

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hypericum scabroides'in DOKU KÜLTÜRÜ İLE
YETİŞTİRİLMESİ VE HİPERİSİN İÇERİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Hilal SURMUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

TEMMUZ 2006

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DIYARBAKIR

Hilal SURMUŞ tarafından yapılan “*Hypericum scabroides*’in Doku Kültürü ile Yetiştirilmesi ve Hiperisin İçeriklerinin Araştırılması” konulu bu çalışma , jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

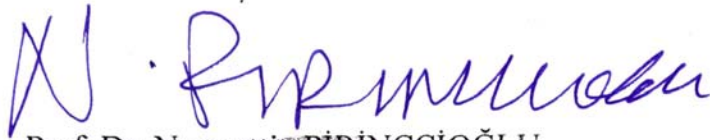
<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>
Başkan: Prof. Dr.	Hasan Çetin ÖZEN
Üye : Prof..Dr.	Ahmet ONAY
Üye : Yrd. Doç. Dr.	Haluk AYDIN



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 03/07/2006

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

31.07/2006



Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)



TEŞEKKÜR

Bitkilerin toplanmasında deneysel çalışmalarda bilgi birikimleriyle büyük desteğini gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN'e, biyoteknolojik çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ahmet ONAY'a, biyoteknolojik, fizyolojik çalışmalarda tecrübelerinden yararlandığım değerli arkadaşım Arş. Gör.Özgür KARAKAŞ'a ve istatistiksel hesaplamalarda yardımlarından dolayı Veysi KIZMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her konuda büyük desteklerini aldığım sevgili arkadaşlarım Nurettin Asan ve Nevin Arslan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hilal SURMUŞ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
AMAÇ.....	iv
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
1.GİRİŞ.....	7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
3.MATERYAL ve METOD.....	8
3.1. Materyal.....	8
3. 1. 1. <i>Hypericum scabroides</i> Robson&Poulter’in Genel Özellikleri ve Yayılışı.....	8
3. 1. 2. Bitkinin Toplanması.....	8
3.2. Metod.....	8
3.2.1. Biyoteknolojik Çalışmalar.....	8
3.2.1.1. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu.....	8
3.2.1.2. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	9
3.2.1.3. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	9
3.2.1.4. Röpikaj ve Kültür Odalarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	11
3.2.1.5. Kullanılan Materyalin Sterilizasyonu.....	11
3. 2. 1.6. Ekim İşlemleri.....	11
3.2.1.6.1. <i>H. scabroides</i> ’in Olgun Tohumlarından Mikroçoğaltma Çalışmaları.....	11
3.2.1.6.2. Tohum Kabuklarının Çatlatılmasının Çimlenmeye Etkisi.....	12
3.2.1.6.3. Ön Soğuklamanın (Stratifikasyon) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	12
3.2.1.6.4. Farklı BAP Konsantrasyonlarının İn Vitro Şartlarda Çatlatılmış Tohumların Çimlenmesine Etkisi.....	13
3.2.1.6.5. <i>In Vitro</i> Şartlarda Rejenere Edilen Sürgünlerin Alt Kültür Çalışmaları.....	13
3.2.1.6.6. GA ₃ ’ in <i>In Vitro</i> Şartlarda Çimlendirilen Bitkiciklerin Gelişimi Üzerine Etkisi.....	14
3.2.1.6.7. Farklı BAP Oranlarının <i>In Vitro</i> Şartlarda Elde Edilen Sürgünlerin Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	14
3.2.2. Fizyolojik çalışmalar.....	15
3.2.2.1. Bitki materyali.....	15
3.2.2.2. Bitki Materyallerini Kurutma Koşulları.....	15
3.2.2.3. Kullanılan Kimyasallar.....	15
3.2.2.4. Kullanılan Aletler.....	15
3.2.2.5. Materyallerin Analize Hazırlanması.....	15
3.2.2.6. Total Hiperisin Miktarının Belirlenmesi.....	16
4.BULGULAR.....	17
4.1. <i>H. Scabroides</i> ’in Tohumundan İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmaları.....	17
4.1.1. Olgun <i>H. Scabroides</i> Tohumlarını Çimlendirme Çalışmaları.....	17
4.1.2. Tohum Kabuklarının Çatlatılmasının Çimlenmeye Etkisi.....	17
4.1.3. Ön Soğuklama (Stratifikasyon) İşleminin Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	17
4.1.4. Tohum Çimlenmesi Üzerine Farklı BAP Oranlarının Etkisi.....	17
4.1.4.1. Alt Kültür Çalışmaları.....	18

4.1.4.1.1 GA ₃ ' in İn Vitro Şartlarda Çimlenen Bitkiçiklerin Gelişimi Üzerine Etkisi	19
4.2. Farklı BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkilerin Total Hiperisin İçerikleri.....	20
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	20
6.REFERANSLAR	22
7. ÇİZELGE LİSTESİ	27
7.1. Tablo 1. Farklı BAP Ortamlarına Aktarılan Tohumların Çimlenme Yüzdesi.....	27
7.2. Tablo 2. Farklı BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkilerin Sürgün Sayısı ve Uzunluğu (cm).....	27
8.RESİMLER.....	28
8.1.Resim 1. İlk Yaprakçıkların Oluşmuş Hali.....	29
8.2. Resim 2. Besi Ortamına Aktarılmış Tohumların 4. Hafta Sonundaki Gelişim Şekli ...	29
8.3.Resim 3. Alt kültür Serileri Sonucu Oluşturulan Sürgünlerin Genel Görünüşü.....	30
8.4. Resim 4. Yüksek BAP Ortamlarında Kalluslaşan Bitkiler ve Üzerilerinde Gelişen Çok Sayıdaki Sürgünlerin Genel Görünüşü .	30
8.5. Resim 5. 0.0055 µM BAP İçeren Ortamda Yetişen <i>H. scabroides</i> 'in Genel Görünüşü.	31
8.6. Resim 6. 0.011 µM BAP İçeren Ortamda Yetişen <i>H. scabroides</i> 'in Genel Görünüşü.	31
8.7.Resim 7. 0.0275µM BAP İçeren Ortamda Yetişen <i>H.scabroides</i> 'in Genel Görünüşü.	32
9.ÖZGEÇMİŞ	33

AMAÇ

Hypericum türleri, başta depresyon rahatsızlıkları olmak üzere pek çok tedavi edici özelliğiyle geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

Bu çalışmada Doğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösteren ve endemik bir tür olan *Hypericum scabroides* Robson&Poulter (Guttiferae)'in doku kültürü yöntemi (*in vitro* mikroçoğaltma) ile yetiştirilmesi için uygun bir protokol belirlemesi ve yapısında bulunan total hiperisin miktarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma sonucu elde edilen bulgular, bölgemizde yetişen diğer endemik ve tıbbi bitkilerin *in vitro* mikroçoğaltılması ve etken maddelerinin tesbiti çalışmalarına da ışık tutacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada *Hypericum scabroides* Robson&Poulter (Guttiferae)'in *in vitro* mikroçoğaltma (doku kültürü ile yetiştirme) protokolü ve bunların total hiperisin içeriği araştırıldı.

Tohumlar hormonsuz , 0.055, 0.011 ve 0.0165 μM BAP içeren Murashige ve Skoog (MS) (1962) ortamlarında kültüre alındı.En iyi çimlenme yüzdesi,kontrol grubu (BAP bulunmayan) ve 0.0165 μM BAP içeren ortamlardan elde edildi.

Ayrıca ön soğuklama işleminin çimlenme yüzdesini arttırdığı saptandı

Proliferasyon için en iyi ortamın 0.0275 μM BAP içeren ortam olduğu tesbit edildi. Bu çalışmada ayrıca çimlendirilien tohumların ilk sürgün ve gövde kısımlarının daha iyi gelişmesi için GA_3 'in gerekli olduğu gözlemlendi. En iyi gelişim 0.29 μM GA_3 içeren ortamdan sağlandı.

Sonuç olarak hem *in vitro* mikroçoğaltılan hem de doğadan toplanan bitkilerin yeteri miktarda hiperisin içermediği saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum scabroides*,Hiperisin, Mikropropagasyon, Proliferasyon.

SUMMARY

In this study, *in vitro* micropropagation (by tissue culture growth) and total hypericin content of *Hypericum scabroides* Robson&Poulter (Guttiferae) were studied.

The seeds were cultured on Murashige and Skoog (MS) (1962) medium containing 0.055, 0.011 and 0.0165 μM BAP together with a hormone free medium as a control.

The best germination percentage were obtained from the control group (BAP free) and 0.0165 μM BAP medium. It was also determined that the process of stratification was raised germination percentage of the cultured seeds.

The MS medium containing 0.0275 μM BAP was the best for proliferation of axillary shoots.

In addition, the effects of Giberellik acid (GA_3) was studied on shoot development.

The best of growth was obtained from MS medium containing 0.29 μM GA_3 .

As results of this study, hypericin contents of naturally growth and *in vitro* growth plants were investigated. In both treatments were obtained not enough contained hypericin.

Keywords: **Hypericum scabroides**, Hypericin, Micropropagation, proliferation.

1.GİRİŞ

Teknolojik alandaki hızlı gelişmeler sayesinde yaşamın her alanında olduğu gibi sağlık alanında da ileri düzeyde araştırmalar yapılmaktadır. Bunlar arasında, geleneksel tedavide yaygın olarak kullanılan ve tedavi özelliği bulunan bitki türleri ile ilgili çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Bu araştırmalar sonucu elde edilen bilgiler, tedavi özelliği gösteren doğal sağlık ürünlerin yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır. Örneğin; Kuzey Amerika’da eczanelerde satılan her beş üründen birini bu tip bitkiler oluşturmaktadır [1]. Bu bitkiler arasında yer alan *Hypericum* türleri de antik çağlardan beri halk hekimliğinde kullanılmaktadır [2].

Hypericum (Guttiferae) dünyada özellikle ılıman bölgelerde, çalılık ve fundalık alanlarda yetişen bir bitki cinsidir [3]. Dünyada yaklaşık 400 türü bulunan *Hypericum* cinsi, Türkiye’de 43 ü endemik olmak üzere 89 türle temsil edilmektedir. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde de 13 türü tespit edilmiştir [4]. En iyi bilinen türü St. John’s wort olarak bilinen *Hypericum perforatum*’dur. Türkiye’de kantaron, kantarum, koyun kıran ve binbirdelik otu adlarıyla bilinir [5-6].

