



**DIŞ KOŞUL VE *In vitro* KOŞULLARDA
YETİŞEN SARI KANTARON (*Hypericum
perforatum* L.) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL
İÇERİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Didem TAŞTEKİN

Yüksek Lisans

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR
ROYANDAZAGH
2020**

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DIŞ KOŞUL VE *In vitro* KOŞULLARDA YETİŞEN SARI KANTARON
BİTKİSİNİN (*Hypericum perforatum* L.) FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Didem TAŞTEKİN

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

TEKİRDAĞ-2020

Her hakkı saklıdır.



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Didem TAŞTEKİN

İMZA

Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH danışmanlığında, Didem TAŞTEKİN tarafından hazırlanan “Dış Koşul ve *In vitro* Koşullarda Yetişen Sarı Kantaron Bitkisinin (*Hypericum perforatum* L.) Fitokimyasal İçeriğinin Karşılaştırılması ” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından 19.06.2020 tarihinde Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Cüneyt AKI

İmza:

Üye: Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç.Dr. Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DIŞ KOŞUL VE *In vitro* KOŞULLARDA YETİŞEN SARI KANTARON BİTKİSİNİN
(*Hypericum perforatum* L.) FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Didem TAŞTEKİN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.), yüksek fitokimyasal içeriği ile farmasötik alanda kullanılan önemli tıbbi aromatik bir bitkidir. Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında; araziden toplanan sarı kantaron bitkisinin yaprak ve nod kısımları kullanılarak; *in vitro* koşullarda öncelikli olarak uygun sterilizasyon yöntemi belirlenmiştir. Daha sonra steril eksplantlardan sürgün ve kallus rejenerasyonlarının gerçekleştirilmesi, devamında ise *in vitro* koşullarda elde edilen bitkisel materyaller ile dış koşullarda yetişen bitkilerin fitokimyasal içeriğinin karşılaştırılması çalışılmıştır. Araştırmada her iki eksplant türü için de iki farklı sterilizasyon yöntemi denenmiştir. En yüksek sterilizasyon başarısı, ön yıkama yapıldıktan sonra %70'lik (v/v) etil alkolde 1 dk, ardından %35'lik (v/v) çamaşır suyu çözeltilisinde 3 dk bekletilmesi ile elde edilmiştir. Bu şekilde her iki eksplant türü içinde %100 sterilizasyon başarısı elde edilmiştir. *In vitro* sürgün kültürlerinin kurulmasında ise farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren 6 farklı ortam kullanılmıştır. En iyi sürgün gelişim yüzdesi ve ortalama sürgün sayısı 0,5 mg/L BAP ve 2,5 mg/L NAA ile desteklenmiş olan MS besin ortamından elde edilmiştir. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi %100 ve ortalama sürgün sayısı 5,53 olarak bulunmuştur. Nod eksplantı için ise %80 sürgün gelişimi görülürken ortalama sürgün sayısı 4,33 olarak tespit edilmiştir. Kallus kültürlerinin kurulması için dört farklı ortam kullanılmıştır. En yüksek yaş ve kuru ağırlık 1,0 mg/L NAA ile desteklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Köklendirme çalışmasının verilerine göre en iyi besin ortamı 0,2 mg/L IBA ile desteklenmiş ortamdır. Çalışmanın devamında dış koşul bitkileri ile *in vitro* sürgünlerin ve gelişen kallusların fitokimyasal içerikleri uçucu bileşenler açısından karşılaştırılmıştır. Dış koşullarda yetişen bitkilerde en çok cis-Osimen (%13,62) bileşeni tespit edilmiştir. *In vitro* sürgünlerde en çok 1-[3-methyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)oxiranyl]-Ethanone (%22,63) tespit edilmiş olup, terpen ve terpen türevlerinden ise en çok Nerolidol Z ve E (%19,96) bileşenin bulunduğu görülmüştür. Kalluslarda ise en fazla bulunan bileşenin 1,3,5-Cycloheptatriene (%12,14) olduğu görülmüş, Farnesane (%7,94) en çok bulunan terpen bileşeni olarak tespit edilmiştir. Uçucu bileşenler açısından en değerli grup olan terpen türevi bileşikler açısından değerlendirildiğinde dış koşul bitkilerinde %40,84, *in vitro* sürgünler için %35,36 ve kalluslarda %29,39 değerleri elde edilmiştir. Yapılan bu çalışma literatüre katkı sağlayarak çalışmanın devamı olan hücre süspansiyon kültürlerinin kurulmasına ışık tutacaktır. *In vitro* çalışmaların optimize edilmesi ile özel bir etken madde üzerinde bundan sonra yapılması planlanan araştırmalara kaynak oluşturacaktır.

Anahtar kelimeler: Sarı kantaron, fitokimyasal, *in vitro*, uçucu bileşen, terpen, kallus

2020, 99 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

COMPARISON OF THE PHYTOCHEMICAL CONTENT OF ST. JOHN'S WORT
(*Hypericum perforatum* L.) GROWN IN EXTERNAL AND *In vitro* CONDITIONS

Didem TAŞTEKİN

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) is an important medicinal aromatic plant used in the pharmaceutical field with its high phytochemical content. Within the scope of this study; *In vitro* conditions, using the leaf and node parts of the St. John's wort plant, firstly, determining the appropriate sterilization method, performing shoot and callus regenerations from sterile explants, and then comparing the phytochemical content of the plants grown in *in vitro* conditions with the plants under external conditions. In the study, two different sterilization methods were tried in both explant types. The highest sterilization success was achieved by standing in 70 % (v/v) ethyl alcohol for 1 minute after prewash, and then for 3 minutes in 35 % (v/v) bleach solution. 100 % sterilization success was achieved in both types of explants. Six different media containing different concentrations of BAP and NAA were used to establish *in vitro* shoot cultures. The best shoot growth percentage and number of shoots per explant were obtained in MS nutrient media supplemented with 0,5 mg / L BAP and 2,5 mg / L NAA. 100% shoot development for leaf explant and the number of shoots per explant was found to be 5,53. For the node explant, 80% shoot growth was observed, while the number of shoots per explant was 4,33. Four different medias were used to establish callus cultures. The highest wet and dry weight was obtained in an media where MS nutrient medium supplemented with 1,0 mg / L NAA was used. In the continuation of the study, the phytochemical contents of external conditions plants and *in vitro* shoots and developing calluses were compared in terms of volatile components. The most found component was cis-Osimen (13,62%) in plants grown in external conditions. *In vitro shoots*, 1-[3-methyl-3- (4-methyl-3-pentenyl) oxiranyl] - Ethanone (22,63%) has been detected as most found component and Nerolidol Z and E (% 19,96) component was found as terpene. The most found component in callus was 1,3,5-Cycloheptatriene (12,14%), while Farnesane (7,94%) was the most common terpene component. When evaluated in terms of terpene derivative compounds, which are the most valuable group for volatile components, values of 40,84% in external plants, 35,36% for *in vitro* shoots and 29,39% in calluses were obtained. This study will contribute to the literature and shed light on the establishment of cell suspension cultures that are the continuation of the study. It will be a source of research planned on a special active ingredient by optimizing *in vitro* studies.

Key words: St. John's Wort, phytochemical, *in vitro*, volatile compound, terpene, callus

2020, 99 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Hypericum</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	3
1.2. Sarı Kantaron (<i>Hypericum perforatum</i> L.).....	4
1.3. Sekonder Metabolitler ve Fitokimyasallar.....	6
1.3.1. Sekonder Metabolit ve Fitokimyasalların Tanımı, Sınıflandırılması	7
1.4. Sarı Kantaronun Fitokimyası	10
1.4.1. Naftodiantronlar	13
1.4.2. Floroglusinoller.....	14
1.5. Kullanım Alanları	21
1.6. Bitki Hücre ve Doku Kültürü	23
1.6.1. Bitki Doku Kültürünün Tanımı, Mikroçoğaltım ve Kallus Kültürleri	23
1.6.2. Bitki Doku Kültürünün Sağladığı Avantajlar	26
2. KAYNAK ÖZETLERİ	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. <i>In vitro</i> Çalışmada Kullanılan Materyaller	35
3.2. Fitokimyasal Analizler için Kullanılan Materyaller	35
3.3. Bitkisel Materyallerin Eldesi	35
3.4. Yöntem	36
3.4.1. <i>In vitro</i> Çalışmada Alet, Ekipman ve Çalışma Ortamının Sterilizasyonu.....	36
3.4.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu.....	37
3.4.3. Eksplantların Sterilizasyonu	37
3.4.4. Sterilizasyon Denemelerinin Kurulması.....	39
3.4.5. <i>In vitro</i> Sürgün ve Kallus Kültürleri.....	39
3.4.6. <i>In vitro</i> Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	40
3.4.7. <i>In vitro</i> Sürgünlerde ve Kalluslarda Gelişimin Belirlenmesi	41

3.4.8. Elde Edilen <i>In vitro</i> Sürgün ve Kallusların Analiz için Ekstraksiyona Hazırlanması	41
3.4.9. Analiz Çözeltilerinin Hazırlanması	41
3.4.10. İstatistiksel Değerlendirme	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	43
4.1. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu	43
4.2. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların <i>In vitro</i> Sürgün Kültürleri	46
4.3. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların Kallus Kültürleri	52
4.4. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantlardan <i>In vitro</i> Sürgünlerin Köklendirilmesi	56
4.5. GC-MS Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	59
4.5.1. Dış Koşullarda Yetişen Sarı Kantaron Bitkisinin Analiz Sonuçları.....	59
4.5.2. <i>In vitro</i> Sürgünlerin Analiz Sonuçları.....	62
4.5.3. Kallus Kültürlerinin Analiz Sonuçları.....	65
4.5.4. Dış Koşullarda Yetişen Bitki ile <i>In vitro</i> Koşullarda Yetişen Bitkicikler ve Gelişen Kallusların İçeriklerinin Karşılaştırılması.....	70
5. TARTIŞMA.....	75
5.1. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu	75
5.2. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların <i>In vitro</i> Sürgün ve Kallus Kültürleri.....	76
5.3. Dış Koşullarda Yetişen Bitki ile <i>In vitro</i> Koşullarda Yetişen Bitkicikler ve Gelişen Kallusların İçeriklerinin Karşılaştırılması	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	90

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1. Sekonder metabolit sınıflarına ait olan bileşiklere örnekler.....	9
Çizelge 1.2. Sarı kantaronun içerdiği bileşikler ve miktarları.....	12
Çizelge 1.3. Sarı kantaronun bünyesinde bulundurduğu bileşik grupları ve toplam miktarları	13
Çizelge 1.4. <i>Hypericum perforatum</i> bitkisinin Temmuz, Eylül ve Kasım aylarında uçucu yağ bileşenleri	18
Çizelge 1.5. Bitki doku kültürünün avantaj ve dezavantajları.....	26
Çizelge 3.1. Yapılan sterilizasyon denemeleri	38
Çizelge 3.2. <i>In vitro</i> sürgün elde etmek kültürleri için kullanılan besin ortamı kompozisyonları	40
Çizelge 3.3. Kallus elde etmek kültürleri için kullanılan besin ortamı kompozisyonları	40
Çizelge 3.4. Köklendirme besin ortamı kompozisyonları	41
Çizelge 4.1. Farklı sterilizasyon uygulamalarının kontaminasyon üzerine etkisi	44
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren besin ortamlarındaki yaprak eksplantı için sürgün gelişim verileri ve varyans analizi sonucu	51
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren besin ortamlarındaki nod eksplantı için sürgün gelişim verileri ve varyans analizi sonucu	52
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda NAA içeren besin ortamlarındaki bitkilerden kallus gelişim verileri ve varyans analizi sonucu.....	56
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda IBA içeren besin ortamlarındaki bitkilerden kök gelişim verileri.....	57
Çizelge 4.6. Dış koşuldan toplanan bitkilerin yapısında bulunan uçucu bileşenler	60
Çizelge 4.7. Dış koşuldan toplanan bitkinin terpen ve terpen türevi bileşikleri.....	61
Çizelge 4.8. Dış koşuldan toplanan bitkinin düz zincirli hidrokarbonlar (alkan ve alkenler) ve türevi bileşikleri.....	62
Çizelge 4.9. <i>In vitro</i> sürgünlerin yapısında bulunan uçucu bileşenler	63
Çizelge 4.10. <i>In vitro</i> sürgünlerin terpen ve terpen türevi bileşikleri.....	65
Çizelge 4.11. Kallusların yapısında bulunan uçucu bileşenler	66
Çizelge 4.12. Kallusların terpen ve terpen türevi bileşikleri	68
Çizelge 4.13. Kalluslarda düz zincirli hidrokarbonlar (alkan ve alkenler) ve türevi bileşikler....	68
Çizelge 4.14. Üç farklı bitkisel materyalde içerik karşılaştırması.....	73
Çizelge 4.15. Üç farklı bitkisel materyalde içeriklerin terpenler açısından karşılaştırılması...	74

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1. Sarı kantaronun görünümü a.Bitkinin genel görünüşü b.Çiçeklerin üstten görünüşü c. Bitkinin yapraklarının görüntüsü	6
Şekil 1.2. a.Hiperisin bileşiğinin molekül yapısı b. Pseudohiperisin bileşiğinin molekül yapısı	14
Şekil 1.3. Hiperforin bileşiğinin molekül yapısı	15
Şekil 1.4. Kuarsetin bileşiğinin molekül yapısı	16
Şekil 1.5. Gümüş (1), Sarıgazi (2), Bafra (3), Osmancık (4), Hacıköy (5), Merzifon (6), Karadağ (7), Havza (8), Samsun (9), and Yeniköy (10) bölgelerinden toplanan <i>H.perforatum</i> bitkisinin içerdiği temel terpenik bileşiklerin	20
Şekil 1.6. a.Beta-farnesene molekülü b. Limonene molekülü	21
Şekil 1.7. Sarı kantaron bitkisinden zeytinyağı içerisinde bekletilerek elde edilen yağ	22
Şekil 1.8. Mikroçoğaltımın aşamaları	25
Şekil 2.1. (A) <i>In vitro</i> bitkicik (B) ve (C) IAA ve IBA ile desteklenmiş MS/B5 besin ortamı içerisinde kallus ve kök formasyonu (D) Kök kültürünün başlangıç aşaması (E) 7 haftalık kültür sonucunda elde edilen biyokütle (F) Dondurularak kurutulmuş kök biyokütle pelletleri	30
Şekil 2.2. a. 500 L biyoreaktör içerisindeki kültür b. 500 L horizontal biyoreaktör içerisinde biyokütle görünümü c. Hasat edilen ve kurutulan adventif kökler.....	31
Şekil 3.1. <i>In vitro</i> çalışma için kullanılan bitkisel materyal	36
Şekil 3.2. Sterilizasyon için hazırlanan bitkisel materyal.....	38
Şekil 3.3. a.Ön yıkama yapılan bitkisel materyaller b. Sterilizasyon için laminar akışlı kabinin hazırlanması.....	38
Şekil 3.4. Etil alkol (%70'lik) ile sterilizasyon aşaması.....	39
Şekil 3.5. Örneklerin ekstraksiyona hazırlanması a. Dış koşullardan toplanarak kurutulmuş ve öğütülmüş sarı kantaron b. Ekstraksiyon için hazırlanan kalluslar c. Ekstraksiyon için hazırlanan <i>in vitro</i> sürgünler.....	42
Şekil 3.6. a. Tartılan bitkisel materyal b. Metanolik sodyum hidroksit eklenmiş <i>in vitro</i> ve dış koşullardan alınan materyaller	41
Şekil 4.1. Sterilizasyon denemelerinden elde edilen başarı yüzdeleri.....	45
Şekil 4.2. Sterilizasyon denemelerinden elde edilen kontaminasyon yüzdeleri.....	45
Şekil 4.3. 1 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi	46
Şekil 4.4. 2 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi	47
Şekil 4.5. 3 numaralı ortamda gelişen sürgünler	48

Şekil 4.6. 3 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Ortalama sürgün uzunluğu düşük olan yaprak eksplantları b. Ortalama sürgün uzunluğu yüksek olan yaprak eksplantları	48
Şekil 4.7. 4 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi	49
Şekil 4.8. 5 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi	49
Şekil 4.9. 6 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi	50
Şekil 4.10. 1 numaralı ortamda gelişen kalluslar.....	53
Şekil 4.11. 2 numaralı ortamda gelişen kalluslar a. Yeşil renkli ve kısmen kırılğan kallus yapısı b. Koyu yeşil-kahverengi sert kallus yapısı	54
Şekil 4.12. 3 numaralı ortamda gelişen kallus.....	55
Şekil 4.13. 4 numaralı ortamda gelişen kallus.....	55
Şekil 4.14. Köklendirme ortamına transfer edilen ve kök gelişimi olan <i>in vitro</i> sürgünler	57
Şekil 4.15. 2 numaralı köklendirme ortamında bulunan eksplantlar a. Kök gelişimi bulunmayan eksplant b. Eksplantın ortalama uzunluğu	56
Şekil 4.16. 1 numaralı köklendirme ortamında bulunan eksplantlar a. Kök gelişimi gerçekleşen eksplant b. Eksplantın ortalama uzunluğu	58
Şekil 4.17. 1 numaralı köklendirme ortamında bulunan eksplantlar a. Kök gelişimi gerçekleşen eksplant b. Gelişen köklerde ortalama uzunluk.....	59
Şekil 4.18. Dış koşullardan yetişen bitkilerde yapılan analiz sonucunda elde edilen GC-MS kromatogramı	60
Şekil 4.19. <i>In vitro</i> sürgünler ile yapılan analiz sonucunda elde edilen GC-MS kromatogramı	62
Şekil 4.20. Kalluslar ile yapılan analiz sonucunda elde edilen GC-MS kromatogramı	66
Şekil 4.21. Dış koşullarda yetişen bitkilerde bulunan terpen ve türevi bileşenler.....	70
Şekil 4.22. <i>In vitro</i> sürgünlerde bulunan terpen ve terpen türevleri	71
Şekil 4.23. Kalluslarda terpen ve tepen türevleri.....	72
Şekil 4.24. Üç farklı bitkisel materyalde içerik karşılaştırması.....	73
Şekil 4.25. Üç farklı bitkisel materyalde içeriklerin terpenler açısından karşılaştırılması.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

BAP: Benzil amino pürin

IAA: İndol-3-asetik asit

IBA: İndol-3-bütirik asit

KIN: Kinetin

NAA: Naftalen asetik asit

2,4-D: 2,4- Diklorofenoksi asetik asit

L: Litre

mL: mililitre

g :gram

mg: miligram

g/L: gram/ Litre

mg/L: miligram/ Litre

MS: Murashige and Skoog

%: yüzde

dk: dakika

μ M: mikromolar

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi

HPLC: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

DAD: Diode Array Dedector

GC/MS:Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi

RP: Ters Faz

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında büyük desteğini gördüğüm ve çalışmalarımın yürütülmesi sırasında bilgi ve tecrübeleri ile çalışmalarına katkıda bulunan ve yönlendiren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH'a; araştırmalarım ve uygulamalarım sırasında bilgisi, tecrübesi ve cana yakınlığı ile her konuda bana yardımcı olan Araş. Gör. Elif Ceren PEHLİVAN'a ve yüksek lisans öğrencisi Şerifcan İNANÇLI'ya; tezimi yazmam sırasında yüksek lisans ve doktora bilgileri ile bana destek olan iş arkadaşım Sinem DERELİ'ye; uygulamalarım sırasında bana yardım eden tüm Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölüm'ü araştırmacılarına; çalışma kapsamında gerçekleştirilen GC-MS analizlerinin yapılmasına olanak sağlayan NABİLTEM'e ve araştırmacılarına teşekkürü borç bilirim. Ayrıca her zaman her konuda bana destek olan ve en zor zamanlarımda hep yanımda olan annem Filiz TAŞTEKİN'e, babam Tefvik TAŞTEKİN'e ve akademik yönü ile her türlü problemime çözüm olan ablam Dilek TAŞTEKİN'e sonsuz teşekkürler.

Haziran, 2020

Didem TAŞTEKİN
Biyomühendis

1. GİRİŞ

H.perforatum L. yaklaşık 30 ila 90 cm aralığında büyüyebilen çok yıllık bir bitkidir (Hışıl, Şahin ve Omay, 2005). Yaprakları 2-4 cm uzunluğunda olup ana sap üzerinde yer almaktadır. Çanak yapraklar ise 4-6 mm uzunluğundadır. Çanak yapraklar üzerinde yer yer siyah salgı bezecikleri bulunmaktadır. Meyvesi ise 1-1.3 mm uzunluğunda tohumlar içeren üç odacıklı kapsül şeklindedir (Asgarpanah, 2012). Odunsu bir yapıya sahip, tüysüz çok yıllık bir bitkidir. Haziran ayından Eylül'e kadar çiçek açmaktadır. Mezofitik alanlarda kendiliğinden yetişmekle birlikte deniz seviyesinden 2500 m'ye kadar bu bitkiyi görmek mümkündür (Altan, Damlar, Aras ve Alpaslan, 2015). Dünya genelinde sıcaklık bakımından ne çok sıcak ne de çok soğuk olmayan havanın değişken olduğu iklim kuşaklarında yetişmektedir. Tropikal iklimden biraz daha serin olan dağlık tropikal bölgelerde de yayılım göstermektedir (Asgarpanah, 2012). Kayalık, taşlı yerlerde, yol kenarlarında, çimenli nehir kenarlarında bulunmaktadır. Yayılış gösterdiği yerlerin temel özelliği kışının nemli yazlarının kurak olmasıdır. Dünyada Batı Avrupa, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika ve Asya' da yayılış göstermektedir. Ülkemizde de Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu, Orta ve Doğu Anadolu, Karadeniz ve Marmara bölgesinde yetiştiği görülmüştür (Asgarpanah, 2012; Altan, Damlar, Aras ve Alpaslan, 2015).

Bitkisel ilaç olarak yaygın şekilde kullanılmakta olup yaklaşık olarak 2000 yıldan beri insanlar tarafından çeşitli hastalıkların iyileştiricisi olarak kabul edilmektedir. Bitkinin bilinen en büyük etkisi antidepresan olmasıdır. Ancak antimikrobiyal etkisi ile yara iyileştirilmesi içinde son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu alanla ilgili olarak son yıllarda çok sayıda araştırma yapılmıştır (Altan vd., 2015).

Hypericum cinsi bitkiler özellikle de *H. perforatum* L. bünyesinde aktif bileşikler bulundurduğu çok uzun yıllardır bilinmesine rağmen bu cinsin içerisinde yer alan pek çok türün biyoaktif yapısı tam olarak keşfedilememiştir (Napoli vd., 2018). Bu cinse ait bitkiler sekonder metabolit açısından zengindir ve sahip oldukları metabolitler biyolojik açıdan önemli aktiviteler göstermektedir.

H. perforatum temelde 3 ana grup bileşik içermektedir. Temel bileşenleri olarak kabul edilen naftodiantronlar, floroglusinoller, ve geniş aralıkta bulunan flavonoidler (Alali, Tahawa, Gharaibeh, 2009). Ayrıca sahip olduğu tanen ve uçucu yağ özelliği de yaygın olarak bilinmektedir (Asgarpanah 2012).

H. perforatum farmakolojik açıdan yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünyada antidepresan tedavisinde kullanılan en etkili bitkilerdendir. Antiviral, antimikrobiyal ve yara iyileştirici etkisi nedeniyle de halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Alali ve ark. 2009). Bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ve ülkemizde halk arasında “kantaron yağı” olarak bilinen yağı da çok eski çağlardan bu yana kullanılmaktadır (Özcan, 2015).

Batı ülkelerinin birçoğunda önemli bir tıbbi bitki olarak tanımlanan bu bitkiye ihracat ve ithalat konusunda çok önem verilmektedir. Floramızda yaygın bulunan sarı kantaron hem iç tüketimde kullanılmakta hem de ihraç edilmektedir. Tıbbi ve ekonomik açıdan önemli olan bu bitki floramızda yaygın olarak bulunmasına rağmen tarla koşullarında üretilmemektedir. Tarla koşullarında üretimi yapılmak istendiğinde de Türkiye’de geliştirilmiş bir çeşit bulunmamaktadır (Ekren, Sönmez ve Bayram, 2010). *H. perforatum* dünyada oldukça fazla tüketilmektedir. Tüketilen bu hammaddenin büyük bir bölümü bitkinin kültürü yapılarak sağlanırken, belli bir kısmı da değişik ülkelerin florasından toplanmaktadır. Ancak hem üretimle elde edilen ve hem de floradan toplanan ham materyalin belli kalite kriterlerine sahip olması istenmektedir. Almanya’da yıllık tüketilen drog miktarının 600 ton olduğu bildirilmektedir (Bayram, Arabacı ve Çakmak, 2002). Bitkiden hazırlanan farklı formlardaki antidepresif farmakolojik ürünlerin yıllık satış değerinin Avrupa pazarlarında 100 milyon doları, ABD’de ise 500 milyon doları aştığı; dünya genelinde ise 1 milyar dolara yaklaştığı; *Hypericum* ürünlerinin standart antidepresan ilaçların yerine ikame olarak depresyon tedavisinin maliyetini önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmektedir (Solomon, Adams ve Graves, 2013).

Tıbbi bitkiler klinik açıdan önemli pek çok doğal ürünün temel kaynağı olarak kabul edilmekte ve özellikle bünyelerinde buldukları sekonder metabolitlerle endüstriyel olarak önemli kaynaklardır. İlaç sektöründe kullanılan hammaddelerin büyük bir kısmı uzun ve karmaşık basamaklardan oluşan kimyasal sentez yoluyla elde edilmektedir. Bu nedenle maliyeti yüksek işlemlerdir. Aynı zamanda son yıllarda dikkat edilen karbon ayak izi kavramına göre çevresel açıdan zararlı oldukları raporlanmaktadır. Araştırmacılar karşılaşılan bu sorunları çözmek için doğal kaynakların kullanıldığı yöntemler üzerine eğilmeye başlamıştır.

H.perforatum L. bitkisi bünyesinde bulundurduğu bileşikler ile medikal açıdan önemli bir bitkidir. Yukarıda belirtilen sebepler göz önünde bulundurularak sahip olduğu sekonder metabolit içeriğini arttırmak ve kullanmak adına biyoteknolojik çalışmalarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Yapılan biyoteknolojik çalışmaların pek çoğu içerdiği metabolitleri kullanmak adına yapılmaktadır. Bu amaçla da en çok bitki doku ve hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda farklı bitki kısımları kullanılarak öncelikli olarak sterilizasyon denemeleri yapılmış ve en uygun sterilizasyon yöntemi seçilmiştir. Devamında *in vitro* sürgün ve kallus kültürleri kurulmuştur. Elde edilen *in vitro* sürgünlerden kullanılarak köklendirme çalışması yapılmıştır. *In vitro* materyaller ile dış koşul bitkilerinin fitokimyasal bileşenler olan uçucu bileşenler açısından içerik karşılaştırması GC-MS analizleri ile yapılmıştır. *H. perforatum* L. türü ile yapılan bu çalışmada, *in vitro* protokollerin geliştirilmesi, devamında dış koşuldan toplanan bitkiler ile karşılaştırmalı fitokimyasal analizlerin yapılması ile büyük ölçekli üretimlerde bitki doku kültürünün kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma ile bugüne kadar gerçekleştirilmiş çalışmalara katkı sağlanmış, ileriki dönemlerde de gerçekleştirilecek olan diğer çalışmalara ışık tutması hedeflenmiştir.

1.1. *Hypericum* Türlerinin Genel Özellikleri

Hypericum, *Clusiaceae* familyasına ait bir cins olup yaklaşık 450 çalı ve ot formuna sahiptir. Dünyanın pek çok yerinde geleneksel tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu cinsin tüm üyeleri “ Saint John’ wort” olarak bilinmektedir. Aynı zamanda “Rose of Sharon” ve “Tutsan” olarakta isimlendirilmektedir (Alali vd., 2009).

Hypericum ve St. John wort isimlerinin kökenleriyle ilgili bir takım açıklamalar mevcuttur. *Hypericum* isminin Yunanca da yer alan hyper (yüksek) ve eikon (görüntü)’dan geldiği ifade edilmektedir. St. John’s wort olması ise çiçek tomurcuklarının ilk kez St. John gününde (24 Şubat) belirmesinden kaynaklanmaktadır (Barnes, Anderson ve Philipson, 2001).

Dünyada yaklaşık 350-400 türü, Türkiye’de ise bu familyaya ait 70 farklı tür tespit edilmiştir. En iyi yetiştirme gösterdiği toprak yapısı ise hafif asidik-nötr topraklardır.

Hypericum türlerinin genel özellikleri:

- Sıklıkla siyah veya kırmızı glandular salgıları olan basit yarı saydam yapraklar,
- 5 merouslu yeşil çanak yaprakları ve açık sarı petalleri, stamenleri 3-5 demet şeklinde, ovaryumu 3-5 adet ince uzun şekilde,
- İçerisinde pek çok silindirik tohumlar içeren bir adet kapsüler meyvedir.

1.2. Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.)

H.perforatum L. yaklaşık 30 ila 90 cm aralığında büyüeyebilen çok yıllık bir bitkidir (Hışıl ve ark. 2005).Yaprakları 2-4 cm uzunluğunda olup ana sap üzerinde yer almaktadır. Çanak yapraklar ise 4-6 mm uzunluğundadır. Çanak yapraklar üzerinde yer yer siyah salgı bezecikleri bulunmaktadır. Meyvesi ise 1-1.3 mm uzunluğunda tohumlar içeren üç odacıklı kapsül şeklindedir (Asgarpanah, 2012).

