

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİY-DR-2011-0003

Hypericum adenotrichum Spach'UN DOKU KÜLTÜRÜ
TEKNİKLERİ İLE ÇOĞALTILMASI VE *IN VITRO*
KOŞULLARDA SEKONDER METABOLİT
DEĞİŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Ömer YAMANER

Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ömer YAMANER tarafından hazırlanan “*Hypericum adenotrichum* Spach’un doku kültürü teknikleri ile çoğaltılması ve *in vitro* koşullarda sekonder metabolit değişiminin araştırılması” başlıklı tez, 06.09.2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	:
Üye	:
Üye	:
Üye	:
Üye	:

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu (*tezin türü*) tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla (*tarih*) tarihinde onaylanmıştır.

Ünvanı, Adı Soyadı
Enstitü Müdürü

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

09.09.2011

Ömer YAMANER

ÖZET

***Hypericum adenotrichum* Spach'UN DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÇOĞALTILMASI VE *IN VITRO* KOŞULLARDA SEKONDER METABOLİT DEĞİŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ömer YAMANER

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ
2011,137 sayfa

Bu çalışmada, endemik ve tıbbi bitki olarak potansiyel önemi olan *H. adenotrichum*'un *in vitro* çoğaltımı için uygun bir protokol tanımlanması ve bazı stres ve elisitör uygulamalarının *in vitro* koşullarda bu bitkinin sekonder metabolitlerinin üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tohum çimlendirme çalışmalarında çimlenme üzerine ışık, stratifikasyon, sıcaklık ve ortamdaki tuz konsantrasyonunun negatif ya da pozitif etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, fide gelişimi için en iyi ortamın ¼ MS/Galzy ortamı olduğu belirlenmiştir. Doğadan toplanan bitkilerden sağlanan yaprak eksplantlarından kallus oluşumu gözlenmiştir. En yüksek kallus indüksiyon yüzdesi 4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA (%95) içeren MS ortamında elde edilmiştir. BA'nın tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarından elde edilen kalluslar, 0.5 mg/L KIN içeren MS besi ortamında alt kültüre alındıklarında sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. *H. adenotrichum*'un yaprak eksplantlarından, KIN'in tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarında, direkt sürgün oluşumu gözlenmiştir. *In vitro* ortamda elde edilmiş direkt ve indirekt sürgünler, KIN'in tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarında, aksiller sürgün rejenerasyonu göstermişlerdir. Ayrıca, *H. adenotrichum*'un aksiller sürgünlerinden 0.5 mg/L IAA içeren makro ½ MS ve makro ¼ MS ortamlarında kök oluşumu gerçekleşmiştir. *H. adenotrichum* bitkisinin önemli sekonder metabolitlerinin elisitasyonuna yönelik olarak, sukroz, polietilen glikol (PEG) krom (Cr), pektin ve mannan *in vitro* fidelere uygulanmıştır. *In vitro* da belirli sürelerde çeşitli stres ve elisitör uygulamalarına maruz bırakılan fidelerin metanolik ekstraktları HPLC ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda, hiperisinlerin elisitasyonunda pektin, flavonoidlerin elisitasyonunda ise Cr en etkili elisitörler olarak belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Hypericum adenotrichum*, *in vitro* çoğaltım, adventif sürgün rejenerasyonu, aksiller sürgün rejenerasyonu, elisitör, sekonder metabolitler

ABSTRACT**PROPAGATION OF *Hypericum adenotrichum* Spach USING TISSUE CULTURE TECHNIQUES AND INVESTIGATION OF SECONDARY METABOLITE VARIATIONS UNDER *IN VITRO* CONDITIONS**

Ömer YAMANER

Ph.D. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Bengi ERDAĞ
2011,137 pages

In this study, it has been aimed to describe an appropriate procedure for *in vitro* propagation of *H. adenotrichum* which is an endemic plant and also has a potential value as a medicinal plant, and to determine the effects of some stress and elicitor treatments on production of secondary metabolites under *in vitro* conditions. In seed germination studies, it has been determined that light, dark, stratification, temperature and salt concentration of medium have positive or negative effects on seed germination behavior. $\frac{1}{4}$ MS/Galzy medium has been determined as the best medium for seedling development. Callus formation has been observed from leaf explants excised from the plants that were collected from their natural habitat. The highest callus induction percentage has been obtained on MS media supplemented with 4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA. Shoot induction has been observed from calli induced on the MS media containing BA alone after subculturing the calli on MS medium supplemented with 0.5 mg/L KIN. Directly shoots formation has been observed on leaf explants of *H. adenotrichum* on MS media containing KIN alone. Direct and indirect shoots of *H. adenotrichum* that were obtained from *in vitro* experiments have showed axillary shoot regeneration on MS media containing KIN alone. The highest axillary shoot number per explant has been obtained from MS medium containing 0.5 mg/L KIN. The root formation has occurred from axillary shoots of *H. adenotrichum* on media containing 0.5 mg/L IAA. Sucrose, polyethylene glycol, chrome, pectin and mannan have been applied to *in vitro* seedling intended for elicitation of important secondary metabolites of *H. adenotrichum*. Methanolic extracts of *in vitro* seedlings exposed various stress and elicitor treatments have been analyzed with HPLC. According to the results of HPLC analysis, pectin for elicitation of hypericins and chrome for elicitation of flavonoids have been determined as the most effective elicitors.

Key words: *Hypericum adenotrichum*, *in vitro* propagation, adventitious shoot regeneration, axillary shoot regeneration, elicitor, secondary metabolites

ÖNSÖZ

Hypericum adenotrichum ülkemiz florası için endemik ve aynı zamanda tıbbi olarak potansiyel öneme sahip bir bitkidir. Tür ile ilgili olarak bu zamana kadar herhangi bir *in vitro* doku kültürü çalışması ve sekonder metabolitlerinin elisitasyonuna yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Çalışma *H. adenotrichum* için bu anlamda gerçekleştirilen ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. Değerli sekonder bileşikleri nedeniyle *Hypericum* türleri ile ilgili olarak tüm dünyada çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Floramız için endemik olan *Hypericum* türleri ile ilgili olarak sistematik ve sosyolojik çalışmalar, doku kültürü teknikleri ile çoğaltım, fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar, tıbbi özelliklerin belirlenmesi (antidepresan, antiviral, antikanser vb.) ve sekonder bileşiklerinin analiz edilmesine yönelik çalışmaların yapılması bilimsel ve ekonomik anlamda bu bitki türlerinin daha iyi değerlendirilmesine ve bunlardan yararlanılmasına olanak tanıyacaktır.

Doktora tezimin her aşamasında büyük desteğini gördüğüm ve çalışmalarımın yürütülmesi sırasında bilgi ve tecrübeleri ile çalışmalarına katkıda bulunan ve yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bengi ERDAĞ'a; Doktora Tez izleme Komitem'de bulunan ve çalışmalarım sırasında değerli görüş ve önerileri ile çalışmalarına katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Avni GÜVEN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN'e; araştırmalarımız sırasında birçok konuda derin bilgileri ile bizi aydınlatan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Adnan ERDAĞ'a; HPLC analizleri sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve bu konuda her türlü yardımı esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Cengiz GÖKBULUT'a; arazi çalışmaları sırasında beni yalnız bırakmayan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut KIRMACI ve Sayın Araş. Gör. Evrim DEMİR'e; laboratuvar çalışmalarına katkıda bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali ÖZMEN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN'e; FBE-09013 no'lu proje kapsamında finansal destekte bulunan ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine; çalışma ortamı ve olanaklarının sağlanması bakımından Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne teşekkürleri bir borç bilirim. Ayrıca her zaman her konuda bana destek olan ve en zor zamanlarımda hep yanımda olan sevgili eşim Çiğdem YAMANER'e ve doğumu ile hayatıma daha da anlam kazandıran oğlum Harun YAMANER'e; ailem ve eşimin ailesine sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
2.1. Doku Kültürü ve Doku Kültüründe Sekonder Metabolit İçeriklerinin Araştırılması ile İlgili Çalışmalar	11
2.2. Stres ve Elisitör Uygulamaları ile İlgili Çalışmalar	17
2.3. Sekonder Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Analizi ile İlgili Çalışmalar	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. <i>In vitro</i> Çalışmalar İçin Yapılan Ön Hazırlıklar.....	24
3.2.1.1. Bitkisel materyalin toplanması.....	24
3.2.1.2. Alet, ekipman ve çalışma ortamının sterilizasyonu.....	24
3.2.1.3. Besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu.....	24
3.2.1.4. Kontaminasyonun erken tespiti	26
3.2.2. <i>In vitro</i> Çimlenme	27
3.2.2.1. Tohum doluluk ve canlılık oranlarının belirlenmesi	27
3.2.2.2. Tohumların sterilizasyonu.....	28
3.2.2.3. Tohumların kültüre edilmesi	29
3.2.3. Bitkisel Materyalin Hazırlanması ve <i>In Vitro</i> Kültürü	30
3.2.3.1. Bitkisel materyallerin sterilizasyonu	30
3.2.3.2. Eksplantların kültüre edilmesi.....	31
3.2.4. Aksiller Sürgün Çoğaltımı	32

3.2.5. Adventif ve Aksiller Sürgünlerin Köklendirilmesi Denemeleri	32
3.2.6. Köklendirilen Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılması	33
3.2.7. <i>In vitro</i> Stres ve Elisitör Uygulamaları	33
3.2.7.1. Sukroz uygulaması	33
3.2.7.2. Polietilen glikol (PEG, 6000) uygulaması	33
3.2.7.3. Cr (IV) uygulaması	34
3.2.7.4. Pektin uygulaması	34
3.2.7.5. Mannan uygulaması	34
3.2.7.6. Fidelerin hasat edilmesi ve saklanması	34
3.2.8. Sekonder Metabolitlerin Analiz Edilmesi	35
3.2.8.1. Örneklerin liyofilizasyonu (dondurarak kurutma)	35
3.2.8.2. Örneklerin ekstraksiyonları	35
3.2.8.3. HPLC analizleri	36
3.2.9. Verilerin Değerlendirilmesi	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1. <i>In Vitro</i> Çimlenme	40
4.1.1. Tohum Doluluk ve Canlılık Oranları	40
4.1.2. Tohumların Sterilizasyonu	41
4.1.3. Tohum Çimlenmesi ve Fide Gelişimi	41
4.2. Bitkisel Materyalin Hazırlanması ve <i>In Vitro</i> Kültürler	55
4.2.1. Bitkisel Materyallerin Sterilizasyonu	55
4.2.2. Kültüre Edilen Eksplantların Verdikleri <i>In Vitro</i> Cevaplar	56
4.2.2.1. Kallus oluşumu	56
4.2.2.2. İndirekt adventif sürgün rejenerasyonu	67
4.2.2.3. Direkt adventif sürgün rejenerasyonu	71
4.2.2.4. Aksiller sürgün rejenerasyonu	73
4.2.2.5. Köklenme ile ilgili sonuçlar	76
4.2.2.6. Köklendirilen Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılması	78

4.3. Elisitör ve Strese Maruz Bırakılan Fidelerin Sekonder Metabolit İçeriklerinin HPLC Analiz Sonuçları.....	78
4.3.1. Standartlara Ait Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi ve Doğru Denkleminin Hesaplanması ile İlgili Sonuçlar.....	78
4.3.2. Standartların Pik Çıkış Süreleri ve Kromatogramları	82
4.3.3. Örneklerin Analiz Sonuçları.....	86
4.3.4. Elisitasyon Uygulamalarına Göre <i>In Vitro</i> Fidelerde Sekonder Metabolit Değişimleri	86
4.3.4.1. Su stresi (osmotik stres)	87
4.3.4.2. Biyotik elisitörler	97
4.3.4.3. Krom (Cr) uygulaması	106
5. SONUÇ	112
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ	136

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

BA	6-Benzil adenin
CAT	Katalaz
Cr	Krom
DAD	Diode Array Detector
2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
dk	Dakika
EtOH	Etil alkol
g	gram
g/L	gram/Litre
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (High Performance Liquid Chromatography-Mass spectrometry)
HPLC-NMR	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Nükleer Manyetik Rezonans (High Performance Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance)
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol-3-butirik asit
KIN	Kinetin
kPa	Kilopaskal
L	Litre
mg/L	Miligram/Litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MS	Murashige and Skoog
NAA	Naftalen Asetik Asit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
OGs	Oligogalakturonidler
PDA	Patates Dekstroza Agar
PEG	Polietilen glikol
PTFE	Politetrafloroetilen
SOD	Süperoksit dimutaz

TDZ	Thidiazuron
TLC	İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography)
TTC	2,3,5-Trifeniltetrazolium klorür
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
%	yüzde
&	ve (and)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>Hypericum</i> 'ların içerdiği önemli bileşikler.....	6
Şekil 3.1.	<i>H. adenotrichum</i> 'un doğal ortamındaki genel görünüşü	22
Şekil 3.2.	<i>H. adenotrichum</i> 'un çiçek yapısı ve salgı tüylerinin yakından görünüşü	23
Şekil 4.1.	¼ MS/Galzy ortamında yetişen 8 haftalık fide.....	54
Şekil 4.2.	¼ MS ortamında yetişen 8 haftalık fide.....	54
Şekil 4.3.	MS ortamında yetişen 8 haftalık fide.....	55
Şekil 4.4.	3 mg/L BA içeren MS ortamında yaprak eksplantından kallus oluşumu	58
Şekil 4.5.	BA konsantrasyonlarına göre değişen kallus indüksiyon oranları.....	58
Şekil 4.6.	1 mg/L TDZ içeren MS ortamında yaprak eksplantından kallus oluşumu	60
Şekil 4.7.	TDZ konsantrasyonlarına göre değişen kallus indüksiyon oranları ...	60
Şekil 4.8.	2 mg/L KIN + 0.2 mg/L NAA içeren MS ortamında yaprak eksplantından kallus oluşumu.....	62
Şekil 4.9.	KIN + NAA konsantrasyonlarına göre değişen kallus indüksiyon oranları.....	62
Şekil 4.10.	4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA içeren MS ortamında yaprak eksplantından kallus oluşumu.....	64
Şekil 4.11.	BA + NAA konsantrasyonlarına göre değişen kallus indüksiyon oranları.....	64
Şekil 4.12.	0.5 mg/L KIN içeren MS besi ortamlarında kallus indüksiyon aşamasında kullanılan BA konsantrasyonlarına göre değişen sürgün indüksiyon oranları	69
Şekil 4.13.	3 mg/L BA'dan elde edilen kalluslardan, 0.5 mg/L KIN içeren ortamlarda sürgün indüksiyonu	69
Şekil 4.14.	Ortalama boyu yaklaşık 1.0 cm olan sürgünlerin hormonsuz MS ortamına aktarıldıktan 2 hafta sonraki görüntüsü	70
Şekil 4.15.	KIN konsantrasyonlarına göre değişen sürgün indüksiyonu	72
Şekil 4.16.	1 mg/L KIN içeren MS ortamında yapraktan direkt sürgün indüksiyonu	72
Şekil 4.17.	KIN konsantrasyonlarına göre değişen aksiller sürgün indüksiyonu ..	74
Şekil 4.18.	0.5 mg/L KIN içeren MS ortamında aksiller sürgün indüksiyonu	75

Şekil 4.19. 0.5 mg/L IAA içeren ½ MS ortamında aksiller sürgünlerden kök indüksiyonu.....	76
Şekil 4.20. 0.5 mg/L IAA içeren ¼ MS ortamında aksiller sürgünlerden kök indüksiyonu.....	77
Şekil 4.21. Rutin kalibrasyon eğrisi	79
Şekil 4.22. Hiperosid kalibrasyon eğrisi	79
Şekil 4.23. İzokuersitrin kalibrasyon eğrisi.....	80
Şekil 4.24. Amentoflavon kalibrasyon eğrisi.....	81
Şekil 4.25. Pseudohiperisin kalibrasyon eğrisi.....	81
Şekil 4.26. Hiperisin kalibrasyon eğrisi	82
Şekil 4.27. 270 nm’de standartlara ait kromatogram	84
Şekil 4.28. 590 nm’de standartlara ait kromatogram	85
Şekil 4.29. 15 ve 30 gün PEG uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	89
Şekil 4.30. 15 ve 30 gün PEG uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	89
Şekil 4.31. 15 ve 30 gün PEG uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	90
Şekil 4.32. 15 ve 30 gün PEG uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	91
Şekil 4.33. 15 ve 30 gün sukroz uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	93
Şekil 4.34. 15 ve 30 gün sukroz uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	94
Şekil 4.35. 15 ve 30 gün sukroz uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	95
Şekil 4.36. 15 ve 30 gün sukroz uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	95
Şekil 4.37. 15 ve 30 gün pektin uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	99
Şekil 4.38. 15 ve 30 gün pektin uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	100
Şekil 4.39. 15 ve 30 gün pektin uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.....	100

Şekil 4.40.	15 ve 30 gün pektin uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları	101
Şekil 4.41.	15 ve 30 gün mannan uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları	103
Şekil 4.42.	15 ve 30 gün mannan uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.	104
Şekil 4.43.	15 ve 30 gün mannan uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları	105
Şekil 4.44.	15 ve 30 gün mannan uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları	105
Şekil 4.45.	15 ve 30 gün Cr uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları	108
Şekil 4.46.	15 ve 30 gün Cr uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları	109
Şekil 4.47.	15 ve 30 gün Cr uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları	110
Şekil 4.48.	15 ve 30 gün Cr uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları	110

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	<i>H. adenotrichum</i> 'un <i>in vitro</i> çalışmalarında kullanılan temel besi ortamları.....	26
Çizelge 3.2.	Tohumlar için uygulanan sterilizasyon işlemleri	29
Çizelge 3.3.	Yaprak eksplantları için uygulanan sterilizasyon denemeleri.....	31
Çizelge 3.4.	Kromatografik koşullar	38
Çizelge 4.1.	Distile su içerisinde batan ve yüzen tohum sayıları	40
Çizelge 4.2.	Farklı uygulamalara maruz bırakılan tohumların PDA ortamındaki kontaminasyon yüzdeleri	41
Çizelge 4.3.	Karanlık ortamlarda elde edilen çimlenme değerleri	43
Çizelge 4.4.	Karanlıkta tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının etkileri ve bunların etkileşimlerinin üç yönlü varyans analizi sonuçları	44
Çizelge 4.5.	Karanlıkta üç yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testine göre tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının oluşturduğu gruplar ..	45
Çizelge 4.6.	Fotoperiyotlu ortamlarda elde edilen çimlenme değerleri	46
Çizelge 4.7.	Fotoperiyotta tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının etkileri ve bunların etkileşimlerinin üç yönlü varyans analizi sonuçları	47
Çizelge 4.8.	Fotoperiyotta üç yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testine göre tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının oluşturduğu gruplar ..	48
Çizelge 4.9.	<i>H. adenotrichum</i> fidelerinin gelişimi üzerine farklı ortamların etkisi	51
Çizelge 4.10.	Farklı uygulamalara maruz bırakılan tohumların PDA ortamındaki kontaminasyon yüzdeleri	56
Çizelge 4.11.	Farklı BA konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan <i>H.adenotrichum</i> 'un yaprak eksplantlarına ait kallus indüksiyon oranları	57
Çizelge 4.12.	Farklı TDZ konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan <i>H.adenotrichum</i> 'un yaprak eksplantlarına ait kallus indüksiyon oranları.....	59

Çizelge 4.13. Farklı KIN ve NAA konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan <i>H.adenotrichum</i> 'un yaprak eksplantlarına ait kallus indüksiyon oranları.....	61
Çizelge 4.14. Farklı BA ve NAA konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan <i>H. adenotrichum</i> 'un yaprak eksplantlarına ait kallus indüksiyon oranları.....	63
Çizelge 4.15. Farklı büyüme düzenleyicisi konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan <i>H.adenotrichum</i> 'un yaprak eksplantlarına ait en yüksek kallus indüksiyon oranına sahip ortamların karşılaştırılması.....	65
Çizelge 4.16. Kallus indüksiyonunda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerine göre sürgün indüksiyon cevapları.....	68
Çizelge 4.17. Kalluslardan, 0.5 mg/L KIN içeren MS besi ortamlarında sürgün indüksiyonu	68
Çizelge 4.18. Farklı KIN konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında eksplant başına direkt sürgün sayısına ait ortalamalar	71
Çizelge 4.19. Farklı KIN konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında eksplant başına aksiller sürgün sayısına ait ortalamalar.....	74
Çizelge 4.20. Standartların pik çıkış süreleri.....	83
Çizelge 4.21. 15 gün PEG (g/L) uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)	88
Çizelge 4.22. 30 gün PEG (g/L) uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)	88
Çizelge 4.23. 15 gün sukroz (g/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)	92
Çizelge 4.24. 30 gün sukroz (g/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)	93
Çizelge 4.25. 15 gün pektin (mg/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)	98
Çizelge 4.26. 30 gün pektin (mg/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)	98
Çizelge 4.27. 15 gün mannan (mg/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.).....	102
Çizelge 4.28. 30 gün mannan (mg/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.).....	103

Çizelge 4.29. 15 gün Cr (mM) uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.).....	107
Çizelge 4.30. 30 gün Cr (mM) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.).....	108

1. GİRİŞ

In vitro bitki doku kültürü teknikleri, diğer üretim yöntemlerinden farklı olarak kontrollü çevresel koşullarda, belirli bir steril besi ortamında, aseptik olarak izole edilen hücre, protoplast, doku ve organların kültürlerini kapsayan (Ziv ve Altman, 2003); organogenezis, somatik embriyogenezis ve genetik transformasyon aracılığı ile önemli bitkilerin korunması için kullanılan bir teknolojidir (Sajc vd., 2000; Mujib ve Samaj, 2006). *In vitro* teknikler kullanılarak hastalık ve virüsten arındırılmış tek bir ana stok bitkiden, genetik olarak özdeş bitkilerin çok büyük miktarlarda üretimi sağlanabilmektedir (Shibli vd., 1997). Ayrıca çoğaltılması zor olan türlerin üretilmesi, kaybolmakta olan türlerin korunması, genetik iyileştirme çalışmaları ve bitki sekonder metabolitlerinin üretilmesi gibi pek çok alanda çeşitli doku kültürü teknikleri rutin olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu vd., 2001).

Son yıllarda doğal bitki materyallerine ilginin artması nedeniyle doğal habitatların yok edici kullanımları, birçok bitki türünü tehdit etmektedir. Bitki genetik kaynaklarının kaybı yeni *ex situ* koruma metotlarının geliştirilmesini gerektirmektedir (Paunescu, 2009). Tarla ya da botanik bahçelerinde kültivasyon, tohum bankalarının oluşturulması, tohumların çimlenme şartlarının belirlenmesi, tohumdan çoğaltıma gidilmesi, bitki doku kültürü tekniklerini kullanarak mikro-çoğaltım ile sürekli kültürlerin oluşturulması ve DNA bankaları önemli *ex situ* koruma çalışmaları arasındadır (Laliberté, 1997; Kapai vd., 2010).

Bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak sekonder metabolitlerin üretimi son zamanlarda önemli ölçüde hız kazanmıştır. Bitki sekonder metabolitleri, “Hücre büyümesi ve çoğalmasındaki primer biyokimyasal yollarda yer almayan ancak özellikle bitkinin çevresine adaptasyonunda rol oynayan bir molekül grubu çeşidi” olarak tanımlanmaktadır (Makkar vd., 2007). Literatürde bu bileşikler için; bitki sekonder bileşikleri, fitokimyasallar, antinutrisyonel faktörler ve bitki ksenobiotikleri gibi terimler kullanılmaktadır. Bitkilerde sekonder metabolitlerin dağılımı, primer metabolitlere göre çok daha kısıtlanmıştır; bir bileşik çoğunlukla yalnızca birkaç türde bulunmaktadır ya da bir tür içinde bile birkaç varyetede var olabilmektedir. Sekonder metabolitlerin bitki metabolizmasındaki fonksiyonları açık olmamasına rağmen, yine de onların yırtıcı hayvanlara karşı savunma mekanizmasında ya da böceklerle tozlaşma için cezbedici olarak ekolojik bir role sahip olabileceği bildirilmektedir (Grisebach, 1988). Ayrıca bu bileşikler, patojenlere karşı bitkiyi korumak için antibakteriyel, antiviral ve antifungal

(fitoaleksinler), öteki bitkiler için toksik ya da anti-germinatif (allelopati) olarak (Bourgauud vd., 2001) ve ışığın zararlı etkilerine karşı yaprakları korumak için UV absorblayıcılığı gibi çok önemli görevlere sahiptirler (Li vd., 1993). Bitkinin kendisine sağladığı bu yararların yanı sıra, sekonder metabolitler insanlar için de son derece önemlidir. Son zamanlarda bitkilerden ekstrakte edilen bioaktif bileşikler, farmasötik, tarım kimyasalları, tat ve güzel koku bileşenleri, yiyecek katkı maddesi ve pestisit olarak da kullanılmaktadırlar (Vijaya vd., 2010).

Eski zamanlardan beri tıbbi bitkiler bir ilaç kaynağı olarak hemen hemen bütün kültürlerde kullanılmıştır (Kumar, 2004; Patwardhan vd., 2004). Bitkisel uygulamalar, geleneksel tıp içerisinde en yaygın olarak kullanılanıdır. Bazı Avrupa ve Afrika ülkelerinde nüfusun %80'ni primer sağlık bakımları için geleneksel tıbbi kullanmaktadır. Birçok gelişmiş ülkede nüfusun %70-80'ni alternatif ya da tamamlayıcı tıptan faydalanmaktadır. Uluslararası marketlerde bitkisel ürünler yüksek kar getirmektedir. 2003-2004 yıllarında Batı Avrupa'da yıllık kazanç 5 milyon dolara ulaşmıştır. Çin'de 2005 'de toplam satış 14 milyon dolar, Brezilya'da 2007 bitkisel ilaç geliri ise 160 milyon dolar olmuştur (World Health Organization, 2008). Dünya sağlık örgütü, 2050 yılında tıbbi bitkilere olan talebin 5 trilyon dolara ulaşacağını öne sürmüştür (Sharma, 2004). Tıbbi bitkilerde ve bitkisel ilaçlarda üretim, tüketim ve uluslararası ticaret büyümekte ve gelecekte daha fazla büyümesi beklenmektedir. Artan market taleplerini karşılamak için araştırmalar, bitkisel ilaç ve ilaçların yeni bitki kaynaklarını ortaya çıkarmak ve aynı zamanda daha iyi ürün ve kalite için yeni stratejiler geliştirmek için yapılmaktadır (Gokhale ve Bansal, 2010). Fitofarmasötik preparatlardaki tıbbi içerik ve kalitede geniş varyasyonlar gözlenmiştir. Bu durum çoğunlukla kültür periyodu ve toplanma mevsiminden kaynaklanmaktadır (Abdin vd., 2003). Ayrıca bitkiler genellikle sahada büyümektedir. Bu yüzden ürün kalitesini tehlikeye atabilen patojenler ile böceklerin istilasına ve kirleticilerin kontaminasyonuna açıktır (Bacila, 2010). Halen tıbbi bitki türlerinin sadece %10'u kültüre edilebilmekte, geri kalan %90'ı yabani popülasyonlardan toplanmaktadır (Julising vd., 2007). Bitkilerin devam eden tahribatı, yıllar geçtikçe bitki türlerinin soylarının tükenmesine yönelik temel bir tehdit ortaya çıkaracaktır. Günümüzde yeni bitkisel kaynaklı kimyasal maddeler için araştırma yapmak öncelikli olmalı ve gelecekte de biyoçeşitliliğin sürdürülebilirliğinin korunması ve akılcı kullanımı yönünde çaba sarf edilmelidir (Philipson, 1990). Fitofarmasötik endüstrisi

tarafından karşılaşılan problemlere en verimli ve en uygun alternatif çözüm, tıbbi bitkiler ve onların ekstraktlarının üretimi için *in vitro* sistemlerin geliştirilmesidir (Nasim vd., 2010). Biyoteknologlar mikroçoğaltım ve diğer bitki doku kültürü teknikleri ile önemli bitkilerin daha fazla çoğaltılmasına başlanmasıyla birçok problemin üstesinden gelineceğini düşünmektedirler (Sarin, 2005). Son 20 yıldan beridir, bitki hücre ve doku kültürü teknolojisinin, yararlı sekonder metabolitler için bir kaynak olarak tam bitki kültürlerinin dereceli olarak yerine geçmesi mümkün kılınmaktadır. Bitki doku kültürü ile farmasötiklerin üretimi birçok avantaj sunar:

- Bitkinin kendisinin elde edilebilirliğinden bağımsız ürün tedarikinin kontrolü,
- Kontrollü ve optimize şartlar altında kültüre edilme,
- Mikrobiyal sistemler için kullanılan benzer programlar ile nesil (soy) ıslahı,
- Zararlı herbisit ve pestisitlerin kullanımının gerekmemesi,
- Doğal substratlara benzer bileşiklerin ilavesi ile normalde bitkide sentezlenmeyen yeni bileşiklerin sentezlenmesi olasılığı,
- İklim ve coğrafik bölgeden bağımsızlık (Chattopadhyay vd., 2002).

Bazı bitkilerde *in vitro* rejenere bitkiciklerin aktif bileşikleri daha yüksek verimde ürettiği rapor edilmiştir (Fowke vd., 1994; Han vd., 1999). Sekonder bileşiklerin yüksek verimde üretimi aynı zamanda kallus kültürlerinden, süspansiyon kültürlerinden ya da prekürsör kullanımında da bildirilmiştir (Gokhale ve Bansal, 2010; Jordan vd., 2006). *In vitro* kültürlerde dikkatli bir şekilde belirli kimyasal ürünlerin kasıtlı uyarılması, mikro çevre koşullarının kontrolü altında biyokimyasal ve metabolik yolların derinlemesine araştırılması için de mükemmel bir zemin hazırlar (Karuppusamy, 2009). Ticari firmalar için uygun miktarda ürün elde etmek için çalışmalar; kültür şartlarının optimizasyonu, prekürsörlerin kullanılması ve yüksek üretim yapan nesillerin seçimi, transformasyon metotları ve immobilizasyon teknikleri aracılığı ile elde edilen hücrelerin biyosentez (biyosentetik) aktivitelerinin üzerine odaklanmıştır (Dicosmo ve Misawa, 1995).

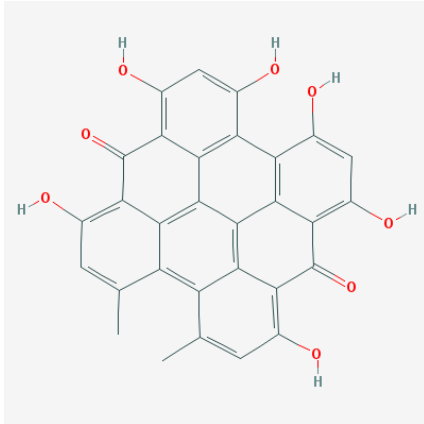
In vitro kültürler ile sekonder metabolitleri arttırmanın birkaç yolu vardır. Bunlar:

- Metabolik yolları teşvik eden biyotik ya da abiyotik elisitörlerin kullanımı,
- Ara bileşik ya da bileşiklere öncülük eden metabolik yolların ifadesini destekleyen karbon akışında değişimleri indükleyen ya da onun üretimini arttırma amacı ile kültür ortamına arzu edilen bir bileşiğin bir prekürsör (öncü) olarak eklenmesi,

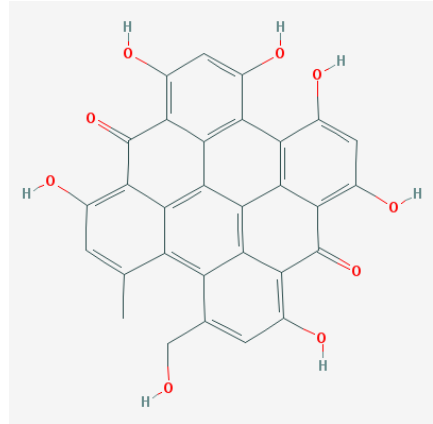
- Protoplast füzyonu ya da genetik mühendisliği aracılığı ile yeni genotiplerin üretimi,
- Canlı hücrelere onlarda zaten var olan varyasyonu arttırmak için mutajenlerin kullanımındır (Sasson, 1991).

Tıbbi bitkiler arasında özellikle *Hypericum* cinsine ait türler önemli bir yere sahiptir. *Guttiferae* familyasına ait olan *Hypericum* cinsi yaklaşık 450 tür içermektedir (Robson, 2003). Birkaç *Hypericum* türü, yara iyileştirici, bakterisid, anti-inflamatuar, diüretik ve sedatif özelliklerinden dolayı yüzyıllardır geleneksel olarak kullanılmaktadır (Demirci ve Başer, 2005). *Hypericum* türlerinin, naftodiantronlar (hiperisin, pseudohiperisin), floroglusinoller (hiperforin, adhiperforin), flavonoidler (kuersetin, hiperosid, kuersitrin, izokuersitrin, rutin, kamferol, mirsetin, amentoflavon, 13,Π8-Biapigenin), fenilpropanoitler (kafeik asit, klorogenik asit), uçucu yağlar (terpenler, alkoller), aminoasitler (GABA, sistein, glutamin, lösin, lizin, ornitin, prolin, treonin), ksantonlar (kielkorin, norathrol), taninler (tannik asit), prosiyanidinler (proksiyanidin, kateşin, epikateşin polimerleri) ve diğer bazı suda çözünür bileşikler (organik asitler, peptitler, polisakkaritler) olarak adlandırılan birçok bioaktif bileşik içerdiği rapor edilmiştir (Greeson vd., 2001).

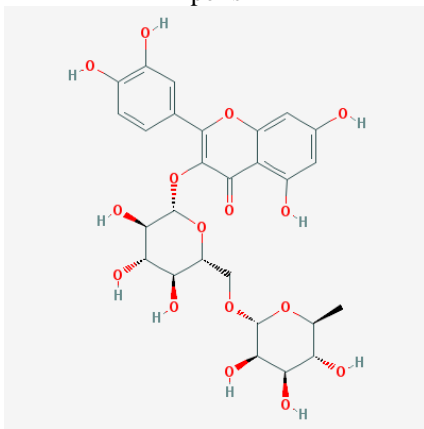
Hypericum ekstraktlarının en çok çalışılan bileşikleri, hiperisin, pseudohiperisin, hiperforin ve flavonoidleridir (rutin, hiperosid, izokuersitrin, kuersitrin, kuersetin, amentoflavon) (Şekil 1). *Hypericum* ekstraktlarının antidepresan aktivitesi, hiperisin, pseudohiperisin, hiperforin ve flavonoidlere bağlanmaktadır (Butterweck, 2003). Hiperisin ve pseudohiperisin fotodinamik, antiviral, antiretroviral, antibakteriyel, antipsoriatik, antidepresan ve antitümoral aktivitelere sahiptir (Guedes ve Eriksson, 2005).



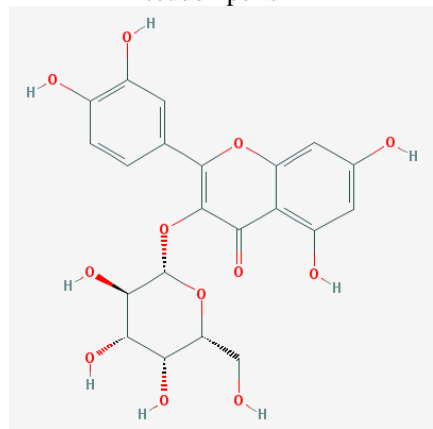
Hiperisin



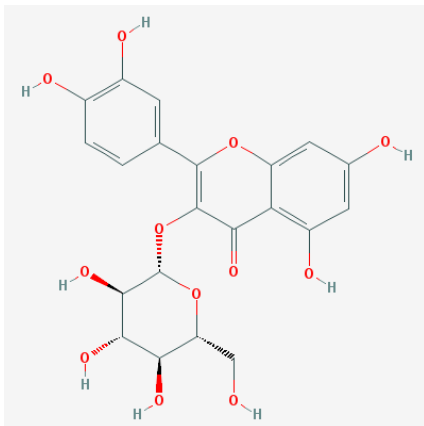
Pseudohiperisin



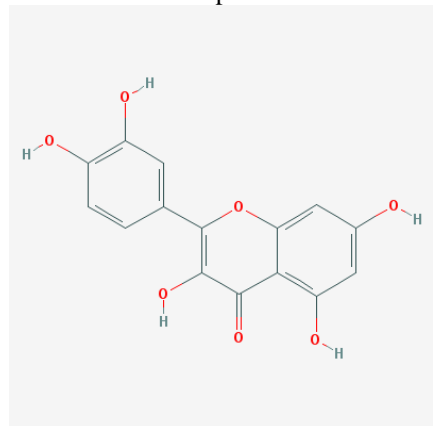
Rutin



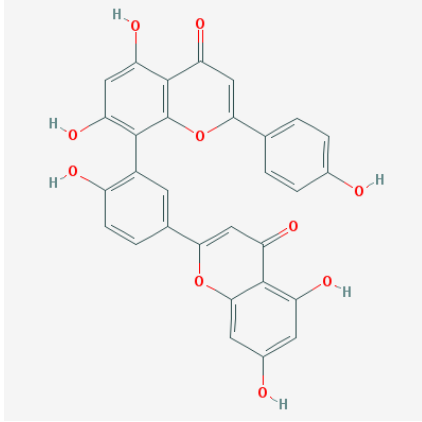
Hiperosid



İzokuersitrin



Kuersetin



Amentoflavon

Şekil 1.1. *Hypericum*'ların içerdiği önemli bileşikler¹

Floroglusinoller (hiperforin, adhiperforin), antibakteriyel, antitümoral ve antidepresan aktiviteler göstermektedir (Beerhues, 2006). *Hypericum* ksantonları, anti-inflamatuar, kanser-kemopreventif ve kardiyovasküler koruyucu aktivitelere sahiptir (Fotie ve Bohle, 2006). Ayrıca bazı ksantonlar iyi antibakteriyel özellikler taşımaktadır (Xiao vd., 2008).

Hypericum türleri içerisinde en yaygın ve popüler olanı *Hypericum perforatum* L.'dur. *H. perforatum* kompleks bir sekonder metabolit karışımı içeren iyi bilinen bir tıbbi bitkidir (Tatsis vd., 2007). 1998'de *H. perforatum*'un yıllık market değeri sadece ABD'de 210 milyon \$, dünya genelinde ise 570 milyon \$'ı aşmıştır (Gruenwald, 1999). *H. perforatum* Amerika'da en çok satılan bitkisel ürünler arasında yer almaktadır (National Centre for Complementary and Alternative Medicine, 2002). *H. perforatum*'un tıbbi ürünlerinin (ör. Psychotonin®, Neuroplant®, Hyperforat®) antidepresan uygulamaları Avrupa'da özellikle de Almanya'da giderek popüler olmaktadır (Gioti, 2005). Botanik endüstrisinin *Hypericum* ihtiyacı büyük ölçüde doğadan toplama ve tarla tarımı ile karşılanmaktadır (Kirakosyan vd., 2004). Ancak üretimde sorunlar vardır. *Hypericum* türlerinin çimlenme kapasitesi tohum dormansisine bağlı olarak genellikle çok düşüktür (Macchia vd., 1983). *H. perforatum*'un bir patojeni olarak tanımlanmış *Colletotrichum gloeosporioides*, antraknoz denilen bir hastalığa

¹ Bileşiklerin kimyasal yapıları <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> adresinden alınmıştır.

neden olmakta ve bu durum tarla tarımı ile bu bitkinin üretiminde büyük kayıplar verebilmektedir (Gaudin vd., 2002; Gaudin vd., 2003; Crockett vd., 2010). Biyotik ve abiyotik stres, bitkilerdeki sekonder metabolitlerin seviyesi üzerinde önemli bir etki gösterir (Dixon ve Paiva, 1995). *H. perforatum*'daki tıbbi olarak aktif bileşiklerin konsantrasyonu elde edilebilir nitrojen, ışık miktarı ve kalitesi, mevsim ve büyüme bölgelerine bağlı olarak değişmektedir (Tirillini, 2006). Ayrıca bitki materyalinin toplanma, işlenme ve depolanması sırasında bazı faktörler de bitkideki aktif bileşenlerin seviyesini etkileyebilmektedir (Abreu ve Mazzafera, 2005). Bu bitkinin doğal sağlık ürünlerinin standartizasyonunda üç sekonder metabolitin (hiperisin, pseudohiperisine ve hiperforin) ölçümleri temel alınmaktadır (Orth vd., 1999). Yapraklardaki hiperisin ve pseudohiperisin konsantrasyonu yazın ve kışın yetiştirilen bitkiler arasında 50 kat değişebilmektedir (Southwell ve Bourke, 2001). Bütün bu faktörler ticari olarak üretilen *Hypericum* farmasötik preparatlarındaki aktif bileşik içeriklerinin stabil olmamasına neden olmaktadır. Bu bitkinin kısıtlı bir alanda var oluşu, mevsimsel toplama, biyoçeşitliliğin kaybı, kalitedeki çeşitlilik ve kontaminasyon konusu *Hypericum* yetiştiriciliği ve onların sekonder metabolit üretimi için alternatif metotların araştırılmasına yol açmıştır.

In vitro kültür, *Hypericum* türlerinin çoğaltılması için uygulanabilir bir seçenek olarak gösterilmektedir (Bacila vd., 2010). Kontrollü ve standardize edilmiş laboratuvar şartları altında *H. perforatum*'un *in vitro* kültürü, olumsuz çevresel koşulların oluşturduğu problemler için bir çözüm olarak sunulmaktadır. *Hypericum* türleri için kullanılacak mikroçoğaltım ve diğer *in vitro* teknikler ile aynı fitokimyasal profile sahip bitki materyalinin sağlanabileceği ve sekonder metabolitlerin değişken miktarlarda üretilmesine yol açan faktörlerin elimine edilebileceği Wojcik ve Podstolski (2007) tarafından da rapor edilmiştir.

