

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ'NDE
YETİŞEN ve ENDEMİK
BİR TÜR OLAN *Hypericum spectabile*'nin
***İN VİTRO* MİKROÇOĞALTIM YOLLARININ**
ARAŞTIRILMASI

Pınar KARAKUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Haziran 2011

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Pınar KARAKUŞ tarafından yapılan “Güneydoğu Anadolu’da Yetişen ve Endemik Bir Tür olan *Hypericum spectabile*’nin *In Vitro* Mikroçoğaltım Yollarının Araştırılması ” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Doç. Dr. Murat KIZIL

Üye : Doç. Dr. Süreyya NAMLI

Üye : Yrd. Doç. Dr. Çiğdem IŞIKALAN (Danışman)

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/06/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi başta olmak üzere çalışmalarımın her aşamasında; bilgi ve deneyimleri ile beraber sabrını da benden hiç esirgemeyen sayın danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Çiğdem IŞIKALAN'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarını kurarak bize çalışma imkanı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Davut BAŞARAN'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalıştığım bitkinin temini, teşhisi ve arazi ortamındaki fotoğraf çekimi konusunda yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın deney aşamasında desteğini benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Süreyya NAMLI'ya saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın tez yazım aşamasında, istatistiki verilerin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Filiz AKBAŞ'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında manevi destekleriyle hep yanımda olan dostlarıma özellikle de Yeter KAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde maddi manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli aileme özellikle de babam Mustafa KARAKUŞ'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

DÜBAP-10-FF-122 nolu proje ile maddi katkı sağlayarak yardımda bulunan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	IX
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
KISALTMA VE SİMGELER.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
3. MATERYAL ve METOT.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Bitkinin toplanması.....	18
3.2. Metot.....	18
3.2.1. Cam Malzeme ve Filtre Kağıtlarının Sterilizasyonu.....	18
3.2.2. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	19
3.2.3. Röpikaj ve Kültür Odalarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	19
3.2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	19
3.2.4.1. MS besisi Ortamında Kullanılan Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	20
-1Litre Murashige ve Skoog (MS) Besi Ortamının Hazırlanması.....	22
- Bitki Büyüme Hormonlarının Hazırlanması.....	23
3.2.5. Kullanılan Materyalin Sterilizasyonu.....	23
3.2.6. Kültür Başlatma Çalışmaları.....	24
3.2.7. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları.....	24

3.2.7.1. BAP (Benzilaminopurin)'in Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi.....	24
3.2.7.2. Kin (Kinetin)'in Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi.....	24
3.2.7.3 BAP+Oksin Kombinasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi.....	25
3.2.7.4. Kin+Oksin Kombinasyonunun Sürgün Proliferasyonuna Etkileri.....	26
3.2.7.5. Yaprak ve Kök Eksplantlarından Indirekt Sürgün Rejenerasyonu.....	27
3.2.8 Sürgünlerin Köklendirme Çalışmalarına MS'in Etkisi.....	27
3.2.8.1. 1/1MS'in Etkisi.....	28
-1/1 MS'de NAA'nın Etkisi.....	28
-1/1 MS'de IAA'nın Etkisi.....	28
3.2.8.2. ½ MS'in Etkisi.....	29
-½ MS'de NAA'nın Etkisi.....	29
-½ MS'de IAA'nın Etkisi.....	30
3.2.9 Aklimatizasyon Çalışmaları.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4. 1 Kültür Başlatma Çalışmaları.....	31
4.2 Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları.....	31
4.2.1 BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	31
4.2.2 Kinetin'in Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	33
4.2.3 BAP+Oksin Kombinasyonunun Sürgün Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	35
4.2.4. Kinetin+Oksin Kombinasyonunun Sürgün Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	37

4.2.5.	Yaprak ve Kök Eksplantlarından İndirekt Sürgün Rejenerasyonu.....	38
4.3.	Sürgünlerin Köklendirmesinde MS'in Etkisi.....	43
4.3.1	1/1 MS'de NAA'nın Etkisi.....	43
4.3.2.	1/1 MS'de IAA'nın Etkisi.....	43
4.3.3.	½ MS'de NAA'nın Etkisi.....	44
4.3.4.	½ MS'de IAA'nın Etkisi.....	45
4.4	Aklimatizasyon Çalışmaları.....	46
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	49
6.	KAYNAKLAR.....	53
	ÖZGEÇMİŞ.....	57

ÖZET

GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ'NDE
YETİŞEN ve ENDEMİK BİR TÜR OLAN
Hypericum spectabile'nin İN VİTRO MİKROÇOĞALTIM
YOLLARININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar KARAKUŞ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Bu çalışmada, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde endemik bir tür olarak yetişen *Hypericum spectabile* tohumlarından itibaren *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım için bir metod geliştirmek temel hedef olarak amaçlanmıştır.

Araştırmanın birinci aşamasında; başlangıç materyali olarak kullanılan *Hypericum spectabile* tohumları sırasıyla % 70'lik etil alkol içerisinde 30 sn, %5'lik NaOCI solusyonunda 10 dk bekletilerek sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Steril tohumlar, bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) içermeyen Murashige ve Skoog (MS) besi ortamlarında kültüre alınarak çimlendirilmiştir.

İkinci aşamada; birer sitokinin olan benzilaminopurin (BAP) ve Kinetin (Kin)'in farklı konsantrasyonlarını (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l) içeren MS besi ortamlarının etkisi ayrı ayrı test edilmiştir. Sürgün proliferasyonu için test edilen BAP konsantrasyonları arasında 0.25 mg/l içeren besi ortamının (eksplant başına 49.80 sürgün) ideal olduğu tespit edilmiştir.

Kinetin konsantrasyonları karşılaştırıldığında ise 0.5 mg/l Kin (eksplant başına 27.33 sürgün) ile desteklenmiş MS besi ortamından en fazla sürgün elde edilmiştir. Bu oranda fazla miktarda sürgün elde edilmesine rağmen sürgün gelişiminin iyi olmadığı görülmüştür.

Ayrıca sürgün sayılarını artırmak ve geliştirmek amacıyla oksin ve sitokinin kombine etkilerini araştırmak için 9 farklı besi ortamı hazırlanmıştır. Önceki deneylerde elde edilen veriler doğrultusunda, kültür besi ortamına BAP (0.25 mg/l) ve Kin (1.5 mg/l) ile birlikte α -naftalenasetik asit (NAA), indolasetik asit (IAA) gibi oksinlerin farklı oranlarının (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) etkileri ayrı ayrı araştırılmıştır. Test edilen hormon kombinasyonları karşılaştırıldığında sürgün sayısında önemli bir artışın olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında; kallus başlatma çalışmaları için yaprak ve kök eksplantları, BAP (0.5, 1.0, 1.5 mg/l) ve 2,4- diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) kombinasyonlarından oluşan besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Yaprak eksplantları için 1.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l 2,4-D, kök eksplantları için ise 1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş besi ortamlarının optimum oranlar olduğu belirlenmiştir.

Kallustan sürgün rejenerasyonunu sağlamak için, kalluslar 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l BAP ilave edilmiş besi ortamlarına aktarılmıştır. En fazla sürgün sayısı 1.5 mg/l BAP'lı besi ortamında (eksplant başına 25.15 sürgün) elde edilmesine rağmen sürgünlerin morfolojik gelişiminin iyi olmadığı, oysa 0.5 mg/l BAP'lı besi ortamında (eksplant başına 22.75 sürgün) gelişen sürgünlerin daha canlı ve sağlıklı olduğu gözlenmiştir.

Çalışmanın dördüncü aşamasında ise; sürgünlerin köklendirilmesi için NAA ve IAA'nın dört farklı konsantrasyonu (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) ile birlikte MS besi ortamı kuvvetinin (1/1 MS, 1/2 MS) etkisi araştırılmıştır. Sürgünlerin köklendirilmesi için en iyi sonuç 0.25 mg/l IAA'lı 1/1 MS besi ortamından alınmıştır.

Elde edilen köklü fideciklerin toprağa adaptasyonu, aklimatizasyon çalışmaları ile başarılı bir şekilde sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum spectabile*, mikropropagasyon, kallus, BBD

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* MICROPROPAGATION METHODS OF ENDEMIC *Hypericum spectabile* GROWN IN SOUTHEAST ANATOLIA REGION

M.Sc. THESIS

Pınar KARAKUŞ

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2011

In this study, the main aim was to develop a method for *Hypericum spectabile*'s *in vitro* micropropagation of its seed that an endemic species grown in East and Southeast Anatolia Region.

In the first phase of study; seeds of *Hypericum spectabile*, used as a starting material, a sterilization process was done waiting respectively in 70% ethyl alcohol for 30 seconds, 5% NaOCI solution for 10 minutes. Sterile seeds were germinated based culture on MS medium free plant growth regulators (PGRs) .

In the second phase of study; different concentrations (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l) of benzylaminopurine (BAP) and Kinetin (Kn) that are used as a cytokinin tested separately. Among the concentrations 0.25 mg/l BAP (49.80 shoots per explant) was found ideal for shoot proliferation.

Compared to Kin concentrations, the most shoots were obtained on MS medium supplemented with 0.5 mg/l Kin (27.33 shoots per explant). Although more shoots were obtained in this medium, growth of shoots were not good.

In addition , in order to improve and increase the number of shoots nine different types of medium was prepared to investigate combined effects of BAP and Kin. The data obtained in accordance with previous experiments, BAP (0.25 mg/l) and Kin (1.5 mg/l) together with different concentrations of (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) naphthalene acetic acid (NAA) and indole acetic acid (IAA) were tested separately. Compared hormone combinations tested, were not a meaning ful increase in the number of shoots.

In the third phase of study; leaf and root explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations and combinations of benzilaminopurin (BAP; 0.5, 1.0, 1.5 mg/l) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; 0.5, 1.0, 2.0 mg/l). The best callus induction for leaf explants was observed in the treatment containing 1.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l 2,4-D on the other hand for root explants 1.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l 2,4-D culture medium was optimal rates.

For shoot formation from calli, calli were transferred into different BAP concentrations (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l) separately. Although the highest number of shoots produced on medium supplemented with 1.5 mg/l BAP (25.15 shoots per explant), however, morfology of shoots were not good. The best result for shoot morfology was observed in the treatment containing 0.5 mg/l BAP (22.75 per explant), in this medium shoots were more vibrant and more healthy.

In the fourth phase of study; for the shoot rooting four different concentrations of NAA and IAA (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l) together with the force of the MS medium (1 / 1 MS, ½ MS) was investigated. Optimum result were taken on MS medium supplemented with 0.25 mg/l for rooted of seedling.

Adaptation to soil of Obtained rooted seedling were succesfully provided with acclimatization works.

Keywords : *Hypericum spectabile*, micropropagation, callus, PGRs

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1	İndirekt Sürgün Rejenerasyonu için BAP ve 2,4-D'nin Kombine Etkisi	27
Çizelge 3.2	1/1MS Besi Ortamının İçeriği	28
Çizelge 3.3	½ MS Kültür Besi Ortamının İçeriği	29
Çizelge 4.1	BAP'ın farklı konsantrasyonlarının sürgün gelişimi üzerine etkisi	33
Çizelge 4.2	Kinetin'in farklı konsantrasyonlarının sürgün gelişimi üzerine etkisi	35
Çizelge 4.3	Yaprak ve kök eksplantlarından kallus kültürlerinin başlatılması için BAP ve 2,4-D kombinasyonlarının etkisi	38
Çizelge 4.4	Yaprak eksplantlarından kallus kültürlerinin oluşturulması için BAP ve 2,4-D'nin kombine etkisi	39
Çizelge 4.5	Kök eksplantlarından kallus kültürlerinin oluşturulması için BAP ve 2,4-D'nin kombine etkisi	41

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1	Doğal Ortamda <i>Hypericum spectabile</i> 'nin genel görünüşü	18
Şekil 4.1	Hormonsuz MS besi ortamında kültüre alınan tohumların genel görünüşü	31
Şekil 4.2	Hormonsuz kültür besi ortamında çimlenen tohumların genel görünüşü	31
Şekil 4.3	Yüksek BAP konsantrasyonlarında sürgünlerin görünüşü	32
Şekil 4.4	Yüksek BAP konsantrasyonlarında sürgünlerin görünüşü	32
Şekil 4.5	0.5 mg/l BAP'lı besi ortamında sürgünlerin genel görünüşü	32
Şekil 4.6	0.25 mg/l BAP'lı kültür besi ortamındaki sürgünlerin genel görünüşü	32
Şekil 4.7	0.25 mg/l Kin içeren besi ortamında kültüre alınan sürgünlerin genel görünüşü	34
Şekil 4.8	2.5 mg/l Kin içeren besi ortamında kültüre alınan sürgünlerin genel görünüşü	34
Şekil 4.9	1.5 mg/l Kin ile desteklenmiş besi ortamında sürgünlerin genel görünüşü	34
Şekil 4.10	0.25 mg/l BAP+ NAA ortamında sürgünlerin genel görünüşü	36
Şekil 4.11	0.25 mg/l BAP+NAA ortamında sürgünlerin genel görünüşü	36
Şekil 4.12	0.25 BAP+1.0 mg/l IAA destekli besi ortamında sürgünlerin genel görünüşü	36
Şekil 4.13	0.25 BAP+0.25 mg/l IAA ortamında sürgünlerin görünüşü	37
Şekil 4.14	1.5 mg/l Kin+NAA destekli besi ortamlarında sürgünlerin görünüşü	38
Şekil 4.15	1.5 mg/l Kin+IAA oranlarında sürgünlerin görünüşü	38
Şekil 4.16	Kültüre alınan kök eksplantlarının görünüşü	39
Şekil 4.17	Kültüre alınan yaprak eksplantlarının görünüşü	39
Şekil 4.18	1.0 mg/l BAP+2.0 mg/l 2,4-D içeren besi ortamında yaprak eksplantlarından kallus oluşumu	40
Şekil 4.19	1.5 BAP+0.5 mg/l 2,4-D içeren besi ortamında kök eksplantlarından gelişen kallus	42
Şekil 4.20	1.5 mg/l BAP ortamında sürgünlerin genel görünüşü	43

Şekil 4.21	0.5 mg/l BAP ortamında sürgünlerin genel görünüşü	43
Şekil 4.22	1 mg/l IAA'lı ortamda köklü fideciklerin genel görünüşü	44
Şekil 4.23	0.5 mg/l IAA'lı köklü fideciklerin genel görünüşü	44
Şekil 4.24	0.25 mg/l IAA'lı köklü fideciklerin genel görünüşü	44
Şekil 4.25	$\frac{1}{2}$ MS- NAA'lı ortamda sürgünlerin görünüşü	45
Şekil 4.26	$\frac{1}{2}$ MS-I AA'lı ortamlarda sürgünlerin görünüşü	46
Şekil 4.27	Köklü bitkiciklerin genel görünüşü	46
Şekil 4.28	Aklimatizasyon çalışmalarının 8. gününde bitkilerin genel görünüşü	46
Şekil 4.29	Aklimatizasyon çalışmalarının 12. gününde bitkilerin genel görünüşü	47
Şekil 4.30	Bitkiciklerin toprağa adaptasyonu	47

KISALTMA VE SİMGELER

°C	:Santigrat derece
2,4- D	:2,4 Diklorofenoksi asetik asit
atm	:Atmosfer
BAP	:6-Benzilaminopurin
BBD	:Bitki büyüme düzenleyicileri
CaCl ₂ .2H ₂ O	:Kalsiyum klorür dihidrat
cm	:Santimetre
m	:Metre
CM	:Carte & Mendonca
CoCl ₂ .6 H ₂ O	:Kobalt klorür hegzahidrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	:Bakır sülfat pentahidrat
D.Ü.	:Dicle Üniversitesi
dk	:Dakika
FeSO ₄ .7H ₂ O	:Demir sülfat heptahidrat
g	:Gram
GA ₃	:Gibberelik asit
H ₃ BO ₃	:Borik asit
HCl	:Hidroklorik asit
IAA	:İndol-3-asetik asit
IBA	:İndol bütirik asit
K	:Potasyum