Sistematığıne bakılacak olursa:

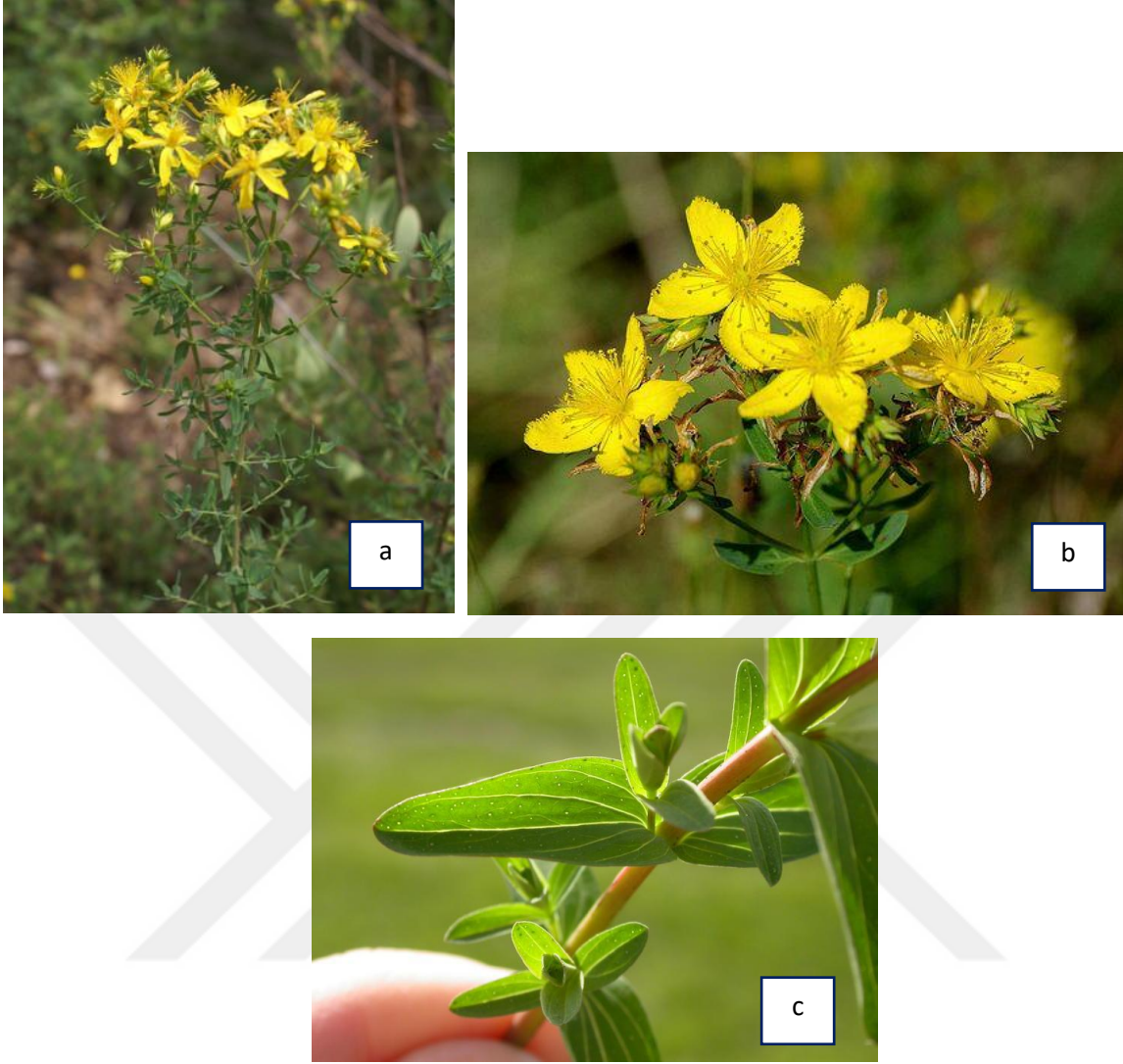
- Bölüm: *Spermatophyta*
- Alt bölüm: *Angiospermae*
- Sınıf: *Dicotyledoneae*
- Alt sınıf: *Magnolipsida*
- Takım: *Theales*
- Familya: *Cluciaceae* (*Hypericaceae*, *Guttiferae*)
- Cins: *Hypericum*
- Tür: *Hypericum perforatum* L.(Kantaron otu, Binbirdelik otu) (Yücel 2006).

Odunsu bir yapıya sahip, tüysüz çok yıllık bir bitkidir. Haziran'dan Eylül'e kadar çiçek açmaktadır. Mezofitik alanlarda kendiliğinden yetişmekle birlikte deniz seviyesinden 2500 m'ye kadar bu bitkiyi görmek mümkündür (Altan vd., 2015). Dünya genelinde sıcaklık bakımından ne çok sıcak ne de çok soğuk olmayan havanın değişken olduğu iklim kuşaklarında yetişmektedir. Tropikal iklimden biraz daha serin olan dağlık tropikal bölgelerde de yayılım göstermektedir (Asgarpanah, 2012).

Kayalık, taşlı yerlerde, yol kenarlarında, çimenli nehir kenarlarında bulunmaktadır. Yayılış gösterdiği yerlerin temel özelliği kışının nemli yazlarının kurak olmasıdır. Dünyada Batı Avrupa, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika ve Asya' da yayılış göstermektedir. Ülkemizde de Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu, Orta ve Doğu Anadolu, Karadeniz ve Marmara bölgesinde yetiştiği görülmüştür (Asgarpanah 2012, Altan vd., 2015).

Günümüzde en çok kullanılan şekli ise çiçek üst kısımlarının yağ içerisinde bekletilmesi ile elde edilen ekstraktın yara ve yanıklarda kullanımınıdır (Franchi, Nencini, Collavoli ve Massarelli, 2011).

Bu tür ve bağılı olduğu familyadaki diğer tüm türlerin farmasötik alanda kullanımında bazı kısıtlamalar söz konusudur. İçerdikleri aktif maddeler zamana karşı stabil değildir ve ışıktaki bozulmaktadır (Franchi vd, .2011).



Şekil 1.1. Sarı kantaronun görünümü a.Bitkinin genel görünüşü b.Çiçeklerin üstten görünüşü c. Bitkinin yapraklarının görüntüsü

1.3. Sekonder Metabolitler ve Fitokimyasallar

Son yıllarda gıda endüstrisi hızlı bir gelişme kaydetmiştir. Literatüre giren bazı kavramlar klasik yaklaşımların ve tartışmaların yön değiştirmesine neden olmuştur. Antioksidan ve fitokimyasal kavramları sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Tıp dünyasında uzun yıllardır yapılan araştırmalar diyetlerde yer alan sebze, meyve ve baklagillerin pek çok hastalığın önlenmesine katkı sağladığını göstermiştir. Bitkilerin bu faydalarının antioksidan adı verilen maddelerden kaynaklandığı keşfedilmiş olup mikro düzeydeki yaklaşımlarda da fitokimyasallar olarak ifade edilen pek çok bileşen üzerinde durulmaya başlanmıştır (Dündar, 2001).

Besin olmayan, ancak besinler gibi yararları ve görevleri olan tıbbi açıdan yararlı, fonksiyonel, özel amaçlı besinlerin yapısında bulunan bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşiklere fitokimyasallar denir (Evcimen ve Aslan, 2015). Diğer bir tanımı ise bitkilerin ikincil metabolik faaliyetleri yani sekonder metabolizmaları sırasında oluşarak depolanan, sadece besin olarak kullanıldığında insan sağlığına faydalı etkilerde bulunan biyoaktif bileşiklere fitokimyasallar denir (Uzunhan, 2014). Phyto kelimesi Yunanca bitki demektir. Fitokimyasalları kısaca bitki bileşenleri, kimyasalları olarak tanımlayabiliriz. Terapötik amaçlarla kullandığımız bu bileşenler bitkilerin yapraklarında, köklerinde rizomlarında, gövdelerinde, meyve ve tohumlarında yer almaktadır (Doughari, 2012).

1.3.1. Sekonder Metabolit ve Fitokimyasalların Tanımı, Sınıflandırılması

Tüm yaşam formlarında bulunan birincil metabolizmadan başka, yaşam faaliyetlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan başka bir metabolizma da mevcuttur. Bütün bu reaksiyonlar sekonder metabolizma olarak adlandırılırken, ürünleri de sekonder ürünler olarak adlandırılır (Oluk, 2006). Bu kavram ilk defa primer metabolitlerin zıt kavramlısı olarak ifade edilmiştir (Kossel, 1891). Sekonder metabolitler bitkiler tarafından üretilen ancak fotosentez yoluyla içerisinde bulunmayan, fizyolojik bir zorunluluk oluşturmeyen maddeler şeklinde tanımlanmaktadır (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015).

Sekonder ürünler, sekonder metabolitler olarak adlandırılırlar. Bitkilerin yaşamsal olayları üzerinde primer metabolitler kadar etkili olmayan, ancak bitkideki savunma sisteminin en önemli parçasını oluşturan bileşiklerdir (Demirci, Özdamar ve Baydar, 2015).

Sekonder metabolitler için farklı isimlendirmelerde bulunmaktadır. Stres yoluyla oluşturulmuş olan sekonder metabolitlere “fitoaleksin” denilmektedir. Stres metabolitleri olarak bilinir ve bitki tarafından üretilebilmesi için ortamda mutlaka bir stres faktörü bulundurulmalıdır. Fitoaleksinlerin dışında morfolojik farklılaşmaya bağlı olarak üretilen sekonder metabolitlerde mevcuttur (Oluk, 2006).

Bitkilerin sekonder metabolizma faaliyetleri sırasında ortaya çıkarak depolanan, sadece besin olarak tüketildikleri zaman insan sağlığı için yararlı etkilerde bulunan biyoaktif bileşiklere “fitokimyasallar” denmektedir (Uzunhan, 2014). Bitki doku kültürleri, 30.000’den fazla kimyasal bağ içeren çok değerli fitokimyasalları sentezleme potansiyeline sahiptir. Bitki doku kültürleri tarafından sentezlenen fitokimyasal miktarı, mikroorganizmalar tarafından

sentezlenen fitokimyasal miktarının yaklaşık 4 katıdır (Zhong, 2001). Fitokimyasallar, doğal olarak tarımsal yöntemlerle de elde edilebilirler. Ancak, tarımsal üretim, pek çok bitki için mevsimsel olduğu gibi, coğrafi konuma, iklim ve büyüme koşullarına da bağlıdır (Gueven and Knorr, 2011).

Primer metabolitler, canlılarda hayati öneme sahip olan bileşiklerdir. Büyüme, metabolizma ve üreme gibi fonksiyonlar içerisinde kilit rol oynamaktadır. Sentezleri hemen hemen her canlıda aynıdır. Sekonder metabolitler, büyüme ve gelişmede temel role sahip olmasa da eksiklik durumunda bitkinin zarar görmesine neden olurlar. Çoğu durumda bitkilerde düşük molekül ağırlığında bulunurlar (Topcu ve Çölgeçen, 2015). Bitkilerde temel görevleri ise şu şekildedir:

- Bitkiyi patojen saldırılarına karşı korur. Böylece aynı ortamda bulunan bitkilere karşı rekabet gücü artar.
- Tozlaşma sırasında faydalı organizmaları çekerek tozlaşmaya katkı sağlar.
- Bitkiyi abiyotik stres faktörlerine karşı korur (Oskay ve Oskay, 2009).

Sekonder metabolitler ve fitokimyasalları genel olarak üç grup altında sınıflandırılmaktadır. Farklı kimyasal yapılar gösteren bu bileşikler: fenolikler, terpenler-steroidler ve alkaloitlerdir (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Bitki sekonder metabolitlerinin sınıflandırılması biyosentetik yollarına göre gerçekleşmektedir (Bourgaud, Gravot, Milesi ve Gontier, 2001).

Fenolikler, bitkilerin tamamında bulunan ve pigmentlerden oluşan geniş bir gruptur. Fenolikler içerisinde lignin gibi hücrede yapısal görevi olan bileşiklerde bulunmaktadır. Bitki savunmasında, tozlaşmada ve tohum oluşmasında görev aldıkları tesbit edilmiştir. Kumarinler, stilbenler, isoflavonoidler ve taninler bitki savunmasında önemli bir yere sahip sekonder metabolitlerdir. Fenoliklerde kendi içerisinde flavonoidler ve stilbenler olarak ayrılmaktadır. Flavonoidler, pek çok çiçek ve meyvenin renginin oluşmasında görev alırken aynı zamanda bitkiyi UV ışığına karşı koruma görevi de vardır. Yaralanma ve besin yetersizliği durumunda bitkilerde sentezlenirler. Stilbenler ise daha çok bitki savunmasında görev alırlar (Topcu ve Çölgeçen, 2015).

Terpenler, bitkisel aromaların oluşmasında görevli sekonder metabolitlerdir. Gıda ve parfümeri endüstrisinde kullanılan esansiyel yağların temel bileşeni oldukları söylenebilir. Bitki de, glandular trikomal, salgılama kaviteleri ve glandular epidermis gibi özelleşmiş

yapılarda üretilmektedir. Steroller, bitkilerde fitosteroller olarak ifade edilir. Bitki hücre membranlarının yapısına katılan önemli bir bileşendir. Brassinosteroidler olarak adlandırılan türleri; iletim farklılaşmasını, kök gelişimini ve senesensi baskılayıcı doğal bitki büyüme düzenleyiciler olarak belirtilmiştir (Topcu ve Çölgeçen, 2015).

Alkaloidler, uzun yıllar boyunca insanlar tarafından çok farklı amaçlarla kullanılmıştır. En çok kullanıldıkları alan ağrı kesici olarak kullanılmalarıdır. Alkoloitlerin bitkilerdeki temel görevi herbivor, sinek ve mikroorganizmalara karşı savunma oluşturmaktır. Bazı doku hasarlarına cevap olarak üretilmektedir (Topcu ve Çölgeçen, 2015).

Çizelge 1.1. Sekonder metabolit sınıflarına ait olan bileşiklere örnekler (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015)

Metabolit Çeşidi	Örnek
Terpenler	
Monoterpen	Mentol
Seskiterpen	Limonen
Diterpen	Taksol
Triterpen	Digitanin
Tetraterpen	Karoten
Politerpen	Dolikol
Fenoller	
Ligninler	Lignin
Tanenler	Gallik asit
Flavonoidler	Antosiyanin
Kumarinler	Furanokumarinler
Alkaloid	
Alkoloid	Nikotin

1.4. Sarı Kantaronun Fitokimyası

Hypericum cinsi bitkiler özellikle de *H. perforatum* büyensinde bulundurduğu aktif bileşikler ile Avrupa farmakopesinde çok eski zamanlarda raporlanmıştır. Ancak bu cinsin içerisinde yer alan pek çok türün biyoaktif yapısı tam olarak keşfedilememiştir (Napoli vd., 2018). Bu cinsine ait olan bitkiler sekonder metabolit açısından zengin bitkilerdir. Sahip oldukları metabolitlerde biyolojik açıdan önemli aktiviteler göstermektedir.

H. perforatum temelde 3 ana grup bileşiklerini içermektedir. Temel bileşenleri olarak kabul edilen naftodiantronlar, floroqlusinoller, ve geniş aralıkta bulunan flavonoidler (Alali vd., 2009). Ayrıca sahip olduğu tanen ve uçucu yağ özelliği de yaygın olarak bilinmektedir (Asgarpanah, 2012).

Yapılan bir çalışmada 20 adet metabolit tanımlanmış ve miktarları hesaplanmıştır. Bu tanımlanan metabolitlerin üç ana bileşik sınıfında yer aldığı raporlanmıştır (Napoli vd., 2018). Bu bileşikler:

- Naftodiantronlar (Hiperisin ve onun biyosentetik prekürserleri olan pseudohiperisin ve protohiperisin)
- Flavonoidler (rutin,kuarsetin, kuarsetrin, piagenin)
- Açılfloroqlusinoller (hiperforin ve adhiperforin) (Napoli vd., 2018).

Bu ana grupların içerisinde ise belli başlı bileşenler yer almaktadır. Naftodiantronlar içerisinde hiperisin, pseudohiperisin, protohiperisin ve protopseudohiperisin yer almaktadır. Floroqlusinoller içerisinde ise hiperforin, adhiperforin, hiperforin ve adhiperforin bulunmaktadır. Flavonoidler de ise hiperosit ve rutin en çok bulunan bileşiklerdir (Alali vd., 2009).

H.perforatum kurumuş çiçeklerinde bulunan bileşik oranları bitki yaşına ve bulunduğu bölgeye göre farklılık göstermektedir. Ortalama içeriği (EMA, 2009).

- %0.2-4 oranında Floroglusinol türevleri
- %0.06-0.4 oranında naftodiantronlar
- %2-4 oranında flavonoidler
- İz miktarda ksanten
- %0.1-0.25 esansiyel yağ
- Az miktarlarda khloregenik asit ve serbest aminoasitler

Napoli vd. (2018)' nin yaptığı çalışmada ise *H.perforatum* türüne ve 10 farklı *Hypericum* türüne ait bitkilerin fitokimyasal özelliklerini incelemiştir. Bunun için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve spektrofotometrik yöntemler kullanmışlardır. Bu çalışmada 1 kg kurutulmuş bitkiden 13,36 g naftodiantron türevi bileşikler, 45,64 g açılfloroglukinol türevleri, 1,59 g sinnamik asit türevleri, 8,88 g flavanoid ve 4,74 g biflavolon türevi bileşikler elde edilmiştir (Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3).

Çizelge 1.2. Sarı kantaronun içerdiği bileşikler ve miktarları (Napoli vd., 2018; Çırak ve Kurt, 2014; Ciddi, 2005, Hışıl vd., 2005)

Bileşik Grubu	Bileşik Adı	Miktarı (g/kg kuru bitkisel materyal)
Naftodiantronlar	Protopseudohiperisin	3,04
	Pseudohiperisin	5,14
	Protohiperisin	1,50
	Hiperisin	3,69
Açılfloroglusinoller	Hiperforin	40,97
	Adihiperforin	4,68
Sinnamik Asitler	3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	0,28
	<i>p</i> -cumaroylquinic acid	0,05
	5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	0,06
Flavonoidler	Kateşin	0,02
	Kuarsetin-3- <i>O</i> -galaktosit	4,94
	Kuarsetin-3- <i>O</i> -glukosit	1,87
	Kuarsetin -3- <i>O</i> -arabonosit	0,22
	Kuarsetin-3- <i>O</i> -ramnosit	2,13
	Kuarsetin	0,30
Biflavonlar	Biapigenin	4,56
	Amentoflavon	0,18

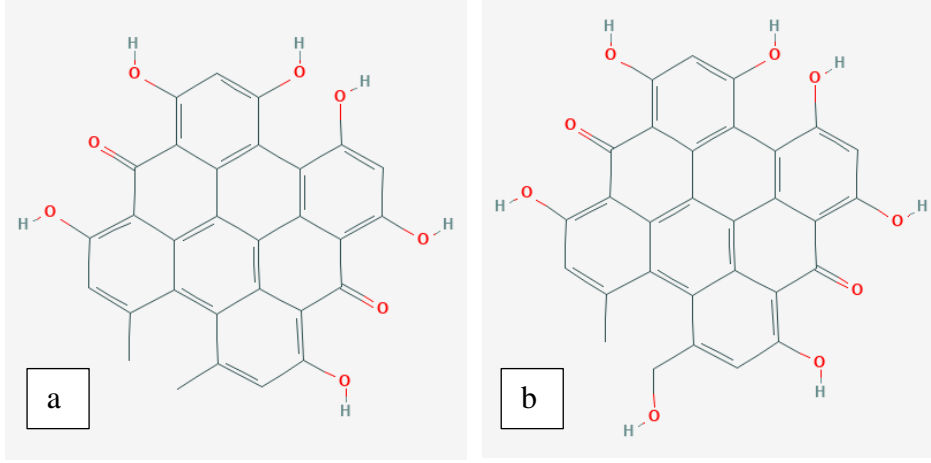
Çizelge 1.3. Sarı kantaronun bünyesinde bulundurduğu bileşik grupları ve toplam miktarları (Napoli vd., 2018, Çırak ve Kurt 2014, Ciddi 2005, Hışıl vd., 2005)

Bileşik Grubu	Miktarı (g/kg kuru bitkisel materyal)
Naftodiantronlar	13.36
Açılfloroglusinoller	45.64
Sinnamik Asitler	1.59
Flavonoidler	8.88
Biflavonlar	4.74

1.4.1. Naftodiantronlar

Bitki yoğun bir sarımsı ve kırmızı renge sahiptir. Bu rengini içerdiği naftodiantronlardan almaktadır. Ayrıca bu bileşikler bitkinin fitotoksik özelliklerine neden olmaktadır (Altan vd., 2015; Ciddi, 2005). Çiçek ve yapraklardaki kuru ağırlığının %0.03-%0.3 arasında bir oranda hiperisin ve pseudohiperisin (Naftodiantronlar) bulunmaktadır. Hiperisinler bu bitkinin temel bileşenleri olarak kabul edilir ve farmakolojik pek çok özelliğide bu bileşikler sayesinde olur (Altan vd., 2015). Hiperisin bitkinin taç yapraklarında yer alan siyah nodüller içerisinde yer almaktadır (Napoli vd., 2018).

Naftodiantronlar çözücü maddeler içerisinde sınırlı bir çözünürlüğe sahiptirler; saf bileşikleri, özellikle hiperisin, oda sıcaklığında, su içinde neredeyse hiç çözünmez. Bununla birlikte, ham bitki kurusundan, naftodiantron içeriğinin % 40'dan fazlası 60-80 °C'de su ile çay hazırlanır gibi elde edilebilir (yaklaşık % 35 psödohiperisin ve % 6 hiperisin). Sudaki çözünürlükte görülen bu artış, bitki kurusunda naphthodianthronların çözünürlüğünü değiştiren efektör maddelerin varlığını göstermektedir. Hiperisin ve psödohiperisinin potasyum tuzları, *Hypericum* cinsinin çözünür pigmentleri olarak tanımlanmıştır (Altan vd., 2015).

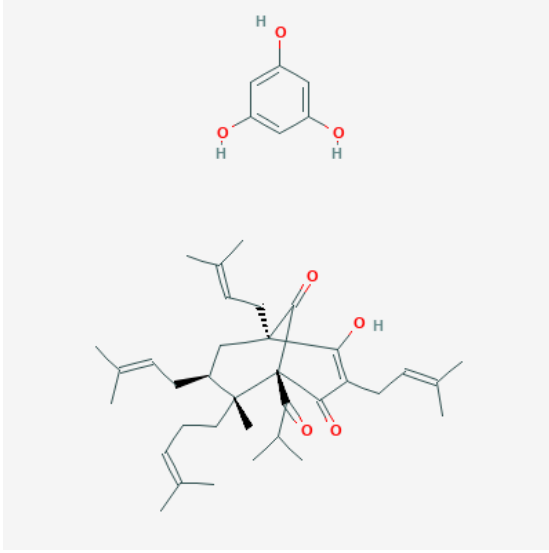


Şekil 1.2. a.Hiperisin bileşiğinin molekül yapısı b. Pseudohiperisin bileşiğinin molekül yapısı

1.4.2. Floroglusinoller

Floroglusinollerin iki yaygın bileşimi hiperforin ve adhiperforindir. Bunlar toplam floroglusinollerin %2.0-4.5 ve %0.2- 1.9 oluşturur (Altan vd., 2015).

H. perforatum'un hiperforinleri, özellikleri çok fazla bilinmemesine rağmen farmakolojik açıdan ilgi çekici bileşiklerdir. Rus bilim adamları yaptıkları çalışmada hiperforinin antibakteriyel özelliğini tespit etmişlerdir. *In vitro* olarak hiperforinin çeşitli nörotransmitter sistemleri inhibe ya da modüle ettiği gösterilmiştir. Serotonin, dopamin ve noradrenalinin kuvvetli bir alımın inhibitörüdür, bu durum bitkinin antidepresan aktivitesinde hiperforinin olası rolünü desteklemektedir. Antidepresan aktivitesinin mekanizması nörotransmitterlerin sinaptik geri alımının inhibisyonu olarak kabul edilir. Bileşik, yeni bir antineoplastik madde olarak, araştırılmaya başlanmıştır. Ayrıca hiperforinin anti-malarya aktiviteye sahip olduğu ve *Plasmodium falciparum* türüne karşı mikromolar aktif olduğu bulunmuştur (Altan vd. 2015; Özcan, 2015; Brondz vd.,1983)



Şekil 1.3. Hiperforin bileşiğinin molekül yapısı

1.4.2.1. Flavanoidler

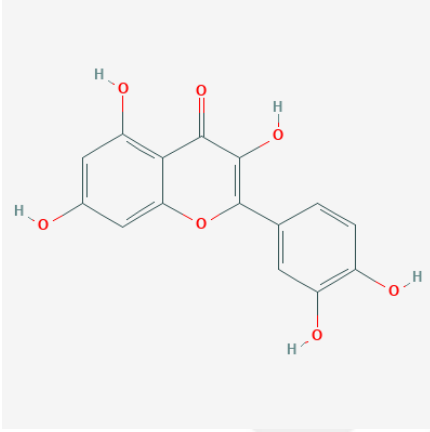
Flavonoidler %2.0-4.0 arasında değişken oranlarla bulunmaktadır. Bulunan flavonoidler flavonol türevi olan kuarsetin ve bunun heterozitleri olan kuarsetrin, izokersitrin, rutin ve hiperozittir (Barnes vd., 2001).

Flavonoidler çoğu bitkilerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir. Özellikle bitkilerdeki yeşil, turuncu, kırmızı pigmentlerden sorumlu yapılar olarak tanımlanırlar. *In vivo*, *in vitro* ve epidemiyolojik çalışmalarla tespit edilmiş birçok biyoaktiviteleri bildirilmektedir. Flavonoidlerin antioksidan etkilerinin mekanizmaları çok sayıda bilimsel çalışmalarla araştırılmış ve farklı aktiviteleri olduğu görülmüştür (Birman, 2012).

Flavonoidler pek çok bitkide yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerdir. Pek çok flavonoid grubu tespit edilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak bilinenleri flavonlar, flavonollar, flavanonollar ve antiosianinlerdir. Besinsel flavonol olarak bilinen Kuarsetin *H.perforatum* da yaygın olarak bulunan ve pek çok farmakolojik etkisi bulunan bir bileşendir (Aluani vd.2016).

İçeriğinde bulunan flavonoidler şu şekildedir:

- Flavonol grubunda yer alan kaempferol ve kuersetin
- Glikozit grubunda yer alan hiperosit, isokuarsetrin, kuarsetrin ve rutin
- Kateşinler



Şekil 1.4. Kuersetin bileşiğinin molekül yapısı

1.4.2.2. Uçucu Yağ Bileşenleri

Bitkilerden elde edilen buharlaşması kolay olan belirgin kokuya sahip, keskin ya da acı lezzeti olan, aromatik sıvılara uçucu yağ adı verilmektedir. Bitkilerin salgı tüy, hücre ve ceplerinde yer almaktadır. Genellikle sap ve kabuklarda nadiren kök, meyve, yaprak ve çiçeklerinde bol miktarda bulunur. Uçucu yağ içeren kurutulmuş bitkisel materyaller en az %0.1, yaygın olarak %1-2 oranında uçucu yağ içermektedir. Nadir de olsa %20 oranında tespit etmek mümkündür (Duru, 1993; Yaşar, 2005).

Bitkilerde tıbbi tedavi amacı ile kullanılan etken maddelerin pek çoğunun uçucu yağlarda yer aldığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre uçucu yağlardan 2000'den fazla bileşen bulunmuştur. Bunların en önemlileri terpenler ve fenilpropanlardır (Umay, 2007).

Uçucu yağları farklı özelliklerine göre sınıflandırılır. Üç farklı grup altında değerlendirilebilir. Kimyasal bileşenlerine, aromatik özelliklerine ve farmakolojik terapik etkilerine göre ayrılırlar. Kimyasal bileşenlerine göre de 4 alt gruba ayrılmaktadır:

- Terpenik maddeler
- Aromatik maddeler
- Düz zincirli hidrokarbonlar
- Azot ve kükürt taşıyan bileşikler (Sağır, 2016).

Uçucu yağ bileşenlerinin geniş bir kısmı terpenik olan bileşenlerden oluşmaktadır. Terpenler, izopren birimlerinin farklı yollarla birleşmesiyle oluşurlar. İçerdiği karbon sayısına göre monoterpenler (10 karbon), seskiterpenler (15 karbon), diterpenler (20 karbon), sesterpenler (25 karbon), triterpenler (30 karbon), karotenoidler (40 karbon) ve kauçuk (500 ve üzeri karbon) olarak sınıflandırılır (Saraçoğlu, 2011).

Yapılan çalışmalarda *H.perforatum* bitkisinde pek çok farklı uçucu yağ bileşenleri tespit edilmiştir. Genellikle terpenik ve düz zincirli hidorkarbonlar tespit edilmiş olup piene, kadinen gibi seskiterpenler gözlenmiştir (Anonim, 2001). Aynı zamanda düz zincirli hidrokarbonlarında elde edildiği raporlanmıştır (Çırak, Bertoli, Pistelli ve Seyis, 2010) (Çizelge 1.4).

