

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

Hypericum perforatum'da TUZ STRESİNİN
KALLUS OLUŞUMUNA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ ve ELDE EDİLEN
KALLUSLARDA UPLC-MS/MS İLE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
YİĞİT KILIÇ

OCAK 2022
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

Hypericum perforatum'da TUZ STRESİNİN
KALLUS OLUŞUMUNA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ ve ELDE EDİLEN
KALLUSLARDA UPLC-MS/MS İLE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
YİĞİT KILIÇ

OCAK 2022
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

YİĞİT KILIÇ tarafından hazırlanan *Hypericum perforatum* 'da Tuz Stresinin Kallus Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi ve Elde Edilen Kalluslarda UPLC-MS/MS ile Fenolik Bileşiklerin Analizi başlıklı tezinin, 14/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Dr. Öğretim Üyesi Filiz ALTAN (Danışman)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Doç. Dr. İbrahim KIVRAK
Muğla Meslek Yüksekokulu Kimya ve Kimyasal İşletme
Teknolojileri Bölümü Kozmetik Teknolojisi Programı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Prof. Dr. Hatice DEMİRAY
Botanik Anabilim Dalı
Ege Üniversitesi, İzmir
İmza

İmza

ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Reşat ÜNAL
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Savunma Tarihi:14.01.2022

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Yiğit KILIÇ
14/01/2022

ÖZET

***Hypericum perforatum*'da Tuz Stresinin Kallus Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi ve Elde Edilen Kalluslarda UPLC-MS/MS ile Fenolik Bileşiklerin Analizi**

Yiğit KILIÇ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Filiz ALTAN

Ocak 2022, 67 sayfa

Ekvator kuşağından İskandinav ülkelerine kadar dünyanın farklı coğrafyalarında yayılış gösteren ve halk arasında sarı kantaron, kan otu, kılıç otu gibi farklı isimler ile bilinen *Hypericum perforatum* L. dünya genelinde geleneksel tıpta yüzyıllardan beri sinir hastalıkları, adet krampları, siyatik, eklem iltihabı ve midevi rahatsızlıklardan kaynaklanan ağrıların giderilmesinde ve bazı cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca *H. perforatum* bitkisi içerdiği fitokimyasallar bakımından zengin bir kaynaktır. Bu bileşikler phloroglucinol türevleri, hiperforin, adhyperforin, naftodianthrones hiperisin, psödohiperisin, flavonoid, hiperosit, rutin, kuersitrin, kersetin, biapigenin, fenilpropan kafeik asit ve klorojenik asit içeren uçucu yağlar olduğu düşünülmektedir. *H. perforatum* başta olmak üzere *Hypericum* türleri son 30 yıldır farmakolojik ve kimyasal anlamda yoğun olarak çalışılmakta, bu bitkilerin tıbbi özellikleri ve önemleriyle ilgili bilimsel çalışmalara her geçen gün bir yenisi eklenmektedir ancak giderek artan sıcaklık değişimine bağlı kuraklıktan kaynaklanan toprak tuzluluğu her gün *H. perforatum* için daha ciddi bir sorun haline gelmektedir ve bu alanda yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Esas olarak Sodyum Klorür (NaCl)'den kaynaklanan tuzluluk, bitki büyümesini ve üretkenliğini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Tuzu temizleyemeyen az yağış, toprak neminin daha hızlı buharlaşmasına neden olan sert yazlar ve gübre uygulamalarının sık ve yanlış yapılması nedeniyle çevremiz hızla kötüleştiğinden, tuzluluk giderek ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bu çalışmada tuz stresinin etkilerinin *H. perforatum* bitkisinde kallus gelişimini nasıl etkilediği incelenmiştir. İlk olarak doğadan toplanan bitkinin tohumları bitki doku kültür ortamında kültüre alınmıştır. Çimlenen bitkiciklerin yaprak gelişimini sağlamak için BA ilaveli besin ortamına alınması sağlanmıştır. Kallusların farklı konsantrasyonlarda tuz içeren besin ortamlarında gelişimleri gözlenmiştir. Farklı besi ortamları altında büyüme ve gelişimleri izlenen bitkiler sonrasında ağırlık ve büyüklük bakımından karşılaştırılmış UPLC-MS-MS analizleri yapılarak fenolik bileşiklerinin değişimleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda bitki büyüme ve gelişimindeki azalmalar gözlenmiş ve bu değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum perforatum*, Tuz stresi, Bitki Doku Kültürü, UPLC-MS-MS

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Salt Stress on Callus Formation in *Hypericum perforatum* and Analysis of Phenolic Compounds in Obtained Calli by UPLC-MS/MS

Yiğit KILIÇ

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assit. Dr. Öğr. Üyesi Filiz ALTAN

January 2022, 67 pages

Hypericum perforatum L., which spreads in different geographies of the World from the equator to the Scandinavian countries and is known by different names such as St. John's Wort, tetterwort, and tipton weed has been used in traditional medicine throughout the World for centuries. It has been used in traditional medicine for nervous system diseases, menstrual cramps, sciatica, joint inflammation, and pain caused by stomach disorders. Moreover, it is used in the treatment of several skin diseases. In addition, the *H. perforatum* plant is a rich source of phytochemicals. These compounds are thought to be essential oils containing phloroglucinol type, hyperforin, adhyperforin, naphthodianthrones hypericin, pseudohypericin, flavonoid, hyperoside, rution, quercitrin, quercetin, biapigenin, phenylpropane caffeic acid and chlorogenic acid. *Hypericum* species, especially *H. perforatum*, have been intensively studied pharmacologically and chemically for the last 30 year, and scientific studies on the medicinal properties and importance of these plants are increasing every day. However, the soil salinity caused by the drought due to the increasing temperature change is becoming a more serious problem for *H. perforatum* day by day, solely, there is no current study in this area. Essentially, salinity from Sodium Chloride (NaCl) is one of the most important environmental factors affecting plant growth and productivity. Salinity has become an increasingly critical problem as our environment rapidly deteriorates due to less precipitation that cannot remove salt, heavy summers that cause soil moisture to evaporate faster and frequent and incorrect fertilizer application. In this study, it has been investigated how the impacts of salt stress affect callus development in *H. perforatum* plant. Primarily, the seeds of the plant collected

from nature were cultured in plant tissue culture medium. Callus growth was stimulated in the nutrient medium induced by growth regulators of the leaves. Finally, the growth of calluses was observed in nutrient medium containing different concentrations of salt. Changes of phenolic compounds were investigated by UPLC-MS-MS analyzes that were compared in terms of weight and size after the growth and development of our plants were monitored under different nutrient medium. As a result of the study, decreases in plant growth and development were observed and these changes were found statistically significant.

Keywords: *Hypericum perforatum*, Salt Stress, Plant Tissue Culture, UPLC-MS-MS



Canım Anneme



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, emeğini ve bilgilerini esirgemeyen ve bana eğitimim boyunca yol gösteren danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Filiz ALTAN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bitki ekstraktlarından fenolik bileşiklerin belirlenmesinde bilgi birikimiyle bizi destekleyen sayın Doç Dr. İbrahim KIVRAK'a teşekkürlerimi sunarım

Tezime katkılardan ve değerli katılımlarını sağladıkları için sayın Prof. Dr. Hatice Demiray'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında süresince bana yardımcı olan ve tez yazım döneminde gerekli düzenlemelerde bana yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Hilal Büşra Tokgöz, Onur Çelik, Hakan Karakaş, Selin Galatalı ve Ayla Eren'e yardımlarından ötürü teşekkürlerimi sunarım

Muğla'da olduğum süre boyunca bana her türlü desteklerini esirgemeyen Aşkınısu Kış, Kadircan Morova arkadaşlarıma ve ailelerine teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getirip iyi günümde de kötü günümde de yanımda olup her daim arkamda duran, canım anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	XII
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 <i>Hypericum perforatum</i> L.'nin yayılışı ve önemi	3
2.1.1 <i>Hypericum perforatum</i> L.....	3
2.1.1.1 Antibakteriyel etkileri	5
2.1.1.2 Antiviral etkileri	5
2.1.1.3 Antidepresan etkileri	5
2.1.2 <i>Hypericum perforatum</i> L. bitkisinin taksonomik sınıflandırılması.....	6
2.2.3 <i>Hypericum perforatum</i> L.'nin doku kültürü çalışmalarında kullanımı.....	6
2.2.4 <i>Hypericum perforatum</i> L bitkisinin aktif bileşenlerinden bazıları.....	9
2.2.4.1 Flavonoidler	9
2.2.4.2 Naftodiantronlar	10
2.2.4.3 Hiperisin.....	10
2.2.4.4 Biflavonlar.....	11
2.2.4.5 Proantosiyanidinler	11
2.3 Tuz stresi ve mekanizmaları.....	12
2.3.1 Tuz stresi ve bitkiler üzerindeki etkileri	13
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyaller	16
3.1.1. Bitki materyali.....	16
3.1.2 Kullanılan cihazlar	16
3.2.3 Bitki materyalinin sterilizasyonu	17