Geleneksel tedavide; yapraklı, çiçekli ve meyvalı dalları ile kökleri kullanılır.

Türkiye’de geleneksel tedavide antispazmik, antiseptik ve sakinleştirici olarak kullanılmaktadır [7]. Modern eczacılık biliminin gelişmesi, diğer bazı bitkiler gibi *Hypericum*’ un da tıbbi olarak kullanılabilen bir bitki olduğunu neredeyse unutturmuştur. Fakat sentetik ilaçların tehlikeli yan etkilerinin bulunması ve bitkilerin çok yönlü etkiye sahip olmaları, bu bitkilerin önemini yeniden gündeme taşımıştır. Özellikle *Hypericum* türlerinin çağımızın yaygın hastalığı olan depresyona karşı etkili olması bu bitkiler ve onlardan elde edilen bileşikler üzerine çalışmaların artmasına neden olmuştur [8].

Sahip olduğu önemli tıbbi özelliklerden dolayı klasik yetiştiriciliğin yanında doku kültürü yöntemiyle de yetiştirilen *Hypericum* türlerinin hiperisin ve pseudohiperisin içeriği, birçok araştırıcı tarafından da çalışılmaktadır [9-10]. *Hypericum* türlerinden elde edilen doğal sağlık ürünlerindeki satış miktarı, bu bitkinin taşıdığı ekstraktların önemini yansıtmaktadır, 2003 yılında Almanya’da bu ilaçların günlük satılan, dozunun 89.9 milyon olduğu ve 2001 de ABD’de bu satışların miktarı 24 milyon dolar olduğu bildirilmektedir [11].

Hypericum türlerinin kimyasal bileşenleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda bu türlerdeki farmakolojik bakımdan aktif bileşenlerin; floroglusinol türevleri, hiperforin ve adhiperforin, naftadiantronlar, hiperisin ve psödohiperisin, flavonoidler, rutin, kuersitrin, izokuersitrin ve biaperin, ayrıca prosiyanidinler, temel yağlar, amino asitler, fenol propanlar, ksantonlar ve diğer bileşikler (organik asit, peptitler, polisakkaritler) olduğu bulunmuştur [12]. Bir naftadiantron olan hiperisin antitümoral fotodinamik terapide kullanılmaktadır [13]. Kuersitin ve diğer flavonoidler gibi lipofilik ekstraktlar derideki yüzeysel yanık, çizik ve yaraların tedavisinde kullanılmaktadır [14]. Bir floroglusinol türevi olan hiperforin de, antidepresan etkiyi sağlayan temel bileşendir [15]. Hiperforinin güçlü bir antitümöral etkisi de bulunmaktadır. Hiperisin ve psödohiperisin gibi polisiklik kinonlar tümör ve virüsler üzerindeki güçlü fotodinamik etkilerinden dolayı bu bileşikler arasında önemli bir grubu teşkil etmektedir [16]. Ayrıca *Hypericum* türlerinin yapısında yer alan ksantonlar da, antiinflammatör, antihepatotoksik, antiviral, antimikrobiyal ve antitümöral gibi birkaç önemli farmakolojik özellik göstermektedir [17].

Bu moleküllerin biyosentezi morfojenesis ile de bağlantılıdır ve genellikle yaprak ve petallerin kenarlarındaki koyu noktacıklı yapılarında bulunur. *Hypericum* bitkileri tarafından hiperisin ve psödohiperisin üretimi tamamıyla genetik ve çevresel faktörlere bağlıdır [18].

Bugüne kadar ticari üretim için tarlalarda yetiştirilen bitki materyali kullanılmaktaydı fakat böcek, virüs, bakteri, kirleticiler ve çevresel şartlar gibi etkenler bu ürünlerin tıbbi kalitesini düşürdüğünden bugün birçok gelişmiş ülkede klasik kültürün yanında doku kültürü yoluyla da tıbbi bitki yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmaktadır [19].

Bu çalışmada; son yıllarda yaygın olarak kullanılan *Hypericum* cinsine ait endemik bir tür olan *Hypericum scabroides* Robson&Poulter türünün farklı BAP konsantrasyonlarında *in vitro* mikroçoğaltılması ve bu ortamlarda yetiştirilen bitkilerin toplam hiperisin içeriklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

KIKUCHI ve ark., (1985), Srilanka'dan toplanan *Hypericum mysoreense*'den; hiperenon-A, miserenon-A ve metil penasil 1,1-dimetilprop-2-enilmalonat bileşiklerini izole etmişlerdir. Yeni olan bu bileşiklerin yanısıra yapısı daha önceden bilinen 4 tane ksanton türevi izole etmiş ve tanımlamışlardır. Bunlar: 2-metoksiksanton, 2,3-dimetoksixanthon, 1,7-dihidroksiksanton ve 2-hidroksiksanton'dur [20].

DECOSTERD ve ark., (1991), *Hypericum calycinum*'un toprak üstü kısımlarının petrol eter özütünden yeni bir tane floroglusinol türevi izole etmişler ve bileşiğin yapısı ¹H ve ¹³C NMR spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Bunun yanında üç monometil eter türevi elde edilmiştir. Bu türevlerin bazıları, Cladosporium cucumerinum'un büyümesini engelleyerek anti-fungal etki göstermiştir. Floroglusinol türevinin ise *in-vitro* test sisteminde anti-malarial etkiye sahip olduğu saptanmıştır [21].

ROCHA ve ark., (1994), *Hypericum brasilense*'nin kök ve gövdelerinin CH₂Cl₂ ile özütlenmesi sonucu yeni bir γ -piron (hyperbrasilone), üç tane bilinen ksanton (1,5-dihidroksiksanton, 5-hidroksi-1-metoksiksanton ve 6-deoksijakareubin) ve betulinik asit izole etmişlerdir. Hiperbrasilon ve ksantonların tümü, Cladosporium cucumerinum'nun büyümesini inhibe ederek anti-fungal etkili olduğu, diğer üç ksantonun da farklı derecelerde monoamin oksidaz A ve B'yi inhibe ettiği görülmüştür [22].

ROCHA ve ark., (1995), *Hypericum brasilense*'nin yaprak ve çiçeklerinin petrol eterle özütlenmesi ile üç tanesi bilinen (japonisin-A, uliginosin-A ve izouliginosin) ve biri de yeni olmak üzere dört floroglusinol izole etmişlerdir. Elde edilen dört floroglusinol'ün, Bacillus subtilis'e karşı etkili olduğu saptanmıştır. Aynı bitkinin MeOH'lı özütünden ise flavonoidler, kamferol, luteolin, kuersetin, kuersitirin, izokuercitirin, hiperosid ve guaijaverin izole edilmiştir [23].

KARTNIG ve ark., (1996), *Hypericum perforatum*, *Hypericum maculatum*, *Hypericum tomentosum*, *Hypericum bithynicum*, *Hypericum glandulosum* ve *Hypericum balearicum*'u doku kültürü yöntemiyle çoğaltmışlar ve değişen miktarlarda hiperisin,

psödohiperisin, flavonoid, monomerik kuersetin türevleri ve apigenin türevleri izole etmişlerdir [24].

RATH ve ark., (1996), *Hypericum roeperonum*'un köklerinden dört tane yeni ksanton izole etmişlerdir. Bunların yapıları spektroskopik ve kimyasal yöntemlerle aydınlatılmıştır. İzole edilen ksantonların bazılarının, *Candida albicans*'a karşı anti-fungal etki yaptığını saptamışlardır [25].

CONSTANTINE ve KARCHESY, (1998), *H. perforatum* bitkisinin, hasat zamanına, kurutma koşullarına ve depolama şekline bağlı olarak hiperisin miktarındaki değişiklikleri çalışmışlardır [26].

WU ve ark., (1998), *H. japonicum*'un toprak üstü kısımlarından yeni bir ksanton glikosid; 1,5-dihidroksiksanton-6-O- β -D-glikosid, yeni bir dimer ksanton; bijaponikaksanton ve ilk naturel prenilat ksanton ; 1,3,5,6-tetrahidroksi-4-prenilksanton izole etmişlerdir. Bununla beraber dört tane bilinen ksanton da elde etmişlerdir [27].

WU ve ark., (1998), *Hypericum henry*'nin yaprak ve gövdesinin CH₂Cl₂ özütlenmesi sonucu yapısı önceden bilinen beş ksanton izole etmişlerdir. Bunlar: kielkorin, kandensin, 1,7-dihidroksiksanton, 1,5-dihidroksi-4-metoksiksanton ve 1,2,3-trihidroksiksanton'dur [28].

ALECU ve ark., (1998), *H. perforatum*'dan saflaştırılan hiperisinin tümör hücrelerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkisini çalışmışlardır. Görünür ışık bölgesinde ve oksijenle fotodinamik bir aktivasyon kazanması nedeniyle bu bileşiğin cilt kanserinde kullanılabileceği önerilmiştir [29].

DENKE ve ark., (1999), *H. perforatum*'un özütlerinin biyokimyasal aktivitelerini araştırmışlardır. Nitrojen fertilizasyonu ile yetiştirilen bitkilerle diğer bitkiler arasında biyolojik aktif madde bakımından farklar olduğunu saptamışlardır [30].

VEROTTA ve ark., (1999), *H. perforatum*'un toprak üstü kısımlarından florohiperforin ve oksitlenmiş analogu olan prenilat floroglusinol hiperforin izole etmişlerdir [31].

UMEK ve ark., (1999), Slovenya yakınlarından toplanan, *H. perforatum*, *H. hirsutum*, *H. maculatum*, *H. tetrapetrum*, *H. montanum* ve *H. humifusum* türlerinin fitokimyasal analizlerini yapmış; rutin, hiperosid, izokuersetin, kuersitrin, kuersetin, 13,11,8-biapigenin, amentoflavon, psödohiperisin, hiperisin ve hiperforin bileşiklerini izole etmişlerdir [32].