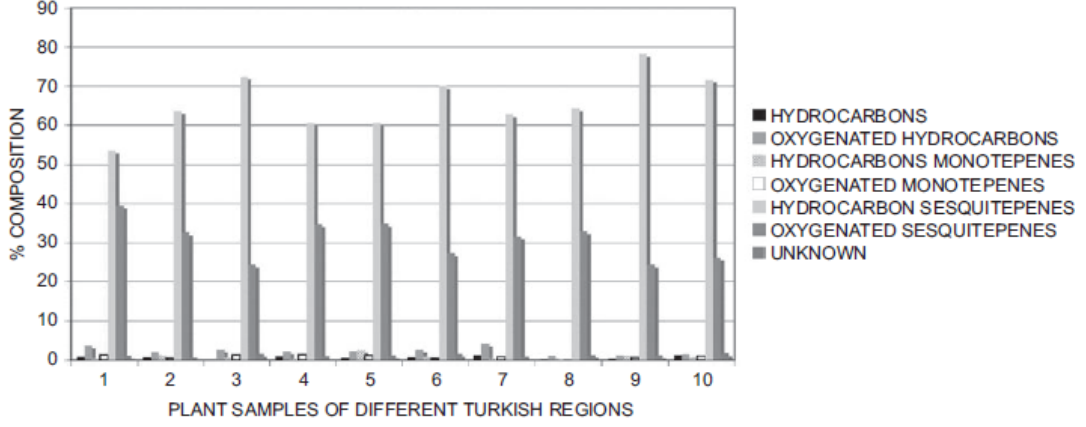
Çizelge 1.4. *Hypericum perforatum* bitkisinin Temmuz, Eylül ve Kasım aylarında uçucu yağ bileşenleri (Yıldırım, Terzioğlu, Okut, Ekici ve Özgökçe, 2009).

	Temmuz	Eylül	Kasım
Alpha-pinene	54,73	57,85	54,80
Alpha-fenchene	0,09	-	-
Camphene	0,40	0,33	0,29
Beta-pinene	22,94	24,14	21,53
Sabinene	0,14	-	-
Verbenene	0,07	0,23	0,31
Beta-myrcene	8,05	5,74	2,77
Alpha-terpinene	0,22	0,11	-
Limonene	4,92	3,33	2,68
Trans-sabinene hydrate	0,75	0,34	-
Cis-ocimene	0,20	0,17	0,11
Gamma-terpinene	0,71	0,63	1,41
Trans-beta-ocimene	1,95	1,02	0,03
Thymene	0,71	0,63	1,41
Delta-2-carene	0,27	0,13	-
Alpha-pinene oxide	0,05	-	-
Alpha-campholenal	0,24	1,61	3,57
Linalool	0,09	0,40	-
Pinicarvone	0,08	0,13	0,19
Borneol acetate	0,07	-	-
Trans-caryophyllene	0,68	0,33	0,27
Trans- pinocarveol	0,30	0,75	2,8
Verbenol	0,15	0,55	4,96

Çizelge 1.4. *Hypericum perforatum* bitkisinin Temmuz, Eylül ve Kasım aylarında uçucu yağ bileşenleri (Yıldırım, Terzioğlu, Okut, Ekici ve Özgökçe, 2009) (devam).

	Temmuz	Eylül	Kasım
Alfa-terpineol	0,79	0,21	1,18
Borneol	0,08	-	-
Germacrene D	0,19	-	-
Verbenone	0,11	0,3	1,54
İsoaromadendrene	0,14	-	-
Delta-cadinene	0,10	-	-
Myrtenol	0,08	0,15	-
Trans-carveol	0,10	0,24	-
Caryophyllene oxide	0,07	-	-
Spathulenol	0,11	-	-
Cembrene	0-19	-	-
P-mentha-1,5-dien-8-ol	-	0,65	0,93
Thyme camphor	-	0,10	-
3-pinanone	-	-	05,0
Carvone	-	-	0,13

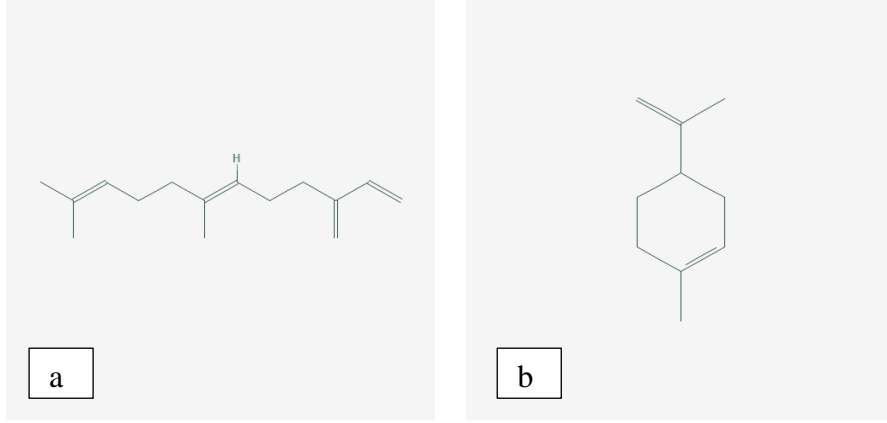
Çırak vd. (2010), Türkiye'nin kuzeyinde yer alan 10 farklı ilden yabancı popülasyondan *H.perforatum* toplayarak essansiyel yağlarındaki dağılımı incelemiştir. Çiçek kısımları toplanarak GC-MS yardımıyla uçucu bileşenler analizlenmiştir. Sonuçlara göre 10 farklı lokasyonda da seskiterpen ve monoterpenler tespit edilmiştir. β -karopilen (4.08–5.93%), γ -muurolen (5.00–9.56%), β -selinen (5.08–19.63%), α -selinen (4.12–10.42%), d-cadinene (3.02–4.94%), α - and β -pinen, myrcen, linalool, cis- and trans-linalool oksit, and α -terpineol gözlenen bileşenler arasındadır. Yaptıkları çalışmada kimyasal içeriklerin genetik özelliklere ve çevresel faktörlere bağlı olduğunu raporlamıştır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Gümüş (1), Sarıgazi (2), Bafra (3), Osmancık (4), Hacıköy (5), Merzifon (6), Karadağ (7), Havza (8), Samsun (9), and Yeniköy (10) bölgelerinden toplanan *H.perforatum* bitkisinin içerdiği temel terpenik bileşiklerin yüzdeleri (Çırak vd., 2010).

Yapılan bir çalışmada, Antalya bölgesinde yetişen bazı medikal aromatik bitkilerin fitokimyasal içeriklerini TOF-LC/MS ve GC-MS cihazı ile incelemiştir. *Echinacea pallida* Nutt., *Melissa officinalis* L., *Hypericum perforatum* L. ve *Sideritis syriaca* L. ile yaptıkları çalışmada *H.perforatum* türüne ait ekstrede %31.7 oran ile octadecatrienoic acid ana bileşen olarak bulunmuştur (Küçük, Tüfekçi ve Demirtaş, 2018).

Hypericum cinsine ait 6 farklı bitki ile yaptıkları bir çalışmada ise kullandıkların bitkilerin ekstraktlarına ait uçucu yağ kompozisyonlarını ve antimikrobiyal etkilerini incelenmiştir. *H.perforatum* türünde monotерpen olan alfa pinene ve seskiterpen olan beta farnesene bileşenleri tespit edilmiştir (Saroglu vd., 2007).



Şekil 1.6. a.Beta-farnesene molekülü b. Limonene molekülü

1.5. Kullanım Alanları

Hypericum perforatum L. bitkisinin çiçeklerinden hareketle hazırlanan ve ülkemizde halk arasında “kantaron yağı” olarak bilinen yağ da, çok eski çağlardan bu yana kullanılmaktadır. Yağı hazırlamak amacıyla; güneşli havada toplanan bitkinin çiçekleri, gevşek biçimde bir şişeye doldurulur ve üstüne, sızma zeytinyağı çiçekleri örtecek şekilde eklenir. 3-5 gün süresince şişenin kapağı açık tutulur ve arada bir çalkalanarak, güneşli bir yerde bekletilir. Daha sonra şişenin kapağı kapatılır ve 4-5 hafta boyunca, arada bir çalkalanarak tekrar güneşte bekletilir. Süre sonunda yağ süzülür, çiçeklerden sıkılarak elde edilen kırmızı renkli kantaron yağı koyu renkli şişelere doldurularak saklanır (Özcan, 2015).



Şekil 1.7. Sarı kantaron bitkisinden zeytinyağı içerisinde bekletilerek elde edilen yağ

Son yıllarda geleneksel yollarla çiçekli kısımlarının yağda bekletilmesi ile elde edilen ekstraktlarının yara ve yanık tedavisinde oldukça etkili oldukları görülmüştür (Franchi ve ark.2011). Bu bitkinin kanıtlanmış yara iyileştirici etkisinin yanı sıra, antimikrobiyel, antikanserojen ve antiviral etkisinin olduğu belirlenmiştir (Çakmak ve Bayram 2003, Fiebich ve ark.2011, Barnes ve ark.2000, Wurglics and Zsilavecz 2006, Orcic ve ark.2011, Silva ve ark.2005, Çelen ve ark. 2008, Ekren ve ark. 2011).

Kantaronun antidepresan aktivitesi kanıtlanan ve dünyada kullanımı yaygın olan, tıbbi bir bitkidir. *H. perforatum* ekstraktları yüzyıllardan beri bitkisel tıpta antidepresan olarak kullanılmaktadır ve bitki 1990'lardan beri bu bakımdan yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Çelen 2008). Antidepresan etkisini hiperforin ve hiperisinden kaynaklandığı ispatlanmıştır. *H. perforatum*'un antidepresan aktivitesinin etkinliği ve güvenilirliği ile ilgili yapılmış birçok klinik ve deneysel çalışma vardır (Çırak ve Kurt, 2014; Fiebich vd., 2011; Barnes vd., .2000; Wurglics and Zsilavecz, 2006).

Kantaron bazı alkollü içeceklerin (likör ve tonik gibi) hazırlanmasında aroma verici olarak da kullanılmaktadır. Avrupa Ekonomik Topluluğu (EEC)'nun 1988 yılındaki 88/388 sayılı direktifiyle, doğal aroma verici ekstraktların kullanılmasından dolayı hiperisin miktarının gıdalarda 0.1 ppm, kek ve tatlılarda 1 ppm ve alkollü içeceklerde 10 ppm'i aşmaması istenmiştir (Hışıl vd., 2005).

1.6. Bitki Hücre ve Doku Kültürü

1.6.1. Bitki Doku Kültürünün Tanımı, Mikroçoğaltım ve Kallus Kültürleri

Bitki doku kültürleri, steril koşullar altında, yapay bir besin ortamında tam bitkiden veya bitkinin çeşitli bölümlerinden elde edilen kültürlerdir. Temel amacı tam bir bitki ya da bitkisel ürün elde etmek olan biyoteknolojik yöntem olarak da tanımlanmaktadır. (Güven ve Gürsul, 2014).

Bitki hücre ve doku kültürleri, aseptik koşullar altında ve uygun besin ortamlarında bitki hücre (meristematik hücreler, hücre süspansiyonu veya kallus hücreleri) doku, organ (apikal meristem, kök, gövde, yaprak vb.) veya bitkiciklerin üretildiği ya da ürünlerin (metabolitler) elde edildiği tekniklerdir (Babaoğlu, Yorgancılar ve Akbudak, 2002).

Bitki doku kültürleri genetik çeşitlilik oluşturmak, yeni çeşit geliştirmek, hastalık taşımayan bitkisel materyal elde etmek ve nesli tükenmiş olan türleri korumak amacıyla alternatif bir yöntem olarak doğmuştur (Bourgard ve ark. 2001, Karakuş 2011). Günümüzde bitki hücre ve doku kültürleri genetik mühendisliği uygulamalarıyla birlikte bitki biyoteknolojisini oluşturmaktadır (Gürel, Hayta, Nartop ve Fedakar, 2013).

Bitkiler sahip oldukları totipotensi özellikleri (yeni bir bitki oluşturabilme) ile doku kültürleri alanında geniş kullanım alanına sahiptir. Bitki doku kültürleri bitkilerin totipotensi özelliğinden faydalanmaktadır. Bu özellik yardımıyla tek hücreden tam bir organizma elde edilebilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri hayvansal dokulardan daha avantajlı durumdadır (Ulukan, 2003; Güven ve Gürsul, 2014).

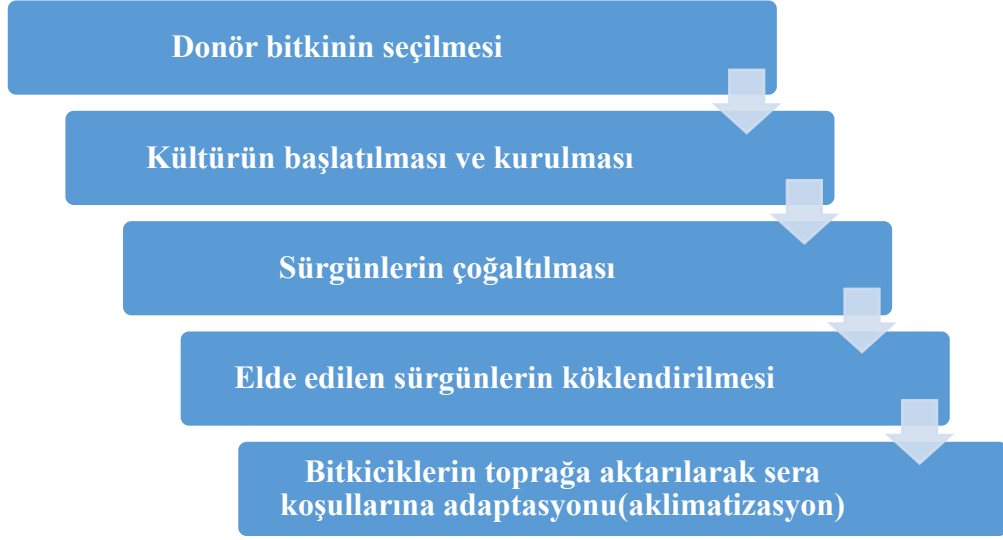
Mikroçoğaltım, yapay besin ortamları içerisinde aseptik şartlar (mikroorganizmalardan arınmış) altında bitkinin tam bitki oluşturma kapasitesine sahip tohum, kök, sürgün vb. kısımlarından birbirine benzeyen çok sayıda bitkiyi hızlı çoğaltma tekniğidir (Özkaynak ve Samancı, 2005).

Mikroçoğaltımda kullanılan bitkisel materyaller:

- Meristemler
- Sürgün uçları
- Aksiler tomurcuklar
- Adventif sürgünler
- Somatik embriyolar
- Soğan pullarıdır.

Mikroçoğaltım; tohum kültürleri, meristem kültürleri, sürgün ucu ve nod kültürleri ile yapılmaktadır (Gürel vd., 2013).

Mikroçoğaltım temelde 5 aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 1.8). İlk aşama yani en önemli aşama donör bitki adı verilen verici, anaç bitkinin seçimidir. İyi bir kültürün başlaması uygun ve verimli donör bitkinin seçimine bağlıdır. İkinci aşama aseptik kültürün başlamasıdır. Bu aşamada eksplant izolasyonu gerçekleştirilerek uygun sterilizasyon yöntemi ve kültür ortamı belirlenir. Üçüncü aşama maksimum sürgün sayısını veren uygun ortam ile kitlesel çoğaltımın gerçekleşmesidir. Dördüncü aşama ise bir önceki aşamada elde edilen *in vitro* sürgünlerin köklendirilmesi işlemidir. Son aşama bitkinin dış koşullara (*ex vitro*) alıştırılması işlemidir (Gürel vd., 2013).



Şekil 1.8. Mikroçoğaltımın aşamaları (Gürel vd., 2013; Özkaynak ve Samancı, 2005).

Kallus, düzensiz bitki hücrelerinin kümeleşerek, kısmen farklılaşmış, hızlı üreyebilen halidir (Nunez vd., 2005). Tüm bitki dokuları, kallus indüksiyonundan sorumludur. Başarılı kallus oluşumu; genotipe ve büyüme düzenleyicilerinin etkisine bağlıdır. Dokunun kallus rejenerasyonu için ihtiyaç duyduğu büyüme düzenleyici tipi ve besin ortamındaki miktarı, ağırlıklı olarak eksplantın türüne ve bitki tipine göre farklılık göstermektedir. Kallus dokusunun en önemli özelliklerinden biri, "ufalanabilirlik"tir. Ufalanabilirlik hücre süspansiyon kültürleri için istenen bir özelliktir (Chawla, 2002). Kallus kültürünü oluşturmak amacıyla bitkinin çok farklı kısımları kullanılabilir. Genellikle vejetatif organlardan yararlanılmaktadır. Yaprak, kök, nod, gövde, petiol, sürgün ucu ve kotiledon kısımları kullanılabilir. Özellikle genç vejetatif organlar, kallus oluşumu açısından oldukça etkilidir (Biswas, Roy, Islam ve Hossain, 2010).

1.6.2. Bitki Doku Kültürünün Sağladığı Avantajlar

Günümüzde, insanoğlunun karşılaştığı en önemli sorunlardan birisi artan nüfusun beslenmesidir. Dünya nüfusunun hızla artması rağmen nüfus ihtiyacını karşılayacak olan tarım alanlarının azlığı, yeni tekniklerin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Geleneksel ıslah teknikleriyle yeni bir çeşit geliştirmenin çok uzun bir zamana ve maddi kaynağa ihtiyaç en önemli dezavantajlarından. Hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere, bitkilerin diğer tarımsal özelliklerini iyileştirmede birçok engellemelerle karşılaşılmaktadır. Aralarında melezleme yapılabilen tür sayısının azlığı, yapılan melezlemelerde istenen karakterlerle birlikte istenmeyen özelliklerin de birlikte geçişinin önlenememesi, arzu edilmeyen karakterlerin geri melezleme yoluyla elemine edilmesinin çok uzun zaman alması, totipotensiyi gerçekleştirmenin çok uzun ve zor olması geleneksel bitki ıslahının önemli dezavantajları arasındadır (Çizelge 1.5). Geleneksel yöntemlerden farklı olarak gerçekleştirilen biyoteknolojik teknikler süreyi kısaltarak zaman ve para kazanılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca geleneksel ıslah yöntemlerinin getirdiği olumsuzluklardan uzaklaşılmasına olanak sağlamaktadır (Kumlay ve Dursun, 2003).

Çizelge 1.5. Bitki doku kültürünün avantaj ve dezavantajları (Hepaksoy, 2005; Babaoğlu vd., 2001).

Avantajları	Dezavantajları
Bitkilerin mevsimden bağımsız klonal olarak hızlı çoğalması	İlk yatırım maliyeti yüksekliği
Geleneksel yöntemlerle çoğalması zor olan bitkilerin kolaylıkla çoğalmasının sağlanması	Eğitimli personel ihtiyacı gerektirir.
Hastalık etmenlerinden arınmış bitki eldesi	
Haploid bitkilerin elde edilmesi	
Biyokimyasal ürünlerin kısa sürede kolaylıkla üretilmesi	
Uzun vadede yüksek kazanç elde edilmesi	

Biyoteknolojik yöntemlerin, ilk uygulaması olan doku kültürü yöntemleriyle virüsten ari (temiz) materyal elde edilmesi (meristem kültürü), vejetatif hızlı çoğaltım, genetik materyalin muhafazası, embriyo kültürü, anter kültürü, kallus kültürü, değişik hücre kültürleri ve protoplast kültürleri gibi yöntemlerin bitki ıslahında kullanılması mümkün olmuştur (Gönülşen, 1991).

In vitro bitki kültürleri; aseptik şartlarda, niteliği belirli kimyasal ve fiziksel ortamlarda hücre, doku, organ ve bitkilerin kültüre alınması olarak tanımlanır. Bitkilerde *in vitro* hücre kültüründe ilk çalışma, Haberlandt'a aittir (1902). Bitki doku kültüründe ilk ticari ilgi alanını süs ve gıda bitkileri olmuştur (Topcu ve Çölgeçen, 2015). Bitki doku kültür teknolojisinin amacı yüksek miktarda, homojen, farklılaşmamış hücrelerin üretimine olanak sağlamaktır (Güven ve Gürsul, 2014).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tıbbi bitkiler klinik açıdan önemli pek çok doğal ürünün temel kaynağı olarak kabul edilmekte ve özellikle bünyelerinde bulundurdukları sekonder metabolitlerle endüstriyel olarak önemli kaynaklardır. İlaç sektöründe kullanılan hammaddelerin büyük bir kısmı uzun ve karmaşık basamaklardan oluşan kimyasal sentez yoluyla elde edilmektedir. Bu nedenle maliyeti yüksek işlemlerdir. Aynı zamanda son yıllarda dikkat edilen karbon ayak izi kavramına göre çevresel açıdan zararlı oldukları raporlanmaktadır. Araştırmacılar karşılaşılan bu sorunları çözmek için doğal kaynakların kullanıldığı yöntemler üzerine eğilmeye başlamıştır.

H.perforatum bitkisi bünyesinde bulundurduğu bileşikler ile medikal açıdan önemli bir bitkidir. Yukarıda belirtilen sebepler göz önünde bulundurularak sahip olduğu sekonder metabolit içeriğini arttırmak ve kullanmak adına biyoteknolojik çalışmalarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Yapılan biyoteknolojik çalışmaların pek çoğu içerdiği metabolitleri kullanmak adına yapılmaktadır. Bu amaçla da en çok bitki doku ve hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada, İtalya’ da yaz döneminde toplanmış olan sarı kantaron bitkisinin sıcak metanol ekstraksiyonu yardımıyla aktif bileşiklerinin incelendiği HPLC-DAD ve HPLC-MS yöntemi geliştirmiştir. Klorogenik asit, rutin, hiperosit, biagenin, pseudohiperisin, hiperisin, hiperforin ve adihiperforin bileşikleri geliştirdikleri yöntem ile analizlenerek, toplanan bitkiler içerisindeki miktarları belirlenmiştir (Brolis vd., 1998).

Bir başka çalışmada Ege Bölgesi florasından toplanarak Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü’nün Bornova’da bulunan deneme tarlasında yetiştirilen *H. perforatum* populasyonundan seçilerek oluşturulan klonlarının bazı agronomik özellikleri ve hiperisin oranları belirlenmiştir. Araştırmada bitki boyu minimum 51 cm, maksimum 73.7 cm, yeşil herba verimi minimum 651 g/parsel, maksimum 3850 g/parsel, üst drog herba (üst 1/3’lük kısmı) verimi minimum 188 g/parsel, maksimum 1202 g/parsel olarak elde edilmiştir Sarı kantaron için önemli bir kalite kriteri olan hiperisin oranı ise, üst drog herbadan elde edilmiş olan öğütülmüş materyalde saptanmış ve minimum %0.215, maksimum %0.290 bulunmuştur (Bayram vd., 2002).

Muğla İlinden toplanan sarı kantaron bitkisi ile yapılan bir çalışmada toplam fenolik miktarını belirlenmiş ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. İki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanarak bitki içerisinde bulunan toplam fenol miktarı ve polifenol miktarı araştırılmıştır. Ekstraksiyon için yaklaşık olarak 0,625 g kurutulmuş ve toz hale getirilmiş bitkisel materyal kullanılmıştır. 25 mL distile su yardımıyla 45 °C’de 12 saat, 75 °C’de 5 saat, 100 °C’de 1 saat olmak üzere ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır. Toplam fenol miktarı için Folin-Ciocalteu yönteminden, polifenol miktarını belirlemek için ise TLC (ince tabaka kromatografisi)’den yararlanılmıştır. Elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi için 6 farklı suş kullanılmıştır ve *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* mikroorganizmaları üzerinde inhibitör etki yarattığı gözlenmiştir (Çelen, Ayhan ve Özkan, 2008).

Yıldırım vd. (2009), Van ve yöresi doğal florasında yaygın olarak bulunan kantaron bitkisi, uçucu yağ bileşenleri yönünden araştırılmıştır. Çalışmada doğal ortamdan bitkiler temmuz ayında çiçekli dönemde iken, Eylül ve Kasım aylarında meyve dönemindeyken toplanarak Clevenger aparatı (su buharı distilasyon cihazı) ile kaynatılmış ve uçucu yağı elde edilmiştir. Daha sonra uçucu yağ n-hekzan içerisinde çözdürülerek, GC/MS cihazı yardımı ile uçucu yağ bileşenleri tespit edilmiştir. Farklı dönemlerde toplanan kantaron bitkisinde uçucu yağ miktarı (%1,6) değişmemekle birlikte uçucu yağ bileşenlerinin oranlarında değişimler gözlenmiştir.

Tunus’ da yapılan bir başka çalışmada yetişen 3 farklı *Hypericum* türünün (*H.perforatum*, *H.perforatum*, *H.ericoides*) biyoaktif bileşik miktarını karşılaştırmıştır. Ekstraksiyon için 1 gram öğütülmüş bitkisel materyal 20 mL metanol kullanılarak 30 dk boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Çökme işleminden sonra kalan bitkisel materyal üzerine 10 mL daha metanol eklenerek ultrasonik banyoda 15 dk sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra organik kısımlar birleştirilmiş, Wattman kağıdından süzülmuş ve 10 dk santrifüj edilmiştir. Konsanrasyon işlemi için rotary vakum evaporatör kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlarda biyoaktif bileşiklerin incelenmesi için ters faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC-DAD) yöntemi kullanılmıştır. 15 farklı fitokimyasal incelenmiş olup en yüksek fitokimyasal miktarı *H.perforatum*’da elde edilmiştir (Hosni, Msaada, Taarit, Hammami ve Marzouk, 2010).

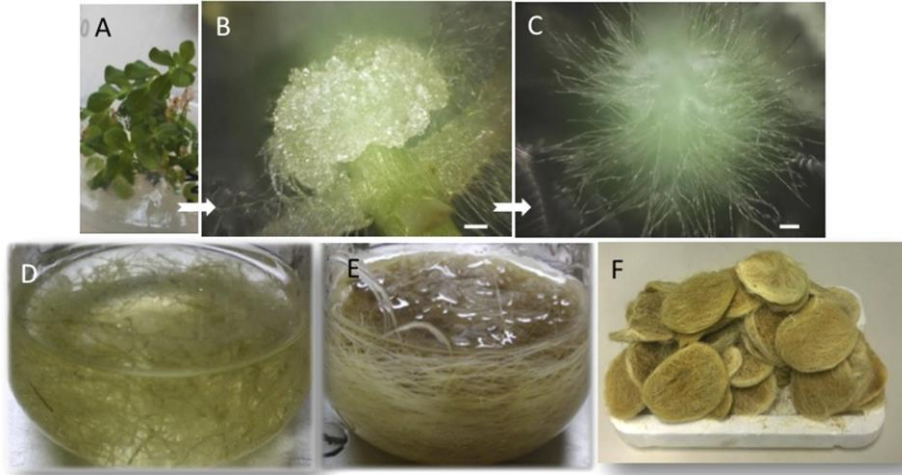
H. perforatum çok bilinen tıbbi bir bitkidir. Ana farmakolojik özelliği naftodiantronlar grubunda olan hiperisin ve pseudohiperisinden kaynaklanmaktadır. Ancak bu bileşiklerin bitki içerisindeki miktarı çevresel koşullardan çok fazla etkilenmektedir. *In vitro* kültürlerde elisitasyon uygulaması bu sorunun üstesinden gelebilecek bir yaklaşım olarak görülmektedir. Bu çalışmada da hücre, kallus ve sürgün kültürleri kullanılarak elisitasyon uygulamasının hiperisin ve pseudohiperisin birikimine etkisi incelenmiştir. Bu çalışma da yapılan analizler için elde edilen bitkisel materyaller liyofilize edilerek farklı çözeltiler ile muamele edilmiştir (Gadzovska ve ark.2007).

Farklı büyüme düzenleyiciler kullanarak yapılan bir çalışmada, *H.perforatum* için *in vitro* rejenerasyon metodu geliştirmiş ve rejenerasyon sonunda elde edilen rejenere bitkilere genetik stabilite analizi uygulanmıştır. Kallus gelişimi için farklı büyüme düzenleyici konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besin ortamı kullanılmıştır. Sürgün ve kök gelişimi için farklı bir besin ortamı kullanılmıştır. Genetik stabilite analizi için RAPD (random amplified polymorphic DNA) ve RFLP (Restriction fragment length polymorphism) yöntemleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda elde edilen bilgiler *in vitro* olarak rejenere edilen bitkilerde anlamlı bir genetik çeşitlilik gözlenmemiştir. Bu çalışma sayesinde *in vitro* yetiştirilen bitkilerin tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerden genetik açıdan farklı olmadıkları ve bu sayede endüstriyel kullanıma uygun olduğu ispatlanmıştır (Banerjee, Bansyopadhyay ve Rychaundhuri, 2012).

Sirvent ve Gibson (2002), çalışmalarında *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkicikler üzerinde biyotik ve kimyasal elisitasyon uygulayarak HPLC yöntemiyle hiperisin ve hiperforin içeriğini incelemiştir. Meristem kültürüne uygulanan salisilik asit ve metil jasmonat sonucunda hiperisin ve hiperforin miktarında artış olduğu gözlenmiştir.