KI	:Potasyum iyodür
Kin	:Kinetin (6-furfuroaminopurin)
KNO ₃	:Potasyum nitrat
KOH	:Potasyum hidroksit
l	:Litre
LM	:Lloyd & McCown
mg	:Miligram
MgSO ₄ .7H ₂ O	:Magnezyum sülfat heptahidrat
MnSO ₄ .4H ₂ O	:Magnezyum sülfat tetrahidrat
MS	:Murashige ve Skoog
Na ₂ EDTA	:Sodyum etilen diamin tetra asetik asit
NAA	: α -Naftalen asetik asit
NaOCl	:Sodyum hipoklorit
NaOH	:Sodyum hidroksit
NH ₄ NO ₃	:Amonyum nitrat
RB	:Roest & Bockelmann
sn	:Saniye
ZnSO ₄ .7H ₂ O	:Çinko sülfat heptahidrat
μ mol	:Mikro mol
PGRs	:Plant Growth Regulators (BBD: Bitki Büyüme Düzenleyicileri)
TDZ	:Thidiazuron
ppm	:Parts Per Million (Milyonda bir)

WHO

: World Health Organization

(Dünya Sağlık Örgütü)

pH

:Asitlik Derecesi

GC/MS

:Gas Chromatography/Mass Spectrometry

(Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi)

1.GİRİŞ

Bitkilerin pek çoğu tarihin çok eski devirlerinden beri tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Kimya sanayisindeki gelişmeler ilaç sanayisini de etkilemiş, sentetik ilaçlar tıbbi bitkilerin yerini almaya başlamıştır. Sentetik ilaç sanayinin gelişmesi, bitkilerin kullanımını her ne kadar azaltmış olsa da sentetik ilaçların zehirli yan etkilerinin bulunması ve bitkisel ilaçların çok yönlü etkiye sahip olmaları, bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif bileşikler üzerindeki çalışmaların artmasına neden olmuştur. Kuzey Amerika'da eczanelerde satılan her beş üründen birini tıbbi bitkiler oluşturmaktadır (NCCAM, 2001). Bugün bile dünya nüfusunun büyük bir bölümü tıbbi bitkilerle tedavi olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 91 ülkenin tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı çalışmalara dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre, tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin toplam miktarının 20 000 kadar olduğu belirtilmiştir.

Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkiler, bilimsel bir süzgeçten geçirilerek yeniden değerlendirilmiş ve fitoterapi adı ile anılan bir bilim dalı haline gelmiştir. Bu bilim dalı, giderek gelişmekte ve daha fazla önem kazanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verileri, gelişmekte olan ülkelerde insanların % 80'nin bu tedavi yöntemlerini kullandığını ve 3.3 milyar insanın da tedavi aracı olarak tıbbi bitkilerden yararlandığını ortaya koymuştur. Doğaya veya yeşile dönüş olarak adlandırılan doğal beslenme, doğal ürünlerle tedavi gibi hususlar, ancak sentetik ürünlerden uzaklaşmak isteyen gelişmiş toplumlar için söylenebilir.

Türkiye florasının önemli bir özelliği, oldukça zengin bir yapıya sahip olmasıdır. Ülkemizde 11000 bitki türü doğal olarak yetişmesine rağmen, bunlardan yeterince istifade edilememektedir. Bitkilerin kimyasal içerikleri ile ilgili çalışmalar ise çok yavaş yürümektedir. Son yıllarda teknoloji ve tıp ne kadar ilerlerse ilerlesin, doğal zenginliklerin tükenmesi ve ekonomik olarak ülkelerin girdikleri çıkmazlar, doğal ürünlerin çok amaçlı kullanılmalarını zorunlu kılmıştır.

Geniş biyolojik aktivitelerinden dolayı, çeşitli sekonder metabolitleri içeren bitkiler, yüzyıllardır geleneksel halk ilacı olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda, içerdikleri sekonder metabolitlerin hem geleneksel tedavide hem de tıpta ilaç olarak kullanılmasından dolayı, tıbbi bitkilerin önemi artmıştır. Bu bitkiler arasında yer alan

Hypericum türleri de antik çağlardan beri halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Dias ve ark. 1998). *Hypericum*, depresyona bağlı sinir sistemi bozukluklarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca, kanserli tümör hücrelerinin büyümesini engellemede faydalı olduğu bulunmuştur. *Hypericum* türlerinin çağımızın yaygın hastalığı olan depresyona karşı etkili olması, bu bitkiler ve onlardan elde edilen bileşikler üzerinde çalışmaların artmasına neden olmuştur (Laakmann ve ark. 1998).

Bitkilerin, kendi ekosistemleri dışında büyümeleri zordur. Özellikle, *Hypericum* türleri patojenlere duyarlılıklarından dolayı, geniş tarla kültürlerinde dayanıksızdır. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak, kaybolmakta olan türlerin korunmasını sağlamak, hastalıklardan arındırılmış bitkisel materyal elde etmek, çoğalması zor olan ve nesli tükenmekte olan türleri üretmek amacıyla, bitkilerin doku kültürü yoluyla çoğaltılması yoluna gidilmiştir. Bu ve benzeri nedenlerden dolayı sekonder metabolit üretiminde bitki biyoteknolojisinin kullanımı, alternatif bir yaklaşım olarak doğmuştur (Bourgau ve ark. 2001).

Tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi, çoğaltılması ve sekonder bileşiklerinin üretiminde geleneksel yöntemlerin yanı sıra alternatif bir teknik olan bitki doku kültürü uygulamaları ayrıca zamandan ve mekandan tasarruf sağlayabilen güvenilir bir metottur. Doku kültürleri; bitki fizyolojisi, biyokimya ve moleküler biyolojide en çok başvurulan yöntem ve araçlar arasında yer almaktadır. Günümüzde bitki biyoteknolojisi, bitki bilimlerinin birçok alanında gittikçe artan bir hızla kullanılmaktadır. Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki yada hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus kültürleri), doku (çeşitli bitki kısımları) veya organ (apikal meristem, kök, vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya çeşitli bitkisel ürünlerin (sekonder metabolitler vb.) üretilmesidir (Babaoğlu ve ark. 2002).

Sahip olduğu tıbbi özelliklerden dolayı, klasik yetiştiriciliğin yanı sıra, doku kültürü yöntemiyle de yetiştirilen *Hypericum* türlerinin, hiperisin ve psödohiperisin içeriği, birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Oluk ve ark. 2010, Namlı ve ark. 2009, Karakaş ve ark. 2008, Ayan ve ark. 2005).

Hücre veya dokulardan yeni bitki bireyleri meydana getirmeye imkan tanıyan organogenezis, generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin üretiminde büyük

kolaylıklar sağlamaktadır. Organogenezisin diğer bir önemi ise, bitki transformasyon çalışmalarının başarısını yakından etkilemesidir. Çünkü, optimize edilmiş bir rejenerasyon sistemine sahip olmayan bir türde, transformasyon yapmanın bir anlamı yoktur. *In vitro* kültürü yapılan hücrelerden bazılarının, özgün bir işlevi yerine getirmek veya bir doku ya da organı oluşturmak üzere farklılaşmaları, genellikle sekonder metabolitlerin birikiminde bir artış meydana getirmektedir (Sökmen ve Gürel 2002).

Bu çalışmada, son yıllarda yaygın olarak kullanılan *Hypericum* cinsine ait, endemik bir tür olan *Hypericum spectabile*'nin *in vitro* mikroçoğaltılma yollarının araştırılması ve *in vitro* teknikler kullanılarak elde edilen sürgünlerin yaprak ve kök eksplantlarından kallus ve kallustan sürgün rejenerasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

Hypericum türlerindeki hiperisin ve psödohiperisin gibi sekonder metabolitler, özellikle antiviral, antikanserojen ve antidepresan etki göstermesi, tüm dünyada *Hypericum* türlerinin ticari önemini büyük ölçüde arttırmaktadır. *Hypericum* türleriyle ilgili gerek *in vitro* gerekse bu türlerin çalışılmasını birincil derecede önemli kılan sekonder metabolitleriyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, çalışmamızda bitkisel materyal olarak kullandığımız *Hypericum spectabile* ile ilgili mikropropagasyon ve sekonder metabolitlerini içeren herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

Cardoso ve Oliveira'nın (1996), *Hypericum brasiliense* ile ilgili yaptıkları çalışmada; büyüme, sürgün verme ve köklenme oranlarına göre doğal populasyondan seçilmiş 10 adet fideden elde ettikleri nodal tomurcukları, farklı büyüme düzenleyicileriyle desteklenmiş temel MS ve Gamborg besi ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırmacılar, optimum kallus oluşumunun, 1-2 mg/l 2,4-D içeren her iki ortamda da gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Hypericum foliosum Ation, sınırlı bir yayılış alanına sahip olması, bir yıl içerisinde tohumlarının çimlenme kabiliyetini yitirmesi ve mevcut populasyonlarında oldukça az sayıda bitki bulunmasından dolayı koruma altına alınan Azore Adalarına özgü endemik bir türdür. Moura (1998), bu bitki için etkili bir mikroçoğaltım sistemi tanımlamak amacıyla, olgun bitkilerden elde ettiği gövde nodüllerini Murashige & Skoog (MS), Roest & Bockelmann (RB), Lloyd & McCown (LM) ve Carte & Mendonca (CM) temel besi ortamlarında kültüre almıştır. Bu ortamlar içerisinde en iyi mikroçoğaltım oranı CM ortamından elde edilmiş ve bunun üzerine denemeler farklı büyüme düzenleyicileri (BA, NAA, iP ve Kin) ile modifiye edilen CM ortamları ile devam ettirilmiştir. Aynı araştırmacı 0.1 mg/l BA ya da 0.1 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA ile desteklenmiş CM ortamını direkt mikroçoğaltım için en etkili ortamlar olarak tanımlamıştır. Elde edilen bitkicikler, başarılı bir şekilde sera şartlarına araştırmacı tarafından adapte edilmiştir.

Alberto ve ark. (1998), *in vitro* ortamda *Hypericum perforatum*'un ihtiva ettiği sekonder metabolitlerden olan flavanoidlerin üretimini incelemek amacıyla başlattıkları

kallus kültürlerinde, *in vivo* bitkilerde bulunmayan bazı yeni flavonoidlerin oluştuğunu bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar da, *Hypericum* türlerinden hiperisin, psödohiperisin, xanton, quercetin, benzopiran, sampsonin gibi sekonder bileşikleri izole etmişlerdir. Bu araştırmacılar; Hansen ve ark. (1999), *Hypericum perforatum*'da bilinen temel bileşiklerin yanı sıra kuersitin-arabinosid ve kuersitin-galaktourunid isimli iki yeni bileşik bulmuşlardır. Hu ve ark. (1999), *Hypericum ascyron*'un toprak üstü kısımlarının etanol özütünden sekiz ksanton türeği izole etmişlerdir. Bunlardan 3,6-dihidroksi-1,7-dimetoksiksanton yeni bir bileşik olup, 5-kloro-1,6-dihidroksi-3-metoksi-8-metilksanton yüksek bitkilerden izole edilen ilk ksanton'dur. Verotta ve ark. (1999), *Hypericum perforatum*'un toprak üstü kısımlarından, florohiperforin ve oksitlenmiş analogu prenilat floroglusinol hiperforin izole etmişlerdir.

Cellarova ve Kimakova (1999), *Hypericum perforatum* fidelerinin farklı oksin ve sitokinin seviyelerine tepkilerini inceledikleri *in vitro* çalışmada, IAA ve IBA 'nın doza bağlı olarak köklenmeyi etkilediklerini ve 2,4-D ile NAA'nın köklenme üzerine olumlu etkide bulunduklarını bildirmişlerdir.

Sökmen ve Sökmen (1999), *Hypericum capitatum*'un kallus kültürlerini farklı besi ortamlarında büyütürken hücre morfolojisi, kütleli hücre verimi (biyomas) ve biyoaktif ksantonların üretimi bakımından farklılıklar gösteren, 8 hücre hattı elde etmişlerdir. Bu hatlardan geliştirilen hücre süspansiyon kültürleri de benzer özellikler göstermişlerdir. Hücre süspansiyon kültürleri dikkate alındığında, en yüksek hücre verimi HC119 B5 hattında, en yüksek ksanton üretimi ise HC119 M18 hattında gözlenmiştir. Kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde kaynak bitkide daha önce saptanmamış, ancak iki *Hypericum* türünde (*Hypericum inodorum* ve *Hypericum canariensis*) bulunan 2 ksanton izole edilmiştir. Araştırmacılar bu durumun sekonder metabolitlerin *in vitro* ifadesi açısından önemli bir bulgu olarak düşünülebileceğini bildirmişlerdir.

Briskin (2000), *in vitro* koşullarda tıbbi bitkilerin çoğaltılması ve büyütülmesi için hücre, doku ve organ kültür sistemlerinin geliştirilmesi, bu bitkilerin moleküler düzeydeki çalışmalarında fayda sağlayacağını vurgulamıştır. Ayrıca, bu gibi doku kültür

çalışmalarının, tıbbi bitkilerdeki fitokimyasalların üretilmesinde de faydalı olacağını bildirmiştir.

Cherry ve ark. (2000), *Hypericum* türleri için etkili bir *in vitro* çoğaltım sistemi tanımlamayı hedefledikleri çalışmalarında eksplant kaynağı olarak, *Hypericum androsaemum* ve *Hypericum patulum* için olgun bitkileri, *Hypericum grandifloru* için ise 8 haftalık fideleri kullanmışlardır. Bitkisel eksplant olarak hipokotil, yaprak ve kök eksplantlarını farklı dozlarda oksin ve sitokinin içeren temel MS besi ortamlarında 4 hafta süre ile kültürde bekletmişlerdir. Çalışmada, oksin olarak 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/l dozlarında IAA, IBA ve NAA; sitokinin olarak ise yine aynı dozlarda Kin ve BA kullanılmıştır. *Hypericum patulum*'da kök oluşumu sadece NAA uygulamasında meydana gelmiş ancak oluşan kökler kallus oluşturmuşlardır. *Hypericum grandiflorum*'da ise 0.5 mg/l IAA uygulaması zayıf bir kök oluşumu meydana getirmesine rağmen *in vitro* şartlara tepkisi oldukça zayıf olarak bulunmuştur. Eksplantlar arasında rejenerasyon tepkisi bakımından farklılık gözlenmemiştir. Genel anlamda, denenen türlerde kök oluşumu için IAA, sürgün oluşumu içinse Kin tavsiye edilmiştir. Fakat, sadece *Hypericum androsaemum*'da BA sürgün oluşumu için daha etkili bulunmuştur. Sonuç olarak, araştırmacılar bu üç *Hypericum* türünde yapılacak çalışmalar için muhtemel oksin ve sitokinin oranları olarak 0.5-0.1 mg/l Kin ve IAA'yı tavsiye etmişlerdir.