ISHIGURO ve ark., (1999), *Hypericum patulum*'un süspansiyon hücre kültüründen iki yeni ksanton glikosid; patulosid-A ve patulosid-B izole etmişlerdir [33].

APAYDIN ve ark., (1999), *Hypericum triquetrifolium*'un MeOH özütünün fareler üzerinde antinosiseptif aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu bitkiden elde edilen

özütün ratlara uygulanması sonucu uygulama miktarına bağlı olarak iltihaplanmayı önlediğini saptamışlardır [34].

HANSEN ve ark., (1999), *H. perforatum*'da bilinen temel bileşiklerin yanısıra iki yeni bileşik bulmuşlardır. Bunlar; kuersetin-arabinosid ve kuersetin-galaktouronid'dir [35].

HU ve ark., (1999), *Hypericum ascyron*'un toprak üstü kısımlarının EtOH özütünden sekiz ksanton türevi izole etmişlerdir. Bunlardan; 3,6-dihidroksi-1,7-dimetoksiksanton yeni bir bileşiktir ve 5-kloro-1,6-dihidroksi-3-metoksi-8-metilksanton yüksek bitkilerden izole edilen ilk kloroksanton'dur [36].

SÖKMEN ve ark., (1999), Doku kültürü yöntemiyle çoğaltıp yetiştirdikleri *Hypericum capitatum*'un MeOH özütünün düşük oranda HIV-1'e karşı antiretroviral aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır [37].

HU ve SIM, (2000), *H.sampsoni*'nin toprak üstü kısımlarının EtOH özütünde daha önceden izole edilmiş olan sampsonin A-M'nin yanı sıra değişik spektroskopik teknikler kullanılarak bazı poliprenilat benzoilfloroglusinol türevleri izole etmişlerdir [38].

VEROTTA ve ark., (2000), *H. perforatum*'un toprak üstü organlarından prenilat floroglusinol hiperforinin oksijenli üç analogunu izole etmişlerdir. Bunlar; 33-deoksi-33-hidroperoksifurohiperforin, oksepahiperforin ve 8-hidroksihiperforin 8,1-hemiasetaldir [39].

SIRVENT ve GIBSON, (2000), *H. perforatum*'da bulunan hiperisin psödohiperisin ve diğer bileşiklerin elde edilmesi için yeni bir teknik geliştirmişlerdir [40].

EVSTATIEVA ve ark., (2000), Bulgaristan'daki *H. perforatum*'ların hiperisin miktarlarını belirlemeye yönelik olarak yaptıkları çalışmada, 20 floristik bölgeden toplanan toplam 65 populasyon içinde en fazla hiperisin içeriğinin güney Bulgaristan'ın dağlık bölgesinde yetişen *H. Perforatumda*'da bulunduğunu saptamışlardır [41].

SOUTHWELL ve BOURKE, (2001), *H. perforatum*'un hiperisin içeriğinin mevsimlere bağlı olarak değiştiğini saptamışlardır. Geniş yapraklarda kışın minimum hiperisin-psödohiperisin miktarı 100 ppm iken yazın 3000 ppm. dar yapraklarda ise bu miktar, kış mevsiminde geniş yaprağına yakın bir değerdeyken yaz mevsiminde maksimum yani 5000 ppm. kadar olduğunu saptamışlardır [42].

KİTANOV ve NEDIALKOV, (2001), *Hypericum annulatum* bitkisinin MeOH özütünden iki yeni benzofenon, hiperisefonosid ve annulatofenon izole etmişlerdir. Benzofenonların yapılarının 2'-O-β-D-glukopiranasol-2,4,5',6-tetrahidroksibenzofenon ve 2,3,5,6-tetrahidroksi -4-metosibenzofenona benzediği spektral ve kimyasal yollarla kanıtlamışlardır [43].

PLOSS ve ark., (2001), *H. perforatum*'dan asetonla özütünden flavanollerden; kateşin ve epikateşin ile prosianidin izole etmişlerdir. Bunları yapıları temel kimyasal ve spektral yöntemlerle tespit etmişlerdir [44].

JURGENLIEMK ve NAHRSTEDT (2001), *H. perforatum*'un kurutulmuş özütünden HPLC kullanarak 22 fenolik bileşik izole etmişlerdir. Bunlardan kuersetin-3-O-(2''-O-acetil)- β -D-galaktsid ilk defa izole edilen doğal bir bileşiktir. Kriptoklorogenik asit, protokateşik asit, 3-O-[Z]-p-kumar-oilkuinik asit, isoorientin, sianidin-3-O- α -L-rhamnoside ve astilbin ise ilk kez böyle bir kaynaktan izole edilmiştir [45].

ÖZEN ve BAŞHAN (2002), *Hypericum triquetrifolium*'un yapısında bulunan yağ asitlerinin bileşimlerini, GC/MS yöntemiyle saptanmasına yönelik bir çalışma yapmışlardır [46].

ÖZEN ve ark. (2004), Türkiye'de yetişen iki *Hypericum* türünün yağ asidi ve 3-hydroxy yağ asidi bileşimlerini araştırmışlardır [47].

ZOBAYED ve ark. (2004), Altı farklı kültür sistemi kullanılarak *H. perforatum*'un in vitro karakterizasyonunun tesbiti amacıyla geniş bir in vitro gelişme skalası araştırmışlar. Bu çalışmada hiperisin ve psödfhiperisin miktarının jelli ortamda (katı besiyeri) sıvı besiyeri ortamındakinden daha fazla olduğu bulunmuştur [19].

PIOVAN ve ark.,(2004), *Hypericum elodes* türündeki kırmızı bezelerde hiperisin türevlerinin oluşturulduğunu bitkinin sepallerinden aldıkları mikro örneklerle, elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometri (ESI-MS/MS) yöntemlerini kullanarak bulmuşlar ve bu bulguya dayanarak, bu türün *Hypericum* cinsi içerisindeki taksonomik yerinin bulunabileceğini ve bu türün de naftadiantronların biyosentez yolunu gerçekleştirebileceğini ortaya çıkarmışlardır [48].

FENNER ve ark.,(2005), Güney Brezilya'da yetişen yedi *hypericum* türü (*H. caprifoliatum* Cham.ve *Schltl.*, *H. carinatum* Griseb., *H. connatum* Lam., *H. ternum* A. St.-Hil., *H. myrianthum* Cham. ve *Schltl.*, *H. piriiai* Arechav. ve *H. polyanthemum* *Klotzsch ex Reichardt*)'un toprak üstü kısımlarının ham metanolik ekstraktları, agar sulandırma metodu kullanılarak filamentsi mantar, patojenik mayalar ve dermatofitleri içeren standardize edilmiş panele karşı *in vitro* antifungal aktiviteleri araştırılmış ve *H. Ternum*'un kloroform ve hekzan ekstraktlarının test edilen ekstraktlar arasında en büyük aktivite gösterdiğini saptamışlardır [49].

DULGER ve GONUZ ,(2005), Türkiye de yetişen ve Balıkesir bölgesi için endemik bir tür olan *Hypericum kazdagensis*' in yapraklarının kloroform ,aseton ve metanol

ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini disk difüzyon metodunu kullanarak araştırmışlar ve bütün ekstraktların test edilen bakterilere karşı aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır [50].

KARAKAŞ, (2005), *Hypericum triquetrifolium*'u *in vitro* da BAP oranlarını kullanarak yetiştirmiş ve kimyasal ve spektral yöntemler kullanarak hiperisin içeriğini test etmiştir [51].

ÇIRAK ve ark.,(2006) Türkiye'de yetişen , *Hypericum aviculariifolium subsp. depilatum var. depilatum* (endemik) ve *Hypericum pruinaum* türlerinde hiperisin miktarının geceleri, yeni gelişen çiçekli kısımlarda en yüksek bulmuşlar, *Hypericum perforatum* da ise en yüksek hiperisin seviyesinin tam çiçeklenme evresinde olduğunu saptamışlardır [52].

MEDINA ve ark.,(2006),*Hipericum* türlerinin içerdiği lipofilik bir bileşeni olan hiperforinin; nörolojik,antibakteriyel ,antitumoral özellikler gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır [53].

MARTONFİ ve ark.,(2006), *H. maculatum ve H. perforatum*' un sekonder metabolit içeriklerini karşılaştırdıklarında, ,kimyasal profillerinin (hiperosid, izoquersitrin, quersitrin, quersetin, biapigenin, psödohiperisin, hiperisin varlığı) çok benzer olduğunu, fakat *H. maculatum* ve akraba türleri olan *H. dubium ve H. carpaticum, un, H. perforatum*' da genellikle var olan rutin ve hiperforini içermediklerini saptamışlardır. Ayrıca H. maculatum'daki hiperisin içeriğini 0.033 - 0.339 olarak bulmuşlardır [54].

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 bulmuş ve her iki türün içerdiği uçucu yağların, 60-80 µg/ ml lik bir konsantrasyonda dokuz mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tesbit etmişlerdir [55].

3.MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3. 1. 1. *Hypericum scabroides* Robson & Poulter'in Genel Özellikleri ve Yayılışı

Gövde 15-40 cm, dik veya tabanda yatık, gövde kısa tüylü, beyaz veya kahverengimsi tüylüdür. Salgı tüyleri bulunmaz. Genelde salgısız yada az sayıda belli belirsiz kırmızı salgı noktacıklardır. Ana gövde üzerinde yapraklar 7-15 mm, dikdörtgenimsidir. Şeritsiye doğru değişen şekillerde bazen geriye doğru kıvrık, uç kısmı yuvarlağımsıdır. Çiçek durumu korimbus ve çok çiçeklidir. Sepaller dikdörtgenimsi mızraksı, uçlar yuvarlağımsı, kemirilmiş dişsidedir. Petaller 6-9 mm dir. Kapsül 5-10 mm yumurtamsıdır. Çiçeklenme dönemi 6. aydır.

Genel coğrafi yayılışı: Doğu Anadolu Bölgesinde yayılış gösteren endemik bir türdür [56].

3. 1. 2. Bitkinin Toplanması

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan *Hypericum scabroides*'in vejetatif dönemdeki yaprakları ve tohumları haziran-ağustos 2005'de Elazığ-Gezin, Hazar Gölü civarından toplanmıştır. Bu bitkiye ait herbaryum örnekleri, Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'nda (DUF) saklanmaktadır.