Hypericum cinsine ait farklı türlerin *in vitro* rejenerasyonu için çok sayıda başarılı deneme vardır: *H. canariense* L. (Mederos, 1991; Mederos vd., 1997), *H. brasiliense* Choisy (Cardoso ve Oliveira, 1996), *H. foliosum* Aiton (Moura, 1998), *H. perforatum* L. (Cellárová vd., 1992; Pretto ve Santare´m, 2000; Zobayed vd., 2004), *H. erectum* Thunb. (Yazaki ve Okuda, 1990), *H. patulum* Thunb. (Baruah vd., 2001), *H. hirsutum* L. (Coste vd., 2011), *H. maculatum* Crantz (Bacila vd., 2010), *H. sampsonii* Hance (Zeng ve Zhou, 2002; Liu vd., 2007), *H. mysorensis* Heyne (Shilpashree ve Rai, 2009), *H. rumeliacum* Boiss. (Danova, 2010), *H. ternum* A.St.Hil. (Pinhatti, 2010). Şu ana kadar incelenen literatürlerde biz 16

Hypericum türünün hem çoğaltım amaçlı hemde sekonder metabolitlerinin üretimi için *in vitro* kültür teknikleri aracılığı ile mikroçoğaltımının yapıldığını tespit ettik. Bununla birlikte, *H. perforatum* en çok ilgilenilen ve yoğun bir şekilde çalışılan türdür. *Hypericum* türlerinin *in vitro* rejenerasyonu, tam fideler ya da onlardan kesilen parçalar (Cellárová vd., 1992), hipokotil kısımları (Murch vd., 2000), nodal segmentler (Santarem ve Astarita, 2003) ve yapraklar (Pretto ve Santarém, 2000; Wojcik ve Podstolski, 2007) kullanılarak çeşitli tip ve konsantrasyonda sitokin ve oksin içeren ortamlarda başarılmıştır. *Hypericum* türlerinin kültürleri, bitkilerin farklı ontogenetik devrelerinden orjinlenen eksplantlardan başlatılmıştır. Örneğin, genç fide eksplantları, ya bitkinin morfogenetik potansiyeline yönelik bir çalışma için ya da sekonder metabolit profilinin görüntülenmesi için hücre süspansiyonlarının başlatılmasında kullanılan kallus dokularını üretmek için kullanılmaktadır (Pasqua vd., 2003). *Hypericum* türlerinin hücre ve doku kültürlerinde fitokimyasallarının biyosentezi ve birikimi üzerine de çok sayıda çalışma vardır (Mulinacci vd., 2008; Bais vd., 2003). Santarem ve Astarita (2003), gövde fragmentlerinden elde edilen kallus, sürgün ve bitkiciklerde hiperisin içeriğini araştırmıştır. Hücre kültürlerinin verimliliğini artırmak için kültür şartları genellikle prekürsörler ve elisitörler kullanılarak optimize edilmektedir (Verpoort ve van der Heijden, 1996; Yamamoto vd., 1998; Kirakosyan vd., 2000; Vardapetyan vd., 2006).

In vitro kültürlerin elisitasyonu, istenilen bileşiklerin miktarını arttırmak ve devamlı üretimini sağlamak için kullanışlı bir yaklaşımdır (Oksman-Caldentey ve Inze', 2004). Elisitörler, sinyal transdüksiyon basamaklarını aktive eden ve sekonder bileşiklerin biyosentezi ile ilişkili genlerin aktivasyonu ve ekspresyonuna yol açan sinyal molekülleridir (Zhao vd., 2005) ve ROS üretimini, hipersensitif yanıtları ve fitoaleksinin üretimini harekete geçiren çeşitli bitki savunma sistemlerini indüklemeye kapasitesine sahiptirler (Angelova vd., 2006; Montesano vd., 2003). Bu yüzden elisitörler, değerli bitki sekonder metabolitlerinin üretimini arttırmak için kullanılabilir yararlı araçlardır (Vasconsuelo ve Boland, 2007). *Hypericum* türlerinin *in vitro* kültür sistemlerinde naftodiantronları üretme yeteneklerini test etmek için mannan, β -1,3-glukan, pektin, jasmonik asit (JA), metil jasmonat (MeJA), Salisilik asit ve *Colletotrichum gloeosporioides* (fungus) ve *Phytophthora cinnamoni* (fungus) gibi elisitörler kullanılmıştır (Kirakosyan vd., 2000; Sirvent ve Gibson, 2002; Walker vd., 2002; Gadzovska vd., 2007).

Hypericum ürünleri genellikle % 0.3 hiperisin içeriklerine göre standardize edilir (Avato ve Guglielmi, 2004; Wang vd., 2004). Bitki ekstraktı gibi kompleks karışımlarda bioaktif bileşiklerin tanımlanması oldukça zor bir iştir. Farklı kodekslerde farklı ekstraksiyon prosedürleri gösterilmiştir. *H. perforatum*'dan aktif bileşikleri ekstrakte etmek için, ultra sesli ve ultra sessiz maserasyon (Smelcerovic vd., 2002), sokslet ekstraksiyonu (Brolis, 1998), hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (ASE) (Crockett vd., 2005), basınçlı su ekstraksiyonu (Mannila, 2003), superkritik sıvı ekstraksiyon (Mannila, 2002; Seger, 2004) gibi birkaç metot kullanılmıştır. Son çalışmalar göstermiştir ki, direkt sonikasyon ile *H. perforatum*'dan elde edilen hiperisinler, flavonoidler ve hiperforinlerinin miktarı, diğer ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilenden daha yüksektir (Smelcerovic vd., 2006) ve metanol ile sonikasyonu, homojen bir drog örneği (bütün ana metabolitleri temsil eden ve daha az bozulmuş ürünler) elde etmek için en iyi ekstraksiyon metotlarından biridir (Avato ve Guglielmi, 2004). Ayrıca, ekstraksiyon sırasında ışığın bulunmaması, fotosentitif olan naftodiantronların ve floroglukonol türev ürünlerinin yıkımından kaçınmak için tavsiye edilmektedir (Li ve Fitzloff, 2001; Tolonen, 2002; Pages vd., 2007). *H. perforatum* örneklerinin analizleri için, ince tabaka kromatografisi (TLC), spektrofotometre, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (HPLC-MS), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-nükleer manyetik rezonans (HPLC-NMR) ile birkaç metot rapor edilmiş ama bunların çoğu yalnızca naftodiantronların ve/ya da hiperforinlerin tespiti üzerine odaklanmıştır. Sadece bir kaç HPLC metodu, *H. perforatum*'da aynı anda rutin, hiperosid, izokuersitrin, kuersitrin, kuersetin, pseudohiperisin, hiperforin ve hiperisin gibi ana bileşenlerin tespiti için rapor edilmiştir (Li ve Fitzloff, 2001; Ganzera vd., 2002).

Hypericum adenotrichum Spach *Hypericum* cinsine ait Türkiye'de yetişen endemik bir türdür. Yaptığımız literatür araştırmaları dahilinde *H. adenotrichum* ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır ve yapılan çalışmalar sadece biyokimyasal çalışmalardır. Mikrodistilasyon yöntemi ile bitkinin uçucu bileşikleri incelenmiş ve ana bileşen olarak germakren-D belirlenmiştir. Bulunan ve total bileşenlerinin %93'ünü oluşturan 45 bileşik ise şöyledir: α -Pinen, Hekzenal, Undekan, β -Pinen, Mirsen, Limonen, (Z)-3-Hekzenal, Amilfuran (2-Pentylfuran), Tridekan, Nonanal, Bisikloelemen, α -Kopaen, β -Burbonen, β -Kubeben, β -Funebren, β -Yılangen, β -Karyofillen, Alloaromadendren, (Z)- β -Farnesen, α -Humulen, γ -Muurolen, α -Terpineol, Germakren-D, α -Muurolen, Bisiklogermakren, (E,E)- α -Farnesen, δ -

Kadinen, γ -Kadinen, Kadina-1,4-dien(=Cubenene), Mirtenol, 3,7-Guaiadiene, (E,E)-2,4-Dekadienal, Nonadekan, Dodekanol, Globulol, Heneikosan, Hekzahidrofarnesil aseton, Spatulanol, (Z)-3-Hekzenil benzoat, T-Kadinol, T-Muurolol, δ -Kadinol, Karvakrol, α -Kadinol, Dodekanoik asit (Erken vd., 2001). Crockett vd. (2005)'nin yaptığı diğer bir çalışmada rutin, hiperosid, izokuersitrin, kuersitrin, kuersetin, amentoflavon, pseudohiperisin, hiperisin, hiperforin olmak üzere 9 bileşik standart alınarak, içlerinde *H. adenotrichum*'un da yer aldığı bazı *Hypericum* türlerinin toprak üstü kısımları analiz edilmiştir. Analizler sonucunda *H. adenotrichum*'un izokuersitrin, kuersitrin, kuersetin, amentoflavon, pseudohiperisin gibi bileşenleri içerdiği bildirilmiştir. Çırak vd., (2009), *H. adenotrichum*'un toprak üstü kısımlarını analiz etmiş ve analizler sonucunda bitkinin hiperforin, pseudohiperisin, hiperisin, klorogenik asit, rutin, hiperosid, apigenin-7-O-glucoside, kuersitrin, kuersetin, kamferol, amentoflavon içerdiğini tespit etmişlerdir. Özmen vd., (2009), *H. adenotrichum*'un ekstraktlarının P-53 bağımsız güçlü anti-neoplastik (antikanser) özelliklere sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Yapılan literatür araştırmalarında tıbbi ve endemik bir bitki olan *H. adenotrichum* ile ilgili yapılmış herhangi bir *in vitro* doku kültürü çalışmasına rastlanmamıştır. Yukarıda verilen bilgiler ışığında ele alınan bu çalışmada, *H. adenotrichum* bitkisinin uygun kısımlarının eksplant olarak kullanılması ile farklı büyüme düzenleyicilerine vereceği morfolojik tepkiler belirlenmiş ve bu tür için etkili bir *in vitro* çoğaltım sistemi tanımlanmıştır. Ayrıca, *in vitro* koşullar altında bazı elisitör ve stress uygulamaları ile bitkideki sekonder metabolit miktar ve değişimi belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Doku Kültürü ve Doku Kültüründe Sekonder Metabolit İçeriklerinin Araştırılması ile İlgili Çalışmalar

Pretto ve Santarem (2000), *Hypericum perforatum* yaprak eksplantlarını 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D, 0.45 ya da 4.5 μ M) ve 6-benziladenin (BA, 0.44 ya da 4.4 μ M) ya da kinetin (KIN, 0.46 ya da 4.6 μ M) içeren MS (Murashige ve Skoog) ortamında karanlık ya da aydınlık koşullarda kültüre ederek kalluslar elde etmişlerdir. En yüksek hücre proliferasyonu karanlıkta 4.4 μ M BA and 4.5 μ M 2,4-D varlığında kültüre edilen eksplantlardan elde edilmiştir. Kallus başına en yüksek sürgün sayısı 4.6 μ M kinetin ve 0.45 μ M 2,4-D ilaveli ortamlar üzerinde indüklenen kallusların, 4.4 μ M BA içeren MS ortamlarında kültüre alınmasından elde edilmiştir. Kök oluşumu indol-3-bütirik asit (IBA, 4.9 μ M) içeren ya da içermeyen MS ve ½ MS ortamındaki sürgünlerden indüklenmiş ve en yüksek köklenme IBA varlığı dikkate alınmaksızın ½ MS ortamından elde edilmiştir. Araştırmacılar rejenere olan bitkileri kolay bir şekilde sera koşullarına adapte etmişlerdir.

Murch vd. (2000), *Hypericum perforatum*'un etiyole hipokotil eksplantlarından *de novo* sürgünlerin indüksiyonu için Thidiazuran (TDZ)'ın kullanıldığı bir *in vitro* rejenerasyon sistemi geliştirdiklerini rapor etmişlerdir. Kültür ortamına ilave edilecek optimum TDZ seviyesi 9 günlük indüksiyon periyodu için 5 μ mol/L olarak belirlenmiştir. BA ve IAA (İndol-3-asetik asit) içeren diğer büyüme ortamları, *H. perforatum* hipokotillerinde rejenerasyonu indükleme bakımından etkili olamamışlardır. Kültürlerin histolojik incelenmesi, rejenere bitkilerin *de novo* gelişmiş sürgünlerden köken aldığını ortaya koymuştur. Rejenere sürgünlerin bitki büyüme düzenleyici içermeyen sıvı bir besi ortamına transferi, yaşayabilir durumda olan bitkiciklerin hızlı ve verimli bir şekilde büyümesi ile sonuçlanmıştır. Araştırmacılar, *H. perforatum* için geliştirdikleri bu hızlı ve etkili mikroçoğaltım sisteminin, bu bitkinin hem genetik anlamda iyileştirilmesinde, hem de nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılacak yüksek kalitede fitofarmakolojik preparatların üretiminde faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

Baruah vd. (2001), sürgün ucu kültürü ile *Hypericum patulum*'da yüksek oranda bitki rejenerasyonu için bir *in vitro* protokol geliştirmişlerdir. *H. patulum* bitkisi

Doğu Himalayalarda yüksek rakımda yetişen yabancı bir kaynaktan toplanmıştır. Çoklu sürgün oluşumu, 6-benzil amino pürin (BAP) ve Kinetin ile desteklenmiş temel MS ortamlarında kültüre alınan sürgün uçlarından başlatılmıştır. Ortamlara tiamin-HCl, Ca-pantotenat ve biotin ilavesi çoklu sürgün oluşumunu artırmıştır. Kısa süreli bir oksin uygulamasından sonra mikrosürgünler köklendirilmiştir. Araştırmacılar köklenen bitkicikleri başarılı bir biçimde dış ortama aktarmışlardır.

Santarem ve Astarita (2003), *Hypericum perforatum* için bir mikroçoğaltım sistemi geliştirmiş ve *in vitro* ve tarla şartlarında yetişen bitkiler arasında hiperisin içeriklerini karşılaştırmışlardır. *In vitro* kültürler, 4.5 µM BA, kinetin, TDZ'nin tek başına ya da 0.05 µM NAA ile kombinasyonu ile desteklenmiş MS ortamına inoküle edilen olgun bitkilerin nodal segmentlerden başlatılmıştır. Organogenik eksplantlar ya BA ya da kinetinin tekbaşına veya NAA ile kombinasyonları şeklinde kullanıldığı ortamlarda gözlenmiştir. 4.5 µM BA içeren çoğaltım ortamı üzerinde organogenik eksplantların altkültürü, organogenik cevapları desteklemiş ve teşvik etmiştir. Ortalama en yüksek sürgün üretimi (52.6, sürgün) BA ve NAA'nın varlığında indüklenen eksplantlardan elde edilmiştir. Köklenmiş bitkiler başarılı bir şekilde aklimatize edilmiştir. Hiperisin içeriği analizleri şunu göstermiştir ki, kalluslar ana bitkideki içeriğin sadece % 0.11'i kadar hiperisin ihtiva etmekte, *in vitro* bitkilere ait yaprak ve sürgünler ise tarla şartlarında yetiştirilen bitkilerle benzer seviyede hiperisin içermektedir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak *H. perforatum*'da hiperisin oluşumunun yaprak farklılaşması ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir.

Pasqua vd. (2003), *Hypericum perforatum*'un hücre süspansiyon kültürleri, kallusları ve *in vitro* sürgün ve köklerinden hazırlanan metanolik ekstraktlarında aktif metabolit (hiperisinler, hiperforinler ve flavonoidler) içeriklerini araştırmışlardır. Hiperisinlerin biyosentezi rejenere vejetatif sürgünlerde salgı yapılarının (koyu noktacıklar) oluşumu ile ilişkili bulunmuştur. Hiperforinlerin ve flavonoidlerin üretiminin uyarılabilmesi, yaprak gelişiminin daha ileri evrelerde olmasını gerektirmiştir. Ksantonlar süspansiyon hücrelerinde, farklılaşmamış kalluslar ve bitkiciklerden ya da kalluslardan gelişen köklerde ana metabolik ürünlerdir. Hiperisinler, hiperforinler ve flavonoidleri biriktiren rejenere bitkiciklerin kök harici kısımlarında ksantonlar tespit edilmemiştir.

Ayan vd. (2005), *Hypericum perforatum*'un mikroçoğaltımı yolu ile hiperisin üretmek ve bu bitki için etkili bir mikro çoğaltım sistemi tanımlamak amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada yaprak diskleri ve gövde segmentlerini, kinetin, 2,4-D (0.5, 1 ve 1.5 mg/L) ve sukroz (30, 40 ve 50 g/L) içeren MS ortamlarında, karanlık şartlarda ve 26 ± 2 °C'ta sekiz hafta boyunca kültüre almışlardır. Bitki büyüme düzenleyicileri içeren bütün ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Ancak, kallus oluşum sıklığı bakımından en yüksek değerler 30 g/L sukroz, 0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L kinetin içeren MS ortamından elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar sürgün oluşumu için 1mg/L BA; kök oluşumu için ise 1 mg/L IAA içeren MS ortamlarında alt kültüre alınmışlardır. Kallus başına sürgün sayısı ve hiperisin içeriği de bu sürgünlerde araştırılmıştır. Yaprak disklerinden gelişen kallusların oluşturduğu rejenerantlarda bu değerler daha yüksek olup sırasıyla 19 sürgün/kallus ve % 0.048 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar elde edilen genç bitkicikleri başarılı bir şekilde sera şartlarına adapte ettiklerini bildirmişlerdir.

Gadzovska vd. (2005), *Hypericum perforatum*'un *in vitro* kültürlerinde hiperisin ve pseudohiperisin üretimi üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini araştırmışlardır. 0.1-2.0 mg/L konsantrasyon aralığında BA, sürgünlerde hiperisin (25–50 µg/g kuru ağırlık (KA)) ve pseudohipersin (170–350 µg/g KA) üretimini arttırmıştır. Kallus kültürlerinde, BA (4.0-5.0 mg/L) hiperisin(15–20 µg/g KA) içeriklerini değiştirmemiş ancak pseudohiperisin(120–180 µg/g KA) üretimini etkilemiştir. Oksinlerin varlığında (IAA ve IBA) *Hypericum* bitkicikleri hiperisin (30–100 µg/g KA) ve pseudohiperisin (120–400 µg/g KA) üretmiştir. IAA'nın varlığı bitkiciklerde naftodiantronların üretimini etkilememiş fakat IBA bitkiciklerde hiperisin ve pseudohiperisin üretimini azaltmıştır. Araştırmacılar sonuç olarak *in vitro* kültürlerde naftodiantronların spesifik birikiminin, ortama ilave edilen fitohormonlar ile etkilendiğini ve bu bileşiklerin uygun *in vitro* sistemler ile miktarlarının arttırılabileceğini belirtmişlerdir.

Perez-Garcia vd. (2006), *Hypericum perforatum*'un 68 yabani popülasyonunu kullanarak, bitkinin tohum çimlenme davranışlarını araştırmışlardır. Tohum çimlenme testleri 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyodunda 25/15 °C'ta gerçekleştirilmiştir. Final çimlenme yüzdeleri, %6-98 aralığında yüksek oranda değişiklik göstermiştir. Benzer şekilde çimlenme hızı 6.1- 23.0 gün arasında değişmiştir. Aynı zamanda çimlenme üzerine silika jel ile tohum kurutmanın etkisi çalışılmıştır. Bunun yanı sıra, birkaç popülasyon hattında tohum çimlenmesi üzerine iki ayrı inkübasyon sıcaklığı (15 ve 25 °C) ve ışık koşullarının (fotoperiyot

ve karanlık) etkisi çalışılmıştır. Sıcaklığın final çimlenme yüzdeleri üzerine önemli bir etkisi bulunmamışken, ışık hatların çoğunda çimlenmeyi arttırmıştır. Düşük çimlenme yüzdelere sahip dört hattın tohumları, çimlenmeyi arttırabilen farklı ekim öncesi uygulamalara (kuru sıcak, sıcak su ve gibberellik asit) maruz bırakılmıştır. Çimlenme test edilen dört hattan ikisinde gibberellik asit ile önemli derecede teşvik edilmiş, ama termal uygulamalar çimlenme yüzdesinde önemli bir artış sağlamamıştır.

Franklin ve Dias (2006), *Hypericum perforatum*'un farklı genotipleri (Helos, Topas, Elixir ve Numi) ile ilgili *in vitro* çalışmalar yapmış ve bu genotiplerin rejenerasyon ortamlarına benzer cevaplar verdiğini tespit etmişlerdir. Farklı genotiplerlerden alınan aynı eksplantların rejenerasyon cevapları (kallus, kök, ya da sürgün üretimi) benzer bulunmuştur. Bununla birlikte aynı genotiplerden alınan eksplant kaynakları (yapraklar, hipokotiller ve kökler) bitki rejenerasyon sıklığı ve ortamlara verilen cevabı anlamlı bir şekilde etkilemiştir. Bütün genotipler için eksplant başına en yüksek sürgün sayısını vermesi bakımından kök parçaları en çok cevap verme potansiyeline sahip eksplantlar olarak bulunmuştur. Sürgün rejenerasyonu düşük konsantrasyonda BA içeren IAA ilave edilmiş ya da edilmemiş ortamlarda daha hızlı olarak bulunmuştur. Daha yüksek konsantrasyonlarda BA (8.8 μM) sürgün tomurcuklarının oluşumunu geciktirmiştir.

Liu vd. (2007), *Hypericum perforatum* ve *Hypericum sampsonii*'de bitki büyümesi ve sekonder metabolitlerin üretimi üzerine (hiperforin ve hiperisinler) benzilaminopurin (BA), zeatin (ZT) ve thidiazuron (TDZ) sitokininlerinin etkisini araştırmışlardır. Amonyum nitrat ve potasyum nitratı %50 azaltılmış, BA (0.44 μM) ve indol-3-butirik asit (IBA, 0.049 μM) ilave edilmiş modifiye MS ortamında kültüre edilen *H. perforatum*'da hiperisinlerin üretimi artmıştır. TDZ (0.45 μM) uygulaması *H. perforatum*'da pseudohiperisin ve hiperisin üretimini yaklaşık olarak 2.95-2.62 kat arttırmıştır.

Çırak vd. (2007b), normal laboratuvar şartları altında düşük çimlenme oranına sahip *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* tohumlarının çimlenme oranlarını arttırmak için yaptıkları çalışmada, petri kaplarına yerleştirilmeden önce tohumlar GA solüsyonu (50, 100 ya da 150 ppm), çeşme suyu ya da sıcak suyla (40, 50, 60 °C) 30 dakika kadar muamele edilmişlerdir.

KNO₃ uygulaması için tohumlar, petri kaplarında 20 mL KNO₃ (0.01 mol) ile muamele edilmiştir. Çimlenme oranı üzerine ışığın etkilerini araştırmak için çalışmalar hem sürekli ışıktaki hem de karanlıkta gerçekleştirilmiştir. Işığın *H. aviculariifolium* tohumlarının çimlenmesi için çok önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir. Işık, çeşme suyu ve 50 ppm GA uygulaması çimlenmeyi önemli bir şekilde arttırmıştır. Karanlıkta yalnızca KNO₃ uygulanmış tohumlar etkin biçimde çimlenmiştir. Araştırmacılar *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* tohumlarının ekzojen dormansiye sahip olduğu ve çimlenme için ışığa gereksinimi olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, kapsül ve tohum kabuğundaki bir kimyasal inhibitörden kaynaklanan ekzojen dormansiye yenmek için çeşme suyu uygulamasını ve tohumların ışık gereksinimlerine bir alternatif olarak 0.01 mol KNO₃ uygulamasını önermektedirler.

Oluk ve Orhan (2009), *Hypericum triquetrifolium* için hızlı bir mikroçoğaltım protokolü geliştirmişlerdir. Başlangıç materyali olarak Türkiye'nin Ege Bölgesindeki Kaz Dağlarından toplanan tohumlar kullanılmıştır. Su-agar (%89) ortamında çimlenmiş 6 haftalık fideler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplant başına en yüksek sürgün çoğaltım oranı (5.95), 1.25 mg/L TDZ + 0.5 mg/L IAA ilave edilmiş MS ortamında elde edilmiştir. Kök gelişimi (sürgün başına 5-6) 1 mg/L IAA ile desteklenmiş MS ortamında elde edilmiştir. *In vitro* köklendirilmiş bitkicikler kolaylıkla dış ortama aklimatize edilmiştir.

Wojcik ve Podstolski (2007), *Hypericum perforatum* yaprak eksplantlarını, oksinler (2.4-D, NAA, IAA) ve sitokininler ile desteklenmiş MS ortamında karanlıkta kültüre ederek kallus indüksiyonunu sağlamışlardır. Elde edilen kalluslar tekbaşına IAA ya da NAA içeren ortamlarda kök oluşturmuştur. En yüksek kök sayısı 11.42 µM IAA içeren ortamlarda elde edilmiştir. Aynı zamanda oksin ve sitokininler ile desteklenmiş ortamlarda indirekt sürgün oluşumu da gözlemlenmiştir. En verimli sürgün oluşumu 2.85 µM IAA ve 4.44 µM BA ile desteklenmiş ortamlarda gerçekleşmiştir. Bir aylık kültür periyodundan sonra yaprak eksplantı başına ortalama 35 sürgün elde edilmiştir. Rejenere edilen sürgünler bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ya da IAA (1.43 µM ya da 4.28 µM) içeren MS ortamında köklendirilmiştir. En hızlı kök oluşumu 4.28 µM IAA içeren ortamlarda gerçekleşmiştir.

Bacila vd. (2010), aseptik fiderden elde ettiği nodal eksplantları kullanarak *Hypericum maculatum* için verimli bir *in vitro* çoğaltım protokolü geliştirmeye

çalışmışlardır. Çalışmaları sırasında karşılaştıkları eksplant kahverengileşmesinin önüne geçmek için ortamlara askorbik asit ve sitrik asit ilave etmişlerdir. 0.5 mg/L 2iP + 0.2 mg/L BA + 0.1 mg/L K + 0.05 mg/L NAA içeren temel MS ortamında nodal eksplantlardan ortalama 3.1 cm uzunluğunda çoklu sürgünler elde etmişlerdir. Sürgün uzaması ve köklenme için sürgünler, 0.5 mg/L GA₃ ve üç konsantrasyonda (0, 0.5, 1.0 mg/L) iki farklı oksin (IAA ve IBA) içeren ½ MS ortamına transfer edilmiştir. Kök sayısı, kök uzaması ve sürgün boyu için en verimli kültür ortamı 1.0 mg/L IAA içeren ½ MS ortamı olarak tespit edilmiştir. Köklenmiş bitkicikler daha sonra dış ortama aklimatize edilmiştir.

Palmer ve Keller (2011), *Hypericum perforatum*'un petal eksplantlarında bitki rejenerasyonu gerçekleştirmişlerdir. Çeşitli yaşlardaki petaller, oksin ve sitokin (kinetin) ile desteklenmiş MS ortamı üzerinde karanlıkta kültüre edilmiş ve 28 gün sonra kallus ve sürgün tespit edilmiştir. Oksinin sitokinine oranı 10:1 olduğunda, kallus ve sürgün oluşumu IAA, IBA ve NAA'nın bütün seviyeleri tarafından indüklenirken 2,4-D ile yalnızca kallus oluşumu indüklenmiştir. Sürgün rejenerasyonu için oksinin optimum seviyesi 1.0 ve 0.1 mg/L kinetin olmuştur. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (57.4 ve 53.4) sırasıyla IAA ve IBA'dan elde edilmiştir. Oksinin yokluğunda 0.1 ve 0.25 mg/L kinetin seviyeleri düşük oranda kallus ve sürgün oluşumunu indüklemiş fakat daha düşük kinetin seviyeleri bu etkiyi göstermemiştir. Kallus ve sürgün oluşumu büyüme düzenleyicilerinin yokluğunda gözlenmemiştir. Petallerden kökenlenen sürgünler ekzojen oksin uygulaması gerektirmeden ½ MS ortamında köklendirilmiştir. Araştırmacılar oksin tipinin *H. perforatum*'un petal eksplantlarından bitki rejenerasyonu için kritik faktör olduğunu ve yüksek sitokin seviyelerinin mutlak olarak gerekli olmadığını bildirmişlerdir.

Namlı vd. (2010), *Hypericum retusum* için *in vitro* tekniler aracılığı ile çoklu sürgün üretimi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. *H. retusum* tohumları temel MS ortamında çimlendirilmiştir. Kültürler, dokuz farklı BA ve Kinetin konsantrasyonları ile ayrı ayrı desteklenmiş MS ortamı üzerine inokule edilen sürgünlerden başlatılmıştır. En yüksek sürgün sayısı 0.5 mg/L BA (64.25 sürgün/eksplant) ilave edilmiş ortamdan elde edilmiştir. Kinetin için kullanılan konsantrasyonlardan en iyi sonuç 1.5 mg/L Kinetin (27.87 sürgün/eksplant) ilave edilmiş ortamda elde edilmiştir. Ayrıca sürgünler, BA ve Kinetinin 3 farklı oksin (0.25 mg/L IAA, IBA, NAA) ile kombineli bir şekilde ayrı ayrı kullanıldığı

ortamlarda kültüre edilmiştir. Sürgün uzunluğu ve sayısı açısından en iyi sonuç 0.5 mg/L BA + 0.25 mg/L IBA (54.12 sürgün/eksplant, 3.36 sürgün uzunluğu) ilave edilmiş ortamda elde edilmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak BA'nın tek başına kullanımının sürgün çoğaltımı için en verimli yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Oluk vd. (2010), *Hypericum triquetrifolium*'da indirekt rejenerasyonu indüklemek için bir metot tanımlamışlardır. Kalluslar, BA (2 mg/L) ile kombineli IAA (0.5 mg/L) ile desteklenmiş yarı katı MS ortamı üzerinde 35 günlük aseptik fidelerin kotiledon eksplantlarından indüklenmiştir. Meristemoidler sitokininlerin azaltılması ile kallusların yüzeyinde gelişmiş ve bitki büyüme düzenleyicileri tamamen uzaklaştırıldığı zaman bu embriyonik kalluslardan %100 oranında bitkicik rejenerasyonu yarı katı ortamda meydana gelmiştir. Denemeler sırasında elde edilen embriyonik kalluslar hiperisin içerikleri bakımından analiz edilmiş ve 48 µg/g KA oranında hipersin içerdikleri tespit edilmiştir. Rejenere bitkicikler 1 mg/L IAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir.

2.2. Stres ve Elisitör Uygulamaları ile İlgili Çalışmalar

Kirakosyan vd. (2000), *H. perforatum*'un sürgün kültürlerine, mannan (0.01-0.1 mg/ml), β -1,3-glukan (0.01-0.1 mg/mL), pektin (0.05-0.1 mg/mL) ve maya ekstraktı (1-8 mg/mL) uygulamış ve bu elisitörlerin hiperisinlerin üretimi üzerine etkisini incelemiştir. Araştırmacılar, mannanın pseudohiperin üretimini 4 kat ve hiperisin üretimini 2 kat arttırdığını, pektin ve β -1,3-glukanın ise pseudohiperisin üretimini yaklaşık 2 kat arttırdığını fakat hiperisin üretimini etkilemediğini tespit etmişlerdir.

Kirakosyan vd. (2001), *H.perforatum*'un kallus kültürlerinden rejenere edilen sürgünlerde, hiperisin ve pseudohiperisin biyosentezi üzerine mantar (cork) parçacıklarının etkisini araştırmışlardır. Mantar parçacıklarının ilavesi sürgün büyümesini çok az stimüle etmiş ve pseudohiperisin üretimini de 3 kat arttırmıştır. Pseudohiperisin üretimi 1'den 4 mg/mL'ye kadar mantar parçacıklarının ilavesi ile orantılı olarak artmıştır. Mantar parçacıklarının miktarındaki artış sürgün büyümesini ve pseudohiperisin üretimini inhibe etmiştir.

Sirvent ve Gibson (2002), metil jasmonat, salisilik asit ve bir bitki patojeni olan *Colletotricum gloeosporioides*'i bir elisitör olarak *Hypericum perforatum*'un meristem kültürlerine 2 hafta boyunca ayrı ayrı uygulamıştır. Metil jasmonat ve

salisilik asitin her ikisi de hiperisin ve hiperforin üretimini etkilemiştir. 14 gün 200 μ M metil jasmonat uygulaması total hiperisin seviyesini 3.3 kat arttırmıştır. Bir bitki patojeni olan *Colletotricum gloeosporioides*'i ise yapraklardaki hiperisin içeriğini 2 kat arttırmıştır.

Abreu ve Mazzafera (2005), *Hypericum brasiliense*'de, betulinik asit ve bazı fenolik bileşiklerin içeriği üzerine, su ve sıcaklık stresinin etkilerini araştırmışlardır. Genel olarak su stresi özellikle bazı fenolik bileşikler başta olmak üzere analizi yapılan bütün bileşiklerin seviyesini arttırmıştır. Diğer yandan değişen sıcaklıklara verilen cevaplar bileşiklere göre çeşitlilik göstermiş ve sıcaklık uygulamalarında yalnızca fenolik bileşik miktarının arttığını rapor etmişlerdir.

Vardapetyan vd. (2006), *Hypericum perforatum*'un sürgün kültürlerinin morfogenetik ve biyosentetik potansiyelleri üzerine mannan, β -1,3-glukan, ansimidol ve mantar kırıntıları (cork crumbs) gibi elisitörlerin etkisini çalışmışlar ve bu elisitörlerin varlığında *Hypericum perforatum*'un farklı morfogenetik yapıya sahip kallus kültürlerini kurmuşlardır. *H. perforatum*'un kallus kültürlerinde, mannan (yeast mannan), β -1,3-glukan ve mantar kırıntıları uygulamasının hiperisin ve pseudohiperisinin biyosentezini stimüle ettiği tespit edilmiştir. Mannan uygulaması ile hiperisin miktarı yaklaşık 2 kat artarken, pseudohiperisin miktarı yaklaşık 4 kat artmıştır. β -1,3-uygulaması ise pseudohiperisin miktarını yaklaşık 2.5 kat arttırmıştır. Mantar kırıntıları ise pseudohiperisinin miktarını 3 kat arttırmıştır.

Tirillini vd. (2006), *Hypericum perforatum* fidelerinin büyüme ortamlarına 0.01 ve 0.1 mM krom ilave etmişlerdir. Yedi gün 0.01 mM Cr(VI) uygulaması, protopseudohiperisin (+ %135), hiperisin (+ %38) ve pseudohiperisin (+ %5) üretimini arttırmıştır. İki gün kadar 0.1 mM Cr(VI) uygulaması ise, protopseudohiperisin (+ %167), hiperisin (+ %25) ve pseudohiperisin (+ %5) miktarını farklı oranlarda arttırmıştır. Krom uygulamasının en büyük etkisi, 7 gün kadar uygulanan 0.1 mM Cr(VI) konsantrasyonunda gözlenmiştir; protopseudohiperisin % 404 ve pseudohiperisin %379 oranına artmıştır. Hiperisin bu uygulamadan etkilenmemiştir. Kromun hiperisin ve pseudohiperisin üretimi üzerine bu olumlu etkilerine karşı olarak **Murch vd. (2003)**, bir ağır metal olan nikelin *H.perforatum*'un *in vitro* kültürlerinde bioaktif moleküllerin sentezi

üzerine etkisini incelemişlerdir. 25 ya da 50 mM nikel uygulaması steril fidelerin hiperforin biriktirme ya da üretme kapasitesini tamamen kaybetmesine neden olmuştur. Aynı zamanda pseudohiperisin ve hiperisin konsantrasyonu 15-20 kat bir azalma göstermiştir.

Gadzovska vd. (2007), *Hypericum perforatum*'un hücre süspansiyonlarında, jasmonik asitin (JA) farklı konsantrasyonlarının fenilpropanoid ve naftadiandronları üretme yetenekleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. JA uygulamasının toplam fenolik içeriği ve flavanollerini 1-7 gün içerisinde, flavonollerini ise 4-14 gün içerisinde 6 kat arttırırken, hiperisin ve pseudohiperisin miktarını 4 gün sonra 2.4 kat arttırdığını rapor etmişlerdir.

Pavlik vd. (2007), *in vitro* şartlarda sakkaroz, polietilen glikol (PEG), metil jasmonat ve *Agrobacterium tumefaciens*'in *Hypericum perforatum*'un fidelerinin morfolojisi ve sekonder metabolitlerinin (hiperisin ve hiperforin) üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Hiperisin ve hiperforin üretimi kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda sakkaroz (10-30 g/L) ilavesi ile etkilenmiştir. Sakkarozun(10-30 g/L) varlığında PEG (1.25-5 g/L) ilavesi *H.perforatum in vitro* kültürlerinde hiperisin ve hiperforin üretimini arttırmıştır. Hiperisin ve hiperforin sentezi daha yüksek PEG (10 ve 15 g/L) konsantrasyonlarında deneme bitkilerinin çoğu için değişmemiş ya da azalmıştır. Hiperisin ve hiperforin üretiminin metil jasmonat ya da *A. tumefaciens*' uygulaması ile stimule olduğunu bildirmişlerdir.

Liu vd. (2007), *H. perforatum*'un sıvı kültürlerinde dört prekürsör (öncül) (L-fenilalanin, L-triptofan, sinnamik asit ve emodin) ve bir sinyal elisitörün (metil jasmonat, MeJA), hiperforin ve hiperisinlerin (pseudohiperisin ve hiperisin) üretimi üzerine etkisini çalışmışlardır. L-fenilalanin (75-100 mg/L) hiperisinlerin üretimini arttırmış ama hiperforin miktarını azaltmıştır. Hiperisin, pseudohiperisin ve hiperforin konsantrasyonları ortama L-triptofan(25-100 mg/L) ilave edildiği zaman azalmıştır. Bununla birlikte L-triptofan (50 mg/L) MeJA (100 µM) ile birlikte uygulandığında hiperforin üretimini 1.8 kat arttırmıştır. Sinnamik asit ve emodin hiperisinlerin üretimini etkilememiştir.

Namlı vd. (2009), *in vitro* teknikler kullanılarak *Hypericum triquetrifolium*'da hiperisin içeriğini arttırmaya yönelik UV-C radyasyonun etkilerini araştırmışlardır. *H. triquetrifolium* tohumları *in vitro* koşullarda MS ortamı üzerinde çimlendirilmiş ve elde edilen sürgünler 0.25mg/L BA ilave edilmiş MS besi ortamında

çoğaltılmıştır. UV-C radyasyon farklı sürelerde *H. triquetrifolium*'a uygulanmıştır. 15 dakikalık UV-C uygulaması hiperisin içeriğini arttırırken, UV-C ışınının 60 dakikalık uygulaması hiperisin miktarını azaltmıştır. Araştırmacılar UV-C radyasyonun farklı parametrelerinin uygulamasına bağlı olarak sürgünlerde morfolojik değişiklikler gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Coste vd. (2011), *Hypericum maculatum* ve *Hypericum hirsutum*'un *in vitro* sürgün kültürlerinde 2iP (İzopentil adenin), BA (Benzil adenin), Kinetin (KIN) ve Naftalen asetik asit (NAA) bitki büyüme düzenleyicilerinin ve iki elisitörün (jasmonik asit ve salisilik asit) bitki büyüme ve sekonder metabolit üretimi (hiperisin, pseudohiperisin ve hiperforin) üzerine etkilerini araştırmışlardır. BA (0.4 mg/L) ya da Kinetin (0.4 mg/L) ile desteklenmiş MS ortamı üzerindeki sürgün kültürlerinde *H. maculatum*'da hiperisinler ve *H. hirsutum*'da hiperforin üretimi artmıştır. Hiperforin ve hiperisinlerin konsantrasyonu her iki türde de TDZ (0.4 mg/L) içeren MS ortamında azalmıştır. TDZ aynı zamanda rejenere olan sürgünlerde hiperhidrik anomalilere ve nekrozise neden olmuştur. Modifiye MS ortamında kültüre edilen *H. maculatum*'da hiperisinlerin üretimi yaklaşık iki ve *H. hirsutum* sürgünlerinde hiperforin üretimi 6.16 kat artmıştır. 50 µM SA *H. hirsutum*'da hiperisin (7.98 kat) ve pseudohiperisin (13.58 kat) üretimini ve 200 µM SA uygulaması ise *H. maculatum*'da hiperisin (2.2 kat) ve pseudohiperisin (3.94 kat) üretimini arttırmıştır.

2.3. Sekonder Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Analizi ile İlgili Çalışmalar

Li ve Fitzloff (2001), *Hypericum perforatum* diyet takviyelerinde ana bileşiklerin (hiperisin, pseudohiperisin, hiperosid, rutin, kuersitrin, kuersetin, izokuersitrin ve hiperforin) tespiti için bir RP-HPLC-DAD (ters faz-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-fotodiyot dizi dedektör) metodu kullanmışlardır. Örnekler, düşük sıcaklıkta sonikasyon kullanılarak metanolle ekstrakte edilmiştir. İki aşamalı sonikasyon (herbiri 30 dakika), *H. perforatum* örneklerindeki ana bileşiklerin %99'undan daha fazlasının geri kazanımını sağlamıştır. Ana bileşikler, 60 dakika su-asetonitril-metanol-trifluoroasetik asit gradiyenti kullanılarak RP-18 kolunu ile ayrılmıştır. Miktar ölçümü, eksternal standartlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar *H. perforatum* metanolik ekstraktlarının stabilitesi ve numunelerin hazırlanması geniş ölçüde araştırmışlar ve özellikle *H. perforatum* metanolik ekstraktlarındaki ana bileşiklerin (özellikle hiperisin ve pseudohiperisin)

filtrasyon sırasında denenen bazı filtreler tarafından tutulmuş olabileceğini belirtmişlerdir.

Ganzer a vd. (2002), *Hypericum perforatum*'da hiperforin, flavonoidler ve naftodiantronların analizleri için bir metot tanımlamışlardır. Metanolik bitki ekstraktlarının HPLC analizlerinde, 9 ana bileşik 35 dakikalık bir sürede ayrılmış ve tanımlanabilmiştir. Optimum ayırma için, mobil faz olarak 10 mM amonyum asetat tamponu (pH 5.0) ve bir asetonitril/metanol karışımı kullanılmıştır. Sabit faz olarak bir Synergi MAX-RP 80 Å kolon (C-12 materyal) kullanılmıştır. Tespit dalga boyu 270 nm'dir ve tanımlanan bileşikler bir LC-MS analizi ile de doğrulanmıştır. Araştırmacılar ticari *H.perforum* ürünlerini analiz etmiş ve elde edilen kalitatif ve kantitatif sonuçları tartışmışlardır.

Avato ve Guglielmi (2004), *Hypericum perforatum*'un drog örneklerindeki ana bileşiklerin (hiperisinler, hiperforinler ve flavonoidler) kantitatif olarak belirlenmesi sürecinde farklı ekstraksiyon prosedürlerini denemişlerdir. Total hiperisin miktarı UV ve HPLC ile tespit edilmiştir. Metanolle (MeOH) sonikasyon, bütün ana metabolitleri temsil eden homojen bir drog örneği sağlaması ve ürün bozulmasını daha da azalttığı için en iyi ekstraksiyon metodu olarak sonuç vermiştir. Prosedür, ticari bir drog örneği ile standardize edilmiş ve daha sonra güney İtalya'da çeşitli lokalitelerden toplanan *H. perforatum* bitkilerinde aktif metabolitlerin miktarını ölçmek için uygulanmıştır. Altamura (% 0.21) ve Casamassima (% 0.27) olarak adlandırılan iki drog örneği özellikle hiperisin bakımından zengin bulunmuştur.

Smelcerovic vd. (2006), *H. perforatum*'un direkt sonikasyonunu, geleneksel maserasyon, indirekt sonikasyon, sokslet ekstraksiyonu ve hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu (ASE) ile karşılaştırmış ve araştırmışlardır. Yüksek seçici sıvı kromatografisi/ardışık kütle spektrometresi analizleri, araştırılan altı aktif bileşiği (hiperisin, pseudohiperisin, hiperosid, rutin, kuersitrin ve hiperforin) direkt sonikasyon ile elde edilen ekstraktların, diğer metotlar ile elde edilen ekstraktlardan önemli derecede daha fazla içerdiğini göstermiştir. Aktif bileşik içeriği ultrasonik güç 40'dan 60 Watt'a çıkarıldığı zaman artmıştır. Araştırmacılar, geleneksel maserasyon ile elde edilen ekstraktların, analiz edilen aktif bileşikleri en düşük oranda içerdiğini ve sokslet ekstraksiyonunda ASE ya da indirekt sonikasyona göre daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan *Hypericum adenotrichum* Spach, *Guttiferae* familyasına ait Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren endemik çiçekli bir bitkidir. Tür, Batı ve Orta Anadolu’da yayılış gösterip, genellikle 6.-7. aylarda çiçeklenmektedir. Bitki çoğunlukla, kuru otlak ve taşlık yerlerde, 800–1900 m’de yetişmektedir. Bitki genel olarak şöyle tanımlanmaktadır; “Gövdeler 7–32 cm, dik ya da yatık kalkık uçlu (dekumbent) ya da nadiren yere yatmış. Yapraklar 7–26 mm (kulakçıkların dışında), oblong ya da oblanseolatdan lineara, siyah-glandular-saçaklı. Sepaller subekual (uzunlukları birbirlerine yakın), dar oblong, sivriden yuvarlağa, siyah-glandular-saçaklı. Petaller 9–15 mm, birkaç glandular silialı ve apekse yakın birkaç yüzeysel siyah noktalı. Kapsul 7–10 mm, ovoid (Robson, 1967) (Şekil 3.1, 3.2).



