

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO ŞARTLARDA YETİŞTİRİLEN *Hypericum triquetrifolium*
TURRA. (GUTTIFERAE)' NİN TOTAL HİPERİSİN İÇERİĞİNİN
İNCELENMESİ

Özgür KARAKAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
EYLÜL -2005

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Özgür KARAKAŞ tarafından yapılan bu çalışma , jürimiz tarafından BİYOLOJİ
Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı

Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Ahmet ONAY

Üye : Yrd. Doç Dr. Zahir DÜZ



Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

01...11...2005

N. Pirinçcioğlu
Doç. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ



TEŞEKKÜR

Bitkilerin toplanmasında ve deneysel çalışmalarda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN'e, fotoğraf çekimleri ve biyoteknolojik çalışmalarda büyük yardımlarını gördüğüm değerli hocam Doç. Dr. Ahmet ONAY ve Dr. Çiğdem IŞIKALAN'a, ayrıca fizyolojik çalışmalar sırasında yardımlarını gördüğüm sayın hocam Zuhal TOKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bitkilerin teşhisini yapan sayın hocam Doç. Dr. Selçuk ERTEKİN ve spektrofotometrik analizlerde yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Mehmet AKÇAY'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
AMAÇ.....	iv
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
3. MATERYAL VE METOD.....	7
3.1. MATERYAL.....	7
3.1.1. <i>Hypericum triquetrifolium</i> 'un Genel Özellikleri ve Yayılışı.....	7
3.1.1.1. Bitkinin Toplanması.....	7
3.2. METOD.....	7
3.2.1. Biyoteknolojik Çalışmalar.....	7
3.2.1.1. Cam Malzemelerin Sterilizasyonu.....	7
3.2.1.2. Pens ve Bisturilerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	7
3.2.1.3. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	8
3.2.1.4. Röpikaj ve Kültür Odalarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	9
3.2.1.5. Kullanılan Materyalin Sterilizasyonu.....	10
3.2.1.6. Ekim İşlemleri.....	10
3.2.1.6.1. <i>Hypericum triquetrifolium</i> 'un Olgun Tohumlarından Mikroçoğaltma Çalışmaları.....	10
3.2.1.6.2. Tohum Kabuklarının Çatlatılmasının Çimlenmeye Etkisi.....	10
3.2.1.6.3. Farklı BAP Konsantrasyonlarının İn Vitro Şartlarda Çatlatılmış Tohumların Çimlenmesine Etkisi.....	11
3.2.1.6.4. İn Vitro Şartlarda Yetiştirilen Bitkilerin Alt Kültür Çalışmaları.....	11
3.2.1.6.5. Farklı BAP Oranlarının İn Vitro Şartlarda Elde Edilen Sürgünlerin Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	12
3.2.2. Fizyolojik Çalışmalar.....	12
3.2.2.1. Bitki Materyali.....	12
3.2.2.2. Bitki Materyallerini Kurutma Koşulları.....	12
3.2.2.3. Kullanılan Kimyasallar.....	13
3.2.2.4. Kullanılan Aletler.....	13

3.2.2.5. Materyallerin Analize Hazırlanması.....	13
3.2.2.6.Total Hiperisin Miktarının Belirlenmesi.....	14
4. BULGULAR.....	15
4.1. <i>H. triquetrifolium</i> 'un Tohumdan İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmaları.....	15
4.1.1. Olgun <i>H. triquetrifolium</i> 'un Tohumlarını Çimlendirme Çalışmaları.....	15
4.1.2.Tohum Kabuklarının Çatlatılmasının Çimlenmeye Etkisi.....	15
4.1.3. Tohum Çimlenmesi Üzerine Farklı BAP Oranlarının Etkisi.....	15
4.1.3.1. Alt Kültür Çalışmaları.....	16
4.2. Farklı BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkilerinin Total Hiperisin Miktarları.....	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	18
6. KAYNAKLAR.....	19
7. ÇİZELGE LİSTESİ.....	23
7.1. Tablo 1. Farklı BAP ortamlarına aktarılan tohumların çimlenme yüzdesi ve enfeksiyon oranı.....	23
7.2. Tablo 2. Farklı BAP ortamlarında yetiştirilen bitkilerin sürgün sayısı ve uzunluğu (cm).....	23
7.3. Tablo 3. Farklı ortamlarda yetiştirilen <i>Hypericum triquetrifolium</i> 'un total hiperisin miktarı.....	23
8. RESİM LİSTESİ.....	24
8.1. Resim 1. Çatlatılmış Tohumların Besi Ortamına Aktarılmış Hali.....	25
8.2. Resim 2. İlk Yaprakçıkların Oluşmuş Hali.....	25
8.3. Resim 3. Besi Ortamına Aktarılan Tohumların 4. Hafta Sonundaki Gelişim Şekli.....	26
8.4. Resim 4. Yüksek BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkinin Genel Görünüşü.....	26
8.5. Resim 5. Yüksek BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkinin Genel Görünüşü.....	27
8.6. Resim 6. 5 µM BAP İçeren Ortamda Yetişen <i>H. triquetrifolium</i> 'un Genel Görünüşü.....	27
8.7. Resim 7. 10 µM BAP İçeren Ortamda Yetişen <i>H. triquetrifolium</i> 'un Genel Görünüşü.....	28
8.8. Resim 8. 25 µM BAP İçeren Ortamda Yetişen <i>H. triquetrifolium</i> 'un Genel Görünüşü.....	28
9. ÖZGEÇMİŞ.....	29

AMAÇ

Bu çalışmada *Hypericum* türlerinden biri olan *Hypericum triquetrifolium* Turra.'un doku kültürü yöntemi ile yetiştirilip yapısında bulunan total hiperisin miktarının araştırılmasına yönelik çalışmalar amaçlanmıştır.