Pretto ve Santarem'in (2000) bildirdiklerine göre, son birkaç yıl içerisinde antidepresant ve antiviral etkilerinden dolayı, *Hypericum perforatum*'un kullanımı artmıştır. Farmakolojik açıdan sahip olduğu bu potansiyelden dolayı adı geçen araştırmacılar tarafından, bu bitkinin *in vitro* kültürü için yeni bir sistem geliştirilmiştir. Yaprak eksplantları, 0.45 ve 4.45 μ M 2,4-D, 0.44 ve 4.4 μ M BA ve 0.46 ve 4.6 μ M Kin ile desteklenmiş MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Daha sonra kallus oluşumunu sağlamak amacıyla ışıklı ve karanlık ortamların etkisini araştırmışlardır. Bütün kültür ortamlarında kallus oluşumu gözlenmiştir. Aynı araştırmacılar en yüksek hücre çoğalmasını, karanlık şartlarda 4.4 μ M BA ve 4.5 μ M 2,4-D ile desteklenmiş besi ortamında yetiştirilen eksplantlardan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sürgün oluşumu, 4.6 μ M Kin ve 0.45 μ M 2,4-D içeren ortamda oluşan kallusların, 4.4 μ M BA ilaveli MS ortamına transferinden 6 hafta sonra elde edilmiştir. Kökler, IBA (4.9 μ M) ihtiva eden ya da etmeyen tam ve yarım güçteki MS ortamındaki sürgünlerden, en yüksek

köklenme sıklığı ise, IBA varlığı dikkate alınmaksızın yarım güçlü MS ortamından elde edilmiştir.

Bourgaud ve ark.'nın (2001) bildirdiklerine göre, sekonder metabolitler ile ilgili çalışmalar son 50 yıldan bu yana kayda değer bir artış göstermektedir. Bu moleküller, bitkilerin çevreleriyle olan uyumlarında oynadıkları önemli rollerin yanı sıra, ilaç sanayinin en önemli kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Bitki hücre kültürleri, sekonder metabolitlerin hem üretilmesi hem de bilimsel anlamda çalışılması ile ilgili olarak, 1960'ların sonlarından beri uygulama alanı bulmaktadır. *In vitro* sistemleri kullanarak geliştirilen farklı stratejiler sekonder metabolit üretiminin artırılmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda, *in vitro* sekonder metabolit üretiminde daha ziyade hücre kültürleri ön plana çıkmasına rağmen, saçaklı kök ve diğer organ kültürleri de yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Son 30 yıldan bu yana kat edilen mesafelere rağmen, kıymetli sekonder metabolitlerin hücre ve doku kültürleriyle üretiminde ticari anlamda sağlanan başarı oldukça sınırlıdır.

Dias ve ark. (2001), *Hypericum perforatum*'un kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde, 1/3/6 ve 7 nolu ksantonların biriktiğini ve bu birikimin *in vitro* ortamın hormon kompozisyonu ve miktarı ile yakından ilgili olduğunu bildirmiştir. En yüksek ksanton oluşumu MS + 4.5 µmol/L 2,4-D + 2.3 µmol/L Kin ortamında gelişen kalluslarda tespit edilirken, Kin yerine BA kullanımı ksanton üretimini olumsuz yönde etkilemiştir.

Southwell ve Bourke (2001), *Hypericum perforatum*'un hiperisin içeriğinin mevsimlere bağlı olarak değiştiğini saptamışlardır. Geniş yapraklarda; kışın hiperisin–psödohiperisin miktarı minimum 100 ppm iken yazın 3000 ppm. olup, dar yapraklarda ise bu miktar, kış mevsiminde geniş yaprağına yakın bir değerdeyken yaz mevsiminde bu miktarın maksimum 5000 ppm.'e kadar olduğunu saptamışlardır.

Baruah ve ark. (2001), Himalaya Dağlarına özgü endemik bir tür olan *Hypericum patulum* bitkisini, etkili bir şekilde çoğaltmak için bir *in vitro* protokol geliştirmişlerdir. Kaynak bitkilerden aldıkları sürgün uçlarını çoklu sürgün oluşumu için BAP ve Kin ile desteklenmiş temel MS besi ortamlarında kültüre almışlardır. Thiamin HCl, capantothenate ve biotin ilavesi sürgün oluşumunu artırmış olduğundan, oluşan

sürgünler, kısa süreli olarak önce büyüme düzenleyici içermeyen sıvı ortamda, daha sonra da IAA içeren MS ortamında kültüre alınarak köklendirilmişlerdir.

Bezo ve Stefunova'nın (2001) bildirdiklerine göre, modern biyoteknolojik yöntemleri kullanarak genetik varyasyonu artırmak büyük ölçüde mümkündür. Adı geçen araştırmacılar, *Hypericum perforatum* için etkili bir mikro çoğaltma yöntemi geliştirmeyi amaçladıkları çalışmalarında farklı sitokininler (Kin ve BAP) ve oksinler (2,4-D) ile modifiye edilmiş MS ortamlarında kallus oluşumunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Kallus taze ağırlığı bakımından en yüksek sonuçlar, 1mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D ile 1 mg/l BAP ve 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarından elde edilmiştir. Kallus başına sürgün sayısı ise, kallusların geliştiği ortama bağlı olarak 20-30 arasında değişmiştir.

Hypericum cinsi, omega-3 yağ asitleri bakımından oldukça zengin bir kaynaktır. Omega-3 yağ asitleri esansiyel yağ asitleri olarak düşünülmektedir. Kapsamlı araştırmalar, omega-3 yağ asitlerinin inflamasyonu azalttığını, kalp hastalığı ve artrit gibi bazı kronik hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğunu göstermektedir. Özen ve Başhan (2002), *Hypericum triquetrifolium*'un yapısında bulunan yağ asitlerinin bileşimlerini, GC/MS yöntemiyle saptanmasına yönelik bir çalışma yapmışlardır.

Ahmet ve ark. (2002), *Hypericum androsaemum* hücre kültürlerinde benzoik asit sentezini inceledikleri çalışmalarında, hücre kültürlerinin gelişimiyle paralel olarak ksanton miktarının arttığını ve bu artışın metil jasmonat uygulamasıyla teşvik edildiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar gerek hücre kültürünün gelişimiyle gerekse de metil jasmonat uygulamasıyla meydana gelen ksanton miktarındaki bu artışın, benzoik asit biyosentetik enzimlerinin aktivitesindeki artıştan dolayı olduğunu bildirmişlerdir.

Sökmen ve Gürel'in (2002) bildirdiklerine göre, hücre veya dokulardan yeni bitki bireyleri meydana getirmeye imkan tanıyan organogenezis, generatif yoldan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin üretiminde, büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Organogenezisin diğer bir önemi ise, bitki transformasyon çalışmalarının başarısını yakından etkilemesidir. Çünkü, optimize edilmiş bir rejenerasyon sistemine sahip olmayan bir türde, transformasyon yapmanın bir anlamı yoktur. *In vitro* kültürü yapılan hücrelerden bazılarının özgün bir işlevi yerine getirmek veya bir doku ya da organı

oluşturmak üzere farklılaşmaları, genellikle sekonder metabolitlerin birikiminde bir artış meydana getirmektedir.

Bais ve ark.'nın (2002) bildirdiklerine göre, son yıllarda *Hypericum perforatum*'un kullanımı, yaprak ve çiçeklerinde bulunan hiperisinin farmakolojik özelliklerinden dolayı artmıştır. Araştırmacılar hiperisinin geniş çapta üretimini mümkün kılmak amacıyla bu bitkinin *in vitro* şartlarda üretimi ve yetiştirilmesi için yeni bir hücre kültür sistemi geliştirmişlerdir. 2,4-D ve Kin ile modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilen yaprak eksplantları, en yüksek kallus oluşum oranını vermiştir. Hiperisin, hücre fazında ve yapraklardaki lokalizasyonda çeşitlilik göstermiştir. Bu madde hücre içerisinde özel organellerde ve yaprakların vakuollerinde birikim göstermiştir. Ayrıca ışık ve karanlık şartlar da, büyüme ve hiperisin üretimi üzerine etkili olmuştur.

Hohe ve ark.'nın (2002) bildirdiğine göre, doğadan toplanan ya da kültürü yapılarak elde edilen bitkilerin sekonder metabolit içeriği iklim, mevsim ve toprak gibi çeşitli çevre etkenlerinden ötürü önemli seviyede farklılık göstermektedir. Daha da önemlisi, hastalık ve zararlıların meydana getirdiği tahribat ve pestisit kullanımı, hedef metabolitin miktarını ve kalitesini düşürebilmektedir. Bitki metabolizmasını etkileyen çevre faktörlerinin tamamen kontrol edilebildiği *in vitro* kültür sistemleri, tıbbi bitkilerin ve sekonder metabolitlerin üretiminde önemli birer alternatiftirler. Araştırmacılar, kantaron (*Hypericum perforatum*), lavanta (*Lavandula officinalis*), *Cymbopogon citratus* ve fabiana otu (*Fabiana citrata*) bitkilerinde sırasıyla hiperisin, rosmarinik asit, α - β citral ve oleanolik asit'i *in vitro* yöntemlerle üretmek için yaptıkları çalışmada her bitki için kallus, sürgün, süspansiyon ve biyoreaktör gibi farklı *in vitro* kültürleri başlatmışlardır. Kültürler, sözü edilen metabolitleri, kaynak bitkideki seviyelerle karşılaştırılabilir oranda üretmişlerdir. Bitki sekonder metabolitlerinin üretiminde alternatif yöntemlere dair çalışmalar biyoteknolojik yaklaşımların önemli sekonder metabolitlerin üretiminde geleneksel metotlara göre bazı avantajlara sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu avantajlar şu şekilde özetlenebilir: 1. İlgili metabolitin iklimsel değişimler yahut toprak şartlarından bağımsız olarak kontrollü şartlarda üretilebilmesi; 2. *In vitro* materyalin bakteri, mantar ya da böcek gibi kirleticilerden arı oluşu; 3. Herhangi bir bitkinin, ister tropik ister alpinik kökenli olsun, *in vitro* kültüre alınabilmesi; 4. *In vitro* kültür şartlarının optimize edilmesi ve sekonder metabolit üretimini tetikleyecek şekilde düzenlenmesi ile laboratuvar masraflarının azaltılması ve

sekonder verimin artırılması; 5. Organik maddelerin kallus kültürlerinden ekstrakte edilebilmesi.

Santarem ve Astarita'nın (2003), *Hypericum perforatum* için etkili bir mikro çoğaltım sistemi geliştirmeyi ve rejenere bitkilerle tarla şartlarında yetiştirilen bitkilerin hiperisin içeriklerini karşılaştırmayı amaçladıkları bir çalışmada, olgun bitkilerden elde edilen gövde segmentlerini 4.5 μ M BA, Kin, thidiazuron (TDZ) ile desteklenmiş ya da 0.05 μ M NAA ile kombine edilmiş MS ortamında kültüre almışlardır. Yalnızca, BA ve Kin içeren ya da bu hormonları NAA ile birlikte ihtiva eden ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Oluşan kalluslar, 4.5 μ M BA içeren MS besi ortamında sürgün oluşturmak üzere alt kültüre alınmışlardır. En yüksek sürgün oluşumu, BA ve NAA içeren ortamlarda oluşan kalluslarda gözlenmiştir. Köklenen bitkiler başarılı bir şekilde dış şartlara adapte edilmişlerdir. Yapılan analizler neticesinde, kallusların ana bitkideki içeriğin sadece % 0.11' i kadar hiperisin ihtiva ettiği, rejenere bitkilere ait yaprak ve sürgünlerin ise tarla şartlarında yetiştirilen bitkilerle benzer seviyede hiperisin içerdiği belirlenmiştir (0.5 mg/g taze ağırlık). Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak, *Hypericum perforatum*'da hiperisin oluşumunun yaprak farklılaşması ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir.

Abreu ve ark. (2003), genç (6 aylık) ve olgun *Hypericum brasiliense* bitkilerinden elde ettikleri apikal sürgünleri, sıvı ve katı temel MS ortamında kültüre almışlardır. Her iki besi ortamında sürgün gelişimini takiben köklenme ile birlikte bitki rejenerasyonu gözlenmiştir. Genç bitkilerden alınan eksplantlarda ve katı besi ortamında bitkicikler daha uzun boylu olmuşlardır. Ayrıca, olgun bitkilerden elde edilmiş eksplantların katı besi ortamında kültüre alınmasıyla gelişen bitkiciklerin tamamı çiçeklenmiştir. Araştırmacılar, 20 günde yaklaşık 12 cm uzunluğunda bitki elde etmeyi sağlayan bu *in vitro* çoğaltım sisteminin, sera ya da tarla tarımına göre daha avantajlı ve kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Pasqua ve ark (2003), *in vitro* şartlarda yetiştirdikleri *Hypericum perforatum* L. bitkilerinin kallus, hücre süspansiyon kültürleri ve rejenere edilen organlarından elde ettikleri metanol ekstraktlarından hiperforin, hiperisin, flavonoid ve ksanton bileşiklerini izole etmişler.

Kirakosyan ve ark. (2004)'nın bildirdiklerine göre, *Hypericum perforatum* ihtiva eden ürünlere olan yoğun taleple birlikte hızla büyüyen uluslararası piyasa, sürekli ve yüksek kaliteli üretimin yanı sıra daha uzun soluklu ve ekonomik açıdan tatminkâr üretim stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. *Hypericum perforatum* üretiminde; tarla tarımı, sera yetiştiriciliği ve hücre/doku/organ kültürleri olmak üzere farklı alternatif metodlar kullanılmaktadır. Bu metotlar içerisinde en az masraflı olanı tarla tarımı olup fakat kısa vejetasyon süresinden dolayı yıl boyunca istenilen anda sürekli bir üretim bu metot ile mümkün değildir.

Sera üretimi, yüksek enerji ve iş gücü girdileri sebebiyle tarla tarımına kıyasla daha masraflıdır. Ancak ışık ve sıcaklığın kontrol edilmesiyle, üretimde sezona bağımlılığı ortadan kaldırmak mümkün olmaktadır.

Hücre/doku/organ kültürleri; kullanılan kimyasal maddeler ve steril şartlar için gerekli masraflarla birlikte, en pahalı üretim metodudur. Ancak bu metotta, genetik olarak transforme edilmiş bir bitki materyali elde etmek ve materyali çoğaltmak mümkündür. Tarla tarımı ve sera yetiştiriciliği yöntemleriyle bunu gerçekleştirmek mümkün değildir. Hücre/doku/organ kültürleri yöntemiyle elde edilen materyalin sekonder metabolit içeriğinin çok daha yüksek olması, yapılan yüksek masraflı karşılayabilmektedir. Nitekim yine aynı araştırmacılar, yabani floradan toplanan ya da serada yetiştirilen *Hypericum perforatum* bitkilerinden in vitro ortamda rejenere edilen sürgün kültürlerinin hiperisin, psedohiperisin ve hiperforin için mükemmel kaynaklar olduğunu bildirmişlerdir. Rejenere sürgünlerin hiperisin ve psedohiperisin konsantrasyonu in vivo şartlarda yetiştirilen bitkilere göre, 6-8 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Özen ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada Türkiye'de yetişen iki *Hypericum* türünün (*Hypericum perforatum* L. ve *Hypericum retusum* Aucher) GC/MS ile analizlerini gerçekleştirip, yaygın bitki yağ asitleri olarak önemli bileşenler olan 3-hidroksi yağ asitleri, yani 3-hidroksitetra dekanoik asit ve 3-hidroksiokta dekanoik asit elde etmişlerdir.

Ferrari ve ark. (2005), *Hypericum perforatum* subsp. *perforatum* tohumlarını temel MS besisi ortamında çimlendirilerek steril fideler elde etmiş ve bu fidelerden sağlanan gövde eksplantlarını 2,4-D (1.105 mg/l), Kin (0.215 mg/l) ve/veya NAA

(0.186 mg/l) ile desteklenmiş B5 (Gamborg ve ark. 1968) ortamlarında kültüre alarak kallus dokuları geliştirmişlerdir. Kallus taze ağırlığı, NAA içeren ortamlarda daha fazla olmuştur. Kurutulmuş kallus dokularının analizi neticesinde, daha önce kaynak bitkide tanımlanmamış olan iki yeni ksanton (1-hydroxy-5,6,7-trimethoxyxanthone ve 3-Omethylpaxanthone) türevinin varlığı tespit edilmiştir.