3.2.4 Besin ortamı	18
3.2.5 Fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS ile belirlenmesi	20
3.2.6 İklimlendirme odası koşulları	23
4. BULGULAR	24
4.1 Tohumların kültüre alınması	24
4.2 Kallus kültürü ve tuz stresi uygulamaları	25
4.3 İstatistiki analiz sonuçları.....	43
4.4 Fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS ile analiz sonuçları	48
5.TARTIŞMA	52
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKÇA	59
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Hypericum perforatum</i> bitkisinin taksonomik sınıflandırılması.....	6
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar.....	16
Çizelge 3.2. Besin ortamında kullanılan bileşenlerin miktarları.....	19
Çizelge 3.3. Yaprak sayısı ve kallus oluşumu için kullanılan besin ortamlarının bileşenlerin miktarları	19
Çizelge 3.4. Tuz stresine sahip besin ortamlarının bileşenlerinin miktarları.....	20
Çizelge 3.5. Acquity UPLC cihaz analiz şartları	21
Çizelge 3.6. Xevo TQ-S MS/MS cihaz analiz şartları	21
Çizelge 3.7. Fenolik bileşiklerin geçiş, Cone ve Collision enerji değerleri.....	22
Çizelge 4.1. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+K sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları.....	39
Çizelge 4.2. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+50 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları	39
Çizelge 4.3. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+100 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları	39
Çizelge 4.4. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+150 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin kuru ağırlıkları	40
Çizelge 4.5. MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+K sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları.....	40
Çizelge 4.6. MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+50 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları	41
Çizelge 4.7. MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+100 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları	41
Çizelge 4.8. MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+150 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları	41
Çizelge 4.9. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA ve farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlarda büyütülmüş bitkilerin kuru ağırlıkları	42
Çizelge 4.10. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA ve farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlarda büyütülmüş bitkilerin kuru ağırlıkları	42
Çizelge 4.11. Farklı konsantrasyondan bitkilerin One-Kolmogorov-Smirnov analizi	45
Çizelge 4.12. Farklı besin ortamlarında büyütülmüş bitkilerin KRUSKAL-WALLIS testi sonuçları	46
Çizelge 4.13. Farklı besin ortamlarında büyütülen bitkilerin ağırlıklarının bar grafiği	47
Çizelge 4.14. Tüm gruplara ait fenolik bileşik içeriği mg/kg (ppm) cinsinden verilmiştir.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Hypericum perforatum</i> bitkisinden bir görünüm (Web-1).....	4
Şekil 2.2. Flavonoid molekülünün genel yapısı (Web-2)	9
Şekil 2.3. Naftodiantron molekülünün genel yapısı (Web-3)	10
Şekil 2.4. Hiperisin molekülünün genel yapısı(Web-4).....	11
Şekil 2.5. Proantosiyanidin molekülünün genel yapısı (Web-5)	12
Şekil 3.1. Bitki tohumlarının sterilizasyon aşamaları	18
Şekil 3.2. İklimlendirme odasından bir görünüm	23
Şekil 4.1. Sterilize edilmiş tohumların magentalara ekimi	24
Şekil 4.2. ½ MS ortamında kültüre alınan <i>H. perforatum</i> bitkisinin tohumlarından bir görüntü (15.gün).....	25
Şekil 4.3. Tuz içeren besin ortamına alınmadan önce <i>H. perforatum</i> bitkisinden görüntüler	25
Şekil 4.4. <i>H. perforatum</i> bitkisinin tuz ilaveli besin ortamına alınmasından 7 gün sonrasındaki görüntüleri.....	26
Şekil 4.5. <i>H. perforatum</i> bitkisinin tuz ilaveli besin ortamına alınmasından 12 gün sonrasındaki görüntüleri.....	27
Şekil 4.6. Tuz ilaveli besin ortamına alınan yapraklarda gözlenen kahverengileşme ve sararmalar.....	27
Şekil 4.7. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ K içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin kallus gelişiminden görüntüler (24. gün).....	30
Şekil 4.8. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ 50 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin kallus gelişiminden görüntüler (24. gün).....	31
Şekil 4.9. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA 100 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görüntüler ((24. gün).....	32
Şekil 4.10. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ 150 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görüntüler (24. gün).....	33
Şekil 4.11. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ K içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görüntüler (26. gün).....	34
Şekil 4.12. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 50 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görüntüler (26. gün).....	35
Şekil 4.13. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 100 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görüntüler (26. gün).....	36
Şekil 4.14. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 150 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görüntüler (26. gün).....	37
Şekil 4.15. Yaş ağırlıkları tartılmadan önce <i>H.perforatum</i> bitkisinin görüntüleri (25. gün)	38
Şekil 4.16. Yaş ağırlıkları tartılmadan önce <i>H. perforatum</i> bitkisinin görüntüleri (25. gün)	38

Şekil 4.19. Farklı oranlarda tuz içeren ortamlarda büyütülen *H. perforatum* bitkilerinin ağırlıklarının istatistiki analizi..... 44



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

°C	Derece
µm	Mikrometre
APX	Askorbat Peroksidaz
BA	Benzil Adenin
CAT	Katalaz
g	Gram
GR	Glutasyon Redüktaz
HIV	İnsan İmmun Yetmezlik Virüsü
HPLC	Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi
MCMV	<i>Murin sitomegalovirüsü</i>
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MS	Murashige & Skoogh Medium
NAA	Naftelin Asetik Asit
PTC	Bitki Doku Kültürü
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
rpm	Dakikadaki Devir
SJW	St John's-wort
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOS	Tuza Aşırı Hassas
UPLC-MS/MS	Ultra Performanslı Likit Kromatografisi
vb	Ve benzeri
yy	Yüzyıl

1. GİRİŞ

Türkiye’de sarı kantaron olarak bilinen ve yabancı kaynaklarda St. John’s Wort adıyla geçen *Hypericum perforatum* L. çok yıllık bir bitkidir ve dünyanın birçok yerinde yarı iyileştirici, bakterisit, idrar sökücü, iltihap giderici ve yatıştırıcı etkilerinden dolayı yüzyıllardan beri tedavi maksatlı kullanılmaktadır (Çırak ve Kurt, 2014). Ülkemiz için *H. perforatum* önemli bir merkezdir (Çırak 2014). Bu tür son 30 yıldan beri bitki klinik ve laboratuvar şartlarında yoğun olarak çalışılmakta ve birçok hastalık tedavi süreçlerinde kullanılmaktadır.

Bitki doku kültürü aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından (eksplant) kontrollü çevre koşullarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir (Smith, 2012). Bitki doku kültürünün tuza toleranslı bitkilerin üretimi ve tuz tolerans mekanizmalarının anlaşılmasında avantajları şu şekildedir: Göreceli olarak küçük alanlar kullanılarak laboratuvarında çok sayıda genotip seçimleri yapılabilir ve değerlendirilebilir. Çevre ve besin koşulları eşit ve hassas bir şekilde kontrol edilebilir. Morfoloji ve gelişim aşamalarındaki farklılıklardan kaynaklanan komplikasyonlar, hücrelerin kültür ortamında üniform olarak büyütülmesiyle azaltılabilir. Nesiller arası süre kısaltılabilir. Kültür koşulları sırasında, genotiplerde varyasyonlar oluşturulabilir. Bu özellik için somaklonal değişkenliğin hücre düzeyinde seçilen özellikler, rejenere bitkilerde ve onların soylarında değerlendirilebilir (Kozai ve Kubota, 2005).

Tuz stresi, bitkilerin büyümesini ve gelişmesini osmotik ve iyon stresine neden olarak engeller. Tuzluluk, bitkiler üzerindeki doğrudan etkisini osmotik ve iyon stresi oluşturarak gösterirken, dolaylı etkisini (sekonder etki) bu stres faktörleri sonucu bitkide meydana gelen yapısal bozulmalar ve toksik bileşiklerin sentezlenmesi ile gösterir (Ahmad vd., 2013). Tuz stresi bitkinin gövde ile kök uzunluğunda ve ağırlığında azalma; yapraklarda küçülme ve incelme ile sayılarında azalma; yaprak yüzeyinde bulunan mumsu tabaka ile kutikula tabakasında incelme; vasküler doku

farklılaşmasında ve gelişiminde azalma meydana gelir. Tuz stresi bitkilerde hücre düzeyinde; Hücre zarı ve hücre duvarına, iyon içeriğine, bitki organelleri üzerine etkisi vardır (Çulha ve Çakırlar, 2011).