Şekil 3.1. *H. adenotrichum*’un doğal ortamındaki genel görünüşü



Şekil 3.2. *H. adenotrichum*'un çiçek yapısı ve salgı tüylerinin yakından görünüşü

3.2. Yöntem

Hypericum adenotrichum'un doku kültürü teknikleri ile çoğaltılması ve *in vitro* koşullarda sekonder metabolit değişiminin araştırılması ile ilgili yaptığımız çalışmalar 9 ana başlıkta sunulacaktır. Bunlar:

- *In vitro* çalışmalar için yapılan ön hazırlıklar
- *In vitro* çimlenme denemeleri
- Bitkisel materyalin hazırlanması ve *in vitro* kültürü
- Aksiller sürgün çoğaltımı denemeleri
- Adventif ve aksiller sürgünlerin köklendirilmesi denemeleri
- Köklendirilen bitkilerin dış ortama alıştırılması
- *In vitro* fidelere stres ve elisitör uygulaması denemeleri
- Elisitör ve strese maruz bırakılan fidelerin sekonder metabolit içeriklerini HPLC yöntemi ile analiz edilmesi denemeleri
- Verilerin değerlendirilmesi

3.2.1. *In vitro* Çalışmalar İçin Yapılan Ön Hazırlıklar

3.2.1.1. Bitkisel materyalin toplanması

Çalışma materyalimiz olan *H. adenotrichum* bitkisinin tohumları ve vejetatif kısımları, bitkinin doğal yayılış gösterdiği Karıncalı Dağı'ndan (Karacasu, AYDIN) yaklaşık 1400 metreden (GPS: N 37 41 609, E 0,28 34 051) toplanmıştır. Bitkinin vejetatif kısımları 2008 ve 2009 yıllarının Mart-Nisan aylarında, tohumları ise aynı yılların Temmuz ayında yapılan arazi çalışmalarında doğal yaşama ortamından toplanarak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Vejetatif kısımlar ve tohumlar ile ilgili çalışmalara hemen başlanmıştır.

3.2.1.2. Alet, ekipman ve çalışma ortamının sterilizasyonu

Tohumların ve vejetatif kısımların sterilizasyonu ve kültüre edilmesi ile ilgili çalışmalar laminar hava akımlı steril çalışma kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kabinin iç ve dış kısmı çalışmaya başlamadan önce %70'lik etil alkol (EtOH) ile silinmiş ve ardından kabin içerisinde bulunan UV lambası bir saat süre ile çalıştırılmıştır. Tohum sterilizasyonu ve ekimi sırasında kullanılan bütün malzemeler ya alimünyum folyo ile sarılarak ya da ağızları alimünyum folyo ile kapatılarak 105 kPa basınç altında 121 °C'ta 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiş ve otoklavlama sonrası malzemeler mümkün olduğunca hızlı bir şekilde laminar hava akımlı kabin içerisine alınmışlardır. Kabinde çalışmaya başlamadan önce el ve kolların kabin içerisine giren kısımları sabunlanarak yıkanmış daha sonra %70'lik alkol ile de yıkanmıştır. Eksplantların sterilizasyonu ve ekimi sırasında kabin içerisinde bulunan bek yakılarak kullanılan bazı malzemeler zaman zaman ateşten geçirilmiş ve mümkün olduğu kadar ateşe yakın çalışılmıştır.

3.2.1.3. Besi ortamlarının hazırlanması ve sterilizasyonu

Sterilizasyonu sağlanan tohumların çimlenme denemeleri için MS temel ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) tam olarak, farklı oranlarda seyreltilmiş MS ortamı ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS), B5 (Gamborg vd., 1968) ve Galzy (Galzy, 1964) vitaminleri ile desteklenmiş MS ortamı kullanılmıştır. Yaprak eksplantlarının organogenez çalışmaları için ise farklı büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiş MS ortamı

temel besin ortamı olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Ortamların hazırlanması sırasında kullanılan makro elementler, mikro elementler, aminoasitler ve vitaminler önceden stok çözeltiler halinde hazırlanmıştır. Makro elementlerin stok çözeltilerinde 20 mL içerisinde, 1 litre ortam için gerekli miktar bulunacak biçimde 200 ml'lik, mikro elementler, aminoasitler ve vitaminler için ise 5 mL içerisinde, 1 litre ortam için gerekli miktar bulunacak biçimde 50 mL'lik stoklar halinde hazırlanarak koyu renkli şişelerde +4 °C'ta buzdolabında karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Yaprak eksplantlarının organogenez çalışmalarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri için de stok çözeltiler hazırlanmıştır. Büyüme düzenleyicilerinden Naftalen asetik asit (NAA), Benzil adenin (BA) ve Kinetin (KIN) sodyum hidroksit (NaOH) ile Thidiazuran (TDZ) potasyum hidroksit (KOH) ile ve IAA (İndol-3-asetik asit), IBA (İndol-3-butirik asit) ve 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit) etil alkol (EtOH) ile çözdürülmüştür. Stok çözeltiler çoğunlukla 5 mL'sinde 1 mg/L madde olacak şekilde 25-30 mL olarak hazırlanmış ve çözeltilerin pH'ı 5.0'a ayarlanarak koyu renkli şişelerde +4 °C'ta karanlıkta saklanmıştır. Kullanılacak bitki büyüme düzenleyicilerinden istenilen miktar mikropipet yardımı ile çekilerek ortamlara ilave edilmiştir.

Makro ve mikro besin elementleri, vitaminleri, aminoasitleri, bitki büyüme düzenleyicileri ve diğer bileşenleri tamamlanan besi ortamına istenilen miktarda sukroz tartılarak (30 g/L) ilave edilmiş ve solüsyonun hacmi, distile su ile son hacime yakın bir hacime tamamlanmıştır. Ortamların pH'sı 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri ile (Barnes, 1979; Fonnesech ve Fonnesech, 1980) 5.8'e ayarlanmıştır. Hazırladığımız besi ortamını katılaştırmak için ortama 8 g/L agar agar (Sigma) ilave edilmiş ve besi ortamının hacmi distile su ile son hacime tamamlanmıştır.

Kültür ortamlarını homojenize etmek için, 95 °C sıcaklığa ayarlanmış çalkalamalı sıcak su banyosu kullanılmıştır. Kültür ortamları, altın sarısı bir renk alana kadar su banyosunda bekletilerek homojenize edilmiştir. Kültür ortamları, homojen hale geldikten sonra, 190 cc'lik etiketli cam kavanozlara 30-35 ml olacak şekilde dökülmüştür. Ağız iyice kapatılmış kavanozlar, 15 dakika süresince 121 °C'ta 105 kPa basınç altında otoklavda tutularak steril edilmiştir. Steril edilen besi ortamları, otoklavdan çıkarıldıktan sonra uygun bir yerde soğumaya bırakılmış ve karanlıkta muhafaza edilmiştir.

ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
Vitaminler ve Aminoasitler							
Myo-inositol	100	100	100	100	100	100	10
Nikotik asit	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1
Pridoksin-HCl	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1
Thiamin-HCl	0.1	0.1	0.1	10	10	10	1
Biotin	-	-	-	-	-	-	0.01
Ca-pantetonat	-	-	-	-	-	-	1
Glisin	2	2	2	-	-	-	2
Diğer Bileşenler							
Sakkaroz	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30
Agar	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g	8 g
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

3.2.2. *In vitro* Çimlenme

3.2.2.1. Tohum doluluk ve canlılık oranlarının belirlenmesi

Yapılan morfolojik gözlemler sırasında tohumların büyük bir kısmının boş olduğu saptanmış ve bu durumun sayısal olarak da değerlendirilmesi gerektiği düşüncesinden hareketle tohum doluluk oranı belirlenmiştir. Bunun için rastgele 100 tohum seçilmiş ve tohumlar stereo mikroskop altında ikiye bölünerek içinde embriyo olup olmasına göre tohum doluluk oranı yüzde olarak belirlenmiştir.

Tohumların boş ve dolu olarak değerlendirilmesine ilişkin morfolojik gözlemler, tohumların yüzdürülme metodu ile de desteklenmeye çalışılmıştır. Yüzdürme metodu, su ya da başka bir sıvıda yoğunluk farkına göre boş, dolu ve mekanik olarak zarar görmüş tohumların ayrılmasında kullanılmaktadır (Schmidt ve Joker, 2001). Bu amaçla, 100'er adet tohum, 4 tekrarlı olarak aşağıdaki işlemlerden geçirilmiştir: Tohumlar öncelikle içerisinde distile su bulunan bir behere alınmış ve yaklaşık 30 dk süre sonunda dolu olduğu düşünülen tohumların kabın dibine çökmesi beklenmiştir. İşlem sırasında beherde distile su içerisinde bulunan tohumlar belirli aralıklarla bir cam baget ile karıştırılmıştır. 30 dakikalık süre sonunda suyun yüzeyinde kalan tohumlar bir süzgeç yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Böylece suyun yüzeyinde kalan tohumlar (yüzen), kavanozun dibine çöken (batan) tohumlardan ayrılmıştır. Sonuçlar % olarak değerlendirilmiştir.

Dolu olduğu düşünülen tohumlar öncelikle tohum canlılık testine tabi tutulmuştur. Bu amaç doğrultusunda tohumlara Tetrazolium testi (ISTA, 1999; Agrawal, 1986) uygulanmıştır. Tetrazolium testinde tohumların canlılığı, 2,3,5-trifeniltetrazolium klorür (TTC) çözeltisinde belli bir süre tutulan embriyoların boyanma derecesi (kırmızı renk) ile saptanır. Tohum canlılık testi için öncelikle % 1'lik TTC çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra içi dolu olan tohumların bir yarısı jilet yardımıyla uzaklaştırılmış ve geriye kalan yarıları bir petriye alınmıştır. Tohumların üzerine önceden hazırladığımız % 1'lik TTC çözeltisi dökülmüş ve 24 saat boyunca karanlıkta beklemeye bırakılmıştır. 24 saat sonrasında embriyoların boyanıp- boyanmamasına göre canlı tohum sayısı yüzde olarak belirlenmiştir.

3.2.2.2. Tohumların sterilizasyonu

Tohumlar için uygun bir sterilizasyon prosedürü belirlemek amacı ile farklı sterilizasyon denemeleri yapılmıştır. Amaç embriyoya zarar vermeden tohumu mikroorganizmalardan arındırmaktır. Tohumlar ile ilgili çalışmalarda tohumlara kesinlikle çıplak elle dokunulmamış ve mutlaka eldiven kullanılmıştır. Tohumlar öncelikle çatlamış tohum kapsüllerinin içerisinde çıkarılmış ve daha sonra çeşme suyu altında yaklaşık yarım saat yıkanarak kaba kirlere arındırılmıştır. Bu işlemden sonra tohumlar Çizelge 3.2'de de belirtildiği gibi sırası ile % 70 lik etil alkol ve 1-2 damla Tween 80 ilaveli ticari NaOCl (% 4.5 'lik Sodyum hipoklorit) ve ½ oranında sulandırılmış ticari NaOCl (% 2.25'lik Sodyum hipoklorit) ile belirli sürelerde muamele edilerek steril edilmeye çalışılmıştır. Tohumlar daha

sonra 3 kez steril distile su ile durulanarak Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamına ekilmiştir. Denemeler her bir ortama 4 eksplant olmak üzere 4 tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler 37 °C'ta ayarlanmış etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kontaminasyon yüzdeleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Tohumlar için uygulanan sterilizasyon işlemleri

%70'lik Etil Alkol (30 saniye)		%70'lik Etil Alkol (1 dakika)	
% 4.5 'lik NaOCl	% 2.25'lik NaOCl	% 4.5 'lik NaOCl	% 2.25'lik NaOCl
2.5 dk	2.5 dk	2.5 dk	2.5 dk
5 dk	5 dk	5 dk	5 dk
7.5 dk	7.5 dk	7.5 dk	7.5 dk
10 dk	10 dk	10 dk	10 dk

3.2.2.3. Tohumların kültüre edilmesi

Yapılan ön denemelerde çimlenmenin sağlanamaması, *H. adenotrichum* tohumlarının çimlenme için özel istekleri olduğunu ya da bir dormansiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bilindiği gibi çimlenmenin gerçekleşmesinde sıcaklık, nem, oksijen, ışık gibi bir takım temel faktörler rol oynamaktadır. Bu temel faktörler göz önüne alınarak, *in vitro* çimlenmeyi ve ayrıca büyüme ve gelişmeyi teşvik etmek için; soğuk uygulaması (stratifikasyon), farklı sıcaklık uygulamaları, farklı ışık koşulları ve farklı kültür ortamları denenmiştir. Dormansiye kırma yollarından biri olan stratifikasyon sürecinde tohumlar 2 ay boyunca + 4 °C'ta tutulmuştur. Tohum çimlenmesi ve gelişimi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için, 15, 18, 22 ve 25 °C inkübasyon sıcaklıkları ve ışığın etkisini araştırmak için ise 16/8 fotoperiyot ve tamamen karanlık koşullar denenmiştir. Ayrıca *H. adenotrichum* tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine, farklı tuz ve vitamin konsantrasyonlarına sahip *in vitro* kültür ortamlarından MS, ½ MS, ¼ MS, MS/B5, ½ MS/B5, ¼ MS/B5 ve ¼ MS/Galzy ortamlarının etkisi test edilmiştir. ½ MS, ¼ MS ortamları sırasıyla, MS makro tuzlarının ½, ¼ oranında azaltılması ile hazırlanmıştır. ½ MS/B5, ¼ MS/B5 ortamları sırasıyla, MS makro tuzlarının ½, ¼ oranında azaltılması ve MS

vitaminleri yerine B5 ortamına ait vitamin konsantrasyonlarının ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. ¼ MS/Galzy ortamı MS makro tuzlarının ¼ oranında azaltılması ve MS vitaminleri yerine Galzy vitamin konsantrasyonlarının ilave edilmesi ile hazırlanmıştır.

Çalışmalarımız sırasında öncelikle tohumlar yüzen ve batan tohum olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Bu iki grup tohuma sterilizasyon işleminden sonra, soğuk uygulaması, farklı sıcaklık (15, 18, 22 ve 25 °C), ışık (fotoperiyot, karanlık ortam) ve farklı besi ortamları (MS, ½ MS, ¼ MS, MS/B5, ½ MS/B5, ¼ MS/B5 ve ¼ MS/Galzy) birbiri ile kombine edilecek şekilde uygulanmıştır. Böylece *H. adenotrichum* tohumlarının çimlenme ve fide gelişimi için en uygun koşulların belirlenmesine çalışılmıştır. Her bir deneme için 20 tohum kullanılmış ve denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2.3. Bitkisel Materyalin Hazırlanması ve *In Vitro* Kültürü

3.2.3.1. Bitkisel materyallerin sterilizasyonu

Bitkilerin vejetatif kısımları doğal ortamlarından toplandıkları gün hemen kültüre alınma işlemlerine başlanmıştır. Denemelerde yapraklar eksplant olarak kullanılmıştır. Öncelikle bitkisel materyal için uygun bir sterilizasyon prosedürü belirlemek amacı ile sterilizasyon denemeleri yapılmıştır. Amaç yaprak eksplantlarına zarar vermeden yaprağı mikroorganizmalardan arındırmaktır. Çalışmalar sırasında vejetatif bitki kısımlarına kesinlikle çıplak elle dokunulmamış ve mutlaka eldiven kullanılmıştır. Yapraklar sterilizasyona tabi tutulmadan önce akan çeşme suyu altında yaklaşık yarım saat yıkanarak kaba kirlerinden arındırılmıştır. Yaprak eksplantlarının sterilizasyonu için yapraklar Çizelge 3.3'den de görülebileceği gibi sırası ile 30 saniye % 70'lik EtOH ve 1-2 damla tween 80 ilaveli ticari NaOCl (% 4.5 'lik Sodyum hipoklorit) ve çeşitli oranlarda sulandırılmış (1/2, 1/3, 1/4) ticari NaOCl ile belirli sürelerde muamele edilerek steril edilmeye çalışılmıştır. Yapraklar 3 kez steril distile su ile durulandıktan sonra yaklaşık 1 cm²'lik parçalara ayrılarak PDA ortamlarına aktarılmıştır. Denemeler her bir ortama 4 eksplant gelecek şekilde 4 tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler 37 °C'ta ayarlanmış etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kontamine eksplant yüzdeleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Yaprak eksplantları için uygulanan sterilizasyon denemeleri

%70'lik Etil Alkol (30 saniye)			
% 4.5 'lik NaOCl	% 2.25'lik NaOCl	% 1.5'lik NaOCl	% 1.125'lik NaOCl
2.5 dk	2.5 dk	2.5 dk	2.5 dk
5 dk	5 dk	5 dk	5 dk
7.5 dk	7.5 dk	7.5 dk	7.5 dk
10 dk	10 dk	10 dk	10 dk

3.2.3.2. Eksplantların kültüre edilmesi

Sterilizasyon denemeleri sonucunda en uygun sterilizant konsantrasyonu ve süresi belirlendikten sonra sterilize edilen yapraklar makas ve bistüri yardımı ile yaklaşık 0.5 cm'lik parçalara ayrılarak kallus, direkt veya indirekt organogenezis sürecinin başlatılması için farklı tip ve miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamlarında kültüre edilmişlerdir.

Denemelerde Murashige & Skoog (MS) (1962) besi ortamı temel ortam olarak kullanılmış ve bu ortam kallus, direkt veya indirekt organogenezis sürecinin başlatılması için çeşitli tip ve konsantrasyonlarda oksin ve sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiştir. Denemelerimizde sitokin olarak Benzil adenin (BA), Thidiazuran (TDZ) ve Kinetin (KIN), oksin olarak 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit (2,4-D) ve Naftalen Asetik Asit (NAA) gibi bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır. Bunlardan BA, NAA, KIN ve 2,4-D etkili konsantrasyon aralıklarına uygun olarak 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/L konsantrasyonlarında, TDZ ise 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 ve 1 mg/L konsantrasyonlarında MS ortamına ilave edilmiştir. Ayrıca TDZ, BA ve KIN, NAA'nın 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4 mg/L konsantrasyonları ile kombineli olarak kullanılmıştır. *In vitro* çalışmalar sonucunda elde edilen kalluslar indirekt adventif sürgün gelişimini teşvik etmek amacıyla 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L KIN ve 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L BA içeren MS ortamlarına alınmıştır.

Denemelerde eksplantlar her besi ortamına 4 eksplant gelecek şekilde kültüre edilmiş ve tüm denemeler 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kùltürler 24 ± 2 °C sıcaklıkta ve 16/8 fotoperiyod koşulları altında inkübe edilmiştir. Kùltürler 4 haftalık aralıklarla alt kültür edilmiş ve 8. haftanın sonunda eksplantlardan kallusların indüksiyonu, direkt ve indirekt adventif sürgün sayıları kaydedilmiştir. Eksplantlardan direkt ve indirekt yollarla rejenere olan adventif sürgünler, boylarının uzaması için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Yaklaşık 2-2.5 cm boyuna ulaşan adventif sürgünler hem köklenme hem de aksiler sürgün çoğaltımı çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.4. Aksiller Sürgün Çoğaltımı

Adventif sürgün çoğaltımı denemelerinden elde edilen sürgünler başlangıç eksplantı olarak kullanılmıştır. Stok kùltürlerden ayrılan tekli sürgünler, aksiller sürgün çoğaltımı denemeleri için KIN ve BA'nın 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/L konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamlarına aktarılmışlardır. Denemeler her kavanoza 4 eksplant gelecek şekilde kültüre edilmiş ve tüm denemeler 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kùltürler 24 ± 2 °C'ta 16/8 fotoperiyod koşulları altında inkübe edilmiştir. Kùltür başlangıcından yaklaşık 4 hafta sonra oluşan aksiller sürgün sayıları kaydedilmiştir. Aksiller sürgünler, boylarının uzaması için daha sonra hormonsuz MS ortamına aktarılmış ve 2-3 cm boyuna ulaşan sürgünler köklendirme denemeleri için kullanılmıştır.

3.2.5. Adventif ve Aksiller Sürgünlerin Köklendirilmesi Denemeleri

In vitro çoğaltım denemeleri sonucu elde edilen yaklaşık 2-3 cm uzunluğundaki adventif ve aksiller sürgünler, köklendirme çalışmalarında kullanılmıştır. Köklendirme çalışmalarında MS, makro $\frac{1}{2}$ MS ve makro $\frac{1}{4}$ MS besi ortamları temel ortam olarak kullanılmış ve bu ortam köklendirme sürecinin başlatılması için çeşitli tip ve konsantrasyonlarda oksinler ile desteklenmiştir. Denemelerimizde IBA, IAA ve NAA köklendirmeyi teşvik edici büyüme düzenleyicileri olarak kullanılmıştır. Etkili konsantrasyon aralıklarına uygun olarak IAA 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/L, IBA 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/L ve NAA 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/L olarak besi ortamlarına ilave edilmiştir.

3.2.6. Köklendirilen Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılması

Sürgünlerin köklendirilmesi ile elde edilen bitkicikler içinde buldukları kültür ortamından alınarak dış ortama alıştırmaya çalışılmaya başlanmıştır. Bitkiciklerin kök kısımları musluk suyu ile iyice yıkanarak besi ortamı kalıntılarından temizlenmiştir. Bitkicikler daha sonra küçük saksılara dikilmişlerdir. Bitkicikler dış ortama adaptasyonlarının sağlanabilmesi için ilk etapta üzerleri naylon torba ile örtülmüştür. Saksıdaki bitkicikler iklim odasında 16/8 fotoperiyot koşullarında büyütülmeye devam edilmiştir. Bitkiciklerin üstündeki naylon torba kademeli bir şekilde bitkinin üzerinden alınmıştır. Naylon torba ilk günlerde günde 1-2 saat daha sonra 4-5 saat 3 hafta sonunda tamamen kaldırılarak genç bitkicikler ortam şartlarına alıştırmış ve hayatta kalanların oranı tespit edilmiştir. Yaklaşık 1 ay sonra *H. adenotrichum* türüne ait genç bitkiciklerden hayatta kalanların saksıları değiştirilerek dış ortama aktarılmıştır.

3.2.7. *In vitro* Stres ve Elisitör Uygulamaları

H. adenotrichum bitkisinin sekonder metabolitlerinin (hipersinler ve flavonoidler) değişiminin araştırılmasına yönelik olarak, *in vitro* koşullarda çimlendirilen tohumlardan elde edilen fideler, bazı stres ve elisitör uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Sukroz ve Polietilen glikol (PEG) bitkide su ve kuraklık stresini tetiklemek, Krom (Cr) ağır metal stresi oluşturmak ve pektin ve mannan ise biyotik elisitörler olarak fidelere uygulanmıştır.

3.2.7.1. Sukroz uygulaması

H. adenotrichum fideleri, 15, 30, 45, 60 g/L sukroz konsantrasyonlarına sahip ¼ MS/Galzy ortamlarında 22±1 °C'ta, 16/8 fotoperiyot koşulları altında 15 ve 30 gün boyunca kültüre edilmiştir.

3.2.7.2. Polietilen glikol (PEG, 6000) uygulaması

H. adenotrichum fideleri, 2.5, 10, 15 g/L PEG (6000) konsantrasyonlarına sahip ¼ MS/Galzy ortamlarında 22±1 °C'ta, 16/8 fotoperiyot koşulları altında 15 ve 30 gün boyunca kültüre edilmiştir. PEG distile suda içerisinde manyetik karıştırıcıda

biraz ısıtıldıktan sonra çözünmüştür. Çözünen PEG ortamlara otoklavlanmadan önce ilave edilmiştir.

3.2.7.3. Cr (IV) uygulaması

H. adenotrichum fideleri, 0.01 mM (2,98 mg/L) ve 0.1mM (29,8 mg/L) Krom Cr (VI) konsantrasyonlarına sahip ¼ MS/Galzy ortamlarında 22±1 °C'ta, 16/8 fotoperiyot koşulları altında 15 ve 30 gün boyunca kültüre edilmiştir. Krom, Sodyum dikromat olarak uygulanmıştır. Sodyum dikromat direkt distile suda çözülüp ortamlara otoklavlanmadan ilave edilmiştir.

3.2.7.4. Pektin uygulaması

H. adenotrichum fideleri, 10, 50, 100 mg/L pektin konsantrasyonlarına sahip ¼ MS/Galzy ortamlarında 22±1 °C'ta, 16/8 fotoperiyot koşulları altında 15 ve 30 gün boyunca kültüre edilmiştir. Pektin direkt suda çözülüp ortamlara otoklavlanmadan önce ilave edilmiştir.

3.2.7.5. Mannan uygulaması

H. adenotrichum fideleri, 10, 50, 100 mg/L mannan konsantrasyonlarına sahip ¼ MS/Galzy ortamlarında 22±1 °C'ta, 16/8 fotoperiyot koşulları altında 15 ve 30 gün boyunca kültüre edilmiştir. Mannan direkt suda çözülüp ortamlara otoklavlanmadan önce ilave edilmiştir.

3.2.7.6. Fidelerin hasat edilmesi ve saklanması

Farklı stres koşulları veya elisitörlere maruz bırakılmış olan fidelerin bir kısmı 15. bir kısmı ise 30. günde ortamlardan alınmıştır. Fidelerin kök kısımları kesilmiş ve kök üstü kısımları önce alüminyum folyo ile sarılmış ve etiketlenerek kilitli poşetler içerisine konmuştur. Daha sonra örnekler sıvı azot içinde dondurulmuş ve analizlerinin yapılacağı zamana kadar -80 °C'ta depolanmıştır.

3.2.8. Sekonder Metabolitlerin Analiz Edilmesi

In vitro da belirli sürelerde çeşitli stres ve elisitör uygulamalarına maruz bırakılan ve -80 °C'ta depo edilen fideler öncelikle liyofilize edilmiştir. Liyofilize örneklerin daha sonra sonikatör yardımı ile ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen örnekler, bitkideki sekonder metabolit değişimini belirlemek için HPLC cihazı ile analiz edilmiştir. Analiz için *Hypericum* türlerinin en çok çalışılan bileşiklerinden olan, hiperisin, pseudohiperisin ve bazı flavonoidler (rutin, hiperosid, izokuersitrin, amentoflavon) olmak üzere toplam 6 bileşik seçilmiştir.

3.2.8.1. Örneklerin liyofilizasyonu (dondurarak kurutma)

-80 °C'ta depolanan fideler, falkon tüpler içerisine yerleştirilmiş ve falkon tüplerin ağzları tülbent bezi ile kapatılmıştır. Daha sonra örneklerin içerisinde bulunduğu bu tüpler liyofilizatör cihazının içerisine yerleştirilmiş ve -55 °C'ta 48 saat boyunca örneklere liyofilizasyon işlemi uygulanmıştır. Liyofilize olan örnekler, ekstraksiyonları yapılanadək -20 °C'ta saklanmıştır.

3.2.8.2. Örneklerin ekstraksiyonları

Örneklerin ekstraksiyonu için, Li ve Fitzloff (2001), Ganzera vd. (2002), Avato ve Guglielmi (2004), Smelcerovic vd. (2006) araştırmalarına ait çalışmalardan faydalanılmış, tüm bu çalışmaların en verimli sonuçları değerlendirilerek yöntem modifiye edilmiş ve aşağıdaki ekstraksiyon basamakları takip edilmiştir:

1. Liyofilize örnekler öğütülerek toz haline getirilmiş ve kullanılıncaya dek -20 °C'ta karanlık koşullarda saklanmıştır.
2. 100 mg toz örneğin ekstraksiyonu için 4 mL HPLC saflığında metanol kullanılmıştır.
3. 100 mg toz bitki örneği ağırlığı hesaplanmış propilen vidalı kapaklı 10 ml'lik borosilikat amber cam tüp içerisine alınmış ve 30 dakika loş ışıkta soğuk su banyosu içerisinde bir sonikatör kullanarak 4 mL metanolla ekstrakte edilmiştir. Sonikasyon sırasında direkt sonikasyon yöntemi kullanılmış ve direkt sonikasyon 20 kHz'da 60 W güç değerinde gerçekleştirilmiştir.

4. Karışım 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant (üst sıvı) 10 ml'lik hacimli balona aktarılmıştır.
5. Tüpteki kalan kısım (pellet), yukarıda tanımlandığı gibi 4 ml metanolla 2. kez ekstrakte edilmiş ve süpernatant önceki süpernetant ile birleştirilmiştir.
6. Ekstraktlar bir vakum santrifüj cihazı kullanarak konsantre edilmiştir.
7. Konsantre ekstraktın hacmi metanolla tekrar 4 mL'ye tamamlanmıştır.
8. 5 mL'lik steril şırıngalara çekilmiş 4 mL'lik ekstraktlar daha sonra şırıngaların ucuna takılan PTFE (0.45 µm, ValuPrep 25 mm, Pall) filtrelerden geçirilerek 1,5 mL'lik borosilikat amber cam viallere aktararak porsiyonlara ayrılmış ve HPLC analizine kadar -20 C'ta saklanmıştır. Mümkün olduğu kadar bütün ekstraksiyon prosedürü gün ışığından korunarak gerçekleştirilmiş.

3.2.8.3. HPLC analizleri

HPLC cihazının bileşenleri

Bütün örneklerin HPLC analizleri, Agilent 1100 HPLC sistemi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dedektör olarak DAD (Diode Array Detector) (G1315B) kullanılmıştır. HPLC cihazının diğer bileşenleri şunlardır: Mobil faz gaz giderici (Agilent 1100), LC Pompa (Agilent, 1100), Otomatik örnekleyici (Agilent 1100, G1313), Kolon fırını (Agilent 1100, G1316A). Ayırma kolonu olarak Synergi MAX-RP 80 Å kolon (150 × 4.6 mm i.d.; 4 µm; Phenomenex) kullanılmıştır. Kullanılan kolon C12 materyaline sahiptir.

Kullanılan standartlar, kimyasallar ve solüsyonlar

Hiperisin (carl-roth), pseudohiperisin (carl-roth), rutin (carl-roth), hiperosid (carl-roth), izokuersitrin (carl-roth), amentoflavon (carl-roth) bileşikleri standart olarak kullanılmıştır. Mobil fazların hazırlanması sırasında kullanılan glasiyel asetik asit (Carlroth), Asetonitril (Fluka), Metanol (Sigma-Aldrich) ve Amonyum nitrat (Sigma) HPLC saflığındadır. Mobil faz A (10 mM amonyum asetat tamponu) ve Mobil faz B (asetonitril ve metanol (9:1)) olmak üzere iki mobil faz kullanılmıştır.

Standartların ana stoklarının hazırlanması

Hiperisin, pseudohiperisin, rutin, hiperosid, izokuersitrin, amentoflavon bileşiklerinin herbiri için, 15 mL'lik koyu renkli cam şişelerde metanolla 100 ppm'lik 10mL stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok solüsyonların çözünürlüğünü arttırmak için hazırlanan stoklar, sonikatör banyosunda 5 dakika sonike edilmiştir. Stoklar + 4 °C'ta saklanmıştır. Stoklar kullanılmadan önce her seferinde su banyosunda 1-2 dakika sonike edilmiştir.

Standart karışımı için ana stoğun hazırlanması

Hiperisin, pseudohiperisin, rutin, hiperosid, izokuersitrin, amentoflavon bileşiklerinin herbirini 10 ppm içerecek şekilde standart karışımı stoğu 10 mL'lik koyu renkli cam şişelerde 5 mL olarak hazırlanmıştır. Standart karışım stoğu + 4 °C'ta saklanmıştır. Stok kullanılmadan önce her seferinde 1-2 dakika sonike edilmiştir.

Mobil faz A'nın hazırlanması (10 mM amonyum asetat tamponu)

1,927 g amonyum asetat ultra saf su ile çözüldülmüş, son hacim 2.5 L'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'ı glasiyel asetik asit ile 5.0'a ayarlanmıştır. Çözelti her kullanımda taze olarak hazırlanmıştır.

Mobil faz B'nin hazırlanması (asetonitril ve metanol (9:1))

2250 mL asetonitril ve 250 mL metanol karıştırılarak 2500 mL 9:1 oranında asetonitril:metanol karışımı elde edilmiştir. Karışım her kullanımda taze olarak hazırlanmıştır.

Kromatografik metot ve koşullar

H.adenotrichum metanolik ekstraktlarının analizinde, Ganzera vd.'nin (2002) *H. perforatum* metanolik ekstraktları için kullandıkları kromatografik metotdan faydalanılmıştır Çizelge (Çizelge 3.4). Analizler sırasında gradiyent elüsyon yapılmıştır. Gradiyent elüsyonu şu solvent gradiyenti kullanılarak gerçekleştirilmiştir: 10 dk'da 87A/13B'dan 83A/17B'ye, daha sonra 25dk'da 100B'ye kadar; her bir yürütmeyi 10 dk'lık bir dengeleme periyodu takip etmiştir. Hiperisin ve pseudohiperisin en yüksek pik verdikleri 590 nm'deki pikleri,

flavonoidlerin (rutin, hiperosid, izokuersitrin, amentoflavon) ise 270 nm'de verdikleri pikler değerlendirilmiştir. Pikler, standart bileşikler ile örneklerin çivilenmesi ve alikoyma zamanlarının karşılaştırması ile tayin edilmiştir.

Çizelge 3.4. Kromatografik koşullar

Akış hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	50 µL
Analiz süresi	35 dk
Dalga boyu	270 nm, 590 nm
Kolon ısısı	40 °C
Mobil faz	Mobil faz A: 10 mM amonyum asetat Mobil faz B: asetonitril ve metanol (9:1)

Standartlara ait kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ve doğru denkleminin hesaplanması

Analiz yapılan bileşiklerin ekstraktlarda nitel ve nicel olarak belirlenebilmesi için bileşiklere ait standartların dedektör cevaplarına bakılmıştır. Standartların çıkış zamanları bileşiklerin nitel olarak tanımlanmasında kullanılmıştır. Bileşiklerin ekstraktlardaki miktarlarının belirlenebilmesi için bir standart kalibrasyon eğrisine gereksinim vardır. Standart eğrinin çizilmesi için, standartların stok solüsyonlardan herbir standart için 6 ya da 7 kalibrasyon seviyesi metanol ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Standart solüsyonlar 4 °C'ta karanlıkta depolanmış ve 30 gün boyunca stabil bir şekilde kullanılmıştır. Enjekte edilen hiperisin (0.02, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5 5.0, 10 µg/mL), pseudohiperisin (0.05, 0.1, 0.5 2.5 5.0, 10 µg/mL), hiperosid (0.05, 0.1, 0.5, 2.5, 7.5, 15, 30 µg/mL), Rutin (0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 µg/mL), izokuersitrin (0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 µg/mL) ve amentoflavonun (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 1.0 µg/mL) konsantrasyon aralıkları içerisinde dedektör cevapları incelenmiş ve herbir konsantrasyon için pik alanları hesaplanıp, saptanmış alanlar standart konsantrasyonlarına karşı aritmetik ıskalalı bir grafiğe

aktarılmıştır. Verilere doğrusal regresyon analizi uygulanarak bileşiklerin standart eğrisi, eğriyi tanımlayan eşitlik ve korelasyon katsayıları (R^2) elde edilmiştir. Doğru denkleminde yararlanılarak analiz edilen bileşiklerin, *H. adenotrichum in vitro* fidelelerinde ki miktarları hesaplanmıştır.

3.2.9. Verilerin Değerlendirilmesi

Tohum çimlenmesine ait verilerin değerlendirilmesinde üç yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Çimlenme oranına ait veriler $x' = \arcsin \sqrt{(x/100)}$ dönüşümü yapılarak varyans analizinde kullanılmıştır. Ortalamalar arasında önemli bulunan farklılıklar Tukey çoklu karşılaştırma testi ile mukayese edilmişlerdir. Fide gelişim parametreleri, kallus oluşum (indüksiyon) oranı, kallus başına sürgün sayısı, eksplant başına direkt sürgün sayısı ve eksplant başına aksiller sürgün sayısına ait verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Kallus indüksiyon oranına ait sonuçlar, $x' = \arcsin \sqrt{(x/100)}$ dönüşümü yapılarak, kallus başına sürgün sayısı, direkt sürgün sayısı ve aksiler sürgün sayısına ait veriler ise karekök dönüşümü $\sqrt{(x+0.5)}$ yapılarak varyans analizinde kullanılmıştır. Ortalamalar arasında önemli bulunan farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile mukayese edilmişlerdir İstatistikî analizler için SPSS 15.0 programından faydalanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *In Vitro* Çimlenme

4.1.1. Tohum Doluluk ve Canlılık Oranları

Tohumların ikiye bölünerek içerisinde embriyo olup olmamasına göre yapılan morfolojik gözlemler sonucunda tohumların yaklaşık %70 oranında boş olduğu belirlenmiştir. Yüzdürme tekniğine göre, kabın dibine batan tohumlar “dolu”, yüzen tohumlar ise “boş” kabul edilmiştir. Buna göre 100 tohumdan ortalama olarak yaklaşık %67’sinin boş, %33’ünün ise dolu olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu değerler, tohumları tek tek kesip bakarak yaptığımız boş-dolu tohum sayımında elde ettiğimiz yaklaşık %70 boş, %30 dolu tohum sonuçları ile hemen hemen örtüşmektedir. Dolu olarak belirlenen tohumlara uygulanan tohum canlılık testinde embriyoların tamamının canlı olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Distile su içerisinde batan ve yüzen tohum sayıları

1. Tekrar		2. Tekrar		3. Tekrar		4. Tekrar	
Batan tohum sayısı	Yüzen tohum sayısı	Batan tohum sayısı	Yüzen tohum sayısı	Batan tohum sayısı	Yüzen tohum sayısı	Batan tohum sayısı	Yüzen tohum sayısı
36	64	38	62	28	72	31	69

Yüzen tohumlar ile ilgili yapılan bütün denemelerde hiçbir tohum çimlendirilememiştir. Bu durum yüzdürme-çöktürme deneyinin başarılı olduğunu ve amacına ulaştığını göstermektedir. Yaklaşık % 67’si boş olan tohumlar dolu tohumlardan ayrılmıştır. Bu şekilde boş tohumların, çimlenme oranını rastlantısal olarak düşürme olasılığı giderilmeye çalışılmıştır. Yüzdürme metodu birçok boş, kırılmış, hastalıklı veya böcek zararı görmüş tohumları ayırmada yardımcı olmaktadır (Bonner vd.,1994). Bu metot, özellikle ağır tohumlu türlerde uygulanan bir metottur ve yüksek nem içeriğine sahip iri tohumlar için çok iyi sonuçlar vermektedir (Bonner vd.,1994; Avşar, 2002). Yöntem daha çok büyük ve iri

tohumlara uygulanmasına rağmen *H. adenotrichum* tohumlarının ayırımında da başarıyla kullanılmıştır.

4.1.2. Tohumların Sterilizasyonu

Tohumlar için uygun bir sterilizasyon yöntemi belirlenmesi kontaminasyon kaynaklı besi ortamı ve tohum kaybını engellemek için oldukça önemli bir aşamadır. Kullanılan sterilizant konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça tohumların zarar görmesi ve çimlenme kabiliyetini kaybetmesi olasılığında artmaktadır. Bunun için sterilizasyonu sağlayacak minimum sterilizant konsantrasyonu ve minimum sterilizasyon süresinin tespit edilmesi gerekmektedir. *H. adenotrichum* tohumların sterilizasyonu için yapılan denemelerde sterilizasyon için en iyi yöntemin tohumların 30 dakika musluk suyu altında yıkandıktan sonra, sırası ile 1 dakika % 70 lik etil alkol ve 5 dakika 1-2 damla tween 80 ilaveli % 2.25 'lik NaOCl (sodyum hipoklorit) uygulaması ardından 3 kez steril distile su ile durulanması olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı uygulamalara maruz bırakılan tohumların PDA ortamındaki kontaminasyon yüzdeleri

Uygulama süresi (dk)	%70'lik Etil Alkol (30 saniye)		%70'lik Etil Alkol (1 dakika)	
	% 4.5 'lik NaOCl	%2.25'lik NaOCl	% 4.5 'lik NaOCl	%2.25'lik NaOCl
2.5	%50	%70	%35	%50
5	%10	%25	%0	%0
7.5	%0	%0	%0	%0
10	%0	%0	%0	%0

4.1.3. Tohum Çimlenmesi ve Fide Gelişimi

Tohum çimlenme davranışı, özellikle germplazm için verimli populasyonları temin etmek ve standart canlılık izleme protokolü geliştirmek için *ex situ* korumanın ayrılmaz bir parçasıdır (Bewley ve Black, 1994). Genellikle çok yıllık bitkilerin ekonomik üretimi, yüksek kalitede tohumların hızlı senkronize

çimlenmesini gerektirir (Zinati vd., 2000). Tohumdan üretim, aseksüel olarak çoğalabilmelerine rağmen, ticari üretim için bitkilerin üretiminin en verimli metodu olduğu düşünülmektedir (Zhang ve Cheng, 1989; Omidbaigi ve Bernath, 1993; Zheljzakov vd.,1996). Tohumdan çoğaltım yapabilmesinin en önemli aşaması verimli bir çimlenme prosedürünün elde edilmesidir. Tohumların düşük çimlenme oranları, tohum çimlenmesi sırasında uygun olmayan çevresel şartlar, düşük tohum gücü ya da tohum dormansisine bağlanmıştır (Wartidiningsih vd., 1994). Bununla birlikte birçok doğal bitki tohumu kompleks dormansi sistemlerine sahiptir (Zinati vd., 2000). Dormansi, şartlar fide canlılığı için optimum olana kadar tohumların çimlenmemesini sağlar (Bewley ve Black, 1982). *Hypericum* cinsinin çimlenme biyolojisi üzerine yapılmış birçok çalışma vardır (Grime vd., 1981; Campbell, 1985; Maya vd., 1988; Gonzalez- Martin, 1995; Keller ve Kollmann, 1999; Çırak, 2004; Perez-Garcia vd., 2006; Çırak, 2007a). *Hypericum* türlerinin çimlenme kapasitesi tohum dormansisine bağlı olarak genellikle çok düşüktür (Macchia vd., 1983). *Hypericum perforatum*'da buna kapsülde bulunan kimyasal bir inhibitörün neden olduğu bildirilmiştir (Campbell, 1985). Çırak vd. (2004), *H. perforatum* tohumlarının hem ekzojen hem de endojen dormansiye sahip olduğunu, ekzojen dormansinin ekim öncesi uygulamalar ile elimine edilebildiğini ama endojen dormansinin ışık yokluğu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Perez-Garcia vd. (2006)'de ışığın *H. perforatum* tohumlarının çimlenmesinde önemli bir role sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu veriler gözönüne alınarak *H. adenotrichum*'da dormansinin kırılmasına ve çimlenme oranının artırılmasına yönelik stratifikasyon, sıcaklık, ışık ve çeşitli ortam faktörleri değerlendirilmiştir.