Ayan ve Çırak (2005), *Hypericum linarioides*, *Hypericum lydum*, *Hypericum organifolium*, *Hypericum venustum* ve *Hypericum scabrum* bitkilerinde en uygun kallus oluşum ortamlarını tespit etmek için yürüttükleri çalışmada; tohumları farklı konsantrasyonlarda BA ve 2,4-D ile desteklenmiş temel MS besisi ortamlarında kültüre almışlar ve BA ile 2,4-D konsantrasyonlarının türe göre değiştiğini ve kallus oluşumunu önemli seviyede etkilediğini bildirmişlerdir.

Ayan ve ark. (2005), hiperisini doku kültürü yöntemiyle üretmek ve *Hypericum perforatum* için etkili bir mikro çoğaltım sistemi tanımlamak amacıyla yürüttükleri bir çalışmada, yaprak diskleri ve gövde segmentlerini Kin, 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 sekiz hafta boyunca kültürde muhafaza etmişlerdir. Sonuçta, araştırmacılar tarafından 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 Kin içeren MS ortamından elde edilmiştir. Elde edilen kalluslar, sürgün oluşumu için 1 mg/l BA; kök oluşumu için ise 1 mg/l IAA içeren MS ortamlarında alt kültüre alınarak, kallus başına sürgün sayısı ve hiperisin içeriği araştırılmıştır. Yaprak disklerinden gelişen kallusların oluşturduğu sürgünlerde, bu değerler daha yüksek olup sırasıyla; 19 sürgün/kallus ve % 0.048 olarak tespit edilmiştir.

Ayan ve Çırak (2006), *Hypericum perforatum* tohumlarını, 2,4-D (0.1, 1.0 mg/l) ve BA'nın farklı konsantrasyonları ile desteklenmiş temel MS besisi ortamlarında kültüre almışlardır. Oluşan kalluslar sürgün gelişimini teşvik etmek amacıyla BA (4.4 mg/l) içeren besisi ortamına, bu besisi ortamında gelişen sürgünler ise köklenme için IAA (1 mg/l) içeren MS ortamına transfer edilmişlerdir. Dış şartlara alıştırılan bitkiciklerin %40'ı hayatta kalmayı başarmıştır.

Franklin ve Dias (2006), *Hypericum perforatum*'un 4 farklı genotipinde organogenezis ve somatik embriyogenezis çalışması yaparak, bitki büyüme

düzenleyicilerinin bitki rejenerasyonunu etkilediğini ve sürgün rejenerasyonunun düşük BAP oranlarında daha hızlı olduğunu belirlemişlerdir.

Toker ve ark. (2006), Türkiye’de yetişen *Hypericum hyssopifolium* var. *Microcalycinum* ve *Hypericum lysimachioides* var. *Lysimachioides* türlerinin uçucu yağ bileşenlerini, GC ve GC-MS yöntemlerini kullanarak araştırmışlar ve analizler sonucunda bu türlerden elde edilen uçucu yağların içindeki en büyük komponentin karyofilen oksit olduğunu ve her iki türün içerdiği uçucu yağların, 60-80 µg/ ml lik bir konsantrasyonda dokuz mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çırak ve ark. (2007), *Hypericum bupleuroides* gris.’in internodal ve yaprak eksplantlarından alınan bitkilerin direk ve indirek rejenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmalarında, yaprak ve internodal eksplantlar, benziladenin (BA; 1.0 veya 0.1 mg/l) ve 2,4-dikloro fenoksi asetik asit (2,4-D; 1.0 veya 0.1 mg/l) ile desteklenmiş MS besisi ortamında kültüre alınan *in vitro* çimlenmiş 9 haftalık fidelerden alınmıştır. BA ve 2,4-D kombinasyonu kullanımına bağlı olarak, bu kültürlerin aşırı kallusun yanı sıra eksplantların her iki çeşidinin yüzeyinde direkt olarak adventif sürgün tomurcukları ürettiği görülmüştür. Araştırmacılar, 2 mg/l BA ile desteklenmiş MS ortamında her iki eksplant türünde kallustan çok sayıda sürgün elde etmişlerdir. Internodal eksplantlar direk ve indirek bitki rejenerasyonuna yaprak dokularına göre, daha duyarlı olarak bulunmuştur. Sürgünler ya kallus ya da eksplant yüzeyinden alınarak, rejenere edildikten sonra, hormonsuz MS besisi ortamı, sürgünler için en iyi köklenme ortamı olarak gözlemlenmiştir.

Karakaş ve ark. (2008), *Hypericum triquetrifolium* Turra.’nın hiperisin içeriği ve sürgün rejenerasyonu üzerine BAP’ın farklı oranlarının etkisini inceledikleri çalışmalarında, *in vitro* ortamda *Hypericum triquetrifolium* Tura.’da hiperisin birikiminde BAP’ın farklı konsantrasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, *Hypericum triquetrifolium* Turra. tohumları %5.5 agar, %3 sakkaroz ve BAP (0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) ile desteklenmiş MS besisi ortamında kültüre alınmıştır. Akseni çimlenen tohumların apikal çeşitleri BAP (0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) ile desteklenmiş MS ortamında çoğaltılmıştır. En yüksek sürgün sayısı, 2.0 mg/l BAP ile desteklenmiş MS

ortamında elde edilmiştir. En yüksek hiperisin oranı, 1.0 mg/l BAP ile desteklenmiş besi ortamında bulunmuştur.

Pasqua ve ark. (2008), *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Fröhlich) Borkh'ın yapraklarından *in vitro* koşullarda elde edilen kalluslardan, sürgün rejenerasyonu ve somatik embriyogenesis elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Oluk ve ark. (2009) 'nın bildirdiklerine göre, on farklı ortama yerleştirilen *Hypericum triquetrifolium* Turra'nın olgun fideleri sekiz haftada sulu agarda (Water-agar) (%89) çimlendirilmiştir. Eksplant başına en yoğun sürgün oranı 1.25 mg/l thidiazuron (TDZ) + 0.5 mg/l IAA ile desteklenmiş MS ortamında, en uygun kök gelişimi ise, 1 mg/l IAA ile desteklenmiş MS besi ortamında elde edilmiştir.

Namlı ve ark (2009), *Hypericum triquetrifolium* Turra'da hiperisin artışına UV-C radyasyonunun etkisini inceledikleri çalışmalarında, *Hypericum triquetrifolium* Turra'nın olgun tohumları hormonsuz MS besi ortamında çimlendirilmiş ve sürgünler 0.25 mg/l BAP (N6-benzylaminopurine) ile desteklenmiş MS kültür ortamında başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. UV-C radyasyonu, *Hypericum triquetrifolium* Turra'ya farklı periyotlarda (15, 30, 45, 60 dk) uygulanmıştır. 15 dk UV-C uygulamasında hiperisin içeriği yükselmesine rağmen, 60 dk'lık uygulamada ise bu hiperisin içeriğinde düşüş görülmüş ve UV-C radyasyonunun test edilen parametrelerine bağlı olarak, sürgünlerde morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir.

Namlı ve ark. (2010), diğer bir araştırmalarında, *Hypericum retusum* Aucher' in mikroçoğaltımı üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini test etmek amacıyla sürgünlerin Kinetin (Kin) ve Benzil aminopurinin (BAP) dokuz farklı konsantrasyonu ile desteklenmiş MS besi ortamında culture almışlardır. Sürgün proliferasyonu çalışmalarında, BAP için ideal oran 0.5 mg/l (64.25 sürgün/eksplant), Kin için ise en ideal oran 1.5 mg/l (27.87 sürgün/eksplant) ile desteklenmiş ortamda elde etmişlerdir. Ayrıca, sürgünler üç farklı oksin (0.25 mg/l IAA, IBA, NAA) ile kombine edilmiş Kin (1.5 mg/l) ve BAP (0.5 mg/l) içeren ortamda ayrı ayrı kültüre alınmıştır. Sürgün sayısı ve uzunluğu göz önüne alındığında, en uygun sonuç 0.5 mg/l BAP + 0.25 mg/l IBA (54.12 sürgün/eksplant, 3.36 sürgün uzunluğu) ile desteklenmiş ortamda elde edilmiştir. Çalışmada en etkili sürgün çoğaltımı, BAP'ın tek başına kullanımı ile elde edilmiştir.

Oluk ve ark. (2010) bildirdiklerine göre, *Hypericum triquetrifolium* Turra'nın indirek rejenerasyonu başlatmak için yapılan çalışmalarında, kallus başlatılması, BAP (2 mg/l) + IAA (0.5 mg/l) ile desteklenmiş yarı katılaştırılmış MS besi ortamında 35 günlük yaşlı aseptik fidelerin kotiledon eksplantları ile yapılmıştır. Sitokininlerin azalmasıyla kallus yüzeyinde meristem dokusu gelişmiş ve yarı katı MS ortamında bitki büyüme düzenleyicileri tamamen çıkarıldığında elde edilen embriyojenik kallus aracılığıyla maksimum düzeyde rejenere küçük bitkiler oluşmuştur. Araştırmacılar tarafından bu embriyojenik kallusun hiperisin içeriği 48 µg/g DM olarak bulunmuştur. Rejenere bitkicikler 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirilip, aklimatizasyon çalışmaları başarıyla (%94) yapılmıştır.

Bacila ve ark (2010), aseptik şartlarda yetiştirdiği, *Hypericum maculatum cranz* bitkisinin nodal segmentlerini kullanarak, 0.5 mg/l 2iP + 0.2 mg/l BA + 0.1 mg/l Kin + 0.05 mg/l NAA içeren MS besi ortamında kültüre alarak sürgün oluşumunu sağlamışlar ve elde ettikleri bitkileri 0.5 mg/l GA₃ (Gibberellik asit) ve 1 mg/l IAA içeren MS ortamında köklendirerek toprağa aktarmışlardır.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

Hypericum (Guttiferae) özellikle ılıman bölgelerde, çalılık ve fundalık alanlarda yetişen bir bitki cinsidir (Campbell ve Delfosse 1984). Dünyada yaklaşık 400 türü bulunan *Hypericum* (Guttiferae) cinsi, Türkiye de 43'ü endemik olmak üzere 89 türle temsil edilmektedir. Türkiye'de geleneksel tedavide antispazmik, antiseptik ve sakinleştirici olarak kullanılmaktadır (Davis 1988).

Çok yıllık otsu bitkiler sınıfından olan bu cinse ait taksonların yaprakları basit veya tam kenarlı ve çoğunlukla şeffaf noktalıdır. Çiçekleri erselik olup 5 çanak ve 5 taç yapraktan oluşur, genellikle sarı renkli olan çiçekler üzerlerinde siyah noktalar içerir. Stamenler 5'li demetler halinde taç yaprakların karşısında yer alır, her birinde 3 ile 125 arası stamen vardır, ender olarak steril demetlere değişirler. Ovaryum, her birinde 2 veya daha çok tohum taslağı 3-5 adet serbest veya ince bitişiktir. Meyve, kapsül tipinde olup septisid olarak açılır (Yaltırık ve Efe 1989).

Takson Hiyerarşisi:

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Division: Magnoliophyta

Classis: Magnoliopsida (Dicotyledoneae)

Subclassis: Dilleniidae

Order: Theales

Family: Clusiaceae

Genus: *Hypericum*

Species: *Hypericum spectabile*

(Seçmen ve ark. 2008)



Şekil 3.1. Doğal Ortamda *Hypericum spectabile*'nin genel görünüşü (Adıyaman-Kahta Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN)

3.1.1. Bitkinin toplanması

Araştırmada başlangıç materyali olarak *Hypericum spectabile*'nin olgun tohumları kullanılmış olup, çalışma D.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarında 2009-2011 yılları arasında yürütülmüştür. Araştırmanın materyalini oluşturan türün temini ve teşhisi Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından yapılmıştır.

3.2. METOD

3.2.1. Cam Malzeme ve Filtre Kağıtlarının Sterilizasyonu

Deneylerde kullanılan cam malzemelerden erlenmayer ve beher fırça yardımıyla temizlenip, sıcak sudan geçirildikten sonra üç defa saf sudan geçirilerek etüvde 180 °C'de 3 saat bekletilmek suretiyle steril edilmiştir. Diğer cam malzemeler olan mezür, balon joje ve pipetler ise yine fırça yardımıyla yıkanıp, sıcak sudan geçirildikten sonra üç defa saf sudan geçirilerek 80 °C'de etüvde 3 saat bekletilmek suretiyle sterilizasyonları sağlanmıştır.

Bitkisel materyallerin kültüre alındığı Magenda GA-7 kültür kapları ise sıcak suda yıkanıp, üç defa saf sudan geçirilip kurutma işlemi sağlandıktan sonra alüminyum folyo ile sarılarak 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 25 dakika süre ile otoklavda sterilizasyonu tamamlanmıştır. Araştırmanın her aşamasında kullanılan filtre kağıtları,

180 °C’de 2 saat süre ile, besi ortamları ve stokların hazırlanmasında kullanılan saf sular ise yine etüvde 180 °C’de 3 saat süre ile sterilize edilmiştir.

3.2.2. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Materyallerin uygun boyutlarda hazırlanması ve kültür kaplarına yerleştirilmesi için kullanılan pens ve bisturiler % 96’lık alkol ile silinip 6-9’lu gruplar halinde alüminyum folyo ile sarılarak kuru hava sterilizatöründe 300 °C’de 30 dakika süre ile steril edilmiştir.

3.2.3. Röpikaj ve Kültür Odalarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Deneyler başlatılmadan 1 gün (24 saat) önce röpikaj odasındaki kapı, masa, dolaplar, zemin ve duvarlar seyreltilmiş sodyum hipoklorit (NaOCI; % 53 klorür içeren) ile silinmiştir. Çalışmanın yapılacağı steril kabinin iç kısımları %70’lik alkol ile temizlenmiştir. Yukarıda verildiği gibi röpikaj odasının sterilizasyonu yapıldıktan sonra ultraviyole lambası 2-4 saat açık bırakılarak sterilizasyon işlemleri tamamlanmıştır.

Büyüme odasında; 30-60 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetine sahip cıvalı Flüoresan lambalar (400 w, MBFR/U, Thorn) ve ortam sıcaklığını $25\pm 2^\circ\text{C}$ de sabit tutan bir sıcaklık kontrol sistemi bulunmaktadır. Ayrıca büyüme odasının ışık peryodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak biçimde ayarlanmıştır (3000-5000 lüx).

3.2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Bu araştırmada yapılan bütün deneysel çalışmalarda, besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS-1962) tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanılmıştır.

3.2.4.1. MS besi ortamında kullanılan stok çözeltilerin hazırlanması

MS (makro elementler) Ana Çözeltisi

NH_4NO_3	16.5 g
KNO_3	19.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7 g
KH_2PO_4	1.7 g
Distile Su	1000 ml’ye tamamlanır

MS Mikro 1 Elementler Ana Çözeltisi

H ₃ BO ₃	620 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	1695 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg
KI	83 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

MS Mikro 2 Elementler Ana Çözeltisi

CuSO ₄ .5H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ .6 H ₂ O	25 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

Kompleks Şelatör Ana Çözeltisi

FeSO ₄ .7H ₂ O	3.725 g
Na ₂ EDTA	2.785 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır.

Vitamin Karışımı Ana Çözeltisi

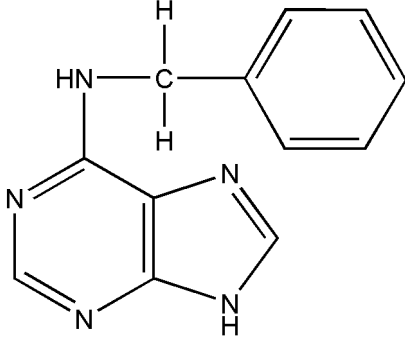
Nikotinik asit	50 mg
Glisin	200 mg
Pridoksin HCl	50 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır

B1 Vitamini Ana Çözeltisi (10⁻³)

Tiamin HCl	100 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

BAP Ana Çözeltisi (10⁻³)

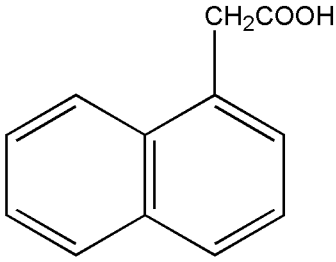
6-Benzilaminopurin (BAP)	100 mg
1N HCl	3-5 cc
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.