Bu çalışmanın amacı, *Hypericum perforatum L.* bitkisinde, bitki doku kültür teknikleri kullanılarak tuz stresinin etkisini belirlemektir. Tuzluluktan kaynaklanan bitki stresi, kantitatif olarak ilişkilendirilebiliyorsa, bu bitkinin bu stres koşulları altında izlenmesinde ve yönetilmesinde etkili bir araç olarak kullanılabilir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak *Hypericum perforatum*'un tohumu materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada, öncelikle tohumların sterilizasyonu sağlanmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar çimlendirilmiş ve çimlenen materyallerden sürgün gelişimi sağlamak amacıyla büyüme düzenleyicisi içeren taze besin ortamlarına bitkiciklerin transferi gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 21 gün sonunda bitkinin yaprak ve gövde kısımlarından yararlanılarak tuz ilaveli (0,50,100,150 mM NaCl) ve kallusa teşvik edici bitki büyüme düzenleyicileri bulunan besin ortamlarında gelişimleri sağlanmıştır. Gelişimleri sağlanan bitkilerin ağırlıkları ölçülmüş ve fenolik bileşiklerin belirlenmesi için UPLC-MS/MS analizi yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Hypericum perforatum* L.'nin yayılışı ve önemi

2.1.1 *Hypericum perforatum* L.

Hypericum perforatum L bitkisi yüzyıllardır küçük cilt lezyonları, siyatik cilt yaralanmaları ve birçok hastalığında tedavisinde kullanılmıştır. İlk olarak 1753 yılında Carolus Linnaeus tarafından tanımlanan *H. perforatum* 20 yy. ortalarında ticari olarak satılan bir bitki olmuştur (Klemow vd., 2011). Ekvator ülkelerinden İskandinav ülkelerine Orta Asyadan bir çok dünya ülkesinde yaygın halde bulunan *H. perforatum* ülkemizde de yaygın olarak bulunur (Güner ve Aslan, 2012). Bu tür ülkemizde bölgesel olarak sarı kantaron, kılıç otu, kan otu, yara otu gibi isimler alır. Yabancı kaynaklarda ise “St. John’s Wort” şeklinde bahsedilen *H perforatum* içerdiği fenolik bileşikler nedeni ile yara tedavilerinde, depresyon tedavilerinde ve birçok hastalığın tedavisinde aktif olarak yer almaktadır.

Ilıman bölgelerde yetişen bu cins yara, egzema ve yanıkların tedavisinde şifalı bir bitkidir (Yazaki vd., 1994). *H perforatum* L travma, romatizma, nevraji, gastroenterit, ülser, histeri, depresyon tedavisinde de kullanılmaktadır (Miller, 1998). Bu tedavilerde ilaç üretiminde ve alternatif tedavi süreçlerinde kullanılan *H. perforatum* L bu nedenle ticari açıdan önemli bir bitkidir. Bitkiden üretilen farklı formlardaki ilaçların satış değeri Avrupa ilaç pazarlarında 100 milyon \$’ı Dünya genelinde ise bu rakamın 1 milyar \$’a yaklaştığı bilinmektedir. Bu ilaç tedavileri ve alternatif tıpta kullanımı diğer antidepresan ilaç kullanımını düşürdüğü ve hastalık tedavilerinde kullanılan maliyetleri azalttığı bildirilmiştir (Solomon vd., 2013).

Sarı kantaron olgun gövdeleri ve dalları tüysüz olan çok yıllık otsu bir bitkidir. Genç saplarında karşılıklı bulunan iki sırt bulunur ve yaprakları genel olarak eliptik, dikdörtgen veya oval şeklinde olabilir. Çiçekleri genellikle radyal, simetrik, düz veya çiçek salkımlarında bulunur. Meyveleri oval kapsüllerdir. Tohumları genellikle 1mm uzunluğunda, kahverengi ve çok sayıda bulunur (Klemow vd., 2011).

Hypericum türleri sıklıkla çok yıllık bitkilerdir. En yaygın olarak bilinen *Hypericum perforatum* 'un kromozom sayısı 8 dir ve tetraploid bir bitkidir ancak diploid ve heksaploid formları da vardır (Robson ve Adams, 1968). *H. perforatum* çok yıllık bir bitki olmakla birlikte saçak kök sistemine sahiptir. Yapraklarında ışık geldiğinde delik gibi gösteren gözenekler vardır bu gözenekler nedeni ile latince gözenekli, delikli anlamında “*perforatum*” ismini almıştır (Çırak 2014). Ülkemiz şartlarında mart ayı ile havalarda ısınması ile toprak yüzeyinde *H. perforatum* yeşermeye başlar. Mayıs ile çiçeklenmeye başlar ve haziran ayının ortalarında çiçeklenme maksimum seviyeye ulaşır ve bu seviye ağustos ayının sonuna kadar devam eder. Temmuz ayında meyveler oluşmaya başlar ve bu meyveler ağustos ayının başından itibaren olgunlaşır ve tohum dökmeye başlarlar (Çırak 2014).



Şekil 2.1. *Hypericum perforatum* bitkisinden bir görünüm (Web-1)

2.1.1.1 Antibakteriyel etkileri

H. perforatum içerdiği hiperforinin *Staphylococcus aureus*' a karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Bronz vd., 1982). İçerdiği diğer bir bileşik olan Hiperforin'nin *Streptococcus pyogenes* ve *Corynebacterium diphtheriae* gibi gram-positif bakterilere karşı da antibakteriyel aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Schempp vd., 2000).

2.1.1.2 Antiviral etkileri

H. perforatum'un içerdiği flavoid sekonder bileşiğinin influenza virüsüne karşı aktivite gösterdiği çalışmalar bildirilmiştir (Mishenkova vd., 1975). Ayrıca hiperisin ve psödohiperisinin herpes simpleks virüsünün tip 1 ve 2 varyantları üzerinde etki gösterdiği (Wood vd., 1990) ve insan immun yetmezlik virüsü (HIV) üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu raporlanmıştır (Lavie vd., 1989; Lopez-Bazzocchi vd., 1991). Hiperisin'in ayrıca *Murin sitomegalovirüsü* (MCMV) virüsünü de yapısal olarak baskıladığı raporlanmıştır (Hudson vd., 1991).

2.1.1.3 Antidepresan etkileri

H. perforatum 1 bileşiklerinden olan hiperisin (Butterweck vd., 1998) ve hiperforin (Laakmann vd., 1998) gibi bileşenleri antidepresan tedavisi için önemli birer bileşen olarak görülmektedir, hafif ila orta dereceli depresyon tedavisinde diğer terapötik ajanlara etkili bir alternatif olarak kabul edilir (Bach-Rojecky vd., 2004).

Farelerde yapılan çalışmalarda antidepresan etkisinin bir göstergesi olarak farelere farklı dozlarda uygulanan hiperisin ve hiperforin bileşiklerinin deney hayvanlarında hareketsiz süresini kısalttığı yani hayvanların aktivitelerinin daha yüksek olduğu raporlanmıştır. Bileşenler üzerindeki farklılıkların antidepresan etkileri arasındaki ilişkiyi doğru oranda değiştirmesi her iki bileşiğin de potansiyel bir antidepresan etkisi olan maddelerin gösterilmesi için eşit derecede olduklarını kanıtlamıştır (Bach-Rojecky vd., 2004).

2.1.2 *Hypericum perforatum* L. bitkisinin taksonomik sınıflandırılması

Çizelge 2.1. *Hypericum perforatum* bitkisinin taksonomik sınıflandırılması

Alem	Bitkiler
Alt Alem	Yeşil Bitkiler
İnfra Alem	Kara Bitkileri
Üst Şube	Embriyofitalar
Şube	Damarlı Bitkiler
Alt Şube	Tohumlu Bitkiler
Sınıf	Çift Çenekliler
Üst Takım	Gülgiller
Takım	<i>Malpighales</i>
Aile	<i>Hypericaceae</i>
Cins	<i>Hypericum</i>
Tür	<i>Hypericum perforatum</i> L

2.2.3 *Hypericum perforatum* L.'nin doku kültürü çalışmalarında kullanımı

Bitkiler, antik çağlardan beri tıbbi güçleri için tüm dünyada kullanılmaktadır. Bitkilerin farmakolojik özellikleri, fitokimyasal bileşenlerine, özellikle katma değerli biyoaktif bileşiklerin olağanüstü kaynakları olan ikincil metabolitlere dayanmaktadır. İkincil metabolitler karmaşık kimyasal bileşime sahiptir ve bitkilerde farklı fizyolojik görevleri yerine getirmek için çeşitli stres biçimlerine yanıt olarak üretilir. İlaç endüstrilerinde, kozmetiklerde, diyet takviyelerinde, kokularda, aromalarda, boyalarda vb. kullanılmaktadırlar. Bu metabolitlerin çeşitli endüstriyel sektörlerde yaygın kullanımı, bitki doku kültürü (PTC) tekniklerini kullanarak üretimi artırmaya yönelik araştırmalara odaklanma ihtiyacını başlatmıştır ve biyoreaktörler kullanarak büyük ölçekli üretimlerini optimize etmek. İklimsel ve coğrafi koşullardan bağımsız olan bitki doku kültürü teknikleri, ikincil metabolitlerin kesintisiz, sürdürülebilir, ekonomik ve uygulanabilir bir üretimini sağlayacaktır (Chandran vd., 2020).