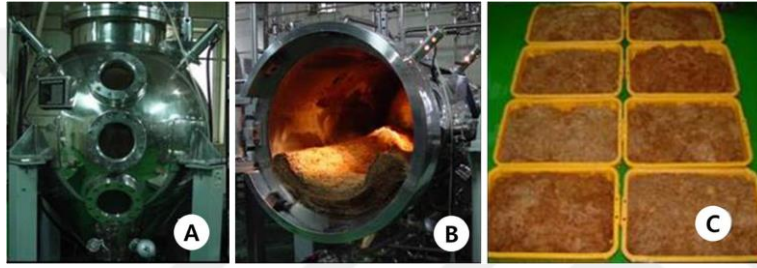
Xu vd. (2011), yaptıkları çalışmada *H.perforatum*' u kullanarak oluşturdukları hücre süspansiyon kültürlerine ozon uygulaması yaparak hiperisin miktarını arttırmayı amaçlamıştır. Farklı konsantrasyonlarda ozon uygulaması yapılarak hiperisin miktarı analizlenmiştir. Ozon uygulamasının hiperisin miktarında 4 katlık bir artışa katkı sağladığı raporlanmıştır.

H. perforatum bitkisinin kökleri ile yapılan bir çalışmada, kök kültürlerinde hiperforin üretimini üzerine çalışılmıştır. Hiperforin, ışık, sıcaklık ve oksijenden çok çabuk etkilenmektedir. Tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerde bu sebeple belirli bir kalite yakalanamamaktadır. Bu çalışmada *H. perforatum* kök kültürünün yaş ve kuru ağırlıklarında hiperforin miktarına bakılmıştır. 5 hafta sonunda gelişen adventif kökler alınmış ve su yardımıyla kullanılmış besin ortamlarından arındırılmış ve liyofilize edilmiştir. 0,5 g liyofilze toz materyal ve eter kullanılarak ardışık ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Stabil hiperforin elde edildiği gözlenmiştir (Gaid, Haas, Beuerle, Scholl ve Beerhues, 2016).



Şekil 2.1. (A) *In vitro* bitkicik (B) ve (C) IAA ve IBA ile desteklenmiş MS/B5 besin ortamı içerisinde kallus ve kök formasyonu (D) Kök kültürünün başlangıç aşaması (E) 7 haftalık kültür sonucunda elde edilen biyokütle (F) Dondurularak kurutulmuş kök biyokütle pelletleri

Fenolikler ve flavonoidler *H.perforatum* bitkisinin temel biyoaktif bileşikleridir. Bu fitokimyasalların kalitesi ve miktarı bitkinin yetiştirildiği çevre şartlarından çok fazla etkilenmektedir. Büyük ölçekte adventif kök kültürlerinde biyoreaktörlerin kullanımı büyük ölçekte standart kalite ve miktarda aktif bileşik elde edilmesine bir alternatif oluşturmaktadır. Cui vd. (2014), biyoreaktör kullanarak *H. perforatum* bitkisinin adventif kök kültüründen elde edilen biyoaktif bileşiklerin pilot ölçekte üretimini incelemiştir. Bu çalışmada 500 L kapasiteli pilot ölçek biyoreaktör kullanılarak adventif kök kültürü kurulmuştur. Elde edilen kuru biyokütlede toplam fenol içeriğine, toplam flavonoid içeriğine, hiperisin ve kuarsetin miktarına bakılmıştır. Sonuçlar farmasötik ve gıda endüstrisi için kullanılabilir fitokimyasal miktarına ulaşıldığını göstermiştir.



Şekil 2.2. a. 500 L biyoreaktör içerisindeki kültür b. 500 L horizontal biyoreaktör içerisinde biyokütle görünümü c. Hasat edilen ve kurutulmuş adventif kökler

Cui vd. (2010), yaptıkları çalışmada *H. perforatum* adventif köklerinde farklı konsantrasyonlarda oksin, oksin/sitokinin kombinasyonları, inokulum miktarı ve Murashige ve Skoog (MS) ortamı seyreltmelerinin biyokütle ve toplam biriken fenolikler, flavonoid miktarları araştırılmıştır. Kültür büyümesi ve sekonder metabolit üretim miktarı optimize edilmiştir. 0.1 mg/L Kinetin ile 1 mg/L IBA ilaveli ortamda inokulum yoğunluğu 6 g/L yaş ağırlıkta kültürler kullanılmıştır. İnokulasyon 6 g/L yaş ağırlıkta adventif kökler 3 L hacimde balon tipte kabarcık biyoreaktöre yapılmıştır. Reaktör içinde bulunan ½ MS ortamı 0.1 mg/L Kinetin, 1 mg/L IBA desteklenmiştir. Analizler için *in vitro* kökler 50 °C de 1 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutulmuş 0,2 g materyale %80'lik metanol yardımıyla 80 °C de reflux işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 104.2 g/L adventif kökten kuru ağırlık bazında 56.47 ± 0.22 mg/g toplam fenolik, 35.01 ± 1.26 mg/g flavonoid, 0.97 ± 0.06 mg/g klorojenik asit ve 1.389 ± 0.80 mg/g hiperisin elde edilmiştir. Bu çalışma *Hypericum perforatum* adventif kök kültürünün kullanıldığı biyoreaktör teknolojisinde hiperisin üretimi optimize edilmiştir.

Gadzovska vd. (2005), yaptıkları çalışmada *H. perforatum in vitro* kültüründe hiperisin ve pseudohiperisin üretiminin artırılması için etkili bir protokol geliştirilmesi amaçlanmıştır. Büyüme düzenleyicilerin aktiviteside bu çalışmada gösterilmiştir. Sürgün, kallus ve genç bitki kültürleri çalışılmıştır. Mikroçoğaltım ve kallus oluşumu için steril ortamda çimlenmiş olan tohumların apikal segmentleri kullanılmıştır. Bunun için MS/B5 kültür ortamları 0,1 -5,0 mg/L BA büyüme düzenleyicisi ile desteklenmiştir. Sürgünlerin rejeneratif potansiyelleri için ise 0,05 – 1,0 mg/L IAA ve IBA ile desteklenmiş ortamlar kullanılmıştır. Büyüme düzenleyicilerin hiperisin ve pseudohiperisin üretimine etkisinin araştırılması için ise RP-HPLC metotları kullanılmıştır. Liyofilize edilen bitkisel materyaller metanol ekstraksiyonu yapılarak analizlenmiştir. Yapılan çalışmanın sonunda IAA miktarının naftadiantron üretimine bir katkısı olmadığı görülmüştür. IBA kullanımının ise düşüşe neden olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonucunda uygun miktarlarda fitohormon ile desteklenmiş ortamlarda gelişen bitkiciklerde istenen miktarlarda hiperisin ve pseudohiperisin elde edilebileceği gösterilmeye çalışılmıştır.

Gadzovska vd. (2007), yaptıkları çalışmada *H.perforatum* hücre süspansiyon kültürlerine farklı konantrasyonlarda Jasmonik asit elisitasyonu yaparak fenilpropanoid ve naftadiantron üretimini amaçlamaktadır. Fenolik bileşiklerin analizlenmesinde HPLC-DAD ve ESI-MS kullanılmıştır. JA elisitasyonunun uygulanmasından sonra 6 farklı fenolik bileşikte artış olduğu görülmüştür. JA elisitasyonunun fenilpropanoid ve naftadiantron miktarının artmasına katkıda bulunduğu görülmüştür.

H. perforatum bitkisi ile yapılan başka bir araştırmada *in vitro* adventif köklerinden düşük besin ve oksin içeriğindeki sıvı ortamda mikroçoğaltımını amaçlamaktadır. Kökler sürgünden gelişmiş olan kalluslardan elde edilmiştir. Bunun için 4.0 mg/L IAA içeren MS ortamı kullanılmıştır. Sıvı ortamda kök kültürü için ise 1.0 mg/L IAA içeren ½ MS ortamı kullanılmıştır. 200 mg kök inokulumu ile 4.13±0.67 g (226±34.4 sürgün) toplam biyokütle elde edilmiştir. 2.0 mg/L ön Kinetin uygulaması sürgün gelişimini desteklemiştir. Sürgünler devamında sıvı ortam içeren Growtek kaplarına aktarılmıştır. Morfolojik değişiminin gözlenmesi için RAPD analizi yapılmış ve ana bitkiye %84-99 oranında benzerlik olduğu görülmüştür (Goeli, Kukreje ve Bisht, 2009).

Hücre süspansiyon kültürlerinin kullanılarak yapılan bir araştırmada, kallus ve in vitro rejenere edilmiş sürgün ve köklerin metanolik ekstraktlarındaki aktif metabolitleri çalışılmıştır. 1 g kurutulmuş materyal için 75 mL metanol kullanılmıştır. Aerial bölümlerde bulunan hiperisin, hiperforin ve flavonoid miktarları incelenmiştir (Pasqua vd., 2003).

H. perforatum türünün antiviral ve antidepresan etkisi nedeniyle son yıllarda kullanımı artmıştır. Farmakolojik potansiyeli nedeniyle *in vitro* olarak da çalışılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada yaprak eksplantları 2,4-D(0.45-4.5 µM) ve BA (0.44-4.4 µM) MS içeren ortama transfer edilmiştir. Eksplantlar kallus oluşumu için karanlık ve ışıklı ortamlarda bekletilmiştir. En iyi kallus oluşumu 4.4 µM BA ve 4.5 µM 2,4-D içeren ve karanlıkta bekletilen ortamda elde edilmiştir. Kalluslar 4.6 µM Kinetin ve 0.45 µM 2,4-D içeren ortama aktarılarak sürgün oluşumu teşvik edilmiştir. Kök oluşumunun ardından sera koşullarına aklimatizasyon yapılmıştır (Pretto ve Santern, 2000).

Hücre süspansiyon kültürlerine *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) elisitasyonunun *Hypericum perforatum* bitkisinin fenol metabolizmasına etkisini incelemesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Ekstraksiyon için 50 mg/ mL olacak şekilde kurutulan *H. perforatum* biyokütlesi üzerine %90'lık metanolik solüsyon ilave edilerek sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözünür fenolikleri HPLC-DAD ve HPLC-DAD-MS/MS ile analizlenmiş ve CG elisitasyonunun xantan birikiminde belirgin bir artış oluşturduğu görülmüştür (Conceição, Ferreres, Tavares ve Dias, 2006).

H. perforatum bitkisi kullanılarak xantan üretimi üzerine çalışmalar raporlanmıştır. Bir çalışmada kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde xantan üretimini incelenmiştir. Xantan birikiminin bitki büyüme düzenleyicilerden çok fazla etkilendiği gözlenmiştir (Dias, Seanra, Andrade, Ferreres ve Ferreira, 2001).

Doku kültürü kullanılarak yapılan bir çalışmada, yaprak eksplantlarını kullanarak in vitro da hiperisin üretimini araştırılmıştır. Hiperisinin farklı özel organellerde özellikle de yaprak vakuollerinde biriktiği görülmüştür. Ayrıca hücre süspansiyon kültürlerinde aydınlık ve karanlık kültür koşullarının, hücre agregat boyutunun büyümeye ve hiperisin üretimine önemli katkısı olduğu tespit edilmiştir (Bais, Walker, McGrew and Vivanco, 2002).

Franklin ve Dias (2006), *H.perforatum* üzerinde organogenez ve somatik embriyogenez çalışması yapmıştır. Dört farklı genotip üzerinde çalışma yapılmıştır (Helos, Topas, Elixir, Numi). Dört farklı genotip içinde aynı rejenerasyon ortamı kullanılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak aynı genotipin farklı eksplantlarının kullanıldığı rejenerasyon çalışmalarında farklı sonuçlar görülmüştür. Organogenez ve embriyogenez gözlemleri elektron ve ışık mikroskobundan yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kılıç ve Özdemir (2016), yaptıkları çalışmada endüstriyel uygulamalar için Türkiye’de yetişen *H.scrabum*’un on farklı yabancı popülasyonunda hipokotil eksplantlarından elde edilen kalluslarda esansiyel yağ üretiminin geliştirilmesini amaçlamıştır. Çalışma kapsamında katı faz mikroekstraksiyon metodunu kullanılmış ve bunun için 5 g kurutulmuş, toz hale getirilmiş kalluslar kullanılmıştır. Sonuçlara göre esansiyel yağ üretimi için iyi bir deneysel sistem oluşturulduğu raporlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada, Antalya bölgesinde yetişen bazı medikal aromatik bitkilerin fitokimyasal içeriklerini TOF-LC/MS ve GC-MS cihazı ile incelemiştir. Ekstrakt hazırlığı için metanol ve kloroform ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiş, vakum altında kurutulmuştur. Elde edilen ekstraktlar metanolik potasyum hidroksit çözeltisi ve hekzan uygulamasından sonra analizlenmiştir. *Echinacea pallida* Nutt., *Melissa officinalis* L., *Hypericum perforatum* L. ve *Sideritis syriaca* L. ile yaptıkları çalışmada *H.perforatum* türüne ait ekstrede %31.7 oran ile octadecatrienoic acid ana bileşen olarak bulunmuştur (Küçük vd., 2018).

Murch vd. (2000), TDZ kullanarak *in vitro* rejenerasyon protokolü oluşturmuştur. Diğer bitki büyüme düzenleyiciler olan IAA ve BA hipokotil eksplantlarında rejenerasyonu teşvik etmediği görülmüştür.

Metil jasmonatın (MeJA) elisatör olarak kullanıldığı bir çalışmada, elisasyonun hücre süspansiyon kültürlerinde hücre büyümesine ve flavanoid sentezine etkisini araştırmıştır. Yaptıkları bu çalışma hücre süspansiyon kültürlerinde MeJA ile flavonoid üretimini için ilk çalışma olduğu raporlanmıştır (Wang, Qian ve Yao, 2015).

Wojcik ve Podstolski (2007), *H.perforatum* yaprak eksplantlarının kullanıldığı sürgün rejenerasyon protokolü geliştirmiştir. Bunun için farklı bitki büyüme düzenleyicilerin kullanıldığı ortamlar üzerinde denemeler yapılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *In vitro* Çalışmada Kullanılan Materyaller

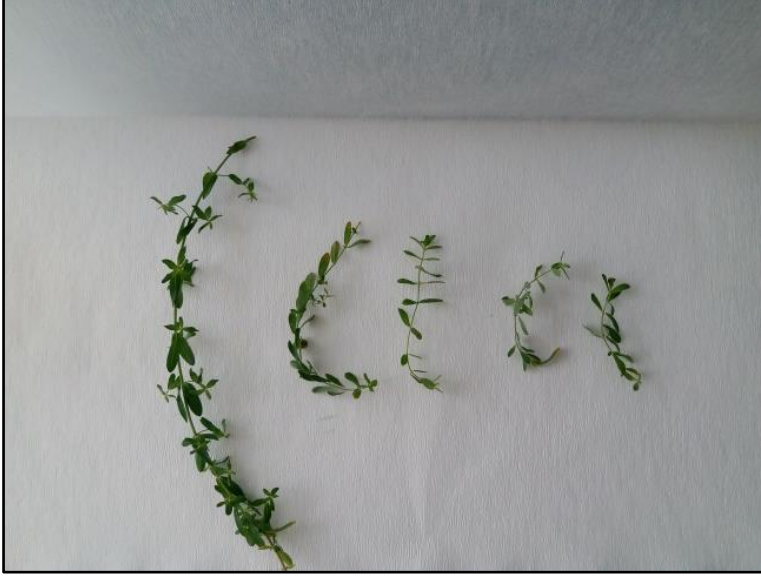
Çalışmada bitki doku kültürü için kullanılan *H. perforatum* bitkisi İzmir'in Ödemiş ilçesinde faaliyet gösteren bir seradan (Gürbüz Candan Meyve Fidanı ve Tarım Ürünleri Üretim ve Tic.) temin edilmiştir. Analiz için toplanan dış koşullar bitkiler ise Aydın ilinin Kuşadası ilçesinin Yavansu Mahallesi lokasyonundan (37.838300 enlem, 27.255520 boylamda, 37° 49' 6.1752" Kuzey ve 27° 16' 8.6916" Doğu) toplanarak gün ışığında kurutularak gölgede bekletilmiştir. Sterilizasyon ajanı olarak ise antibakteriyel sabun, %15 ve %35 (v/v)'lık çamaşır suyu ve %70 (v/v)'lik etil alkol çözeltisi kullanılmıştır. Bu çalışmalar Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitki, Hücre, Doku ve Organ Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür ve eksplantların gelişmesi için Tarımsal Biyoteknoloji Bölümüne ait iklim odaları kullanılmıştır.

3.2. Fitokimyasal Analizler için Kullanılan Materyaller

Analizler için Merck marka sodyum hidroksit, metanol ve hekzan kullanılmıştır. Fitokimyasal analizler için Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Enstrümental Analiz Laboratuvarı'na ait Shimadzu-QP2010-Ultra Model GC-MS cihazı kullanılmıştır.

3.3. Bitkisel Materyallerin Eldesi

In vitro çalışmada yaprak ve nod eksplantları kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce canlı bitkiden dikkatlice kesilerek sterilizasyon için hazırlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *In vitro* çalışma için kullanılan bitkisel materyal

3.4. Yöntem

3.4.1. *In vitro* Çalışmada Alet, Ekipman ve Çalışma Ortamının Sterilizasyonu

Eksplantların sterilizasyonu ve kültüre edilmesi ile ilgili çalışmalar laminar hava akımlı steril çalışma kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kabinin iç ve dış kısmı çalışmaya başlamadan önce %70'lik etil alkol (EtOH) ile silinmiştir. Eksplantların steril edilmesi ve kültüre alınması sırasında kullanılan bütün malzemeler 121 °C'de 1,2 atm basınç altında 20 dk boyunca sterilizasyona tabi tutulmuş ve sterilizasyon sonrası malzemeler mümkün olduğunca hızlı bir şekilde laminar hava akımlı kabin içerisine alınmışlardır. Kabin içerisine malzemeler aralarında boşluklar bulunacak şekilde zemine yerleştirilmiştir. Kabinde çalışmaya başlamadan önce el ve kolların kabin içerisine giren kısımları sabunlanarak yıkanmış, daha sonra %70'lik alkol ile de steril edilmiştir.

3.4.2. Besin Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Yapılan çalışmada, *in vitro* kallus ve sürgün geliştirme çalışmalarında mineral tuzları ve vitaminleri içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır. Sterilizasyon denemesi için 0 MS besin ortamı kullanılmış olup, sürgün ve kallus gelişimi için farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyici içeren 0 MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie) ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3). Besin ortamının hazırlanmasında 1 L saf su içerisine hassas terazide tartılmış 30 g/L sukroz eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra içerisine 4,4 g/L MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie) eklenmiştir. Hazırlanan besin ortamının pH'ı 1N NaOH veya HCL kullanılarak 5,6-5,8'e ayarlandıktan sonra otoklavlanabilir cam şişelere doldurulup üzerine 6,5 g/L Plant Agar (Duchefa Biochemie) eklenerek 121 °C'de 1,2 atm basıçta 20 dk boyunca otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besin ortamlardan 0 MS olanlar doğrudan petrilere dökülmüştür. Bitki büyüme düzenleyici içeren ortamlar ise 1 mg/mL olacak şekilde bitki büyüme düzenleyicisi içeren filtre sterilizasyonu ile steril edilmiş stok solüsyonlardan yapılan ilaveler sonrasında kültür kaplarına (kavanoz ve petrilere) dökülmüş ve donma işleminden sonra tüm besin ortamları streçlenerek etiketlenmiştir.

3.4.3. Eksplantların Sterilizasyonu

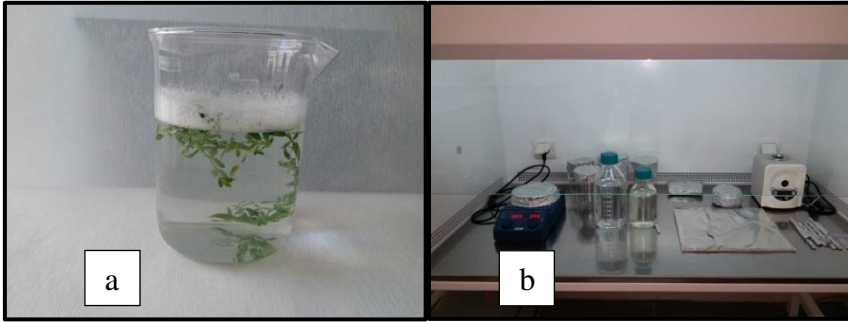
Bitkisel materyal için uygun bir sterilizasyon prosedürü belirlemek amacı ile sterilizasyon denemeleri yapılmıştır. Amaç steril besin ortamında kontaminasyona sebep olabilecek tüm mikroorganizmaların arındırılmasıdır. Olgun bitkilerden alınan eksplantlar ön sterilizasyon amacıyla 3 damla (yaklaşık 0.20 mL) antibakteriyel sabun damlatılmış 500 mL distile su içerisinde 10 dk bekletilmiş ve musluk suyu altında 15 dk süreyle durulanmıştır (Şekil 3.2). Daha sonra laminar akışlı kabin içerisinde sterilizasyon amacıyla 1 dk boyunca %70'lik (v/v) etanol çözeltisinde bekletilmiş, devamında %15 ve %35'lik (v/v) çamaşır suyu içerisinde 3 dk boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Ardından tüm eksplantlar 5 dk süreyle 3 kez steril su ile durulanmıştır (Çizelge 3.1, Şekil 3.3, Şekil 3.4).

Çizelge 3.1. Yapılan sterilizasyon denemeleri

Deneme Adı	Etil Alkol Çözeltisi Konsantrasyon ve Bekletme Süresi	Çamaşır Suyu Çözeltisi Konsantrasyonu ve Bekletme Süresi
Deneme 1	%70' lik (v/v) ,1 dk	%15'lik (v/v) , 3 dk
Deneme 2	%70' lik (v/v) ,1 dk	%35'lik (v/v) , 3 dk



Şekil 3.2. Sterilizasyon için hazırlanan bitkisel materyal



Şekil 3.3. a.Ön yıkama yapılan bitkisel materyaller b. Sterilizasyon için laminar akışlı kabinin hazırlanması



Şekil 3.4. Etil alkol (%70'lik) ile sterilizasyon aşaması

3.4.4. Sterilizasyon Denemelerinin Kurulması

Sterilize edilmiş olan eksplantlar 3-4 cm uzunluğunda kesilmiştir. Kesilen bitkisel materyaller yaprak ve nod eksplantlarına ayrılarak bitki büyüme düzenleyici içermeyen 0 MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie) besin ortamına aktarılmıştır. Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Eksplantların kültürü, 1000 lux ışık şiddetine sahip, $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında gerçekleştirilmiştir. 2 hafta sonunda sterilizasyon gözlemleri yapılmıştır.

3.4.5. *In vitro* Sürgün ve Kallus Kültürleri

Sterilizasyon denemesi sonucunda elde edilen verilere göre belirlenen yöntem ile eksplantlar sterilize edilmiş ve farklı konsantrasyonda BAP (0.5 mg/L ve 1.5 mg/L) ve NAA (0.5 mg/L, 1.5 mg/L ve 2.5 mg/L) içeren MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie) besin ortamlarına transfer edilmiştir (Çizelge 3.2). Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Eksplantların kültürü, 1000 lux ışık şiddetine sahip, $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen somatik embriyolardan kallus kültürleri kurulmuştur. NAA (0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 1.5 mg/L ve 2.5 mg/L) ile desteklenmiş MS besin ortamlarına transfer edilmiştir (Çizelge 3.3). Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Eksplantların kültürü, 1000 lux ışık şiddetine sahip, $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. *In vitro* sürgün elde etmek için kullanılan besin ortamı kompozisyonları

Ortam No	Temel Besin Ortamı	BAP Konsantrasyonu (mg/L)	NAA Konsantrasyonu (mg/L)
Kontrol Grubu	MS*	-	-
1	MS*	0,5	0,5
2	MS*	0,5	1,5
3	MS*	0,5	2,5
4	MS*	1,5	0,5
5	MS*	1,5	1,5
6	MS*	1,5	2,5

*MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie)

Çizelge 3.3. Kallus elde etmek için kullanılan besin ortamı kompozisyonları

Ortam No	Temel Besin Ortamı	NAA Konsantrasyonu (mg/L)
Kontrol Grubu	MS*	-
1	MS*	0,5
2	MS*	1,0
3	MS*	1,5
4	MS*	2,5

*MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie)

3.4.6. *In vitro* Sürgünlerin Köklendirilmesi

35 gün sonunda elde edilen *in vitro* sürgünler birbirinden ayrılarak farklı konsantrasyon da IBA (0.1 mg/L, 0.5 mg/L ve 1.0 mg/L) ile desteklenmiş MS ortamlarına transfer edilmiştir (Çizelge 3.4). Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve her tekerrürde 5 eksplant olacak şekilde kültürler yapılmıştır. Eksplantların kültürü, 1000 lux ışık şiddetine sahip, 23±1°C' de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Köklendirme besin ortamı kompozisyonları

Ortam No	Temel Besin Ortamı	IBA Konsantrasyonu (mg/L)
Kontrol Grubu	-	-
1	MS*	0,1
2	MS*	0,5
3	MS*	1,0

*MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie)

3.4.7. *In vitro* Sürgünlerde ve Kalluslarda Gelişimin Belirlenmesi

In vitro koşullarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie) ortamına aktarılan eksplantlarda 35 sonra sürgünler ve 60 gün sonra kalluslar gözlenmiştir. Eksplantlar da sürgün gelişimi ve eksplant başına düşen sürgün sayısı belirlenmiştir. Elde edilen kalluslar da ise analiz için hazırlanması esnasında kurutma öncesi yaş ağırlık ve kurutma sonrası kuru ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Köklenen sürgünlerde ise kurutma öncesi kök gelişimleri gözlenmiştir.

3.4.8. Elde Edilen *In vitro* Sürgün ve Kallusların Analiz için Ekstraksiyona Hazırlanması

Köklenen bitkicikler 55 gün, sürgünler 35 gün, kalluslar ise 60 günün sonunda kültür koşulundan çıkarılarak saf su yardımıyla temizlenmiştir. Temizlenen bitkicikler ve kalluslar 2 hafta sürecince Whatman kağıdı üzerinde oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan materyaller analize kadar 2-8°C soğuk koşullarda (buzdolabında) bekletilmiştir.

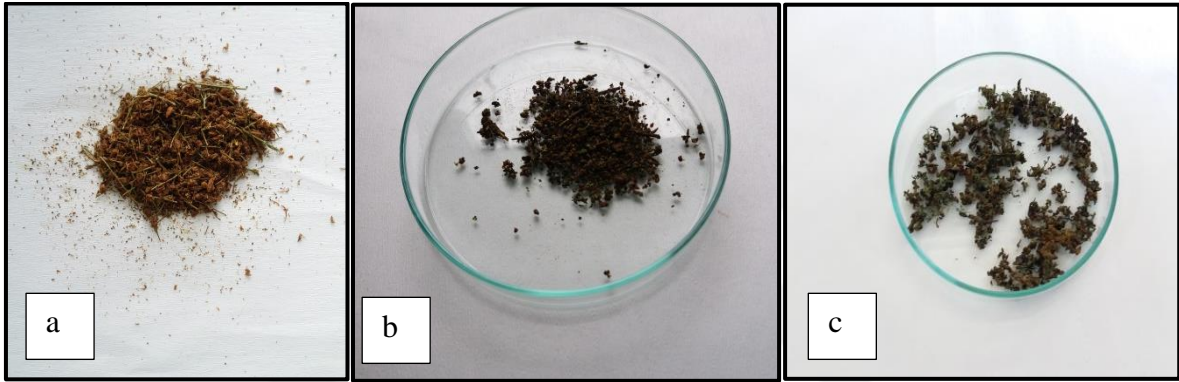
3.4.9. Analiz Çözeltilerinin Hazırlanması

3.4.9.1. Metanolik Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlığı

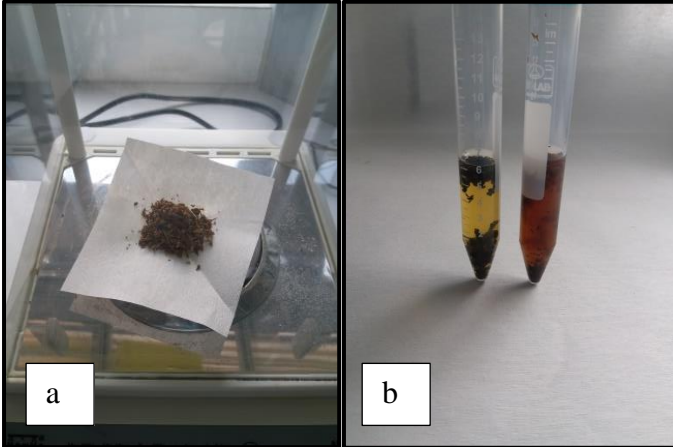
0,2 g sodyum hidroksit üzerine 250 mL saf su ilave edildikten sonra karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra ekzotermik reaksiyon nedeniyle ısınan çözeltinin soğuması beklenmiş ve daha sonra üzerine 250 mL metanol eklenerek manteyik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

3.4.9.2. Ekstraksiyon

Dış koşullardan toplanıp gün ışığında kurutululan ve *in vitro* koşullardan elde edilen bitkisel materyaller ev tipi öğütücü yardımıyla küçük parçalara bölünmüşlerdir (Şekil 3.5). 0.2 g öğütülmüş bitkisel materyal üzerine 6 mL metanolik sodyum hidroksit çözeltisi eklenerek 3dk boyunca vortekslenmiştir (Şekil 3.6). Daha sonra 6 mL hekzan ilave edilerek 3 dk vorteks işlemi uygulanmıştır. Faz oluşumu için 30 dk boyunca beklendi. Üst faz olan hekzan fazı bir pipet yardımıyla toplanarak GC-MS analizi için örnek şişesine alınmıştır (Küçük vd., 2018).