Benzilaminopurin (BAP)

NAA Ana Çözeltisi (10^{-3})

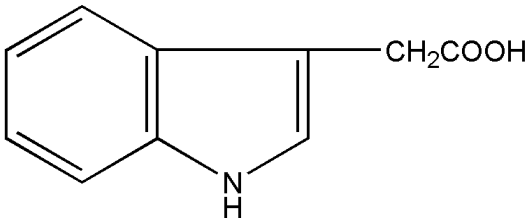
α Naftalen asetik asit (NAA)	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	3-5 cc
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.



Naftalen asetikasit (NAA)

IAA Ana Çözeltisi (10^{-3})

İndolasetikasit (IAA)	100 mg
% 95 lik Etil Alkol	5-10 cc
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.



İndol asetikasit (IAA)

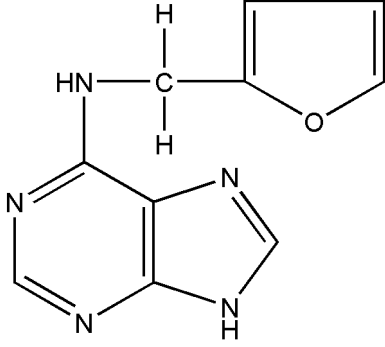
Kinetin Ana Çözeltisi (10^{-3})

Kinetin (6-furfuroaminopurin)

100 mg

Distile su

100 ml'ye tamamlanır.



6-furfuroaminopurin (Kin)

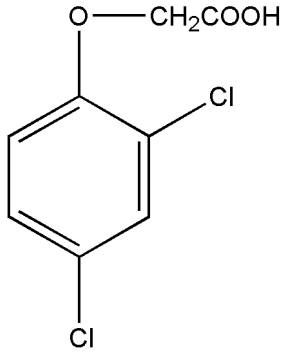
2,4- D Ana Çözeltisi (10^{-3})

2,4 Diklorofenoksi asetikasit (2,4-D)

100 mg

% 95 lik Etil Alkol

100 ml



2,4 Diklorofenoksi asetikasit (2,4-D)

-1 Litre Murashige ve Skoog (MS) Besi Ortamının Hazırlanması;

Araştırmamızda kullanılan 1 lt MS besi ortamı aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır.

1 litrelik bir erlenmayer içerisine 750 ml steril edilmiş distile saf su bırakılmıştır. Daha sonra sırasıyla; 30 gr sakkaroz, 100 ml MS ana solüsyonu, 10 ml MS-1, 1 ml MS-2, 10 ml kompleks şelatör, 1 ml vitamin karışımı, 1 ml B1 vitamini eklenerek çözelti

steril distile su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır. MS kültür besi ortamı hazırlanırken sırasıyla eklenen her stok çözeltiden sonra solüsyon 2-4 dakika çalkalanmıştır. Çalışmanın amacına uygun bitki büyüme düzenleyicileri (oksin ve sitokinin) seçilip eklendikten sonra besi ortamının pH'sı 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile 5,7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Katılaştırma ajanı olarak kültür besi ortamına 5.458 g agar eklenmiştir. Hazırlanan besi ortamı, 25 dakika süre ile 121 °C'de 1 atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyonu sağlanan besi ortamı röpikaj odasında bulunan steril kabin içerisinde Magenta GA-7 kaplarına 50-60 ml olacak şekilde bölüştürülmüştür.

-Bitki Büyüme Hormonlarının Hazırlanması

Stok çözeltilerin tümü genellikle g/ml konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin (BBD) hazırlanması için, büyüme hormonları için gerekli olan miktarlar bir parça alüminyum folyo içinde tartılmıştır. 50 veya 100 ml'lik steril balon jojeler içerisine bırakılmıştır. Her madde az miktarlarda (5-10 ml) 1 M KOH veya HCl ya da alkolde çözdürülmüştür. Bazı maddeler ise (2,4-D için) alkolde eritilmiştir. Eritilen bitki büyüme hormonları steril saf suyla, 50 ml veya 100 ml'ye tamamlanmıştır. Büyüme maddelerinin hazırlanan stok çözeltileri buzdolabında +4°C'de saklanarak her 2-3 haftada bir yeniden taze solüsyonlar hazırlanmıştır.

3.2.5. Kullanılan Materyalin Sterilizasyonu

Bu araştırmada başlangıç materyali olarak kullanılan *Hypericum spectabile*'nin tohumlarına aşağıda belirtilen sterilizasyon işlemi sırasıyla uygulanmıştır.

Tohumlar, musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik alkolde 30 saniye çalkalanarak ön sterilizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Daha sonra %5'lik NaOCI çözeltisinde 10 dakika süre ile bekletilerek sterilizasyon işlemi tamamlanan tohumlar, steril saf su ile 5 kez 5'er defa çalkalanarak NaOCI'den arındırılmıştır.

Steril tohumlar, 30 g/l sakkaroz ve 5.458 g/l agar ile desteklenmiş hormonsuz 1/1 MS besi ortamında kültüre alınarak, optimum koşulların sağlanmış olduğu büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Kültüre alınan tohumların gelişimleri ile ilgili gözlemler alınarak, çimlenme durumları değerlendirilmiştir.

3.2.6. Kùltür Başlatma Çalışmaları

Araştırmanın birinci aşamasında, çimlendirme çalışmalarında tohumlara 2 farklı uygulama yapılmıştır.

-Birinci uygulamada; başlangıç materyali olarak kullanılan tohumlar sterilizasyon işlemlerinden geçirildikten sonra, testaları çatlatılmadan *in vitro* ortamda kùltüre alınmıştır. Besi ortamlarında yaklaşık 4-5 hafta besi ortamında bekletilmesine rağmen tohumlarda çimlenme belirtisi görülmemiştir.

-İkinci uygulamada; steril pens ve bistüriler yardımıyla tohumlar çatlatılarak kùltür besi ortamına aktarılmıştır. Tohumların kùltüre alınmasından 5-10 gün sonra ilk çimlenme belirtisi olan radikula gelişimi ve daha sonraki günlerde yaprak gelişimine tanık olunmuştur.

3.2.7. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları

3.2.7.1. BAP (Benzilaminopurin)'ın Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün

Proliferasyonuna Etkisi

In vitro teknikler kullanılarak tohumlar çimlendirildikten sonra, mikroçoğaltma çalışmalarının birinci aşamasında sürgün proliferasyonu üzerine BAP'ın farklı konsantrasyonlarının (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l) etkisi araştırılmıştır.

BAP'ın farklı konsantrasyonlarını içeren 1/1 MS besi ortamları; 30 g/l sakkaroz, 5.458 g/L agar ilavesiyle desteklenmiştir. Çimlenme çalışmalarından elde edilen 10-15 günlük genç sürgünler, her bir kaptaki 3-4 tane olacak şekilde 6 farklı besi ortamında kùltüre alınarak, büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Test edilen BAP parametrelerinin materyaller (3-5 yapraklı genç sürgünler) üzerindeki etkisi (sürgün sayısı-uzunluğu ve genel morfolojik gözlemler) haftalık gözlemler alınarak veriler halinde kaydedilmiştir.

3.2.7.2. Kin (Kinetin)'in Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün

Proliferasyonuna Etkisi

Sürgün proliferasyon çalışmaları için ayrıca Kinetinin farklı konsantrasyonlarının (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l) etkisi araştırılmıştır. 10-15

günlük genç sürgünler Kinetinin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır.

Besi ortamı 30 g/l sakkaroz, 5.458 g/l agar ilavesiyle desteklenerek, pH'sı agar ilavesinden önce NaOH ve HCl ile 5.7 olacak şekilde ayarlanıp, 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Haftalık gözlemler alınarak, test edilen 6 farklı parametrenin sürgün gelişimine etkisi veriler halinde kaydedilmiştir.

3.2.7.3. BAP+Oksin Kombinasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Mikroçoğaltma çalışmalarının birinci aşamasında test edilen BAP parametreleri arasında 0.25 mg/l oranının, sürgün çoğaltımı için ideal olduğu tespit edilmiştir. Araştırmanın ikinci aşamasında, elde edilen bu veriler doğrultusunda, 0.25 mg/l BAP ile birlikte NAA ve IAA'nın farklı konsantrasyonlarını (0.25, 0.5, 1.0 mg/l) içeren besi ortamları ayrı ayrı hazırlanarak, sürgün proliferasyonu üzerine oksin ve sitokininin kombine etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla besi ortamında BAP oranı (0.25 mg/l) sabit tutularak, NAA'nın farklı konsantrasyonlarını (0.25, 0.5, 1.0 mg/l) içeren besi ortamı 30 g/l sakkaroz ve 5.458 g/l agar ile desteklenmiştir. Besi ortamının pH'sı agar ilavesinden önce NaOH ve HCl ile 5.7 olacak şekilde ayarlanıp, 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

Çimlenme ortamlarında elde edilen genç sürgünler (3-5 yapraklı) steril pens ve bistüriler yardımıyla NAA'nın değişik konsantrasyonlarını içeren kültür kaplarına (her bir kapta 3-4 sürgün) ayrı ayrı aktarılmıştır. Kültür işlemleri tamamlandıktan sonra kültür kaplarının kapakları kapatılıp, parafilmle sarılarak büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Sürgün gelişimi ve boyu, sürgün sayısına ilişkin veriler belirli zaman periyotlarında alınarak kaydedilmiştir.

Ayrıca araştırmada, 0.25 mg/l BAP ve IAA'nın aynı konsantrasyonlarının (0.25, 0.5, 1.0 mg/l) birlikte etkisi de incelenmiştir. 3-5 yapraklı steril sürgünler, BAP ve IAA'yı içeren 3 farklı besi ortamında kültüre alınarak, büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Materyaller, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve gelişimleri bakımından karşılaştırılmıştır.

3.2.7.4. Kin+Oksin Kombinasyonunun Sürgün Proliferasyonuna Etkileri

Sürgün çoğaltımı çalışmalarında test edilen Kin parametrelerinin etkisi karşılaştırıldığında, sürgün proliferasyonu için ideal oranın 1.5 mg/l olduğu önceden yaptığımız deneylerden aldığımız sonuçlarla tespit edilmiştir. Ancak sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve morfolojik gözlemlerden alınan veriler, beklenen sonucu vermediği için, Kin ve oksin kombinasyonlarının etkisi de ayrıca araştırılmıştır. Hazırlanan besi ortamında 1.5 mg/l Kin oranı sabit tutularak, NAA ve IAA'nın birlikte etkisi araştırılmıştır.

Besi ortamında sakkaroz ve agar oranları önceki deneylerde kullanılan miktarlarda alınarak, besi ortamının pH'sı 5.7 olacak şekilde ayarlanıp 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Steril sürgünler 1.5 mg/l Kin ile birlikte NAA konsantrasyonlarının (0.25, 0.5, 1.0 mg/l) bulunduğu besi ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kültür işlemleri tamamlandıktan sonra, kapların kapakları parafilmle sarılarak, sürgünler büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Sürgün gelişimi, boyu ve sürgün sayısına ilişkin veriler belirli periyotlarla alınarak sonuçlar kaydedilmiştir.

Aynı şekilde, Kin (1.5 mg/l) ve diğer bir oksin çeşidi olan IAA konsantrasyonlarının (0.25, 0.5, 1.0 mg/l) birlikte etkisi de ayrı ayrı incelenmiştir. Genç sürgünler steril pens ve bistüriler yardımıyla uygun boyutlarda kesilerek hazırlanan 3 değişik besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve sürgün boyuna ilişkin veriler düzenli aralıklarla alınarak kaydedilmiştir.

3.2.7.5. Yaprak ve Kök Eksplantlarından İndirekt Sürgün Rejenerasyonu

Kallus başlatma çalışmalarında, BAP ve 2,4-D'nin kombinasyonlarından oluşan 9 parametre ayrı ayrı kullanılarak MS besi ortamı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. İndirekt Sürgün Rejenerasyonu için BAP ve 2,4-D'nin Kombine Etkisi

BAP	2,4-D
0.5 mg/l	0.5 mg/l
0.5 mg/l	1.0 mg/l
0.5 mg/l	1.5 mg/l
1.0 mg/l	0.5 mg/l
1.0 mg/l	1.0 mg/l
1.0 mg/l	1.5 mg/l
1.5 mg/l	0.5 mg/l
1.5 mg/l	1.0 mg/l
1.5 mg/l	1.5 mg/l

İn vitro ortamda yetiştirilen sürgünlerin yaprak ve kökleri kallus kültürlerini başlatma çalışmaları için materyal kaynağı olarak kullanılmıştır. Hazırlanan MS besi ortamı, 30 g/l sakkaroz ve 5.458 g/l agar ile desteklenmiştir. Gelişen kalluslar, kallus proliferasyonu için, steril pens ve bistüriler yardımıyla 2-3 parçaya bölünerek önce 0.5 mg/l BAP daha sonra ise 1.0 mg/l BAP ile desteklenmiş besi ortamında alt kültürleri yapılmıştır.

Kallus proliferasyonu başarıyla tamamlandıktan sonra, kallus dokusu, kallustan sürgün rejenerasyonu için, 3-5 parçaya bölünerek BAP'ın 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l konsntrasyonlarını içeren 1/1 MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Periyodik gözlemler alınarak, kallus başına sürgün sayısı kaydedilmiştir.

3.2.8. Sürgünlerin Köklendirme Çalışmalarına MS'in Etkisi

Proliferasyon çalışmalarında elde edilen 3.5-4 cm uzunluğunda ve sağlıklı gelişen sürgünler köklendirme çalışmalarında materyal kaynağı olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızın bu aşamasında, birer oksin olan NAA, IAA ile MS'in gücünün (1/1, 1/2) sürgünlerin köklenmesi üzerine kombine etkisi araştırılmıştır.

3.2.8.1. 1/1MS'in Etkisi

Çizelge 3.2 : 1/1MS Besi Ortamının İçeriği

Agar	5.458 g
Sakkaroz	30 g
MS Ana Çözeltisi (Makro Elementler)	100 ml
MS Mikro Elementler-1	10 ml
MS Mikro Elementler-2	1 ml
Kompleks Şelatör	10 ml
Vitamin Karışımı	1 ml
B1 Vitamini Ana Çözeltisi	1 ml
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.

-1/1 MS'de NAA'nın Etkisi

Köklendirmeye uygun olacak şekilde seçilmiş sürgünler, 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l NAA oranları ile ayrı ayrı desteklenen 1/1 MS bes ortamında kültüre alınmıştır. Besi ortamı Çizelge 3.2.'de verilen miktarlarda sakaroz ve stok çözeltilerden alınarak hazırlanmıştır. Besi ortamının pH'sı agar ilavesinden önce NaOH ve HCl ile 5.7 olacak şekilde ayarlanıp, 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Steril sürgünler hazırlanan bes ortamlarının bulunduğu magenda kültür kaplarına aktarılarak, NAA ve 1/1 MS'in köklenme üzerine etkisi incelenerek, elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir.

-1/1 MS'de IAA'nın Etkisi

Sürgünlerin köklendirme çalışmalarında, 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l IAA'nın etkisi de araştırılmıştır. Sürgünler, steril pens ve bistüriler yardımıyla hazırlanan bes ortamlarını içeren kültür kaplarına her bir kapta 3-4 eksplant olacak şekilde aktarılmıştır. Gözlemler sonucunda, IAA parametrelerinin kök uzunluğu ve kök sayısına ilişkin etkisi veriler şeklinde kaydedilmiştir.