ÖZET

Bu çalışmada, *Hypericum triquetrifolium* Turra. (Guttiferae)'nin in vitro mikroçoğaltılması ve bunların total hiperisin içeriği araştırılmıştır.

Tohumlar hormonsuz, 9.8, 19.6, 39.2 ve 78.4 μ M BAP içeren ortamlarda kültüre alınmıştır.

En iyi çimlenme yüzdesi BAP ın bulunmadığı ve 19.6 μ M BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. 25 μ M BAP içeren ortamın proliferasyon için en iyi ortam olduğu saptanmıştır. Çalışmada in vitro çoğaltılan bitkilerin total hiperisin içerikleri de araştırılmıştır.

En yüksek total hiperisin içeriği 10 μ M BAP içeren besi ortamında yetişen bitkilerden elde edilmiştir. İn vitro çoğaltılan bitkilerin hiperisin içerikleri doğadan toplananlardan daha yüksek bulunmuştur.

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

SUMMARY

In this study, in vitro micropropagation and total hypericin content of *Hypericum triquetrifolium* Turra. (Guttiferae) were investigated. The seeds were cultured in the mediums contain BAP free, 9.8 , 19.6, 39.2 and 78.4 μM BAP.

The best germination percent were obtained BAP free and 19.6 μM BAP medium. For the proliferation, medium containing 25 μM BAP were the best.

Total hypericin contents of in vitro micropropagated plants were also investigated.

The highest total hypericin content were obtained in the plants that growth in the medium containing 10 μM BAP. Total hypericin contents of in vitro micropropagated were higher than collected from nature.

Keywords: *Hypericum triquetrifolium*, Hypericin, Micropropagation, Proliferation.

1.GİRİŞ

Bitkiler tarihin ilk çağlarından beri bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmışlardır. Her ne kadar sentetik ilaç sanayiinin gelişmesi bu bitkilerin kullanımını azaltmışsa da, sentetik ilaçların tehlikeli yan etkilerinin bulunması ve bitkisel ilaçların çok yönlü etkiye sahip olmaları, bu bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif bileşikler üzerindeki çalışmaların artmasına neden olmuştur. Hem doğadan toplanmasının zor olması, hem de türlerinin tehlikeye girebilecek olması bu bitkilerin kültür yoluyla çoğaltılmasını gerektirmiştir.

Bugün birçok gelişmiş ülkede klasik kültürün yanında doku kültürleri yoluyla da tıbbi bitki yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmaktadır. Bunlar arasında *Hypericum* türleri, yıllık 600 milyon dolarlık ticaret hacmi ve içerdikleri çok önemli kimyasal bileşikler nedeniyle kültürü en çok yapılan bitkiler arasında bulunmaktadır (Ernst 1994).

Çok eski zamanlardan beri yaygın olarak tedavide kullanılan *Hypericum* cinsinin adı Yunanca'da "hayalet, kötü ruh defeden" anlamındadır. Bu bitkinin şeytanı ve kötü düşünceleri kovduğu ve koruyucu gücünün bulunduğu inanılırdı. Ayrıca *Hypericum*, Hıristiyan azizlerinden biri olan T. John'la ilişkilendirilmiştir. *Hypericum*'un çiçeklenmeye başladığı 21-24 Haziran döneminde St. John'un doğduğuna, *Hypericum*'un yapraklarında kırmızı beneklerin belirginleştiği Ağustos döneminde ise St. John'un öldürüldüğüne bu nedenle de bitkinin kanadığına inanılırdı. " St. John's Wort" olarak adlandırılan bu bitki "St. John günü" adı verilen özel günlerde toplanmaktadır.

Hypericum cinsinin, Türkiye'de 77 ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde de 13 türü tespit edilmiştir. Türkiye'de kantaron, kantarum, koyun kıran ve bin bir delik otu adlarıyla bilinir (BAYTOP 1984).

Geleneksel tedavide; yapraklı, çiçekli ve meyvalı dalları ile kökleri kullanılmaktadır (KUMPER 1989; KAKO ve SALEEM 1993).

Çok yıllık otsu bitkiler sınıfından olan bu cinse ait taksonların yaprakları basit veya tam kenarlı çoğunlukla şeffaf noktalıdır. Çiçekler ersellik olup 5 çanak ve 5 taç yapraktan oluşur ve genellikle sarı renklidir ve üzerinde 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 (YALTIRIK ve EFE, 1989).

Günümüzde yaygın olarak mide rahatsızlıklarında (gastrit, ülser), iştah açıcı, sarılıkta, dıştan yaralarda iltihap kurutucu olarak, ayak mantarında, diş eti iltihabı için (gargara yaparak), balgam söktürücü, sinüzitte, barsak iltihabında, basurda, ateşli hastalıklarda ateş düşürücü ve kan yapıcı olarak dahilen basura ve kabızlığa karşı kullanılmaktadır (BAYTOP 1984).