H. perforatum (Sarı Kantaron) geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan, dünya çapında dağılmış çok yıllık otsu bir bitkidir (Çırak 2014). *H. perforatum* ağırlıklı olarak çiçekler ve yapraklar üzerinde bulunan özel bezlerde lokalize olan hiperisin, hiperforin, üreme yapılarında lokalize olan bir açılfloroglusinoller ailesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olarak aktif bileşik türlerini üretir (Ara Kirakosyan vd., 2004). Hiperisinlerin memeliler için toksik olduğu ve antiviral ve antikanser aktivite gösterdiği bilinmektedir (Miadokova vd., 2010). Hiperforinler, güçlü antimikrobiyal aktivite sergiler ve bitkinin anti depresif etkileri için öncül biyoaktif bileşenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. *H. perforatum* Avrupa'dan ABD'ye 17. yy. da getirilmiştir. Bitki zararlı bir ot olarak kabul edildiğinden, popülasyonları ikincil metabolit konsantrasyonu bağlamında analiz etmek için çok az çaba sarf edilmiştir. Ancak ikincil metabolit çalışmaları açısından, *H. perforatum* aromatik bileşenlerin biyosentezlerini ve bu yolların çevresel ve genetik etkilerle düzenlenmesini incelemek için ideal bir model sistemdir. Bu kısmen *H. perforatum*'un bitki doku kültüründe kullanılmasının asıl sebeplerindendir (Ara Kirakosyan vd., 2004).

H. perforatum için uluslararası pazarın hızla büyümesi ürünleri, çevresel açıdan daha sürdürülebilir ve ekonomik olarak uygulanabilir üretim stratejilerinin yanı sıra tutarlı ve yüksek kaliteli ürün üretme ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bu ihtiyacın giderilmesi için *H. perforatum* bitkilerinin yetiştirmek için kullanılan üç alternatif strateji vardır (Rauter vd., 2013). Bu stratejiler tarla ekimi, seracılık ve bitki doku ve organ kültürüdür. En ucuz üretim şekli tarla yetiştiriciliğidir ancak kısa büyüme mevsimi nedeni ile yıl boyunca yaprak ve çiçek doku üretimi mümkün değildir. Sera yetiştiriciliği, yüksek enerji ve işçilik nedeni ile orta maliyetli bir üretim şeklidir ayrıca ek aydınlatma ve kontrollü sıcaklıklar ile bitkilerin yıl boyunca sürekli büyümesi mümkündür. Bitki doku ve organ kültürü işçilik, kimyasal fiyatları ve düzenli steril koşullar nedeni ile en pahalı protokoldür. Ancak bir kişinin bitkilerin, organların genetik olarak dönüştürülmesine ve daha sonra bitkilerden çok sayıda mikro çoğaltımına izin verme avantajına sahiptir (AB Kirakosyan vd., 2000). Dönüştürülmüş sürgünler ne tarlada ne de sera üretiminde bu denli hızlı ve sürdürülebilir üretimi mümkün kılmıştır (Sirvent vd., 2003).

H. perforatum, ürün talebini karşılamak için başlangıçta yabancı işçiliğe (doğal vahşi ortamından bitki materyali toplama) dayalı olarak uluslararası alanda önde gelen bitkisel ürünlerden biridir. Değerli fenolik bileşikleri ile ilgili olarak yabancı popülasyonlardaki varyasyonun kapsamına ilişkin bilgiler vardır, bu nedenle pazar taleplerini karşılamak için alternatif bir uzun vadeli strateji olarak hücre kültürlerinin daha da geliştirilmesi için yabancı popülasyonlardaki elit germplazmaları belirleme fırsatı yaratır (Alfermann vd., 1995). Somatik hibridizasyon veya Agrobacterium kullanılarak genetik transformasyon yoluyla bitki kültürlerinin genetik olarak geliştirilmesi, fitofar ilaçlarının üretimini optimize etmek için de faydalı stratejiler olabilir. Protoplast izolasyonu ve müteakip bitki rejenerasyonu için kültürlenme yöntemlerinin geliştirilmesi de dikkate alınmalıdır, çünkü somatik hibridizasyon, *H. perforatum*'un çeşitli bitki türleri arasında yeni hibritler üretmek için yeni olanaklar açar. Somatik melezler, HPLC yoluyla incelenebilen çeşitli morfolojik karakterlerde ve fitokimyasal özelliklerde rejenere bitkilerin değişkenliğini değiştirebilir (Dörnenburg vd., 1995). *H. perforatum*'un genetik olarak güçlendirilmesine yönelik ilk ilk adım olarak, gelecekteki araştırmalar somatik hibridizasyon, bir genetik transformasyon sisteminin geliştirilmesi ve elit germplazmasının artırılmasını sağlamak için genetik manipülasyonlar üzerindeki çabalara odaklanmalıdır. Bu stratejilerin *H. perforatum*'dan istenen ürünlerin başarılı biyoteknolojik üretimine yol açabileceğine inanılmıştır.

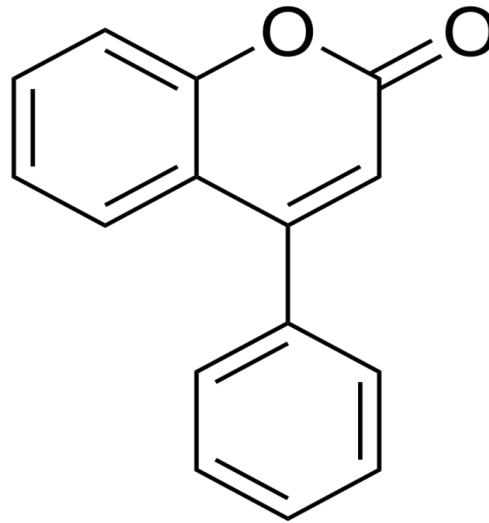
H. perforatum'un başlıca ikincil metabolitleri bitki dokuları içindeki özel morfolojik yapılarda birikir. Örneğin Hiperisinlerin biyosentezi, hem bozulmamış bitkilerin hem de sürgün organ kültürlerinin yapraklarında morfogenez ve koyu kırmızı renkli yağ bezelerinin oluşumu ile bağlantılıdır (Zdunek ve Alfermann, 1992). Hipeforinler ise öncelikle organlardaki ve taç yapraklarda birikir, açılfloroglusinoller bitki dışı organlarında sentezlenir (Repcak ve Martonfi, 1997). Bir üretim teknolojisi olarak bitki hücre doku kültürü bazı sınırlamalara rağmen sekonder metabolitleri ve diğer doğal ürünleri ticari üretimi için büyük önem göstermektedir (Dörnenburg vd., 1995). Hücre kitlelerinin hızlı çoğalması ve yoğun bir biyosentetik döngü nedeniyle hücre kültürleri daha yüksek bir metabolizma hızına sahiptir. Bu nedenle sekonder metabolit oluşumu, genel üretim maliyetlerini düşürürken aynı zamanda yüksek kalitede tutarlı bir ürün üretmeye olanak tanıyan kısa bir yetiştirme süresi içerisinde gerçekleştirilebilir (Alfermann vd., 1995).

2.2.4 *Hypericum perforatum* L bitkisinin aktif bileşenlerinden bazıları

Tıbbi değeri olan fitokimyasallar, ilaç geliştirmede büyük bir potansiyele sahiptir. Günümüzde bitkilerden elde edilen çeşitli kimyasallar dünya çapında önemli ilaçlar olarak kullanılmaktadır. *H. perforatum* yara iyileştirici, bakterisit, antiinflamatuvar, idrar söktürücü ve yatıştırıcı özelliklerinden dolayı yüzyıllardır geleneksel şifalı bitkilerden biri olarak kullanılmaktadır (Çurak vd., 2007). *H. perforatum* başlıca fitokimyasal bileşiklerinin, floroglukinol türevleri hiperforin ve adihiperforin, naftodianornes hiperisin, psödohiperisin, flavonoid hiperosit, ve klorojenik asit içeren uçucu yağlar olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Patocka, 2003).

2.2.4.1 Flavonoidler

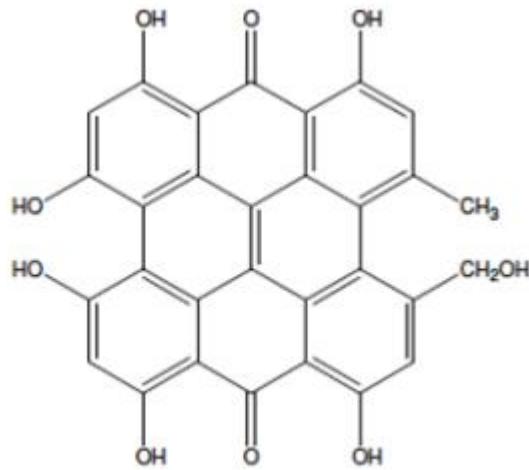
Flavonoid glikozitler, SJW'deki en büyük ikinci aktif metabolit grubunu oluşturur ve esas olarak rutin, hiperosid, izokersetin ve kersitrin ile temsil edilir. Bu metabolitlerin bazı antidepresan özellikleri vardır, ancak çoğu zaman yardımcı efektörler olarak hareket ederek hiperisinler gibi diğer maddelerin farmakolojik özelliklerini artırırlar (Peron vd., 2013).