Şekil 3.5. Örneklerin ekstraksiyona hazırlanması a. Dış koşullardan toplanarak kurutulmuş ve öğütülmüş sarı kantaron b. Ekstraksiyon için hazırlanan kalluslar c. Ekstraksiyon için hazırlanan *in vitro* sürgünler



Şekil 3.6. a. Tartılan bitkisel materyal b. Metanolik sodyum hidroksit eklenmiş *in vitro* ve dış koşullardan alınan materyaller

3.4.9.3. GC-MS Analizi

Ekstraksiyon ile elde edilen numuneler analiz süresine kadar +4 °C’ de muhafaza edilmiştir. Numuneler Shimadzu Marka QP2010 Ultra Model GC-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dk akış hızında helyum gazı kullanılmıştır. Enjeksiyon sıcaklığı 25 °C, interface sıcaklığı 265 °C ve ion source sıcaklığı 260 °C olarak ayarlanmıştır. Kolon fırın sıcaklığı programı ise 50 °C’de 5 dk beklenerek başlamıştır. Daha sonra dakikada 3°C artışla 240 °C’ye kadar çıkmıştır. Toplam analiz süresi 68.33 dk olarak belirlenmiştir. Kolon olarak Teknokroma 5 MS (30 m x 0.25 mm, 0.5 µ film kalınlığı) kullanılmıştır.

3.4.10. İstatistiksel Değerlendirme

Sterilizasyon denemeleri, *in vitro* sürgün ve kallus denemeleri 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen verilerin istatistiki değerlendirmesi SPSS ver. 22 istatistik programında One -Way Anova post hoc. testlerinden Duncan testi ile yapılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1967).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu

Sterilizasyon denemelerinde kontaminasyon yüzdesi ve sterilizasyon başarısı belirleme işlemi 2 hafta süresince yapılmıştır. Gözlem sırasında eksplantlarda ve ortamlarda istenmeyen mikroorganizma büyüme ve gelişmeleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Görsel olarak elde edilen sonuçlar kaydedilmiş ve hesaplamalara dahil edilmiştir. İki farklı sterilizasyon denemesi yapılmıştır. Sterilizasyon denemelerinde elde edilen yüzdeler yardımıyla sterilizasyon başarısı tespit edilmiştir.

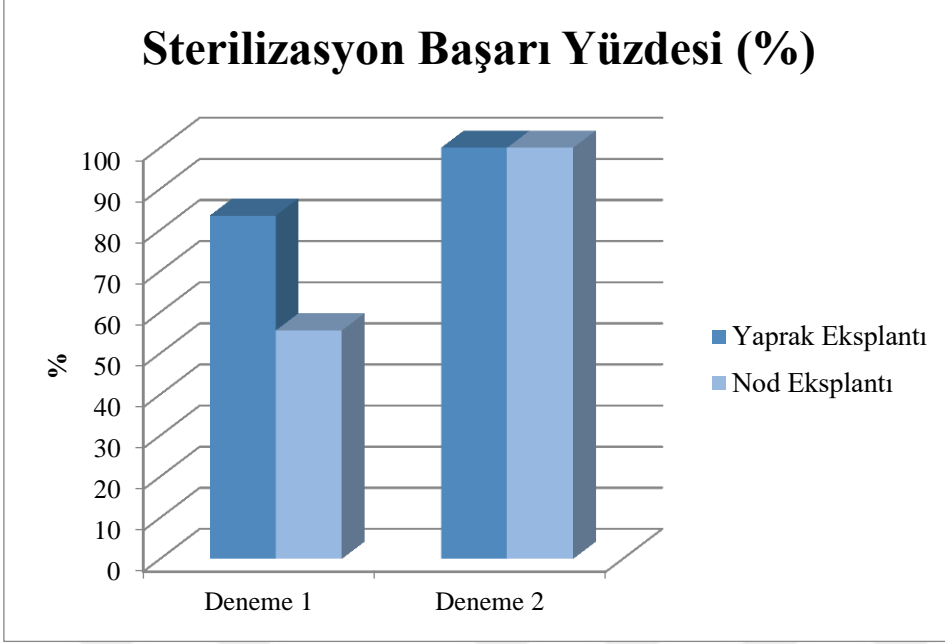
2 numaralı sterilizasyon denemesinde eksplantlar ilk olarak ön yıkama için antibakteriyel sabun içeren distile suda 10 dk bekletilmiş ve devamında 15 dk bounca musluk suyu altında durulanmıştır. Daha sonra 1dk %70’lik (v/v) etanol çözeltisinde bekletilmiş, devamında 3 dk %15’lik (v/v) çamaşır suyu içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Çamaşır suyu uygulamasından sonra sterilizasyon ajanının uzaklaştırılması amacıyla 5 dk süreyle 3 kez steril distile su ile durulanmıştır. Yaprak eksplantları için yapılan gözlem sonucunda kontaminasyon yüzdesinin ise %16,50 olduğu belirlenmiştir. Sterilizasyon başarısı ise % 83,50 olarak belirlenmiştir. Nod eksplantlarında ise % 44,54 kontaminasyon

yüzdesi ve % 55,56 sterilizasyon başarısı elde edilmiştir. Bu deneme seti için gözlemler 2 haftalık bir zaman dilimi içerisinde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2).

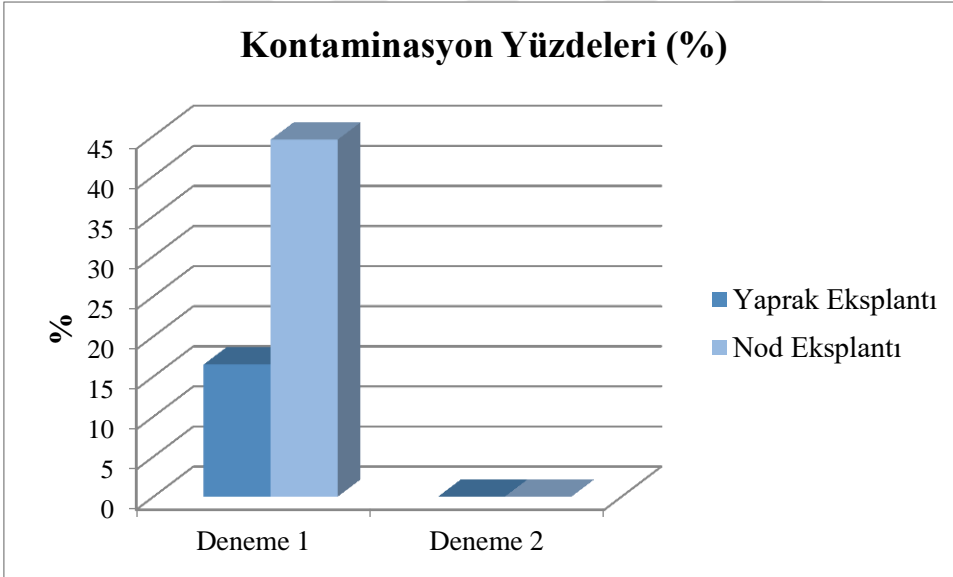
3 numara olarak ifade edilen sterilizasyon denemesinde, 2 numaralı denemeden farklı olarak çamaşır suyu çözeltisinin konsantrasyonu değiştirilmiştir. %35 (v/v) olarak hazırlanmıştır. Bu deneme seti için gözlemler 2 haftalık bir zaman dilimi içerisinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda her iki eksplant türü içinde kontaminasyon gözlenmemiştir. %0,00 kontaminasyon yüzdesi tespit edilmiştir. Eksplanların tümünün sağlıklı olduğu, kararma ve vitrikiye olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2). Deneme sonunda elde edilen verilere yapılan varyans analizi sonucu Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1’e göre NaOCl konsantrasyonu kontaminasyon üzerinde 0.01 düzeyinde farklılık göstermektedir. Farklılığın düzeyini belirlemek için Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı sterilizasyon uygulamalarının kontaminasyon üzerine etkisi

Uygulama No.	Çamaşır suyu Konsantrasyon Yüzdesi (%)	Kontamine yaprak Sayısı ve Yüzdesi (%)		Kontamine nod Sayısı ve Yüzdesi (%)	
		Sayı	%	Sayı	%
1	0	15b	100	15c	100
2	%15	1 a	88,9	4 ab	66,7
3	%35	0 a	0	0 a	0
F		0,00		0,00	



Şekil 4.1. Sterilizasyon denemelerinden elde edilen başarı yüzdeleri

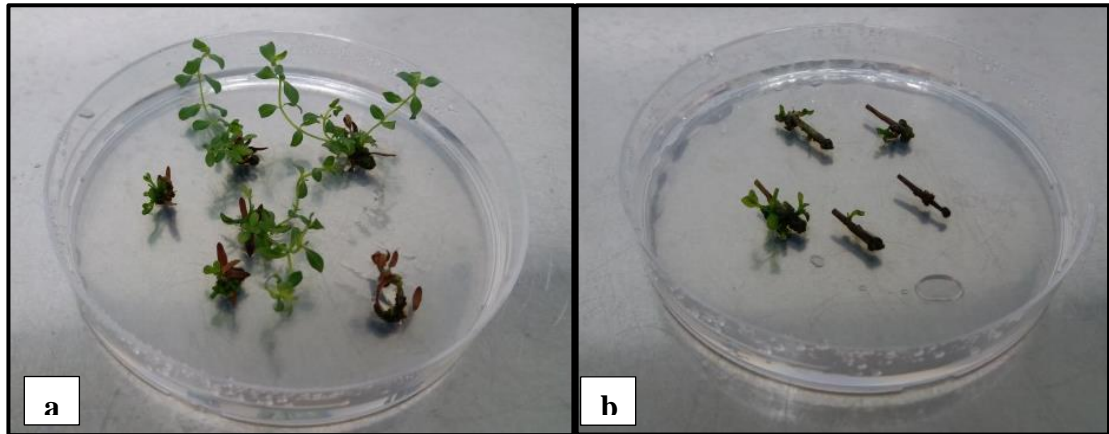


Şekil 4.2. Sterilizasyon denemelerinden elde edilen kontaminasyon yüzdeleri

4.2. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların *In vitro* Sürgün Kültürleri

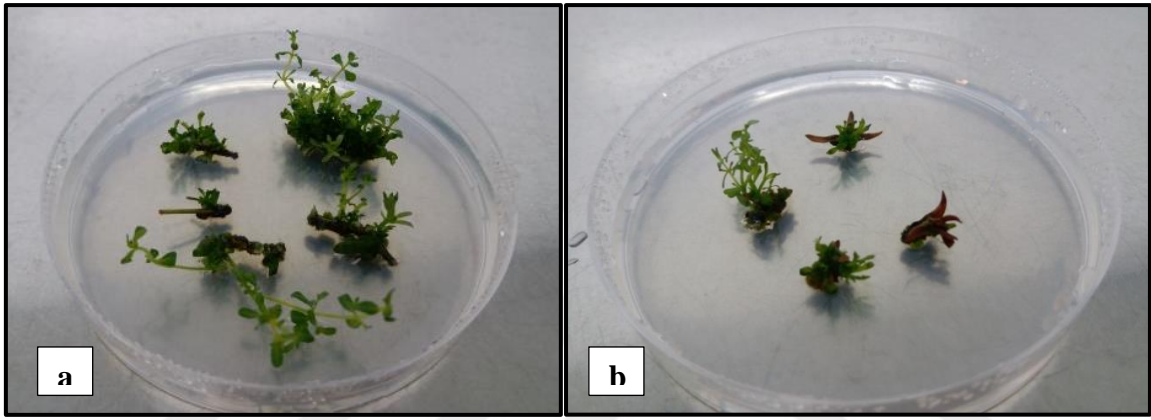
In vitro sürgün gelişimi için altı farklı ortam kompozisyonu denenmiştir. Bitki büyüme düzenleyici olarak BAP ve NAA kullanılmıştır. MS temel besin ortamlarında iki farklı BAP konsantrasyonu, 3 farklı NAA konsantrasyonu belirlenerek bunların birbiri ile kombinasyonları denenmiştir (Çizelge 3.2). Altı farklı denemede de sürgün oluşumu gözlenmiştir. Eksplant türlerine göre farklı yüzdelerde sürgün oluşumu ve gelişimi belirlenmiştir. Sürgün gelişimi ölçümlerinde 0.5 cm'den daha kısa olan sürgünler ihmal edilmiştir.

1 numaralı ortam olarak kullanılan 0,5 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA içeren 0 MS besin ortamında her iki eksplant türünde de sürgün oluşumu ve gelişimi gözlenmiştir. 35 günlük kültür süresince eksplant türlerinde farklı oranlarda ve sayıda sürgünler elde edilmiştir. Yaprak eksplantından %64,44 oranında sürgün gelişimi gözlenmiştir ve ortalama sürgün sayısı ise 1,68 olarak belirlenmiştir. Sürgün boylarına bakıldığında ise minimum sürgün boyu 0,8 cm iken maksimum sürgün boyu 2,9 cm olarak ölçülmüştür. Nod eksplantında ise %26,67 olarak belirlenen sürgün gelişiminin yaprak eksplantına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3). Eksplant başına ortalama sürgün sayısı ise 0,50 olarak tespit edilmiştir. 0,5 cm minimum ve 1,0 cm maksimum sürgün boyu olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. 1 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi

2 numaralı ortam olarak kullanılan 0,5 mg/L BAP ve 1,5 mg/L NAA içeren 0 MS besin ortamında her iki eksplant türünde de sürgün oluşumu ve gelişimi gözlenmiştir. 35 günlük kültür süresince eksplant türlerinde farklı oranlarda ve sayıda sürgünler elde edilmiştir. Yaprak eksplantından %60,00 oranında sürgün gelişimi gözlenmiş olup 2,93 eksplant başına düşen sürgün sayısı olarak hesaplanmıştır. Sürgün boyları 1,2-1,3 cm aralığında değişkenlik göstermektedir. Nod eksplantında ise %73,33 olarak belirlenen sürgün gelişiminin yaprak eksplantına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4). Eksplant başına ortalama sürgün sayısı 3,22 olarak hesaplanmıştır. Minimum sürgün boyu 0,5 cm, maksimum sürgün boyu 3,3 cm olarak ölçülmüştür.

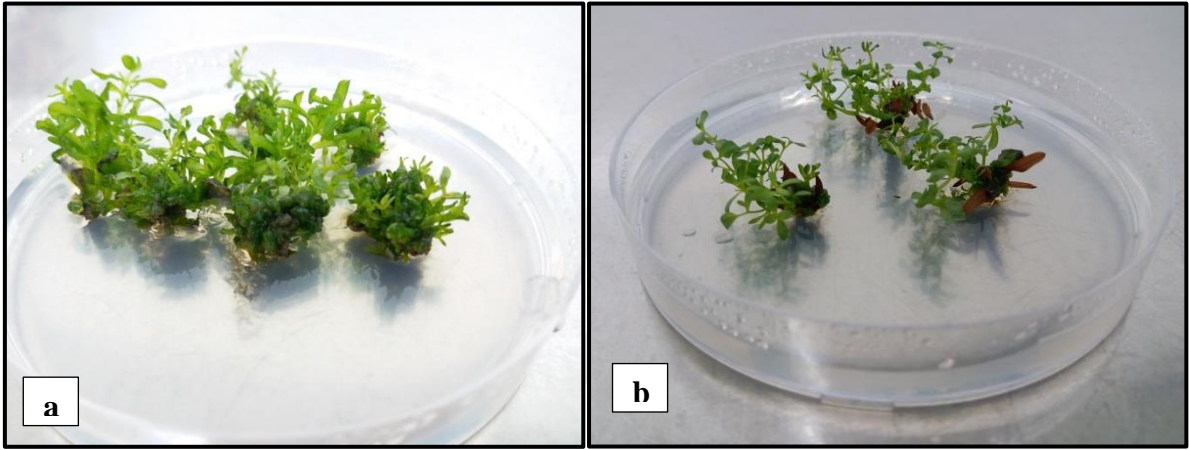


Şekil 4.4. 2 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi

3 numaralı ortam olarak kullanılan 0,5 mg/L BAP ve 2,5 mg/L NAA içeren MS besin ortamında her iki eksplant türünde de sürgün oluşumu ve gelişimi gözlenmiştir. 35 günlük kültür süresince eksplant türlerinde farklı oranlarda ve sayıda sürgünler elde edilmiştir. Yaprak eksplantından %100,00 oranında sürgün gelişimi gözlenmiştir ve eksplant başına düşen sürgün sayısı 5,53 olarak hesaplanmıştır. Maksimum sürgün boyu 1,6 cm ölçülmüş olup minimum sürgün boyu 0.8 cm olarak ölçülmüştür. Nod eksplantında ise %80,00 olarak belirlenen sürgün gelişiminin yaprak eksplantına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5). Eksplant başına ortalama sürgün sayısı 4,33 olarak hesaplanmıştır. 1,0 cm uzunluğunda sürgünlerin gelişim gösterdiği görülmüştür. 6 ortam içerisinde en iyi sonuçlara 3 numaralı ortam ile ulaşılmıştır.

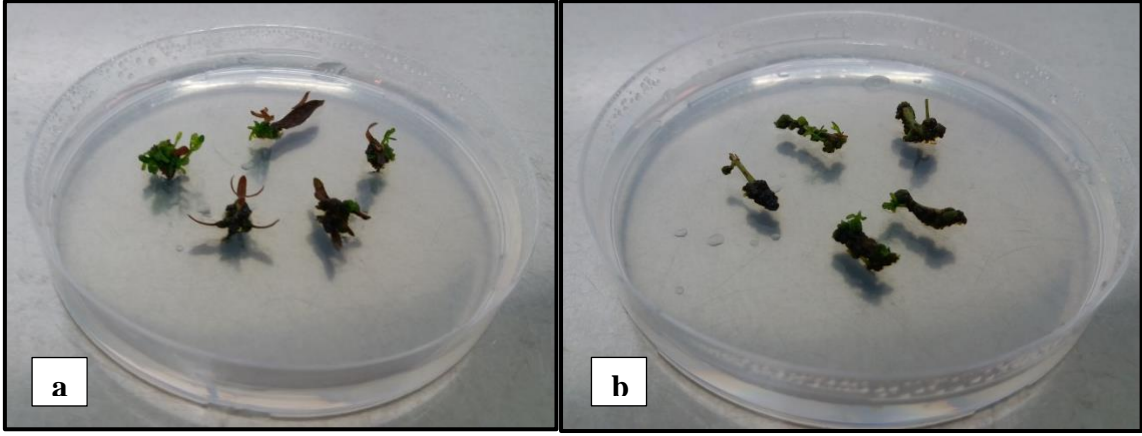


Şekil 4.5. 3 numaralı ortamda gelişen sürgünler



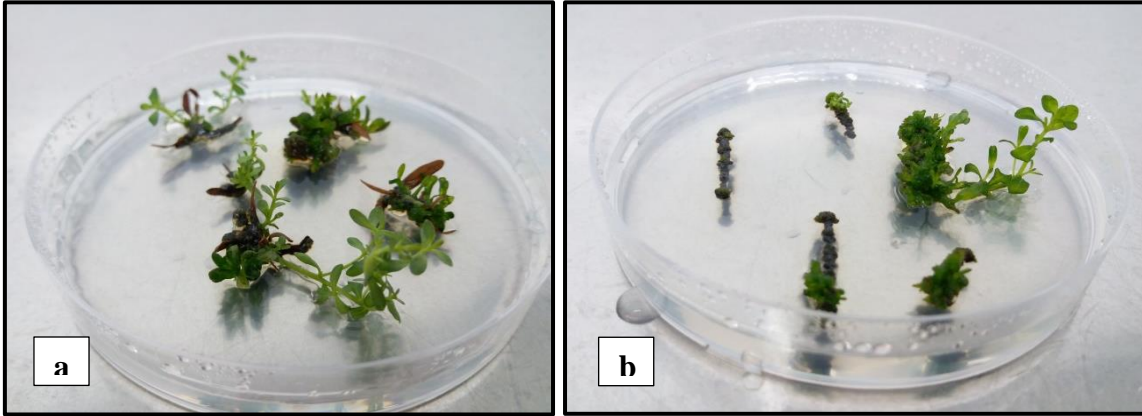
Şekil 4.6. 3 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Ortalama sürgün uzunluğu düşük olan yaprak eksplantları b. Ortalama sürgün uzunluğu yüksek olan yaprak eksplantları

4 numaralı ortam olarak kullanılan 1,5 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA içeren MS besin ortamında her iki eksplant türünde de sürgün oluşumu ve gelişimi gözlenmiştir. 35 günlük kültür süresince eksplant türlerinde farklı oranlarda ve sayıda sürgünler elde edilmiştir. Yaprak eksplantından %46,67 oranında sürgün gelişimi gözlenmiştir. Eksplant başına düşen sürgün sayısı ise 1,22 olarak belirlenmiştir. Sürgün boyları 0,5 cm olarak ölçülmüştür. Nod eksplantında ise %20,00 olarak belirlenen sürgün gelişiminin yaprak eksplantına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). Minimum sürgün boyu 0,5 cm olup maksimumu ise 1,1 olarak ölçülmüştür. Eksplant başına ortalama sürgün sayısı 0,33 olarak belirlenmiştir.



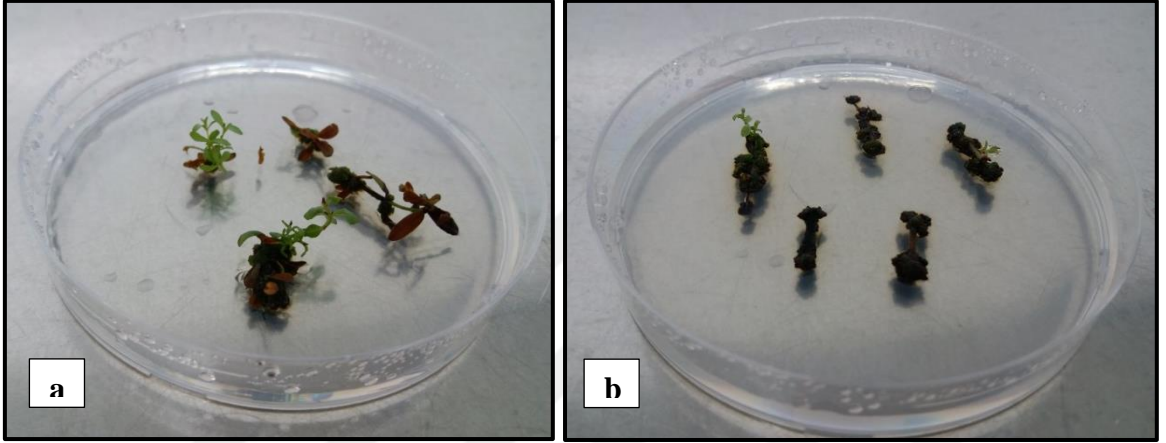
Şekil 4.7. 4 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi

5 numaralı ortam olarak kullanılan 1,5 mg/L BAP ve 1,5 mg/L NAA içeren MS besin ortamında her iki eksplant türünde de sürgün oluşumu ve gelişimi gözlenmiştir. 35 günlük kültür süresince eksplant türlerinde farklı oranlarda ve sayıda sürgünler elde edilmiştir. Yaprak eksplantından %100,00 oranında sürgün gelişimi gözlenmiş olup eksplant başına 3,67 sürgün elde edilmiştir. Minimum sürgün boyu 0,5 cm olarak ölçülürken 3,0 cm maksimum olarak ölçülmüştür. Nod eksplantında ise %53,33 olarak belirlenen sürgün gelişiminin yaprak eksplantına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Eksplant başına ortalama 1,67 sürgün hesaplanmıştır. 2,2 cm maksimum sürgün boyu olarak ölçülmüş ve minimumu 0,8 cm olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.8. 5 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi

6 numaralı ortam olarak kullanılan 1,5 mg/L BAP ve 2,5 mg/L NAA içeren MS besin ortamında her iki eksplant türünde de sürgün oluşumu ve gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.9). 35 günlük kültür süresince eksplant türlerinde farklı oranlarda ve sayıda sürgünler elde edilmiştir. Yaprak eksplantından %40,00 oranında sürgün gelişimi gözlenmiştir. Eksplant başına 2,22 sürgün sayısı belirlenmiş olup 1,0 cm uzunluğunda sürgünler elde edilmiştir. Nod eksplantında ise %20,00 olarak belirlenen sürgün gelişiminin yaprak eksplantına göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. 0,5 cm uzunluğunda sürgünler elde edilmiş olup eksplant başına ortalama 0,67 eksplant hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. 6 numaralı ortamda gelişen sürgünler a. Yaprak eksplantı için sürgün gelişimi b. Nod eksplantı için sürgün gelişimi

Elde edilen verilerin yaprak eksplantı (Çizelge 4.2) ve nod eksplantı için (Çizelge 4.3) tablo halinde özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren besin ortamlarındaki yaprak eksplantı için sürgün gelişim verileri ve varyans analizi sonucu

Deneme Adı	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Sürgün Geliştiren Eksplant Sayısı	Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı	Sürgün Gelişim Yüzdesi	Sağlıklı Gelişen Toplam Sürgün Sayısı
1	0,5	0,5	10ab	1,7cd	64,40b	18cd
2	0,5	1,5	9 b	3bc	60,00b	23bc
3	0,5	2,5	15 a	6a	100,00a	83a
4	1,5	0,5	9b	1,2cd	46,00b	9cd
5	1,5	1,5	15a	4b	100,00a	55b
6	1,5	2,5	6 b	2,2cb	40,00b	15bc
7 (kontrol grup 0 MS)	0	0	0c	0d	0c	0d
	F		0,00	0,00	0,00	0,00

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sarı kantaron bitkisinden alınan yaprak eksplantında Sürgün Geliştiren Eksplant Sayısı, Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı, Sürgün Gelişim Yüzdesi, Sağlıklı Gelişen Toplam Sürgün Sayısı bakımından bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ve konsantrasyonları arasında 0,01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren besin ortamlarındaki nod eksplantı için sürgün gelişim verileri ve varyans analizi sonucu

Deneme Adı	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Sürgün Geliştiren Eksplant Sayısı	Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı	Sürgün Gelişim Yüzdesi	Sağlıklı Gelişen Toplam Sürgün Sayısı
1	0,5	0,5	4cb	0,50cb	26,67c	6b
2	0,5	1,5	11a	3,22a	73,33a	35a
3	0,5	2,5	12a	4,33a	80,00a	50a
4	1,5	0,5	3c	0,33c	20,00c	3b
5	1,5	1,5	8b	1,70b	53,33b	10b
6	1,5	2,5	3cb	0,70cb	20,00c	3b
7 (kontrol grup 0 MS)	0	0	0	0	0c	0b
	F		0,00	0,00		0,0

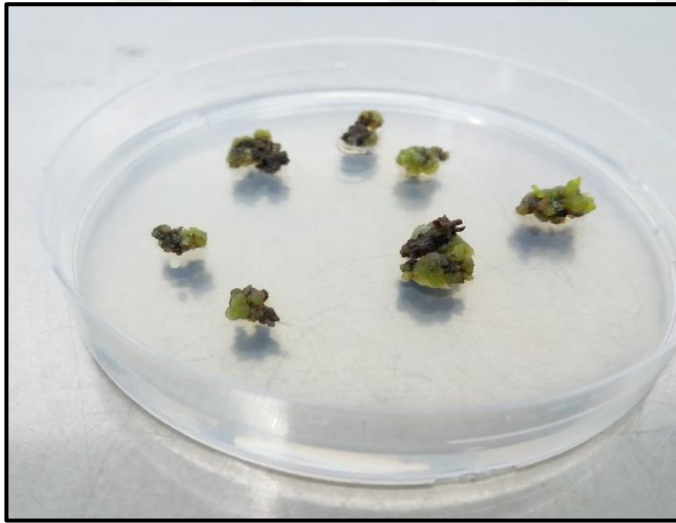
Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sarı kantaron bitkisinden alınan nod eksplantında Sürgün Geliştiren Eksplant Sayısı, Eksplant Başına Ortalama Sürgün Sayısı, Sürgün Gelişim Yüzdesi, Sağlıklı Gelişen Toplam Sürgün Sayısı bakımından bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ve konsantrasyonları arasında 0,01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

4.3. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların Kallus Kùltürleri

Elde edilen *in vitro* sürgünlerden sürgün gelişimi olmamış somatik embriyolardan kallus kùltürleri kurulmuştur. NAA (0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 1,5 mg/L ve 2,5 mg/L) içeren MS besin ortamlarına transfer edilmiştir (Çizelge 3.3).