Hypericum türlerinden antifungal (DECOSTERD ve ark., 1986), antibakteriyel (ISHIGURO ve ark., 1986), antiviral (JACOBSON ve ark., 2001) ve antikanser (JAYASURIYA ve ark., 1989) özellik gösteren hiperisin ve bunun türevleri ile flavonoid, floroglusinol ve ksanton gibi bileşikler izole edilmiştir. Ksantonlar, antiinflammatör, antihepatotoksik, antiviral, antimikrobiyal ve antitümöral gibi birkaç önemli farmakolojik özellik göstermektedir (BENNET ve LEE, 1989; ROCHA ve ark., 1994). Floroglusinol ve filisinik asit türevleri antibakteriyel, antifungal ve sitotoksik aktiviteler göstermektedir (JAYASURIYA ve ark., 1989 ve JAYASURIYA ve ark., 1991). Bunların yanısıra floroglusinol türevleri güçlü antitümör aktivite göstermektedir (ARISAWA ve ark., 1991). Hiperisin ve psödohiperisin gibi polisiklik kinonlar tümör ve virüsler üzerindeki güçlü fotodinamik etkilerinden dolayı bu bileşikler arasında önemli bir grubu teşkil etmektedir (VANDENBOGARDE ve ark., 1997; AGOSTINIS ve ark., 2002; ALI ve ark., 2002; MISKOVSKY, 2002).

Hiperisin ve psödohiperisin *Hypericum* türlerinde yaygın olarak bulunan ve çok sayıda hidroksil grubu taşıyan, halkalı yapıya sahip naftodiantronlardır (GIESE, 1980). Bu moleküller, genellikle yaprak ve petallerin kenarlarındaki koyu noktacıklı yapılarda bulunur (FORNASIERO ve ark., 1998).

Hiperisin ve psödohiperisin doğal olarak sentezlenen kırmızı renkli pigmentlerdir (ROTH, 1990; WEISS, 1991; BOMBARDELLI ve MORAZZONI, 1995). Hiperisin ve psödohiperisin miktarı, ekolojik faktörlere, hasat zamanına ve hasat edilen bitkinin işleniş biçimine bağlı olarak farklılık gösterir (SOUTHWELL ve CAMPBELL, 1991; BRANTNER ve ark., 1994; CELLAROVA ve ark., 1994).

Bu çalışmada; son yıllarda yaygın olarak kullanılan *Hypericum* cinsine ait *Hypericum triquetrifolium* türünün farklı BAP konsantrasyonlarında in vitro mikroçoğaltılması ve bu ortamlarda yetiştirilen bitkilerin hiperisin içerikleri incelenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

KIKUCHI ve ark., (1985), Srilanka'dan toplanan *Hypericum mysorense*'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.

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 spektroskopi 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.

ROCHA ve ark., (1994), *Hypericum brasilense*'nin kök ve gövdelerinin CH₂Cl₂ ile özütlenmesi sonucu yeni bir γ -pirone (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*'nin büyümesini inhibe ederek anti-fungal etkili olduğu, diğer üç ksantonun da farklı derecelerde monoamin oksidaz A ve B'yi inhibe ettiği görülmüştür.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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

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.

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

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.

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

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.

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

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.

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.

HU ve SIM, (2000), *Hypericum 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.

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.

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

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 5000ppm. kadar olduğunu saptamışlardır.

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

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.

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.

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.

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

ÖZEN ve ark. (2004), Türkiye'de yetişen iki *hypericum* türünün yağ asidi ve 3-hydroxy yağ asidi bileşimlerini araştırmışlar.

3.MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3. 1. 1. *Hypericum triquetrifolium*'un Genel Özellikleri ve Yayılışı

Gövde 15-55 cm, dik veya yatık, iki şeritsi, dallar genişçe yaygın genellikle piramit şeklinde sıralanmıştır. Yapraklar 3-20 mm olup, üç köşeli-mızraksı ya da nadiren dar yumurta şeklinde şeritsi dikdörtgenimsi, gövdeyi saracak şekilde dalgalı bazen orta büyüklükten küçüğe doğru yarı noktacıklıdır. Sepaller, dikdörtgenimsi, yumurtamsı-dikdörtgenimsi, yuvarlağımsı veya tepecikli, tüm veya dişsi, siyah noktacıksız. Petaller 5-7 mm, nadiren bir tane yüzeysel noktacıklı veya noktacıksız. Kapsül 3-5 mm, yumurtamsı. Çiçeklenme dönemi 5-9 aylar.

Türkiye'de yayılış gösterdiği bölgeler: Marmara, Ege, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleridir (ROBSON 1975).

3. 1. 2. Bitkinin Toplanması

Bu çalışmada materyal olarak kullanılan *Hypericum triquetrifolium* (Guttiferae) un vejetatif dönemdeki yaprak ve tohumları ağustos 2004'de Elazığ-Gezin, Hazar Gölü civarından toplanmıştır. Bu bitkiye ait herbaryum örnekleri, Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryum'unda (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'de Ve 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 (1962) tarafından önerilen temel besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanıldı. MS (Murashige ve Skoog) besi ortamında kullanılan stok çözeltilerin hazırlanması aşağıda açıklandığı gibidir.

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 cc'ye tamamlanır.