Şekil 2.2. Flavonoid molekülünün genel yapısı (Web-2)

2.2.4.2 Naftodiantronlar

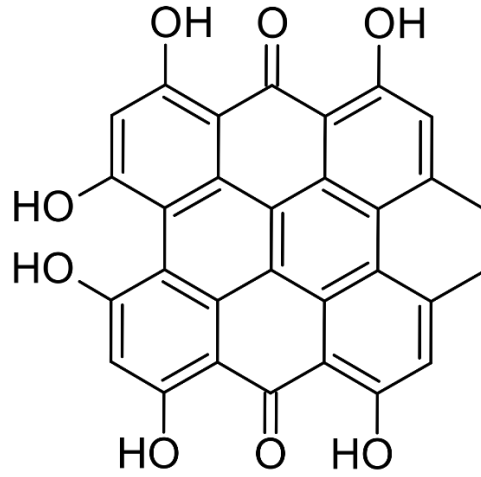
Hypericum cinsinin tipik bileşikleridir. Bitkinin kırmızı renginden ve fototoksik özelliklerinden sorumludurlar (Saddiçe vd., 2010). Bitkiden izole edilen naftodiantronlar kararsız yapılarından dolayı hiperisine ve psödohiperisine dönüştürülür (Schey vd., 2000).



Şekil 2.3. Naftodiantron molekülünün genel yapısı (Web-3)

2.2.4.3 Hiperisin

Hiperisin, değerlendirilen 36 *Hypericum* türünden 27'sinde bulunmuştur ve bu nedenle bu bitki cinsinin önemli bir ikincil metaboliti gibi görünmektedir (Kitanov ve Ecology, 2001). Aslında hiperisin bitkilerin gövde, yaprak, sepaller, petalleri stamenler ve ovülleri üzerinde bulunan koyu renkli bezlerde granüller olarak bulunmaktadır (Falk ve Schmitzberger, 1992).



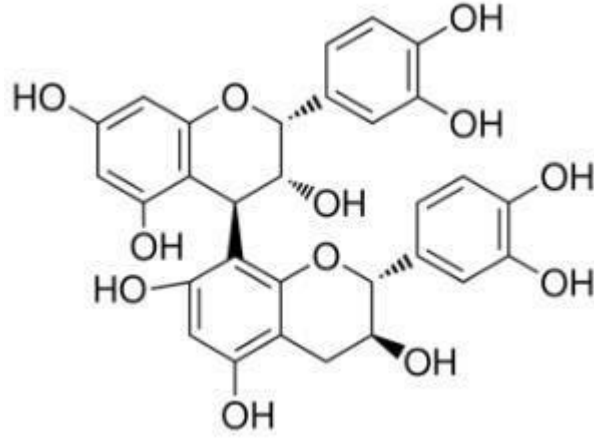
Şekil 2.4. Hiperisin molekülünün genel yapısı(Web-4)

2.2.4.4 Biflavonlar

Hypericum'da bulunan biflavonlar anti-enflamatuar ve analjezik etkinliklere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca *H. perforatum* da tespit edilen biflavonlar: 3', 8''-biapigenin (0.1–0.5%) (Berghöfer ve Hölzl, 1987), amentoflavon (0.01–0.05%)^{29, 30} ve 6', 8''-diquersetin³¹ (Berghöfer ve Hölzl, 1989) *H. Perforatum*'daki bu biflavonların terapötik önemi henüz bilinmemektedir (Altan vd., 2015).

2.2.4.5 Proantosiyanidinler

Bileşikler taninler ile temsil edilmektedir. Bu bileşiklerin toplam konsantrasyonu çiçeklenme öncesindeki aşamada değişmektedir. Proantosiyanidinlerin antioksidan (Nahrstedt ve Butterweck, 1997), anti-viral (Chatterjee vd., 1998) ve antimikrobiyal (Scalbert, 1991) etkinlikleri rapor edilmiştir.



Şekil 2.5. Proantosiyanidin molekülünün genel yapısı (Web-5)

2.3 Tuz stresi ve mekanizmaları

Topraktaki suyun buharlaşması ve bitkilerin topraktaki suyu kullanımıyla topraktaki su tüketildiğinde geride tuzlar kalarak birikmektedir. Toprakta biriken tuzlar, toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini bozmakta ve bitki gelişimini de olumsuz yönde etkilemektedir (Ekmekçi vd., 2005). Esas olarak NaCl'den kaynaklanan tuzluluk, bitki büyümesini ve üretkenliğini etkileyen başlıca çevresel faktörlerden biridir (Flowers, 2004). Tuzu yeterince uzaklaştıramayan yetersiz yağmur miktarları, toprakta kalan nemin hızlıca buharlaşmasına neden olan sıcak hava şartları ve gübrelerin sık şekilde ve yanlış kullanımı nedeniyle çevre koşulları hızla bozulduğundan, tuzluluk giderek artan ciddi bir sorun haline gelmiştir (F. Wu, 2000). Geçtiğimiz on yılda, tuz stresinin bitkilerde biyokimyasal, fizyolojik ve hücreler süreçlerindeki spesifik etkileri rapor edilmiştir (Cushman ve Bohnert, 2000; Jian Kang, 2007; Parida vd., 2005).

Tuz stresinden kaynaklanan hasarın genel belirtileri, bitki büyümesinin engellenmesi, uzun süreli maruz kalmaları sırasında bitki yaşlanması ve ölümü ile sonuçlanmaktadır. Büyüme inhibisyonu, diğer semptomlara neden olan birincil hasardır, ancak şiddetli tuzluluk şoku altında kontrollü hücre ölümü de meydana gelebilir (Yazdani vd., 2012). Tuz stresi, hücrelere taşındığında stomaları kapatan absisik asit sentezini indükler. Stomaların kapanması sonucunda fotosentez azalır ve fotoinhibisyon ve oksidatif stres oluşur. Osmotik stresin bitki büyümesi üzerindeki ani etkisi, absisik asit yolu ile doğrudan ya da dolaylı olarak hücre büyümesini ve gelişimini engeller (Jian Kang, 2007).

Kök yüzeyindeki aşırı sodyum iyonları, bitki potasyum beslenmesini bozar. Sodyum ve potasyum iyonlarının benzer kimyasal yapısı nedeniyle, sodyumun kök tarafından potasyum alımı üzerinde güçlü bir inhibitör etkisi vardır. Bitkiler potasyum alımı için hem düşük hem de yüksek afiniteli sistemler kullanır. Sodyum iyonları, düşük potasyum/sodyum seçiciliğine sahip olan düşük afiniteli sistem üzerinde daha zararlı bir etkiye sahiptir (Flowers, 2004). Sodyum stresi altında, yeterli potasyum beslenmesini sürdürmek için bitkilerin daha seçici yüksek afiniteli potasyum alım sistemini çalıştırması gerekir. Potasyum eksikliği kaçınılmaz olarak büyüme inhibisyonuna yol açar çünkü en bol hücre katyon olan potasyum hücre turgorunun, membran potansiyelinin ve enzim aktivitelerinin korunmasında kritik bir rol oynar. Ayrıca bitkilerde Nitrat, Potasyum ve Fosfat Sodyum sitoplazmaya girdiğinde birçok enzimin aktivitelerini inhibe eder (Qados, 2011). Bu engelleme aynı zamanda ne kadar potasyum bulunduğu da bağlıdır: en zararlı olanı yüksek sodyum/potasyum oranıdır. Hücre içinde büyük miktarlarda sodyum biriktiren halofitlerde bile, sitozolik enzimleri sodyuma glikofitlerin enzimleri kadar duyarlıdır. Bu, halofitlerin sodyumu sitozolik enzimlerden uzakta vakuol içinde bölümlere ayırması gerektiği anlamına gelir. Sodyum ve potasyum iyonları arasındaki savaşta önemli bir faktör kalsiyumdur. Artan kalsiyum arzı, sodyum stresi altındaki bitkiler üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir. Kalsiyum, sodyuma meydan okuyan bitkilerde potasyum taşınmasını ve potasyum/sodyum seçiciliğini sürdürür. Kalsiyumun bu faydalı etkisi, potasyum ve sodyum taşıyıcılarının ekspresyonunu ve aktivitesini düzenleyen hücre içi bir sinyal yolu aracılığıyla sağlanır. Kalsiyum ayrıca seçici olmayan katyon kanallarının aracılık ettiği sodyum ithalatını doğrudan baskılayabilir (Zhu, 2001).

2.3.1 Tuz stresi ve bitkiler üzerindeki etkileri

Bununla birlikte farklı bitki gelişim aşamalarında tuz stresine tolerans türden türe değişiklik gösterebilir. Bitkinin tuz stresine karşı verdiği tepki hem hücresel hiperosmolariteyi hem de iyon dengesizliğini hafifletmek için koordinasyon içinde çalışması gereken sayısız süreçten oluşur. Tuz stresinin bu olumsuz etkisi, çimlenme, fide, vejetatif ve olgunluk aşamaları dahil olmak üzere hemen hemen tüm büyüme aşamalarında tüm bitki düzeyinde ortaya çıkar (Ashraf, 2004).