Batan tohumlar ile karanlık ortamda yapılan çalışmalar sonucunda, çimlendirme ortamları, sıcaklık ve soğuk uygulamasına bağlı çimlenme yüzdeleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Karanlık ortamlarda elde edilen çimlenme değerleri

Karanlık ortamlarda tohum çimlenmesi (%)								
Çimlendirme ortamları	Soğuk uygulaması (+4°C)				Soğuk uygulamasız			
	Sıcaklıklar				Sıcaklıklar			
	15 °C	18 °C	22 °C	25 °C	15 °C	18 °C	22 °C	25 °C
MS	25	30	20	10	10	10	5	0
½ MS	25	40	25	10	15	15	10	0
¼ MS	30	40	35	20	15	20	10	5
MS/B5	25	30	20	10	10	10	5	0
½ MS/B5	25	35	25	10	10	15	5	0
¼ MS/B5	30	40	30	20	15	20	10	0
¼ MS/Galzy	25	40	30	20	15	20	10	5

Karanlıkta çimlenme yüzdesi üzerine çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulaması ile bunların karşılıklı etkileşimlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olup olmadığının belirlenmesi için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Karanlıkta tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının etkileri ve bunların etkileşimlerinin üç yönlü varyans analizi sonuçları

Varyans kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	Önem düzeyi (P)
Ortamlar (O)	0.372	6	0.062	38.907	0.000
Sıcaklık (S)	2.143	3	0.714	448.030	0.000
Stratifikasyon (ST)	2.552	1	2.552	1601.001	0.000
O x S	0.116	18	0.006	4.049	0.000
O x ST	0.017	6	0.003	1.750	0.116
S x ST	0.115	3	0.038	24.090	0.000
O x S x ST	0.055	18	0.003	1.916	0.021

Çizelge 4.4'den de görülebileceği gibi çimlenme yüzdelere bağlı olarak yapılan üç yönlü varyans analizi sonucunda karanlıkta tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasına bağlı olarak önem düzeyi (p) 0.05'den küçük çıkmıştır. Bu sonuca bağlı olarak çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının $p < 0.05$ güven düzeyi ile çimlenme yüzdelerinin farklılıklar gösterdiği söylenebilir. Çizelgenin ortam * stratifikasyon satırındaki değerlerden ortam ve stratifikasyonun çimlenme yüzdesi üzerindeki ortak etkisinin ($p = 0.116$, $p > 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı göstermektedir. Yani çeşitli ortamlarda çimlendirilen tohumların çimlenme yüzdesi stratifikasyona bağlı olarak farklılık göstermez ve ortam ile stratifikasyon bir etkileşim içerisinde değildir diyebiliriz. Çizelgenin ortam*sıcaklık satırındaki değerlerden ortam ve stratifikasyonun çimlenme yüzdesi üzerine ortak etkisinin ($p = 0.000$, $p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Çizelgenin ortam*sıcaklık*stratifikasyon satırındaki değerlerden ortam, sıcaklık ve stratifikasyonun çimlenme yüzdesi üzerine ortak etkisinin ($p = 0.021$, $p < 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ve bu 3 faktör çimlenme üzerine ortak bir etkileşime sahiptir. Belirlenen bu

farklılıklardan sonra, uygulanan tüm işlemler bakımından nasıl bir gruplandırma meydana geldiğini ortaya koymak için Tukey testi yapılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Karanlıkta üç yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testine göre tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının oluşturduğu gruplar

	Faktörler	Gruplar
Ortamlar	MS	c
	½ MS	b
	¼ MS	a
	MS/B5	c
	½ MS/B5	bc
	¼ MS/B5	a
	¼ MS/Galzy	a
Sıcaklıklar	15 °C	b
	18 °C	a
	22 °C	c
	25 °C	d
Stratifikasyon	Stratifikasyonlu	a
	Stratifikasyonsuz	b

Çizelge 4.5’den de görüleceği gibi tohum çimlenme ortamına bağlı olarak 4 farklı grup meydana gelmiş olup ¼ MS, ¼ MS/B5, ¼ MS/Galzy ortamlarında çimlendirilen tohumlarda çimlenme yüzdesi en yüksek çıkmış ve bu ortamlar arasında $p>0.05$ olduğu için istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çimlendirme sıcaklıkları bakımından da 4 farklı grup meydana gelmiş olup 18 °C’ta çimlenme yüzdesinin en fazla olduğu belirlenmiştir. Stratifikasyonlu tohumlar ile stratifikasyonsuz tohumlar arasında çimlenme yüzdesi bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmuş olup stratifikasyonlu tohumlarda çimlenme yüzdesi en yüksek çıkmıştır.

Batan tohumlar ile fotoperiyotlu ortamda yapılan çalışmalar sonucunda, çimlendirme ortamları, sıcaklık ve soğuk uygulamasına bağlı çimlenme yüzdeleri Çizelge 4.6'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Fotoperiyotlu ortamlarda elde edilen çimlenme değerleri

Fotoperiyotlu ortamlarda tohum çimlenmesi (%)								
Çimlendirme ortamları	Soğuk uygulaması (+4°C)				Soğuk uygulamasız			
	Sıcaklıklar				Sıcaklıklar			
	15 °C	18 °C	22 °C	25 °C	15 °C	18 °C	22 °C	25 °C
MS	40	60	35	20	20	25	15	0
½ MS	50	65	40	20	20	30	15	5
¼ MS	55	75	50	30	25	35	20	5
MS/B5	40	55	35	20	20	25	15	0
½ MS/B5	50	65	35	20	20	30	15	5
¼ MS/B5	55	70	40	30	25	35	15	5
¼ MS/Galzy	55	70	40	30	20	35	20	5

Fotoperiyotta çimlenme yüzdesi üzerine çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulaması ile bunların karşılıklı etkileşimlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olup olmadığının belirlenmesi için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Fotoperiyotta tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının etkileri ve bunların etkileşimlerinin üç yönlü varyans analizi sonuçları

Varyans kaynağı	Kareler toplamı	Serbestli derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	Önem düzeyi (P)
Ortamlar (O)	0.390	6	0.065	75.933	0.000
Sıcaklık (S)	4.133	3	1.378	1610.606	0.000
Stratifikasyon (ST)	4.300	1	4.300	5026.659	0.000
O x S	0.067	18	0.004	4.373	0.000
O x ST	0.020	6	0.003	3.911	0.001
S x ST	0.071	3	0.024	27.684	0.000
O x S x ST	0.107	18	0.006	6.943	0.000

Çizelge 4.7'den de görülebileceği gibi çimlenme yüzdelere bağlı olarak yapılan üç yönlü varyans analizi sonucunda fotoperiyotta tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasına bağlı olarak önem düzeyi (P) 0.05'den küçük çıkmıştır. Bu sonuca bağlı olarak çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının $p < 0,05$ güven düzeyi ile çimlenme yüzdelere farklılıklar gösterdiği söylenebilir. Çizelgenin ortam * stratifikasyon, ortam*sıcaklık, sıcaklık*stratifikasyon ve ortam*sıcaklık*stratifikasyon satırındaki değerlerden bu faktörlerin çimlenme yüzdesi üzerindeki ortak etkisinin $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir yani bu faktörler çimlenme üzerine bir etkileşim içerisindedirler. Belirlene bu farklılıklardan sonra, uygulanan tüm işlemler bakımından nasıl bir gruplandırma meydana geldiğini ortaya koymak için Tukey testi yapılmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Fotoperiyotta üç yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testine göre tohum çimlenmesi üzerine, çimlenme ortamları, çimlenme sıcaklıkları ve soğuk uygulamasının oluşturduğu gruplar

	Faktörler	Gruplar
Ortamlar	MS	c
	½ MS	b
	¼ MS	a
	MS/B5	c
	½ MS/B5	b
	¼ MS/B5	a
	¼ MS/Galzy	a
Sıcaklıklar	15 °C	b
	18 °C	a
	22 °C	c
	25 °C	d
Stratifikasyon	Stratifikasyonlu	a
	Stratifikasyonsuz	b

Çizelge 4.8'den de görüleceği gibi tohum çimlenme ortamına bağlı olarak 3 farklı grup meydana gelmiş olup ¼ MS, ¼ MS/B5, ¼ MS/Galzy ortamlarında çimlendirilen tohumlarda çimlenme yüzdesi en yüksek çıkmış ve bu ortamlar arasında $p>0.05$ olduğu için istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çimlendirme sıcaklıkları bakımından da 4 farklı grup meydana gelmiş olup 18 °C'ta çimlenme yüzdesinin en fazla olduğu belirlenmiştir. Stratifikasyonlu tohumlar ile stratifikasyonsuz tohumlar arasında çimlenme yüzdesi bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmuş olup stratifikasyonlu tohumlarda çimlenme yüzdesi en yüksek çıkmıştır.

Karanlık ortamlarda en yüksek çimlenme yüzdesi, stratifikasyon uygulanmış tohumların 18 °C'ta ¼ MS (%40), ¼ MS/B5 (%40), ¼ MS/Galzy(%40), ortamlarında çimlendirilmesi ile elde edilmiştir. Fotoperiyotlu ortamlarda en yüksek çimlenme yüzdesi stratifikasyon uygulanmış tohumların 18 °C'ta ¼ MS

(%75), ¼ MS/B5 (%70), ¼ MS/Galzy (%70) ortamlarında çimlendirilmesi ile elde edilmiştir. Karanlık ortamlardaki çimlenme yüzdeleri ile fotoperiyotlu ortamlardaki çimlenme yüzdelerini karşılaştırdığımızda en yüksek çimlenme yüzdesine (%70-75) fotoperiyotlu ortamlarda ulaşıldığı görülmektedir.

Hypericum adenotrichum tohumlarının çimlenmesi üzerine ışığın önemli bir etkisi olduğu görülmektedir. En iyi çimlenme yüzdesine 16/8 fotoperiyot altında ulaşılmıştır. Tohum çimlenmesinde sıcaklık kadar ışık da önemlidir. Işık çimlenme üzerine düzenleyici bir etkiye sahiptir ve endojen tohum dormansisi bazı bitki türlerinde genellikle ışığın yokluğu ile ilişkilidir (Arechiga., vd., 1997). Bazı tohumlar karanlıkta ve ışıkta benzer şekilde çimlenirken (Baskin ve Baskin, 1988), bazıları ise ya ışık altında (Colbach vd., 2002) ya da karanlık koşullarda (Thanos vd.,1989) daha kolay çimlenebilirler. Ayrıca, çimlenmek için ışık gereksinimleri, sıcaklığa göre farklılaşabilir. Yapılan çalışmalara göre bazı türler çimlenme için sabit bir sıcaklık ve ışığa ihtiyaç duyarlarken diğerleri ya karanlıkta ya da ışıkta çimlenirler fakat sıcaklık dalgalanmasına ihtiyaç duyarlar (Felippe, 1978). Diğer türlerde ise, stratifikasyon (Farmer vd., 1984) ya da yüksek sıcaklıklar (Amritphale vd., 1989) çimlenme için ışık ihtiyacının yerini alır. Genellikle, ışığın yokluğu *H. aviculariifolium* (Çırak vd., 2007b), *H. brasiliense* (Faron vd., 2004), *H. gramineum* (Willis vd.,1997) ve *H. perforatum* (Campell.,1985; Faron vd., 2004; Çırak vd., 2004; Perez-Garcia vd., 2006; Guedes, 2009) gibi bazı *Hypericum* türleri üzerine negatif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Tohumlar + 4 °C'ta 2 ay boyunca saklandıktan sonra *in vitro* çimlenme denemelerine geçilmesi ile optimum koşullar baz alındığında, çimlenme yüzdesinin yaklaşık 2 kat arttığı görülmüştür. Buda bize bir tohum dormansisinin olduğunu ve soğuk uygulaması ile bu dormansinin kırıldığını göstermektedir. Birçok türün tohumları dormansiyi yenmek için ekim öncesi uygulamalar gerektirir. Soğuk uygulaması (stratifikasyon), dormant tohumlara sahip türlerde çimlenmeyi teşvik etmek için kullanılabilen ekim öncesi tohum uygulamalarından biridir (Hartmann vd., 1990) ve içsel dormansinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olmaktadır. (Rehman ve Park, 2000).

Tohum çimlenmesi üzerine sıcaklığın etkili olduğu görülmüştür. En yüksek çimlenme yüzdesine 18 °C'ta (%75) ulaşılmıştır. Sıcaklık arttıkça çimlenme yüzdesi düşmüştür. *Hypericum* türleri üzerine yapılan bir çalışmada 4 *Hypericum* türünün (*H. hirsutum*, *H. polyphyllum*, *H. xylosteifolium* ve *H. erectum*) sıcaklık

25 °C'ta çıkınca çimlenme oranlarının önemli ölçüde düştüğü rapor edilmiştir (Osińska ve Suchorska-Tropiło, 2002). Sıcaklık çimlenme üzerinde 3 şekilde rol oynar; çimlenmenin kapasitesi ve yüzdesini belirler, primer ve/ya da sekonder dormansiyi elimine eder ve sekonder dormansiyi indükler (Bewley ve Black, 1994). 25 °C ve üzerindeki sıcaklıkların *H.adenotricum* tohumları üzerinde sekonder dormansiyi indüklediği düşünülmektedir.

H. adenotrichum'un çimlenmesi üzerine farklı ortam tiplerinin etkisi ile ilgili olarak yapılan denemelerde, optimum koşullarda (fotoperiyot-stratifikasyon-18°C) en iyi çimlenme yüzdesi ¼ MS (%75), ¼ MS/B5 (%70), ¼ MS/Galzy (%70) ortamlarından elde edilmiştir. Bu durum vitamin içeriklerinin çimlenme üzerine önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. En iyi çimlenme yüzdesine ¼ MS tuz konsantrasyonlarında ulaşılması ortamda tuz konsantrasyonunun (½ MS (% 65), MS (%60) artmasına bağlı olarak çimlenme oranının düşmesi, çimlenme ortamındaki yüksek osmotik basıncın emmeyi (su alınımını) zorlaştırması ile ilişkili olabilir. Bazı bitkilerde tuzluluk, tohum çimlenmesini olumsuz etkiler, nodül oluşumunu azaltır, bitki gelişimini geciktirir ve ürün oluşumunu azaltır (Greenway ve Munns, 1980). Tuzluluk, ya su alınımını önleyen osmotik potansiyeli yaratarak ya da embriyo canlılığı üzerine iyonların toksik etkisi ile tohum çimlenmesini etkileyebilir (Lianes vd., 2005). Üç yönlü varyans analizi ve Tukey testine göre çimlenme ortamları arasında bir farklılık olmasına rağmen çimlenme yüzdelерinin optimum koşullarda ½ MS için % 65 ve MS için % 60 olması tuz konsantrasyonun ışık, sıcaklık ve stratifikasyon kadar çimlenme üzerinde etkili olmadığını göstermektedir.

Tohumlar çimlendikten bir hafta sonra 22±1 °C'ta 16/8 fotoperiyot koşullarına alınmışlardır. MS, ½ MS, ¼ MS, MS/B5, ½ MS/B5, ¼ MS/B5, ¼ MS/Galzy ortamlarında 8 hafta boyunca fidelerin gelişimleri izlenmiştir. Fide gelişimlerinin değerlendirilmesinde fide başına ortalama sürgün sayısı, ortalama yan kök sayısı, ortalama sürgün uzunluğu, ortalama kök uzunluğu ve sürgün başına ortalama yaprak sayısı parametleri kullanılmıştır. Gelişim parametlerinin değerlendirilmesi için, tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Ortalamalar arasında önemli bulunan farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile mukayese edilmişlerdir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *H. adenotrichum* fidelerinin gelişimi üzerine farklı ortamların etkisi

Ortamlar	Fidelerin gelişim parametreleri				
	Ort. sürgün sayısı (s.s)	Ort. yan kök sayısı	Ort. sürgün uzunluğu (s.u) (cm)	Ort. kök uzunluğu (cm)	Ort. yaprak sayısı (y.s)
MS	1.8 ^{d*}	1.6 ^c	2.1 ^b	2.5 ^a	9.5 ^b
½ MS	2.5 ^{bc}	3.6 ^{bc}	2.2 ^b	2.7 ^a	9.8 ^b
¼ MS	3.6 ^b	6.0 ^{ab}	3.0 ^{ab}	3.0 ^a	11.8 ^{ab}
MS/B5	2.0 ^d	1.6 ^c	2.2 ^b	2.3 ^a	9.6 ^b
½ MS/B5	2.6 ^{bc}	3.8 ^{bc}	2.2 ^b	2.6 ^a	10.0 ^b
¼ MS/B5	3.6 ^b	5.8 ^{ab}	2.9 ^{ab}	2.9 ^a	11.5 ^{ab}
¼ MS/Galzy	5.8 ^a	6.3 ^a	3.3 ^a	3.0 ^a	12.3 ^a

* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Fide başına ortalama en yüksek sürgün sayısı ¼ MS/Galzy (5.8, s.s/fide) ortamından elde edilmiştir. ¼ MS (3.6, s.s/fide) ve ¼ MS/B5 (3.6, s.s/fide) ortamlarındaki sürgün sayısı ¼ MS/Galzy ortamına göre daha düşüktür. Makro ve mikro tuz konsantrasyonları aynı vitamin içerikleri farklı olan bu ortamlar karşılaştırıldıklarında MS ve B5 vitaminlerinin sürgün sayısı üzerinde önemli bir etkisi gözlenmezken Galzy vitaminleri sürgün sayısını önemli ölçüde arttırmıştır. ½ MS (2.5, s.s/fide) ve ½ MS/B5 (2.6, s.s/fide) ortamlarındaki sürgün sayısı da MS (1.8, s.s/fide) ve MS/B5 (2.0, s.s/fide) ortamlarından daha yüksektir. Ortamdaki tuz konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısında bir düşüş gözlenmiş ve MS ve B5 vitaminleri de sürgün sayısı üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. Fide başına ortalama en yüksek yan kök sayısı ¼ MS/Galzy (6.3, k.s/fide) ortamından elde edilmesine rağmen ¼ MS (6.0, k.s/fide) ve ¼ MS/B5 (5.8, k.s/fide) ortamlarındaki yan kök sayısı ¼ MS/Galzy ortamına göre çok az düşüş göstermiştir. Makro ve mikro tuz konsantrasyonları aynı vitamin içerikleri farklı olan bu ortamlar karşılaştırıldıklarında Galzy vitaminlerinin MS ve B5

vitaminlerine göre yan kök sayısı üzerine bir etkisi olduğunu ama bu etkinin çok fazla olmadığını söyleyebiliriz. $\frac{1}{2}$ MS (3.6, k.s/fide) ve $\frac{1}{2}$ MS/B5(3.8, k.s/fide) ortamlarındaki yan kök sayısı da MS (1.6, k.s/fide) ve MS/B5(1.6, k.s/fide) ortamlarından daha yüksektir. Ortamdaki tuz konsantrasyonu arttıkça yan kök sayısında bir düşüş gözlenmiş ve MS ve B5 vitaminleri de yan kök sayısı üzerinde önemli bir etki göstermemiştir.

Fide başına ortalama en yüksek sürgün uzunluğu $\frac{1}{4}$ MS/Galzy (3.3, s.u/fide) ortamından elde edilmiştir. $\frac{1}{4}$ MS (3.0, s.u/fide) ve $\frac{1}{4}$ MS/B5 (2.9, s.u/fide) ortamlarındaki sürgün uzunluğu $\frac{1}{4}$ MS/Galzy ortamına göre çok az düşüş göstermiştir. Galzy vitaminleri MS ve B5 vitaminlerine göre sürgün uzunluğu üzerine azda olsa belirli bir etkiye sahiptir. $\frac{1}{2}$ MS (2.2, s.u/fide), $\frac{1}{2}$ MS/B5 (2.2, s.u/fide) MS (2.1, s.u/fide) ve MS/B5 (2.2, s.u/fide) ortamlarındaki sürgün uzunlukları bakımından bir fark gözlenmemiştir. Sadece ortamdaki makro elementler 4 kat azaltılınca sürgün uzunluğunda istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. MS ve B5 vitaminleri de sürgün uzunlukları üzerinde önemli bir etki göstermemiştir.

MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS, MS/B5, $\frac{1}{2}$ MS/B5, $\frac{1}{4}$ MS/B5, $\frac{1}{4}$ MS/Galzy ortamları arasında kök uzunluğu bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Sürgün başına ortalama en yüksek yaprak sayısı $\frac{1}{4}$ MS/Galzy (12.6, y.s/sürgün) ortamından elde edilmiştir. $\frac{1}{4}$ MS (11.8, y.s/sürgün) ve $\frac{1}{4}$ MS/B5 (11.5, y.s/sürgün) ortamlarındaki sürgün sayısı $\frac{1}{4}$ MS/Galzy ortamına göre daha düşüktür. Makro ve mikro tuz konsantrasyonları aynı vitamin içerikleri farklı olan bu ortamlar karşılaştırıldıklarında, MS ve B5 vitaminlerinin yaprak sayısı üzerinde önemli bir etkisi gözlenmezken Galzy vitaminleri yaprak sayısını azda olsa arttırmıştır. $\frac{1}{2}$ MS (9.8, y.s/sürgün), $\frac{1}{2}$ MS/B5 (10, y.s/sürgün) MS (9.5, y.s/sürgün) ve MS/B5 (9.6, y.s/sürgün) ortamlarındaki sürgün uzunlukları bakımından bir fark gözlenmemiştir. Sadece ortamdaki makro elementler 4 kat azaltılınca sürgün uzunluğunda istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. MS ve B5 vitaminleri de sürgün uzunlukları üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. $\frac{1}{4}$ MS/Galzy ortamı fide başına ortalama sürgün sayısı, ortalama yan kök sayısı, ortalama sürgün uzunluğu ve sürgün başına ortalama yaprak sayısı bakımından en uygun fide gelişim ortamı olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Genel olarak kök uzunlukları dışında artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak fide gelişimi

olumsuz yönde etkilenmiştir. Dolayısıyla $\frac{1}{4}$ MS ortamındaki fidelerdeki gelişim (Şekil 4.2) MS ortamına (Şekil 4.3) göre çok daha iyi sonuçlar vermiştir. MS ve B5 vitaminlerinin arasında fide gelişimi bakımından anlamlı bir fark gözlenmemiş, Galzy vitaminleri ise fide gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Galzy vitaminleri MS ve B5 vitaminlerinde farklı olarak özellikle biotin ve Ca-pentatonat içeriği ile öne çıkmaktadır. Normal bitkiler büyüme ve gelişme için vitaminleri sentezlerler (Chawla, 2002). Bununla birlikte *in vitro*'da büyüyen bitki hücreleri gerekli vitaminleri yalnızca optimal miktarın altında sentezlebilirler; bu yüzden kültür ortamı sıklıkla büyümeyi arttırmak için vitaminlerle desteklenmektedir (Al-Khayri, 2001).

Mineraller kültür ortamlarının önemli bileşenleridir ve ortamların makro ve mikro tuz karışımlarının kombinasyonları için çok sayıda seçenek vardır (Fadel vd., 2010). MS ortamı diğer ortam tipleri ile karşılaştırıldığında yüksek tuz içeriğine sahiptir (özellikle potasyum ve nitrat tuzları bakımından) ve yaygın olarak doku kültüre çalışmalarında kültür ortamı olarak kullanılmaktadır (Beyl, 2005). Yüksek tuz içeriğinden dolayı bu besi ortamı *in vitro* bitkiciklerin ya da eksplantların gelişimi ve büyümesi için her zaman en uygun bir ortam olmayabilir. Tuz stresi bitki büyümesini fizyolojik açılardan etkilemektedir. Sürgün büyümesi ve kuru madde tuzluluk ile azalmakta ve kök:sürgün oranı artabilmektedir (Rahman vd., 2008). Mccue ve Hanson'a (1990) göre sürgün büyümesi, büyüme noktalarında hücre bölünmesi ve büyümesi üzerine tuzun inhibitör etkilerinden dolayı tuzlulukla azalmaktadır (Kaymakanova, 2009). Tuzlulukla bitki büyümesinin inhibisyonu, iyonların inhibitör etkisine bağlı olabilir ya da yüksek tuzluluk bitki tarafından su alınımının yavaşlamasına neden olarak kök ve sürgün uzamasını inhibe edebilir (Werner ve Finkelstein, 1995; Jamil, 2006). Ebrahim vd., (2007) *Coffea arabica* L. üç çeşidine ait tohumları MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS ve agar ortamlarında çimlendirerek çimlenme yüzdelerini ve fide gelişimlerini karşılaştırmıştır. MS ortamından agar ortamına doğru orantılı olarak çimlenme yüzdesinin ve hipokotil ve kök uzunluğunun arttığını belirtmiştir. Bizim çalışmamızda makro tuz konsantrasyonları bakımından kök uzunluğunda istatistiki olarak anlamlı bir fark olmamıştır. Fakat kök sayıları, sürgün uzunlukları, sürgün sayıları ve yaprak sayıları bakımından anlamlı bir fark meydana gelmiştir. Makro tuz konsantrasyonu özellikle sürgün ve kök sayısı üzerinde daha etkili olmuştur.



Şekil 4.1. ¼ MS/Galzy ortamında yetişen 8 haftalık fide



Şekil 4.2. ¼ MS ortamında yetişen 8 haftalık fide



Şekil 4.3. MS ortamında yetişen 8 haftalık fide

4.2. Bitkisel Materyalin Hazırlanması ve *In Vitro* Kültürler

4.2.1. Bitkisel Materyallerin Sterilizasyonu

Yaprak eksplantları için uygun bir sterilizasyon yöntemi belirlenmesi kontaminasyon kaynaklı besi ortamı ve eksplant kaybını engellemek için oldukça önemli bir aşamadır. Kullanılan sterilizant konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça eksplantların zarar görmesi ve rejeneratif potansiyelini kaybetmesi olasılığında artmaktadır. Bunun için sterilizasyonu sağlayacak minimum sterilizant konsantrasyonu ve minimum sterilizasyon süresinin tespit edilmesi gerekmektedir. *H. adenotrichum* yaprak eksplantları için yapılan denemelerde sterilizasyon için en iyi yöntemin 30 saniye % 70' lik etil alkol ve 5 dakika 1-2 damla tween 80 ilaveli % 2.25 'lik NaOCl (sodyum hipoklorit) uygulaması ardından 3 kez steril distile su ile durulanması olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Farklı uygulamalara maruz bırakılan tohumların PDA ortamındaki kontaminasyon yüzdeleri

Uygulama süresi (dk)	%70'lik Etil Alkol (30 saniye)			
	% 4.5 'lik NaOCl	%2.25'lik NaOCl	% 1.5'lik NaOCl	% 1.125'lik NaOCl
2.5	% 75	% 100	% 100	% 100
5	% 0	% 0	% 50	% 100
7.5	% 0	% 0	% 35	% 80
10	% 0	% 0	% 25	% 75

4.2.2. Kültüre Edilen Eksplantların Verdikleri *In Vitro* Cevaplar

4.2.2.1. Kallus oluşumu

BA, KIN, TDZ, NAA ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan *H. adenotrichum*'un yaprak eksplantlarında kallus indüksiyon oranına ait farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kallus indüksiyon ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonlarının kallus indüksiyon oranına etkileri istatistiki anlamda önemli bulunmuştur. *H. adenotrichum*'un yaprak eksplantları, 2,4-D ve NAA'nın tek başına kullanıldığı MS temel besi ortamlarında, bu bitki büyüme düzenleyicilerinin hiçbir konsantrasyonuna cevap vermemişlerdir. KIN'nin farklı konsantrasyonlarda tek başına ilave edildiği MS temel besi ortamlarında, eksplantlardan kallus indüksiyonu gözlenmemiştir.

BA'nın tek başına kullanıldığı ortamlarda, eksplantlardan kallus indüksiyonunu sağlanmıştır (Şekil 4.4). Eksplantlar 3 mg/L BA (%80) içeren ortamlarda en yüksek kallus indüksiyon oranına sahiptir (Çizelge 4.11). 3 mg/L'den düşük ve yüksek BA konsantrasyonlarında kallus indüksiyon oranının düştüğü görülmektedir (Şekil 4.5).

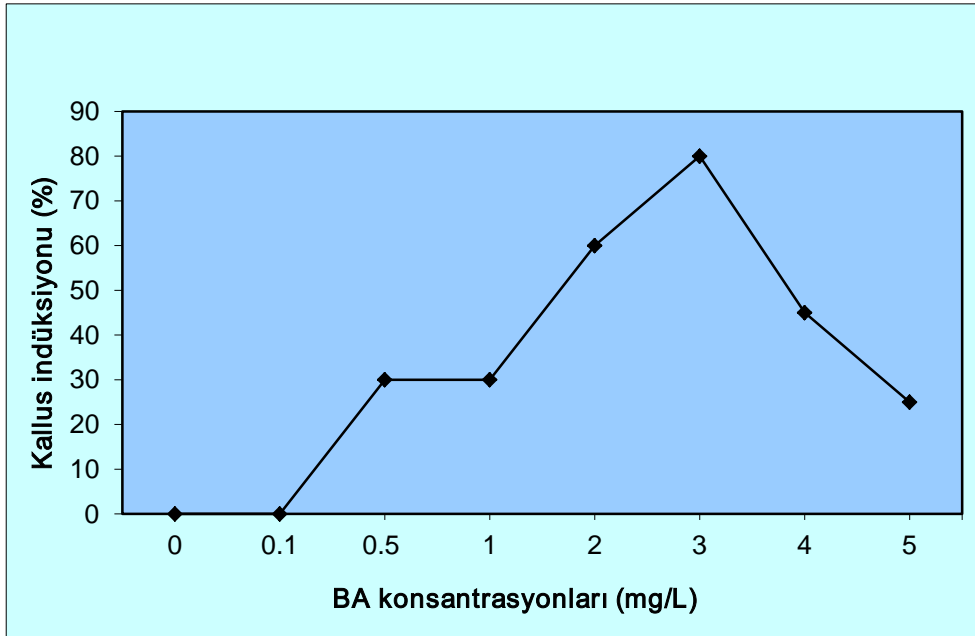
Çizelge 4.11. Farklı BA konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan *H.adenotrichum*'un yaprak eksplantlarına ait kallus indüksiyon oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)	Kallus indüksiyon (%)
0 (kontrol)	0 ^{d*}
0.1 BA	0 ^d
0.5 BA	30 ^c
1 BA	30 ^c
2 BA	60 ^b
3 BA	80 ^a
4 BA	45 ^{bc}
5 BA	25 ^c

* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.4. 3 mg/L BA içeren MS ortamında yaprak eksplantından kallus oluşumu



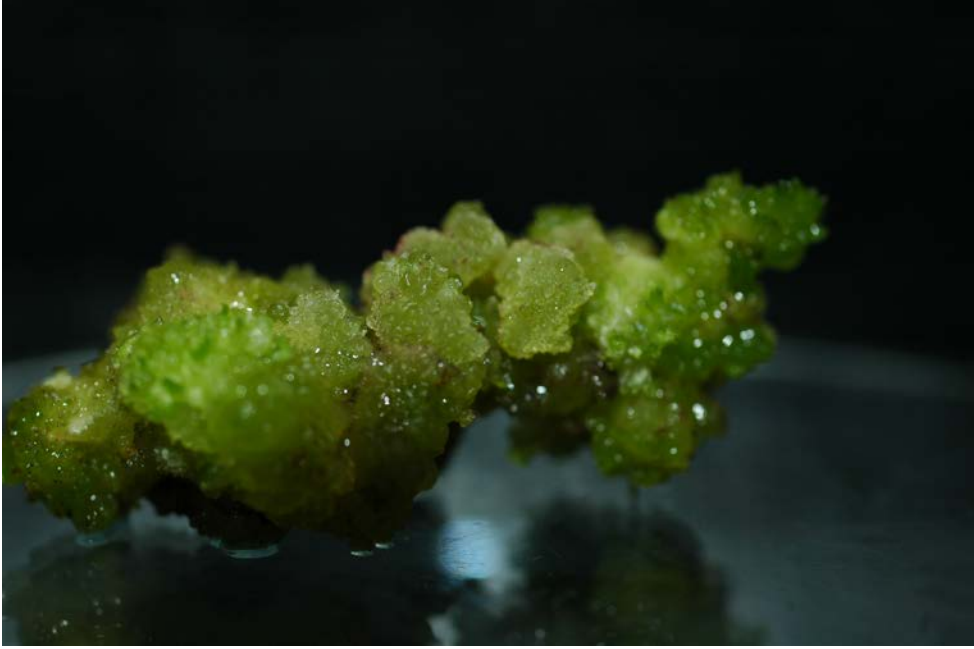
Şekil 4.5. BA konsantrasyonlarına göre değişen kallus indüksiyon oranları

TDZ'nin farklı konsantrasyonlarda tek başına ilave edildiği MS besi ortamlarında, eksplantlardan kallus indüksiyonu sağlanmıştır (Şekil 4.6). TDZ içeren ortamlarda kültüre edilen eksplantlarda artan TDZ konsantrasyonuna bağlı olarak kallus indüksiyon oranının arttığı görülmektedir (Şekil 4.7). 1 mg/L TDZ (%90) en yüksek kallus indüksiyon oranına sahiptir. Fakat 1 mg/L TDZ (%90) ve 0.5 mg/L TDZ (%80) konsantrasyonları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.12).

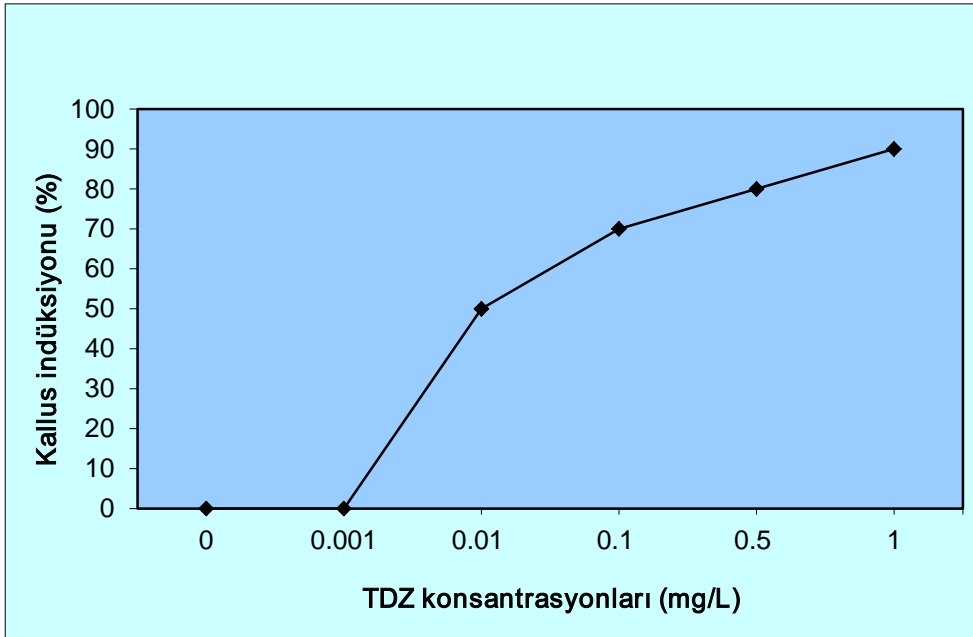
Çizelge 4.12. Farklı TDZ konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan *H.adenotrichum*'un yaprak eksplantlarına ait kallus indüksiyon oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)	Kallus indüksiyonu (%)
0 (kontrol)	0 ^{d*}
0.001 TDZ	0 ^d
0.01 TDZ	50 ^{bc}
0.1 TDZ	70 ^{ab}
0.5 TDZ	80 ^a
1 TDZ	90 ^a

* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.6. 1 mg/L TDZ içeren MS ortamında yaprak eksplantından kallus oluşumu



Şekil 4.7. TDZ konsantrasyonlarına göre değişen kallus indüksiyon oranları

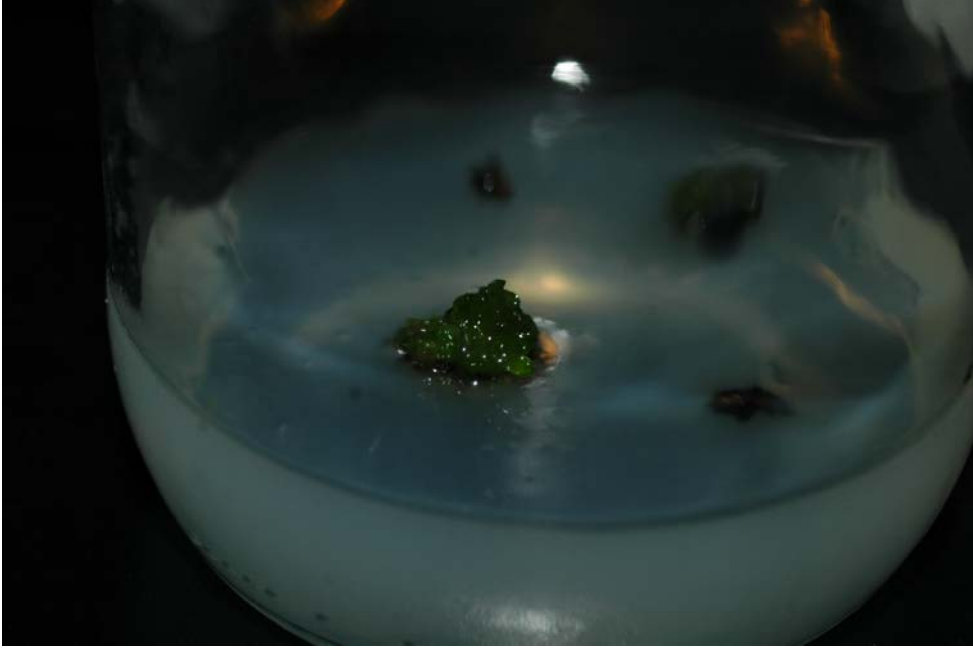
BA ve KIN'in farklı konsantrasyonlarının, NAA'nın 0.2 mg/L'lik konsantrasyonu ile kombineli olarak kullanıldığı MS ortamlarına aktarılan eksplantlardan kalluslar elde edilmiştir. BA ve KIN'nin farklı konsantrasyonları, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4 mg/L NAA ile birlikte kullanıldıklarında ise eksplantlardan önemsenecek düzeyde kallus indüksiyonu gözlenmemiştir.

KIN'in tek başına kullanıldığı ortamlarda kallus indüksiyonu gözlenmezken, 0.2 mg/L NAA ile birlikte kullanıldığı ortamlarda NAA'nın etkisine bağlı olarak kallus indüksiyonu gözlenmiştir (Şekil 4.8). KIN içeren ortamlarda en yüksek kallus indüksiyon oranı 2 mg/L KIN + 0.2 mg/L NAA (%80) içeren ortamda gözlenmiştir (Çizelge 4.13). 2 mg/L KIN'in üzerindeki konsantrasyonlarda kallus indüksiyon oranı düşüş göstermiştir (Şekil 4.9).

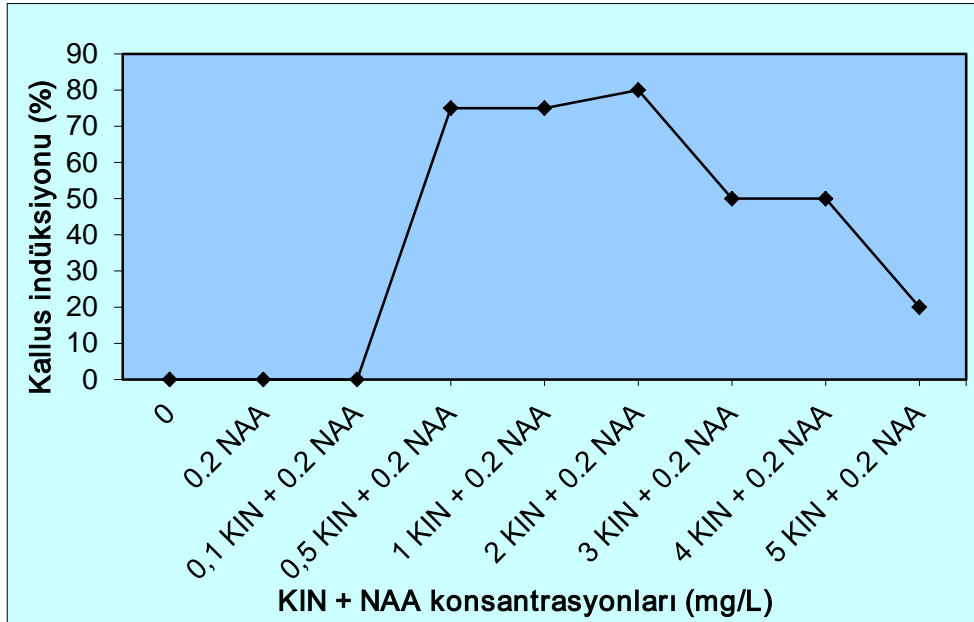
Çizelge 4.13. Farklı KIN ve NAA konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan *H.adenotrichum*'un yaprak eksplantlarına ait kallus indüksiyon oranları

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)	Kallus indüksiyonu (%)
0	0 ^{f*}
0.2 NAA	0 ^f
0.1 KIN + 0.2 NAA	0 ^f
0.5 KIN + 0.2 NAA	75 ^{ab}
1 KIN + 0.2 NAA	75 ^{ab}
2 KIN + 0.2 NAA	80 ^a
3 KIN + 0.2 NAA	50 ^{bc}
4 KIN + 0.2 NAA	50 ^{bc}
5 KIN + 0.2 NAA	20 ^{de}

* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.8. 2 mg/L KIN + 0.2 mg/L NAA içeren MS ortamında yaprak eksplantından kallus oluşumu



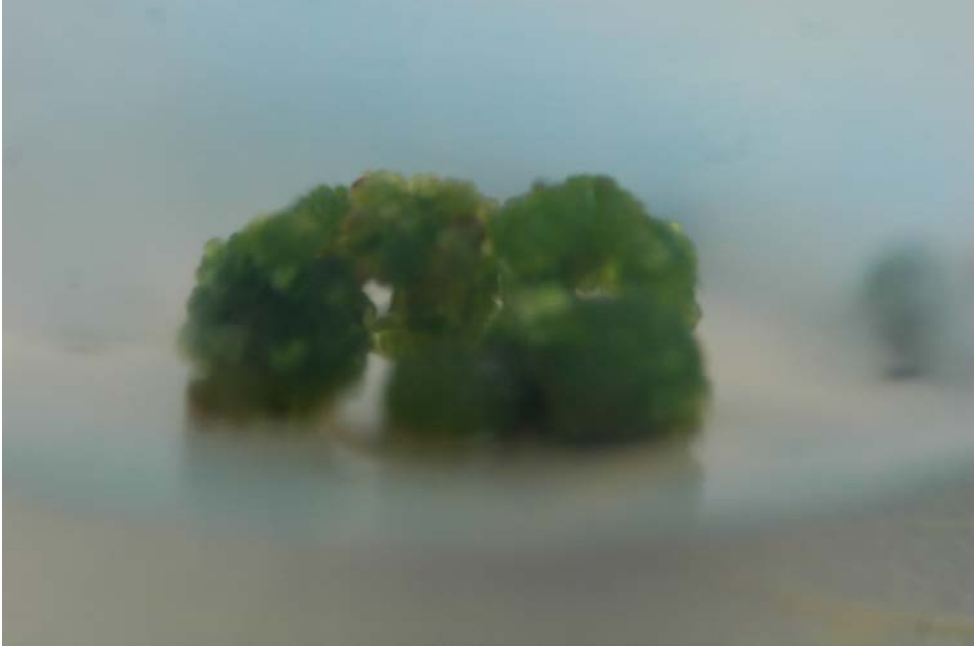
Şekil 4.9. KIN + NAA konsantrasyonlarına göre değişen kallus indüksiyon oranları

BA tek başına kullanıldığında kallus indüksiyonu gözlemlendiği gibi NAA ile birlikte kullanıldığında da kallus indüksiyonunu sağlamıştır (Şekil 4.10). En yüksek kallus indüksiyon oranına 4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA (%95) içeren MS ortamında kültüre edilen eksplantların sahip olduğu görülmüştür. Fakat istatistikî anlamda, 5 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA (%90), 4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA (%95) bitki büyüme düzenleyicileri arasında kallus indüksiyon oranı bakımında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.14). BA'nın 0.2 mg/L NAA ile birlikte kullanıldığı ortamlarda NAA'nın etkisine bağlı olarak, artan BA konsantrasyonuna göre kallus indüksiyon oranında artış gözlenmiştir (Şekil 4.11).