MS Mikro 1 Elementler Ana Çözeltisi

H_3BO_3	620 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860 mg
KI	83 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg
Distile su	1000 cc'ye tamamlanır.

MS Mikro 2 Elementler Ana Çözeltisi

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	25 mg
Distile su	100 cc'ye tamamlanır.

Kompleks Kelatör Ana Çözeltisi

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

Vitamin Karışımı Ana Çözeltisi

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

B1 Vitamini Ana Çözeltisi

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

BAP (6-Benzylaminopurin) Ana Çözeltisi

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

MS kültür besi ortamı aşağıdaki şekilde hazırlandı

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

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 cc).

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 klorür 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.triquetrefolium 'un olgun tohumlarının çimlenme sırasında enfekte olmasını önlemek için yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu.

Çalışmada kullanılan 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. Tohumlar steril kurutma kağıtları üzerinde pens ve bisturi yardımı ile izole edilerek MS besi ortamı içeren magenda GA-7 kültür kaplarında aktarıldı. Tohumların çimlenmesi ve gelişmesi için kullanılan MS besi ortamı 30g/L sakkaroz, 12 gL⁻¹ agar ile desteklendi. Agar ilavesinden önce, besi ortamının pH'sı KOH ile, 5.8 olacak şekilde ayarlandı ve 1 atmosfer basınçta 121 °C'de 25 dakika süre ile otoklavda steril edildi.

3. 2. 1.6. Ekim İşlemleri

3.2.1.6.1. *H. triquetrefolium*'un Olgun Tohumlarından Mikroçoğaltma Çalışmaları

H. triquetrefolium 'un mikroçoğaltma çalışmalarında materyal olarak olgun tohumlar kullanıldı. Tohumlar, musluk suyunda yıkandıktan sonra % 70'lik alkolde 30 sn çalkalanarak ön sterilizasyona tabi tutuldu. Materyalin sterilizasyonu, daha önce de bildirildiği gibi, % 5 NaOCI içerisinde 10 dakika süre ile bekletilerek yapıldı. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, steril distile su ile 5 kez 5'er dakika çalkalanarak NaOCI'den arındırıldı. Daha sonra tohumlar, steril kurutma kağıtları üzerinde pens yardımıyla izole edilerek, MS besi ortamı bulunan magenda 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 magenda 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. Farklı BAP Konsantrasyonlarının İn 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 4 Magenta GA-7 kültür kabı ve her bir kap için ortalama 6 tohum kullanıldı.

3.2.1.6.4. İn Vitro Şartlarda Yetiştirilen Bitkilerin Alt Kültür Çalışmaları

1. Alt Kültür

İn vitro şartlarda *H. triquetrifolium*'un olgun tohumlarından elde edilen sürgünlerin alt kültür çalışmaları yapıldı. Bu amaçla elde edilen sürgünler 19.6 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.

3.2.1.6.5. Farklı BAP Oranlarının İn 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 aşağıda gösterildiği gibi BAP'ın, 5 µM, 10µM, 25 µM'lık 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 250 mg olan miktarlar alındı.

1. Toz haline getirilen bitki materyalleri (250 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 cc'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 absorbanası 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 cc'lik ölçü balonlarına seyreltme amacıyla aktarıldı. Daha sonra bu çözeltinin absorbanası 592 nm'de UV-spektrofotometresinde ölçüldü.

4. BULGULAR

4.1. *H. triquetrifolium*'un Tohumundan İtibaren Mikroçoğaltma Çalışmaları

4.1.1. Olgun *H. triquetrifolium* Tohumlarını Çimlendirme Çalışmaları

Sterilizasyondan sonra doğrudan besiyerine alınan olgun tohumların 4. hafta sonunda hiç biri çimlenmedi.

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 4 gün sonra tohumların yarısının çimlendiği görüldü. Kültürün 10. gününde ilk yaprakçıkların oluştuğu gözlemlendi (**Resim 1,2**). 4. Haftanın sonunda yaprak ve gövde kısımlarının iyice belirginleştiği gözlemlendi (**Resim 3**).

4.1.3. Tohum Çimlenmesi Üzerine Farklı BAP Oranlarının Etkisi

Bu çalışmada da tohumların çimlendirilmesi için tohum kabukları çatlatıldıktan sonra aşağıda görüldüğü gibi kontrol grubu ile birlikte 4 farklı BAP (9.8 μM , 19.6 μM , 39.2 μM ve 78.4 μM) 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.

Ortamin içeriği (μM BAP)	Çimlenen Tohum (%)
Kontrol	69.2
9,8	21.7
19.6	39.1
39.2	31.8
78.4	36.3

Farklı BAP oranlarını kullanarak yaptığımız çalışmada çimlenme yüzdesi bakımından en iyi ortamın hormonsuz ortam olduğu tespit edildi. Morfolojik durumlarına bakıldığında 78.4 μM BAP'lı ortamda yaprak hacminin en fazla olduğu ve yaprakların kırmızı bir renk aldığı gözlemlendi. Çimlenen tohum sayısına bakıldığında kontrol grubundan sonra en yüksek çimlenme yüzdesi 19.6 μM BAP'lı ortamdan elde edildi. Morfolojik yapılarına bakıldığında; 19.6 μM BAP'lı ortamda gelişen bitkilerin yapraklarının normal renkte olduğu gözlemlendi (**Resim 3-6**).