3.2. Metod

3.2.1. Biyoteknolojik Çalışmalar

3.2.1.1. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu

Cam malzemeler (erlenmayer, mezür, balon joje, pipet, beher) sadece sıcak su kullanılarak fırça yardımı ile temizlendi. Daha sonra üç defa saf sudan geçirilerek 180 °C'de etüvde bir saat bekletilmek suretiyle kurutuldu. Kullanılan Magenda GA-7 kültür kapları ise alüminyum folyo ile sarılarak 121°C'deVe 1 atmosfer basınçta 25 dakika süre ile otoklavda sterilize edildi.

3.2.1.2. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Pens ve bisturiler önce % 96'lık alkol ile silinip 10'arlı gruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak 300 °C'lik kuru bir sterilizatörde 30 dakika süre ile sterilize edildi.

3.2.1.3. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmada besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS) (1962) tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanıldı. MS besi ortamında kullanılan stok çözeltilerin hazırlanması aşağıda açıklandığı gibidir.

MS(makro elementler) Ana Çözeltisi

NH ₄ NO ₃	16.5 g
KNO ₃	19.0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7 g
KH ₂ PO 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	2230 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg
KI	83 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır.

MS Mikro 2 Elementler Ana Çözeltisi

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

Vitamin Karışımı Ana Çözeltisi

Nikotinic asit	50 mg
Glisin	2.00 mg
Pridoksin HCl	50 mg
Distile su	100 ml'ye tamamlanır

Kompleks Kelatör Ana Çözeltisi

FeSO ₄ .7H ₂ O	2.78 g
Na ₂ EDTA	2.00 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır.

B1 Vitamini Ana Çözeltisi

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

BAP (6-Benzylaminopurin) Ana Çözeltisi

BAP	100 mg
1N HCl	2-3 ml
Distile su	100 ml'ye tamamlanır.

GA₃ (Giberellik asit) Ana Çözeltisi

GA ₃	25 mg
Distile su	25 ml 1'e 1 alınır.

MS Kültür Besi Ortamı

Agar	12 g
Sakkaroz	30 g
MS ana solüsyonu (Makro elementler)	100 ml
MS mikro elementler-1	10 ml
MS mikro elementler-2	1 ml
Kompleks kelatör	10 ml
Vitamin karışımı	1 ml
B1 vitamini ana solüsyonu	1 ml
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır.

Besi ortamlarının sterilizasyonu, 1 atmosfer basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda bekletilmek sureti ile yapıldı. Sterilizasyonu yapılan besi ortamı, steril kabin içerisinde Magenta GA-7 kültür kaplarına aktarıldı (50-60 ml).

3.2.1.4. Röpikaj ve Kültür Odalarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Röpikaj odasında, bir ultraviyole lambası, içinde ekim işlemlerinin gerçekleştirildiği steril bir kabin ve kabin içerisinde bunzen beki bulunmaktadır. Röpikaj odasına girilmeden 24 saat önce, kapı, duvar, masa, dolaplar, taban vs. seyreltilmiş sodyum hipoklorit (NaOCI; % 53'lük sodyum hipoklorit içeren) ile steril edildi. Steril kabinin içi ve yüzeyi alkol (% 70) ile temizlendi. Oda temizlendikten sonra, ultraviyole lambası ekim işlemlerinde bir gece önce 2-4 saat açık bırakılarak sterilizasyon tamamlandı.

Kültür odasının sıcaklığı 25 ± 2 °C'a, ışık periyodu da 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak biçimde ayarlandı (3000-5000 lüx).

3.2.1.5. Kullanılan Materyalin Sterilizasyonu

H. scabroides'in olgun tohumları, çimlenme sırasında enfekte olmasını önlemek için yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu.

Çalışmada kullanılacak tohumlar, musluk suyunda yıkandıktan sonra % 70'lik alkolde 30 saniye çalkalanarak ön sterilizasyonu yapıldı. Daha sonra tohumlar % 5'lik NaOCI çözeltisi içinde 10 dakika süre ile bekletildi. Ön sterilizasyonu yapılan tohumlar, steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanmak üzere NaOCI'den arındırıldı. dakika süre ile otoklavda steril edildi. [51]

3. 2. 1.6. Ekim İşlemleri

3.2.1.6.1. *H. scabroides*'in Olgun Tohumlarından Mikroçoğaltma Çalışmaları

H. scabroides'in mikroçoğaltma çalışmalarında materyal olarak olgun tohumlar kullanıldı. Tohumlar, 3.2.1.5. te belirtilen sterilizasyon işleminin tabi tutuldu. Daha sonra tohumlar, steril kurutma kağıtları üzerinde pens yardımıyla izole edilerek, MS besi ortamı bulunan Magenta GA-7 kültür kaplarına aktarıldı. Tohumların çimlenmesi için MS ortamı, 30 gL⁻¹ sakkaroz, 10 gL⁻¹ agar ilavesiyle desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce 5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Kültüre alındıktan 2 hafta sonra tohumların çimlenme durumları değerlendirildi.

3.2.1.6.2. Tohum Kabuklarının Çatlatılmasının Çimlenmeye Etkisi

Materyal olarak kullanılan olgun tohumların *in vitro* şartlarda çimlendirilmesi için alınan olgun tohumlar sterilizasyon aşamalarından geçirildikten sonra doğrudan kültüre alındı. Bu işlemlerden 2 hafta sonra yapılan gözlemlerde tohumların hiçbirinin çimlenmediği gözlemlendi. Bu nedenle, tohum kabuklarının çatlatılmasının çimlenme hızı üzerine etkisi araştırıldı.

Çalışmada kullanılan tohumlar, 3.2.1.5’de belirtildiği gibi sterilizasyon aşamalarından geçirildikten sonra steril kurutma kağıtları üzerinde pens yardımıyla izole edildi ve MS besi ortamı bulunan Magenta GA-7 kültür kaplarına aktarıldı.

Tohumların çimlenmesi için MS ortamı, 30 gL⁻¹ sakkaroz, 10 gL⁻¹ agar ilavesiyle desteklendi. Besi ortamının pH’sı agar ilavesinden önce 5.8 olacak şekilde ayarlandı ve 1 atm basınçta 12°C’de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Sterilizasyon aşamasından sonra olgun tohumlar steril kabin içinde kurutma kağıtları üzerinde 1 pens ve bisturiler yardımıyla çatlatıldı ve kültür kaplarına aktarıldı.

Ekim işleminden sonra günlük gözlemler yapıldı ve tohumların ekiminden 3 hafta sonraki çimlenme durumlarına ait gözlemler yapılarak bu gözlemler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildi.

3.2.1.6.3 Ön Soğuklamanın (Stratifikasyon) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Materyal olarak kullanılan olgun tohumların *in-vitro* şartlarda çimlendirilmesi için alınan olgun tohumlar sterilizasyon aşamalarından geçirildikten sonra doğrudan kültüre alındı. Bu işlemlerden 2 hafta sonra yapılan gözlemlerde tohumların çimlenme oranlarının çok düşük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, tohumların ön soğuklama işlemlerinden geçirilmesinin çimlenme hızı ve oranı üzerine etkisi araştırıldı.

Bu çalışmada tohumlar kültüre alınmadan önce bir hafta süreyle nemli bir ortamda +4°C’de ön soğuklama işlemine tabi tutuldu.

Çalışmada kullanılan tohumlar, 3.2.1.5’de belirtildiği gibi sterilizasyon aşamalarından geçirildikten sonra steril kurutma kağıtları üzerinde pens yardımıyla izole edildi ve MS besi ortamı bulunan Magenta GA-7 kültür kaplarına aktarıldı.

Tohumların çimlenmesi için MS ortamı, 30 gL⁻¹ sakkaroz, 10 gL⁻¹ agar ilavesiyle desteklendi. Besi ortamının pH’sı agar ilavesinden önce 5.8 olacak şekilde ayarlandı ve 1 atm basınçta 12°C’de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Sterilizasyon aşamasından sonra olgun tohumlar steril kabin içinde kurutma kağıtları üzerinde bir pens ve bisturi yardımıyla çatlatıldı ve kültür kaplarına aktarıldı.

Ekim işleminden sonra günlük gözlemler yapıldı ve tohumların ekiminden 3 hafta sonraki çimlenme durumlarına ait gözlemler yapılarak bu gözlemler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildi.

3.2.1.6.4. Farklı BAP Konsantrasyonlarının *In Vitro* Şartlarda Çatlatılmış Tohumların Çimlenmesine Etkisi

Tohum kabuklarını çatlatarak hormonsuz ortamda olgun tohumları çimlendirdikten sonra aşağıda verilen farklı BAP konsantrasyonlarının çimlenme üzerindeki etkisini araştırmak üzere bir çalışma yapıldı. Bu çalışmada da tohumların sterilizasyonu için önceki sterilizasyon işlemlerinin aynısı kullanıldı.

Tohumların çimlenmesi için yukarıda belirtilen BAP'ın farklı oranlarının bulunduğu MS besi ortamı, 30 gL⁻¹ sakkaroz, 10 gL⁻¹ agar ilavesiyle desteklendi. Besi ortamı pH'sı agar ilavesinden önce 5.8 olacak şekilde ayarlanarak 1 atm. basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Sterilizasyon aşamasından sonra olgun tohumlar steril kabin içinde steril kurutma kağıtları üzerinde steril pens ve bisturiler yardımıyla çatlatıldı ve kültür kaplarına aktarıldı.

BAP'ın farklı konsantrasyonlarında tohumların çimlendirilmesi için yaptığımız çalışmada kontrol grubu da dahil her bir oran için 5 Magenta GA-7 kültür kabı ve her bir kap için ortalama 6 tohum kullanıldı.

3.2.1.6.5. *In Vitro* Şartlarda Rejenere Edilen Sürgünlerin Alt Kültür Çalışmaları

1. Alt Kültür

In vitro şartlarda *H. scabroides*'in olgun tohumlarından elde edilen sürgünlerin alt kültür çalışmaları yapıldı. Bu amaçla elde edilen sürgünler 0.0275 µM BAP, 30 gL⁻¹ sakkaroz ve 10 gL⁻¹ agar ile desteklenmiş MS besi ortamında alt kültüre alındı.