Tuz stresi, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkisel üretimi sınırlayan başlıca abiyotik streslerden biridir. Toplam yeryüzünün yaklaşık %7'sinin ve toplam ekilebilir alanın %20'sinin yüksek tuz içeriklerinden etkilendiği bildirilmektedir. Tuzdan etkilenen toprakların ıslahı, gün geçtikçe ekilebilir araziye tuzla kapladığı için gereklidir. Bitkilerin tuz stresine en erken tepkisi, yaprak yüzeyi genişleme hızında azalma ve ardından stres yoğunlaştıkça genişlemenin durmasıdır, ancak stres hafiflediğinde büyüme yeniden başlar. Tuz stresinden fotosentez, protein sentezi ve lipid metabolizması gibi metabolik süreçler etkilenir. Tuzluluk, ozmotik stres, iyonik stres, oksidatif stres ve hormonal dengesizlikler gibi farklı stres türlerinden sorumludur. Ozmotik stres, topraktaki ozmotik potansiyeli azaltan ve su alımını ve besin maddelerini engelleyen fazla Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarından kaynaklanır. Uyumlu çözünenler olarak bilinen düşük moleküler kütleli bileşikler, tuz stresi altında birikir. Bu uyumlu çözünenler arasında prolin, glisinbetain, şekerler, proteinler, polioller vb. bulunur. Normal biyokimyasal reaksiyonlara müdahale etmezler ve bitkilerin strese karşı direnç oluşturmalarına yardımcı olurlar. Oksidatif stres, hidrojen peroksit, süperoksit iyonları, tekli oksijen radikalleri, peroksitler vb. gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına yol açar (Hasanuzzaman vd., 2013). Bu ROS, proteinler, lipidler, nükleik asitler, vb. gibi biyomoleküller için toksiktir. Normal işleyişini bozarlar. Hücre ve bitkinin büyüme ve gelişmesinin azalmasına yol açar. Bitki sistemleri, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), askorbik asit, glutatyon vb. gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarla donatılmıştır. Hücrenin her bölmesi, belirli bir ROS üzerinde etki eden ve onu detoksifiye eden bir veya daha fazla antioksidan içerir. Seçilen genlerin dahil edilmesi veya aşırı ekspresyonu, strese dayanıklı bitkiler üretmenin umut verici yoludur. Bu bölüm tuz türleri, tuz stresinin nedenleri, tuzdan etkilenen toprakların ıslahı ile ilgilidir. Bu bölüm ayrıca bitkilerin tuz stresine tepkilerini ve farklı biyokimyasal özelliklerin ve anahtar antioksidanların tuz stresine karşı koymadaki rolünü vurgulamaktadır (Rasool vd., 2013).

Bitkilerin ortamdaki yoğun tuzdan kaynaklanan abiyotik stres faktörüne toleransı, hücrel homeostazı restore etmek ve hayatta kalmayı teşvik etmek için karmaşık çok bileşenli sinyal yolları tarafından tetiklenir. Stresten kaynaklanan çevresel streslerin hücrel etkileri sadece iyonik ve ozmotik homeostaz dengesizlikleri değil, aynı zamanda bozulmuş fotosentez, hücrel enerjinin tüketilmesi ve redoks dengesizlikleri

olarak ortaya çıkar. Çevresel stres koşulların algılanması ve hücrel sinyal iletim yolları ile bitki savunma sistemlerinin stres koşullarına göre aktive olması, stres ve enerji sinyalleşmesi ara yüzlerine ışık tutmuştur (Gollack vd., 2014).

Temel olarak bitkiler, tuz stresinden kaçınarak veya tolere ederek baş ederler. Yani bitkiler ya tuz dönemi sırasında uykudadır ya da tuzlu ortamı tolere etmek için hücrel uyum olmalıdır. Tolerans mekanizmaları, ozmotik stresi veya iyon dengesizliğini en aza indirme veya bu streslerin neden olduğu ikincil etkileri hafifletme işlevi gören mekanizmalar olarak kategorize edilebilir. Tuzlu su çözeltisinin kimyasal potansiyeli başlangıçta apoplast ve semplast arasında su potansiyeli dengesizliği oluşturur, bu da turgorun azalmasına yol açar, bu da yeterince şiddetliyse büyümenin azalmasına neden olabilir (Yamada vd., 1995). Büyümenin durması, turgor hücre duvarının verim eşliğinin altına düştüğünde meydana gelir. Hücrel dehidrasyon, su potansiyeli farkı, turgor kaybıyla telafi edilebilecektense daha büyük olduğunda başlar (Ouzounis vd., 2015). Bitki hücresi büyümesi, esas olarak, vakuolar hacimdeki bir artışın aracılık ettiği yönlü genişleme nedeniyle meydana geldiğinden, Na^+ ve Cl^- 'nin bölümlere ayrılması, hücrel gelişim için gerekli olan ozmotik ayarlamayı kolaylaştırır.

İyonların vakuole hareketi, membran vezikülasyonu veya plazma membranını tonoplast ile yan yana getiren sitolojik bir süreç yoluyla doğrudan apoplasttan vakuole doğru gerçekleşebilir (Hasegawa vd., 2000). Daha sonra, sitozolün toksik iyonlara minimum düzeyde maruz kalmasıyla veya hiç maruz kalmamasıyla bölümlendirme gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, şu anda bunun gibi süreçlerin vakuolar iyon bölümlendirmesine ne ölçüde katkıda bulunduğu açık değildir. Apoplasttan vakuole doğru Na^+ ve Cl^- hareketi büyük olasılıkla plazma zarı ve tonoplastta bulunan iyon taşıma sistemleri aracılığıyla gerçekleşir. Muhtemelen, plazma zarı boyunca net akışı ve vakuolar bölümlendirmeyi kontrol etmek için bu iyon taşıma sistemlerinin sıkı koordinat düzenlemesi gereklidir. SOS sinyal yolu, iyon homeostazı için gerekli olan en azından bazı temel taşıma sistemlerinin önemli bir düzenleyicisidir (Sanders, 2000).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Bitki materyali

Hypericum perforatum L. bitkisi Muğla yöresinin dağlarından toplanarak Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. Güven Görk tarafından teşhis edilmiştir. Toplanan bitkilerin tohumları çıkartılarak çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan cihazlar

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası	Tez kapsamında kullanım amacı
Laminar Akımlı Güvenlik Kabini	Biobase BBS- H1300	Dışarıdan içeriye hava girmesine engel vermeyecek laminar akım sistemiyle steril bir alan oluşturarak <i>in vitro</i> 'ya bitki aktarımı, mikroçoğaltım, kriyoprezervasyon aşamaları vb. çalışmalarda kontaminasyon yaşanmadan deneylerin gerçekleşmesini sağlar.
Boncuk Sterilizatör	Biobase GBS- 5000A	Laminar akımlı kabin içerisindeki tüm doku kültürü ve kriyoprezervasyon çalışmalarında, penset, pens, bistüri, makas gibi en temel gerekli ekipmanların sterilizasyonunu sağlar.
Hassas Terazi	Shimadzu Corporation ATX224	Besiyeri vb. çalışmalarda kimyasalların hassas bir şekilde hiçbir akım olmayan bir ortam yaratarak ölçülmesini sağlar.
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Daihan MSH-20A	Kimyasal ve besiyeri hazırlarken solüsyonların hücre içeriğinin homojen olarak karışmasını sağlar

Çizelge 3.1. (devamı)

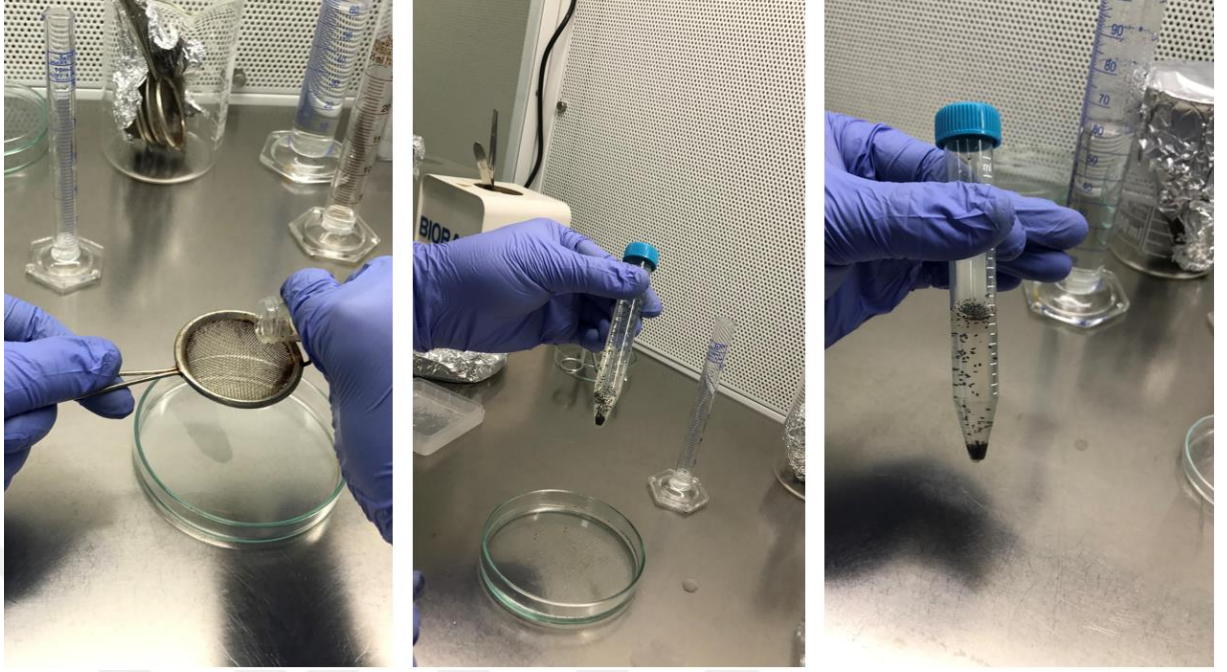
Masaüstü pH metre	Shimadzu Corporation	Deneyleler sırasında hazırlanacak olan tüm kimyasalların ve besiyerlerinin pH değerlerinin belirlenmesinde kullanılır.
+4 Buzdolabı	Shimadzu Corporation	Çözeltilerin, bazı kimyasalların ve besiyerlerinin bozulmadan saklanması sağlanır.