4.1.3.1. Alt Kültür Çalışmaları

İn vitro çimlendirilen tohumlardan alınan sürgün uçlarını çoğaltmak ve kallus geliştirmek için BAP'ın 30, 60, 120 ve 240 μM 'lik oranları kullanıldı.

BAP'ın farklı oranları ile desteklenen MS besi ortamında yetiştirilen bitkiciklerde aşağıdaki morfolojik gözlemler yapıldı:

10. günde kallusumsu yapıların oluştuğu ve bunların üzerinde çok sayıda bitkiciğin geliştiği gözlemlendi.

17. günde bitkiciklerdeki gelişim çok hızlı idi ve kallusumsu yapılar üzerinde gelişen bitkiciklerin büyüüp internod kısımlarının belirginleştiği gözlemlendi.

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 internodları ve nodları belirginleşti. Ayrıca kalluslu yapılar üzerinde gelişen çok sayıda gövdeli bitkiciğin geliştiği gözlemlendi.

60, 120 ve 240 μM 'lik ortamlarda yetiştirilen bitkiciklerin yoğun bir kallus yapısı oluşturduğu (Resim 4,5) ancak 30 μM 'lik ortamda yok denecek kadar az miktarda kallus oluşturduğu tespit edildi.

Bir sonraki çalışmada BAP'ın 5, 10 ve 25 μM 'lik oranları kullanıldı ve ortamların hiç birinde kallusumsu yapının oluşmadığı ve doğal görünümlü bitkicikler 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)
5	25.41 \pm 7.6ab	2.87 \pm 0.60ab
10	26.82 \pm 8.9a	3.29 \pm 0.60b
25	36.7 \pm 10.8c	4.02 \pm 0.84 c

Verilerin güvenilirliği 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.

4.2. Farklı BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkilerin Total Hiperisin Miktarları

Farklı ortamlarda yetiştirilen bitkilerin hiperisin içerikleri Tablo 3'te verilmiştir. 25 μM 'dan daha yüksek BAP konsantrasyonlarında kallusumsu yapı oluştuğundan bunların hiperisin içerikleri saptanmamıştır.

Tablo 3. Farklı Ortamlarda Yetiştirilen *Hypericum triquetrifolium*'un Total Hiperisin İçeriği

Ortamın İçeriği (μM BAP)	Total Hiperisin Miktarı (%) (Ortalama \pm sd)
Doğadan toplanan	0.004 \pm 0.00028 a
5 μM	0.010 \pm 0.00058 ab
10 μM	0.013 \pm 0.00034 bc
25 μM	0.012 \pm 0.00054 c

Tablo 3'te görüldüğü gibi 10 μM BAP'lı ortamlarda yetiştirilen bitkilerin hiperisin miktarı diğer oranlara göre daha fazladır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

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

Araştırmamızda, tohum kabuklarının çatlatılmasının tohumların çimlenme yüzdesini arttırdığı saptandı.

Tohum çimlenmesine farklı BAP oranlarının etkisine bakıldığında; en yüksek çimlenme oranı kontrol grubunda (BAP içermeyen), hormon içeren kaplarda ise 19.6 µM BAP bulunan ortamda (% 39.1) saptanmıştır.

ZOBAYED ve ark. (2003), *Hypericum perforatum* için MS besi ortamında 5 µM thidiazuron (TDZ) ve 3.0 gL⁻¹ gellam gum kullanarak en yüksek çimlenme oranını elde etmişlerdir. *H. triquetrifolium* tohumlarının çimlenmesi için ise, hormonsuz MS besi ortamının en iyi sonucu verdiğini saptadık. En iyi morfolojik gelişim de yine bu ortamda gözlenmiştir.

İn vitro çimlendirilen tohumların çoğaltılması ve kallus oluşturmak için BAP'ın farklı konsantrasyonları kullanıldı. Bu çalışmada en iyi sonucun 30 µM BAP'la destekli MS besi ortamında saptandı ve bundan düşük oranlarda 3 farklı BAP oranı içeren (5, 10 ve 25 µM) kültür ortamları hazırlandı. Bu ortamlarda yetiştirilen bitkilerin sürgün sayısı ve sürgün uzunluklarına bakıldığında; 25 µM BAP içeren ortamın en iyi gelişmeyi sağladığı saptandı. Verilerin sınanması için bu tablodaki veriler ANOVA testine tabii tutuldu. Buna göre 5, 10 ve 25 µM BAP içerdiğinde; sürgün sayısı ve uzunluğu BAP konsantrasyonunun artışı ile doğru orantılı olarak artmıştır.

En iyi gelişimin sağlandığı BAP oranlarında yetiştirilen bitkilerin total hiperisin içeriğine bakıldığında; en yüksek hiperisin miktarının 10 µM BAP içeren ortamda yetiştirilen bitkilerde (% 0.013) olduğu gözlenmiştir. Bu oranlar doğadan topladığımız *H. triquetrifolium*'un total hiperisin içeriğinden daha yüksek bulunmuştur.

AYAN ve ark. (2004), Türkiye'de yetişen 12 *Hypericum* türünün hiperisin içeriklerinin % 0.003 ile % 0.303 arasında değiştiğini saptamışlardır. Çalışmalarımız sonucu elde edilen miktarlar bu değerlerin içinde bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

AGOSTINIS, P., VANTIËGHEM, A., MERLEVEDE, W., DE WITTE, P., 2002:

Hypericin in cancer treatment more light on the way, J. Biochem. Cell B., 34, 221-241.