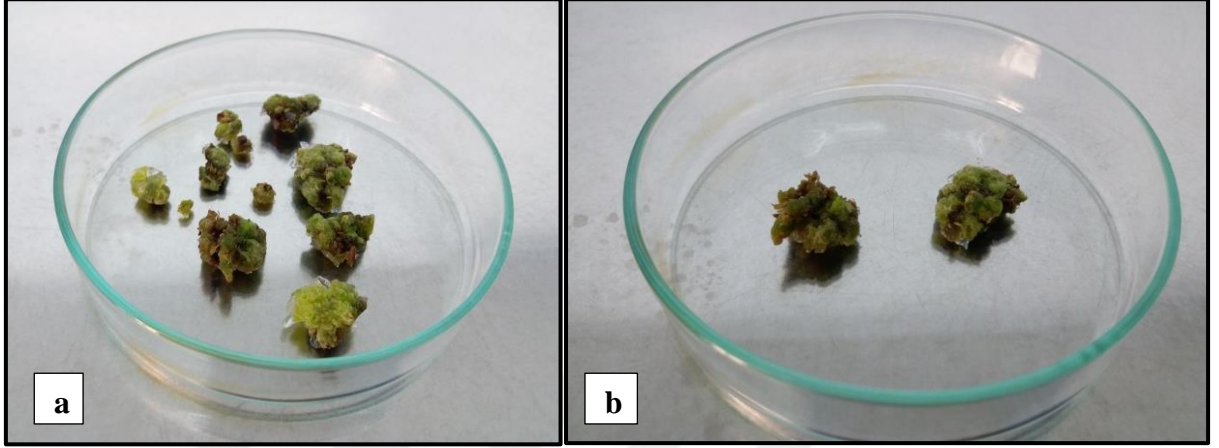
Dört farklı denemede kallus gelişimi gözlenmiştir. Kullanılan besin ortamlarında farklı ağırlıklarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Dört denemede de benzer yapıda kalluslar elde edilmiş olup yeşil renkte ve sert (kompakt) yapılı kallus gelişimi görülmüştür. Kallusların değerlendirilmesi yaş ve kuru ağırlık parametrelerine göre yapılmıştır. Her deneme için üçer tekerrür kurulmuştur.

1 numaralı kallus denemesinde alınan yaş ağırlık tartımlarında 0,2013 g ile 0,2923 g aralığında kallusların oluştuğu tespit edilmiştir. Ortalama olarak 0,2487 g yaş ağırlığa sahip kallusların geliştiği gözlenmiştir. 2 hafta oda şartlarında kurumaya bırakılan kallusların kuru ağırlıkları alınmış, 0,0189 g ile 0,0327 g aralığında kuru ağırlık ölçümleri alınmıştır. Ortalama kuru ağırlık ise 0,0246 g olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



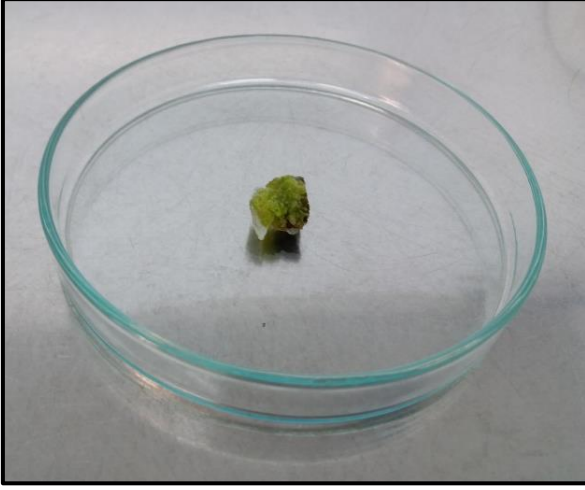
Şekil 4.10. 1 numaralı ortamda gelişen kalluslar

2 numaralı kallus denemesinde alınan yaş ağırlık tartımlarında 0,5322 g ile 0,6664 g aralığında kallusların oluştuğu tespit edilmiştir. Ortalama olarak 0,6284 g yaş ağırlığa sahip kallusların geliştiği gözlenmiştir. 2 hafta oda şartlarında kurumaya bırakılan kallusların kuru ağırlıkları alınmış, 0,0363 g ile 0,0772 g aralığında kuru ağırlık ölçümleri alınmıştır. Ortalama kuru ağırlık ise 0,0538 g olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



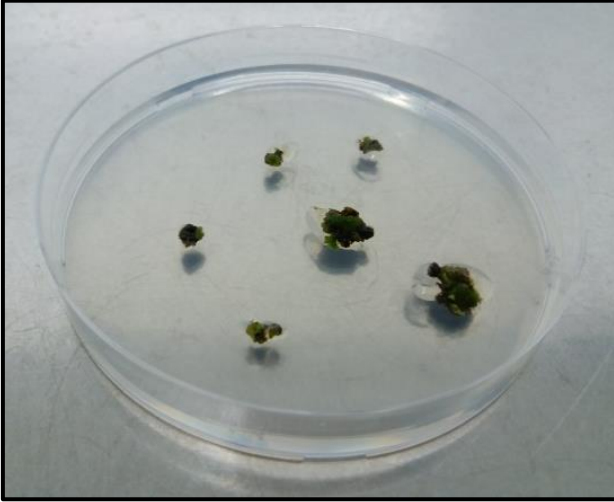
Şekil 4.11. 2 numaralı ortamda gelişen kalluslar a. Yeşil renkli ve kısmen kırılğan kallus yapısı b. Koyu yeşil-kahverengi sert kallus yapısı

3 numaralı kallus denemesinde alınan yaş ağırlık tartımlarında 0,3853 g ile 0,3010 g aralığında kallusların oluştuğu tespit edilmiştir. Ortalama olarak 0,3517 g yaş ağırlığa sahip kallusların geliştiği gözlenmiştir. 2 hafta oda şartlarında kurumaya bırakılan kallusların kuru ağırlıkları alınmış, 0,0325 g ile 0,0502 g aralığında kuru ağırlık ölçümleri alınmıştır. Ortalama kuru ağırlık ise 0,0383 g olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. 3 numaralı ortamda gelişen kallus

4 numaralı kallus denemesinde alınan yaş ağırlık tartımlarında 0,1180 g ile 0,1962 g aralığında kallusların oluştuğu tespit edilmiştir. Ortalama olarak 0,1643 g yaş ağırlığa sahip kallusların geliştiği gözlenmiştir. 2 hafta oda şartlarında kurumaya bırakılan kallusların kuru ağırlıkları alınmış, 0,0110 g ile 0,0208 g aralığında kuru ağırlık ölçümleri alınmıştır. Ortalama kuru ağırlık ise 0,0173 g olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. 4 numaralı ortamda gelişen kallus

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda NAA içeren besin ortamlarındaki bitkilerden kallus gelişim verileri ve varyans analizi sonucu

Deneme Adı	Kullanılan Ortam	Yaş Ağırlık (g)	Kuru Ağırlık (g)
1.deneme	0,5 mg/L NAA	0,25c	0,025bc
2.deneme	1,0 mg/L NAA	0,66a	0,053a
3.deneme	1,5 mg/L NAA	0,36b	0,040b
4.deneme	2,5 mg/L NAA	0,20c	0,020c
Kontrol Grubu	0	0d	0d
F	-	0,00	0,00

Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sarı kantaron bitkisinden alınan eksplantlarda kallus (yaş ve kuru ağırlık) gelişimi bakımından bakımından bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ve konsantrasyonları arasında 0.01 düzeyinde farklılık görülmüştür. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

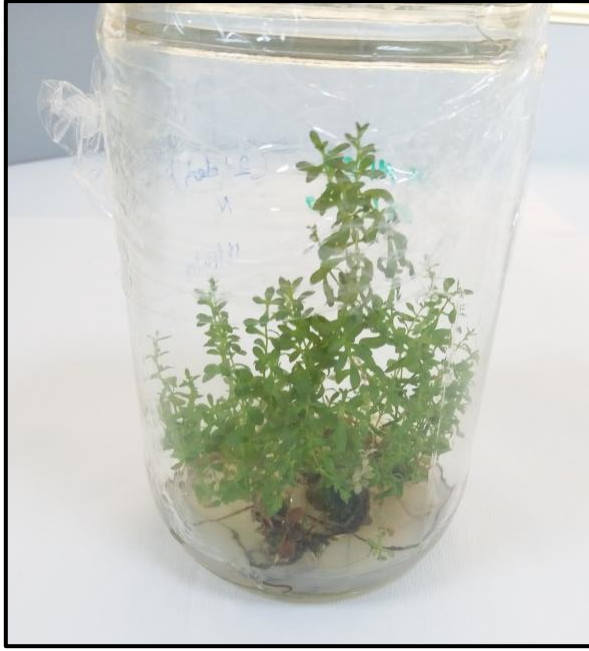
4.4. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantlardan *In vitro* Sürgünlerin Köklendirilmesi

Elde edilen *in vitro* sürgünlerin bir kısmı 35 günün sonunda köklendirme ortamlarına transfer edilmiştir. Köklendirme için IBA (0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L) içeren 0 MS besin ortamlarına kullanılmıştır (Çizelge 4.5).

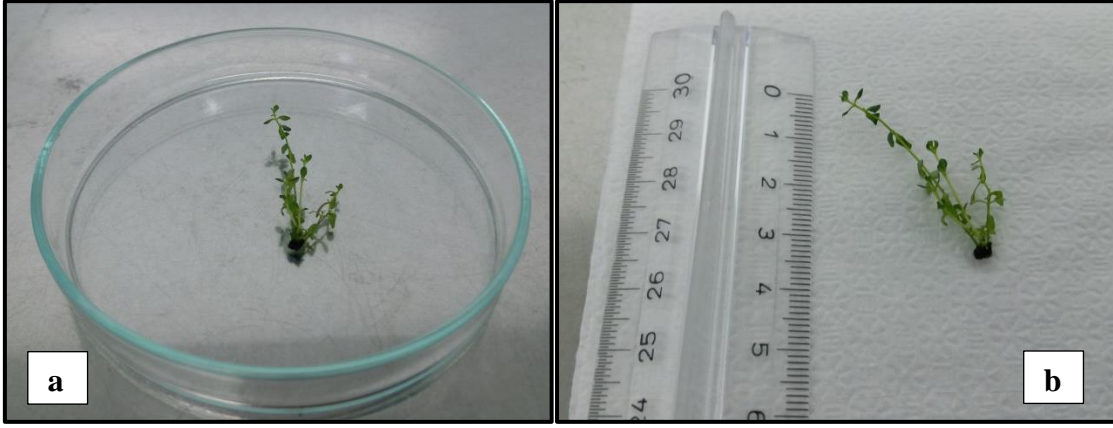
Kullanılan üç farklı ortamda 20 gün sonunda yapılan gözlemlerde 0,1 mg/L IBA içeren 1 numaralı köklendirme denemesinde kök gelişimi görülmüştür (Şekil 4.14, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). 2 ve 3 numaralı köklendirme denemelerinde kök gelişimi görülmemiştir (Şekil 4.15). Yapılan gözlemlerin sonucunda elde edilen verilere göre kök gelişim yüzdesi %53,33 olarak bulunmuş olup eksplant başına kök sayısı 1,11 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Eksplantlar 55 günün sonunda analiz için ortamdaki alınmıştır.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda IBA içeren besin ortamlarındaki bitkilerden kök gelişim verileri

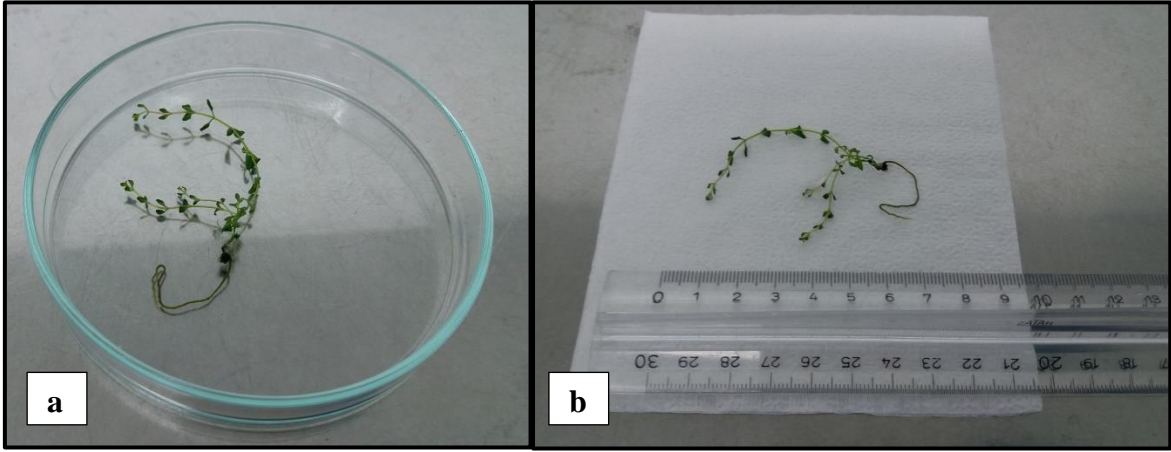
Deneme Adı	Kullanılan Ortam	Kök Gelişim Yüzdesi (%)	Eksplant Başına Kök Sayısı
1.deneme	0,1 mg/L IBA	53,33	1,11
2.deneme	0,5 mg/L IBA	Kök gelişimi gözlenmedi.	-
3.deneme	1,0 mg/L IBA	Kök gelişimi gözlenmedi.	-



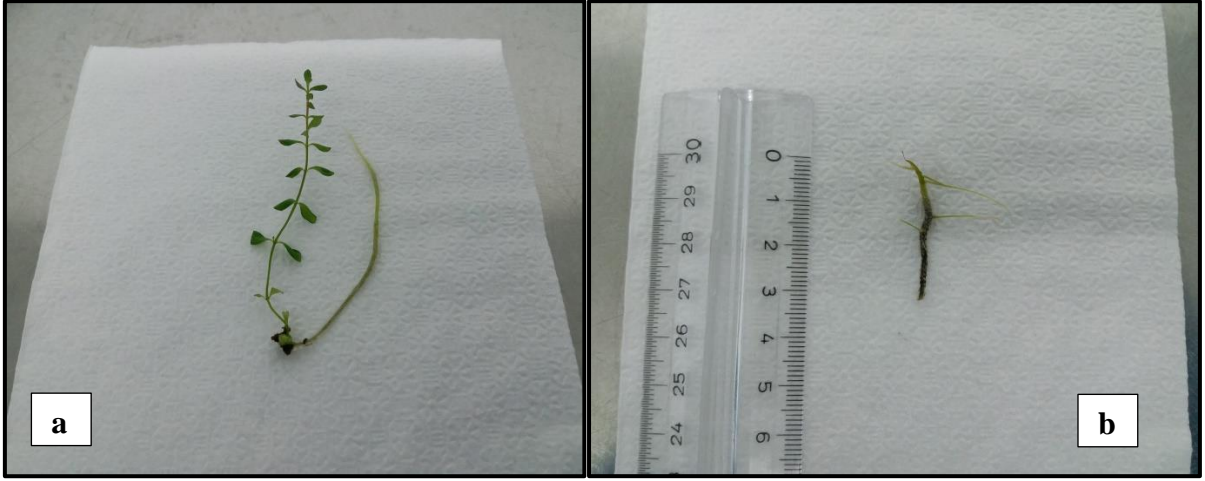
Şekil 4.14. Köklendirme ortamına transfer edilen ve kök gelişimi olan *in vitro* sürgünler



Şekil 4.15. 2 numaralı köklendirme ortamında bulunan eksplantlar a. Kök gelişimi bulunmayan eksplant b. Eksplantın ortalama uzunluğu



Şekil 4.16. 1 numaralı köklendirme ortamında bulunan eksplantlar a. Kök gelişimi gerçekleşen eksplant b. Eksplantın ortalama uzunluğu

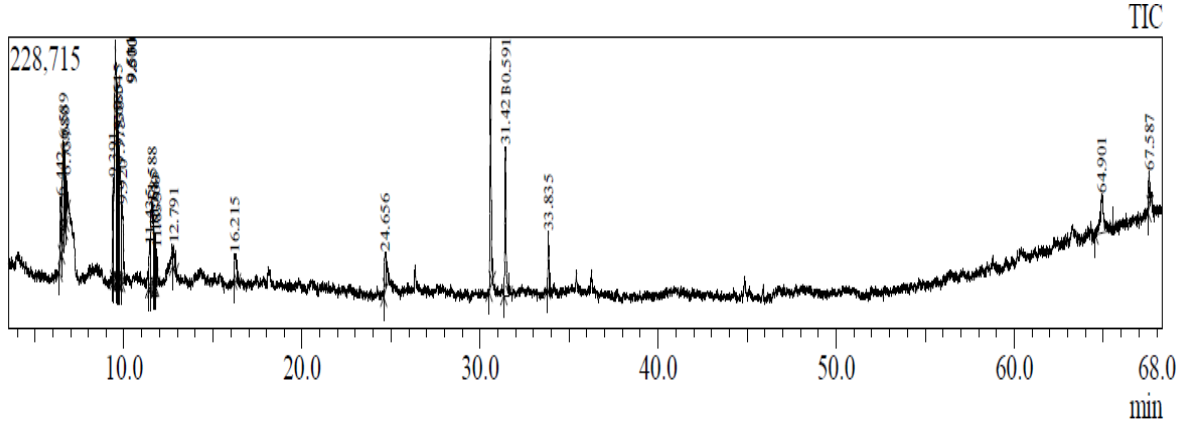


Şekil 4.17. 1 numaralı köklendirme ortamında bulunan eksplantlar a. Kök gelişimi gerçekleşen eksplant b. Gelişen köklerde ortalama uzunluk

4.5. GC-MS Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.5.1. Dış Koşullarda Yetişen Sarı Kantaron Bitkisinin Analiz Sonuçları

Yapılan analize göre dış koşullarda yetişen bitkide 26 adet farklı uçucu bileşen tespit edilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.18). Düz zincirli hidrokarbonlar, siklik yapıda hidrokarbonlar ve türevlerinin, terpen ve terpenik bileşikler, diğer yapıda bileşikler (keton, alkol, eter vb.) görülmüştür (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8). En çok bulunan üç bileşiğin cis-Osimen (%13,62), cis-myrtanol (%6,90) ve n-Nonane (%6,76) olduğu tespit edilmiştir. Total uçucu fitokimyasal içeriğin %40,84'nü terpen ve terpenoik bileşiklerin oluşturduğu görülmüştür. Monoterpen ve seskiterpenler elde edilmiştir. Bu bileşiklerin Alpha-pinene (%6,21), cis-Osimen (%13,62), 4-Thujen-2.alpha.-yl acetate (%4,54), Pseudolimonen (%3,85), Longipinene epoxide (%2,35), Cis-myrtanol (%6,90), Beta-farnesene (%1,96) ve Neryl acetone (%1,41) olduğu tespit edilmiştir. Düz zincirli ve siklik yapıda bileşikler ise toplam bileşenlerin %25,37'sini oluşturmaktadır. Diğer bileşiklerin ise %33,79'nu oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.18. Dış koşullardan yetişen bitkilerde yapılan analiz sonucunda elde edilen GC-MS kromatogramı

Çizelge 4.6. Dış koşullardan toplanan bitkilerin yapısında bulunan uçucu bileşenler

Bileşik adı	Alıkonna Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
2-methyl-octane	6,442	197343	2,32
n-Nonane	6,589	575022	6,76
Cyclohexene oxide	6.-,680	95375	1,12
Isobutyric acid allyl ester	6,737	140174	1,65
alpha-pinene	9,391	295275	3,47
cis-Ocimene	9,511	1157581	13,62
1-Methyl-3-nitro-5-phenoxy-1H-[1,2,4]triazole	9,570	286421	3,37
4-Thujen-2.alpha.-yl acetate	9,600	385952	4,54
Spiro[3,4-diazatricyclo[5.2.2.0(2,6)]undec-3-ene-5,1'-cyclopropane]	9,645	294209	3,46
Alpha-pinene	9,685	233131	2,74
Pseudolimonen	9,730	326993	3,85
2,5-Dimethyl-3-methylene-1,5-hexadiene	9,775	474142	5,58
2,7-dimethyl-(E) 3-Octen-5-yne	9,920	368973	4,34
1-chloro- Decane	11,435	199288	2,34

Çizelge 4.6. Dış koşıldan toplanan bitkilerin yapısında bulunan uçucu bileşenler (devam)

Bileşik adı	Alıkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
Spiro { 6,6-dimethyl-2,3-diazobicyclo [3.1.0] hex-2-ene-4,1'-cyclopropane }	11,588	525568	6,18
3-Methyl-4-nitro-5-(1-pyrazoly) pyrazole	11,685	111392	1,31
5-bromo-1-Pentene	12,791	104329	1,23
2-Methyldecane	16,215	186436	2,19
Longipinene epoxide	30,591	813094	2,35
Cis-myrtanol	31,421	586406	6,90
Beta-farnesene	33,835	166805	1,96
2-chloro octane	64,901	420934	4,95
Neryl acetone	67,587	119567	1,41
Bilinmeyen	11,760	140814	1,66
Bilinmeyen	11,833	96521	1,14

Çizelge 4.7. Dış koşıldan toplanan bitkinin terpen ve terpen türevi bileşikleri

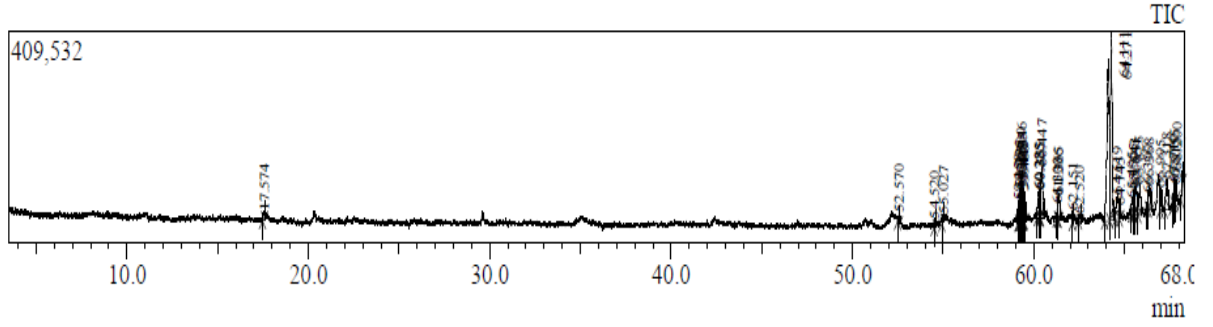
Bileşik adı	Bağlı Olduğu Grup	Alıkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
Alpha-pinene	Monoterpen	9,391	295275	6,21
cis-Ocimene	Monoterpen	9,511	1157581	13,62
4-Thujen-2.alpha.-yl acetate	Terpen türevi keton	9,600	385952	4,54
Pseudolimonen	Monoterpen	9,730	326993	3,85
Longipinene epoxide	Seskiterpen türevi eter	30,591	813094	2,35
Cis-myrtanol	Terpenoik alkol	31,421	586406	6,90
Beta-farnesene	Seskiterpen	33,835	166805	1,96
Neryl acetone	Monoterpenoik keton	67,587	119567	1,41

Çizelge 4.8. Dış koşuldan toplanan bitkinin düz zincirli hidrokarbonlar (alkan ve alkenler) ve türevi bileşikleri

Bileşik adı	Bağlı Olduğu Grup	Altkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
2-methyl-octane	Alkan	6,442	197343	2,32
n-Nonane	Alkan	6,589	575022	6,76
2,5-Dimethyl-3-methylene-1,5-hexadiene	Alken	9,775	474142	5,58
1-chloro- Decane	Halojenize Alkan	11,435	199288	2,34
5-bromo-1-Pentene	Halojenize Alkan	12,791	104329	1,23
2-Methyldecane	Alkan	16,215	186436	2,19
2-chloro octane	Alkan	64,901	420934	4,95

4.5.2. *In vitro* Sürgünlerin Analiz Sonuçları

In vitro sürgünler ile yapılan analizde ise 39 farklı uçucu bileşen tespit edilmiştir. Düz zincirli hidrokarbonlar, siklik yapıda hidrokarbonlar ve türevlerinin, terpen ve terpenik bileşikler, diğer yapıda bileşikler (keton, alkol, eter vb.) görülmüştür (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.19). En çok bulunan üç bileşiğin 1-[3-methyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)oxiranyl]- Ethanone (%22,63), Nerolidol Z ve E (%19,96) ve D-Nerolidol (%5,73) olduğu tespit edilmiştir. Total uçucu fitokimyasal içeriğin %35,36'sını terpen ve terpenoik bileşiklerin oluşturduğu görülmüştür. Monoterpen ve seskiterpenler elde edilmiş, seskiterpen içeriğinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu bileşiklerin Farnesol (%2,91), Alpha-Santanale (%1,18), D-Nerolidol (%5,73), Ledol (%1,85), Nerolidol Z ve E (%19,96), ve Geranylacetone (%3,73) olduğu tespit edilmiştir. Düz zincirli ve siklik yapılu bileşikler ise toplam bileşenlerin %6,94'nü oluşturmaktadır. Diğer bileşiklerin ise %57,70'ni oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10).



Şekil 4.19. *In vitro* sürgünler ile yapılan analiz sonucunda elde edilen GC-MS kromatogramı

Çizelge 4.9. *In vitro* sürgünlerin yapısında bulunan uçucu bileşenler

Bileşik adı	Alıkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
2,5-Dimethylpyrazine	17,574	77098	0,64
Chloroacetic acid, heptyl ester	52,570	75264	0,63
1-cyclopentyl-2-Propanone	54,520	76842	0,64
cis-1,5-Cyclooctanediol	55,027	86334	0,72
Oxalic acid	59,150	89617	0,75
1-[5-methyl-1-(4-methylfuran-3-yl)-1H-[1,2,3]triazol-4-yl]-Ethanone	59,206	180665	1,50
Isobutyroyl Pyrazine	59,235	153135	1,27
Farnesol	59,300	349594	2,91
2,3,5,6-Tetraethyl-2,5-Dibora-1,4-Dioxan	59,346	242876	2,02
3-butoxy-2-methyl-1-Butene	59,385	127869	1,06
5,8-Dimethyl Naphthalene	59,415	96231	0,80
Alpha-Santanale	59,440	141500	1,18
1-cyclohexyl-5-phenyl-3-Pentanone	59,480	192462	1,60
Methyl 2,2,3-trimethylcyclopentyl-ketone	60,285	258545	2,25
1-Bromodecane	60,325	110448	0,92
3-Octenoic acid, butyl ester	60,355	104707	0,87

Çizelge 4.9. *In vitro* sürgünlerin yapısında bulunan uçucu bileşenler (devam)

Bileşik adı	Alınma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
D-Nerolidol	60,447	688476	5,73
5,5-Dimethyl- Bicyclo[2.1.1]Hexane-1-Carboxylic Acid	61,300	68219	0,57
1-Methylheptyl cis-2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)cyclopropanecarboxylate	61,336	90639	0,75
Ledol	61,365	222190	1,85
1-(1,1-Dimethylethyl)-4-Methyl Cyclohexane	62,151	71465	0,59
2-methyldecane	62,520	69948	0,58
1-[3-methyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)oxiranyl]- Ethanone	64,111	2717947	22,63
Nerolidol Z and E	64,271	2397438	19,96
1-butoxy-3-methyl-2-Butene	64,619	426852	3,55
1-Methyl-4-Phenylperhydro-1,4-Azaphosphorine	64,745	89037	0,74
2-methylene-, (3.beta,5.alpha.) Cholestan-3-ol	65,505	108569	0,90
19,19-Dimethyl-eicosa-8,11-dienoic acid	65,543	103264	0,86
Geranylacetone	65,651	447550	3,73
3,7,11-trimethyl-, (E,E)- 2,6,10-Dodecatrien-1-ol	65,825	444871	3,70
Z-Citral	66,300	113552	0,95
3,5,5-trimethyl-1-Hexene	66,368	281467	2,34
3,3,5-Trimethylheptane	66,995	173826	1,45
5-Butylnonane	67,318	434882	3,62
Decahydroquinoline-10-ol	67,710	108607	0,90
Decanoic acid, 2-ethylhexyl ester	67,755	136822	1,14

Çizelge 4.9. *In vitro* sürgünlerin yapısında bulunan uçucu bileşenler (devam)

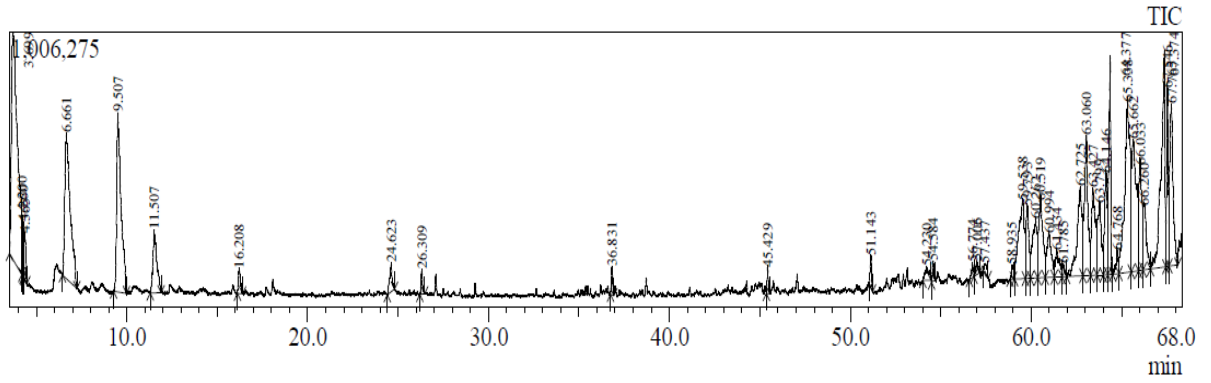
Bileşik adı	Alıkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
Cis-Syn 1,3-Dimethylthymine Dimer	67,815	117375	0,98
2-propyl-1-Heptanol	68,200	146538	1,22
Bilinmeyen	65,405	188584	1,57