MS besi ortamının pH'sı, agar ilavesinden önce KOH ile 5.8'e ayarlanarak 1 atmosfer basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile steril edildi. Besi yerinin sterilizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, steril kabin içerisinde Magenta GA-7 kültür kaplarına bölüştürüldü. Steril filtre kağıtları arasında jelozundan arındırılan sürgünler steril pens ve bisturiler yardımıyla besi ortamlarına aktarıldı. Besi ortamlarına ekimi yapılan sürgünler, sıcaklık ayarı 25±2 °C olan 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık foto periyoda ayarlanmış büyüme odasında geliştirilmeye bırakıldı.

Alt kültürü yapılan sürgünlerin gelişimlerine ve oluşan sürgün sayısına ilişkin veriler kaydedildi.

3.2.1.6.6. GA₃'in *In Vitro* Şartlarda Çimlendirilen Bitkiciklerin Gelişimi Üzerine Etkisi

In vitro şartlarda *H. scabroides*'in olgun tohumlarından elde edilen sürgünler; 0.0275 µM BAP, 30 gL⁻¹ sakkaroz ve 10 gL⁻¹ agar ile desteklenmiş MS besi ortamında alt kültüre alındı. Bu işlemlerden 2 hafta sonra bitkilerde gelişimin durduğu gözlemlendi. Bu nedenle GA₃'in *in vitro* da çimlenen bitkilerin bitki gelişimi üzerine etkili olup olmadığı araştırıldı. Bu çalışma için besi ortamına 0.29 µM GA₃ ilave edildi.

MS besi ortamının pH'sı, agar ilavesinden önce KOH ile 5.8'e ayarlanarak 1 atmosfer basınçta 121°C'de 25 dakika süre ile steril edildi. Besi yerinin sterilizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, steril kabin içerisinde Magenta GA-7 kültür kaplarına bölüştürüldü. Steril filtre kağıtları arasında jelozundan arındırılan sürgünler steril pens ve bisturiler yardımıyla besi ortamlarına aktarıldı. Besi ortamlarına ekimi yapılan sürgünler, sıcaklık ayarı 25±2 °C olan 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık foto periyoda ayarlanmış büyüme odasında geliştirilmeye bırakıldı. Alt kültürü yapılan sürgünlerin gelişimlerine ve oluşan sürgün sayısına ilişkin veriler kaydedildi.

3.2.1.6.7. Farklı BAP Oranlarının *In Vitro* Şartlarda Elde Edilen Sürgünlerin Proliferasyonu Üzerine Etkisi

2. Alt Kültür

Bu çalışmamızda 1. alt kültür çalışmaları sonucunda elde edilen sürgünlerin proliferasyonuna BAP'ın farklı konsantrasyonlarının etkisi araştırıldı. Alt kültür işlemleri sonucunda elde edilen sürgünler BAP'ın, 0.0055 µM, 0.011 µM, 0.0275 µM farklı oranları ile birlikte, 30 gL⁻¹ sakkaroz ve 10 gL⁻¹ agar ile desteklenmiş MS besi ortamında alt kültüre alındı.

Besi yerinin sterilizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, steril kabin içerisinde magenta GA-7 kültür kaplarına bölüştürüldü. Steril filtre kağıtları arasında jelozundan

arındırılan sürgünler steril pens ve bisturiler yardımıyla besi ortamlarına aktarıldı. Besi ortamlarına ekimi yapılan sürgünler, büyüme odasında geliştirilmeye bırakıldı.

Sürgün proliferasyonu için alt kültürü yapılan sürgünlerin morfolojik gelişimlerine, oluşan sürgün sayısına ve sürgünlerin boy uzunluklarına ait veriler kaydedildi.

3.2.2. Fizyolojik çalışmalar

3.2.2.1. Bitki materyali

Fizyolojik çalışmalarda kullandığımız materyaller *in vitro* şartlarda doku kültürü yöntemi ile tohumdan itibaren yetiştirdiğimiz bitkilerden oluşmaktadır. Kullanılan materyaller sadece gövde ve yaprak kısımlarından oluşmaktadır.

3.2.2.2. Bitki Materyallerini Kurutma Koşulları

Çalışmada kullanılan materyaller steril pens ve bisturiler yardımıyla kültür kaplarından alındıktan sonra musluk suyu altında yıkanarak jelozundan arındırıldı. Daha sonra gövde ve yaprak kısımlarından oluşan bitkicikler küçük parçalar halinde kesilerek kurutma kağıtları üzerinde, oda koşullarında 1 hafta süre ile kurumaya bırakıldı.

Kurumuş olan bitkicikler öğütme makinesinde toz haline getirildi ve hassas terazi ile tartıldı.

3.2.2.3. Kullanılan Kimyasallar

Hiperisin miktarını tayin etmede kullanılan; hiperisin, kloroform, metanol ve temizlemede kullanılan aseton Sigma G'den elde edildi.

3.2.2.4. Kullanılan Aletler

UV-spektrofotometresi (Shimadzu UV-160), hassas tartı (GEC AVERY), sonikatör (sanyo soniprep 150), öğütme makinesi, derin dondurucu.

3.2.2.5. Materyallerin Analize Hazırlanması

Farklı kültür ortamlarından yetişen bitkilerin total hiperisin miktarlarının karşılaştırılması için çalışmada BAP'ın 4 farklı ortamında yetişen bitki örneklerinden kuru ağırlığı 500 mg olan miktarlar alındı.

1. Toz haline getirilen bitki materyalleri (500 mg) üzerine 10 ml kloroform eklendi ve oluşturulan çözelti 5 dakika süre ile sonikasyon işlemine tabi tutuldu.
2. Sonikasyon işleminden sonra çözelti sonikatörden alınıp kloroformun uzaklaştırılması için vakumda filtre edildi ve kloroform kısmı atıldı. Bu işlemler 3 kez tekrarlandı.
3. Kloroform kısmı atıldıktan sonra geriye kalan kuru materyal üzerine 10 ml metanol eklendi ve çözelti 5 dakika süre ile sonikasyon işlemine tabi tutuldu.
4. Sonikasyon işleminden sonra çözelti vakumda filtre edildi. Vakum işlemiyle çözücü kısım uzaklaştırıldı. Daha sonra çözücü kısımları (metanollü kısım) alınarak 50 ml'lik cam balonlara aktarıldı. Bu işlemler 3 kez tekrarlandı ve üç işlem sonunda elde edilen metanol kısımlarından oluşan çözeltiler cam balonlarda toplandı.
5. Toplanan metanol evaporatörde uzaklaştırıldı.
6. Hiperisin ve türevleri dışındaki organik maddelerin tamamen uzaklaştırılması için cam balon içerisindeki tortu üzerine 3-4 ml kloroform eklendi ve kloroformlu kısım pastör pipeti yardımıyla atıldı.
7. $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanan derin dondurucuda bekletildi. Geri kalan kısım metanolla çözülerek 589 nm de absorbansı ölçüldü.

Verilerin güvenilirliği açısından her bir deney üç kez tekrarlandı, gruplar karşılaştırıldı ve deney gruplarına ait veriler değerlendirildi.

3.2.2.6. Total Hiperisin Miktarının Belirlenmesi

Total hiperisin miktarının belirlenmesi için örnekler derin dondurucudan alındı ve üzerine hiperisin ve türevlerinin çözülmesi için metanol eklendi. Çözelti iyice çalkalandıktan sonra 25 ml'lik ölçü balonlarına seyreltme amacıyla aktarıldı. Daha sonra bu çözeltinin absorbansı 592 nm'de UV-spektrofotometresinde ölçüldü.

4.BULGULAR

4.1. H. Scabroides'in Tohumundan İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmaları

4.1.1. Olgun H. Scabroides Tohumlarını Çimlendirme Çalışmaları

Tohumlar 3.2.1.5. te belirtilen sterilizasyon işleminden sonra doğrudan besi yerine alındı ve 4. hafta sonunda olgun tohumlardan hiç birinin çimlenmediği gözlemlendi.

4.1.2. Tohum Kabuklarının Çatlatılmasının Çimlenmeye Etkisi

Tohumları çimlendirebilmek için, sterilizasyon işlemlerinden sonra tohum kabukları çatlatıldı ve besiyerlerine aktarıldı. Bu işlemlerden sonra tohumların çimlenme durumlarının tamamen araştırılması için günlük gözlemler yapıldı ve ekim işlemlerinden 6 gün sonra tohumların ancak % 26'sının çimlendiği gözlemlendi.

4.1.3. Ön Soğuklama (stratifikasyon) İşleminin Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Tohumlar çimlendirilme işlemlerinden önce bir hafta boyunca nemli bir ortamda +4 0C soğuklama işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra tohumlar sterilizasyon işlemlerinden geçirilip ,tohum kabukları çatlatıldı ve ekim işlemlerinden 4 gün sonra tohumların yarısının çimlendiği gözlemlendi.

Kültürün 10. gününde ilk yaprakçıkların oluştuğu gözlemlendi (Resim 1). 4. Haftanın sonunda yaprak ve gövde kısımlarının iyice belirginleştiği gözlemlendi (Resim 2).

4.1.4. Tohum Çimlenmesi Üzerine Farklı BAP Oranlarının Etkisi

Bu çalışmada da tohumların çimlendirilmesi için tohum kabukları çatlatıldıktan sonra aşağıda gösterildiği gibi kontrol grubu ile birlikte 3 farklı BAP (0.055,0.011 ve 0.0165 μ M) oranı test edildi.

Tohumlar farklı BAP oranlarının bulunduğu ortamlara aktarıldıktan 2 hafta sonra, her bir ortamdaki çimlenen tohum sayısı, gelişim ve enfeksiyon durumları gözlemlendi. Gözlem sonuçları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Farklı BAP ortamlarına aktarılan tohumların çimlenme yüzdesi.