3.2.8.2. ½ MS'in Etkisi

Çizelge 3.3 : ½ MS Kültür Besi Ortamının İçeriği

Agar	5.458 g
Sakkaroz	30 g
MS Ana Çözeltisi (Makro Elementler)	50 ml
MS Mikro Elementler-1	5 ml
MS Mikro Elementler-2	0.5 ml
Kompleks Şelatör	5 ml
Vitamin Karışımı	0.5 ml
B1 Vitamini Ana Çözeltisi	0.5 ml
Distile Su	1000 ml'ye tamamlanır.

Köklendirme çalışmalarında kullanılmak üzere ½ MS ortamı hazırlamak için (1 lt); 1 litrelik bir erlenmayer içerisine 750 ml steril edilmiş distile saf su bırakılmıştır. Daha sonra Çizelge 3.3.'de belirtildiği gibi 30 gr sakkaroz, 50 ml MS ana solüsyonu, 5 ml MS-1, 0.5 ml MS-2, 5 ml kompleks şelatör, 0.5 ml vitamin karışımı, 0.5 ml B1 vitamini eklenerek çözelti steril distile su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır. Sırasıyla eklenen her stok çözeltiden sonra, çökelmeyi önlemek için solüsyon çalkalanmıştır. Çalışmanın amacına uygun oksin (NAA veya IAA oranları) ilave edildikten sonra, hazırlanan besi ortamının pH'sı 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile 5,7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Katılaştırma ajanı olarak, kültür besi ortamına 5.458 g agar eklenerek, besi ortamı 25 dakika süre ile 121 °C'de 1 atm basınç altında otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyonu sağlanan besi ortamı, Magenta kültür kaplarına 50-60 ml olacak şekilde bölüştürülmüştür

-½ MS'de NAA'nın Etkisi

½ MS'in sürgün köklenmesi üzerine etkisini test etmek için, NAA konsantrasyonlarını ayrı ayrı içeren besi ortamı, 30 g/l sakkaroz ve 5.458g/l agar ile desteklenmiştir. Besi ortamının pH'sı, agar ilavesinden önce NaOH ve HCl ile 5.7 olacak şekilde ayarlanıp, 1 atm basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Steril sürgünler, pens ve bistüriler yardımıyla alınarak NAA'lı besi

ortamlarının bulunduğu magenda kültür kaplarına her bir kapta 3-4 eksplant olacak şekilde aktarılarak, kaplar büyüme odasında (büyüme odasının sıcaklığı 25 ± 2 °C, ışık periyodu 16 saat aydınlık 8 saat karanlık) gelişmeye bırakılmıştır.

-½ MS’de IAA’nın Etkisi

IAA’nın değişik oranlarını (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, mg/l) ayrı ayrı içeren ½ MS besi ortamı, 20 g/l sakaroz ve 5.458 g/l agar ile desteklenerek, besi ortamının pH’sı agar ilavesinden önce 5.7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Sürgünler pens ve bistüriler yardımıyla uygun boyutlarda kesilerek, IAA’lı besi ortamlarını içeren kültür kaplarına aktarılmıştır. Periyodik olarak alınan gözlemler sonucu, sürgünlerde kök sayısına ve kök uzunluğuna ilişkin verileri kaydedilmiştir.

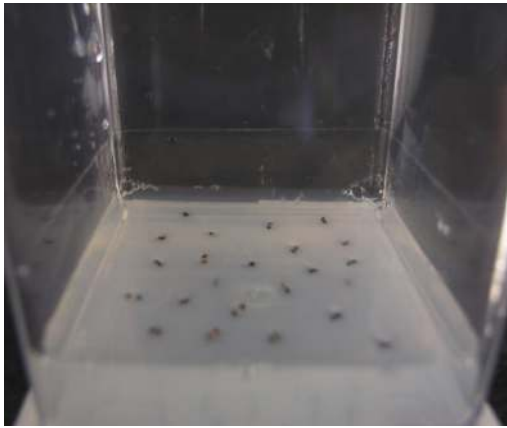
3.2.9. Aklimatizasyon Çalışmaları

In vitro ortamda köklendirilen *Hypericum spectabile* bitkiciklerinin dış ortama alıştırma çalışmaları için; bitkiler köklenme besi ortamlarından çıkarılıp musluk suyu altında 5-10 dakika yıkanarak agarlarından tamamen arındırılmıştır. Köklü bitkicikler ticari olarak satılan torf içeren saksılara dikilmiştir. Dikim işleminden sonra, can suyu verilen bitkilerin üzerleri beherlerle kapatılarak, büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır.

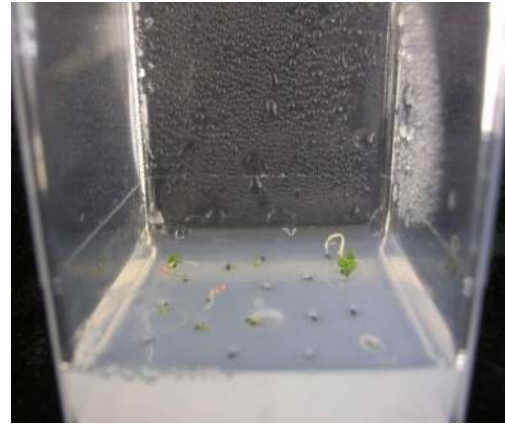
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kültür Başlatma Çalışmaları

Başlangıç materyali olarak kullanılan *Hypericum spectabile*'nin olgun tohumları, %70'lik etil alkol ve %5'lik NaOCI ile steril edildikten sonra testaları çatlatılmadan, hormonsuz 1/1 MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür ortamlarında çimlenme sağlanamadığından, tohumlar yine aynı ortamda (1/1 MS-hormonsuz) testaları çatlatılarak kültüre alınmıştır (Şekil 4.1.). Steril tohumlar kültüre alındıktan 5-6 gün sonra çoğunun çimlendiği, 2-3 hafta sonra ise yaprak ve gövdenin iyice belirginleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. Hormonsuz MS besi ortamında kültüre alınan tohumların genel görünüşü



Şekil 4.2. Hormonsuz kültür besi ortamında çimlenen tohumların genel görünüşü

4.2. Sürgün Proliferasyonu Çalışmaları

4.2.1. BAP'ın Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Proliferasyon çalışmalarında; gelişimlerine bağlı olarak 3-4 haftalık sürgünler, BAP'ın 5 farklı konsantrasyonlarını (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l) ayrı ayrı içeren 1/1 MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

Kültür işleminden 2-3 hafta sonra, test edilen tüm BAP konsantrasyonlarında yeni sürgün ve yaprak gelişiminin yanı sıra, sürgünlerin uzunluğunda da artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak BAP'ın yüksek konsantrasyonlarında (1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l) kültüre alınan materyallerde, kahverengileşme ile birlikte sararmalar gözlenmiştir (Şekil 4.3.). Besi ortamlarında bekletme süresi uzadıkça (4-5 hafta sonra), az miktarda kallus

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

oluşumu ve materyallerin besiyerine değen bölgelerinde kararmalar gözlenmiştir (Şekil 4.4.). Düşük BAP oranlarında (0.25, 0.5 mg/l) ise, sürgünlerin morfolojik görünüm ve özelliklerinin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.). Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi, 0.25 mg/l BAP diğer oranlarla karşılaştırıldığında sürgün sayısı ve sürgün boyu bakımından en uygun cevabı veren besi ortamı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.3. Yüksek BAP konsantrasyonlarında sürgünlerin görünüşü



Şekil 4.4. Yüksek BAP konsantrasyonlarında sürgünlerin görünüşü



Şekil 4.5. 0.5 mg/l BAP'lı besi ortamında sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.6. 0.25 mg/l BAP'lı kültür besi ortamındaki sürgünlerin genel görünüşü

Yapılan gözlemlerde belirtildiği gibi, besi ortamındaki BAP miktarı arttıkça sürgünlerin genel görünümünde (yapraklarda sararma, sürgün boylarında aşırı uzama, materyallerin besiyerine değen bölgelerinde kararma) gibi istenmeyen özellikler tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. BAP'ın farklı konsantrasyonlarının sürgün gelişimi üzerine etkisi

Ortam İçeriği (mg/l) BAP	Sürgün Sayısı (Ortalama)	Sürgün Boyu (Ortalama)
0.25	49.80 ± 0.895 ^a	4.88 ± 0.095 ^a
0.5	29.26 ± 0.795 ^b	3.71 ± 0.131 ^b
1.0	25.46 ± 0.742 ^c	2.96 ± 0.165 ^c
1.5	27.13 ± 0.675 ^{bc}	3.35 ± 0.212 ^{bc}
2.0	36.53 ± 0.660 ^d	3.86 ± 0.150 ^b
2.5	36.40 ± 0.567 ^d	4.52 ± 0.164 ^a

Veriler dört haftalık gözlem sonucu alınmış olup, dört haftada bir verilerin alt kültürü yapılmıştır. Verilerin istatistiki hesaplamaları için; gruplar arasında önemli farklılıkların olup olmadığı KW (Kruskal Wallis) Analizi testi ile $p=0.05$ seviyesinde, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruplardan kaynakladığı ise $p=0.01$ seviyesinde Mann Whitney İkili Karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

4.2.2. Kinetin'in Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Proliferasyonuna

Etkisi

Sürgün proliferasyonu için BAP konsantrasyonlarının yanı sıra aynı konsantrasyonlarda Kin'in etkisi de test edilmiştir. Bu amaçla, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/l Kin oranları MS besi ortamına ayrı ayrı ilave edilerek kültür besi ortamları hazırlanmıştır.

Test edilen konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında; 0.25 ve 0.5 mg/l Kin içeren besi ortamlarının hem sürgün sayısı (sırasıyla; 22.40, 27.33) hem de sürgün boyu (sırasıyla; 4.05, 5.08) bakımından diğer oranlardan daha iyi sonuç verdiği görülmüştür (Çizelge 4.2.). Fakat, bu oranlarda kültüre alınan sürgünlerin boylarının aşırı uzaması istenmeyen bir özellik olduğundan sürgün proliferasyonu için uygun oran olarak tercih edilmemiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. 0.25 mg/l Kin içeren besi ortamında kültüre alınan sürgünlerin genel görünüşü

En düşük sürgün sayısı (17.80) ise, 1.0 mg/l Kin içeren besi ortamında elde edilmiştir. Aynı zamanda, bu oranda sürgün uzunluğu 3.71 olarak tespit edilmiştir.

Yüksek konsantrasyon olarak kullanılan 2.0 ve 2.5 mg/l Kin ile desteklenen MS besi ortamlarında kültüre alınan materyallerde, sürgün sayısı ve sürgün boylarının aynı olduğu tespit edilmiştir. Kültürün 3. haftasından sonra, materyallerin kallus oluşturmaya yönelik geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.8.)

Sürgün proliferasyonu için en uygun besi ortamı olarak seçilen 1.5 mg/l Kin'de ise, sürgün yapraklarının daha iri olduğu, materyallerin canlı-koyu yeşil olarak görüldüğü ve materyallerin kallus oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. 2.5 mg/l Kin içeren besi ortamında kültüre alınan sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.9. 1.5 mg/l Kin ile desteklenmiş besi ortamında sürgünlerin genel görünüşü

Çizelge 4.2. Kinetin'in farklı konsantrasyonlarının sürgün gelişimi üzerine etkisi

Ortam İçeriği (mg/l) Kin	Sürgün Sayısı (Ortalama)	Sürgün Boyu (Ortalama)
0.25	22.40 ± 2.746 ^b	4.05 ± 0.161 ^{bc}
0.5	27.33 ± 0.854 ^a	5.08 ± 0.203 ^a
1.0	17.80 ± 0.367 ^c	3.71 ± 0.143 ^c
1.5	19.60 ± 0.815 ^{bc}	3.57 ± 0.125 ^c
2.0	22.33 ± 0.808 ^b	4.29 ± 0.122 ^b
2.5	22.46 ± 0.729 ^b	4.28 ± 0.146 ^b

Veriler, dört haftalık gözlem sonucu alınmış olup, dört haftada bir verilerin alt kültürü yapılmıştır. Verilerin istatistiki hesaplamaları için; gruplar arasında önemli farklılıkların olup olmadığı KW (Kruskal Wallis) Analizi testi ile $p=0.05$ seviyesinde, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığı ise $p=0.01$ seviyesinde Mann Whitney İkili Karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

4.2.3. BAP+Oksin Kombinasyonunun Sürgün Proliferasyonu Üzerine

Etkisi

In vitro koşullarda yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında hormon çeşidi, aynı şekilde konsantrasyonu da bitki çeşidi veya türüne göre değişmektedir. Bazı bitki türleri sadece sitokininlerin bulunduğu ortamlarda prolifere olurken, bazıları ise sitokinin-oksine kombinasyonlarında daha iyi cevap verdiği bilinmektedir.

Sürgün proliferasyonu için optimum BAP ve Kin oranı önceki deneylerde belirlenmiş olduğundan, bu oranlar (0.25 BAP-1.5 Kin mg/l) sabit tutularak birer oksine çeşidi olan NAA ve IAA ile kombine etkileri ayrı ayrı araştırılmıştır.

0.25 mg/l BAP + NAA'nın tüm parametrelerinde (0.25, 0.5, 1.0 mg/l) sürgün sayısında artış ve büyüme görülmediği gibi, sürgünlerde başlangıçta sararma (Şekil 4.10.) daha sonra kahverengileşme-kızıllaşma bariz bir şekilde gözlenmiştir. Ayrıca bu ortamlarda kültüre alınan materyallerin besiyerine temas eden bölgelerinde kararma ve kallus oluşumu gözlenmiştir (şekil 4.11.)



Şekil 4.10. 0.25 mg/l BAP+ NAA ortamında sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.11. 0.25 mg/l BAP+NAA ortamında sürgünlerin genel görünüşü

Araştırmamızda sürgün proliferasyonu üzerine diğer bir oksin çeşidi olan IAA+BAP'ın kombine etkisi de araştırılmıştır. Alınan veriler sonucunda, 0.25:1.0 mg/l oranında BAP+IAA ile desteklenmiş besi ortamında kültüre alınan materyallerin boy uzunluklarında bir artış saptanmamıştır. Ayrıca, materyallerde yer yer kahverengileşme gözlenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. 0.25 BAP+1.0 mg/l IAA destekli besi ortamında sürgünlerin genel görünüşü

0.25 mg/l BAP ve düşük IAA oranlarında (0.25, 0.5 mg/l) ise; sürgün boylarında belirgin bir uzama gözlenmezken, materyallerde sararma ve sürgünlerde çok sayıda tüysü köklerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. 0.25 BAP+0.25 mg/l IAA ortamında sürgünlerin görünüşü

BAP ile kombine edilmiş NAA ve IAA parametreleri karşılaştırıldığında; IAA'nın NAA'ya göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Ancak sürgün proliferasyonu için, BAP ile birlikte test edilen tüm NAA parametrelerini içeren besi ortamlarının uygun cevap vermediği tespit edilmiştir.

4.2.4. Kinetin+Oksin Kombinasyonunun Sürgün Proliferasyonuna Etkisi

Aynı şekilde sürgün proliferasyonu için, Kin oranı (1.5 mg/l) sabit tutularak, 0.25, 0.5, 1.0 mg/l NAA ve IAA oranlarının etkisi ayrı ayrı araştırılmıştır.

1.5 mg/l Kin ile birlikte NAA'nın test edilen tüm oranlarında kültüre alınan sürgünlerde, yeni sürgün ve yeni yaprak gelişimi görülmediği gibi taban kallusu ve yapraklarda kırmızılaşıma gözlenmiştir (Şekil 4.14.). Sürgünlerin tabanında oluşan kallus ve renk değişimi büyüme ve gelişmeyi engellediğinden, bu değişiklikler çalışmalarımızda istenmeyen özelliklerdir.