Çizelge 4.10. *In vitro* sürgünlerin terpen ve terpen türevi bileşikleri

Bileşik adı	Bağlı Olduğu Grup	Alıkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
Farnesol	Seskiterpenoik alkol	59,300	349594	2,91
Alpha-Santanale	Seskiterpen	59,440	141500	1,18
D-Nerolidol	Seskiterpen	60,447	688476	5,73
Ledol	Seskiterpen	61,365	222190	1,85
Nerolidol Z and E	Seskiterpen	64,271	2397438	19,96
Geranylacetone	Monoterpenoik keton	656,51	447550	3,73

4.5.3. Kallus Kültürlerinin Analiz Sonuçları

Kalluslar ile yapılan analizde ise 40 farklı uçucu bileşen tespit edilmiştir. Düz zincirli hidrokarbonlar, siklik yapıda hidrokarbonlar ve türevlerinin, terpen ve terpenik bileşikler, diğer yapıda bileşikler (keton, alkol, eter vb.) görülmüştür (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.20). En çok bulunan üç bileşiğin 1,3,5-Cycloheptatriene (%12,14), 2-Methylundecane (%8,13) ve Farnesane (%7,94) olduğu tespit edilmiştir. Total uçucu fitokimyasal içeriğin %29,39'unu terpen ve terpenoik bileşiklerin oluşturduğu görülmüştür. Monoterpen ve seskiterpenler elde edilmiş, seskiterpen içeriğinin yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.12). Bu bileşiklerin Alpha-Pinene (%6,64), (-)-beta-Pinene (%2,11), Farnesane (%7,94), Farnesol (%6,94), Nerolidol Z ve E (%3,43), ve Geranylacetone (%2,33) olduğu tespit edilmiştir. Düz zincirli ve siklik yapıda bileşikler ise toplam bileşenlerin % 65,77'ni oluşturmaktadır (Çizelge 4.13). Diğer bileşiklerin ise %4,84'nü oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.20. Kalluslar ile yapılan analiz sonucunda elde edilen GC-MS kromatogramı

Çizelge 4.11. Kallusların yapısında bulunan uçucu bileşenler

Bileşik adı	Alıkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
1,3,5-Cycloheptatriene	3,699	19599040	12,14
Methylfulvene	4,200	780145	0,48
p-(benzyloxy) phenol acetate	4,260	459770	0,28
Toluene	4,365	1325134	0,82
2,6-Dimethylheptane	6,661	11183172	6,93
Alpha-pinene	9,507	10715366	6,64
(-)-beta-Pinene	11,507	3400838	2,11
2-methyldecane	16,208	695780	0,43
Guanidine carbonate	24,623	960640	0,60
4-ethyl-5-methyl- Nonane	26,309	494902	0,31
4-methyl- Tridecane	36,831	497272	0,31
n-Tetradecane	45,429	448448	0,28
1,2-Benzenedicarboxylic acid	51,143	540113	0,33
1-Chlorooctadecane	54,230	681350	0,42
Isooctane	54,584	378951	0,23
Farnesane	56,774	383696	0,24

Çizelge 4.11. Kallusların yapısında bulunan uçucu bileşenler (devam)

Bileşik adı	Altkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
1-Iodo-2-methylundecane	57,006	408021	0,25
5-butyl- Nonane	57,437	413959	0,26
2,3-dimethyl- Nonadecane	58,935	332288	0,21
Farnesol	59,538	6402779	3,97
1-Iodo-2-methylundecane	59,793	3007069	1,86
5-Butylnonane	60,262	3850254	2,39
Farnesol	60,519	4794373	2,97
2-Methylundecane	60,994	2903611	1,80
4,6,8-trimethyl-1-Nonene	61,434	1420455	0,88
1-Iodoundecane	61,785	369977	0,23
2,3,5,8-Tetramethyldecane	62,725	6129276	3,80
1-Chlorooctadecane	63,060	6845372	4,24
Farnesane	63,427	4693037	2,91
4-Methylundecane	63,799	3871032	2,40
2-Nitro-1,3-bis-octyloxy-benzene	64,146	3774438	2,34
Nerolidol Z and E	64,377	5528495	3,43
3,7,11-trimethyl-6,10-Dodecadien-1-yn-3-ol	64,768	791783	0,49
2-Methylundecane	65,338	13118934	8,13
1-Iodo-2-methylnonane	65,662	8867870	5,49
1-Iodo-2-methylundecane	66,033	4727663	2,93
Undecane	66,260	3053107	1,89
6-propyl- Tridecane	67,374	12072226	3,97
(Z)-Geranylacetone	67,546	3764340	2,33
Farnesane	67,763	7728022	4,79

Çizelge 4.12. Kallusların terpen ve terpen türevi bileşikleri

Bileşik adı	Bağlı Olduğu Grup	Ahkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
Alpha-pinene	Monoterpen	9,507	10715366	6,64
(-)-beta-Pinene	Monoterpen	11,507	3400838	2,11
Farnesane	Seskiterpen	56,774	383696	0,24
Farnesol	Seskiterpenoik alkol	59,538	6402779	3,97
Farnesol	Seskiterpenoik alkol	60,519	4794373	2,97
Farnesane	Seskiterpen	63,427	4693037	2,91
Nerolidol Z and E	Seskiterpen	64,377	5528495	3,43
(Z)-Geranylacetone	Monoterpenoik keton	67,546	3764340	2,33
Farnesane	Seskiterpen	67,763	7728022	4,79

Çizelge 4.13. Kalluslarda düz zincirli hidrokarbonlar (alkan ve alkenler) ve türevi bileşikler

Bileşik adı	Bağlı Olduğu Grup	Ahkonma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
1,3,5-Cycloheptatriene	Siklo alken	3,699	19599040	12,14
Methylfulvene	Siklo alken	4,200	780145	0,48
2,6-Dimethylheptane	Alkan	6,661	11183172	6,93
2-methyldecane	Alkan	16,208	695780	0,43
4-ethyl-5-methyl- Nonane	Alkan	26,309	494902	0,31
4-methyl- Tridecane	Alkan	36,831	497272	0,31
n-Tetradecane	Alkan	45,429	448448	0,28
1-Chlorooctadecane	Halojenize alkan	54,230	681350	0,42
Isooctane	Alkan	54,584	378951	0,23
1-Iodo-2-methylundecane	Halojenize alkan	57,006	408021	0,25
5-butyl- Nonane	Alkan	57,437	413959	0,26

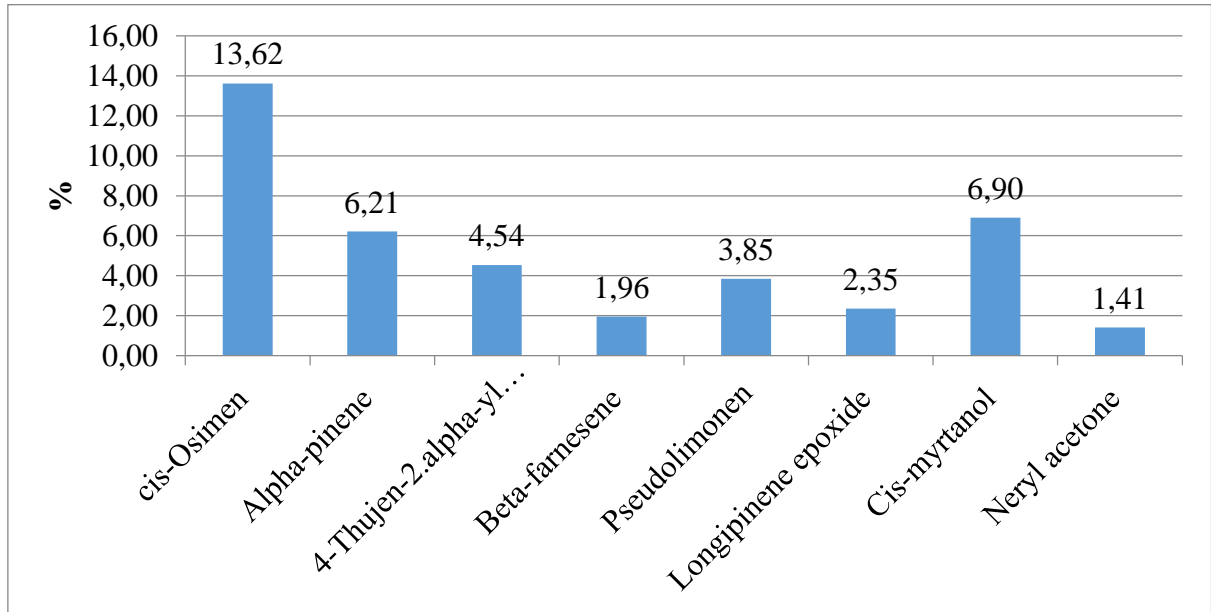
Çizelge 4.13. Kalluslarda düz zincirli hidrokarbonlar (alkan ve alkenler) ve türevi bileşikler (devam)

Bileşik adı	Bağlı Olduğu Grup	Alınma Zamanı (RT)	Alan (Area)	% Alan (Area%)
2,3-dimethyl- Nonadecane	Alkan	58,935	332288	0,21
1-Iodo-2-methylundecane	Halojenize alkan	59,793	3007069	1,86
5-Butylnonane	Alkan	60,262	3850254	2,39
2-Methylundecane	Alkan	60,994	2903611	1,80
4,6,8-trimethyl-1-Nonene	Alken	61,434	1420455	0,88
1-Iodoundecane	Halojenize alkan	61,785	369977	0,23
2,3,5,8-Tetramethyldecane	Alkan	62,725	6129276	3,80
1-Chlorooctadecane	Halojenize alkan	63,060	6845372	4,24
4-Methylundecane	Alkan	63,799	3871032	2,40
2-Methylundecane	Alkan	65,338	13118934	8,13
1-Iodo-2-methylnonane	Halojenize alkan	65,662	8867870	5,49
1-Iodo-2-methylundecane	Halojenize alkan	66,033	4727663	2,93
Undecane	Alkan	66,260	3053107	1,89
6-propyl- Tridecane	Alkan	67,374	12072226	7,48

4.5.4. Dış Koşullarda Yetişen Bitki ile *In vitro* Koşullarda Yetişen Bitkicikler ve Gelişen Kallusların İçeriklerinin Karşılaştırılması

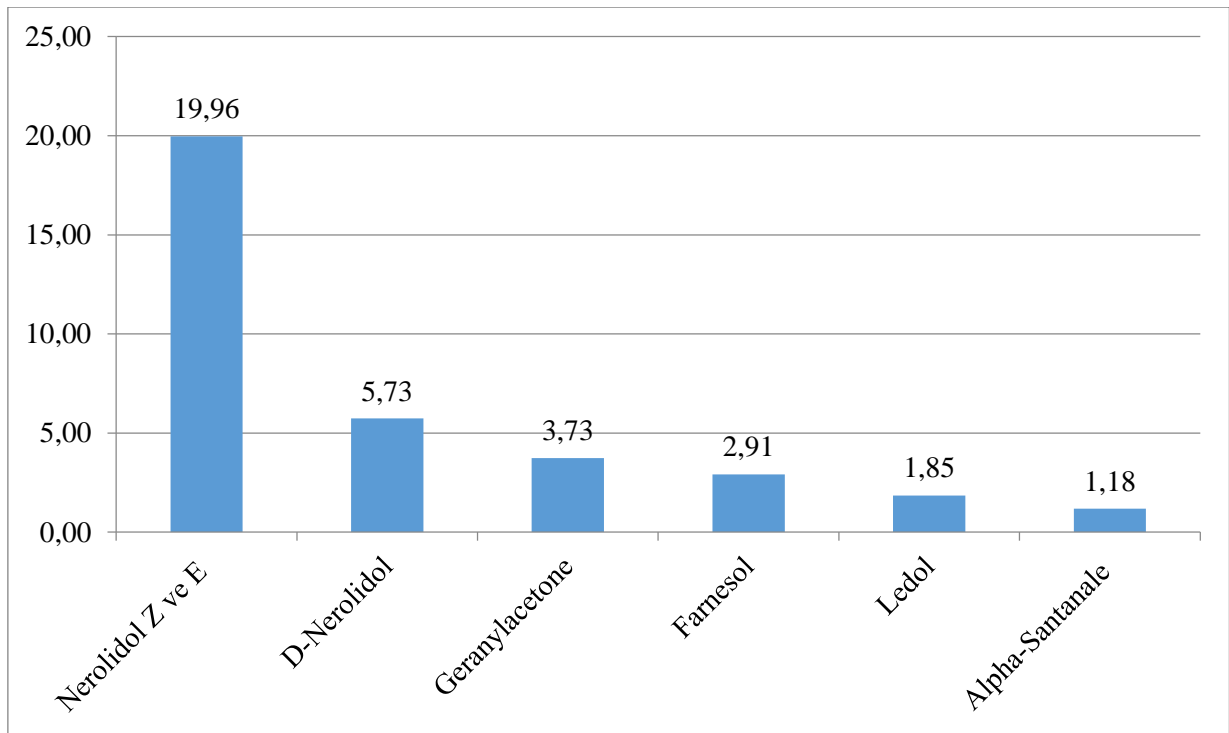
Dış koşullarda yetişen bitkiler ile *in vitro* koşullarda yetişen bitkicikler ve gelişen kalluslar fitokimyasal açıdan farklılık göstermektedir. En çok bulunan beş bileşik açısından değerlendirildiğinde farklı oranlarda bulunan farklı bileşikler içerdikleri görülmüştür.

Dış koşullarda yetişen sarı kantaron büyesinde en çok cis-Osimen (%13,62), cis-myrtanol (%6,90), n-Nonane (%6,76), Spiro {6,6-dimethyl-2,3-diazobicyclo [3.1.0] hex-2-ene-4,1'-cyclopropane}(%6,18) ve 2,5-Dimethyl-3-methylene-1,5-hexadiene (%5,58) bileşiklerini içermektedir. Total uçucu bileşen içeriğinin ise %40,84'ü terpen ve terpen türevi bileşiklerden oluşmaktadır. Alpha-pinene (%6,21), cis-Osimen (%13,62), 4-Thujen-2.alpha.-yl acetate (%4,54), Pseudolimonen (%3,85), Longipinene epoxide (%2,35), Cis-myrtanol (%6,90), Beta-farnesene (%1,96) ve Neryl acetone (%1,41) bileşiklerinin bulunduğu görülmüştür. Fitokimyasal içeriğinin uçucu bileşenler açısından tamamına bakıldığında ise %40,84'ü terpen ve türevi hidrokarbonlardan, %25,37'si diğer hidrokarbonlardan ve %33,79 ise diğer bileşiklerden oluşmaktadır (Şekil 4.21).



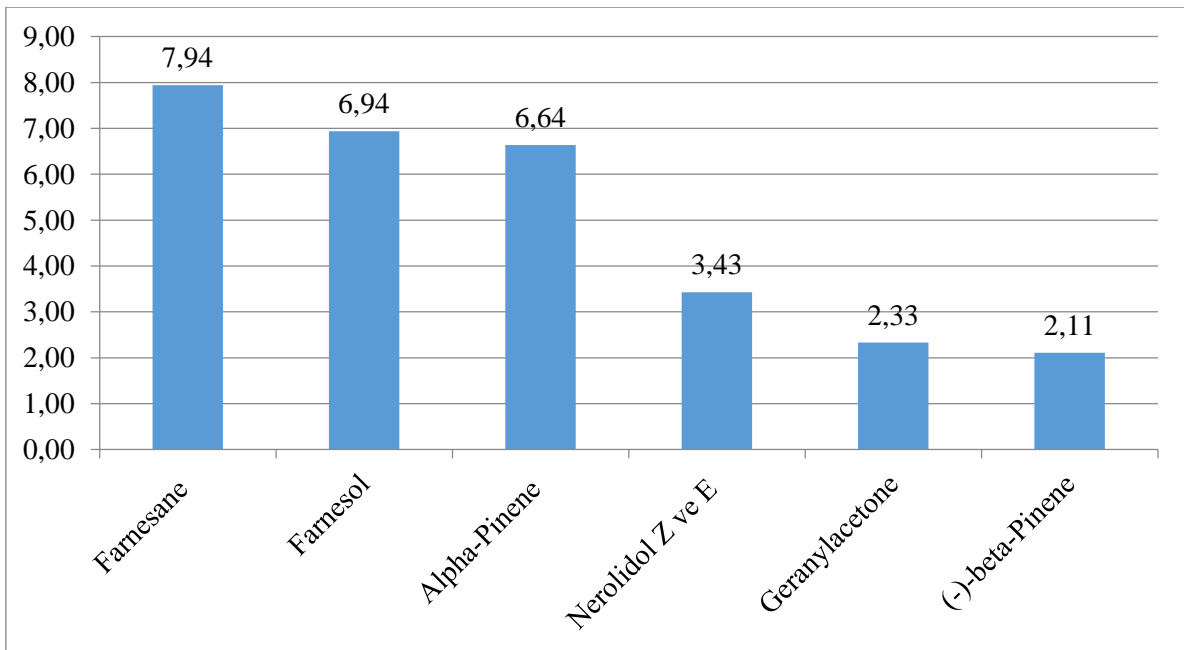
Şekil 4.21. Dış koşullarda yetişen bitkilerde bulunan terpen ve türevi bileşenler

In vitro sürgünlere bakıldığında ise 1-[3-methyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)oxiranyl]-Ethanone (%22,63), Nerolidol Z ve E (%19,96), D-Nerolidol (%5,73), Geranylacetone (%3,73) ve 3,7,11-trimethyl-, (E,E)- 2,6,10-Dodecatrien-1-ol (%3,70) en fazla bulunan beş bileşendir. Total uçucu fitokimyasal içeriğin %35,36'sını terpen ve terpenoik bileşiklerin oluşturduğu görülmüştür. Farnesol (%2,91), Alpha-Santanale (%1,18), D-Nerolidol (%5,73), Ledol (%1,85), Nerolidol Z ve E (%19,96), ve Geranylacetone (%3,73) olduğu tespit edilmiştir. Fitokimyasal içeriğinin uçucu bileşenler açısından tamamına bakıldığında ise %35,36'sı terpen ve türevi hidrokarbonlardan, %6,94'ü diğer hidrokarbonlardan ve %57,70 ise diğer bileşiklerden oluşmaktadır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. *In vitro* sürgünlerde bulunan terpen ve terpen türevleri

Kallus kültürlerinde de fitokimyasal içerikte farklılıklar görülmüştür. En çok bulunan beş bileşiğin 1,3,5-Cycloheptatriene (%12,14), 2-Methylundecane (%8,13), Farnesane (%7,94), 2,6-Dimethylheptane (%6,93) ve Alpha-pinene (%6,64) olduğu tespit edilmiştir. Total uçucu fitokimyasal içeriğin %29,39'unu terpen ve terpenoik bileşiklerin oluşturduğu görülmüştür. Bu bileşiklerin Alpha-Pinene (%6,64), (-)-beta-Pinene (%2,11), Farnesane (%7,94), Farnesol (%6,94), Nerolidol Z ve E (%3,43), ve Geranylacetone (%2,33) olduğu tespit edilmiştir. Fitokimyasal içeriğinin uçucu bileşenler açısından tamamına bakıldığında ise %29,39'u terpen ve türevi hidrokarbonlardan, %65,77'si diğer hidrokarbonlardan ve %4,84'ü ise diğer bileşiklerden oluşmaktadır (Şekil 4.23).

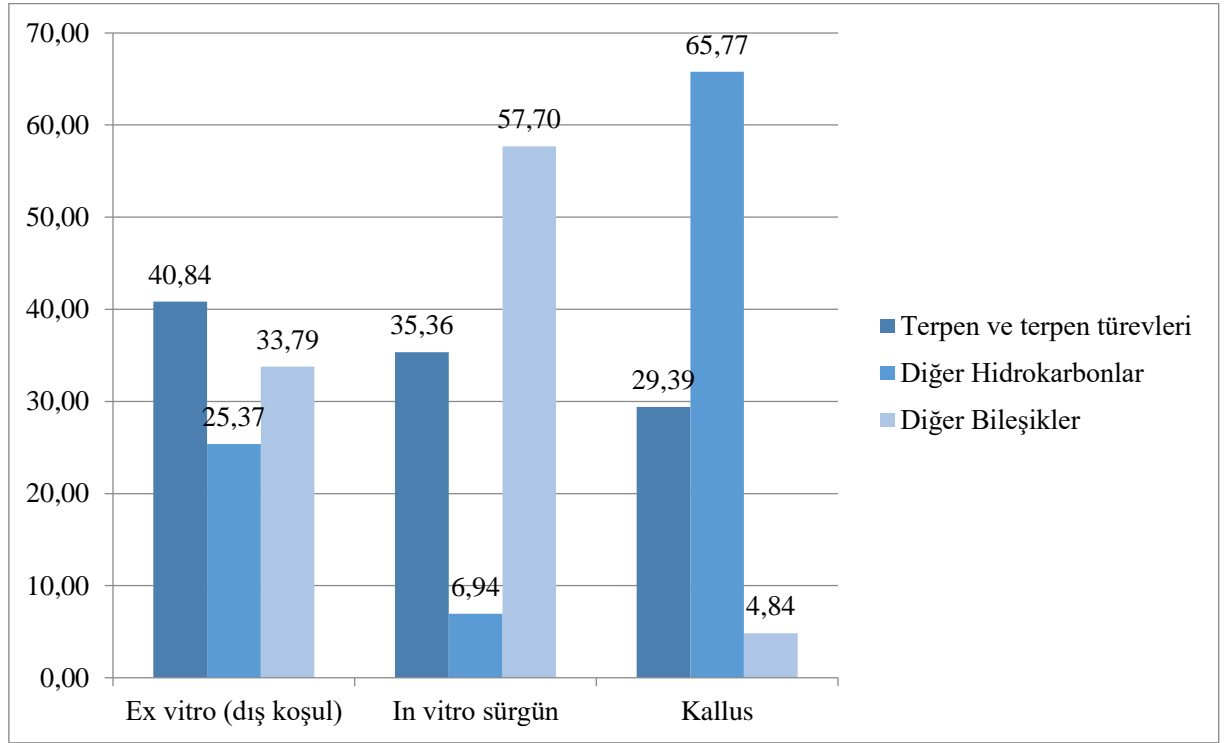


Şekil 4.23. Kalluslarda terpen ve tepen türevleri

Üç farklı bitkisel materyalin fitokimyasal içeriklerini terpen ve terpen türevi, diğer hidrokarbonlar (terpen olmayan hidrokarbonlar) ve diğer bileşikler açısından karşılaştırmak mümkündür. Terpen ve terpen türevleri açısından bakıldığında en yüksek oran %40,84 ile dış koşul (*ex vitro*) bitkilerinde elde edilmiştir. %35,36 ile *in vitro* sürgünler ikinci sırada yer almaktadır. Kalluslarda ise bu oran % 29,39 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.24).

Çizelge 4.14. Üç farklı bitkisel materyalde içerik karşılaştırması

Bitkisel Materyal	Terpen ve terpen türevleri	Diğer Hidrokarbonlar (Terpenler olmayanlar)	Diğer Bileşikler
<i>Ex vitro</i> (dış koşul)	%40,84	%25,37	%33,79
<i>In vitro</i> sürgünler	%35,36	%6,94	%57,70
Kallus	%29,39	%65,77	%4,84

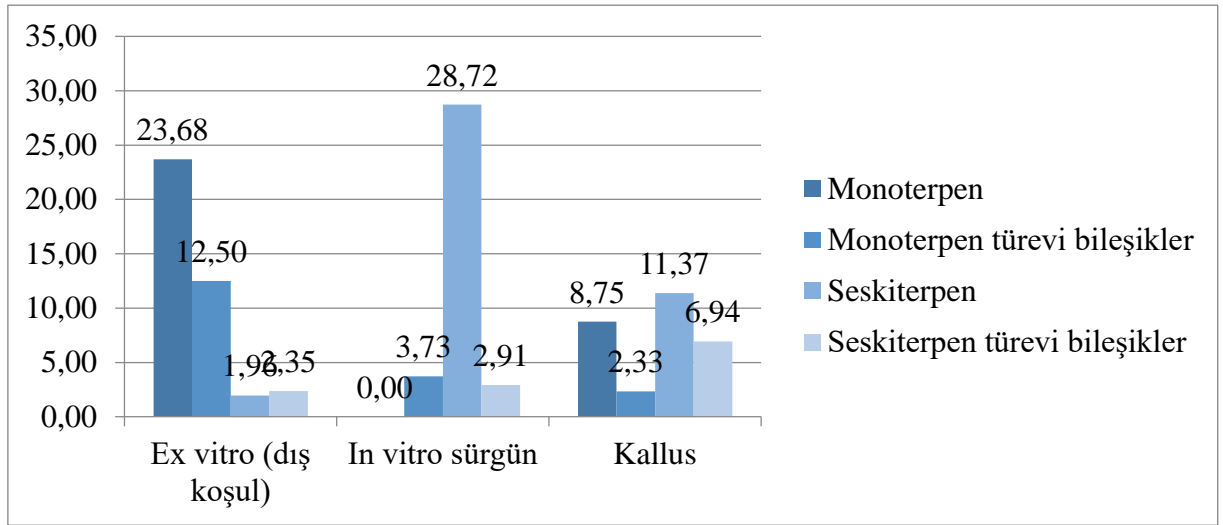


Şekil 4.24. Üç farklı bitkisel materyalde içerik karşılaştırması

Terpen ve terpen türevi bileşiklere bakıldığında ise monoterpen ve seskiterpenlerin tespit edildiği görülmüştür. Dış koşulda yetişen sarı kantaronda monoterpen içeriğinin, *in vitro* sürgün ve kalluslarda ise seskiterpen içeriğinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.25).

Çizelge 4.15. Üç farklı bitkisel materyalde içeriklerin terpenler açısından karşılaştırılması

Bitkisel Materyal	Monoterpen	Monoterpen türevleri	Seskiterpen	Seskiterpen türevleri
<i>Ex vitro</i> (dış koşul)	%23,68	%12,50	%1,96	%2,35
<i>In vitro</i> sürgünler	%0,00	%3,73	%28,72	%2,91
Kallus	%8,75	%2,33	%11,37	%6,94



Şekil 4.25. Üç farklı bitkisel materyalde içeriklerin terpenler açısından karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Gerçekleştirilen bu çalışmada, farklı eksplant tipleri için sterilizasyon protokollerinin oluşturulmasının ardından sürgün ve kallus kültürleri kurulmuş. Yapılan ilk deneme sonucunda eksplantlar üzerinde sadece somatik embriyo ve sürgün gelişimi görülmüştür. Kurulan ilk ortamlarda kallus görülmediği için 35 günün sonunda sürgün gelişimi olmayan somatik embriyolar kallus geliştirmek amacıyla kallus gelişim ortamlarına alınmıştır. Gelişen sürgünlerden bir kısmı köklendirme ortamına ihtiyaç duyulmadan köklenmiştir ancak gelişim göstermeyen sürgünler ise köklendirme ortamlarına transfer edilmiştir. Çalışmanın devamında elde edilen *in vitro* sürgünler ve gelişen kallusların fitokimyasal içeriği uçucu bileşenler açısından dış koşullarda (*ex vitro*) yetişen sarı kantaron bitkisi ile karşılaştırılmıştır. Bu şekilde doku kültürünün temel avantajlarından biri olan mevsimden bağımsız bitki yetiştirilmesinin dış koşullar ile yetişen bitkilere olan benzerliklerinin karşılaştırılmasına adına bir protokol belirlenmiştir. Elde edilen bu protokol, daha sonraki hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit miktarının artırılmasına yönelik olan geniş ölçekli çalışmalarda bir yol gösterici olacaktır. Bu çalışma ile bugüne kadar gerçekleştirilmiş çalışmalara katkı sağlanmış, ileriki dönemlerde de gerçekleştirilecek olan diğer çalışmalara ışık tutması hedeflenmiştir.

5.1. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre en iyi sterilizasyon uygulaması 2 numaralı sterilizasyon denemesi olarak bulunmuştur. Bu denemede ön yıkama yapılmış ve devamında %70'lik (v/v) etanol çözeltisinde 1 dk bekletilmiş ve %35'lik (v/v) çamaşır suyu içerisinde 3 dk bekletilmiştir. Her iki eksplant türü içinde %100 sterilizasyon başarısı olduğu görülmüştür. Eksplantlarda herhangi bir kararma ve vitrifikasyon gözlemi yapılmamıştır. *In vitro* sürgün kültürlerinin kurulması için bu protokol kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir.

İlk sterilizasyon denemesinden farklı olarak sterilizasyon ajanının konsantrasyonunun artmasının kontaminasyon oranını düşürdüğü söylenebilir. 1 numaralı denemede çamaşır suyu içerisinde bekletme süresi artılarak kontaminasyon oranı düşürülebilir. Ancak eksplantların sterilizasyon ajanı içerisinde uzun süreli olarak bekletilmesi eksplantların *in vitro* koşullarda gelişimini olumsuz etkilemektedir. Bu protokol ile minimum zarar ile kısa sürede sterilizasyon başarısının her iki eksplant türü içinde gerçekleştirildiği söylenebilir. Benzer şekilde sarı kantaron ile yapılan bir çalışmada ise genç sürgünler %70'lik (v/v) etil alkol

çözeltisinde 30 s bekletilmiş ve daha sonra %0,1 (w/v) HgCl₂ 3 dk bekletilerek sterilizasyon sağlanmıştır (Goel vd., 2009). Yapılan başka çalışmada ise sarı kantaronun tohum sterilizasyonu için %70'lik etanol çözeltisi ve %1,5'lik çamaşır suyu kullanılmıştır (Wojcik vd., 2007).