ALİ, M.S., CHEE, K.S., YUEN, Y.G., OLIVO, M., 2002: Hypericin induced dead receptor-mediated apoptosis in photoactivated tumor cells, Int J. Mol. Med., 9, 601-616.

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.

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.

ARISAWA, M., FUJITA, A., MORITA, N., OKUYAMA, T., NISHINO, H., 1991: Inhibition of tumor-promoter-enhanced ³H-choline incorporation into cellular phospholipids by phloroglucinol derivatives from mallotus japonicus, J. Natl. Prod., 54, 1409-1412.

AYAN, A.K., ÇIRAK, C., KEVSEROĞLU, K., ve ÖZEN, T., 2004: Hypericin In Some *Hypericum* Species From Turkey. Asian Journal of Plant Sciences, 3, 200-202.

BAYTOP, T., 1984: Türkiyede Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları, No:3255, İstanbul.

BENNET, J.G., LEE, H. H., 1989: Xanthones from Guttiferae, Phytochemistry, 28, 967-998

CONSTANTINE, G.H., KARCHESY, J., 1998: Variations in Hypericin Concentration in *Hypericum perforatum* and Commerical Products, Pharmaceutical Biology, 36(5), 365-367.

DECOSTERD, L., STOECKLI-EVAN, H., MSONTHI, D.J., HOSTETTMANN, K., 1986: Anew antifungal chromene and a related dichromene from *Hypericum revolutum*, Planta Med., 55, 429.

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.

- 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.
- 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 Beninsula into the Next Millenium,
Vol. 1, İstanbul.
- 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., Anal. Chem., 71, 5235-5241.
- HU, L.H., YIP, S.C., SIM, K.Y., 1999.** Xanthones from *Hypericum ascyron*,
Phytochemistry, 52,1371-1373.
- 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.
- ISHIGURO, K., YAMAKI, M., TAKAGI, S., 1986:** Sarothralen A and B, new antibiotic
compounds from *Hypericum japonicum*, Planta Med. 52, 288-290.
- 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.
- JACOBSON, M.J., FEINMAN, L., LIEBES, L., OSTROW, N., KOSLOWSKI, V.,
TOBIA, A., CABANA, E.B., LEE, D., SPRITZLER, J., PRINCE, M.A., 2001:**
Pharmacokinetics, safety, and antiviral effects of hypericin, a derivative of St. John's
wort plant, in patients with chronic hepatitis C virus infections, Antimicrob. Agents
Chemother. 45, 517-524.
- JAYASURIYA, H., MCCHESENEY, J.D., SWASON, S.M., PEZZUTO, J.M., 1989.**
Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Rottlerin-type Compounds from *Hypericum
drumandii*, J. Natural Product, 52(2), 325-331.
- JAYASURIYA, H., BAKER, J.K., CLARK, A.M., MCCHESENEY, J.D., 1991-A.**
Synthesis and the Biological Evaluation of the Structural Units of Drummondin,
Pharmaceutic Research, 8(11), 1372-1376.
- JURGENLIMEK, G., NAHRESTED, A., 2001.** Phenolic Compounds from *Hypericum
perforatum*, Planta Med., 68, 88-91.

- KAKO, M.D., AL-SULTAN II SALEEM A.N., 1993.** Studies of sheep Experimentally poisoned with *Hypericum perforatum*, Veterinary and Human Toxicology, 35(4), 298-300.
- 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.
- 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 Coumponds from *Hypericum mysorens* Heyne., Chem. Pharm. Bul., 33(2), 557-564.
- KITANOV, G.M., NEDIALKOV, P.T., 2001.** Benzophenone O-glucosid, a Biogenik Precursor of 1,3,7-trioxygenat Xanthonen in *Hypericum annulatum*, Phytochemistry, 57, 1237-1243.
- KUMPER, H., 1989.** *Hypericum* poisoning in sheep, Tierarztl Prax., 17(3), 257-261.
- MISKOVSKY, P., 2002:** Hypericin-a new antiviral and antitumor photosensitizer mechanism of action and interaction with biological macromolecules, Curr. Drug. Targ. 3, 55-84.
- PLOSS, O., PETEREIT, F., NAHRESTEDT, A., 2001.** Procyanids from the herb of *Hypericum perforatum*, Pharmazie, 56, 509-511.
- RATH, G., POTTERAT, O., MAVI, S., HOSTETTMANN, K., 1996.** Xanthonen from *Hypericum reoperanum*, Phytochemistry, 43(2), 513-520.
- ROBSON, N. K. B., 1975.** Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Vol:2, Edit, P. H. Davis, University Press, Edinburgh.
- ROCHA, L., MARSTON, A., KAPLAN, M.A., STOECKLI-EVANS, H., THULL, U., TESTA, B., HOSTETTMANN, K., 1994.** An Antifungal Gamma-pyrone and Xanthonen with MAO Inhibitory Activity from *Hypericum brasiliense*, Phytochemistry, 36(6), 1381-1385.
- ROCHA, L., MARSTON, A., POTTERAT, O., KAPLAN, M.A., STOECKLI-EVANS, H., HOSTETTMANN, K., 1995.** Antibacterial phloroglucinols and Flavonoids from *Hypericum brasiliense*, Phytochemistry, 40(5), 1447-1452.
- SIRVENT, T., GIBSON, D.M., 2000.** Rapid Isocratic HPLC Analysis of Hypericins, J. Liq. Chrom and Rel. Technol., 23(2), 251-259.
- SOUTHWEELL, A.I., BOURKE, C.A., 2001.** Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L., Phytochemistry, 56, 437-441.