3.2.3 Bitki materyalinin sterilizasyonu

Elde edilen bitki materyalleri (tohumları), doğadan direkt olarak alınması nedeni ile üzerinde birçok mikroorganizma barındırma ihtimaline karşı sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmelidir. Bitkilerin *in vitro* ortamda steril bir şekilde kontaminasyona uğramadan kültüre alınması için tohum sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bitkilerden elde edilen tohumlarımız;

- %70'lik etil alkolde 5 dakika çalkalanmıştır. Ardından 1-2 dakika arası saf suda durulanmıştır.
- %10'luk domestosda 10 dakika çalkalanmıştır. Yaklaşık 2-3 dakika saf suda durulanmıştır.
- Boş bir petrinin içerisine filtre kâğıdı konulmuştur.
- Tohumlar filtre kağıdının üzerine aktarılıp kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Bitki tohumlarının sterilizasyon aşamaları

3.2.4 Besin ortamı

Bu çalışmada ilk olarak tohumların çimlenebilmesi için yarı güçlü MS (1/2 MS) kullanılmıştır. Bu ortamın oluşturulması için;

- ½ MS için 1000 ml besiyeri hazırlanmıştır. MS (Murashige&Skoog Medium) bir besiyeridir.
- 4,40 gr MS vitaminli konsantrasyon terazide tartılıp boş bir beherin içerisine aktarılmıştır.
- Üzerine 30 gr sükröz eklenmiştir.
- Karıştırılma işlemi gerçekleştirildikten sonra pH ölçer cihazı ile pH değeri 5,8 olarak ayarlanmıştır.
- Beherde hazırladığımız karışımı mezüre aktarıp saf su ile toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
- 1000'lük 2 tane otoklav şişesinin her biri için 7 gr agar terazide tartılmış ve 2 tane cam şişeye aktarılmıştır.

- Besiyeri içeren cam şişelerin kapakları yarım kapatılmıştır ve biraz karıştırıldıktan sonra üzerine alüminyum folyolar geçirilip otoklavlanmaya bırakılmıştır.
- Otoklavdan sonra çıkarılan besiyerleri laminar kabine getirilmiştir.
- Daha sonra kültür kaplarına dökme işlemi gerçekleştirilip kabinde soğuyarak donması sağlanmıştır.
- Sterilize edilmiş tohumlarımız soğumuş kültür kaplarına alınmıştır ve bitki büyüme odasına (16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyodik koşulda 24°C sıcaklık) kaldırılmıştır.

Çizelge 3.2. Besin ortamında kullanılan bileşenlerin miktarları

Bileşenler	1 Litrede Bulunması Gereken Miktarlar
MS	4,30g/L
Sükroz	30g/L
Agar	7g/L

Tohumlar ilk kültüre alınması işleminden 24 gün sonrasında çimlenen tohumlarımızı MS+1 mg/L BA besin ortamına aktararak kallus oluşuma ve yaprak sayısının ve gelişiminin artırılmasına teşvik edilmiştir. MS+1 mg/L BA besin ortamında bulunan bileşenler aşağıda listelenmiştir.

Çizelge 3.3. Yaprak sayısı ve kallus oluşumu için kullanılan besin ortamlarının bileşenlerin miktarları

Bileşenler	1 Litrede Bulunması Gereken Miktarlar
MS	4,30 g/L
Sükroz	30 g/L
Agar	7 g/L
BA	1 mg/L

Kallus oluşumuna teşvik edilmiş bitkilerde sonrasında tuz konsantrasyonunun farklı seviyelerde olduğu besiyerleri dökülmüştür. Farklı tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde bulunan bileşenler aşağıda listelenmiştir.

Çizelge 3.4. Tuz stresine sahip besin ortamlarının bileşenlerinin miktarları

Bileşenler	1 Litrede Bulunması Gereken Miktarlar
MS	4,30 g/L
Sükroz	30 g/L
Agar	7 g/L
BA	1 mg/L
NAA	1 mg/L
NaCl	50/100/150 mM

3.2.5 Fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS ile belirlenmesi

Denemelerde yer alan her bir *H. perforatum* grubundan 5 g tartılmıştır, 200 ml azot ile parçalanmaları sağlanmıştır. Üzerine 30 mL aseton:su (80:20) karışımı ilave edilmiş ve -86 °C’ de 6 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Soğutucudan çıkartılan karışım ultrasonik banyoda 15 dakika tutulduktan sonra, ekstrakt 4000 rpm’de 20°C’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Whatman No 4 filtre kağıdından süzölmüş ve daha sonra kalıntı 2 kez daha 30 mL’ lik aseton:su karışımları ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Birleştirilen ekstraktlardaki aseton düşük vakum altında, 40°C’de buharlaştırılmıştır. Sulu faz, 3 kez 30 mL n-hekzan ve ardından dietileter ile yıkanmıştır sonra 3 kez 30 mL etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Organik fazlar birleştirilmiştir. 40°C’de buharlaştırılarak kurutulmuş ve su:metanol (80:20) karışımında tekrar çözülmüştür. Çözelti Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0.20 µm filtrelerden geçirilerek UPLC-MS/MS analizi yapılmıştır (Kıvrak, 2013).

Çizelge 3.5. Acquity UPLC cihaz analiz şartları

Acquity UPLC Cihaz Parametreleri				
Column	Acquity UPLC BEH C18 column (1.7µm 2.1x100mm)			
Mobil Phase A	%0,5'lik CH ₃ COOH içeren H ₂ O			
Mobil Phase B	%0,5'lik CH ₃ COOH içeren MeOH			
Column Oven Temp	40°C			
Injection Volume	2µL			
Gradient Program	Time (dak.)	Flow (mL/dak.)	% Solvent A	% Solvent B
	0.00	0.650	99.00	01.00
	1.00	0.650	99.00	01.00
	10.00	0.650	70.00	30.00
	12.00	0.650	05.00	95.00
	12.10	0.650	99.00	01.00
	15.00	0.650	99.00	01.00

Çizelge 3.6. Xevo TQ-S MS/MS cihaz analiz şartları

Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Parametreleri	
Ion Mode	ESI (+) yada ESI(-)
Capillary Voltages	3000 V
Cone Voltages	10-50 V
Source Offset	60 V
Desolvation Temperature	500°C
Desolvation Gas Flow	1000 (L/hr)
Cone Gas Flow	150 (L/hr)
Nebuliser	7.0 bar
Source Temperature	150°C
LM Resolution 1	3
HM Resolution 1	15
Ion Energy 1	1
LM Resolution 2	3
HM Resolution 2	15
Ion Energy 2	1
Collision Gas Flow	0.17
Collision Energy	0-40