5.2. Sarı Kantaron Bitkisinden Elde Edilen Eksplantların *In vitro* Sürgün ve Kallus Kültürleri

Genel olarak sarı kantaron bitkisinde yapılan denemeler sonucu oksin miktarının yüksek ve sitokinin miktarının düşük olduğu ortamlarda eksplantların üzerinde kallus yerine somatik embriyo gelişimi gözlenmiştir ve sürgün gelişiminde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sürgün gelişiminde ise her iki eksplant türü içinde en iyi sonuca 3 numaralı ortam olarak kullanılan 0,5 mg/L BAP ve 2,5 mg/L NAA içeren 0 MS besin ile ulaşılmıştır. Yaprak eksplantında %100 sürgün gelişimi gözlenmiş olup nod eksplantında ise %80 sürgün gelişimi gözlenmiştir. En düşük sürgün gelişim yüzdeleri ise 4 (1,5 mg/L BAP+0,5 mg/L NAA) ve 6 (1,5 mg/L BAP+1,5 mg/L NAA) numaralı ortamlarda, yaprak eksplantında %46,67 ve %40,00 iken nod eksplantında ise %20,00 olduğu görülmüştür. 35 gün sonunda yapılan gözlem sonuçlarına göre her iki eksplant türü değerlendirildiğinde yaprak eksplantının kullanımının, sürgün gelişim yüzdesi ve eksplant başına düşen sürgün sayısı açısından daha avantajlı olduğu görülmüştür. Goel vd. (2009), yaptıkları çalışmada sürgün gelişimi ve kallus başlangıcı için 0,25 mg/L Kinetin ve 0,5 mg/L 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamı kullanarak 8 haftalık bir sürede gelişim gözlemlemiştir. Franklin ve Dias (2006), yaptıkları çalışmada *H.perforatum* bitkisine ait dört farklı genotipi kullanmış ve farklı eksplant kullanımının organogenez ve embriyogenez çalışmalarında rejenerasyon farklılığı oluşturduğunu tespit etmiştir. Başka bir çalışmada ise TDZ kullanılarak *in vitro* rejenerasyon protokolü oluşturulmuştur. IAA ve BA kullanımının hipokotil eksplantlarında rejenerasyonu teşvik etmediği raporlanmıştır (Murch vd., 2000).

Kallus geliştirmek için ilk denemelerde gelişen somatik embriyolar kullanılmıştır. Kurulan ikinci denemelerde sadece NAA ile desteklenmiş 0 MS ortamları kullanılmıştır. Kullanılan ortamlarda kallus yaş ve kuru ağırlıkları değerlendirilmiştir. En yüksek yaş ve kuru ağırlık 2 numaralı ortam olan 1,0 mg/L NAA içeren 0 MS ortamından elde edilmiştir. En düşük kallus ağırlığına ise 2,5 mg/L NAA içeren 4 numaralı denemede ulaşılmıştır. Tüm kallus denemelerinde koyu renkli yeşil-kahverengi kalluslar elde edilmiştir. Pasqua vd. (2003), *in vitro* sürgünlerden kallus gelişimi için yaprak eksplantlarını kullanmış ve 1,105 mg/L 2,4-

D, 0,215 mg/L Kinetin ve 0,186 mg/L NAA içeren MS ortamını kullanmıştır. Kültür koşulu olarak karanlık ortam kullanmıştır. Beş kez alt kültür işlemi gerçekleştirerek kırılğan ve beyaz yapılı kallusların geliştiğini raporlamıştır. Gadzovska vd. (2005), *in vitro* çimlenmiş tohumlardan elde edilen aksiler tomurcukları kullanarak kallus kültürü oluşturmuştur. Yüksek konsantrasyonda (3,0-5,0 mg/L) BA içeren MS ortamının kallus formasyonunu indüklediğini raporlamıştır. Gadzovska vd. (2013) yılında yaptıkları çalışmada ise kallus gelişimi için 1,0 mg/L 2,4-D, 0,1 mg/L NAA ve 0,5 mg/L BA kullanmıştır.

In vitro sürgünlerin bir kısmı analiz için ayrılırken bir kısmı köklendirme ortamlarına transfer edilmiştir. Köklendirme ortamı olarak IBA içeren 0 MS besin ortamları kullanılmıştır. Üç farklı denemede kök gelişimi sadece 0,1 mg/L IBA içeren ortamda görülmüştür. 2 ve 3 numaralı ortarlarda kök gelişimi görülmemiştir. Artan IBA konsantrasyonun kök gelişimini teşvik etmediği belirlenmiştir. Wojcik vd. (2007), yaptıkları çalışmada IAA'nin *Hypericum perforatum* için köklenmeye etkisini araştırmıştır. Bu çalışmaya göre ilk beş günlük gözlem sonucunda kök gelişimi gözlenmemiştir. Köklenme için kültürlerin gözlem süreleri artırıldığında hem kök gelişiminin arttığı hem de kök yapısının güçlendiği raporlanmıştır.

5.3. Dış Koşullarda Yetişen Bitki ile *In vitro* Koşullarda Yetişen Bitkiler ve Gelişen Kallusların İçeriklerinin Karşılaştırılması

Dış koşullarda yetişen bitkiler ile *in vitro* koşullarda yetişen bitkiler ve gelişen kalluslar fitokimyasal açıdan farklılık göstermektedir. En çok bulunan beş bileşik açısından değerlendirildiğinde farklı oranlarda bulunan farklı bileşikler içerdikleri gözlenmiştir.

Dış koşullarda yetişen bitkilerin fitokimyasal içeriklerinin daha yoğun olduğu görülmektedir. Sekonder metabolit içeriklerinin bitkilerde artmasındaki en büyük etken stres faktörleridir (Oluk, 2006). *Ex vitro* koşullarda bulunan bitkiler çevresel faktörlerin tamamından etkilenmektedir. Abiyotik ve biyotik stres faktörleri fitokimyasalların artışına neden olmaktadır. *In vitro* koşullar bitkilerin stabil koşullarda yetiştirildiği yapay ortamlardır (Güven ve Gürsul,2014). Dolayısıyla *ex vitro* koşullara benzer sonuçların elde edilmesi için farklı uygulamalar yapılmalıdır.

Uçucu yağ bileşenlerin en önemlisi terpen ve terpen türevi bileşikleridir (Umay, 2007). Bu açıdan bakıldığında dış koşullarda yetişen sarı kantaron bitkisinin çiçek ve gövde kısımlarından %40,84 ile en yüksek oranda terpen bileşikleri elde edilmiştir. Devamında ise %35,36 ile *in vitro* sürgünlerin geldiği görülmüştür. *H. perforatum* bitkisi bünyesindeki pek çok fitokimyasal yaprak ve çiçeklerinde bulundurmaktadır. Kallus formları tam olarak yaprak ve çiçek formlarında olmadığı için terpen ve türevleri açısından *in vitro* sürgünlerin ve *ex vitro* bitkinin %5,48 oranında altında kaldığı görülmüştür. Ancak total olarak bakıldığında uçucu bileşenler açısından kallus formlarının iyi durumda olduğu sonuçlarda görülmüştür. İlerleyen çalışmalarda özellikle hücre süspansiyon kültürlerinde yapılacak olan stres çalışması uygulamalarının dış koşullarda yetişen bitkilere göre daha avantajlı olduğu ön görülebilir. Dış koşullarda yetişen bitkilerde monoterpen oranının yüksek olduğu görülürken, *in vitro* koşulların (sürgün ve kallus olarak) seskiterpen açısından yüksek olduğu görülmüştür. Dış koşul bitkilerinde elde edilen sonuçlarda bir monoterpen olan cis-Osimen miktarının fazlalığı tespit edilmiştir. *In vitro* sürgünlerde ise Nerolidol oranının yüksek olduğu, kalluslarda ise Farnesane seskiterpeninin yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Yapılan çalışmalarda *H.perforatum* bitkisinde pek çok farklı uçucu yağ bileşenleri tespit edilmiştir. Genellikle terpenik ve düz zincirli hidorkarbonlar tespit edilmiş olup piene, kadinen gibi seskiterpenler gözlenmiştir (Anonim, 2001). Çırak vd. (2010), Türkiye'nin kuzeyinde yer alan 10 farklı ilden yabancı popülasyondan *H.perforatum* toplayarak esansiyel yağlarındaki dağılımı incelemiştir. Çiçek kısımları toplanarak GC-MS yardımıyla uçucu bileşenler analizlenmiştir. Örnek hazırlığı için havayla kurutulmuş 200 g bitkisel materyal Clevenger aparatı yardımıyla hidrodistilasyon yöntemi kullanılmıştır. Esansiyel yağ ise hekzan yardımıyla çözdürülerek analizleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre 10 farklı lokasyonda da seskiterpen ve monoterpenler tespit edilmiştir. β -karopilen (%4,08–5,93), γ -muurolen (%5,00–9,56), β -selinen (%5,08–19,63), α -selinen (%4,12–10,42), d-cadinen (%3,02–4,94), α - and β -pinen, myrcen, linalool, cis- and trans-linalool oksit, and α -terpineol gözlenen bileşenler arasındadır.

Yaptıkları çalışmada kimyasal içeriklerin genetik özelliklere ve çevresel faktörlere bağlı olduğunu raporlamıştır. Yapılan bir çalışmada, Antalya bölgesinde yetişen bazı medikal aromatik bitkilerin fitokimyasal içeriklerini TOF-LC/MS ve GC-MS cihazı ile incelemiştir. *Echinacea pallida* Nutt., *Melissa officinalis* L., *Hypericum perforatum* L. ve *Sideritis syriaca* L. ile yaptıkları çalışmada *H. perforatum* türüne ait ekstrede %31,7 oran ile octadecatrienoic acid ana bileşen olarak bulunmuştur (Küçük vd., 2018).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tıbbi kullanımı ve bulundurduğu fitokimyasallar açısından değerli bir bitki olan sarı kantaron bitkisi ile yapılan bu çalışmada iki farklı eksplant türü için ortak bir sterilizasyon prosedürü oluşturulmuştur. *In vitro* sürgün gelişimi için 0,5 mg/L BAP ve 2,5 mg/L NAA ile desteklenmiş 0 MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie) besin ortamının en uygun besin ortamı olduğu görülmüştür. Yaprak eksplantlarında yapılan 35 günlük kültür sonucunda eksplant başına 5,53, nod eksplantında ise 4,33 sürgün elde edilerek sarı kantaronun *in vitro* yetiştirilmesinde faydalı bir protokol geliştirildiği ortaya konmuştur. Denediğimiz ortamlarda oksin miktarı yüksek olmasına rağmen kallus gelişim oranı düşük bulunmuştur. En iyi kallus gelişimi 1,0 mg/L NAA ile desteklenmiş 0 MS (with include vitamins, Duchefa Biochemie) ortamında elde edilmiştir. Gelişen kallusların ise çalışmanın devamında yapılacak olan hücre süspansiyon kültürlerinin kurulmasına kaynak sağlayabileceği görülmüştür. Yapılan analizler ile üç farklı bitki koşulunun içeriklerinin çok farklı olmadığı *in vitro* koşullarda yetiştirilen sürgünlerin ve geliştirilen kallusların stres uygulaması gerçekleştirildiğinde fitokimyasal bileşen açısından daha da zengin olacağı ön görülmüştür.

Yapılan bu çalışmanın temel amacı sterilizasyon protokolünün devamında gelişen sürgün ve kallusların *ex vitro* ile uyumluluğunun araştırılmasıdır. Bu amaca ek olarak *in vitro* köklendirme çalışması da yapılmıştır. İlerleyen araştırmalarda farklı ortamlar kullanılarak kök gelişimi arttırılabilir. Ayrıca elde edilen kalluslar yeşil-kahverengi ve kompakt yapıdadır. Kültür süresi ise 60 gündür. Normal şartlarda kallus kültürlerinin devamı olarak yapılan hücre süspansiyon çalışmalarında beyaz-krem renkli ve dağılabilir kallusların gelişmesi önemlidir. Farklı bitki büyüme düzenleyiciler kullanılarak istenen özelliklere sahip kallus gelişimi sağlanabilir.

Sonuç olarak tıbbi aromatik açıdan önemli sarı kantaron bitkisinin dışarıdan toplanmasına ve mevsime bağlı kalınmadan ekonomik bir çoğaltma protokolü sağlanmış olup, geliştirilen bu yöntem ile standart fitokimyasal içeriğe sahip sarı kantaronların elde edilebileceği gösterilmiş oldu.

KAYNAKLAR

- Alali, F.Q., Tahawa, K. ve Gharaibeh, M. (2009). LC-MS and LC-PDA Analysis of *Hypericum empetrifolium* and *Hypericum sinaicum*. *Z. Naturforsch*, 64, 476-482.
- Altan, A., Damlar, İ., Aras M.H. ve Alpaslan, C. (2015). Sarı Kantaronun (*Hypericum perforatum*) Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24 (4): 578-579.
- Aluani, D., Tzankova, V., Yordanov, Y., Zhelyazkova, A., Georgieva, E. ve Yoncheva, K. (2016). Quercetin: An overview of biological effects and recent development of drug delivery system. *Pharmacia*, 63(4): 52-60.
- Anonim. (2001). *Final Report on the Safety Assessment of Hypericum Perforatum Extract and Hypericum Perforatum Oil*. 7 Şubat 2020, <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1080/10915810160233749>
- Asgarpanah, J. (2012). Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Hypericum perforatum* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (19), 1387-1394.
- Assesment Report on *Hypericum perforatum* L. (2009). Herba, European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products, November, London.
- Atalay, E., Erkoyuncu, M.T., Erişen, S. ve Yorgancılar, M. (2017). Endemik *Astragalus trojanus* Stev'in Nodal Kültür ile Mikroçoğaltımı. *YYÜ Tar. Bil. Derg.*, 27(2), 268-275.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak M. (2002). Doku Kültürü Temel Laboratuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, 2.Baskı, (Ed.) M.Babaoğlu, E.Gürel, S.Özcan, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Bais, H.P., Walker, T.S., McGrew, J.J. ve Vivanco, J.M. (2002). Factors affecting growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (ST. John's wort) and production of hypericin. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*, 38 (1), 58-65.
- Banerjee, A., Bansyopadhyay, S. ve Rychaudhuri, S.S. (2012). *In vitro* regeneration of *Hypericum perforatum* L. using thidiazuron and analysis of genetic stability of regenerants. *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 92-98.

- Barnes, J., Anderson, L.A. ve Philipson J.D. (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 583-600.
- Batz, O., Logemann, E., Reinold, S. ve Hahlbrock, K. (1998). Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biol Chem.*, 379, 1127–1135.
- Bayram, E., Arabacı, O. ve Çakmak, H.E. (2009). Bornova Ekolojik Koşullarında *Hypericum perforatum* L. Klonlarının Agronomik Özelliklerinin ve Hypericin Oranlarının Belirlenmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 39(3), 41-48.
- Betz, G.A., Knappe, C. ve Lapierre, C. (2009). Ozone affects shikimate pathway transcripts and monmeric lignin composition in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Eur J Forest Res.*, 128,109–116.
- Birman, H. (2012). Bitkisel Flavonoid Bileşiklerinin Biyoaktiviteleri Ve Muhtemel Etki Mekanizmaları. *İst Tıp Fak Derg*, 75 (3), 46-49.
- Biswas, M. K., Roy, U.K., Islam, R. ve Hossain, M. (2010), Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three stawberry (*Fragaria* sp.) clones, *Turk J Biol*, 34, 75-80.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. (2001), Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science*, 161, 839-851.
- Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F. ve Peterlongo, F. (1998). Identification by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and quantification by highperformance liquid chromatography–UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography*, 825, 9-16.
- Brondz, I., Greibrokk, T., Groth, P. ve Aasen, A. (1983). The absolute configuration of hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L. based on the crystal structure determination of its parabromobenzoate ester. *Acta Chem Scand*, 37, 263-65.

- Conceiçao, L.F.R., Ferreres, F., Tavares, R.M. ve Dias, A.C.P. (2006). Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry*, 67 (2), 149-155.
- Craik, D. ve Malik, U. (2013). Cylotide Biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17, 546-554.
- Cui, X.H., Chakrabarty, D., Lee, E.J. ve Paek, K.Y. (2010). Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology*, 101, 4708-4716.
- Cui, X.H., Murthy, H.N. ve Paek, K.Y. (2014). Pilot-Scale Culture of *Hypericum perforatum* L. Adventitious Roots in Airlift Bioreactors for the Production of Bioactive Compounds. *Appl Biochem Biotechnol*, 174, 784-792.
- Çakmak, H.E. ve Bayram, E (2003). Muğla Orijinli Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Populasyonlarının Bazı Agronomik ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 40 (1), 57-64.
- Çelen, G., Özkan, S. ve Ayhan, F. (2008). The Phenolic compounds from *Hypericum Perfortaum* and Their Antimicrobial Activities. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 36 (4), 339-345.
- Çırak, C., Bertoli, A., Pistelli, L. ve Seyis, F. (2010). Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* from wild populations of northern Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 48(8), 906–914.
- Çırak, C. ve Kurt, D. (2014). Önemli Tıbbi Bitkiler Olarak *Hypericum* Türleri ve Kullanım Alanları. *Anadolu*, 24, 38-52.
- Demirci, T., Özdamar, D. ve Baydar, N.G. (2015). Tıbbi Aromatik Bitkiler ile Sebzelerde Kök Kaynaklı Sekonder Metabolitlerin Üretiminin Artırılmasına Yönelik *In vitro* Uygulamalar, *Türk Tarım Gıda ve Teknoloji Dergisi*, 3 (5), 261-270.
- Dias, A.C.P., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Ferreres, F. ve Ferreira, M.F. (2001). Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. *Journal of Plant Physiology*, 158 (7), 821-827.

- Doughari, J.H. (2012). *Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. 8 Şubat 2020, <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/phytochemicals-extraction-methods-basic-structures-and-mode-of-action-as-potentialchemotherapeutic->
- Duru M.E (1993). *Liquidambar orientalis var. orientalis ve Liquidambar orientalis var. integriloba Yapraklarından Elde Edilen Uçucu Yağın Analizi* (Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Dündar, Y. (2001). Fitokimyasallar ve Sağlıklı Yaşam. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2, 131-138.
- Ebel, J. ve Scheel, D. (1992). Elicitor recognition and signal transduction. In: Boller T, Meins F. *Genes Involved in Plant Defense*. New York: Springer-Verlag, 183–205.
- Ekren, S., Sönmez, Ç. ve Bayram, E. (2011). Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Klonlarında Bazı Tarımsal ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 16, 225-234.
- Erkoyuncu, M.T. ve Yorgancılar, M. (2015). Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ile Sekonder Metabolit Üretimi, *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 2 (1), 66-76.
- Evcimen, M. ve Aslan, R. (2015). Yaygın Kullanıma Sahip Tıbbi Aromatik Bitkilerdeki Bazı Antioksidan Fitokimyasalların Fizyolojik Etkileri. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 8 (2), 59-72.
- Franchi, G.G., Nencini, C., Collavoli, E. ve Massarelli, P. (2011). Composition and antioxidant activity in vitro of different St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17), 4349-4353.
- Franklin, G. ve Dias, A.C.P. (2006). Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. *In vitro Cellular and Development Biology Plant*, 42 (4), 324-330.
- Gadzovska, S., Maury, S., Ounnar, S., Righezza, M., Kascakova, S., Ferregiers, M., Spasenoski, M., Joseph, C. ve Hagege, D. (2005). Identificaiton and quantificaiton of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L., in vitro cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 591–601.

- Gadzovska, S., Maury, S., Ounnar, S., Righezza, M., Kascakova, S., Ferregiers, M., Spasenoski, M., Joseph, C. ve Hagege, D. (2007). Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on roduction of phenlypropanoids and naphodiantrones. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 89, 1-13.
- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spaenoski, M., Hagege, D., Courtois, D. ve Joseph, C. (2013). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphodiantrones and phenlypropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 113, 25-39.
- Gaid, M., Haas, P., Beuerle, T., Scholl, S. ve Beerhues, L. (2016). Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. *Journal of Biotechnology*, 222, 47-55.
- Goel, M.K., Kukreja, A.K. ve Bisht, N.S. (2009). *In vitro* manipulations in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) for incessant and scale up microprogapagation using adventitious roots in liquid medium and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 96, 1-9.
- Gaid, M., Haas, P., Beuerle, T., Scholl, S., Beerhues, L. (2016). Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. *Journal of Biotechnology*, 222, 47-55.
- Güven, A. ve Gürsul, I. (2014), Bitki Doku Kültüründe Sekonder Metabolit Sentezi, *Gıda*, 39 (5), 299-306.
- Gürel, A., Hayta, Ş., Nartop, P., Bayraktar, M. ve Fedakar, S. (2013), Bitki Hücre Doku ve Organ Kültürü Uygulamaları, Ege Üniversitesi Yayınları, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir
- Gönülşen, N. (1991), Germplazm Muhafazasında Kullanılan *In Vitro* Teknikleri, *Anadolu Dergisi Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yay.*, 49-68 .
- Gueven, A. ve Knorr, P. (2011). Isoflavanoid Productionby Soy Plant Callus Suspension Culture. *Journal of Food Engineering*, 103, 237-243.
- Hepaksoy, S. (2004). Bazı Kiraz Anaçlarının Mikroçoğaltımı Üzerinde Araştırmalar I. Gelişme ve Çoğalma. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 41 (3), 11-22.

- Hışıl, Y., Şahin, F. ve Omay, S. (2005). Kantaronun (*Hypericum perforatum* L.) Bileşimi ve Tıbbi Önemi. *Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 4(15), 212-218.
- Hosni, K., Msaada, K., Taarit, M.B., Hammami, M. ve Marzouk, B. (2010). Bioactive components of three *Hypericum* species from Tunisia: A comparative study. *Industrial Crops and Products*, 31, 158-163.
- Karakuş, P. (2011). *Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetişen ve endemik bir tür olan Hypericum Spectabile'nin in vitro mikroçoğaltım yollarının araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi), Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Kılıç, O. ve Özdemir, F.A. (2016). *In vitro* callus culture and callus essential oil compositions of ten populations *Hypericum scabrum* L. from Turkey. *Progress in Nutrition*, 18 (2), 166-175.
- Kumlay, A.M. ve Dursun, A. (2003). Bitki Genetik Mühendisliği ve Ekonomik Öneme Sahip Bazı Bitkilerde Genetik Mühendisliği Uygulamaları. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34 (2), 209-216.
- Küçük, S., Tüfekçi, A.R., Gül, F. ve Demirtaş, İ. (2018). Determination of Phytochemical Contents of Some Medicinal Aromatic Plants (*Echinacea pallida*, *Melissa officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Sideritis syriaca*) Belonging to Antalya Region. *Eurasian J. Bio. Chem. Sci.*, 1(1), 29-32.
- Murashige, T. ve Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- Murch, S.J., Choffe, K.L., Victor, J.M.R., Slimmon, T.Y., KrishnaRaj, S. ve Saxena, P.K. (2000). Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*. Cv 'Anthos'). *Plant Cell Reports*, 19 (6), 576-581.
- Napoli, E., Siracusa, L., Ruberto, G., Carrubba, A., Lazzara, S., Speciale, A., Cimino, F. ve Saija, A. (2018). Phytochemical profiles, phototoxic and antioxidant properties of eleven *Hypericum* species e A comparative study. *Phytochemistry*, 152, 162-173.

- Özcan, A. (2015). *Konya ekolojik şartlarında yetiştirilen sarı kantaron (Hypericum Perforatum L.)'un farklı hasat zamanları ve kurutma yöntemlerinin verim ve bazı kalite özellikleri üzerine etkileri* (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Özkaynak, E. ve Samancı, B. (2005). Mikroçoğaltımda Alıştırma. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (36), 28-36.
- Pasqua, G., Avato, P., Monacelli, B., Santamaria, A.R. ve Argentieri, M.P. (2003). Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science*, 165, 977-982.
- Pretto, F.R. ve Santern, E.R. (2000). Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 62, 107-113.
- Rusalepp, L., Raal, A. ve Maeorg, U. (2017). Comparison of chemical composition of *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* in Estonia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 73, 41-46.
- Sağır, Z.Ö. (2016). *Türkiye' De Yetişen Endemik Sideritis L. Türlerinin (Sideritis Pisidica Boiss. Et Heldr. Apud Bentham, S. Phrygia Bornm., S. Brevibracteata P.H. Davis) Fitokimyasal Analizleri* (Doktora Tezi), Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Saraçoğlu, H.T. (2011). *İç Anadolu Bölgesi'nde yetişen bazı Bupleurum L. (Apiaceae) taksonlarının uçucu yağ bileşimleri ve antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi* (Doktora Tezi), Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Saroglou, V., Marin, P.D., Rancic, A., Veljic, M. ve Skaltsa, H. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 146-152.
- Sharma Y.K. ve Davis, K.R. (1997). The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biol Medicine*, 23, 480-488.

- Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O. ve Dias, A.C.P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, 90, 157-167.
- Sirvent, T. ve Gibson, D. (2002). Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60, 311-320.
- Solomon, D., Adams, J. ve Graves, N. (2013). Economic evaluation of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of mild to moderate depression. *Journal of Affective Disorders*, 148, 228-234.
- Snedecor, G.W. ve Cochran, W. G. (1967). *Statistical Methods*, 246-248.
- Tatsis, E.C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A.N., Vervoort, J. ve Gerothanassis, I.P. (2007). Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*, 68, 383-393.
- Topçu, Ş. ve Çölgeçen, H. (2015), Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (2), 9-29.
- Ulukan, H. (2003), Tahıllarda *In vitro* Çalışmalar, *MKU Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8 (1-2), 19-31.
- Umay, A. (2007). *Lavandula Stoechas, Melissa Officinalis Ve Tribulus Terrestris Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Uzunhan, S. (2014). *Heliotropium Hirsutissimum'* dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Fitokimyasal Analizi Ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi), Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Vattikuti, U.M.R ve Ciddi, V. (2005). An overview on *Hypericum perforatum* Linn. *Natural Product Radianance*, 4(5), 368-381.
- Walker, T.S., Bais, H.P. ve Vivanco, J.M. (2002). Jasmonic acid- induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Photochemistry*, 60 (3), 289-293.

- Wang, J., Qian, J. ve Yao, L. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2, 5.
- Wojcik, A. ve Podstolski, A. (2007). Leaf explant response *in vitro* culture of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 29 (2), 151-156.
- Xu M.J. ve Dong, J.F. (2006). Nitric oxide mediates the fungal elicitor induced Taxol biosynthesis of *Taxus chinensis* suspension cells through the reactive oxygen species dependent and independent signal pathways. *Chin Sci Bull*, 51, 1967-1975.
- Xu, M., Yang, B., Dong, J., Lu, D., Jin, H., Sun, L., Zhu, Y. ve Xu, X. (2011). Enhancing Hypericin Production of *Hypericum perforatum* Cell Suspension Culture by Ozone Exposure. *Biotechnol. Prog.*, 27(4), 1101-1106.
- Yaşar, S. (2005). *Çukurova Üniversitesi kampüsünde doğal olarak yetişen bazı çok yıllık tıbbi bitkilerin toprak özellikleri ile sabit ve uçucu yağ içeriklerinin belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yıldırım, B., Terzioğlu, Ö., Okut, N., Ekici, K. ve Özgökçe, F. (2009, Ekim 19-22). Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Bitkisinin Farklı Gelişme Dönemlerinde Uçucu Yağ İçeriğinin Belirlenmesi. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, Hatay.
- Yılmaz, H.R., Yücel, N., Uz, E. ve Koşar, P.A. (2014). Kantaron Otundan (*Hypericum perforatum*) Elde Edilen Hyperisin Maddesinin İnsan Lenfosit Kültürlerinde Kardeş Kromatid Değişimi Üzerine Etkisi. *European Journal of Basic Medical Science*, 4(2), 22-28.
- Yücel, N.K. (2006). *Kantaron Otundan (Hypericum Perforatum L.) Elde Edilen Hyperisin Maddesinin İnsan Lenfosit Kültürlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerine Etkisi* (Yüksek Lisans Tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında İzmir 'de doğdu. Lise öğrenimini İzmir Bornova Hatice Güzelcan Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2011 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik fakültesi, Biyomühendislik Bölümü'nü kazandı. 2016 yılında lisans öğrenimini 2. olarak tamamlayarak Biyomühendis ünvanını aldı. Aynı yıl Şubat ve Haziran ayları arasında Diploid Biyoteknolojik Ürünler İzolasyon Danışmanlık Araştırma Geliştirme Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi'nde araştırmacı olarak çalıştı. 2016 yılının Aralık ayında Vem İlaç San. San ve Tic. A.Ş.' de Arge Analitik Uzman Yardımcısı pozisyonunda çalışmaya başladı. 2017 yılının Eylül ayında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Bitki Biyoteknolojisi alanında yüksek lisansa başladı. 2020 yılında hala çalışmakta olduğu Vem İlaç San. Ve Tic. A.Ş.'de Arge Analitik Uzmanı olarak farmasötik endüstrisinde çalışmaya devam etmektedir.