli and Suspension Cultures of *Coleus blumei*. Natural Product Research 23 (2)127–137.
- Rahmat E, Kang Y 2019. Adventitious Root Culture for Secondary Metabolite Production in Medicinal Plants: A Review. J Plant Biotechnol 46:143–157.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Radic Biol Med, 26(9- 10) 1231-1237.
- Sahraroo A, Mirjalili MH, Corchete P, Babalar M, Moghadam MRF 2016. Establishment and Characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) Cell Suspension Culture: a New in Vitro Source of Rosmarinic Acid. Cytotechnology 68:1415–1424.
- Slinkard K, Singleton VL 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. Am J Enol Viticult 28:49-55.
- SPSS 20. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2011.

- Srivastava S, Conlan XA, Adholeya A, Cahill DM 2016. Elite Hairy Roots of *Ocimum basilicum* as a New Source of Rosmarinic Acid and Antioxidants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 126:19–32.
- Steffens B, Rasmussen A 2016. The Physiology of Adventitious Roots, Topical Review on Adventitious Root Physiology. *Plant Physiology* 170:603–617.
- Verma SK, Sahin G, Das AK, Gurel E 2016. In Vitro Plant Regeneration of *Ocimum basilicum* L. is Accelerated by Zinc Sulfate. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 52:20–27.
- Zeljković S'C, Komz'akov'a K, Šiškov'a J, Karalija E, Sm'ekalov'a K, Tarkowski P 2020. Phytochemical Variability of Selected Basil Genotypes. *Industrial Crops & Products* 157-112910.
- Zhang S, Yan Y, Wang B, Liang Z, Liu Y, Liu F, Qi Z 2014. Selective Responses of Enzymes In The Two Parallel Pathways of Rosmarinic Acid Biosynthetic Pathway to Elicitors In *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117 (5) 645-651.