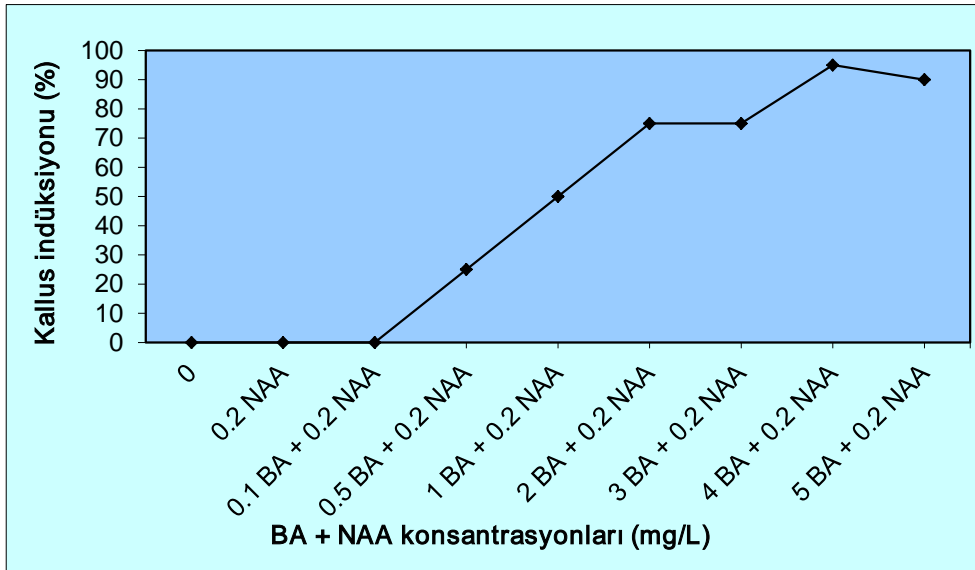
Çizelge 4.14. Farklı BA ve NAA konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan *H. adenotrichum*'un yaprak eksplantlarına ait kallus indüksiyon oranları.

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)	Kallus indüksiyon (%)
0	0 ^{e*}
0.2 NAA	0 ^e
0.1 BA + 0.2 NAA	0 ^e
0.5 BA + 0.2 NAA	25 ^{cd}
1 BA + 0.2 NAA	50 ^{bc}
2 BA + 0.2 NAA	75 ^{ab}
3 BA + 0.2 NAA	75 ^{ab}
4 BA + 0.2 NAA	95 ^a
5 BA + 0.2 NAA	90 ^a

* Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.10. 4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA içeren MS ortamında yaprak eksplantından kallus oluşumu



Şekil 4.11. BA + NAA konsantrasyonlarına göre değişen kallus indüksiyon oranları

TDZ'nin farklı konsantrasyonları, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4 mg/L NAA ile birlikte kullanıldığında önemsenecek düzeyde kallus indüksiyonu gözlenmemiştir.

Kallus oluşturan ortamlar beraber değerlendirildiğinde, en yüksek kallus indüksiyon oranına 4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA (%95) içeren MS ortamında kültüre edilen eksplantların sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Farklı büyüme düzenleyicisi konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan *H.adenotrichum*'un yaprak eksplantlarına ait en yüksek kallus indüksiyon oranına sahip ortamların karşılaştırılması

Bitki Büyüme Düzenleyicileri (mg/L)	Kallus indüksiyonu (%)
4 BA + 0.2 NAA	95 ^{a*}
3 BA	80 ^b
2 KIN + 0.2 NAA	80 ^b
1 TDZ	90 ^{ab}

*Aynı sütun içinde benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

Kallus dokuları, kontrollü şartlar altında kolay bir şekilde bakılabilmeleri ve hızlı çoğalmalarından dolayı bitki doku kültüründe çeşitli uygulama alanlarına sahiptirler. Hücre süspansiyon kültürleri genellikle kallus dokularından başlatılmaktadır ve kallus dokuları organogenez ya da somatik embriyogenez aracılığı ile bitki rejenerasyonu için de ara aşama olarak kullanılmaktadır. Organogenik kallus dokuları adventif sürgün oluşumuna yol açabilir ve bu süreç indirekt organogenez olarak bilinmektedir (Nunez-Palenius vd., 2005).

Kallus ve hücre kültürleri rejenerasyon ya da çoğaltım amaçları (organogenez, somatik organogenez) için, fizyolojik, biyokimyasal (sekonder metabolit üretimi, stres), genetik çalışmalar için, somaklonal varyasyonları içeren (*in vitro*

seleksiyon, mutasyon) çalışmalar için ve germplazmın korunması için kullanılabilir (Rugini ve Gutierrez-Pesce, 2003).

Her kallus dokusu organogenik ya da embriyogenik bir potansiyele sahip değildir; bu yüzden bir kallus dokusundan bitki rejenerasyonu her zaman mümkün değildir ve bu durum çoğunlukla kallus hücrelerinde meydana gelen genetik ve epigenetik varyasyonlara bağlıdır. Kallus dokuları kullanılarak, orjinal bitki materyalinden fenotipik olarak farklı olan bitkileri rejenere etmek mümkündür. Bu durum bazı türlerin doğal genetik çeşitliliğinin kısıtlandığı yetiştirme programlarında kullanılabilir (Nunez-Palenius vd., 2005).

Hypericum türlerinde eksplant kaynağı olarak yaprakların kullanıldığı çalışmalarda (Pretto ve Santarem, 2000; Li vd., 2000; Bezo ve Stefunova, 2001; Bais vd., 2002; Wojcik ve Podstolski, 2007) farklı tipte ve derişimlerde oksin ve sitokininlerle desteklenmiş farklı besi ortamlarında kallus oluşumu sağlanmıştır. Pretto ve Santarem (2000) ve Bais vd., (2002) *H. perforatum* yaprak eksplantlarından 2,4-D ve BA ya da 2,4-D ve KIN içeren ortamlarda kalluslar elde etmişlerdir. *H. mysorensense*'nin nodal eksplantları ile yapılan *in vitro* kültür çalışmalarında yüksek konsantrasyonda BA'nın (2.0-3.0 mg/L) kallus oluşumunu teşvik etmiş ve sürgün çoğalmasını azaltmıştır (Shiplashree ve Rai, 2009). Benzer sonuçlar *H. perforatum*'un apikal segmentlerinin kültürü için de gözlenmiştir (Gadzovska vd., 2005). Bizim yaptığımız çalışmada BA tek başına ya da NAA ile birlikte kullanıldığında yaprak eksplantlarından kallus oluşumu elde edilmiş, KIN ise ancak NAA ile birlikte kullanıldığında kallus indüksiyonu sağlanmıştır. 2,4-D ile yapılan kombinasyonlarda önemsenecek düzeyde kallus indüksiyonu gözlenmemiştir. NAA ve 2,4-D tek başına kullanıldıkları ortamlarda da kallus indüksiyonu elde edilememiştir. Bizim sonuçlarımızla da uyuşacak şekilde Pretto ve Santarem (2000), yalnızca büyüme düzenleyici olarak 2,4-D varlığında yaprak eksplantlarının kültürünün kallus oluşumu ile sonuçlanmadığını ve kültürden 3 hafta sonra ekplantların nekrozise uğradığını rapor etmiştir. Buna karşın Li vd., (2000), *H. perforatum*'da kallus indüksiyonu için en iyi ortamın 2,4-D (1 mg/L) and NAA (1 mg/L) içeren ortamlar olduğunu belirtmiştir. *H. brasiliense* nodal eksplantları kullanılarak yapılan çalışmada, çeşitli oksin konsantrasyonları denenmiş ve en iyi kallus indüksiyonunun 2,4-D ya da NAA içeren MS ya da B5 ortamlarında gerçekleştiği rapor edilmiştir (Cardoso ve Oliveira, 1996). *H. perforatum* olgun bitkilerinin nodal segmentleri, 4.5 µM BA, kinetin, TDZ tek

başına ya da 0.05 μ M NAA ile kombinasyonları ile içeren MS ortamlarında kültüre edilmiştir. Organogenik cevap yanında, kallus oluşumu, TDZ, NAA ya da her ikisinin kombinasyonunda kültüre edilen eksplantlarda gözlenmiştir (sırasıyla % 65.4, % 60.7 ve % 57.7). Test edilen diğer ortamlarda kallus oluşumu indüklenmemiştir (Santarem ve Astarita 2003). Bizim yaptığımız çalışmada ise yaprak eksplantlarından TDZ içeren ortamlarda sadece kallus indüksiyonu gözlenmiştir. TDZ'nin NAA ile kombinasyonunda ise önemli düzeyde kallus indüksiyonu gözlenmemiştir.

4.2.2.2. İndirekt adventif sürgün rejenerasyonu

Kalluslardan sürgün rejenerasyonunu teşvik etmek amacıyla, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 ve 4 mg/L KIN ve 0.1, 0.5, 1, 2, 3 ve 4 mg/L BA içeren MS ortamları ile hormonsuz temel MS ortamları denenmiştir. Kallus indüksiyonunda kullanılan büyüme düzenleyicilerin tip ve konsantrasyonuna bağlı olarak kallustan sürgün rejenerasyon cevapları farklılık göstermiştir (Çizelge 4.16). TDZ içeren ortamlardan elde edilen kallusların sürgün rejenerasyon ortamlarına aktarılması ile sürgün tomurcukları oluşmuş fakat bu sürgün tomurcuklarından sağlıklı sürgünler elde edilememiştir (hiperhidrik sürgün oluşumu). BA + NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin teşviki ile *H. adenotrichum*'un yaprak eksplantlarından oluşan kalluslar, kullanılan hiçbir ortamda sürgün oluşturamamışlardır. KIN + NAA kombinasyonunun teşvik ettiği kalluslardan sürgün tomurcukları oluşmuş fakat bu tomurcuklardan önemsenecek düzeyde sürgün elde edilememiştir. BA'nın tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarından elde edilen kalluslardan hormon içermeyen temel MS, 0.1mg/L BA, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 ve 4 mg/L KIN içeren ortamlardan sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. BA'lı ortamlardan elde edilen kalluslardan, en iyi kallus başına ortalama sürgün sayısı, kallusların 0.5 mg/L KIN içeren MS besi ortamında kültüre edilmesi ile elde edilmiştir (Çizelge 4.17). Ayrıca kallus indüksiyon ortamında kullanılan BA konsantrasyonlarının da kallus başına sürgün sayısı üzerine önemli etkileri olmuştur. En fazla kallus başına sürgün sayısı 3 mg/L BA'dan (35.6) elde edilen kallusların, 0.5 mg/L KIN içeren ortamlarda kültüre edilmesi ile elde edilmiştir (Şekil 4.12). Ortalama boyu yaklaşık 1.0 cm olan sürgünler (Şekil 4.13) boylarının uzaması için hormonsuz MS ortamına aktarılmıştır. MS ortamında, 2 hafta sonra ortalama sürgün boyu yaklaşık 3.0 cm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.14).

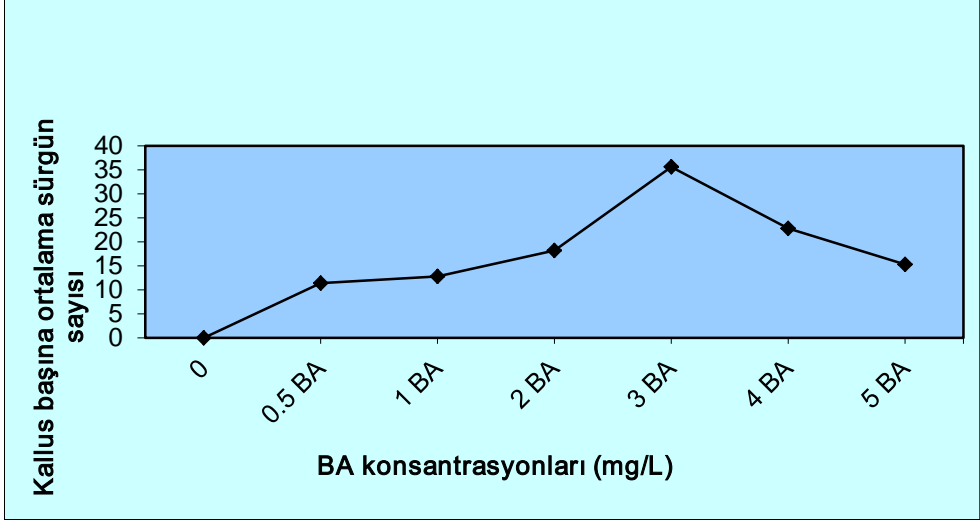
Çizelge 4.16. Kallus indüksiyonunda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerine göre sürgün indüksiyon cevapları

Kallus indüksiyonunda kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (mg/L)	Adventif sürgün cevapları
TDZ kallusları	Sürgün tomurcukları var Düşük oranda anormal sürgün oluşumu
BA + NAA kallusları	Sürgün rejenerasyonu yok
KIN + NAA kallusları	Düşük oranda sürgün rejenerasyonu
BA kallusları	Yüksek sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.17. Kalluslardan, 0.5 mg/L KIN içeren MS besi ortamlarında sürgün indüksiyonu

Kallus indüksiyon aşamasında kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (mg/L)	Kallus Başına Sürgün Sayısı
0.0 (Kontrol)	0 ^{e*}
0.5 BA	11.4 ^d
1 BA	12.8 ^{cd}
2 BA	18.2 ^{bc}
3 BA	35.6 ^a
4 BA	22.8 ^b
5 BA	15.3 ^{cd}

*Benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.12. 0.5 mg/L KIN içeren MS besi ortamlarında kallus indüksiyon aşamasında kullanılan BA konsantrasyonlarına göre değişen sürgün indüksiyon oranları



Şekil 4.13. 3 mg/L BA'dan elde edilen kalluslardan, 0.5 mg/L KIN içeren ortamlarda sürgün indüksiyonu



Şekil 4.14. Ortalama boyu yaklaşık 1.0 cm olan sürgünlerin hormonsuz MS ortamına aktarıldıktan 2 hafta sonraki görüntüsü

Pretto ve Santarem (2000), *H. perforatum* yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslarda, kallus başına en yüksek sürgün sayısının 4.6 μM kinetin ve 0.45 μM 2,4-D ilaveli ortamlar üzerinde indüklenen kallusların, 4.4 μM BA içeren MS ortamlarında kültüre alınmasından elde edildiğini rapor etmişlerdir. Çırak, (2006) gövde segmentlerinden farklı konsantrasyonlarda BA, 2,4-D ve KİN içeren ortamlardan elde ettikleri kalusların, *H. perforatum* için 1 mg/l BA, *H. bupleuroides* için ise 2 mg/l BA ile desteklenmiş MS besi ortamlarında alt kültüre alındıklarında yoğun bir sürgün gelişimi sergilediklerini rapor etmişlerdir. *H. perforatum* için benzer sonuçlar yine KİN ve 2,4-D'den elde edilen kalluslar içinde bildirilmiştir (Ayan vd., 2005). Ayrıca *H. perforatum*'da kalluslardan sürgün oluşumu IAA ve BA ile desteklenmiş ortamlarda üzerinde gözlemlenmiştir. Bir aylık kültür periyodundan sonra yaprak eksplantı başına ortalama 35 sürgün elde edilmiştir (Wojcik ve Podstolski, 2007). *H. perforatum*'un anterlerinden elde edilen kalluslar BA ve NAA kullanılarak sürgün oluşumu indüklenmiştir (Kirakosyan vd., 2000). *H. perforatum* ile ilgili yapılan çalışmalarda kallustan sürgün indüksiyonu için sitokinin olarak özellikle BA'nın daha etkili olduğu görülmektedir. Bizim *H. adenotrichum* yaprak eksplantları

yaptığımız çalışmada düşük konsantrasyonda BA (0.1 mg/L) az sayıda sürgün oluşumunu indüklemesine rağmen yoğun sürgün oluşumu KIN ile başarılmıştır.

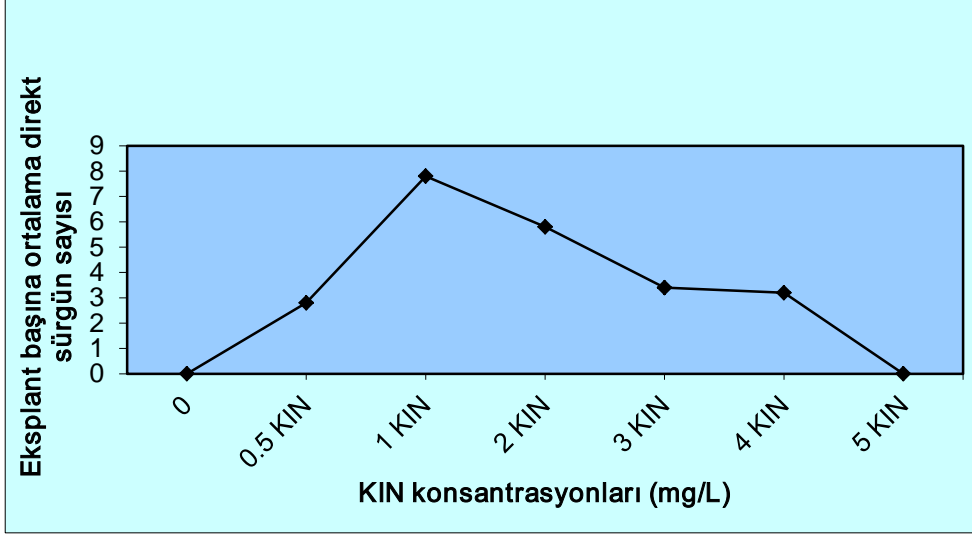
4.2.2.3. Direkt adventif sürgün rejenerasyonu

H. adenotrichum'un yaprak eksplantları, KIN'in tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarında, bir kallus aşaması olmaksızın, önce sürgün tomurcukları sonra bu tomurcuklardan sürgün oluşturmuşlardır. Farklı KIN konsantrasyonlarının eksplant başına direkt sürgün sayısı üzerine etkileri istatistikî anlamda önemli bulunmuştur (Çizelge 4.18). Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 1 mg/L KIN içeren MS ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.15). Yaprak eksplantlarından direkt olarak indüklenen sürgünlerin ortalama boyu 2.8 cm dir (Şekil 4.16).

Çizelge 4.18. Farklı KIN konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında eksplant başına direkt sürgün sayısına ait ortalamalar

Bitki büyüme düzenleyicileri (mg/L)	Eksplant başına sürgün sayısı
0.0 (Kontrol)	0 ^d *
0.5 KIN	2.8 ^c
1 KIN	7.8 ^a
2 KIN	5.8 ^b
3 KIN	3.4 ^c
4 KIN	3.2 ^c
5 KIN	0 ^d

*Benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p < 0.05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.15. KIN konsantrasyonlarına göre değişen sürgün induksiyonu



Şekil 4.16. 1 mg/L KIN içeren MS ortamında yapraktan direkt sürgün induksiyonu

H. perforatum'da *de novo* sürgün organogenezini NAA ile birlikte ya da tek başına sitokinin (BA, KIN, TDZ) içeren ortamda kültüre edilen nodal segmentlerden

indüklenmiştir. Nodal segmentler üzerinde indüklenen sürgünlerin sayısı sitokinin tipi ile değişmiştir. BA (16.9 sürgün/eksplant), KIN (20.7 sürgün/eksplant) tek başına kullanıldığında KIN daha yüksek sürgün indüksiyonu sağlarken, NAA ile birlikte kullanıldıklarında BA (40.6 sürgün/eksplant) içeren ortamda sürgün indüksiyonu artmış, KIN (5.5 sürgün/eksplant) içeren ortamda ise düşmüştür (Santarem ve Astarita, 2003). *H.maculatum*'da yine en yüksek ortalama sürgün sayısı NAA ile kombineli BA varlığında nodal eksplantlardan elde edilmiştir (58.6, sürgün/eksplant) (Bacila vd., 2010). *H. foliosum*'da da nodal eksplantlardan en yüksek sürgün sayısı BA ve NAA eş zamanlı olarak kullanıldığında elde edilmiştir (Moura, 1998). Sitokininler arasında TDZ, *H. perforatum* hipokotil kısımlarında *de nova* adventif sürgünlerin indüksiyonunu teşvik etmede BA'dan daha verimli olduğu rapor edilmiştir (Murch vd., 2000). *H. bupleuroides*'in yaprak ve internodal eksplantları 0.1 mg/L BA ve 1.0 mg /L 2,4-D içeren ortamlarda kültüre edildiği zaman eksplant yüzeylerinden direk olarak adventif sürgün tomurcukları oluşmuş ve sürgünler daha sonra uzatılmıştır (Çırak vd, 2007c). Bizim yaptığımız çalışmada *H. adenotrichum*'un yaprak eksplantlarından sadece KIN içeren ortamlarda direkt sürgün rejenerasyonu gerçekleşmiştir.

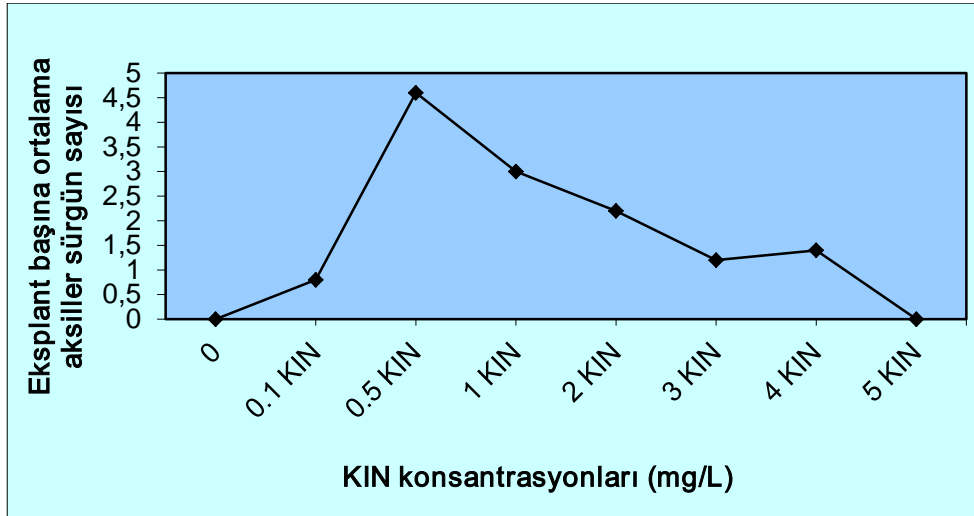
4.2.2.4. Aksiller sürgün rejenerasyonu

Aksiller sürgün çoğaltımı denemeleri için KIN ve BA'nın 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/L konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamı kullanılmıştır. *H. adenotrichum*'un *in vitro* ortamda elde edilmiş direkt ve indirekt sürgünlerinden, KIN'in tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarında, aksiller sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. BA'lı ortamlarda ise herhangi bir aksiller sürgün rejenerasyonu olmamış ve eksplantlar bir iki hafta içerisinde ölmüştür. *H.adenotrichum*'da, farklı KIN konsantrasyonlarının eksplant başına aksiler sürgün sayısına etkileri istatistikî anlamda önemli bulunmuştur (Çizelge 4.19). Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 0.5 mg/L KIN içeren MS ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.17). Çalışmalarda elde edilen aksiller sürgünlerin ortalama boyu 2.5 cm dir (Şekil 4.18).

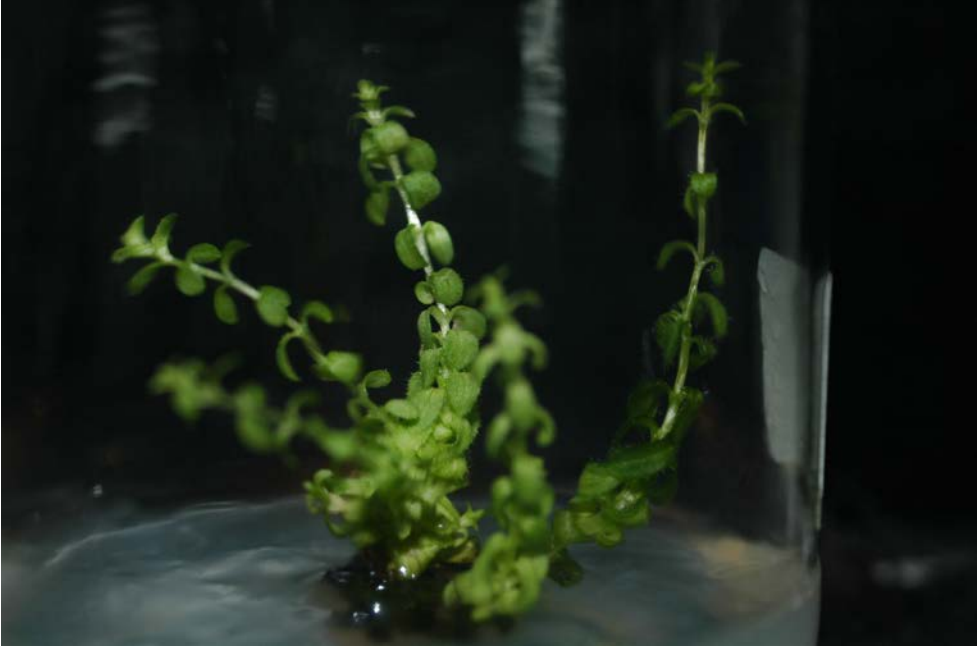
Çizelge 4.19. Farklı KIN konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında eksplant başına aksiller sürgün sayısına ait ortalamalar

Bitki büyüme düzenleyicileri (mg/L)	Eksplant başına sürgün sayısı
0.0 (Kontrol)	0 ^{e*}
0.1 KIN	0.8 ^d
0.5 KIN	4.6 ^a
1 KIN	3.0 ^b
2 KIN	2.2 ^{bc}
3 KIN	1.2 ^{cd}
4 KIN	1.4 ^{cd}
5 KIN	0 ^e

*Benzer harfle gösterilen ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.17. KIN konsantrasyonlarına göre değişen aksiller sürgün induksiyonu

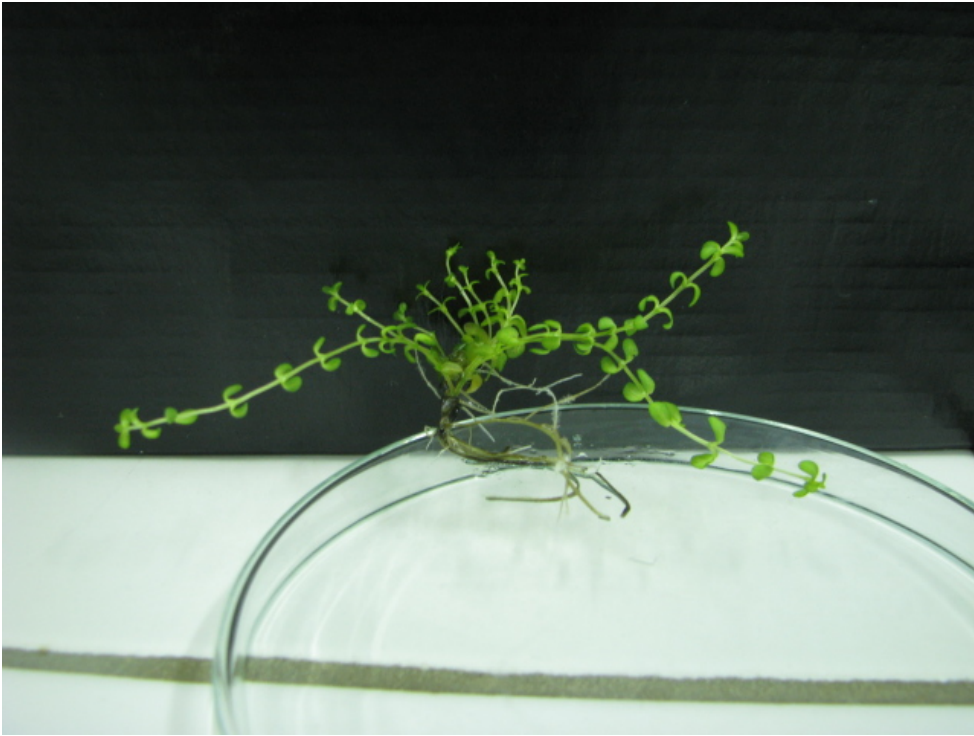


Şekil 4.18. 0.5 mg/L KIN içeren MS ortamında aksiller sürgün indüksiyonu

H. canariense ve *H. foliosum* için sürgün indüksiyonu için en iyi sonuçlar BA ve NAA ile desteklenmiş ortamda kültüre edilen apikal ya da aksiller tomurculardan direkt olarak elde edilmiştir (Mederos, 1991; Moura, 1998). *H. rumeliacum*'un tek-boğum gövde segmentleri 0.3 mg/L BA ile desteklenmiş MS ortamı üzerinde 1.5-2 mm aksiller sürgünler gelişmiş ve 0.3 mg/L BA üzerinde rejenere olan aksiller sürgün yığını 45 günlük bir periyot için 0.2 mg/L BA üzerine transfer edilmesi ile sürgünlerin uzaması sağlanmıştır (Danova vd., 2010). *Hypericum retusum* için kültürler, dokuz farklı BA ve Kinetin konsantrasyonları ile ayrı ayrı desteklenmiş MS ortamı üzerine inokule edilen sürgülerden başlatılmıştır. En yüksek sürgün sayısı 0.5 mg/L BA ilave edilmiş ortamdan elde edilmiştir. Kinetin için kullanılan konsantrasyonlardan en iyi sonuç 1.5 mg/L Kinetin ilave edilmiş ortamda elde edilmiştir (Namlı vd., 2010). Bizim yaptığımız aksiller çoğaltım çalışmalarında BA başarılı olmazken KIN sürgün oluşumunu teşvik etmiştir.

4.2.2.5. Köklenme ile ilgili sonuçlar

Köklendirme denemelerimizde temel MS ve çeşitli konsantrasyonlarda oksin (IAA, IBA) içeren MS ortamlarında düşük oranda kök promordiumları oluşmuş fakat kök gelişimi tamamlanmamıştır. 0.5 mg/L IAA içeren makro $\frac{1}{2}$ MS ve makro $\frac{1}{4}$ MS ortamlarında kültüre edilen aksiller sürgünlerden %25 oranında kök oluşumu gerçekleşmiştir. Makro $\frac{1}{2}$ MS ortamındaki ortalama kök sayısı 4.3 ve kök uzunluğuda 2.5 cm'dir (Şekil 4.19). Makro $\frac{1}{4}$ MS ortamındaki ortalama kök sayısı 6.7 ve kök uzunluğu 2.1'dir. Fide gelişimini karşılaştırdığımızda makro $\frac{1}{4}$ MS ortamındaki köklerin daha zayıf olduğu ve sürgünlerinde nekrozise uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. 0.5 mg/L IAA içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında aksiller sürgünlerden kök induksiyonu



Şekil 4.20. 0.5 mg/L IAA içeren $\frac{1}{4}$ MS ortamında aksiller sürgünlerden kök indüksiyonu

Hypericum'ların birkaç türünde kök oluşumunu indüklemek için büyüme düzenleyicisi olarak IBA, IAA ve NAA oksinleri kullanılmıştır (Pretto ve Santarem, 2000). *H. perforatum*'da özellikle IBA ve IAA kök indüksiyonunda oldukça etkili olmuştur (Cellarova ve Kimakova, 1999; Ayan vd., 2005). *H. perforatum*'da kök oluşumu IBA içeren ya da içermeyen MS ve $\frac{1}{2}$ MS ortamındaki sürgünlerden indüklenmiş ve en yüksek köklenme IBA varlığı dikkate alınmaksızın $\frac{1}{2}$ MS ortamından elde edilmiştir (Pretto ve Santarem, 2000). Wojcik ve Podstolski (2007), yaprak eksplantlarından rejenere edilen sürgünleri, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ya da IAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. *H. maculatum*'da kök sayısı, uzunluğu ve sürgün yüksekliği bakımından en verimli kültür ortamı 1.0 mg/L IAA ilaveli $\frac{1}{2}$ MS ortamı olarak belirlenmiştir. *H. canariensis*'de köklenme IBA ya da NAA'nın varlığında elde edilmesine rağmen (Mederos, 1991), bu büyüme düzenleyicileri *H. foliosum*'un sürgünlerinde köklenmeyi teşvik etmek için etkili olmamıştır (Moura, 1998). Yaptığımız çalışmada MS ortamlarında köklenme ve kök gelişiminin sağlanamaması ortamın iyonik gücü ile ilgili olabilir. Makro $\frac{1}{2}$ MS ve $\frac{1}{4}$ MS ortamlarında 0.5 mg/L IAA ile köklenme sağlansa da köklenme oranı oldukça düşüktür.

4.2.2.6. Köklendirilen Bitkilerin Dış Ortama Alıştırılması

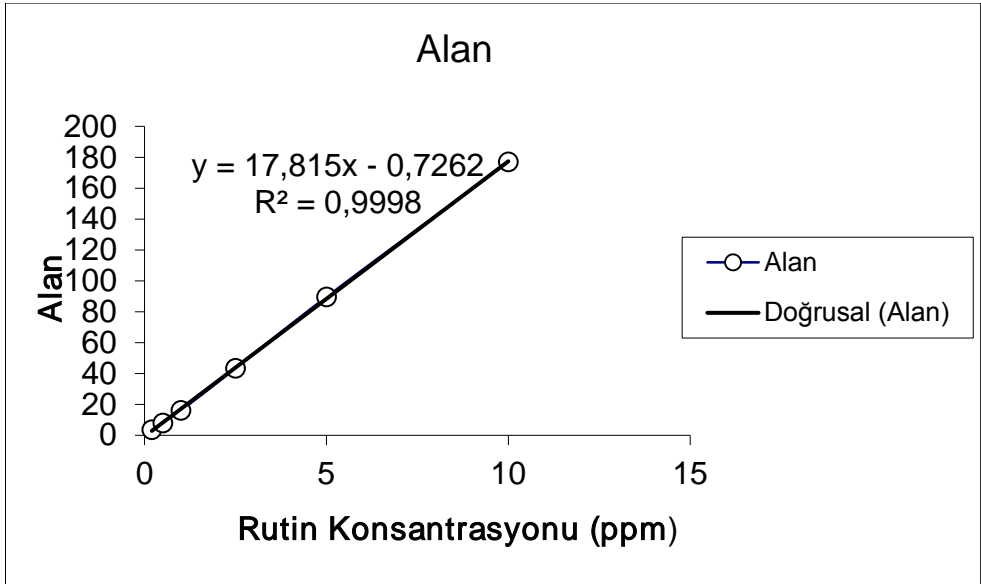
In vitro bitkicikler kök gelişimleri tamamlandığında materyal ve metot bölümünde belirtildiği gibi dış ortama aktarılmıştır. Makro ½ MS ortamında gelişen bitkicikler dış ortam şartlarına başarılı bir şekilde alıştırılırken, makro ¼ MS ortamında gelişen bitkicikler dış ortama alıştıramamıştır.

4.3. Elisitör ve Strese Maruz Bırakılan Fidelerin Sekonder Metabolit İçeriklerinin HPLC Analiz Sonuçları

4.3.1. Standartlara Ait Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi ve Doğru Denkleminin Hesaplanması ile İlgili Sonuçlar

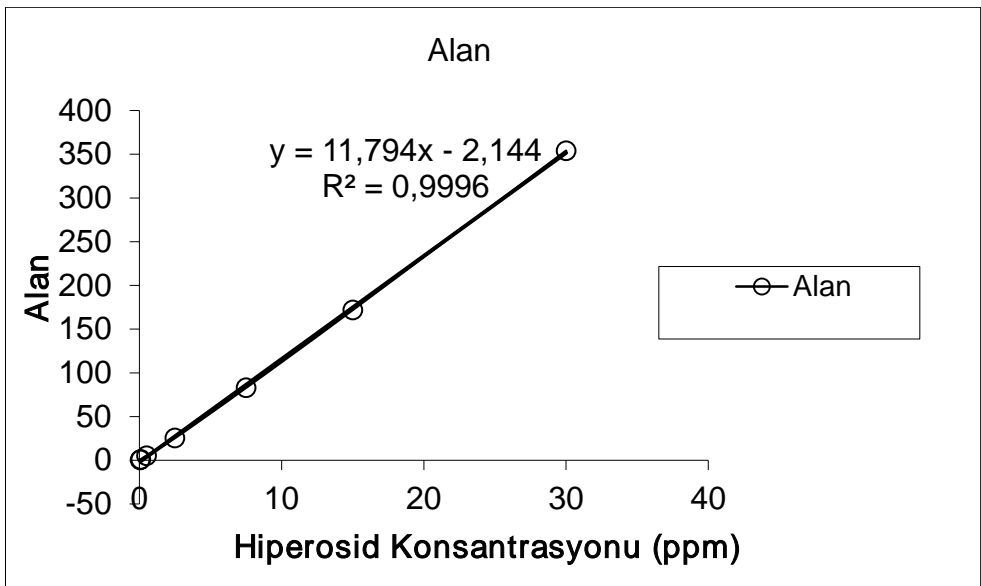
Standart maddeler olan hiperisin, pseudohiperisin, hiperosid, rutin, izokuersitrin ve amentoflavonun *H. adenotrichum in vitro* fidelerindeki miktarlarının tayini için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Standart maddelerin farklı konsantrasyonlarına karşı (x eksen, µg/ml), her bir konsantrasyondaki pik alanları bulunarak (y eksen) kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Her bir bileşik için kalibrasyon aralığının belirlenmesinde, bileşiklerin *H. adenotrichum* ekstraktlarındaki derişimleri dikkate alınmıştır. Doğru denkleminden yararlanılarak analiz edilen bileşiklerin, *H. adenotrichum in vitro* fidelerinde miktarları hesaplanmıştır.

Rutin 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 µg/mL konsantrasyonlarında enjeksiyon yapılmış ve bileşiğe ait kalibrasyon eğrisi, denklemi ve korelasyon katsayısı Şekil 4.21'de verilmiştir.



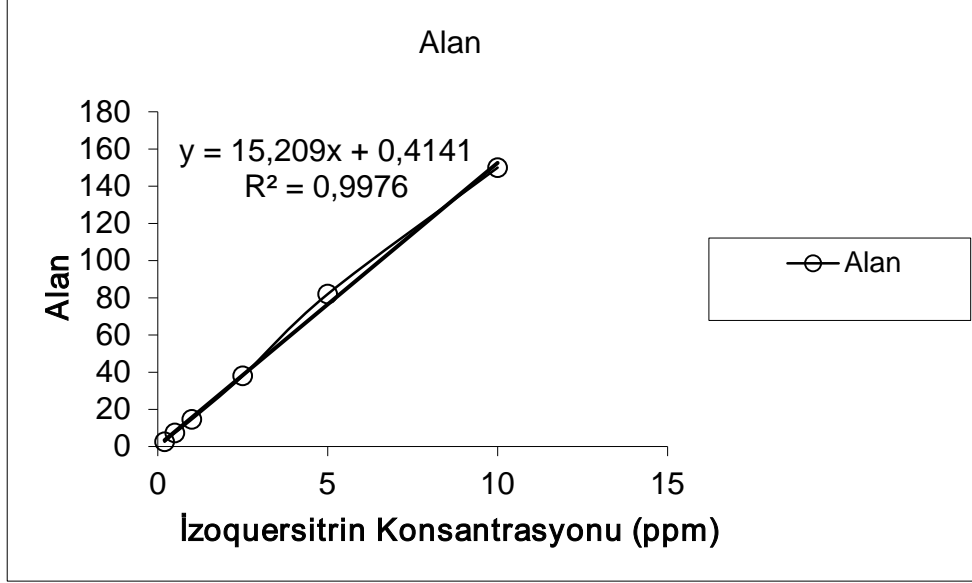
Şekil 4.21. Rutin kalibrasyon eğrisi

Hiperosid bileşiğinin kalibrasyon grafiği için 0.05, 0.1, 0.5, 2.5, 7.5, 15, 30 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında enjeksiyon yapılmıştır. Bileşiğe ait kalibrasyon eğrisi, denklemini ve korelasyon katsayısı Şekil 4.22’de verilmiştir.



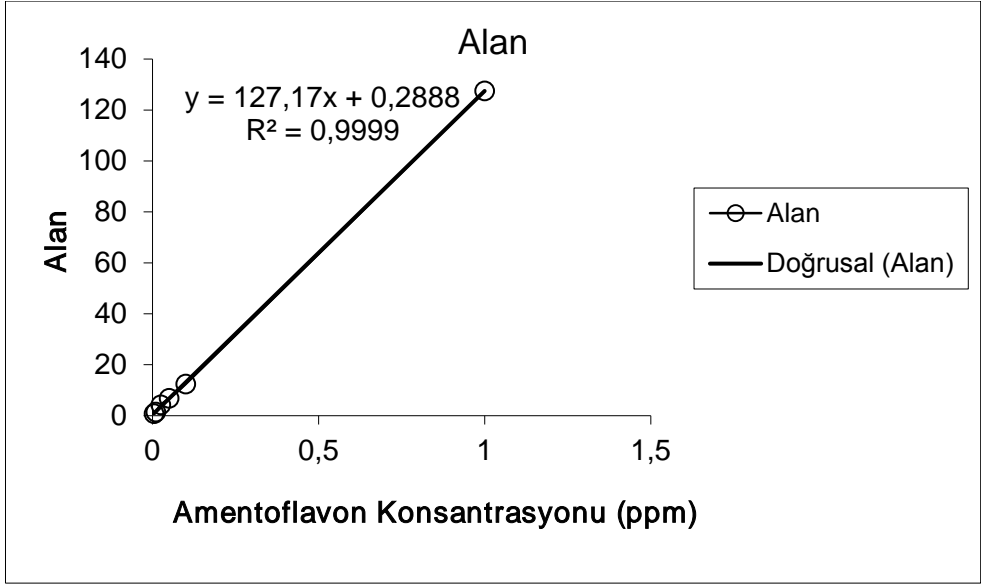
Şekil 4.22. Hiperosid kalibrasyon eğrisi

İzokuersitrin bileşiminin kalibrasyon grafiği için 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 µg/mL konsantrasyonlarında enjeksiyon yapılmıştır. Bileşiğe ait kalibrasyon eğrisi, denklemi ve korelasyon katsayısı Şekil 4.23’de verilmiştir.