Ortamın içeriği (μM BAP)	Çimlenen Tohum (%)
Kontrol	59.2
0.055	13.9
0.011	19.7
0.0165	29.5

Farklı BAP oranlarını kullanarak yaptığımız çalışmada çimlenme yüzdesi bakımından en iyi ortamın hormonsuz ortam olduğu tesbit edildi. Morfolojik durumlarına bakıldığında, 0.0165 μM BAP içeren ortamda çimlenen tohumların yapraklarının daha belirgin ve normal renkte olduğu gözlemlendi (Resim 1). Ayrıca alt kültür çalışmalarında 0.0165 μM BAP içeren ortamdan aktarılan bitkilerdeki verimin (gelişmeye giden bitki sayısı) hormonsuz ortamdakinden daha fazla olduğu gözlemlendi.

4.1.4.1. Alt Kültür Çalışmaları

In vitro çimlendirilen tohumlardan alınan sürgün uçlarını çoğaltmak ve kallus geliştirmek için BAP’ın 0.033, 0.066, 0.132 ve 0.264 μM ’lık oranları kullanıldı.

BAP’ın farklı oranları ile desteklenen MS besi ortamında yetiştirilen bitkiçiklerde aşağıdaki morfolojik gözlemler yapıldı:

10. günde ilk yaprakçıklar ve çok küçük bir gövde yapısının oluştuğu gözlemlendi.

14. günde ilk oluşan yapıların kallus oluşturduğu ve bunların üzerinde çok sayıda bitkiciğin geliştiği gözlemlendi.

17. günde kallusumsu yapılar üzerinde gelişen bitkiciklerin büyüyüp internod kısımlarının belirginleştiği bu bitkiciklerin oldukça zayıf ve açık yeşil bir renkte olduğu gözlemlendi. Bu bitkiciklerden iyi durumda olanlar kalluslardan alınarak alt kültürlerle alındı.

24. günde kalluslar çok hızlı geliştiği halde tomurcukların uzamasında çok az bir gelişme gözlemlendi.

30. günde yoğun bir kallus yapısı ve bu yapılar üzerinde çok sayıda küçük sürgünlerin oluştuğu gözlemlendi. Kalluslu yapılar üzerinde gelişen bitkiciklerin ve bu kallus yapıları üzerinde gelişen bitkiciklerden itibaren alt kültür serilerine alınan bitkiciklerin internodları ve nodları belirginleşti. Bu bitkiciklerin yapraklarının da genişlediği ,gövdenin ve yeşil rengin belirginleştiği gözlemlendi. Bu bitkiciklerin normal bitkiyi andıran bir görünüm aldığı da gözlemlendi. (Resim 3)

0.066, 0.132 ve 0.264 μM 'lık ortamlarda yetiştirilen bitkiciklerin yoğun bir kallus yapısı oluşturduğu (resim 4) ancak 0.033 μM 'lık ortamda yok denecek kadar az miktarda kallus oluşturduğu tesbit edildi.

Bir sonraki çalışmada BAP'ın 0.0055, 0.011 ve 0.275 μM 'lık oranları kullanıldı ve ortamların hiç birinde kallusumsu yapının oluşmadığı ve doğal görünümlü bitkiler geliştiği gözlemlendi. Test edilen ortamlarda yetiştirilen bitkilerin sürgün sayısı ve uzunlukları tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Farklı BAP ortamlarında yetiştirilen bitkilerin sürgün sayısı ve uzunluğu (cm).

Ortamın içeriği (μM BAP)	Sürgün sayısı (Ortalama \pm sd)	Sürgün uzunluğu (Ortalama \pm sd)
0.0055	28.8 \pm 9.41ab	121.3 \pm 19.73 ab
0.011	39 \pm 9.74 a	130.9 \pm 23.32 b
0.0275	42.7 \pm 14.43 c	142.8 \pm 35.81 c

Verilerin güvenirliliği açısından bu tablodaki veriler DUNCAN testine tabi tutuldu. Tablo 2'den de görüldüğü gibi ortamın BAP içeriği arttıkça hem sürgün sayısı hem de sürgün uzunluğu artmıştır

4.1.4.1.1 GA₃' in *In Vitro* Şartlarda Çimlenen Bitkiciklerin Gelişimi Üzerine Etkisi

Çimlenen tohumlardan elde edilen sürgün uçlarının 1. alt kültür çalışmalarında ,ekim işleminden iki hafta sonunda yapılan gözlemlerde bitkilerde gelişimin durduğu gözlemlendi. BAP'ı 0.275 μM oranını içeren MS besi ortamına , bitkinin çimlenmeden sonraki gelişimini desteklenmesi amacıyla GA₃ eklendi.

GA₃'in yüksek oranları (0.58,0.87 ve 0.116 μM) oranları bir süre sonra bitkilerde solmaya neden olurken,düşük oranlarının (0.029,0.0275 ve 0.145 μM) yeterli gelişimi

sağlayamadığı gözlemlendi. Bu nedenle bitkilerin gelişiminde en iyi sonucu veren $0.29 \mu\text{M}$ GA_3 oranı kullanıldı.

4.2. Farklı BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkilerin Total Hiperisin İçerikleri

Hiperisin içeriklerinin araştırılması için yaptığımız çalışma sonunda bu bitkilerin yeterli miktarda hiperisin içermedikleri ortaya çıkarılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada; çok uzun zamandan beri tedavide kullanılan *Hypericum* cinsine ait *H. scabroides* türünün tohumdan itibaren *in vitro* mikroçoğaltılması ve farklı BAP ortamlarında yetiştirilen bitkilerin hiperisin içerikleri incelendi.

Çalışmamızda, tohum kabuklarının çatlatılmasının tohumların çimlenme yüzdesini arttırdığı saptandı. Ayrıca ön soğuklama işleminin tohumların çimlenme oranını arttırdığı saptandı.

Tohum çimlenmesine farklı BAP oranlarının etkisine bakıldığında; en yüksek çimlenme oranı, BAP içermeyen kontrol grubunda (% 59.2), hormon içeren kaplarda ise $0.0165 \mu\text{M}$ BAP bulunan ortamda (% 29.5) saptandı. KARAKAŞ (2005), tohum çimlenmesinde en iyi ortamı, BAP içermeyen kontrol grubu ve $19.6 \mu\text{M}$ BAP bulunan ortamlardan sağlamıştır.

ZOBAYED ve ark. (2004), *Hypericum perforatum* için MS besi ortamında $5 \mu\text{M}$ thidiazuron (TDZ) ve 3.0 gL^{-1} gellam gum kullanarak en yüksek çimlenme oranını elde etmişlerdir. *H. scabroides* tohumlarının çimlenmesi için ise, hormonsuz MS besi ortamının en iyi sonucu verdiğini saptanmıştır. Çimlenen tohumlarda en iyi morfolojik gelişim $0.0165 \mu\text{M}$ BAP içeren ortamda gözlemlendi.

In vitro çimlendirilen tohumların çoğaltılması ve kallus oluşturmak için BAP'ın farklı konsantrasyonları kullanıldı. Bu çalışmada en iyi sonucun $0.033 \mu\text{M}$ BAP'la destekli MS besi ortamında saptandı ve daha düşük oranlarda 3 farklı BAP oranı içeren (0.0055 , 0.011 ve $0.0275 \mu\text{M}$) kültür ortamları hazırlandı. Bu ortamlarda yetiştirilen bitkilerin sürgün sayısı ve sürgün uzunluklarına bakıldığında; $0.0275 \mu\text{M}$ BAP içeren ortamın en iyi gelişmeyi sağladığı saptandı. KARAKAŞ (2005), en iyi gelişmeyi $25 \mu\text{M}$ BAP içeren MS besi ortamında sağlamıştır.

Verilerin sınanması için bu tablodaki veriler DUNCAN testine tabii tutuldu. Buna göre 0.0055, 0.011 ve 0.0275 μM BAP içerdiğinde; sürgün sayısı ve uzunluğu BAP konsantrasyonunun artışı ile doğru orantılı olarak artmıştır.

Birinci alt kültürde MS besi ortamına 0.0275 μM BAP ile birlikte eklenen 0.29 μM GA₃, çimlendirilen tohumlardan elde edilen bitkiciklerde, nodlar arasının uzamasını ve sürgün sayısının artmasını sağladığı gözlemlendi.

En iyi gelişimin sağlandığı BAP oranlarında yetiştirilen bitkilerin total hiperisin içeriğine bakıldığında bu bitkilerin yeterli miktarda hiperisin içermediği saptandı. Doğadan toplanan *H. scabroides*'in topraküstü organlarında da yeterli miktarda hiperisin elde edilemedi.

Bu sonuca göre bu türün, hiperisinin etken madde olarak kullanıldığı tedavi yöntemlerinde kullanılamayacağı açıktır.

6.REFERANSLAR

- [1] National Centre For Complementary And Alternative Medicine (NCCAM),2001.St.John's wort (Fact Sheet), National Institutes of health, Bethesda.
- [2] **DÍAS, A.C.P., FRANCISCO, A., BARBERAN, T., FERRERIA, F., FERRERES, F., 1998.** Unusual flavanoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. Phytochemistry **48**, 1165-1168.
- [3] **CAMPBELL, M.H., DELFOSSE, E.S., 1984.** The biology of Australian weeds 13. *H. perforatum* L. J.Aust. Inst. Agr. Sci., **50**, 50-63.
- [4] **DAVIS, P.H., 1988.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- [5] **BAYTOP, T., 1984:** Türkiyede Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları, No:3255, İstanbul.
- [6] **KAKO, M.D., AL-SULTAN II SALEEM A.N., 1993.** Studies of sheep experimentally poisoned with *H. perforatum*, Veterinary and Human Toxicology, **35(4)**, 298-300.
- [7] **BAYTOP, T., 1999.** Therapy with Medicinal Plants in Turkey. Istanbul University press, Istanbul, pp. 66-67.
- [8] **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.
- [9] **NÖLDNER, M., SCHÖTZ, K., 2002.** Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimmingtest. Planta Medica , **68**, 577–580
- [10] **RODRIGUEZ-LANDA, J.F., CONTRERAS, C.M., 2003.** A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. Phytomedicine ,**10**,688–699.
- [11] **PAULKE,A.,ZSİLAVECZ-SCHUBERT, M., WURGLİCS, M., 2006.** Determination of St. John's wort flavonoid- metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. Journal of chromatography B, **832**,109-113.
- [12] **GREESON, J.M., SANFORD, B., MONTI, D.A., 2001.** St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. Psychopharmacology (Berl), **153 (4)**, 402–414.