Test edilen IAA parametrelerinde ise materyallerin besiyerine temas eden kısımlarında kallus oluşumu ve bu bölgelerin yeşil kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15.)

Test edilen Kin+IAA'nın denenen tüm konsantrasyonları, NAA parametreleriyle karşılaştırıldığında; IAA'lı besi ortamlarının sürgün gelişimi açısından daha iyi cevap verdiği görülmüştür.



Şekil 4.14. 1.5 mg/l Kin+NAA besi ortamlarında sürgünlerin görünüşü



Şekil 4.15. 1.5 mg/l Kin +IAA oranlarında sürgünlerin görünüşü

4.2.5. Yaprak ve Kök Eksplantlarından İndirekt Sürgün Rejenerasyonu

In vitro şartlarda elde edilen sürgünlerin yaprak ve kök eksplantlarından kallus başlatma çalışmaları için, 2,4-D ve BAP'ın farklı konsantrasyonlarının kombine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, Çizelge 4.3. de verilen hormon oranları her eksplant için ayrı ayrı kullanılmıştır.

Çizelge 4.3. Yaprak ve kök eksplantlarından kallus kültürlerinin başlatılması için BAP ve 2,4-D kombinasyonlarının etkisi

0.5 mg/l BAP	0.5 mg/l 2,4-D
0.5 mg/l BAP	1.0 mg/l 2,4-D
0.5 mg/l BAP	1.5 mg/l 2,4-D
1.0 mg/l BAP	0.5 mg/l 2,4-D
1.0 mg/l BAP	1.0 mg/l 2,4-D
1.0 mg/l BAP	1.5 mg/l 2,4-D
1.5 mg/l BAP	0.5 mg/l 2,4-D
1.5 mg/l BAP	1.0 mg/l 2,4-D
1.5 mg/l BAP	1.5 mg/l 2,4-D

Başlangıç materyali olarak seçilen steril yaprak (Şekil 4.16.) ve kökler (Şekil 4.17.) sürgünlerden izole edilerek, 9 farklı besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Yaklaşık 10 -15 gün sonra, deneylerde kullanılan tüm besi ortamlarında kültüre alınan yaprak ve köklerde kallus oluşumu gözlenmiştir. Ancak, besiyerinde bulunan hormon

konsantrasyonuna bağlı olarak gelişen kallus yoğunluğunun ve morfolojik özelliklerinin değiştiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. Kültüre alınan kök eksplantlarının görünüşü



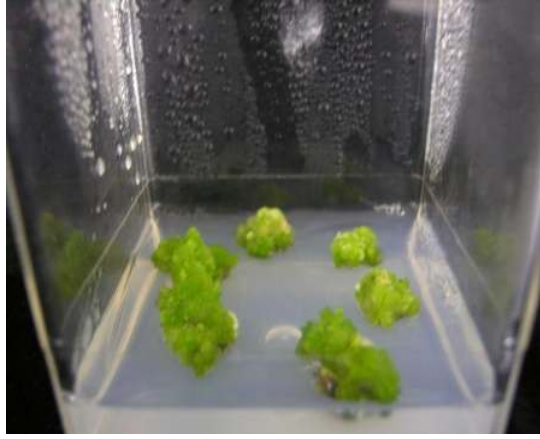
Şekil 4.17. Kültüre alınan yaprak eksplantlarının görünüşü

Çizelge 4.4.'de görüldüğü gibi; BAP ve 2,4-D'nin eşit oranları (0.5 ; 0.5 ya da 1.0 ; 1.0 mg/l) ve aynı zamanda, besi ortamında BAP oranının 1.5 mg/l'ye çıkarılması ile kültüre alınan materyallerde kallus gelişiminin düşük oranda olduğu ve aynı zamanda, oluşan kallusun istenilen özelliklerde (soluk yeşil- sarı, gevşek yapılı-beyaz renkli) olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Yaprak eksplantlarından kallus kültürlerinin oluşturulması için BAP ve 2,4-D'nin kombine etkisi

Büyüme düzenleyicileri (mg/l)		Eksplantların cevabı %	Kallus yapısı	
BAP	2,4-D		Doku	Renk
0.5	0.5	35	Gevşek	Soluk yeşil-sarı
0.5	1.0	100	Gevşek	Yeşil
0.5	2.0	100	Gevşek	Soluk sarı-beyaz
1.0	0.5	63	Gevşek	Soluk yeşil
1.0	1.0	40	Gevşek	Soluk yeşil-sarı
1.0	2.0	73	Sıkı-granüler	Yeşil
1.5	0.5	27	Gevşek	Kahverengi
1.5	1.0	56	Gevşek	Beyaz
1.5	2.0	76	Gevşek	Beyaz

Çizelge 4.4.'de görüldüğü gibi, yapraklardan maksimum kallus oluşumu iki besi ortamında (0.5 BAP + 1.0 mg/l 2,4-D ve 0.5 BAP + 2 mg/l 2,4-D) elde edilmiştir. Her iki ortamda oluşan kallusların morfolojik özellikleri karşılaştırıldığında; 0.5 BAP + 1 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş besi ortamında oluşan kallusların gevşek-yeşil renkli olduğu, 0.5 BAP + 2 mg/l 2,4-D'li besi ortamındaki kallusların ise gevşek-soluk sarı-beyaz renkli olduğu gözlenmiştir. 1.0 BAP + 2 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş ortamda gelişen kallus oranı % 73 olmasına rağmen gelişen kallusun sıkı-granüler, yeşil renkli olması kallus dokusundan sürgün rejenerasyonu için istenilen özellikler olduğundan yapraklardan indirekt sürgün rejenerasyonu için en uygun ortamın, 1.0 BAP + 2.0 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş 1/1 MS besi ortamı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. 1.0 BAP + 2.0 mg/l 2,4-D içeren besi ortamında yaprak eksplantlarından kallus oluşumu

Farklı besi ortamlarında kültüre alınan kök eksplantları karşılaştırıldığında; BAP+ 2,4-D (1.0:2.0 mg/l) ile kombine edilmiş besi ortamında kültüre alınan köklerden %40 oranında kallus elde edilmiştir. Bu oran, kallus oluşturma çalışmalarında elde edilen en düşük orandır (Çizelge 4.5.).

0.5 mg/l 2,4-D ile kombine edilmiş tüm BAP ortamlarında, en fazla kallus oluşumu gözlenmiştir. Bu ortamlarda (0.5 BAP+0.5 mg/l 2,4-D ve 1.0 BAP+0.5 mg/l 2,4-D) oluşan kallus gevşek-soluk yeşil renkli olarak gözlenmiştir.

Sırasıyla 0.5:2.0 ve 1.5:0.5 BAP/2,4-D besi ortamlarından maksimum (% 100) kallus elde edilmiştir. Bu oranlardaki kallusların genel görünüşlerinin (doku yapısı ve renk bakımından) farklı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5.).

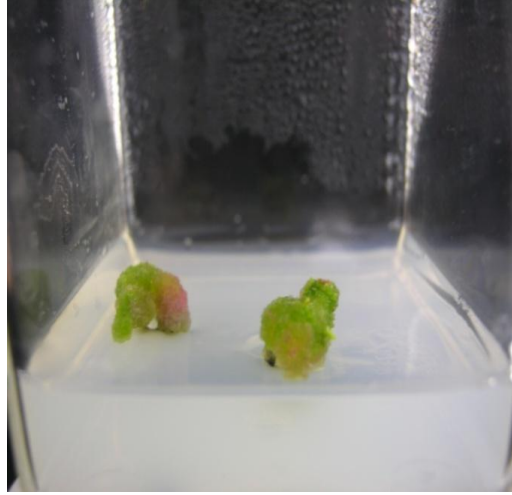
Çizelgede verildiği gibi; hem morfolojik özellikleri hem de eksplantların kallus cevabı bakımından en uygun ortamın, 1.5 BAP + 0.5 mg/l 2,4-D ile kombine edilmiş MS besi ortamı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.19.)

Çizelge 4.5. Kök eksplantlarından kallus kültürlerinin oluşturulması için BAP ve 2,4-D'nin kombine etkisi

Büyüme düzenleyicileri (mg/l)		Eksplantların cevabı %	Kallus yapısı	
BAP	2,4-D		Doku	Renk
0.5	0.5	90	Gevşek	Soluk yeşil
0.5	1.0	75	Gevşek	Yeşil
0.5	2.0	100	Gevşek	Sarımsı beyaz
1.0	0.5	90	Gevşek	Soluk yeşil
1.0	1.0	45	Gevşek	Soluk yeşil
1.0	2.0	40	Yoğun-sıkı	Soluk yeşil
1.5	0.5	100	Gevşek	Yeşil
1.5	1.0	72	Gevşek	Soluk yeşil
1.5	2.0	80	Gevşek	Soluk yeşil

Sonuç olarak, kallus oluşumu için yaprak eksplantlarının kök eksplantlarına göre daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Elde edilen kallus dokusunu proliferet etmek için BAP'ın sadece iki oranı test edilmiştir. Kalluslar, steril pens ve bistüriler yardımıyla 2-3 parçaya ayrılarak önce 0.5 mg/l BAP'lı ortama, daha sonra da 1.0 mg/l BAP içeren besi ortamına alınarak alt kültürleri yapılmıştır.



Şekil 4.19. 1.5 BAP +0.5 mg/l 2,4-D içeren besi ortamında kök eksplantlarından gelişen kallus

0.5 mg/l BAP'lı besi ortamına aktarılan kallus dokusunun yavaş geliştiği için, BAP oranı arttırılmış (1.0 mg/l) besi ortamı tercih edilmiştir.

Her iki besi ortamında kültüre alınan kalluslarda hacim artışı gözlenmesine rağmen 1.0 mg/l BAP'lı ortamda kallusların daha canlı - koyu yeşil olduğu ve hacim artışının diğer orana (0.5 mg/l BAP) göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

4-5 hafta kültür ortamında bekletilen kallusların ilk durumlarına göre hacimlerinin 3-4 katına çıktığı belirlenmiştir. Belirli bir büyüklüğe erişen kalluslardan sürgün rejenerasyonu için yine BAP'ın farklı oranlarını (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 mg/l) içeren 1/1 MS besi ortamlarının etkisi araştırılmıştır. Test edilen BAP parametrelerinin tümünde sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir.

Kültürden 6-7 hafta sonra, rejenere sürgünlerin kallus başına sürgün sayısı kaydedilmiştir. 1.5 mg/l BAP ile desteklenmiş besi ortamında üretilen sürgünlerin sayısı yüksek olmasına rağmen (Şekil 4.20.), tüm parametrelerdeki sürgünlerin morfolojik özellikleri ve gelişimleri karşılaştırıldığında en iyi sonuç 0.5 mg/l BAP ile desteklenmiş besi ortamından alınmıştır (Şekil 4.21.).



Şekil 4.20. 1.5 mg/l BAP ortamında sürgünlerin genel görünüşü



Şekil 4.21. 0.5 mg/l BAP ortamında sürgünlerin genel görünüşü

4.3. Sürgünlerin Köklendirmesinde MS'in Etkisi

4.3.1. 1/1 MS'de NAA'nın Etkisi

Araştırmanın bu bölümünde, sürgünler köklendirme çalışmaları için birer oksin olan NAA ve IAA'nın 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l oranları ile destekli besi ortamları ayrı ayrı hazırlanarak etkileri araştırılmıştır.

Kültürden 35-40 gün sonra alınan sonuçlara göre; test edilen tüm NAA parametrelerini içeren besi ortamlarındaki sürgünlerde yok denecek kadar cılız köklerin olduğu, sürgünlerin gelişimini olumsuz etkilediği veya gelişmeyi engellediği tespit edilmiştir.

4.3.2. 1/1 MS'de IAA'nın Etkisi

Kültürden 35-40 gün sonra test edilen IAA konsantrasyonlarının etkisi karşılaştırıldığında; 2 mg/l IAA'lı besi ortamındaki sürgünlerde köklenmenin çok az oranda olduğu ve bunun yanı sıra genel olarak gelişimin olmadığı gözlenmiştir.

0.5 ve 1.0 mg/l IAA ile desteklenmiş besi ortamlarındaki sürgünlerin benzer şekilde cevap verdiği (az sayıda ve cılız kökler), fakat genel olarak sürgünlerin canlı ve yaprakların koyu yeşil olduğu görülmüştür (Şekil 4.22., 4.23.).



Şekil 4.22. 1 mg/l IAA'lı ortamda köklü fideciklerin genel görünüşü



Şekil 4.23. 0.5 mg/l IAA'lı ortamda köklü fideciklerin genel görünüşü

Köklenme çalışmaları için kullanılan 0.25 mg/l IAA'lı besi ortamında ise, diğer oranlara göre, daha kalın ve sağlıklı köklerin geliştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.24.). Kültürden yaklaşık 35-40 gün sonra, 0.5, 1.0, 2.0 mg/l IAA içeren besi ortamındaki sürgünlerde, yer yer sararma ve kahverengileşme gözlenmiştir.



Şekil 4.24. 0.25 mg/l IAA'lı ortamda köklü fideciklerin genel görünüşü

4.3.3. ½ MS'de NAA'nın Etkisi

½ MS ile birlikte test edilen NAA'lı besi ortamlarında çok sayıda ve uzun kökler gelişmesine rağmen, yeni yaprak ve sürgün gelişiminin olmadığı ve sürgünlerde renk değişiminin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25.).

NAA konsantrasyonları ile desteklenmiş 1/1 MS ortamında olduğu gibi ½ MS besi ortamında da, kültüre alınan materyallerin tümünde köklenme için verim (kök uzunluğu- kalınlığı) alınamamış ve sağlıklı sürgün gelişimi sağlanamamıştır.



Şekil 4.25. ½ MS- NAA'lı ortamda sürgünlerin görünüşü

4.3.4. ½ MS'de IAA'nın Etkisi

IAA konsantrasyonları ile desteklenmiş ½ MS besi ortamlarında kültüre alınan sürgünlerde gelişimin iyi olmadığı, yaprakların yavaş yavaş sarardığı ve daha sonra kahverengine dönüştüğü görülmüştür. Bunun yanı sıra, sürgünlerde az sayıda ve kalın köklerin geliştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.26.).

Köklendirme çalışmalarında MS'in gücü (1/1, ½) karşılaştırıldığında ise, yarım güçteki MS ile birlikte kullanılan IAA ve NAA'nın benzer sonuçlar verdiği ve 1/1 MS'in ise sürgünlerin köklendirilmesi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.26. ½ MS-I AA'lı ortamlarda sürgünlerin görünüşü

4.4 Aklimatizasyon Çalışmaları

İn vitro koşullarda köklendirilmesi sağlanan bitkiciklerin toprağa adaptasyon çalışmaları için bitkicikler, saksılara yerleştirildikten sonra üzerleri beherle kapatılarak büyüme odasında gelişmeye bırakılarak günlük bakımları düzenli olarak yapılmıştır (Şekil 4.27., 4.28). Saksılardaki bitkiciklerin üzeri 2. günden itibaren (2. günde 5 dk, 3. günde 10 dk, 4. günde 15 dk, 5. günde 30 dk, 6. günde 30 dk, 7-10. günde 1 saat) açılmak suretiyle, ortamın nemi kontrol altında tutulmaya çalışılmıştır. Bu şekilde uygulamaya tabi tutulan bitkilerin üzerleri 10. gün sonunda tamamen açılmıştır. Üzerleri tamamen açılan bitkiler, 2 hafta daha büyüme odasında bekletilmeye bırakılmıştır (Şekil 4.29., 4.30.).