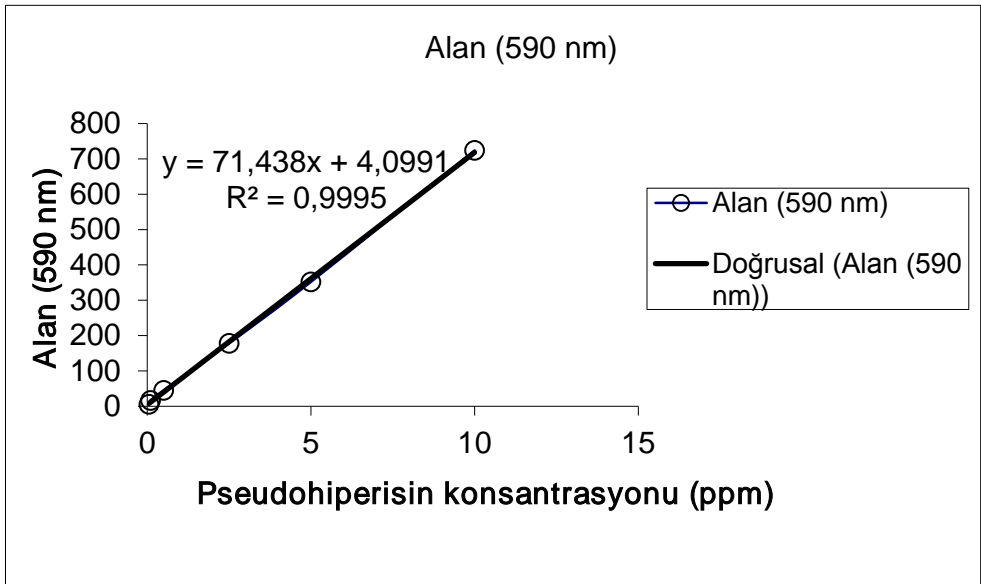
Şekil 4.23. İzokuersitrin kalibrasyon eğrisi

Amentoflavon bileşiminin kalibrasyon grafiği için 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 1.0 µg/mL konsantrasyonlarında enjeksiyon yapılmıştır. Bileşiğe ait kalibrasyon eğrisi, denklemi ve korelasyon katsayısı Şekil 4.24’de verilmiştir.



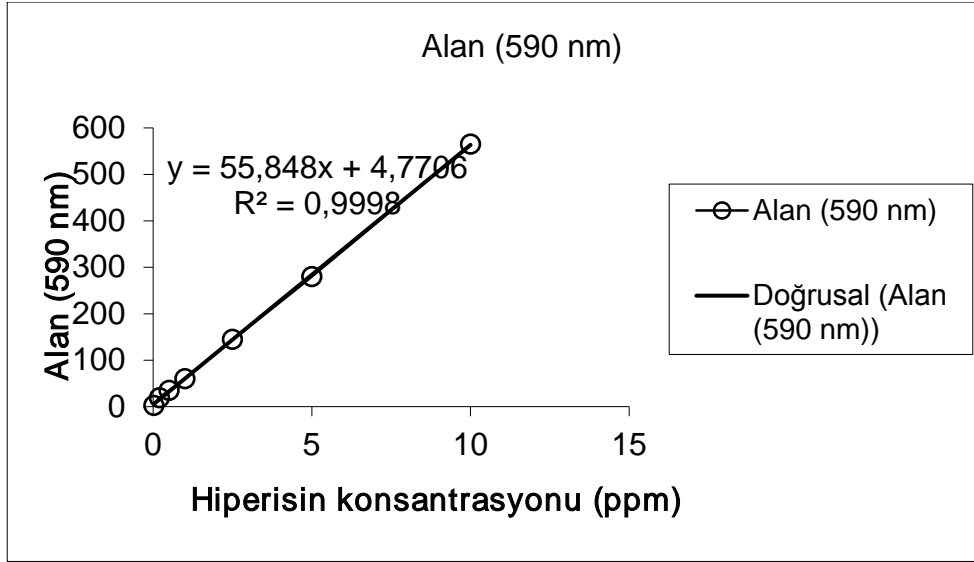
Şekil 4.24. Amentoflavon kalibrasyon eğrisi

Pseudohiperisin bileşiğinin kalibrasyon grafiği için 0.05, 0.1, 0.5 2.5 5.0, 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında enjeksiyon yapılmıştır. Bileşiğe ait kalibrasyon eğrisi, denklemi ve korelasyon katsayısı Şekil 4.25’da verilmiştir.



Şekil 4.25. Pseudohiperisin kalibrasyon eğrisi

Hiperisin bileşiminin kalibrasyon grafiği için 0.02, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5 5.0, 10 µg/mL konsantrasyonlarında enjeksiyon yapılmıştır. Bileşiğe ait kalibrasyon eğrisi, denklemi ve korelasyon katsayısı Şekil 4.26’da verilmiştir.



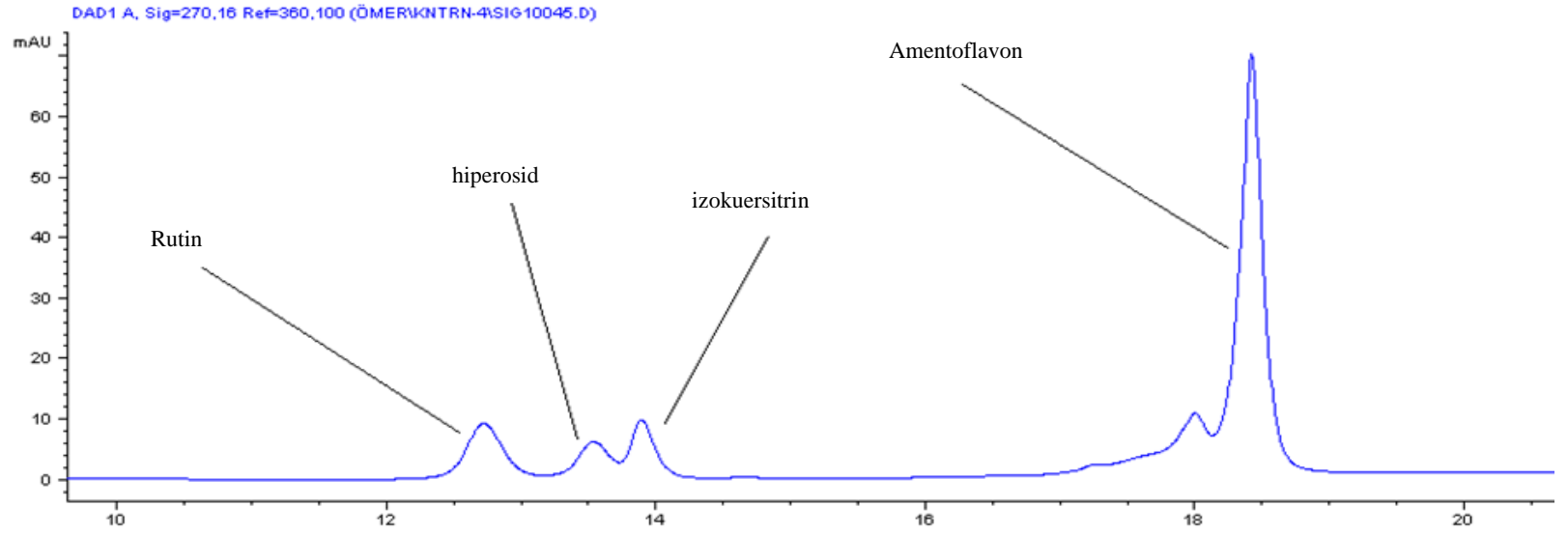
Şekil 4.26. Hiperisin kalibrasyon eğrisi

4.3.2. Standartların Pik Çıkış Süreleri ve Kromatogramları

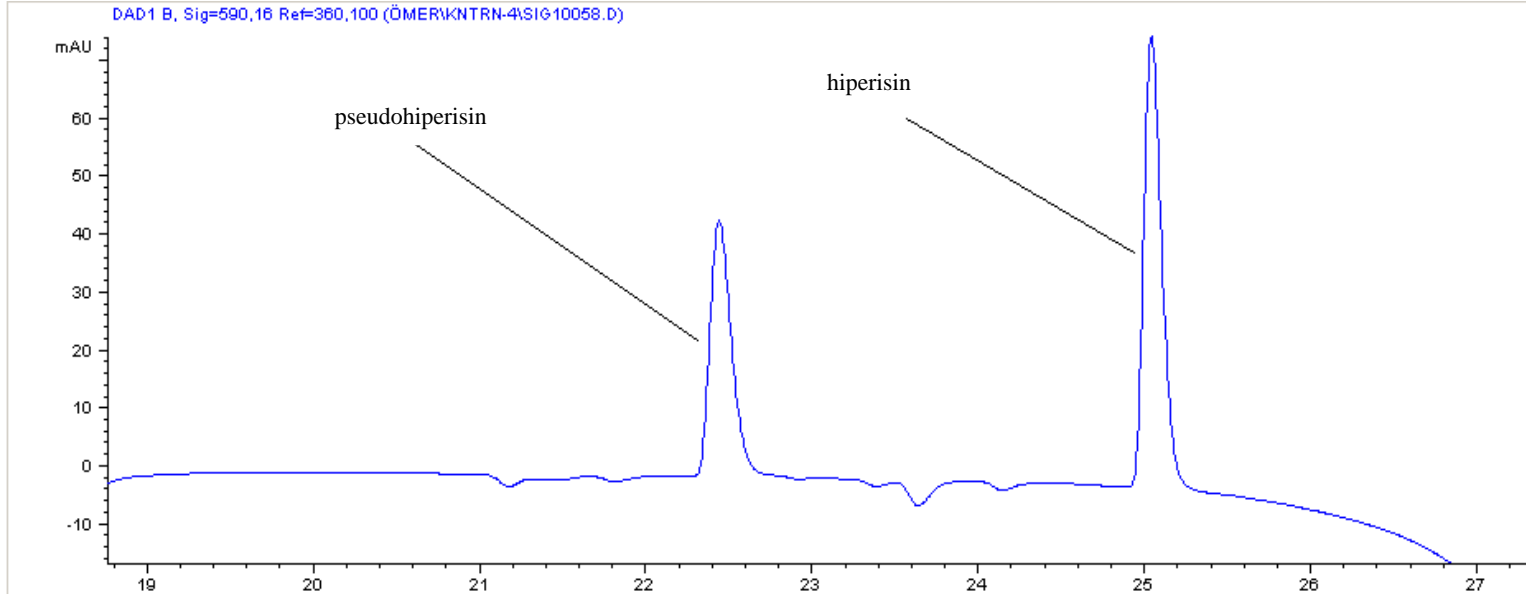
H. adenotrichum in vitro fidelerine ait metanolik ekstraktlarda standart maddelerin var olup olmadığı, HPLC kromatogramlarındaki piklerin alıkonma zamanları karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Standartlara ait piklerin çıkış süreleri çizelge 4.20’de verilmiştir. Standart piklerine ait kromatogramlardan 270 nm’de pik verenler (rutin, hiperosid, izokuersitrin, amentoflavon) Şekil 4.27’de, 590 nm’de en iyi pik verenler (hiperisin ve pseudohiperisin) ise şekil 4.28’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Standartların pik çıkış süreleri

Standart bileşikler	Standartlara ait ortalama çıkış süreleri (dk)
Rutin	12.716
Hiperosid	13.531
İzokuersitrin	13.889
Amentoflavon	18.416
Pseudohiperisin	22.438
Hiperisin	25.039



Şekil 4.27. 270 nm'de standartlara ait kromatogram



Şekil 4.28. 590 nm'de standartlara ait kromatogram

4.3.3. Örneklerin Analiz Sonuçları

Stres ve elisitör uygulamalarına maruz bırakılan *H. adenotrichum* fidelerinde, HPLC analizi sonucunda kullanılan 6 standart bileşikten rutin ve amentoflavon bileşikleri tespit edilememiştir. Diğer 4 bileşik olan hiperisin, pseudohiperisin, hiperosid ve izokuersitrin'nin uygulanan stres ve elisitörlere bağlı olarak *in vitro* fidelerdeki miktarları ise değişim göstermiştir. Sekonder bileşiklerin miktarı 100 g kuru ağırlıktaki (k.a) mg madde miktarı olarak verilmiştir.

4.3.4. Elisitasyon Uygulamalarına Göre *In Vitro* Fidelerde Sekonder Metabolit Değişimleri

Elisitörler, bitkilerde savunma ya da stres ile indüklenen cevapları teşvik eden bileşiklerdir (Sharma vd., 2011). Elisitörler orjinlerine ya da moleküler yapılarına göre fiziksel ya da kimyasal, biyotik ya da abiyotik ve kompleks ya da tanımlanmış olarak sınıflandırılmaktadır (Radman vd., 2003). Biyotik elisitörler patojenden ya da bitki kaynaklı olup biyolojik bir orjine sahipken, abiyotik elisitörler biyolojik bir orjine sahip değildir ve fiziksel faktörler ya da kimyasal bileşiklerde gruplandırılmıştır (Vasconsuelo ve Boland, 2007). Elisitörler aynı zamanda bitki sekonder metabolit sentezinin arttırıcıları olarak kullanılmakta ve önemli bileşiklerin üretimini arttırmak için biyosentetik yolda önemli bir rol oynayabilmektedirler. Elisitasyon yolu ile bitki hücre kültürlerinden sekonder metabolitlerin üretiminin artışı biyoendüstri için önemli ekonomik yararları olan yeni bir araştırma alanı açmıştır. Elisitörler bitki sekonder metabolitlerinde sinyal veren etkileşimleri ve kompleks yolların elemanlarını anlamak için bir araştırma aracı olarak kullanılabilir (Angelova vd., 2006).

H. perforatum in vitro bitkilerine, sekonder metabolit miktarını arttırmaya yönelik olarak farklı konsantrasyonlarda PEG (polietilen glikol), sukroz, pektin, mannan ve krom uygulanmıştır.

4.3.4.1. Su stresi (osmotik stres)

Su stresi, bitkilerin büyüme ve gelişimini düzenleyebilen, bitki üretimini sınırlayabilen, bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini değiştirebilen en önemli çevresel streslerden biridir. Su stresi bitkilerde sekonder metabolit üretimini arttırdığı bilinmektedir (Zobayed vd., 2007). Osmotik stres abiyotik fiziksel bir elisitördür (Vasconsuelo ve Boland, 2007). Sekonder metabolitlerin birikimi bitkilerin bir savunma mekanizması olarak bilinir ve bitkiler çeşitli savunma mekanizmalarına başvurmak için hücrel metabolizmalarını değiştirerek su stresine adapte olur (Gulen ve Eris, 2004). Ağır su stresi şartları, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve fotoinhibitör zarara bağlı olarak oksidatif strese neden olabilir (Asada, 1996) ve bu yüzden antioksidant konsantrasyonları bitkilerde su stresi şartları altında artabilir (Eskling vd., 1997). Su ve osmotik denge, *H. perforatum*'da hiperisin ve pseudohiperisin sentezini ciddi şekilde etkileyebilir (Pavlik vd, 2007). Zobayed vd. (2007), su stresi altında büyüyen *H. perforatum*'da hiperisin ve pseudohiperisin seviyelerinin azaldığını ve hiperforin konsantrasyonunun arttığını rapor etmişlerdir. *Hypericum brasiliense*'de su stresi altında bazı fenolik bileşiklerin (1,5-dihidroksiksantone, rutin, kuersetin ve betulinik asit) arttığı rapor edilmiştir (Abreu ve Mazzafera, 2005).

H. adenotrichum in vitro fidelerinde osmotik stres oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda PEG ve Sukroz denenmiştir.

PEG uygulaması

PEG birçok bitkide su stresini indüklemek için kullanılan ve bitki tarafından alınamayan bir osmotik ajandır (Lemcof vd., 2006; Van den Berg ve Zeng, 2006). PEG 6000 yüksek molekül ağırlığından dolayı hücre çeperi porlarından ve hücre membranından geçemez (Oertli, 1985; Lemcof vd., 2006; Verslues vd., 2006). Bu yüzden PEG'in sekonder toksik etkileri yüksek molekül ağırlığından dolayı elimine olmuştur.

Yaptığımız çalışmada 2.5, 10, 15 g/L PEG (6000) konsantrasyonlarına 15 ve 30 gün boyunca maruz bırakılmış *H. adenotrichum in vitro* fidelerinin sekonder metabolit miktarları, kültür süresine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 15 gün PEG uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.21'de, 30 gün

PEG uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.22’de gösterilmiştir.

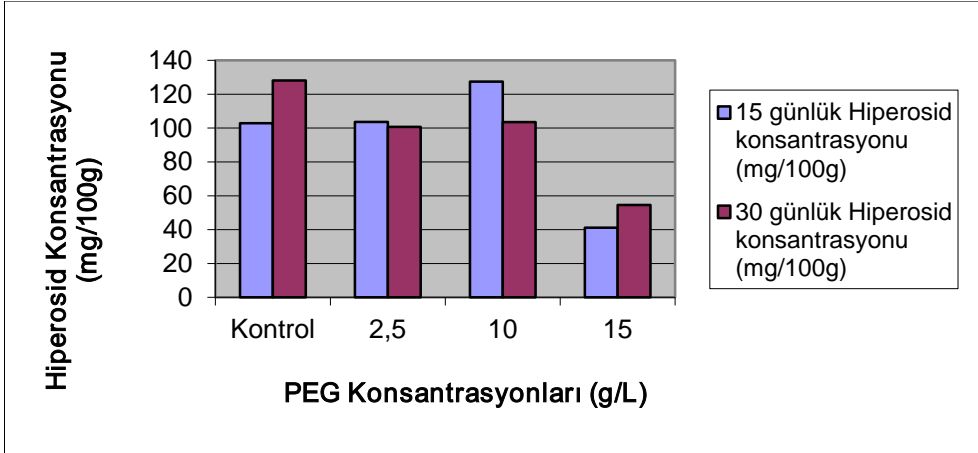
Çizelge 4.21. 15 gün PEG (g/L) uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)

	Kontrol	2.5 PEG	10 PEG	15 PEG
Hiperosid	102.8	103.6	127.4	41.1
İzokuersitrin	10.7	10.3	14.4	5.3
Pseudohiperisin	5.6	5.5	13.0	7.4
Hiperisin	5.5	5.7	11.5	6.5

Çizelge 4.22. 30 gün PEG (g/L) uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)

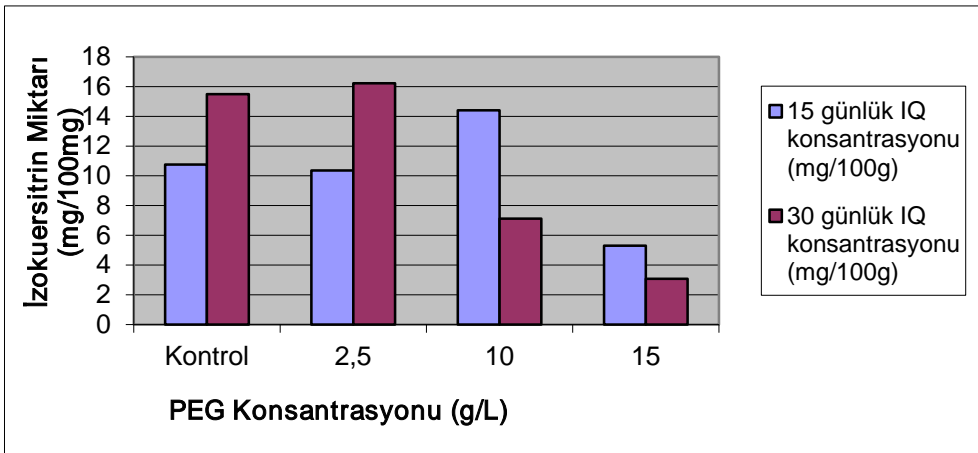
	Kontrol	2.5 PEG	10 PEG	15 PEG
Hiperosid	128.0	100.7	103.5	54.6
İzokuersitrin	15.4	16.2	7.1	3.0
Pseudohiperisin	7.3	5.5	8.9	7.1
Hiperisin	7.2	5.0	7.8	6.9

15 günlük PEG uygulaması sonucu hiperosid konsantrasyonu, kontrole karşılaştırıldığında 2.5 g/L PEG’de değişmezken, 10 g/L PEG konsantrasyonda hafif bir artış göstermiş, 15 g/L PEG konsantrasyonunda ise hiperosid miktarı önemli ölçüde düşmüştür. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında 2.5 ve 10 g/L PEG’de hiperosid konsantrasyonunda hiperosid miktarı hafif bir şekilde azalmış, konsantrasyon 15 g/L’ye çıktığında ise yine önemli ölçüde bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.29).



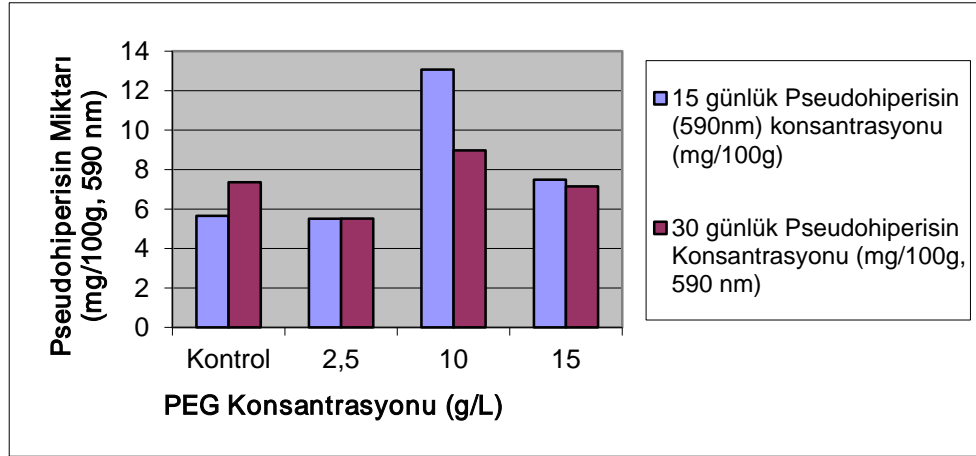
Şekil 4.29. 15 ve 30 gün PEG uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük PEG uygulaması sonucu izokuersitrin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 10 g/L PEG konsantrasyonunda bir artış göstermiştir. 10 g/L PEG’de izokuersitrin konsantrasyonunda kontrole göre yaklaşık 1.3 katlık bir artış olmuştur. 15 g/L PEG konsantrasyonunda ise izokuersitrin miktarı önemli ölçüde düşmüştür. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında 2.5 g/L PEG’de izokuersitrin konsantrasyonu hafif bir şekilde yükselmiş ve daha sonra PEG konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak önemli ölçüde bir düşüş gözlenmiştir. (Şekil 4.30).



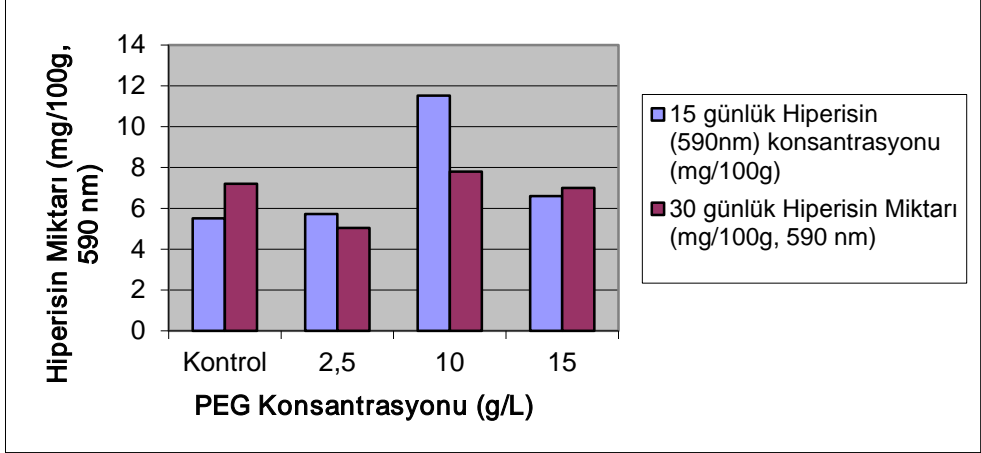
Şekil 4.30. 15 ve 30 gün PEG uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük PEG uygulaması sonucu pseudohiperisin konsantrasyonu, 2.5 g/L PEG’de değişmezken, 10 g/L PEG konsantrasyonunda 2.4 katlık bir artış göstermiştir. 15 g/L PEG konsantrasyonunda ise pseudohiperisin miktarı 10 g/L PEG’e göre biraz düşüş göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında 2.5 g/L PEG’de pseudohiperisin konsantrasyonu hafif bir şekilde düşmüş ve daha sonra 10 g/L PEG’de hafif bir yükseliş olmuştur. 15 g/L PEG ve kontrol arasında bir fark gözlenmemiştir. (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. 15 ve 30 gün PEG uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük PEG uygulaması sonucu hiperisin konsantrasyonu, kontrole karşılaştırıldığında 2.5 g/L ve 15 g/L PEG’de önemli derecede bir değişiklik göstermezken, 10 g/L PEG konsantrasyonunda yaklaşık 2.1 katlık bir artış göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında hiperisin konsantrasyonu, kontrole göre 2.5 g/L PEG’de hafif bir düşüş gösterirken, 10 ve 15 g/L PEG’de önemli bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. 15 ve 30 gün PEG uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

Yaptığımız çalışmada PEG uygulamasının *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerin (hiperosid ve izokuersitrin) elisitasyonunda çok az başarılı olduğu görülmektedir. En yüksek olarak, sadece 15 günlük 10 g/L PEG uygulaması izokuersitrin konsantrasyonunda kontrole göre yaklaşık 1.3 katlık bir artış sağlamıştır. 15 g/L PEG uygulaması hem 15 günlük hemde 30 günlük uygulamalarda flavonoid miktarlarında önemli ölçüde düşüşe neden olmuştur. PEG uygulaması hiperisinlerde (hiperisin ve pseudohiperisin) flavonoidlere göre daha iyi bir elisitasyon sağlamıştır. 15 günlük 10 g/L PEG uygulaması pseudohiperisin miktarında kontrole göre yaklaşık 2.4 ve hiperisin miktarında ise yaklaşık 2.1 katlık bir artış sağlamıştır. Çoğunlukla 15 günlük PEG uygulaması 30 günlük uygulamaya göre elisitasyon açısından daha verimli görülmektedir.

Pavlik vd. (2007), *H. perforatum in vitro* kültürlerinde sukroz (10, 20, 30 g/L) içeren ortamlara PEG (1.25, 2.5, 5, 10, 15 g/L) ilave etmişler ve çoğunlukla düşük konsantrasyonlarda PEG'in (1.25 ve 5 g/L) hiperisin ve hiperforin üretimi indüklediğini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda bundan farklı olarak 10 g/L PEG uygulaması çoğunlukla daha etkili olmuştur. PEG uygulamasının neden olduğu osmotik stres birçok bitkide sekonder metabolit üretimini arttırmıştır; Ör. *Scrophularia ningpoensis*'in köklerinde iridoid glikozitler (catalpol, harpagoside, aucubin ve harpagide) (Wang vd., 2010), *Taxus chinensis* hücre süspansiyonlarında paclitaxel üretimi (Kim vd., 2001) ve *Cistanche deserticola*

hücre kültürlerinde phenylethanoid glikozitler (Liu ve Cheng, 2008) PEG uygulaması ile artmıştır.

Sukroz uygulaması

Sukroz yaygın bir osmotik stres ajanı olarak kullanılmakta ve aynı zamanda çok önemli bir karbon ve enerji kaynağı olarak hizmet etmektedir. Bu yüzden, sukrozun osmotik stres etkisini ve karbon kaynağı olarak besinsel rolünü ayırmak çok zordur (Liu ve Cheng, 2008). *In vitro* kültürlerde bitki büyümesi için fotosentez daha az gereklidir ve kültür ortamında sukroz metabolizma için gerekli olan ana karbon kaynağı olarak rol oynar (Zobayed vd., 2003).

Yaptığımız çalışmada 15, 30, 45 ve 60 g/L sukroz konsantrasyonlarına 15 ve 30 gün boyunca maruz bırakılmış *H. adenotrichum in vitro* fidelerinin sekonder metabolit miktarları, kültür süresine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 15 gün sukroz uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.23'da, 30 gün sukroz uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.24'de gösterilmiştir.

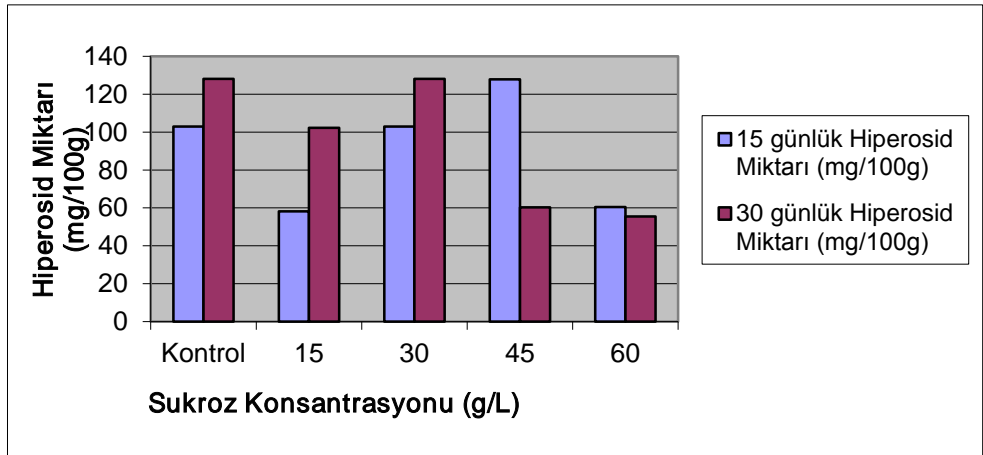
Çizelge 4.23. 15 gün sukroz (g/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)

	Kontrol	15 sukroz	30 sukroz	45 sukroz	60 sukroz
Hiperosid	102.8	58.1	102.8	127.8	60.4
İzokuersitrin	10.7	7.4	10.7	17.0	3.5
Pseudohiperisin	5.6	4.4	5.6	6.2	4.2
Hiperisin	5.5	4.6	5.5	6.4	4.0

Çizelge 4.24. 30 gün sukroz (g/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)

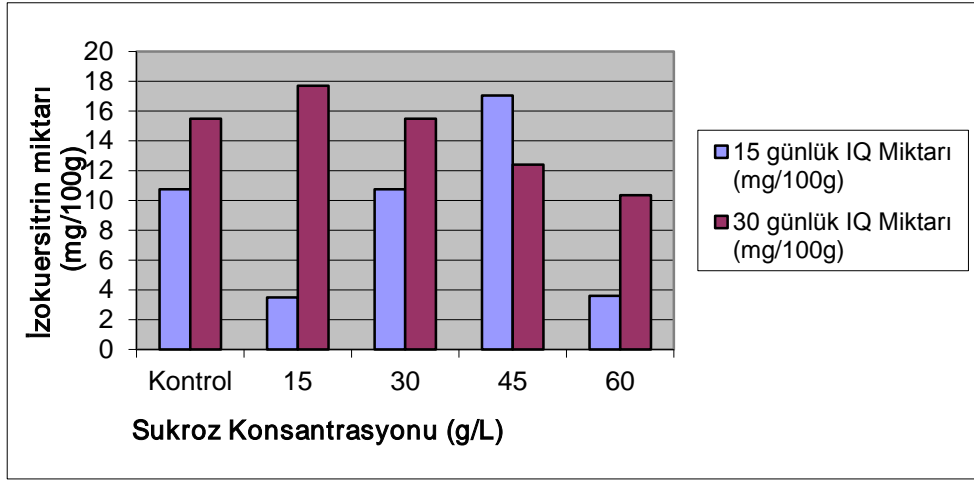
	Kontrol	15 sukroz	30 sukroz	45 sukroz	60 sukroz
Hiperosid	128.0	102.2	128.0	60.3	55.4
İzokuersitrin	15.4	17.6	15.4	12.4	10.3
Pseudohiperisin	7.3	5.5	7.3	6.4	4.5
Hiperisin	7.2	5.5	7.2	6.6	4.9

15 günlük sukroz uygulaması sonucu hiperosid konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 15 g/L sukrozda neredeyse yarı yarıya bir düşüş göstermiştir. 45 g/L sukroz konsantrasyonunda hafif bir artış göstermiş, 60 g/L sukroz konsantrasyonunda ise hiperosid miktarı önemli ölçüde düşmüştür. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında en yüksek hiperosid konsantrasyonunun kontrol bitkisinde olduğu ve 45 ve 60 g/L sukrozda hiperosid konsantrasyonunun önemli ölçüde düştüğü görülmektedir (Şekil 4.33).



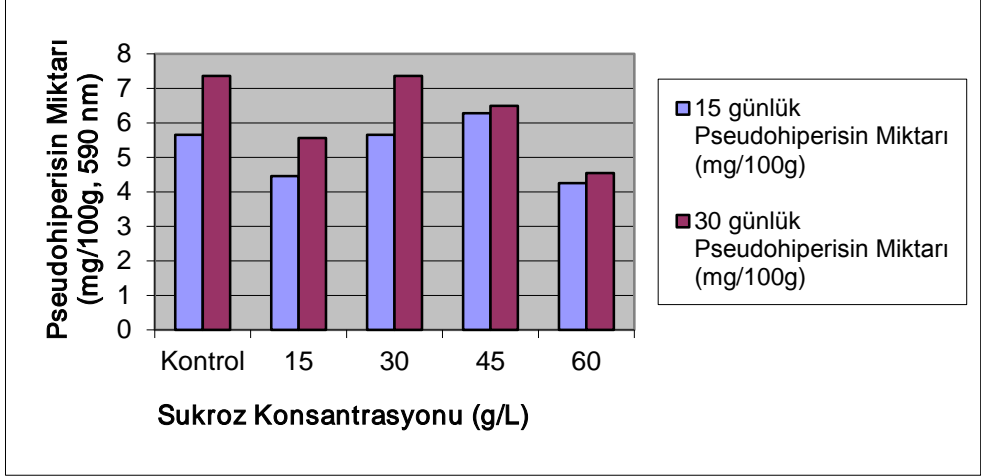
Şekil 4.33. 15 ve 30 gün sukroz uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük sukroz uygulaması sonucu izokuersitrin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 45 g/L sukroza kadar kademeli bir artış göstermiş, 60 g/L sukrozda ise önemli bir düşüş göstermiştir. 45 g/L sukroz konsantrasyonunda izokuersitrin miktarında kontrole göre yaklaşık 1.6 katlık bir artış olmuştur. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında en düşük sukroz konsantrasyonundan (15 g/L) en yüksek sukroz konsantrasyonuna (60 g/L) kadar izokuersitrin miktarında kademeli bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.34).



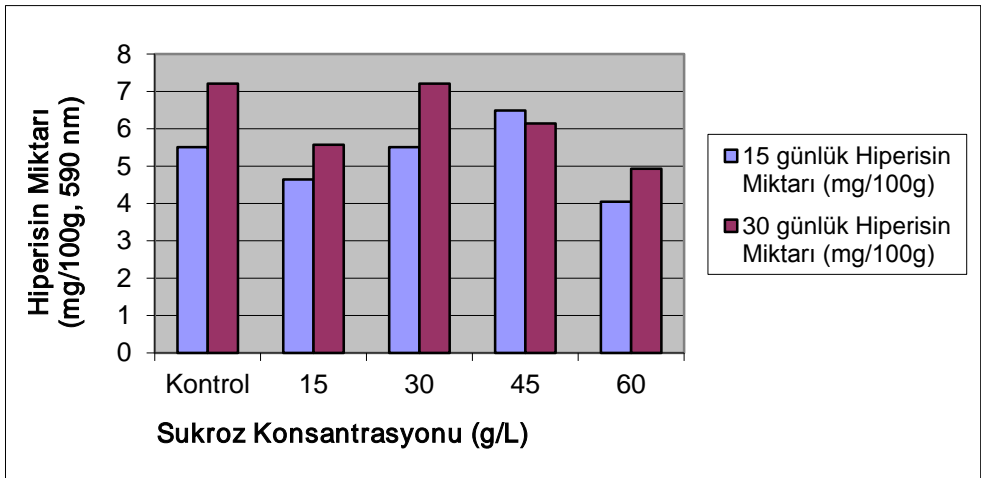
Şekil 4.34. 15 ve 30 gün sukroz uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük sukroz uygulaması sonucu pseudohiperisin miktarı, sukroz konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli ölçüde değişmemiş sadece en yüksek ve en düşük sukroz konsantrasyonlarında hafif bir düşüş göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında en yüksek pseudohiperisin konsantrasyonunun kontrol bitkisinde olduğu ve 15, 45 ve 60 g/L sukrozda pseudohiperisin konsantrasyonu çeşitli oranlarda düştüğü görülmektedir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. 15 ve 30 gün sukroz uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük sukroz uygulaması sonucu hiperisin konsantrasyonu, sukroz konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli ölçüde değişmemiş sadece en yüksek ve en düşük sukroz konsantrasyonlarında hafif bir düşüş göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında en yüksek hiperisin konsantrasyonunun kontrol bitkisinde olduğu ve 15, 45 ve 60 g/L sukrozda hiperisin konsantrasyonu çeşitli oranlarda düştüğü görülmektedir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. 15 ve 30 gün sukroz uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

Yaptığımız çalışmada sukroz uygulaması, *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerinden sadece izokuersitrinin elisitasyonunda çok az da olsa başarı sağlamıştır. 45 g/L sukroz konsantrasyonunda izokuersitrin miktarında kontrole göre yaklaşık 1.6 katlık bir artış olmuştur. 60 g/L sukroz uygulaması hem 15 günlük hemde 30 günlük uygulamalarda flavonoid miktarlarında önemli ölçüde düşüşe neden olmuştur. Sukroz uygulaması hiperisinlerde (hiperisin ve pseudohiperisin) elisitasyon açısından önemli bir sonuç göstermemiş hatta 30 günlük sukroz uygulamasında en yüksek hiperisin ve pseudohipersin miktarı kontrol bitkisinde gözlenmiştir. Sukroz olarak aşırı karbon uygulaması önemli ölçüde hiperisin ve pseudohipersin birikimini indüklemeye yeterli olmamıştır.

Benzer bir çalışma, bir biyoreaktörde *H. perforatum*'da hiperisin, pseudohiperisin ve hiperforin üretimi üzerine 15-60 g/L konsantrasyon aralığında ilave edilen sukrozun etkisi çalışılarak yapılmıştır. Bu çalışmada en yüksek hiperisin içeriği en düşük sukroz uygulamasında (15 g/L) gözlenmesine rağmen hiperisin konsantrasyonu 15 ve 30 g/L konsantrasyon uygulandığı zaman önemli ölçüde değişmemiştir. Benzer şekilde pseudohiperisin içeriği de ortamdaki sukroz konsantrasyonu ile ters orantılı olmuştur. Daha yüksek sukroz konsantrasyonunda (60 g/L) yalnızca hiperisin değil aynı zamanda hiperforin üretiminde de ciddi azalma gözlenmiştir (Zobayed vd., 2003). Pavlik vd. (2007), *H.perforatum*'un *in vitro* fidelerinde hiperisin ve hiperforin üretiminin kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda sukroz (10-30 g/L) ilavesi ile etkilendiğini rapor etmişlerdir. Kültür ortamındaki artan sukroz konsantrasyonu ile birlikte hiperisin ve hiperforin konsantrasyonu artmıştır. 10 ve 30 g/L'de sukroz içeren ortamda kültüre edilen bitkilerde, hiperisin konsantrasyonu 3'den 4 µg/g'a yükselmiştir.

4.3.4.2. Biyotik elisitörler

Biyotik elisitörler patojen ya da bitkinin kendisinden türemiş olan biyolojik bir orjine sahiptirler (Vasconsuelo ve Boland, 2007). Bitki hücre çeperlerinden, mikroorganizmalardan ve glikoproteinlerden kökenlenen polisakkaritler, düşük molekül ağırlıklı organik asitler, fiziksel hasar, kemirgenler, herbivorlar, böcekler, fungus, virüs ve bakteri saldırılarına cevap olarak bitki tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı fitokimyasallar ve protein kinazlar biyotik elisitörler sınıfındadır (Sharma vd., 2011). Polisakkaritler ya da oligosakkaritler yoğun olarak çalışılmış olan elisitasyon yolları ile ilgili sinyal molekülleridir çünkü bu bileşikler bir patojen saldırısı sırasında fungal elisitörlerin yerini alabilir (Zhao vd., 2005). Bu amaçla çalışmalarımızda *H. adenotrichum in vitro* fidelerinde sekonder metabolit induksiyonu için pektin ve mannan kullanılmıştır.

Pektin uygulaması

Pektin, biyotik ve bileşimi tanımlı olan bir elisitördür (Radman vd., 2003; Vasconsuelo ve Boland, 2007; Sharma vd., 2011). Pektin, bütün bitkilerin primer hücre duvarında yer alan kompleks bir polisakkarit ailesidir (Ridley vd., 2001). Temel pektin (1→4)-bağlı galakturonik asit ünitelerinin uzun bir zincirinden oluşmaktadır (Hopkins ve Hüner, 2004). Pektik enzimler, genelde polisakkaritleri parçalayan zincir kırıcı enzimler olarak bilinmektedirler. Bitki hücrelerinin orta lamelinin ve primer hücre duvarının yapısını oluşturan pektik asit ve pektini parçalayan bu enzimler bakteri, mantar, böcek, nematod ve protozoada bulunmaktadırlar. Mikroorganizmal pektin yıkımı bitki patojenitesinde, simbiyotik yaşamda, bitkisel artıkların bozunumunda, bitkisel besinlerin sindiriminde önemli rol oynamaktadır (Maraş vd., 2004). Savunma cevaplarının elisitörleri olarak aktive olan Oligogalakturonidler (OGs), patojen enfeksiyonu sırasında bitki pektininden serbest kalır ve böylece OGs fungal patojenlere karşı temel dirence katkıda bulunmaktadır. *Citrus* pektin homogalakturonan tarafından oluşturulan bir polimerdir. Bununla birlikte Flores-Sánchez vd. (2002), pektinin asidik pH'da (pH 4.63) ve 121 °C'ta sterilizasyondan sonra çeşitli oligogalakturonik fragmentlere parçalanmış olabileceğini ve *Uncaria tomentosa* hücre kültürlerinde bir sinyal molekülü olarak rol oynamış olabileceğini rapor etmiştir.

Yaptığımız çalışmada 10, 50, 100 mg/L pektin konsantrasyonlarına 15 ve 30 gün boyunca maruz bırakılmış *H. adenotrichum in vitro* fidelerinin sekonder metabolit

miktarları, kültür süresine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 15 gün pektin uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.25’de, 30 gün pektin uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.26’de gösterilmiştir.