- [13] **AGOSTINIS, P., VANTIEGHEM, A., MERLEVEDE, W., DEWITTE, P.A., 2002.** Hypericin in cancer treatment: more light on the way. International Journal Of Biochemistry and Cell Biology, 34 (3), 221–241.
- [14] **MAISENBACHER, P., KOVAR, K.A., 1992.** Analysis and stability of *Hypericum oleum*. Planta Medica, 58 (4), 351–354.
- [15] **MULLER, W.E., 2003.** Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. Pharmacological Research, 47 (2), 101–109.
- [16] **MEDINA, M.A., MARTÍNEZ-POVEDA, B., AMORES-SANCHEZ, M.I., QUESADA, A.R., 2006.** Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? Life Sciences, 79, 105–111
- [17] **BENNET, J.G., LEE, H.H., 1989.** Xanthones from Guttiferae. Phytochemistry, 28, 967–998
- [18] **KIRAKOSYAN, A., HAYASHI, H., INOUE, K., CHARCHOGLYAN, A., VARDAPETYAN, H., 2000.** Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. Phytochemistry, 53, 345–348
- [19] **ZOBAYED, S.M.A., MURCH, S.J., RUPASINGHE, H.P.V., SAXENA, P.K., 2004.** In vitro production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'), Plant Science, 166, 333–340.
- [20] **KIKUCHI, T., KADOTA, S., MATSUDA, S., TANAKA, K., NAMBA, T., 1985.** Studies on the Constituents of Medicinal and Related Plants in Sri Lanka. Isolation and Structure of New γ -Pyrone and Related Compounds from *Hypericum mysorense* Heyne., Chem. Pharm. Bul., 33(2), 557–564.
- [21] **DECOSTERD, L.A., HOFFMANN, E., KYBRUZ, R., BRAY, D., HOSTETTMANN, K., 1991:** A New Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum calycinum* with Antifungal and In-vitro Antimalarial Activity, Planta Med., 57, 548–551.
- [22] **ROCHA, L., MARSTON, A., KAPLAN, M.A., STOECKLI-EVANS, H., THULL, U., TESTA, B., HOSTETTMANN, K., 1994.** An Antifungal Gamma-pyrone and Xanthones with MAO Inhibitory Activity from *Hypericum brasiliense*, Phytochemistry, 36(6), 1381–1385.
- [23] **ROCHA, L., MARSTON, A., POTTERAT, O., KAPLAN, M.A., STOECKLI-EVANS, H., HOSTETTMANN, K., 1995.** Antibacterial phloroglucinols and Flavonoids from *Hypericum bresiliense*, Phytochemistry, 40(5), 1447–1452.

- [24] **KARTNIG, T., GOBEL, I., HEYDEL, B., 1996.** Production of Hypericin, Pseudohypericin and Flavonoids in Cell Cultures of Various Hypericum Species and Their Chemotypes, Planta Med., 62, 51-53.
- [25] **RATH, G., POTTERAT, O., MAVI, S., HOSTETTMANN, K., 1996.** Xanthones from Hypericum reoperanum, Phytochemistry, 43(2), 513-520.
- [26] **CONSTANTINE, G.H., KARCHESY, J., 1998:** Variations in Hypericin Concentration in Hypericum perforatum and Commerical Products, Pharmaceutical Biology, 36(5), 365-367.
- [27] **WU, Q.L., WANG, S.P., DU, L.J., YANG, J.S., XIAO, P.G., 1998-A.** Chromone Glycosides and Flavonoids from Hypericum japonicum, Phytochemistry, 49(5), 1417-1420
- [28] **WU, Q.L., WANG, S.P., DU, L.J., YANG, J.S., XIAO, P.G., 1998-B.**Xanthones from Hypericum japonicum and H. henryi, Phytochemistry, 49(5), 1395- 1402.
- [29] **ALECU, M., URSACIUC, C., HALALAU, F., COMAN, G., MERLEVEDE, W., WAELKENS, E., DE WITTE, P., 1998:** Photodynamic Treatment of Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma with Hypericin, Anticancer Research, 18, 4651-4654.
- [30] **DENKE, A., SCHEMPP, H., MANN, E., SCHNEIDRE, W., ELSTNER, E.F., 1999:** Biochemical Activities of Extracts from Hypericum perforatum L., Arzneimittelforschung Drug Research, 49(1),120-125.
- [31] **VEROTTA, L., APPENDINO, G., BELLORO, E., JAKUPOVIC, J., BOMBARDELLI,E., 1999.** Furohyperforin a Prenylated Phloroglucinol from St. Jhon's Wort, J. Natural products, 62, 770-772.
- [32] **UMEK, A., KREFT, S., KARTNIG, T., HEYDEL, B., 1999.** Quantitive PhytochemicalAnalyses of Six Hypericum Species Growing in Slovenia, PlantaMed.,65, 388-390.
- [33] **ISHIGURO, K., YAMAMOTO, R., OKU, H., 1999.** Patulosid A and B, Novel Xanthones Glycosides from Cell Suspension Cultures of Hypericum patulum, J. Natural Products, 62, 906-908.
- [34] **APAYDIN, Ş., ZEYBEK, U., İNCE, İ., ELGİN, G., KARAMENDERES, C., ÖZTÜRK,B., TUĞLULAR, I., 1999:** Hypericum triquetrifolium Turra. Extract Exhibits Anticiceptive Activity in the Mouse, J. Ethnopharmacology, 67, 307-312.
- [35] **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 Spectrmetry for Structure Elucidation of Constituents of Hypericum perforatum L., Anal. Chem., 71, 5235-5241.

- [36] HU, L.H., YIP, S.C., SIM, K.Y., 1999. Xanthenes from *Hypericum ascyron*, Phytochemistry, 52, 1371-1373.
- [37] SÖKMEN, A., JONES, B.M., ERTÜRK, M., 1999. Antimicrobial Activity Of Extracts from the Cell Cultures of Some Turkish Medicinal Plants, Phytotherapy Research, 13, 355-357.
- [38] HU, L.H., SIM, K.Y., 2000. Sampsoniones A-M a Unique Family of Caged Polyprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum sampsonii*, Tetrahedron, 56, 1379-1386.
- [39] VEROTTA, L., APPENDINO, G., JAKUPOVIC, J., BOMBARDELLI, E., 2000. Hyperforin Analogues from St. John's Wort, J. Natural Products, 63, 412-415.
- [40] SIRVENT, T., GIBSON, D.M., 2000. Rapid Isocratic HPLC Analysis of Hypericins, J. Liq. Chrom and Rel. Technol., 23(2), 251-259.
- [41] EVSTATIEVE, L., POPOVA, I., MASLENKOVA, L., SKERLEVE, M., 2000: Content of Hypericin in *Hypericum perforatum* L. from Bulgaria, Proceedings of the 2nd Balkan Botanical Congress Plants of the Balkan Peninsula into the Next Millennium, Vol. 1, İstanbul.
- [42] SOUTHWELL, A.I., BOURKE, C.A., 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L., Phytochemistry, 56, 437-441.
- [43] KITANOV, G.M., NEDIALKOV, P.T., 2001. Benzophenone O-glucosid, a Biogenic Precursor of 1,3,7-trioxygenated Xanthenes in *Hypericum annulatum*, Phytochemistry, 57, 1237-1243.
- [44] PLOSS, O., PETEREIT, F., NAHRESTEDT, A., 2001. Procyanids from the herb of *Hypericum perforatum*, Pharmazie, 56, 509-511.
- [45] JURGENLIMEK, G., NAHRESTEDT, A., 2001. Phenolic Compounds from *Hypericum perforatum*, Planta Med., 68, 88-91.
- [46] ÖZEN, H.Ç., BAŞHAN, M., 2001. The Composition of Fatty Acids in *Hypericum scabrum*, *H. scabroides* and *H. Amblysepalum*. Turk J Chem., 27, 723 - 725.
- [47] ÖZEN, H.Ç., TOKER, Z., KIZIL, G., 2004. The antimicrobial activity of essential oils *Hypericum scabrum*, *hypericum scabroides* and *hypericum triquetrifolium*. Phytother Res., 18(4), 339-41
- [48] PIOVAN, A., FILIPPINI, R., CANIOTA, R., BORSARINI, A., MALECÌ, L.B., CAPPELLETÌ, E.M., 2004. Detection of hypericins in the "red glands" of *Hypericum elodes* by ESI-MS/MS, Phytochemistry, 65, 411-414.

- [49] FENNER,R.,SORTİNO, M.,RATES,S.M.A., DALL'AGNOL,R., FERRAZ ,A., BERNARDİ,A.P.,ALBRİND.,NÖR,C.,POSER,G.V.,SCHAPOVAL,E.,ZACCHİNO,S., 2005. Antifungal activity of some Brazilian Hypericum species, Phytomedicine,12 , 236–240.
- [50] DULGER,B., and GONUZ ,A.,2005.Antibacterial activity of the endemic Hypericum kazdagensis, Fitoterapia,76, 237– 239.
- [51] KARAKAŞ,Ö.,2005. *İn vitro* şartlarda yetiştirilen Hypericum triquetrifolium turra.(Guttiferae)'nin total hiperisin içeriğinin incelenmesi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.15,18.
- [52] ÇIRAK,C., SAĞLAM,B., AYAN,A.K., KEVSEROĞLU, K.,2006. Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some Hypericum species from Turkey during the course of ontogenesis,Biochemical Systematics and Ecology,34,1-13
- [53] MEDİNA, M.A., POVEDA B., AMORES M. I., QUESADA, A. R.,2006. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound?, Life Sciences,79 , 105–111
- [54] MARTONFİ, P., REPEAK,M., ZANVİT,P., 2006. Secondary metabolites variation n Hypericum maculatum and its relatives, Biochemical Systematics and Ecology , 34, 56-59
- [55] TOKER, Z., KIZIL,G., ÖZEN,H.Ç.,KIZIL,M., ERTEKİN, S.,2006. Compositions and antimicrobial activities of the essential oils of two Hypericum species from Turkey,Fitoterapia, 77, 57– 60
- [56] ROBSON,N.K.B., 1975. Flora of Turkey and The East Aegean Islands.Vol:2, Edit,P.H. Davis,University Press, Edinburgh.