Şekil 4.27. Köklü bitkiciklerin genel görünüşü



Şekil 4.28. Aklimatizasyon çalışmalarının 8. gününde bitkilerin genel görünüşü



Şekil 4.29. Aklimatizasyon çalışmalarının 12. gününde bitkilerin genel görünüşü



Şekil 4.30. Bitkiciklerin toprağa adaptasyonu

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde endemik olarak yetişen, *Hypericum* cinsine ait bir tür olan *Hypericum spectabile*'nin *in vitro* mikroçoğaltım yollarının araştırılması ve bu yollarla elde edilen sürgünlerin yaprak ve kök eksplantlarından indirekt organogenezis tekniği ile, kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi araştırılmıştır.

Yaptığımız literatür taramalarına göre, araştırmamızda bitkisel materyal olarak kullandığımız *Hypericum spectabile* ile ilgili *in vitro* çalışma olmaması, bizi bu yönde bir araştırmaya teşvik etmiştir.

Araştırmamızda başlangıç materyali olarak kullanılan *Hypericum spectabile* tohumlarını *in vitro* şartlarda çimlendirebilmek için tohumların bir kısmının testası çatlatılmıştır diğer bir kısmı ise, herhangi bir uygulama yapılmadan hormonsuz MS besi ortamında kültüre alınmıştır.

Hypericum spectabile tohumlarının testaları çatlatılarak hormonsuz MS besi ortamında kültüre alındığında çimlenme yüzdesinin arttığı, kültürden 5-6 gün sonra besiyerindeki tohumların çoğunun çimlendiği gözlenmiştir. Testaları çatlatılmadan kültüre alınan tohumların ise çimlenmediği gözlenmiştir. *In vitro* şartlarda gelişen sürgünler proliferasyon çalışmalarında materyal kaynağı olarak kullanılmıştır.

Karakaş ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada *Hypericum triquetrifolium* Turra.'nın mikroçoğaltımı için en yüksek sürgün sayısını 2.0 mg/l BAP ile desteklenmiş MS ortamında elde etmişlerdir. Namlı ve ark. (2010) ise, *Hypericum retusum* Aucher' in mikroçoğaltımı üzerine BBD'nin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, en yüksek sürgün sayısını 0.5 mg/l BAP ile desteklenmiş 1/1 MS besi ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise, sürgün proliferasyonu için test edilen BAP ve Kin'in farklı konsantrasyonları arasında en uygun hormonun BAP ve oranının da 0.25 mg/l (eksplant başına 49.80 sürgün) olduğu tespit edilerek, bu oranda çok sayıda-sağlıklı sürgünler elde edilmiştir. Mikroçoğaltım için kullanılan sitokinin çeşidi yönünden bizim sonuçlarımız araştırmacıların sonuçlarıyla uyuşmakta, fakat saptanan oranlar değişmektedir. Bu sonuçlar, hormon çeşidi aynı olsa dahi kullanılan hormon konsantrasyonunun türden türe değiştiğini göstermiştir. Çalışmamızda, sürgün sayısı ve

sürgün boyu bakımından Kin oranları arasında uygun sonuç, 0.5 mg/l’li besi ortamından elde edilirken, 1.5 mg/l Kin’in gerek yaprak yapısı gerekse genel görünüş olarak *in vivo* ortamda yetişen bitkiye daha çok benzediği tespit edilmiştir. Namlı ve ark. (2010), *Hypericum retusum* Aucher’ in mikroçoğaltımı üzerine BBD’nin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, sürgün sayısı için en iyi sonucu 1.5 mg/l Kin ile desteklenmiş ortamda elde etmişlerdir. Araştırmacıların sonuçları çalışmamızla uyushmaktadır.

Ayrıca; Franklin ve Dias (2006), *Hypericum perforatum*’un 4 farklı genotipinde organogenezis ve somatik embriyogenezis çalışması yaparak bitki büyüme düzenleyicilerinin bitki rejenerasyonunu etkilediğini bildirmişler ve sürgün rejenerasyonunun düşük BAP oranlarında daha hızlı olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacıların bildirdiği gibi aynı şekilde bizim çalışmamızda da, BAP’ın düşük oranlarında hızlı bir şekilde ve çok sayıda sürgün elde edilmiştir.

Kök ve yapraklardan kallus başlatılması ve proliferasyonu çalışmalarında; BAP ve 2,4-D’nin eşit oranlarını (0.5/0.5 ya da 1.0/1.0 mg/l) içeren besi ortamlarının kallus oluşturmak için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. *Hypericum spectabile*’nin yaprak ve kök eksplantlarından kallus rejenerasyonunun sağlandığı çalışmamızda, ideal oran 1.0 BAP+2.0 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş MS besi ortamındaki yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. Aksine, Bezo ve Stefunova (2001) çalışmalarında, *Hypericum perforatum*’un kallus proliferasyonu için en yüksek sonuçları; 1.0 Kin ve 1.0 mg/l 2,4-D ile 1.0 BAP ve 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamlarından elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bais ve ark. (2002), 2,4-D ve Kin ile modifiye edilmiş MS ortamında geliştirilen yaprak eksplantlarının, en yüksek kallus oluşum oranını verdiğini bildirmişlerdir. Ayan ve ark. (2005), *Hypericum perforatum*’un yaprak diskleri ve gövde segmentlerinden kallus elde etmek için farklı besi ortamlarını kullanarak, sonuçta kallus oluşum sıklığı bakımından en yüksek değerleri; 30 g/l sakkaroz, 0.5 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l Kin içeren MS ortamında sağladıklarını rapor etmişlerdir. Elde ettikleri kallustan sürgün oluşumu için 1.0 mg/l BAP, kök oluşumu için ise 1.0 mg/l IAA içeren MS ortamlarının uygun olduğunu belirlemişlerdir.

Araştırmamızda, *Hypericum spectabile*’nin köklendirme çalışmaları için iki oksin çeşidinin (NAA, IAA) 4 farklı konsantrasyonu ve MS’in kuvveti (1/1 MS, 1/2 MS)

araştırılmıştır. 1/1 MS ve ½ MS besi ortamları gerek kök, yeni sürgün ve yaprak gelişiminde, gerekse morfolojik özelliklerde farklılıklara yol açmıştır. Aynı oranlarda NAA ilave edilmiş her iki besi ortamındaki (1/1 MS ve ½ MS) sürgünlerin köklenmesi ve gelişimi üzerine etkisinin benzer olduğu gözlenmiştir (cılız veya tüysü kökler, sürgünlerde gelişimin olmaması). Bu özelliklere sahip köklü fideciklerin toprağa adaptasyonunda istenilen sonuç elde edilemediğinden, NAA oranları ile destekli MS oranları, köklendirme çalışmaları için uygun bulunmamıştır. Çalışmamızda, oksin olarak kullanılan aynı orandaki IAA ve NAA parametrelerinden NAA'lı besi ortamlarında, kallus oluşumu yoğun bir şekilde gözlenmiştir. Sürgünlerin taban kısmında meydana gelen kallus, kök oluşumunu engellemiştir. Aynı şekilde Cherry ve ark. (2000), *Hypericum* türleri (*Hypericum androsaemum*, *Hypericum patulum* ve *Hypericum grandiflorum*) üzerindeki *in vitro* mikroçoğaltım çalışmalarında, *Hypericum patulum*'da kök oluşumunun sadece NAA uygulamasında meydana gelmiş olduğunu ve oluşan köklerin kallus oluşturduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızda, *Hypericum spectabile* sürgünlerinin köklendirme çalışmaları için, ideal köklenme 0.25 mg/l IAA ortamında sağlanmıştır. Zobayed ve Saxena (2003),'nın *Hypericum perforatum* üzerine yaptıkları *in vitro* çalışmada, köklenme için denenen tüm oksinlerde eksplant başına en yüksek köklenme sayısını, IAA'lı besi ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı şekilde, çalışmamızda test edilen IAA ve NAA hormonları karşılaştırıldığında IAA'nın daha uygun bulunması araştırmacıların sonuçlarıyla uyusmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abreu, I.N., Azevedo, M.T.A., Solferini, V.M., Mazzafera, P. 2003. *In vitro* propagation and isozyme polymorphism of the medicinal plant *Hypericum brasiliense*. *Biologia Plantarum*, 47, 629-632.
- Ahmet, M.A., El-Mawla, A., Beerhues, L. 2002. Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta*, 214; 727-733.
- Alberto, D.C.P., Francisco, A., Barberan, T., Ferreria, F.M., Ferreres, F. 1998. Unusual flavanoids produced by callus of *Hypericum perforatum* L. *Phytochemistry*, 48; 1165-1168.
- Ayan, A., Çırak, C., Kevseroğlu, K., Sökmen, 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.
- Ayan, A., Çırak, C. 2005. Callus induction in some *Hypericum* species growing in Turkey. *Turkish Journal of Field Crops*, 10: 21-29.
- Ayan, A., Çırak, C. 2006. *In vitro* multiplication of *Hypericum heterophyllum*, an endemic Turkish species. *American Journal of Plant Physiology*, 1: 76-81.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A. 2002. Doku Kültürü: Temel Laboratuar Teknikleri. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 1-35.
- Bais H. P., Walker T. S., McGrew J. J., Vivanco J. M. 2002. Factors affecting growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) and production of hypericin. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38; 58-65.
- 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; 947-9.
- Bezo, M., Stefunova, V. 2001. Indirect regeneration of *Hypericum perforatum* L. Under *in vitro* conditions. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 4: 277-279.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161; 839-851.
- Briskin, D.P. 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant physiology*. 124; 507-514.
- Campbell, M H., Delfosse, E. S. 1984. The biology of Australian weeds. 13. *Hypericum perforatum* L, *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 50; 63-73.

- Cardoso, M.A., Oliveira D.E. 1996. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44 (2); 91–94.
- Cellarova, E., Kimakova, K. 1999. Morphoregulatory effect of plant growth regulators on *Hypericum perforatum* L. seedlings. *Acta Biotechnologica*, 19; 163-169.
- Cherry, M., Bhatti, S., Deborah, L., Roger, S., Lewis, M. 2000. Effect of Hormones on *In vitro* Culture of St. John's wort. 274 SNA Research Conference, 45.
- Cirak, C., Ayan , A.K., Kevseroğlu, K. 2007. Direct and indirect regeneration of plants from internodal and leaf explants of *Hypericum bupleuroides* gris. *Journal of Plant Biology*, 50 (1); 24-28.
- Davis, P.H. 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Dias, A.C.P., Rosa, M., Seabra, B., Andrade, F., Manuel F. 2001. Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. *Journal of Plant Physiology*, 158; 821-827.
- Dias, A.C.P., Francisco, A., Barberan, T., Ferreria, F., Ferreres, F. 1998. Unusual flavanoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*, 48;1165-1168.
- Ferraria, F., Pasquab, G., Monacellib, B., Ciminoc P.,Bottad, B. 2005. Xanthones from calli of *Hypericum perforatum* subsp. *perforatum*. *Natural Product Research*, 19; 171–176.
- Franklin, G., Dias, A.C.P. 2006. Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, 12; 321–330.
- Hansen, S.H., Jensen, A.G., Cornett, C., Bjornsdottir, I., Tylor, B.W., Wilson, I.D. 1999. High-Performance Liquid Chromatography On-line Coupled to High-Field NMR and Mass Spectrometry for Structure Elucidation of Constituents of *Hypericum perforatum* L. *Analytical Chemistry* 71; 5235–5241.
- Hu, L.H., Yip, S.C., Sim, K.Y. 1999. Xanthones from *Hypericum ascyron*, *Phytochemistry*, 52; 1371–1373.
- 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.
- Karakas, O.,Toker, Z., Tilkat, E., Ozen, H.C., Onay, A. 2008. Effects of different concentrations of benzylaminopurine on shoot regeneration and hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Natural Product Research*, 1–7.

Laakmann, G., Schule, C., Baghai T., Kieser, M. 1998. St.John's wort in mild to moderate depression; The relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*. 31; 54-59.

Moura, M. 1998. Conservation of *Hypericum foliosum* Ation, an endemic Azorean species, by micropropagation. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 34; 244-248.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15; 473-497.

Namlı, S., Toker, Z., Işıkan, C., Ozen, H. C. 2009. Effect of UV-C on Production of Hypericin in *Hypericum triquetrifolium* Turra Grown Under *In-vitro* Conditions. *Fresenius Environmental Bulletin* by PSP 18 (1).

Namlı, S., Akbaş, F., Işıkan, C., Ayaz Tilkat, E., Başaran, D. 2010. The effect of different plant hormones (PGRs) on multiple shoots of *Hypericum retusum* Aucher. *POJ*, 3(1);12-17.

National Centre For Complementary and Alternative Medicine (NCCAM), 2001.St.John's wort (Fact Sheet), National Institutes of health, Bethesda.

Oluk, E.O., Orhan, S. 2009. Thidiazuron induced micropropagation of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *African Journal of Biotechnology*, 8 (15); 3506-3510.

Oluk, E.S., Orhan, S., Karakaş, O., Çakır, A., 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.

Ozen, H. C., Bashan, M. 2002. Fatty Acid Composition of *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Advanced Food Science*, 173-174.

Ozen, H.C., Başhan, M., Keskin, C., Toker, Z. 2004. Fatty acid and 3-hydroxy fatty acid composition of two *Hypericum* species from Turkey. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106; 68-70.

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 (5); 977-982.

Pasqua, G., Santamaria, A.R., Caniato, R., Filippini, R., 2008. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from leaf derived callus of *Hypericum perforatum* var. *Angustifolium* (sin. Fröhlich) Borkh. *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 142 (1); 106-110.

6. KAYNAKLAR

Pretto, F.R., E.A. Santare'm. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 62;107–113.

Santarem, E.R., Astarita, L.V. 2003. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. *Brasilian Journal of Plant Physiology*, 15(1); 43-47.

Southwell, I.A., Bourke, C.A. 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, 56; 437-441.

Sökmen, A., Gürel, E. 2002. Sekonder Metabolit Üretimi. (Editörler: Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S.: Bitki bioteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları) Selçuk Üniversitesi. Vakfı Yayınları, s. 211-261.

Sökmen, A., Sökmen, M. 1999. *Hypericum capitatum* kallus ve hücre süspansiyon kültürleri hatlarında biyoaktif ksantonların üretimi. *Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi özel sayısı*, 23; 223-226.

Toker, Z., Kızıl, G., Ozen, H.C., Kızıl, M., Ertekin, S. 2006. Compositions and antimicrobial activities of Essential oils of two *Hypericum* species from Turkey. *Fitoterapia* 77; 57-60.

Verotta, L., Appendino, G., Belloro, E., Jakupovic, J., Bombardelli, E. 1999. Furohyperformin a Prenylated Phloroglucinol from St. John's Wort. *J. Natural products*, 62; 770-772.

Yaltırık, F., Efe, A. 1989. Otsu Bitkiler Sistematigi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.

Tohumlu Bitkiler Sistematigi Kitabı; Özcan Seçmen, Yusuf Gemici, Güven Görk, Lütfi Bekat, Erkuter Leblebici; Değiştirilmiş 8. Baskı; Ege Üniversitesi Basım Evi; Bornova (İzmir-2008).

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Pınar KARAKUŞ

Doğum Yeri: Diyarbakır

Doğum Tarihi: 20.05.1985

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lise : Fatih Y.D.A Lisesi / 1999-2003

Lisans :Dicle Üniversitesi / 2004-2008

Yüksek Lisans :Dicle Üniversitesi / FBE / 2009-

Yayımları (SCI ve diğer):

Akbaş, F., Işıksalan, Ç., Namlı, S., Karakuş, P., Başaran, D. ‘Direct Plant Regeneration from *In vitro*-derived Leaf Explants of *Hypericum spectabile*-a medicinal plant’. The Journal of Medicinal Plant Research, 5(11): 2175-2181.

Pınar Karakuş, Çiğdem Işıksalan, Süreyya Namlı, Filiz Akbaş, Davut Başaran (2010). Endemik Bir Tür olan *Hypericum spectabile*’nin Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ile Mikroçoğaltılması. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.