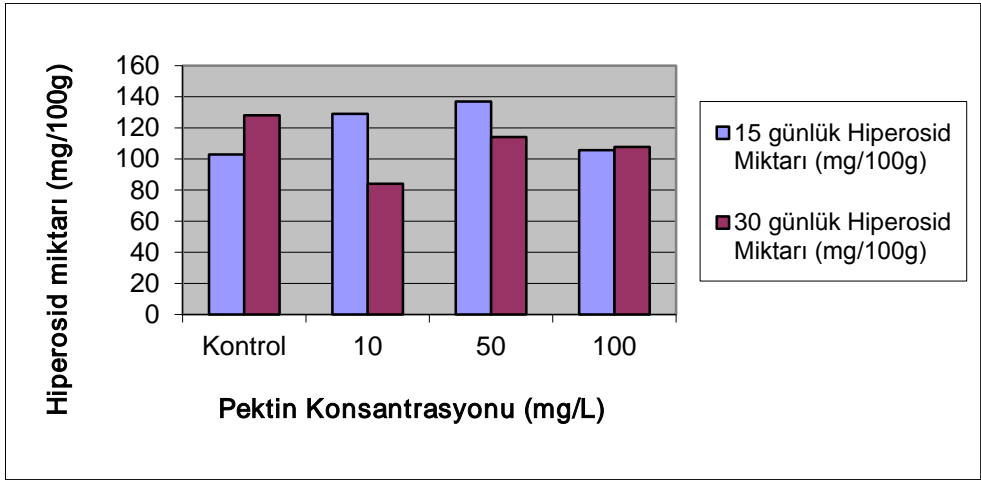
Çizelge 4.25. 15 gün pektin (mg/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)

	Kontrol	10 pektin	50 pektin	100 pektin
Hiperosid	102.8	128.9	136.9	105.6
İzokuersitrin	10.7	8.3	7.5	7.0
Pseudohiperisin	5.6	12.8	27.2	7.2
Hiperisin	5.5	9.4	15.3	6.4

Çizelge 4.26. 30 gün pektin (mg/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)

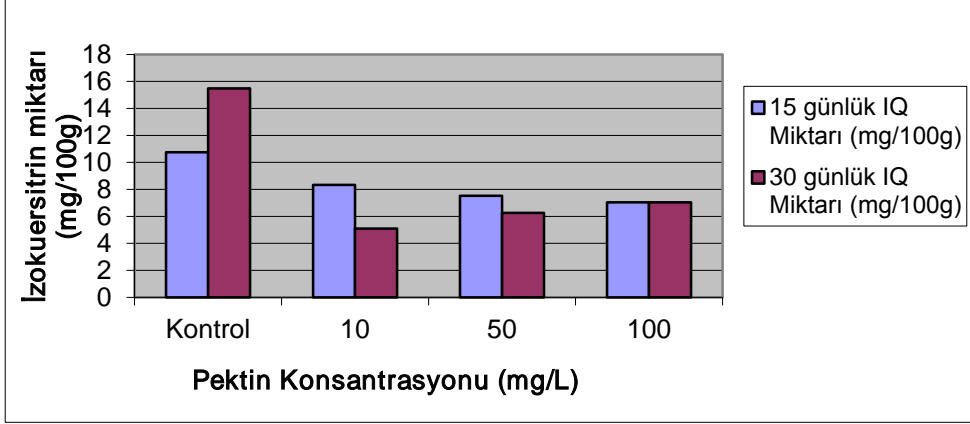
	Kontrol	10 pektin	50 pektin	100 pektin
Hiperosid	128.0	84.0	114.0	107.7
İzokuersitrin	15.4	5.09	6.2	7.0
Pseudohiperisin	7.3	8.2	12.8	5.6
Hiperisin	7.2	6.1	7.9	5.3

15 günlük pektin uygulaması sonucu hiperosid konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 50 mg/L pektine kadar farklı oranlarda yükselmiş, 100 mg/L pektin içeren ortamda düşüş göstererek hemen hemen kontrolle aynı seviyeye gelmiştir. 50 mg/L pektin içeren ortamda hiperosid miktarı kontrolle karşılaştırıldığında yaklaşık 1.3 katlık bir artış göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında en yüksek hiperosid konsantrasyonunun kontrol bitkisinde olduğu ve 10, 50, 100 mg/L pektin içeren ortamlarda hiperosid konsantrasyonu farklı oranlarda düşmüş olduğu görülmektedir (Şekil 4.37).



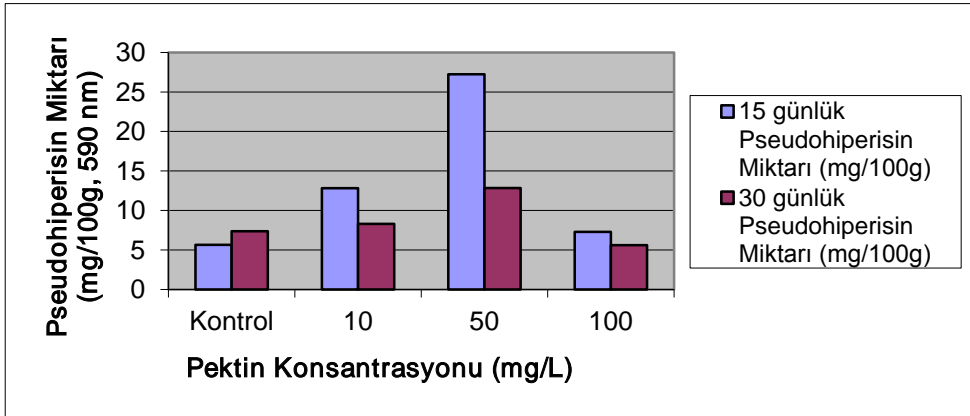
Şekil 4.37. 15 ve 30 gün pektin uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük pektin uygulaması sonucu izokuersitrin konsantrasyonu, en yüksek kontrol bitkisinden elde edilmiştir. İzokuersitrin miktarı kontrolle karşılaştırıldığında pektin konsantrasyonu arttıkça farklı oranlarda hafif düşüş göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında yine en yüksek izokuersitrin konsantrasyonu kontrol bitkisinde gözlenmiştir. İzokuersitrin miktarı kontrolle karşılaştırıldığında pektin konsantrasyonu arttıkça farklı oranlarda hafif düşüş göstermiştir (Şekil 4.38).



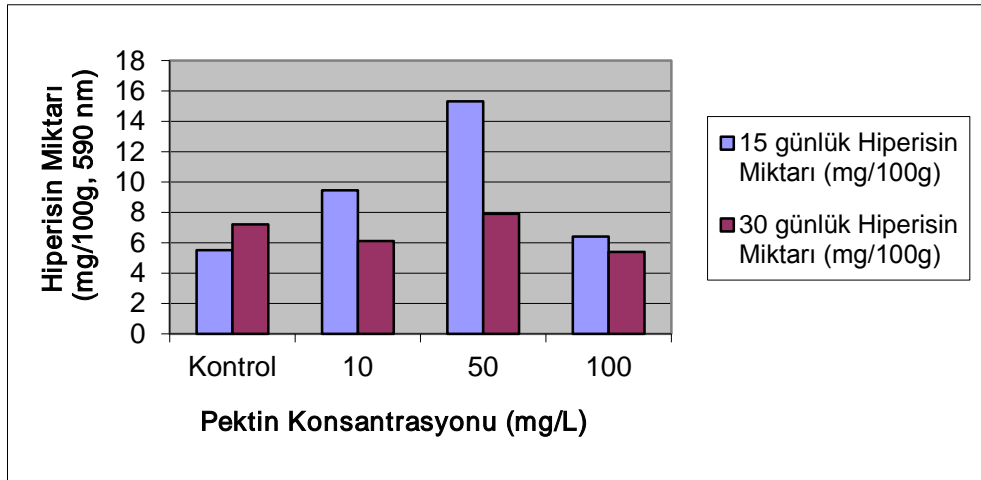
Şekil 4.38. 15 ve 30 gün pektin uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük pektin uygulaması sonucu pseudohiperisin miktarı, kontrolle karşılaştırıldığında 50 mg/L pektine kadar yükselmiş, 100 mg/L pektin içeren ortamda ise düşmüş fakat yine kontrolden yüksek kalmıştır. 50 mg/L pektin içeren ortamda pseudohiperisin miktarı kontrolle göre yaklaşık 4.8 katlık bir artış göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında pseudohiperisin konsantrasyonu kontrolle karşılaştırıldığında 50 mg/L pektine kadar yine yükselmiş, 100 mg/L pektin içeren ortamda ise düşmüştür. 50 mg/L pektin içeren ortamda pseudohiperisin miktarı kontrolle göre yaklaşık 1.7 katlık bir artış göstermiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. 15 ve 30 gün pektin uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük pektin uygulaması sonucu hiperisin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 50 mg/L pektine kadar yükselmiş, 100 mg/L pektin içeren ortamda ise düşmüş fakat yine kontrolden yüksek kalmıştır. 50 mg/L pektin içeren ortamda hiperisin miktarı kontrolle göre yaklaşık 2.8 katlık bir artış göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında hiperisin konsantrasyonu kontrolle karşılaştırıldığında 50 mg/L pektinde hafif yükselmiş, 10 ve 100 mg/L pektin içeren ortamda ise hafif düşüş göstermiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. 15 ve 30 gün pektin uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

Yaptığımız çalışmada pektin uygulaması, *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerinden sadece hiperosid elisitasyonunda çok az da olsa başarı sağlamıştır. 50 mg/L pektin konsantrasyonunda hiperosid miktarında kontrole göre yaklaşık 1.3 katlık bir artış olmuştur. Özellikle 30 günlük uygulamalarda pektin flavonoid miktarlarında düşüşe neden olmuş kontrol bitkileri flavonoid içeriği açısından daha yüksek sonuçlar vermiştir. Pektin uygulaması hiperisinlerde (hiperisin ve pseudohiperisin) elisitasyon açısından önemli sonuçlar vermiştir. 15 günlük pektin uygulamasında 50 mg/L pektin pseudohiperisin miktarını 4.8 kat artırırken 30 günlük uygulamada artış 1.7 kat olmuştur. 15 günlük pektin uygulamasında 50 mg/L pektin hiperisin miktarını 2.8 kat artırırken 30 günlük uygulamalarda pektin hiperisin miktarında önemli bir artış sağlamamıştır. Bu sonuçlar pektinin *H. adenotrichum in vitro* fidelelerinde hiperisinlerin üretimi için etkili bir elisitör olduğunu göstermektedir.

H. perforatum'un sürgün kültürlerinde pektin hiperisin üretimini etkilemezken pseudohiperisin üretimini 1.8 kat artırarak stimule etmiştir (Kirakosyan vd., 2000). Bizim çalışmamızda sürgün kültürlerinden farklı olarak *H. adenotrichum in vitro* fidelerinde pektinin etkisi ile hiperisinlerin üretimi daha çok stimule olmuştur. *Uncaria tomentosa* hücre süspansiyon kültürlerinde uygulanan pektin triterpen asitlerinin (ursolic ve oleanolic acid) üretimini arttırdığı bulunmuştur. Hücre kültürleri, pektin uygulamasının izopentil difosfat izomeraz ve skualen sentez gibi enzimlerin aktivitesinde 3 katlık hızlı bir artışa neden olduğunu göstermiştir (Flores-Sánchez vd., 2002). Pektin *Calendula officinalis* hücre kültürlerinde oleanolik asit (Wiktorowskave vd., 2010) ve *Morinda citrifolia* kültürlerinde antrakuinonların (Dörnenburg ve Knorr, 1994) üretimini stimule etmede başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Mannan uygulaması

Mannan, maya hücre duvarının önemli yapısal bir bileşenidir (Jones ve Ballou 1969) ve biyotik bir elisitör olarak tanımlanmaktadır (Radman vd., 2003).

Yaptığımız çalışmada 10, 50, 100 mg/L mannan konsantrasyonlarına 15 ve 30 gün boyunca maruz bırakılmış *H. adenotrichum in vitro* fidelerinin sekonder metabolit miktarları, kültür süresine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 15 gün mannan uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.27'de, 30 gün mannan uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.28'de gösterilmiştir.

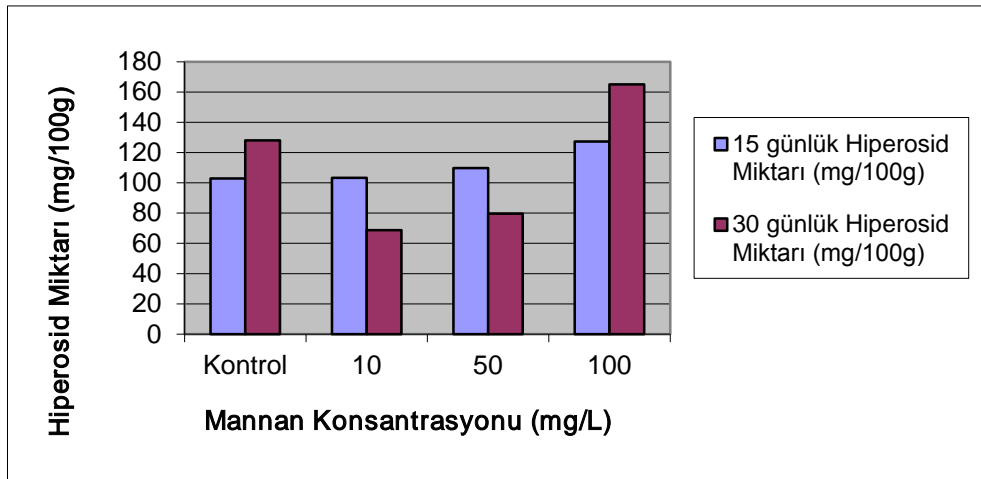
Çizelge 4.27. 15 gün mannan (mg/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a)

	Kontrol	10 mannan	50 mannan	100 mannan
Hiperosid	102.8	103.2	109.7	127.2
İzokuersitrin	10.7	5.8	5.7	8.9
Pseudohiperisin	5.6	10.5	15.9	14.4
Hiperisin	5.5	6.9	9.7	9.3

Çizelge 4.28. 30 gün mannan (mg/L) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a)

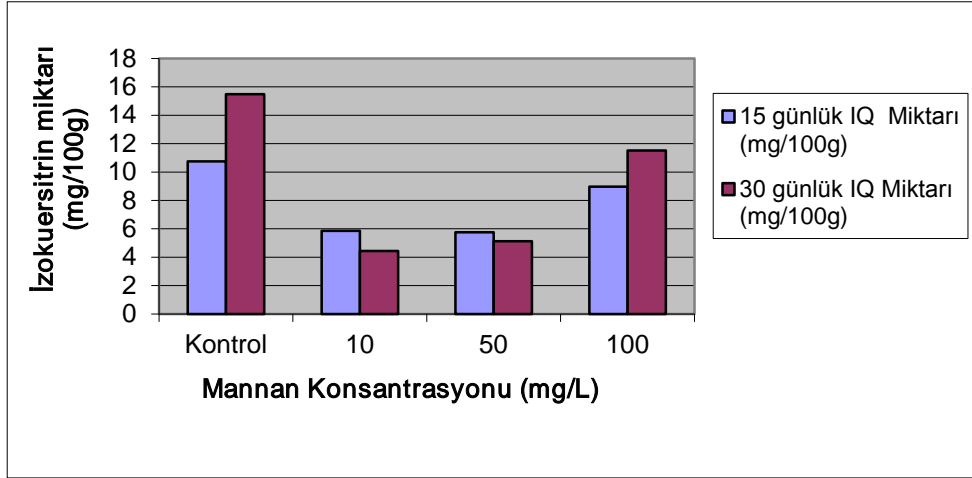
	Kontrol	10 mannan	50 mannan	100 mannan
Hiperosid	128.0	68.7	79.5	165.0
İzokuersitrin	15.4	4.4	5.1	11.5
Pseudohiperisin	7.3	5.9	8.8	13.3
Hiperisin	7.2	5.9	7.1	8.9

15 günlük mannan uygulaması sonucu hiperosid konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında mannan konsantrasyonu artıka çok az yükselmiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında hiperosid konsantrasyonu artan mannan konsantrasyonu ile artmış fakat kontrol, 10 ve 50 mg/L mannana göre daha yüksek hiperosid üretmiştir. Sadece 100 mg/L mannan kontrole göre yaklaşık 1.3 kat hiperosid üretmiştir (Şekil 4.41).



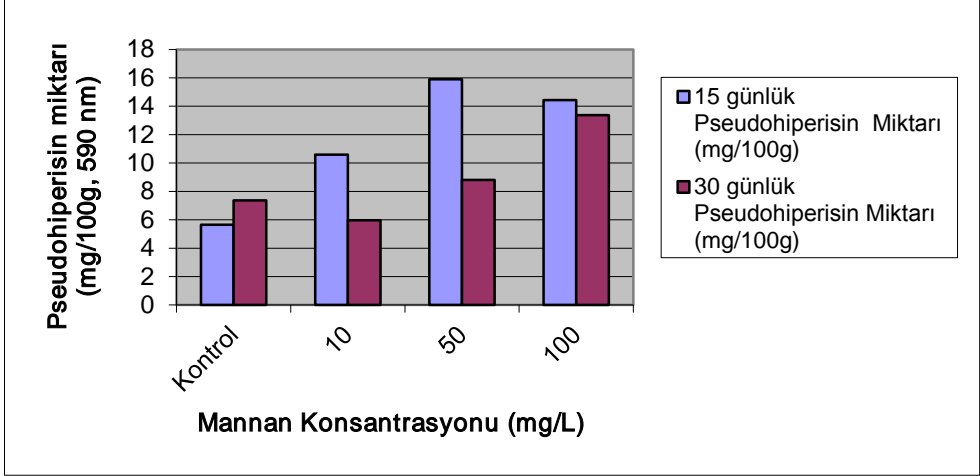
Şekil 4.41. 15 ve 30 gün mannan uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 ve 30 günlük mannan uygulaması sonucu izokuersitrin konsantrasyonu, en yüksek kontrol bitkisinden elde edilmiştir. İzokuersitrin üretimi açısından 100 mg/L mannan 10 ve 50 mg/L'ye göre daha iyi sonuç vermesine rağmen mannan izokuersitrin elisitasyonunda başarısız olmuştur (Şekil 4.42).



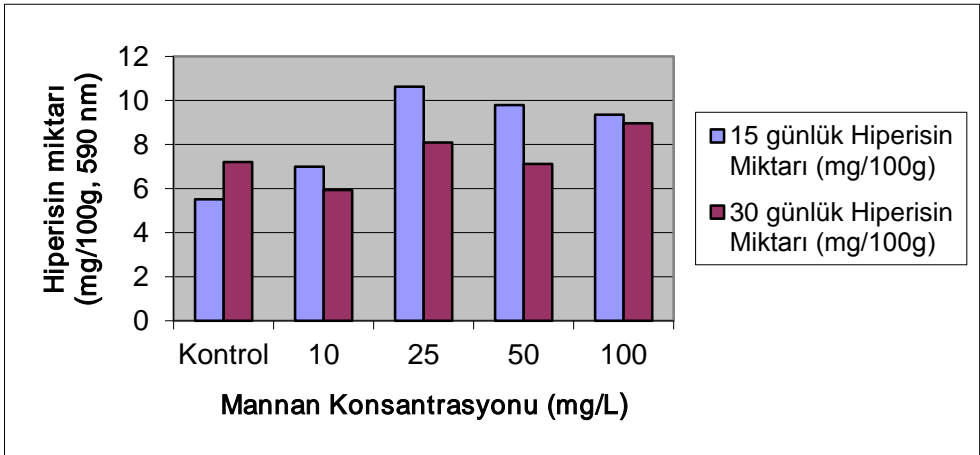
Şekil 4.42. 15 ve 30 gün mannan uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları.

15 günlük mannan uygulaması sonucu pseudohiperisin miktarı, kontrolle karşılaştırıldığında 50 mg/L mannan kadar yükselmiş, 100 mg/L mannan içeren ortamda ise 50 mg/L mannana göre az bir düşüş olmuştur. 50 mg/L mannan içeren ortamda pseudohiperisin miktarı kontrolle göre yaklaşık 2.8 katlık bir artış göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında pseudohiperisin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 100 mg/L mannana kadar farklı miktarlarda yükselmiştir. 100 mg/L mannan içeren ortamda pseudohiperisin miktarı kontrolle göre yaklaşık 1.8 katlık bir artış göstermiştir (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. 15 ve 30 gün mannan uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük mannan uygulaması sonucu hiperisin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 50 mg/L mannan kadar yükselmiş, 100 mg/L mannan içeren ortamda ise 50 mg/L mannana göre az bir düşüş olmuştur. 50 mg/L mannan içeren ortamda hiperisin miktarı kontrolle göre yaklaşık 1.7 katlık bir artış göstermiştir. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında hiperisin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 100 mg/L mannana kadar farklı miktarlarda hafifçe yükselmiş ama bu yükseliş çok önemli olmamıştır (Şekil 4.44).



Şekil 4.44. 15 ve 30 gün mannan uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

Yaptığımız çalışmada mannan uygulaması, *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerinden sadece hiperosid elisitasyonunda çok az da olsa başarı sağlamıştır. 30 günlük uygulamada 100 mg/L mannan konsantrasyonunda hiperosid miktarında kontrole göre yaklaşık 1.3 katlık bir artış olmuştur. Mannan uygulaması hiperisinlerde (hiperisin ve pseudohiperisin) elisitasyon açısından flavonoidlere göre daha iyi sonuçlar vermiştir. 15 günlük mannan uygulamasında 50 mg/L mannan pseudohiperisin miktarını 2.8 kat artırırken 30 günlük uygulamada 100 mg/L mannan artış 1.7 kat olmuştur. Ayrıca 15 günlük uygulamada 50 mg/L mannan içeren ortamda hiperisin miktarı kontrole göre yaklaşık 1.7 katlık bir artış göstermiştir. Bu sonuçlar mannanın *H. adenotrichum in vitro* fidelerinde özellikle pseudohiperisin üretimi için pektin kadar olmamasına rağmen değerlendirilebilecek bir elisitör olduğunu göstermektedir.

H. perforatum in vitro sürgün kültürlerinde mannan 0.05-0.1 mg/ml seviyelerinde hem hiperisin hem de pseudohiperisin üretimini stimule etmiştir. Mannanın 0.1 mg/ml seviyesinde pseudohiperisin üretimi, kontrol sürgün kültürlerinden yaklaşık 4 kat daha fazla bulunmuştur. Mannanın aynı konsantrasyonunda hiperisin üretimi, kontrolden 2 kat daha yüksek olmuştur. Mannanın 0.5 mg/ml'de pseudohiperisin üretimi, kontrole göre 3 kat daha fazladır (Kirakosyan vd., 2000). *H. perforatum* kallus kültürlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Vardapetyan vd., 2006). Mannan, *H. perforatum in vitro* kültürlerinde *H. adenotrichum in vitro* kültürlerine göre daha iyi bir elisitasyon sağladığı görülmektedir.

4.3.4.3. Krom (Cr) uygulaması

Ağır metaller bitki büyümesi üzerinde birçok direkt ve indirekt etkilere yol açar ve bitkinin birçok fizyolojik fonksiyonlarını etkilerler (Rajalakshmi vd., 2010). Ağır metal tuzları aynı zamanda kimyasal abiyotik elisitörlerdir. (Vasconsuelo ve Boland, 2007). Krom bir ağır metaldir. Krom ve onun bileşikleri birçok endüstriyel kullanıma sahiptir. Krom bileşikleri deri işlemede, paslanmaz çelik üretiminde, metal kaplamada, boya pigmenti ve kromik asit üretiminde, elektro kaplamada ve ahşap korumada kullanılmaktadır (Barnhart, 1997; Shanker vd., 2005). Krom bitkiler için gerekli olmayan toksik bir elementtir ve bu yüzden bitkiler krom alımı için spesifik mekanizmalara sahip değildir. Kromun stabil formları trivalent Cr (III) ve heksavalent Cr (VI) türlerdir ve Cr(VI), Cr (III)'e göre daha toksiktir. (Shanker vd., 2005). Krom bitkilerde toksisiteye yol açarak

birkaç metabolik sürece engel olur ve kök büyümesi ve biomasının azalmasına, klorozis, fotosentetik bozulma ve en sonunda bitki ölümüne yol açar (Panda ve Choudhury, 2005; Vernay vd., 2008). Krom bitkilerde reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olarak oksidatif strese neden olur. Oksidatif streste hem enzimatik (CAT, SOD vb.) hem de enzimatik olmayan (glutasyon, askorbat vb.) antioksidatları içeren antioksidant metabolizmayı indükler (Panda ve Choudhury, 2005). Çeşitli bitki türlerinde ağır metal iyonlarının sekonder metabolit birikimini indüklediğine dair pek çok çalışma rapor edilmiştir (Mithöfer vd., 2004).

Hiperisinlerin ve flavonoidlerin birikimi üzerine, yaygın bir çevresel abiyotik kontaminant olan kromun potansiyel etkisini belirlemek için krom *H. adenotrichum in vitro* fidelerine uygulanmıştır. Yaptığımız çalışmada 0.01 ve 0.1 mM Cr konsantrasyonlarına 15 ve 30 gün boyunca maruz bırakılmış *H. adenotrichum in vitro* fidelerinin sekonder metabolit miktarları, kültür süresine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 15 gün Cr uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.29'de, 30 gün Cr uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimleri çizelge 4.30'da gösterilmiştir.

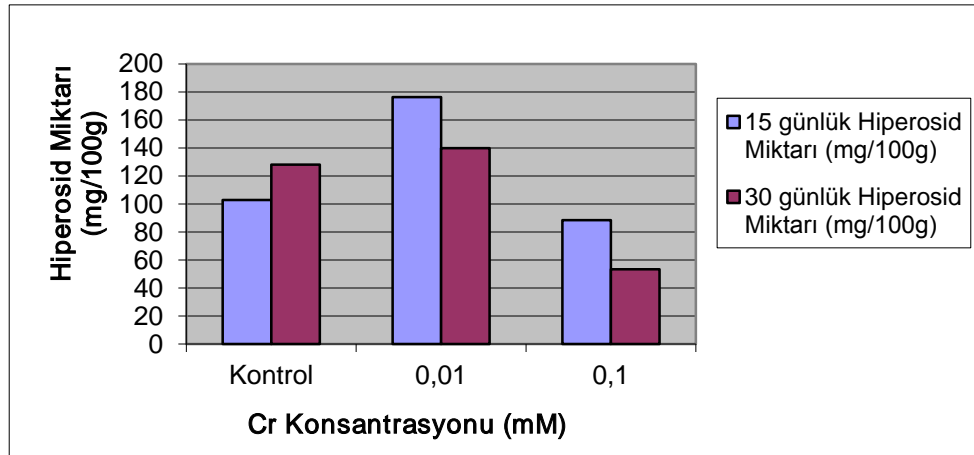
Çizelge 4.29. 15 gün Cr (mM) uygulamasına bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a)

	Kontrol	0,01 Cr	0,1 Cr
Hiperosid	102.8	176.3	88.4
İzokuersitrin	10.7	19.7	8.5
Pseudohiperisin	5.6	12.7	7.2
Hiperisin	5.5	9.6	8.2

Çizelge 4.30. 30 gün Cr (mM) uygulaması bağlı sekonder metabolit değişimi (mg/100g k.a.)

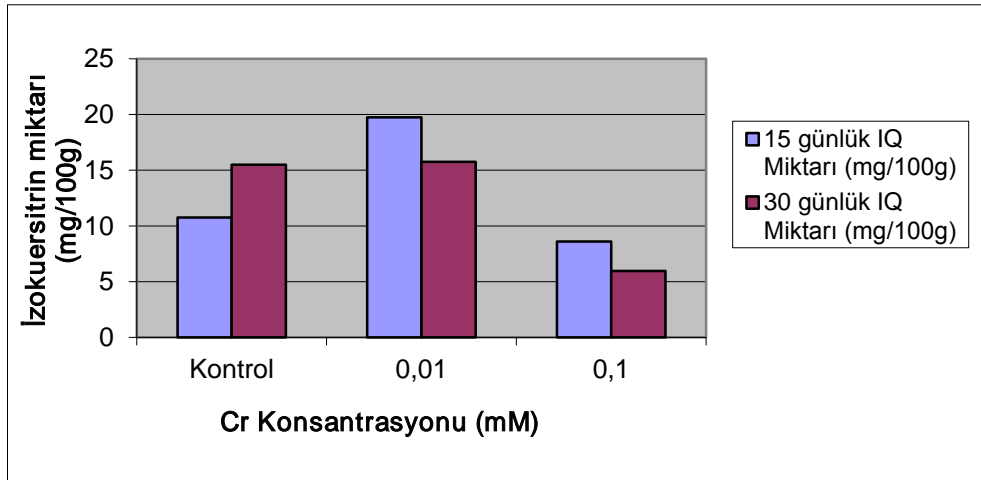
	Kontrol	0.01 Cr	0.1 Cr
Hiperosid	128.0	139.9	53.3
İzokuersitrin	15.4	15.7	5.9
Pseudohiperisin	7.3	9.9	7.1
Hiperisin	7.2	7.7	6.9

15 günlük krom uygulaması sonucu hiperosid konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 0.01 mM krom konsantrasyonunda yükselmiş, 0.1 mM krom içeren ortamda ise düşmüştür. 0.01 mM krom konsantrasyonunda hiperosid miktarı kontrole göre 1.7 kat artıştır. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında hiperosid konsantrasyonu 0.01 mM krom konsantrasyonunda kontrole göre hafif bir artış göstermiş 0.1 mM kromda ise yaklaşık yarı yarıya bir düşüş olmuştur. (Şekil 4.45).



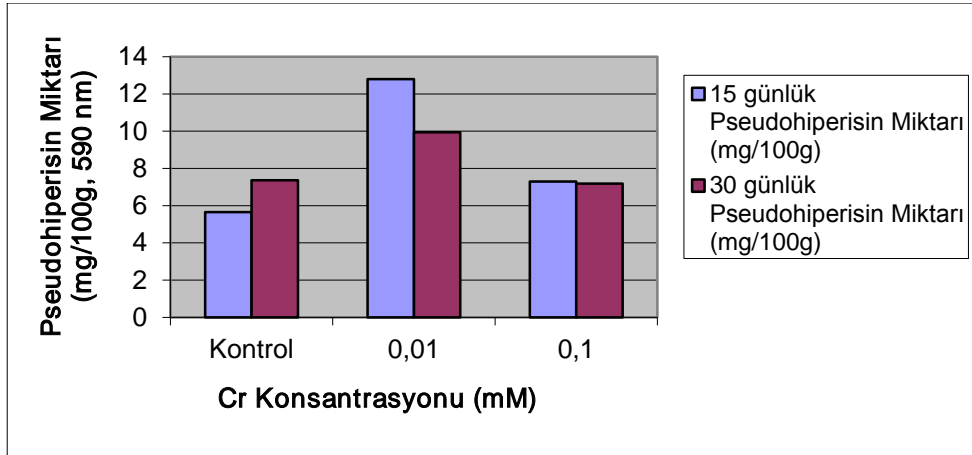
Şekil 4.45. 15 ve 30 gün Cr uygulamasına bağlı hiperosid değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük krom uygulaması sonucu izokuersitrin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 0.01 mM krom konsantrasyonunda yükselmiş, 0.1 mM krom içeren ortamda ise hafif bir düşüş göstermiştir. 0.01 mM krom konsantrasyonunda izokuersitrin miktarı kontrole göre 1.8 kat artmıştır. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında izokuersitrin konsantrasyonu 0.01 mM krom konsantrasyonunda değişmemiş, 0.1 mM kromda ise yaklaşık 3 katlık bir düşüş olmuştur. (Şekil 4.46).



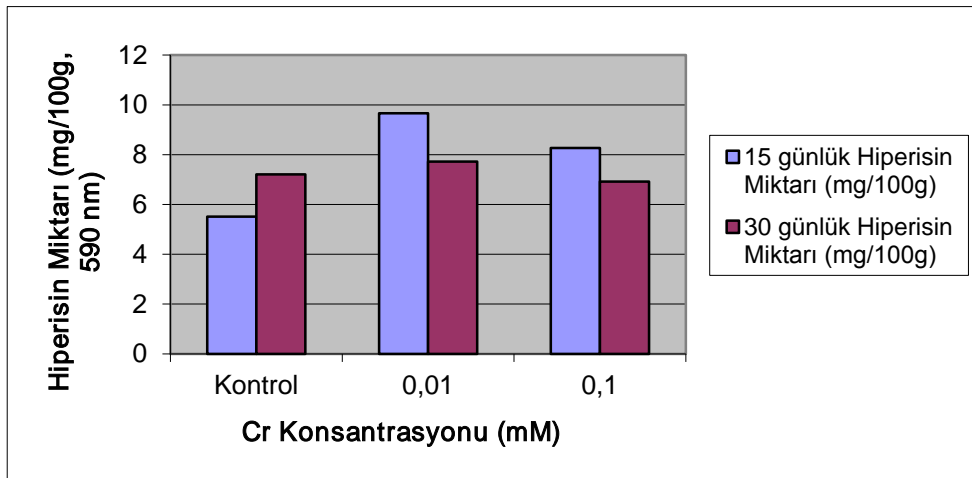
Şekil 4.46. 15 ve 30 gün Cr uygulamasına bağlı izokuersitrin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük krom uygulaması sonucu pseudohiperisin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 0.01 mM krom konsantrasyonunda yükselmiş, 0.1 mM krom içeren ortamda ise 0.01 mM kroma göre bir düşüş olmuş fakat kontrolden yüksek kalmıştır. 0.01 mM krom konsantrasyonunda pseudohiperisin miktarı kontrole göre yaklaşık 2.2 kat artmıştır. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında pseudohiperisin miktarı 0.01 mM krom konsantrasyonunda hafif yükselmiş, 0.1 mM kromda ise değişmemiştir. (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. 15 ve 30 gün Cr uygulamasına bağlı pseudohiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

15 günlük krom uygulaması sonucu hiperisin konsantrasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında 0.01 mM krom konsantrasyonunda yükselmiş, 0.1 mM krom içeren ortamda ise 0.01 mM kroma göre bir düşüş olmuş fakat kontrolden yüksek kalmıştır. 0.01 mM krom konsantrasyonunda hiperisin miktarı kontrole göre yaklaşık 1.7 kat artmıştır. Uygulama süresi 30 güne çıkarıldığında miktarı hiperisin miktarlarında önemli bir değişim olmamıştır. (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. 15 ve 30 gün Cr uygulamasına bağlı hiperisin değişimlerinin grafiksel karşılaştırmaları

Yaptığımız çalışmada krom uygulaması, *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerin (hiperosid ve izokuersitrin) elisitasyonunda çok az da olsa başarı sağlamıştır. 15 günlük uygulamalarda 0.01 mM krom konsantrasyonlarında hiperosid ve izokuersitrin miktarları sırasıyla 1.7 ve 1.8 kat artış göstermiştir. 30 günlük uygulamalarda 0.01 mM krom uygulamalarında önemli bir değişim olmamıştır. Hem 15 hemde 30 günlük 0.1 mM krom uygulamalarında flavonoid miktarları önemli ölçüde düşmüştür. 15 günlük krom uygulaması hiperisinler ve özellikle pseudohiperisin elisitasyonunda başarılı olmuştur. 15 günlük krom uygulamasında 0.01 mM krom pseudohiperisin miktarını 2.2 kat hiperisin miktarını ise 1.7 kat arttırmıştır. 30 günlük krom uygulamaları hiperisinlerin üretiminde önemli bir değişime yol açmamıştır.

Tirillini vd. (2006), *Hypericum perforatum* fidelerinin büyüme ortamlarına 0.01 ve 0.1 mM krom ilave etmişlerdir. Yedi gün 0.01 mM Cr(VI) uygulaması, protopseudohiperisin (+ %135), hiperisin (+ %38) ve pseudohiperisin (+ %5) üretimini arttırmıştır. İki gün kadar 0.1 mM Cr(VI) uygulaması ise, protopseudohiperisin (+ %167), hiperisin (+ %25) ve pseudohiperisin (+ %5) miktarını farklı oranlarda arttırmıştır. Krom uygulamasının en büyük etkisi, 7 gün kadar 0.1 mM konsantrasyonda gözlenmiştir; protopseudohiperisin % 404 ve pseudohiperisin %379 oranında artmıştır. Hiperisin bu uygulamadan etkilenmemiştir. *H. perforatum in vitro* fidelerinde yapılan bu çalışmada bizim çalışmamızın tersine 0.1 mM kromun uygulması hiperisinlerin üretiminde daha etkili olduğu görülmektedir. Bunda uygulama süreleri etkili olmuş olabilir. Krom'un (IV) *Datura innoxia*'da prolin ve scopolamine üretimini (Vernay vd., 2008) *Ocimum tenuiflorum*'da prolin ve eugenol üretimini (Rai vd., 2004) arttırdığı rapor edilmiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, endemik ve tıbbi bitki olarak potansiyel önemi olan *H. adenotrichum*'un tohum ve vejetatif kısımları ile ilgili çalışmalar yapılmış ve bazı stres ve elisitör uygulamalarının *in vitro* koşullarda bu bitkinin sekonder metabolitlerinin üretimi üzerine etkileri çalışılmıştır. Bu kapsamda, öncelikle bitkinin tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine etkili parametreler belirlenmiştir. Daha sonra bitkinin vejetatif kısımları kullanılarak *in vitro* çoğaltımı için uygun bir protokol tanımlanmıştır. Ayrıca PEG, sukroz, mannan, pektin ve krom elisitörleri, bitkinin *in vitro* fidelerine uygulanarak bitkideki önemli sekonder metabolitlerden hiperisinlerin ve bazı flavonoidlerin üretimi arttırılmıştır.

H. adenotrichum tohumları ile ilgili yapılan çalışmalarda, tohumların yüzdürme tekniğine göre, %67'ünün boş, %33'ünün ise dolu olduğu belirlenmiştir. Bu değerler, tohumları tek tek kesip bakarak yaptığımız boş-dolu tohum sayımında elde ettiğimiz yaklaşık %70 boş, %30 dolu tohum sonuçları ile hemen hemen örtüşmektedir. Yüzen tohumlar ile ilgili yapılan bütün denemelerde hiçbir tohum çimlendirilememiştir. Bu durum yüzdürme tekniğinin başarılı olduğunu ve amacına ulaştığını göstermektedir. Embriyo canlılığını belirlemek için yapılan tetrazolium testinde embriyoların tamamının canlı olduğu gözlenmiştir. *H. adenotrichum* tohumlarının sterilizasyonu için en iyi yöntemin, tohumların 30 dakika musluk suyu altında yıkandıktan sonra, sırası ile 1 dakika % 70 lik etil alkol ve 5 dakika 1-2 damla tween 80 ilaveli %2.25'lik 'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit) uygulaması ardından 3 kez steril distile su ile durulanması olduğu tespit edilmiştir. *H. adenotrichum* tohumları için in iyi çimlenme yüzdesine, stratifikasyon uygulanmış tohumların ¼ MS (%75), ¼ MS/B5 (%70), ¼ MS/Galzy (%70) ortamlarında 18 °C'ta ve 16/8 fotoperiyot altında çimlendirilmesi ile elde edilmiştir. Karanlık ortamda, ortam x sıcaklık ve ortam x sıcaklık x stratifikasyonun çimlenme yüzdesi üzerine ortak etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu yani çimlenme üzerine ortak bir etkileşime sahip oldukları belirlenmiştir. Fotoperiyotlu ortamlarda, ortam x stratifikasyon, ortam x sıcaklık ile sıcaklık x stratifikasyon ve ortam x sıcaklık x stratifikasyonun çimlenme yüzdesi üzerindeki ortak etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu yani bu faktörlerin çimlenme üzerine ortak bir etkileşime sahip oldukları belirlenmiştir.

Hypericum türlerinin tohumları ile ilgili yapılmış bazı çalışmalarda tohum çimlenme oranlarının genelde düşük olduğu belirtilmiş ve bu durum genelde endojen ve ekzojen dormansiye bağlanmıştır. Bizim yaptığımız çalışmalar dormansi ile ilgili verileri desteklemesine rağmen, tohumların yüzdürülerek boş-dolu tohum ayırımının yapılmasının da çimlenme oranının arttırılmasında çok önemli bir parametre olarak göz önüne alınması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır. Literatürde çimlenme öncesi *Hypericum* türlerinde boş-dolu tohum ayırımının yapıldığına dair bir veriye rastlanmamıştır. Ayrıca çalışmamız bir *Hypericum* türünde, ışık, karanlık, sıcaklık, stratifikasyon ve ortam şartlarının çimlenme üzerine etkilerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz veriler konu ile ilgili yapılacak çalışmalara bir ışık tutacağı düşünülmektedir.

H. adenotrichum in vitro fideleri için en iyi gelişim ortamının ¼ MS/Galzy ortamı olduğu blirlenmiştir. ¼ MS/Galzy ortamı fide başına ortalama sürgün sayısı, ortalama yan kök sayısı, ortalama sürgün uzunluğu ve sürgün başına ortalama yaprak sayısı bakımından en iyi sonuçların gözleendiği ortam olmuştur.

BA, KIN, TDZ, NAA ve 2.4-D'nin farklı konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamlarında kültüre alınan *H. adenotrichum*'un yaprak eksplantlarında kallus indüksiyon oranına ait farklı sonuçlar elde edilmiştir. KIN'nin farklı konsantrasyonlarında tek başına ilave edildiği MS temel besi ortamlarında, eksplantlardan kallus indüksiyonu gözlenmemiştir. BA'nın tek başına kullanıldığı ortamlarda, eksplantlardan kallus indüksiyonunu sağlanmıştır. Eksplantlar 3 mg/L BA (%80) içeren ortamlarda en yüksek kallus indüksiyon oranına sahiptir. TDZ'nin farklı konsantrasyonlarda tek başına ilave edildiği MS besi ortamlarında, eksplantlardan kallus indüksiyonu sağlanmıştır. 1 mg/L TDZ (%90) en yüksek kallus indüksiyon oranına sahiptir. Eksplantlar 1 mg/L TDZ (%90) ve 0.5 mg/L TDZ (%80) içeren ortamlarda en yüksek kallus indüksiyon oranına sahiptir. BA ve KIN'in farklı konsantrasyonlarının, NAA'nın 0.2 mg/L'lik konsantrasyonu ile kombineli olarak kullanıldığı MS ortamlarına aktarılan eksplantlardan kalluslar elde edilmiştir. KIN içeren ortamlarda en yüksek kallus indüksiyon oranı 2 mg/L KIN + 0.2 mg/L NAA (%80) içeren ortamda gözlenmiştir. BA içeren ortamlarda en yüksek kallus indüksiyon oranına 4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA (%95) içeren MS ortamında kültüre edilen eksplantların sahip olduğu görülmüştür. Kallus oluşturan ortamlar beraber değerlendirildiğinde, en yüksek kallus indüksiyon oranına 4 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA (%95) içeren MS ortamında kültüre edilen eksplantların sahip olduğu görülmüştür.