- 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.
- UMEK, A., KREFT, S., KARTNIG, T., HEYDEL, B., 1999.** Quantitive Phytochemical Analyses of Six *Hypericum* Species Growing in Slovenia, Planta Med. **65**, 388-390.
- VANDEBOGARDE, L.A., CUVEELE, F.J., PROOT, P., HIMPENS, E.B., MERLEVEDE, J.W., DE VITTE, A.P., 1997:** Differantiel Cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin, J. Photochem. Photobiol. B, **38**, 136-142.
- VEROTTA, L., APPENDINO, G., JAKUPOVIC, J., BOMBARDELLI, E., 2000.** Hyperforin Analogues from St. John's Wort, J. Natural Products, **63**, 412-415.
- 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.
- 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.
- 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.
- YALTIRIK, F., EFE, A., 1989.** Otsu Bitkiler Sistematiği. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- ZOBAYED, S.M.A., MURCH, S.J., RUPASINGHE, H.P.V., SAXENA, P.K., 2004:** In vitro production and chemical charecterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv ' New stem' ., Plant Science, **166**, 333-340.

7. ÇİZELGE LİSTESİ

7.1. Tablo 1. Farklı BAP ortamlarına aktarılan tohumların çimlenme yüzdesi ve enfeksiyon oranı

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

7.3. Tablo 3. Farklı ortamlarda yetiştirilen *Hypericum triquetrifolium*'un total hiperisin miktarı

8. RESİMLER

8.1.Resim 1. Çatlatılmış Tohumların Besi Ortamına Aktarılmış Hali

8.2.Resim 2. İlk Yaprakçıkların Oluşmuş Hali

8.3.Resim 3. Besi Ortamına Aktarılan Tohumların 4. Hafta Sonundaki Gelişim Şekli

8.4.Resim 4. Yüksek BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkinin Genel Görünüşü

8.5.Resim 5. Yüksek BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkinin Genel Görünüşü

8.6.Resim 6. 5 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. triquetrifolium*'un Genel Görünüşü.

8.7.Resim 7. 10 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. triquetrifolium*'un Genel Görünüşü.

8.8.Resim 8. 25 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. triquetrifolium*'un Genel Görünüşü.



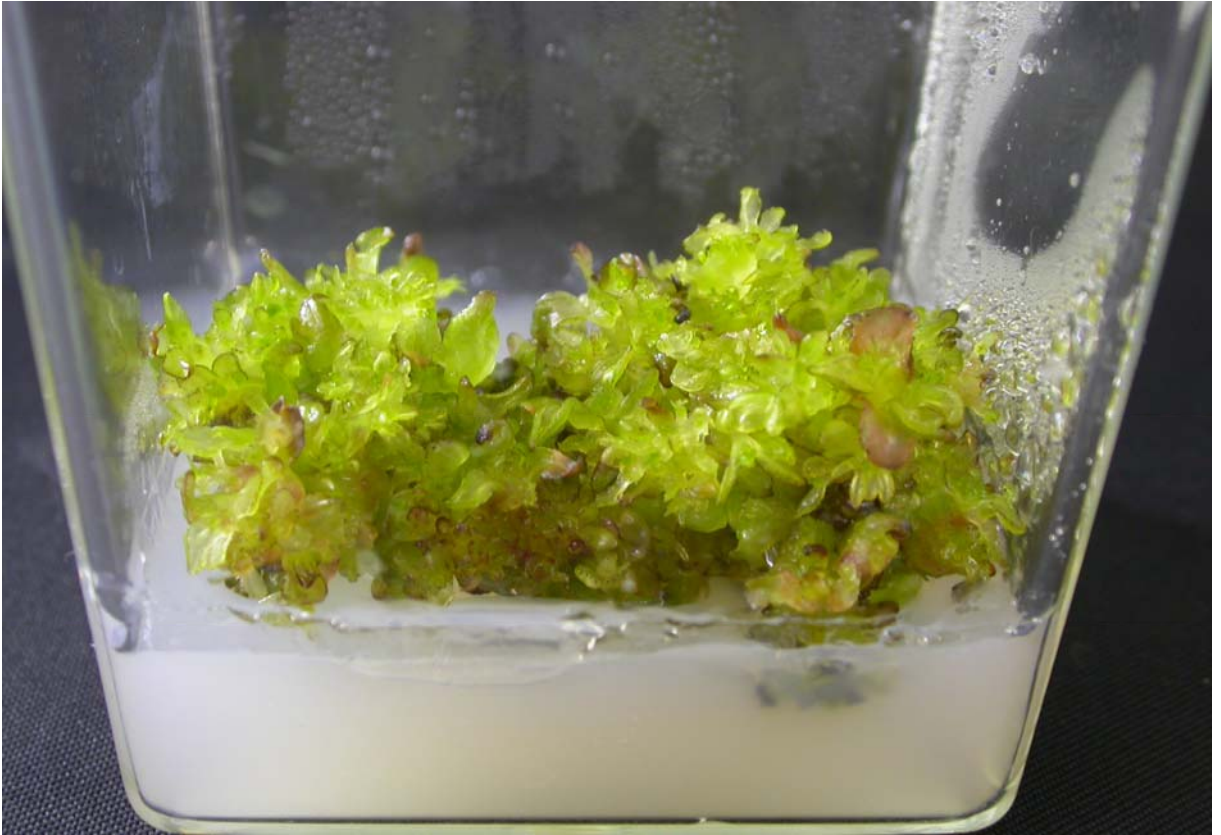
Resim 1. Çatlatılmış Tohumların Besi Ortamına Aktarılmış Hali