7. ÇİZELGE LİSTESİ

7.1. Tablo 1. Farklı BAP ortamlarına aktarılan tohumların çimlenme yüzdesi

7.2. Tablo 2. Farklı BAP ortamlarında yetiştirilen bitkilerin sürgün sayısı ve uzunluğu (cm)

8.RESİMLER

8.1.Resim 1. İlk Yaprakçıkların Oluşmuş Hali.

8.2. Resim 2. Besi Ortamına Aktarılmış Tohumların 4. Hafta Sonundaki Gelişim Şekli

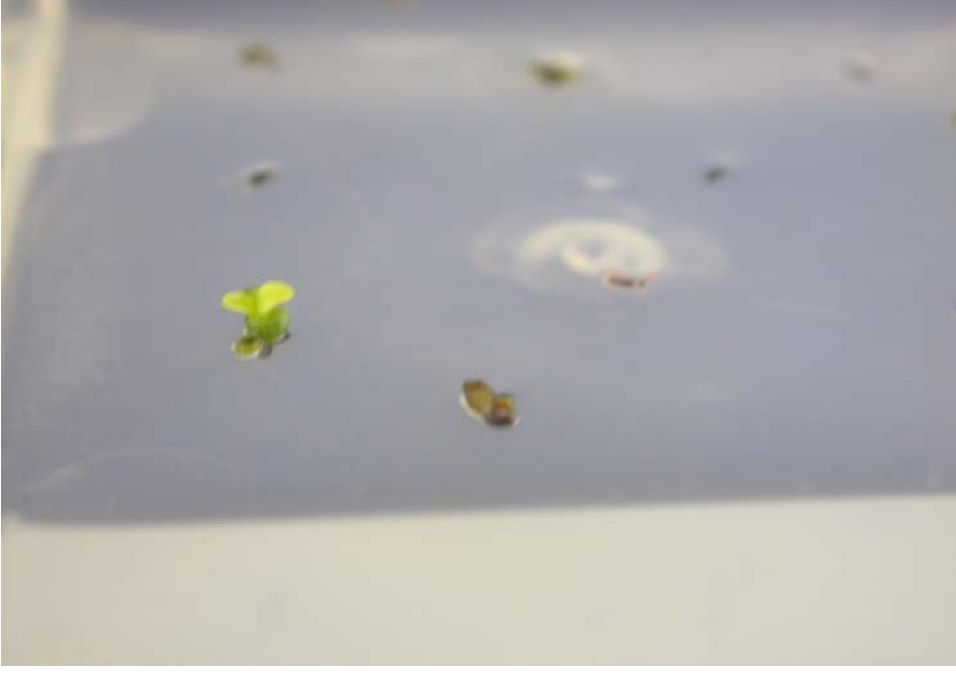
8.3.Resim 3. Alt kültür Serileri Sonucu Oluşturulan Sürgünlerin Genel Görünüşü.

8.4. Resim 4. Yüksek BAP Ortamlarında Kalluslaşan Bitkiler ve Üzerlerinde Gelişen Çok Sayıdaki Sürgünlerin Genel Görünüşü .

8.5. Resim 5. 0.0055 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. scabroides*'in Genel Görünüşü.

8.6. Resim 6. 0.011 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. scabroides*'in Genel Görünüşü.

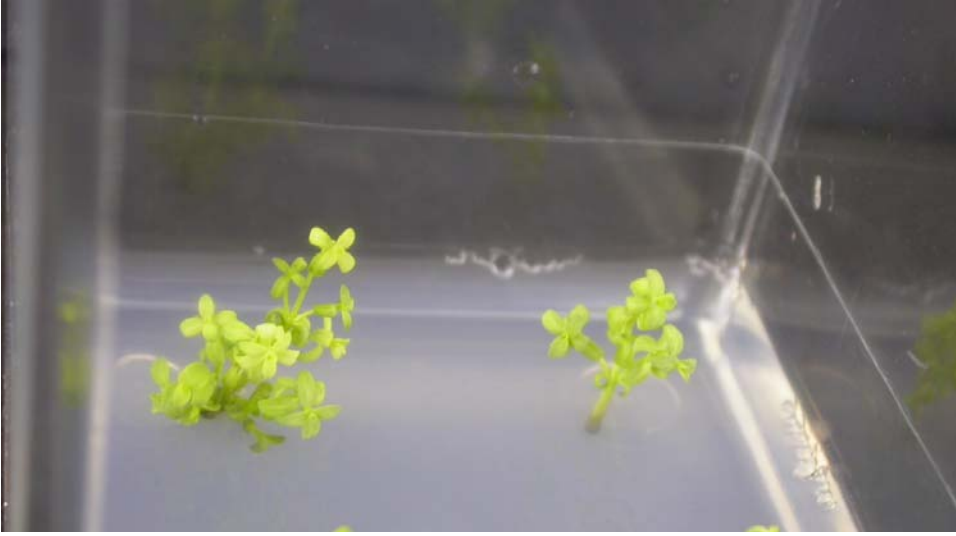
8.7.Resim 7. 0.0275 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H.scabroides*'in Genel Görünüşü.



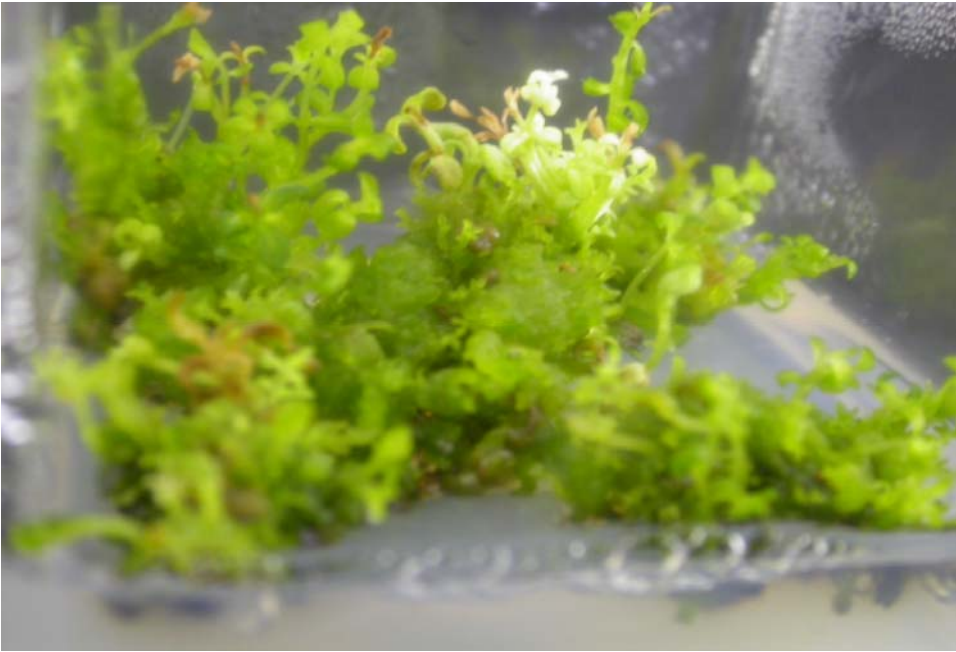
8.1 Resim 1. İlk Yaprakçıkların Oluşmuş Hali.



8.2. Resim 2. Besi Ortamına Aktarılmış Tohumların 4. Hafta Sonundaki Gelişim Şekli



8.3.Resim 3. Alt kültür Serileri Sonucu Oluşturulan Sürgünlerin Genel Görünüşü.



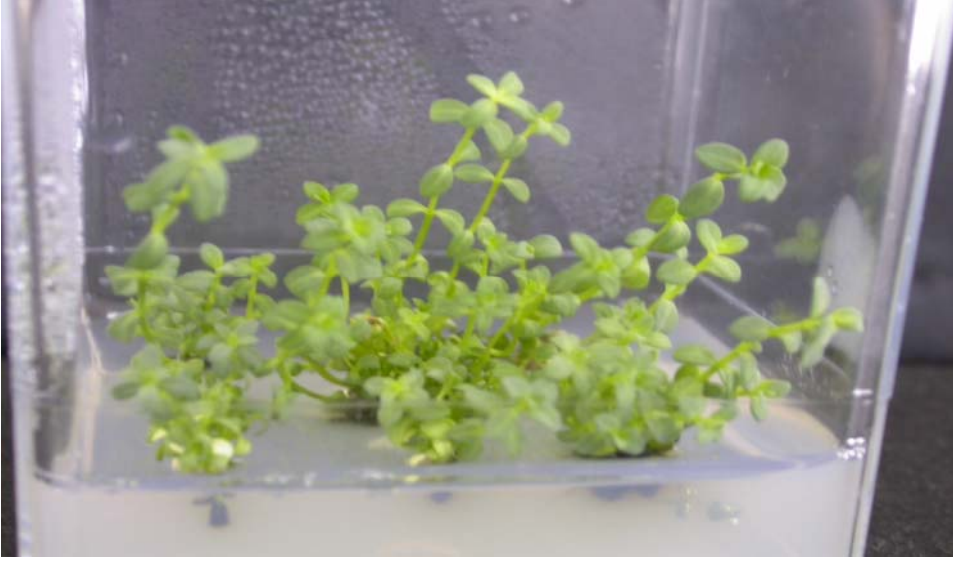
8.4. Resim 4. Yüksek BAP Ortamlarında Kalluslaşan Bitkiler ve Üzerlerinde Gelişen Çok Sayıdaki Sürgünlerin Genel Görünüşü .



8.5. Resim 5. 0.0055 μM BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. scabroides*'in Genel Görünüşü.



8.6. Resim 6. 0.011 μM BAP içeren Ortamda Yetişen *H. scabroides*'in Genel Görünüşü.



8.7. Resim 7. 0.0275 μM BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. scabroides*'in Genel Görünüşü.

9.ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Diyarbakır'ın Silvan ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Kayapınar İlköğretim okulu'nda ,liseyi Diyarbakır Yunus Emre Lisesi'nde tamamladım.

2003 yılında Dicle Üniversitesi Fen -Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum.

2004 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans yapmaya hak kazandım.