Kalluslardan sürgün rejenerasyonu için en iyi kallus başına ortalama sürgün sayısı, BA'nın tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarından elde edilen kallusların, 0.5 mg/L KIN içeren MS besi ortamında kültüre edilmesi ile elde edilmiştir. Ayrıca kallus indüksiyon ortamında kullanılan BA konsantrasyonlarının da kallus başına sürgün sayısı üzerine önemli etkileri olmuştur. En yüksek kallus başına sürgün sayısı 3 mg/L BA'dan (35.6) elde edilen kallusların, 0.5 mg/L KIN içeren ortamlarda kültüre edilmesi sonucunda gözlenmiştir.

H. adenotrichum'un yaprak eksplantları, KIN'in tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarında, bir kallus aşaması olmaksızın, önce sürgün tomurcukları sonra bu tomurcuklardan sürgün oluşturmuşlardır. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (7.8, sürgün/eksplat) 1 mg/L KIN içeren MS ortamından elde edilmiştir.

H. adenotrichum'un *in vitro* ortamda elde edilmiş direkt ve indirekt sürgünlerinden, KIN'in tek başına kullanıldığı MS besi ortamlarında, aksiller sürgün rejenerasyonu sağlanmıştır. Eksplant başına en yüksek aksiller sürgün sayısı (4.6, sürgün/eksplat) 0.5 mg/L KIN içeren MS ortamından elde edilmiştir.

H. adenotrichum'un aksiller sürgünlerden 0.5 mg/L IAA içeren makro ½ MS ve makro ¼ MS ortamlarında %25 oranında kök oluşumu gerçekleşmiştir. Makro ½ MS ortamında gelişen bitkicikler sera şartlarına başarılı bir şekilde alıştırılırken, makro ¼ MS ortamında gelişen bitkicikler dış ortama alıştırılamamıştır.

H. adenotrichum'un *in vitro* doku kültürü teknikleri aracılığı ile çoğaltılmasına yönelik olarak yaptığımız çalışma ilk olma niteliği taşımaktadır. Gerek kallus kültürleri gerekse adventif ve aksiller sürgün rejenerasyonu gibi *in vitro* teknikler ile endemik ve tıbbi açıdan önemli bileşikler içeren *H. adenotrichum* için ileride oluşabilecek herhangi bir tehdit durumunda, bitkinin çoğaltılmasına ilişkin alternatif bir çoğaltım prosedürü oluşturulmuştur. Ayrıca belirlediğimiz *in vitro* metotlar kullanılarak bitki ile ilgili olarak gerçekleştirilebilecek genetik, biyokimyasal, fizyolojik ve sekonder metabolitlerinin üretimine yönelik çalışmalar için, mevsimsel varyasyonlardan, bakteri, fungus ya da diğer mikroorganizmalardan ari bitkisel materyal sağlanabilecektir.

Sekonder metabolitlerin elisitasyonununa yönelik yaptığımız çalışmalardan PEG uygulaması *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerin

(hiperosid ve izokuersitrin) elisitasyonunu çok fazla etkilememiştir. En yüksek olarak, sadece 15 günlük 10 g/L PEG uygulaması izokuersitrin konsantrasyonunda kontrole göre yaklaşık 1.3 katlık bir artış sağlamıştır. PEG uygulaması hiperisinlerde (hiperisin ve pseudohiperisin) flavonoidlere göre daha iyi bir elisitasyon sağlamıştır. 15 günlük 10 g/L PEG uygulaması pseudohiperisin miktarında kontrole göre yaklaşık 2.4 ve hiperisin miktarında ise yaklaşık 2.1 katlık bir artış sağlamıştır.

Sukroz uygulaması, *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerden sadece izokuersitrinin elisitasyonunda çok az da olsa başarı sağlamıştır. 45 g/L sukroz konsantrasyonunda izokuersitrin miktarında kontrole göre yaklaşık 1.6 katlık bir artış olmuştur. Sukroz uygulaması hiperisinlerde (hiperisin ve pseudohiperisin) elisitasyon açısından önemli bir sonuç göstermemiş hatta 30 günlük sukroz uygulamasında en yüksek hiperisin ve pseudohiperisin miktarı kontrol bitkisinde gözlenmiştir.

Pektin uygulaması, *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerden sadece hiperosid elisitasyonunda çok az da olsa başarı sağlamıştır. 50 mg/L pektin konsantrasyonunda hiperosid miktarında kontrole göre yaklaşık 1.3 katlık bir artış olmuştur. Pektin uygulaması hiperisinlerde (hiperisin ve pseudohiperisin) elisitasyon açısından önemli sonuçlar vermiştir. 15 günlük pektin uygulamasında 50 mg/L pektin pseudohiperisin miktarını 4.8 kat arttırırken 30 günlük uygulamada artış 1.7 kat olmuştur. 15 günlük pektin uygulamasında 50 mg/L pektin hiperisin miktarını 2.8 kat arttırırken 30 günlük uygulamalarda pektin hiperisin miktarında önemli bir artış sağlamamıştır.

Mannan uygulaması, *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerden sadece hiperosid elisitasyonunda çok az da olsa başarı sağlamıştır. 30 günlük uygulamada 100 mg/L mannan konsantrasyonunda hiperosid miktarında kontrole göre yaklaşık 1.3 katlık bir artış olmuştur. Mannan uygulaması hiperisinlerde (hiperisin ve pseudohiperisin) elisitasyon açısından flavonoidlere göre daha iyi sonuçlar vermiştir. 15 günlük mannan uygulamasında 50 mg/L mannan pseudohiperisin miktarını 2.8 kat arttırırken 30 günlük uygulamada 100 mg/L mannan artış 1.7 kat olmuştur. Ayrıca 15 günlük uygulamada 50 mg/L mannan içeren ortamda hiperisin miktarı kontrole göre yaklaşık 1.7 katlık bir artış göstermiştir.

Krom uygulaması, *H. adenotrichum in vitro* kültürlerinde analiz edilen flavonoidlerin (hiperosid ve izokuersitrin) elisitasyonunda çok az da olsa başarı sağlamıştır. 15 günlük uygulamalarda 0.01 mM krom konsantrasyonlarında hiperosid ve izokuersitrin miktarları sırasıyla 1.7 ve 1.8 kat artış göstermiştir. 15 günlük krom uygulaması hiperisinler ve özellikle pseudohiperisin elisitasyonunda başarılı olmuştur. 15 günlük krom uygulamasında 0.01 mM krom pseudohiperisin miktarını 2.2 kat hiperisin miktarını ise 1.7 kat arttırmıştır.

Sekonder metabolitlerin elisitasyonununa yönelik yaptığımız çalışma *H. adenotrichum* bitkisi için ilk olma niteliği taşımakta ve bu konuda daha ayrıntılı çalışmaların yapılması için öncülük edebilecek niteliktedir. *In vitro* fideler kullanılarak yapılan bu çalışma, *Hypericum* türlerinin stres şartları altında davranışlarına ait bilgilerimize katkıda bulunmuştur ve elde ettiğimiz veriler çalışılan sekonder metabolitlerin sentez yollarının ve bunu etkileyen faktörlerin anlaşılması için kullanılabilir. Ayrıca ileride farmasötik endüstrisi ve geleneksel tıp için *H. adenotrichum*'un üretimine yönelik kullanılacak tarım teknolojileri ve deneysel botanik uygulamaları için çok yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdin, M.Z., Israr, M.R.U., Rehman, S. K., Jain, S.K. 2003. Artemisinin a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. **Planta Medica**, 69: 289-299.
- Abreu, N., Mazzafera, I. P. 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43: 241-248.
- Agrawal, P.K. 1986. Tetrazolium test for seed viability. In: Seed production technology (Srivastava, J.P. and Simarski, L.T., Eds.), ICARDA, pp: 184-189, Syria.
- Al-Khayri J.M. 2001. Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, 37: 453-456.
- Amritphale, D., Iyengar, S., Sharma, R.K. 1989. Effect of light and storage temperature on seed germination in *Hygrophila auriculata* (Schumach.) Haines. **Journal of Seed Technology**, 13: 39-43.
- Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W. 2006. Elicitation of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 20(2): 72-83.
- Arechiga, M.R., Alam, O.S., Carlos, V.Y. 1997. Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlan Valley in Puebla, Mexico. **Journal of Arid Environments**, 36: 571-578.
- Asada, K. 1996. Production and scavenging of radicals. In: Photosynthesis and the Environment, (Baker, N.R., Ed.), vol. 5, Kluwer Academic.
- Avato, P., Guglielmi, G. 2004. Determination of major constituents in st. john's wort under different extraction conditions. **Pharmaceutical Biology**, 42(1): 83-89.
- Avşar, M.D. 2002. Dalı Servide (*Cupressus sempervirens* L. var. *horizontalis* (Mill.) Gord.) Suda Yüzdürme ile Dolu Tohumların Ayrılabilmesinde Yüzdürme Tekniği ve Süresinin Etkileri. **KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi**, 5(2): 28-36.
- Ayan, A.K., Çırak, C., Kevseroğlu. K., Somken, A. 2005. Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 29: 197-204.

- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. 2001. Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları. I. Baskı, Selçuk Üniversitesi Basımevi, KONYA.
- Bacila, I., Coste, A., Halmagyi, A., Deliu, C. 2010. Micropropagation of *Hypericum maculatum* Cranz an important medicinal plant. **Romanian Biotechnological Letters**, 15(1): 86–91.
- Bais, H.P., Vepachedu, R., Lawrence, C.B., Stermitz, F.R., Vivanco, J.M. 2003. Molecular and biochemical characterization of an enzyme responsible for the formation of hypericin in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). **Journal of Biological Chemistry**, 278: 32413–32422.
- Bais, H.P., Walker, T.S., McGrew, J.J., Vivanco, J.M. 2002. Factors affecting growth of suspension culture of *Hypericum perforatum* L. and production of hypericin. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 38: 58-65.
- Barnes, L.R. 1979. *In vitro* propagation of watermelon. **Scientia Horticulturae**, 11: 223-227.
- Barnhart, J. 1997. Occurrences, uses, and properties of chromium. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 26: S3–S7.
- Baruah, A., Sarma, D., Saud, J., Singh, R.S. 2001. *In vitro* regeneration of *Hypericum patulum* Thunb.—a medicinal plant. **Indian Journal of Experimental Biology**, 39(9): 947–949.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M. 1988. Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperature region. **American Journal of Botany**, 75: 286-305.
- Beerhues, L. 2006. Molecules of interest – hyperforin. **Phytochemistry**, 67: 2201–2207.
- Bewley, J.D., Black, M. 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. II. Viability, dormancy and environmental control. Springer-Verlag, pp.375, Berlin.
- Bewley, J.D., Black, M. 1994. Seeds. In: Physiology of Development and Germination. 2nd edn. Plenum Press, pp. 445, New York.
- Beyl, C.A. 2005. Getting Started with Tissue Culture: Media Preparation, Sterile Technique, and Laboratory Equipment. In: Plant Development and Biotechnology. (Gray, D.J., Trigiano,R.N., Ed.), CRC Pres, pp.19-37, U.S.A..

- Bezo, M., Stefunova, V. 2001. Indirect regeneration of *Hypericum perforatum* L. under *in vitro* conditions. **Acta Fytotechnica et Zootechnica**, 4: 277-279.
- Bonner, F.T., Vozzo, J.A., Elam, W.W., Land, S.B. 1994. Tree seed technology training course. Instructor's manual. Gen. Tech. Rep. SO-106. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, pp. 160, New Orleans, LA: U.S.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites : a historical perspective. **Plant Science**, 161(5): 839-851.
- Brolis, M., Gabetta, N., Fuzzati, R., Pace, R., Panzeri, F., Peterlongo, F. 1998. Identification by high-performance liquid chromatography- diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography- UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. **Journal of Chromatography A**, 825: 9-16.
- Butterweck, V. 2003. Mechanism of action of St. John's wort in depression. **CNS Drugs** 17: 539-562.
- Campbell, M.M. 1985. Germination, emergence and seedling growth of *Hypericum perforatum* L. **Weed Research**, 25: 259-266.
- Cardoso, M.A., de Oliveira D.E. 1996. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 44: 91-94.
- Cellárová, E., Kimáková, K., Brutóvská, R. 1992. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and variability of R₀. **Biology of Plant**, 34 (Suppl.): 536.
- Cellárová, E., Kimáková, K. 1999. Morphoregulatory effect of plant growth regulators on *Hypericum perforatum* L. seedlings. **Acta Biotechnologica**, 19: 163-169.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. K., Bisaria, V. S. 2002. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 7: 138-149.
- Chawla, H.S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology 2nd rev. ed. Science Publishers Inc., p. 750 Enfield, New Hampshire.

- Colbach, N., Chauvel, B., Dürr, C., Richard, G. 2002. Effect of environmental conditions on *Alopecurus myosuroides* germination. I. Effect of temperature and light. **Weed Research**, 42: 210-221.
- 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 and Organ Culture**, 106(2): 279-288.
- Crockett, S.L., Poller, B., Tabanca, N., Pferschy-Wenzig, E.M., Kunert, O., Wedge, D.E., Bucar, F. 2010. Bioactive xanthenes from the roots of *Hypericum perforatum* (common St John's wort). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91(3): 428-34.
- Crockett, S.L., Schaneberg, B., Khan, I.A. 2005. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's Wort) species. **Phytochem. Anal.** 16: 479-485.
- Çırak, C., Ayan, A., Kevseroglu, K., Çalışkan, O. 2004. Germination rate of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) seeds exposed to different light intensities and illumination periods. **Journal of Biological Sciences**, 4: 279-282.
- Çırak, C. 2006. Farklı Doku Kültürü Uygulamalarının İki Kantaron Türünde (*Hypericum perforatum* ve *H. bupleuroides*) Mikroçoğaltım Yeteneği Ve Hiperisin İle Toplam Fenolik Birikimi Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 81 s., Samsun.
- Çırak, C. 2007a. Seed germination protocols for *ex situ* conservation of some *Hypericum* species from Turkey. **American Journal of Plant Physiology**, 2: 287-294.
- Çırak, C., Kevseroğlu, K., Ayan, A.K., 2007b. Breaking of seed dormancy in a Turkish endemic *Hypericum* species: *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* by light and some pre-soaking treatments. **Journal of Arid Environments**, 68:159-164.
- Çırak, C., Ayan, A.K., Kevseroğlu, K. 2007c. Direct and indirect regeneration of plants from internodal and leaf explants of *Hypericum bupleuroides* Gris. **Journal of Plant Biology**, 50(1) : 24-28.
- Çırak, C., Ivanauskasb, L., Janulisb, V., Radusiene, J. 2009. Chemical constituents of *Hypericum adenotrichum* Spach, an endemic Turkish species. **Natural Product Research**, 23(13): 1189-1195.

- Danova, K., Čellárová, E., Macková, A., Daxnerová, Z., Kapchina-Toteva, V. 2010. *In vitro* culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 46: 422–429.
- Demirci, B., Baser, K.H.C. 2005. Analysis of the volatile constituents of Asian *Hypericum* L. (*Clusiaceae*, *Hyperidoideae*) species. **Journal of Essential Oil Research**, 17: 659-663.
- Dicosmo, F., Misawa, M. 1995. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. **Biotechnology Advances**, 13: 425-453.
- Dixon, R.A., Paiva, N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, 7: 1085–1097.
- Dörnenburg, H., Knorr, D. 1994. Effectiveness of plant-derived and microbial polysaccharides as elicitors for anthraquinone synthesis in *Morinda citrifolia* cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42:1048–52.
- Ebrahim, N., Shibli, R., Makhadmeh, I., Shatnawi, M., Abu-Ein, A. 2007. *In vitro* propagation and *in vivo* acclimatization of three coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) from Yemen. **World Applied Sciences Journal**, 2 (2): 142-150.
- Erken, S., Malyer, H., Demirci, F., Başer, K.H.C. 2001. Chemical investigations on some *Hypericum* species growing in Turkey-I. **Chemistry and Natural Compounds**, 37(5): 434-438.
- Eskling, M., Arvidsson, P.O., Akerlund, H.E., 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. **Physiologia Plantarum**, 100: 806–816.
- Fadel, D., Kintzios, S., Economou, A. S., Moschopoulou G. and Constantinidou, H.I.A. 2010. Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (*Mentha spicata* l.). **The Open Horticulture Journal**, 3: 31-35.
- Farmer, R.E., Charrette, P., Searle, I.E., Trajan, D.P. 1984. Interaction of light, temperature and chilling in the germination of black spruce. **Canadian Journal of Forest Research**, 14: 131-133.
- Faron, M., Perecin, M., Lago, A., Bovi, O., Maia, N. 2004. Temperatura, Nitrato de Potássio e Fotoperíodo na germinação de sementes de *Hypericum perforatum* L. e *H. brasiliense* Choisy. **Bragantia**, 63(2), 193-199.
- Felippe, G.M. 1978. Estudos de germinacao, crescimento e floracao de *Bidens pilosa* L. **Revista do Museo Paulista**, 25: 183-217.

- Flores-Sánchez, I.J., Ortega-López, J., Montes-Horcasitas, M.C., Ramos-Valdivia, A.C. 2002. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. **Plant Cell Physiology**, 43(12): 1502–1509.
- Fonnesbach, A., Fonnesbach, M. 1980. *In vitro* propagation of *Monstera deliciosa*. **Horticultural Sciences**, 15(6): 740-741.
- Fotie, J., Bohle, D.S. 2006. Pharmacological and biological activities of xanthones. **Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry**, 5: 15–31.
- Fowke, L.C., Attree, S.M., Pomeroy, M.K. 1994. Production of vigorous desiccation-tolerant white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.] synthetic seeds in a bioreactor. **Plant Cell Reports**, 13: 601-606.
- Franklin, G. and Dias, A. C. P. 2006. Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant**, 42:324–330.
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C., Hagege, D. 2007. Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 89:1–13.
- Gadzovska, S., Maury, S., Ounnar, S., Righezza, M., Kascakova, S., Refregiers, M. 2005. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43: 591-601.
- Galzy, R. 1964. Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. **Ann Epiphyties**, 15: 245-256.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-158.
- Ganzer, M., Zhao, J., Khan, I.A. 2002. *Hypericum perforatum*— chemical profiling and quantitative results of St. John's Wort products by an improved high-performance liquid chromatography method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 91: 623–630.
- Gaudin, M., Simonnet, X., Debrunner, N. 2003. Colletotrichum gloeosporioides as the cause of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) dieback in Switzerland and breeding for a tolerant variety. In: *Hypericum: The Genus Hypericum* (Ernst, E., Eds.), Taylor and Francis, pp. 23–42, London, UK.

- Gaudin, M., Simonnet, X., Ryser, N.D. 2002. Breeding for a *Hypericum perforatum* L. variety both productive and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) tolerant. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, 9: 107-120.
- Gioti, E.M., Skalkos, D.C., Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D. 2005. Single-drop liquid-phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1093: 1–10.
- Glaser, V. 1999. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root. **Nature Biotechnology**, 17: 17-18.
- Gokhale, M., Bansal, Y.K. 2010. Assessment of secondary metabolites in *in vitro* regenerated plantlets of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 20(1): 21-28.
- Gonzalez-Martin M. 1995. Germinación y requerimientos de luz de especies del género *Hypericum* L. en la Islas Canarias. **Bot. Macaron**, 21: 43–49.
- Greenway, H., Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, 31: 149–190.
- Greeson, J., Sanford, B., Monti, D. A. 2001. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological and clinical literature. **Psychopharmacology**, 153: 402–414.
- Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Romdan, J., Band, S.R. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. **Journal of Ecology**, 69: 1017–1059.
- Grisebach, H. 1988. Induction of flavonoid biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures. In: **European Conference on Biotechnology, Scientific, technical and industrial challenges**, (7-8 November 1988), pp.23-27, Italy.
- Gruenwald, J. 1999. The world market for *Hypericum* products. **Nutraceuticals World**, 5: 22–25.
- Guedes, A. P. 2009. Essential Oils From Plants and *in vitro* Shoot Cultures of *Hypericum androsaemum* L., *H. perforatum* L. and *H. undulatum* Schousboe ex. Willd. Universidade do Minho, PhD thesis, Portugal.
- Guedes, R.C., Eriksson, L.A. 2005. Theoretical study of hypericin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 172: 293-299.

- Gulen, H., Eris, A. 2004. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. **Plant Science**,166: 739–744.
- Han, K.H., Gordon, M.P., Floss, H. 1999. Genetic transformation of *Taxus* (yew) to improve production of taxol. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Transgenic Trees 44* (Bajaj, Y.P.S., Eds.), **Springer-Verlag**, pp. 291-306, Berlin.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E. 1990. *Plant propagation: principles and practices*. 5th ed. Prentice Hall, pp. 770, California.
- Hopkins, W.G., Hüner N.P.A. 2004. *Introduction to plant physiology*. 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., pp. 560, USA.
- ISTA (International Seed Testing Association),1999. Biochemical test for viability. **Seed Science and Technology**, 27, supplement.
- Jamil, M., Lee, D.B., Jung, K.Y., Ashraf, M., Chun Lee, S., Rha, E. 2006. Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. **Journal of Central European Agriculture**, 7(2): 273-282.
- Jones, G.H., Ballou, C.E. 1969. Studies on the structure of yeast mannan. I. Purification and some properties of an α -mannosidase from an *Arthrobacter* species. **The Journal of Biological Chemistry**, 244: 1043-1051.
- Jordan, M., Humam, M., Bieri, S., Chriskn, P., Poblete, E., Munoz, O. 2006. *In vitro* shoot and root organizes, plant regeneration and production of tropane alkaloid in some species of *Schizanthus*. **Phytochemistry**, 67(6): 570-578.
- Julsing, M.K., Quax, W.J., Kayser, O. 2007. *The engineering of medicinal plants*. In: *Medicinal Plant Biotechnology*, (Kayser, O., Quax, M.K., Eds),. Wiley-VCH, pp 3-8, Weinheim, Germany.
- Kapaia, V.Y., Kapoora P. and Raoa I.U. 2010. *In vitro* propagation for conservation of rare and threatened plants of India –A Review. **International Journal of Biological Technology**,1(2):1-14.
- Karuppusamy, S., 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, 3: 1222-1239.
- Kaymakanova, M. 2009.Effect of salinity on germination and seed physiology in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 23(2): 326-329.

- Keller, M., Kollmann, J. 1999. Effects of seed provenance on germination of herbs for agricultural compensation sites. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 72: 87–99.
- Kim, S.I., Choi, H.K., Kim, J.H., Lee, H.S., Hong, S.S. 2001. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 28: 202–209.
- Kirakosyan, A. B., Vardapetyan, R. R., Charchoglyan, A. G., Yamamoto, H., Hayashi, H. and Inoue K. 2001. The Effect of cork pieces on pseudohypericin production in cells of *Hypericum perforatum* shoots. **Russian Journal of Plant Physiology**, 48(6): 816–819.
- Kirakosyan, A., Hayashi, H., Inoue, K., Charchoglyan, A., Vardapetyan, H. 2000. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. **Phytochemistry**, 53: 345-348.
- Kirakosyan, A., Sirvent, T., Gibson, D., Kaufman, P. 2004. The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* cultures of *Hypericum perforatum*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 39: 71-81.
- Kumar, P. 2004. Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. **Current Science**, 86(7) : 930-937.
- Laliberté, B. 1997. Botanic garden seed banks/genebanks worldwide, their facilities, collections and network. **Botanic Gardens Conservation News**, 2(9):18-23.
- Lemcoff, J.H., Ling, F., Neumann, P.M. 2006. Short episodes of water stress increase barley root resistance to radial shrinkage in a dehydrating environment. **Plant Physiology**, 127: 603-611.
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G., Last, R.L. 1993. *Arabidopsis* mutants are hypersensitive to UV-B radiation. **Plant Cell**, 5: 171–179.
- Li, J., Wang, T., Yang, X., Zhang, J. 2000. Study on the callus and cell culture of *Hypericum perforatum*. **Zhong Yao Cai**, 23(5): 249-51.
- Li, W., Fitzloff, J.F. 2001. High performance liquid chromatographic analysis of St. John's Wort with photodiode array detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, 765: 99–105.
- Lianes, A., Reinoso, H., Luna, V. 2005. Germination and early growth of *Prosopis strombulifera* seedlings in different saline solutions. **World Journal of Agricultural Sciences**, 1(2): 120–128.

- Liu, C.Z., Cheng, X.Y. 2008. Enhancement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in cell cultures of *Cistanche deserticola* by osmotic stress. **Plant Cell Reports**, 27: 357-362.
- Liu, X.N., Zhang, X.Q., Sun, J.S. 2007. Effects of cytokinins and elicitors on the production of hypericins and hyperforin metabolites in *Hypericum sampsonii* and *Hypericum perforatum*. **Plant Growth Regulation**, 53: 207–214.
- Macchia, N., Benvenuti, A., Angelini L. 1983. Germination characteristics of some seeds of medicinal plants. **Rastitel'nye-Resursy**, 21: 461-463.
- Makkar, H. P.S., Sidhuraju, P., Becker, K. 2007. Plant Secondary Metabolites Series: (Methods in Molecular Biology), vol. 393. Humana Press, pp. 130, Stuttgart, Germany.
- Maliro, M.F.A., Kwapata, M.B. 2000. Apomictic embryo development and survival in *Uapaca kirkiana* under *in vitro* and *in vivo* seed germination. **Scientia Horticulturae**, 83: 139-147.
- Mannila, M., Kim, H., Isaacson, C., Wai, C.M. 2002. Optimisation of supercritical fluid extraction for the separation of hyperforin and adhyperforin in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **Green Chemistry**, 4: 331-336.
- Mannila, M., Wai, C.M. 2003. Pressurized water extraction of naphthodianthrones in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **Green Chemistry**, 5: 387-391.
- Maraş, M., Çavuşoğlu, K., Aksöz, E., Kırındı T. 2004. Pektin, poligalakturonik asit ve liyofilize pektinaz enziminin yapısal analizi. **İtü Dergisi/c Fen Bilimleri**, 2(1): 3-10.
- Maya, P., Monzon, A., Ponce, M. 1988. Datos sobre la germinación de especies endémicas canarias. **Bot Macaron**, 16: 67–80.
- Mccue, K., Hanson, A., 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. **Trends Biotechnology**, 8(12): 358-362.
- Mederos, M.S. 1991. *In vitro* growth and multiplication of *Hypericum canariense* L. **Acta Horticulture**, 289: 133–135.
- Mederos, S., San Andrés, L., Luis, J.G. 1997. Rosmanol controls explants browning of *Hypericum canariense* L. during *in vitro* establishment of shoots. **Acta Societatis Botanical Poloniae**, 66: 347–349.

- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. **FEBS Letters**, 566:1–5.
- Montesano, M., Brander, G., Palva, T. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, 4(1): 73-79.
- Moura, M. 1998. Conservation of *Hypericum foliosum* Aiton, an endemic azorean species, by micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, 34: 244–248.
- Mujib, A., Samaj, J. 2006. Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Mulinacci, N., Giaccherini, C., Santamaria, A.R., Cantato, R., Ferrari, F., Valletta, A., Vincieri, F.F., Pasqua, G. 2008. Anthocyanins and Xanthones in the calli and regenerated shoots of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin, Frohlich) Borkh. **Plant Physiology and Biochemistry**, 46: 414–420.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473–497.
- Murch, S.J., Choffe, K.L., Victor, J.M.R., Slimmon, T.Y., Krishna, Raj, S., Saxena, P.K. 2000. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* cv. "Anthos"). **Plant Cell Reports**, 19: 576-581.
- Murch, S.J., Haq, K., Rupasinghe, H.P.V., Saxena, P.K. 2003. Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **Environmental and Experimental Botany**, 49: 251-257.
- Namli, S., Akbaş, F., Işıkalın, Ç., Ayaz, E., Başaran, T., Başaran, D. 2010. The effect of different plant hormones (PGRs) on multiple shoots of *Hypericum retusum* Aucher. **Plant Omics Journal**, 3(1): 12-17.
- Namli, S., Toker, Z., Işıkalın, Ç., Özen, H. Ç. 2009. Effect of UV-C on production of hypericin in *Hypericum triquetrifolium* Turra grown under *in-vitro* conditions. **Fresenius Environmental Bulletin**, 18(1): 123-128.
- Nasim, S.A., Aslam, J., Kapoor, R., Khan, S.A., 2010. Secondary metabolites production through biotechnological intervention. A Review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 22 (3): 147-161.

- National Centre for Complementary and Alternative Medicine, 2002. Questions and answers: A trial of St. john's wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of major depression. (<http://nccam.nih.gov/news/2002/stjohnswort/sjwqa>), Erişim tarihi:05.06.2011.
- Nunez-Palenius, H.G., Cantliffe, D.J., Klee, H.H., Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagon, R., Perez-Molphe, E. 2005. Methods in plant tissue culture. In: Food Biotechnology, (Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E.), CRC Press, pp. 553-601, New York.
- Oertli, J.J. 1985. The response of plant cells to different forms of moisture stress. **Journal of Plant Physiology**. 121: 295–300.
- Oksman-Caldentey, K.M., Inze, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, 9: 433–440.
- Oluk, E. A., Orhan, S., Karakaş, Ö., Çakır, A., and Gönüz A. 2010. High efficiency indirect shoot regeneration and hypericin content in embryogenic callus of *Hypericum triquetrifolium* Turra. **African Journal of Biotechnology**, 9(15): 2229-2233
- Oluk, E.A. and Orhan S. 2009. Thidiazuron induced micropropagation of *Hypericum triquetrifolium* Turra. **African Journal of Biotechnology**, 8 (15): 3506-3510.
- Omidbaigi, R., Bernáth, J. 1993. Correlation between cutting size and growth of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). **Acta Horticulturae**, 331: 265-268.
- Orth, H.C., Rentel, C., Schmidt P.C. 1999. Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 51: 193–200.
- Osińska, E., Suchorska-Tropiło, K. 2002. The effect of temperature on seed germination of four species of *Hypericum* genus. **Folia Horticulturae**, 14(2): 163-167.
- Özmen, A., Bauer, S., Gridling, M., Singhuber, J., Krasteva, S., Madlener, S., Vo, T.P., Stark, N., Saiko, P., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., Askin-Celik, T., Krenn, L., Krupitza, G. 2009. *In vitro* anti-neoplastic activity of the ethno-pharmaceutical plant *Hypericum adenotrichum* Spach endemic to Western Turkey. **Oncology reports**, 22(4): 845-852.

- Pages, G., Delaurent, C., Phan-Tan-Luu, R., Sergent, M. 2007. Different chemometric approaches to optimize the assay of St. John's Wort active ingredients. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 86: 159–167.
- Palmer, C.D., Keller W.A. 2011. Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 105:129–134.
- Panda, S.K., Choudhury, S. 2005. Chromium stress in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17(1): 95-102.
- Pasqua, G., Avato, P., Monacelli, B., Santamaria, A.R., Argentieri, M.P. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. **Plant Science**, 165: 977–982.
- Patwardhan, B., Vaidya, A.D.B., Chorghade, M. 2004. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current. Science**, 86(6): 789-799.
- Paunescu, A. 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. **Romanian Biotechnological Letters**, 14(1): 4095-4103.
- Pavlik, M., Vacek, J., Klejdus, B., Kuban, V. 2007. Hypericin and hyperforin production in St. John's wort *in vitro* culture: influence of saccharose, polyethylene glycol, methyl jasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 6147-6153.
- Perez-Garcia, F., Huertas, M., Mora, E., Pena, B., Varela, F., Gonzalez-Benito, M.E. 2006. *Hypericum perforatum* L. seed germination: interpopulation variation and effect of light, temperature, presowing treatments and seed desiccation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 53: 1187–1198.
- Philipson J.D. 1990. Plants as source of valuable products. In: Secondary products from plant tissue culture (Chalwood B.V. and Rhodes M.J., Eds.), Clarendon Press, Oxford, pp.1-21.
- Pinhatti, A.V., Nunes, J.M., Maurmann, N., Rosa, L.M.G., Poser, G.L., Rech, S.B. 2010. Phenolic compounds accumulation in *Hypericum ternum* propagated *in vitro* and during plant development acclimatization. **Acta Physiol Plant**, 32: 675–681.
- Preto, F.R., Santare´m, E.R. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 62: 107–113.

- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavarz, T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 37: 91-102.
- Rahman, M., Soomro, U.A., Zahoor-ul-Haq, M., Gul, S. 2008. Effects of NaCl salinity on wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **World Journal of Agricultural Sciences**, 4 (3): 398-403.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N., Mehrotra, S. 2004. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. **Plant Science**, 167: 1159–1169.
- Rajalakshmi, K., Kumar, P., Saravanakumar, A., Aslam, A., Shahjahan, A., Ravikumar, R. 2010. Arachis bioassay for soil contaminated with hexavalent chromium. **Recent Research in Science and Technology**, 2(6): 110-115.
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2nd Edition. Science Pub Inc., pp.375, USA.
- Rehman, S., Park, H. 2000. Effect of scarification, GA and chilling on the germination of golden-tree (*Koelreuteria paniculata* Laxm.) seeds. **Scientia Horticulturae**, 85: 319-324.
- Ridley, B.L., O'Neill M.A., Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, 57: 929–967.
- Robson, N. K. B. 1967. *Hypericum* L. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Davis, P. H., Ed.), Vol. 2, Edinburgh Univ. Press, pp. 355-401, Edinburgh.
- Robson, N.K.B. 2003. *Hypericum* botany. In *Hypericum: the Genus Hypericum* (Ernst, E. Eds.), Taylor and Francis, pp. 196–241, New York.
- Rugini, E., Gutierrez-Pesce, P. 2003. Micropropagation of kiwifruit (*Actinidia* ssp.). In: Micropropagation of woody trees and fruits, (Jain, S.M., Ishii, K. Eds.), pp: 647–69. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Sajc, L., Grubisic, D., Vunjak- Novakovic, G. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. **Biochemical Engineering Journal**, 4: 89-99.

- Santarem, E.R., Astarita, L.V. 2003. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. **Brasilian Journal of Plant Physiology**, 15: 43-47.
- Sarin, R. 2005. Useful metabolites from plant tissue cultures. **Biotechnology**, 4(2): 79-93.
- Sasson, A. 1991. Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. **CIHEAM-Options Me'diterrane'ennes - Se'rie Se'minaires**, 14: 59-74.
- Schmidt, L., Joker, D. 2001. Technical note no. 59 - Glossary of seed biology and technology, p.14, Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark.
- Seger, C., Roempp, H., Sturm, S., Haslinger, E., Schmidt, P.C., Hadacek, F. 2004. Characterization of supercritical fluid extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by HPLC-MS and GC-MS. **The European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 21: 453-463.
- Shankera, A.K., Cervantes C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. 2005. Chromium toxicity in plants. **Environment International**, 31: 739- 753.
- Sharma, A.B. 2004. Global medicinal plants demand may touch \$5 trillion by 2050. **Indian Express**, Monday, March 29, 2004.
- Sharma, M., Sharma, A., Kumar, A., Basu, S.K. 2011. Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. **American Journal of Plant Physiology**, 6 (2): 50-71.
- Shibli, R.A., Ajlouni, M., Jaradat, A., Aljanabi, S., Shatnawi, M. 1997. Micropropagation of wild ear (*Pyrus syriaca*). **Horticultural Science**, 972: 1-6.
- Shiplashree, H.P., Rai, R. 2009. *In vitro* plant regeneration and acclimation of flavonoids in *Hypericum mysorensense*. **International Journal of Integrative Biology**, 8(1): 43-49.
- Sirvent, T., Gibson, D. 2002. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 60: 311-320.
- Smelcerovic, A., Spiteller, M., Zuehlke, S., 2006. Comparison of methods for the exhaustive extraction of hypericins, flavonoids, and hyperforin from *Hypericum perforatum* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 2750-2753.

- Smelcerovic, A.A., Dordevic, S.M., Lepojevic, Z.D., Velickovic, D.T. 2002. The analysis of the kinetics of extraction of resinoids and hypericines from the amber, *Hypericum perforatum* L. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 67: 457-463.
- Southwell, I.A., Bourke, C.A. 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, 56: 437-441.
- Tatsis, E.C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A.N., Vervoort, J., Gerotheranassis, I.P. 2007. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. **Phytochemistry**, 68: 383-393.
- Thanos, C.A., Marcou, S., Christodoulakis, D., Yannitsaros, A. 1989. Early post-fire regeneration in *Pinus brutia* forest ecosystems of Samos Island (Greece). **Acta Oecologica/Oecol. Plantarum**, 10(1): 79-94.
- Tirillini, B., Ricci, A., Pintore, G., Chessa, M., Sighinolfi, S. 2006. Induction of hypericins in *Hypericum perforatum* in response to chromium. **Fitoterapia**, 77: 164-170.
- Tolonen, A., Uusitalo, J., Hohtola, A., Jalonen, J. 2002. Determination of naphthodianthrones and phloroglucinols from *Hypericum perforatum* extracts by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 16 (5): 396-402.
- Van den Berg, L., Zeng, Y.J. 2006. Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. **The South African Journal of Botany**, 72: 284-286.
- Vardapetyan, H. R., Oganessian, A. A., Kabasakalyan, E. E., Tiratsuyan S. G. 2006. The influence of some elicitors on growth and morphogenesis of *Hypericum perforatum* L. callus cultures. **Russian Journal of Developmental Biology**, 37(6): 350-353.
- Vardapetyan, H.R., Oganessian, A.A., Kabasakalyan, E.E., Tiratsuyan, S.G. 2006. The influence of some elicitors on growth and morphogenesis of *Hypericum perforatum* L. callus cultures. **Russia Journal of Developmental Biology**, 37: 350-353.
- Vasconsuelo, A., Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, 172(5): 861-875.

- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G., Hitmi, A. 2008. Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. **Chemosphere**, 72: 763–771.
- Verpoort, R., van der Heijden, R. 1996. Metabolic engineering: a novel approach to the improvement of secondary metabolite production in plants or plant cell cultures. **Phytotherapy Research**, 10:12–14.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.K.. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, 45: 523–539.
- Vijaya Sree, N., Udayasri, P., V.V. Aswani kumar, Y., Ravi Babu, B., Phani kumar, Y., Vijay, V.M. 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. **Journal of Natural Products**, 3:112-123.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Vivanco, J.M. 2002. Jasmonic acid - induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, 60:289–293.
- Wang, D.H., Du, F., Liu, H.Y., Liang, Z.S. 2010. Drought stress increases iridoid glycosides biosynthesis in the roots of *Scrophularia ningpoensis* seedlings. **Journal of Medicinal Plants Research**, 4(24): 2691-2699.
- Wang, Z.J., Lin, S.M., Hu, M.L. 2004. Contents of hypericin and pseudohypericin in five commercial products of St John's wort (*Hypericum perforatum*). **Journal of Science of Food and Agriculture**, 84: 395–397.
- Wartidiningsih, N., Geneve, R.L., Kester, S.T. 1994. Osmotic priming or chilling stratification improves seed germination of purple coneflower. **Hortscience**, 29(12): 1445-1448.
- Werner, J.E., Finkelstein, R.R. 1995. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. **Physiological Plant**, 93: 659-666.
- Wiktorowska, E., Długosz, M., Janiszowska, W. 2010. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. **Enzyme and Microbial Technology**, 46: 14–20.
- Willis, A.J., Groves, R.H., Ash, J.E. 1997. Seed ecology of *Hypericum gramineum*, an Australian Forb. **Australian Journal of Botany**, 45(6): 1009-1022.

- Wojcik, A., Podstolski, A. 2007. Leaf explant response in *in vitro* culture of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, 29: 151-156.
- World Health Organization, 2008. Traditional Medicine. Fact sheet N°134, December 2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>, Erişim tarihi: 05.06.2011.
- Xiao, Z.Y., Shiu, W.K.P., Zeng, Y.H., Mu, Q., Gibbons, S. 2008. A naturally occurring inhibitory agent from *Hypericum sampsonii* with activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, 46, 250–253.
- Yamamoto, H., Yazaki, K., Hayashi, H., Taguchi, G., Yatou, A., Inoue, K. 1998. Effects of cork tissues on the production of secondary metabolites in various plants cell cultures. **Planta Medica**, 6: 43–53.
- Yazaki, K., Okuda, T. 1990. Procyaninins in callus and multiple shoots of *Hypericum erectum*. **Planta Medica**, 56: 490–491.
- Zeng, H.Y., Zhou, P.H. 2002. Callus induction and organogenesis of *Hypericum sampsonii*. **Plant Physiol Commun**, 38: 231–234.
- Zhang, J.Z., Chang, R.K. 1989. Generation and suppression of stimulated Brillouin scattering in single liquid droplets. **JOSA B**, 6(2): 151-153.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, 23: 283–333.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnol Advance**, 23: 283–333.
- Zheljazkov, V., Margina, A. 1996. Effect of increasing dose of fertilizer application on quantitative and qualitative characters of mint. **Acta Horticulture**, 426: 579-592.
- Zinati, G.M., Bryan, H.H., Li, Y. 2000. Stratification enhances germination of purple coneflower (*Echinacea angustifolia*) and st. John's wort (*Hypericum perforatum*) seeds. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, 113: 172-174.

- Ziv, M., Altman A. 2003. Plant tissue culture, general principles. In: Encyclopedia of Applied Plant Sciences, (Thomas, B., Eds), Elsevier Science Ltd., pp: 1341-1353, USA.
- Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Kozai. T. 2007. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. **Environmental and Experimental Botany**, 59: 109–116.
- Zobayed, S.M.A., Murch, S.J., Rupasinghe, H.P.V., Saxena, P.K. 2003. Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75: 143–149.
- Zobayed, S.M.A., Murch, S.J., Rupasinghe, H.P.V., Saxena, P.K. 2004. *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). **Plant Science**, 166: 333–340.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : ÖMER YAMANER

Doğum Yeri ve Tarihi : AYDIN - 29.04.1979

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 1998-2002

Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı, 2002-2005

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

-Diğer

Yamaner Ö., Erdağ B. Direct shoot formation and microtuberization from aseptic seedlings of *Cyclamen mirabile* Hildebr. Biotechnology 7 (2): 328-332, 2008.

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal

Yamaner Ö., Erdağ B. *Cyclamen mirabile* Hildebr.'in aseptik fideleri kullanılarak mikrotuberizasyonu ve direk sürgün rejenerasyonu. 18.Ulusal Biyoloji Kongresi, poster, 28.06.2006.

Yamaner Ö., Erdağ B., Endemik *Hypericum adenotrichum* Spach türünde tohum dormansisinin kırılması ve çimlenme, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Poster, 22.06.2010.

Yamaner Ö., Erdağ B., *Cyclamen mirabile* Hildebr.'in olgun dokularının *in vitro* rejenerasyon potansiyelinin araştırılması, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Poster, 26.06.2008

Avcıoğlu M., **Yamaner Ö.**, *Ocimum basilicum* L.'da *in vitro* kültür şartlarına bağlı olarak total fenolik değişiminin araştırılması, 17. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Poster, 14-17 Temmuz 2010.

c) Katıldığı Projeler

Hypericum adenotrichum Spach'un Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması ve *In vitro* Koşullarda Sekonder Metabolit Değişiminin Araştırılması. ADÜ B.A.P, FBE-09013.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Yalova Acil Yardım ve Kurtarma

Komuta Kontrol Merkezi, 2001

Aydın Merkez 2 Nolu Acil Sağlık Hizmetleri

İstasyonu, 2001-2005

Aydın Karacasu Merkez Sağlık Ocağı, 2005-2006

Aydın Merkez 2 Nolu Acil Sağlık Hizmetleri

İstasyonu, 2006-2007

Aydın Atatürk Devlet Hastanesi, 2007-2011.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : oyamaner@adu.edu.tr

Tarih : 05.08.2011