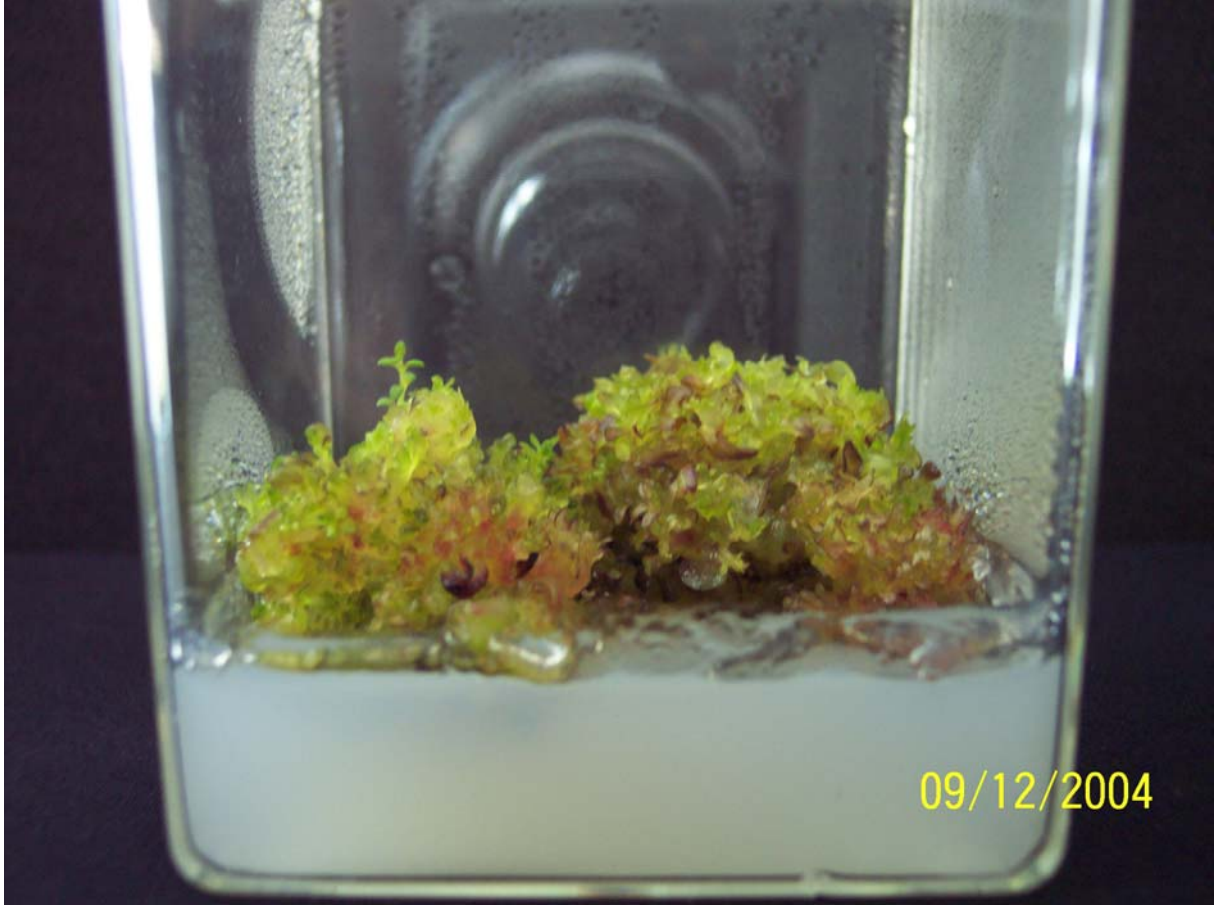
Resim 2. İlk Yaprakçıkların Oluşmuş Hali



Resim 3. Besi Ortamına Aktarılan Tohumların 4. Hafta Sonundaki Gelişim Şekli.



Resim 4. Yüksek BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkinin Genel Görünüşü



Resim 5. Yüksek BAP Ortamlarında Yetiştirilen Bitkinin Genel Görünüşü



Resim 6. 5 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. triquetrifolium*'un Genel Görünüşü.



Resim 7. 10 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. triquetrifolium*'un Genel Görünüşü.



Resim 8. 25 μ M BAP İçeren Ortamda Yetişen *H. triquetrifolium*'un Genel Görünüşü.

9.ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Diyarbakır'a bağlı Alçık Köyünde doğdum. İlk okulu merkeze bağlı Alçık Köyü'nde okudum. Ortaokulu Melik Ahmet Lisesinde, liseyi Diyarbakır Ziya GÖKALP lisesinde okudum. 2003 yılında Dicle Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum.

2003 yılında Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans yapmaya hak kazandım.