Çizelge 3.7. Fenolik bileşiklerin geçiş, Cone ve Collision enerji değerleri

No	Bileşenler	Geçişler (m/z)	^a Cone (V)	^b CE (V)	^c RT (min)
1	Pirogallol	125.01 > 69.10, 79.04, 81.02	20	17, 17, 14	0.97
2	Homogentisik asit	167.03 > 123.03, 122.08, 108.00	10	20, 20, 10	1.47
3	Protokateşuik asit	153.06 > 108.00, 81.01, 91.01	10	20, 25, 20	1.85
4	Gentisik asit	153.05 > 109.04, 108.03, 81.00	10	20, 20, 12	1.85
5	Pirokatekol	153.06 > 81.01, 108.00, 109.04	8	20, 25, 20	2.38
6	Galantamin	288.10 > 198.00, 213.09, 230.95	20	32, 23, 17	2.68
7	<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	136.98 > 93.03, 65.10	10	25, 14	2.75
8	3,4-Dihidroksibenzoaldehit	137.00 > 91.93, 107.94, 136.00	8	21, 20, 18	2.76
9	Katekin hidrat	288.88 > 109.15, 124.99, 245.26	30	25, 20, 15	3.45
10	Vanilik asit	166.98 > 151.97, 108.03, 123.03	20	18, 12, 14	3.61
11	Kafeik asit	179.10 > 135.14, 107.10, 133.9	32	23, 23, 24	3.65
12	Şiringik asit	197.20 > 123.00, 167.00, 182.00	15	22, 18, 14	4.11
13	Vanilin	150.95 > 135.94, 91.90, 107.97	30	20, 20, 14	4.50
14	Epikatekin	189.18 > 151.00, 203.00, 205.00	20	20, 20, 20	5.50
15	<i>p</i> -Kumarik asit	163.01 > 119.04, 93.00, 117.01	5	27, 27, 15	4.65
16	Ferulik asit	193.03 > 134.06, 178.00, 149.02	20	16, 12, 13	5.36
17	Katekin gallat	441.00 > 168.98, 288.97	30	20, 20	5.91
18	Rutin	609.00 > 254.99, 270.93, 299.90	17	55, 55, 40	5.95
19	<i>trans</i> -2-hidroksi sinnamik asit	163.04 > 119.04, 117.01, 93.07	10	25, 22, 13	6.32
20	Mirisetin	316.90 > 107.07, 137.01, 150.97	30	30, 25, 25	6.83
21	Resveratrol	227.01 > 143.01, 159.05, 185.03	30	25, 18, 18	7.13
22	<i>trans</i> -Sinnamik asit	146.98 > 103.03, 62.18	30	10, 10	8.19
23	Luteolin	284.91 > 107.01, 133.05, 151.02	20	30, 33, 30	8.27
24	Kuersetin	303.00 > 137.00, 153.00, 229.00	20	30, 32, 30	8.29
25	Naringenin	270.98 > 107.00, 119.04, 150.97	20	25, 25, 20	9.07
26	Genistein	271.00 > 153.00, 215.00, 243.00	20	27, 25, 24	9.22
27	Apigenin	269.10 > 107.00, 117.00, 149.00	20	30, 30, 25	9.35
28	Kamferol	284.90 > 158.97, 117.10, 227.14	10	34, 40, 30	9.50
29	Hesperetin	301.02 > 108.01, 136.00, 163.99	20	36, 30, 24	9.71
30	Krisin	252.99 > 63.05, 107.05, 142.99	20	30, 25, 25	11.06

^aCone : Cone Voltaj

^bCE : Collision Enerji

^cRT : Alıkonma Zamanı

3.2.6 İklİmlendirme odası koşulları

Kültüre alınan bitkiler, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodik koşulda 24°C sıcaklığa sahip bitki büyüme odalarında saklanmıştır.

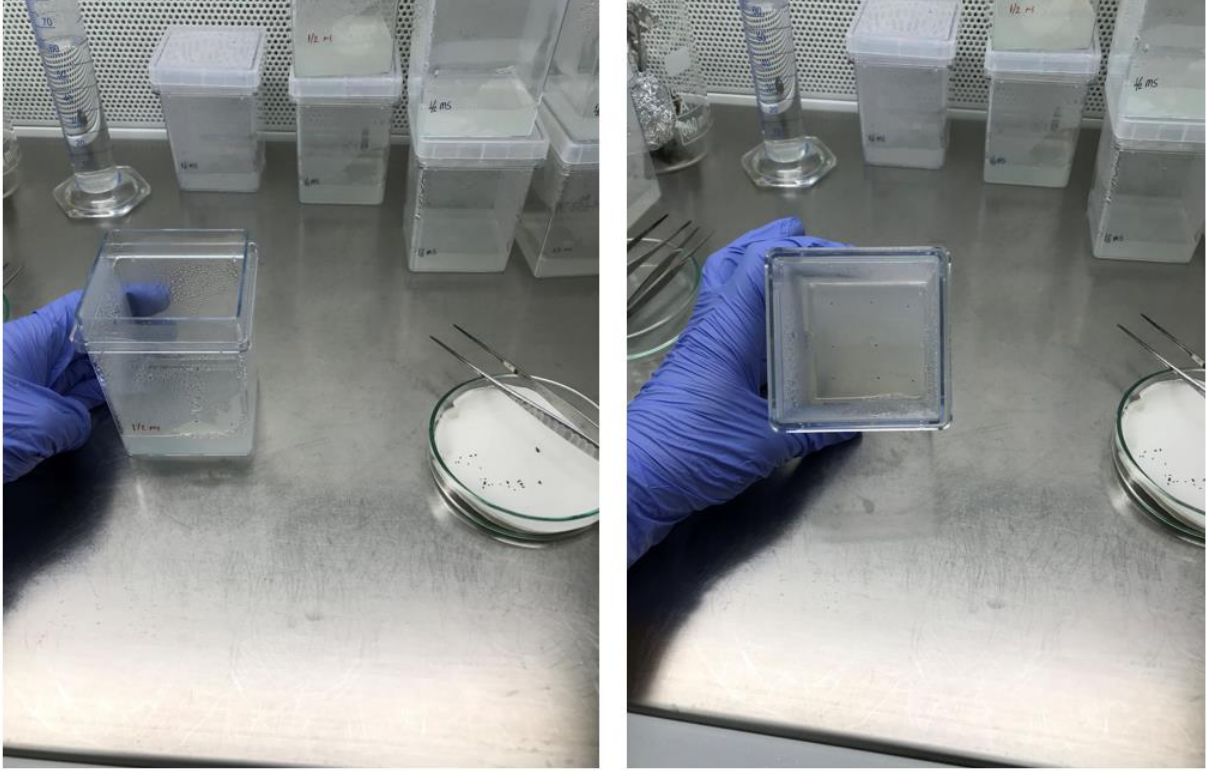


Şekil 3.2. İklİmlendirme odasından bir görünüm

4. BULGULAR

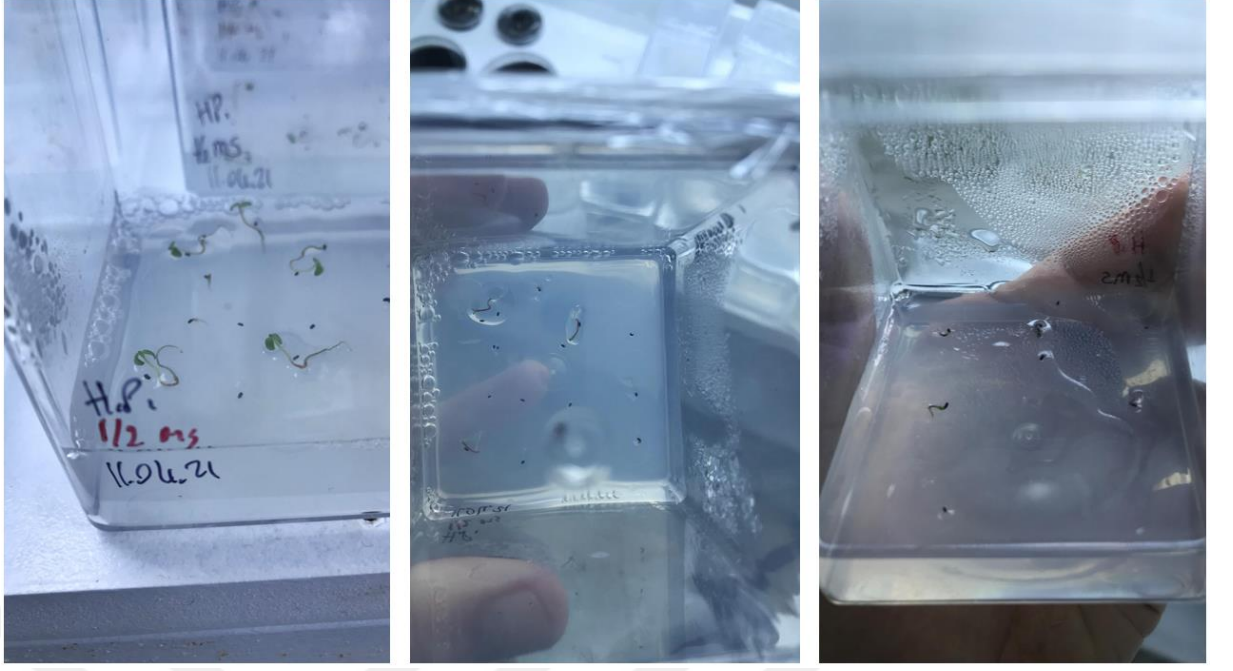
4.1 Tohumların kültüre alınması

İlk olarak sterilize edilen tohumlar çimlenebilmesi için yarı güçlü MS (1/2 MS) ortamına alınmıştır. Her bir magentada 9 tohum olacak şekilde 30 tane magentaya toplamda 270 bitki olacak şekilde alınmıştır.



Şekil 4.1. Sterilize edilmiş tohumların magentalara ekimi

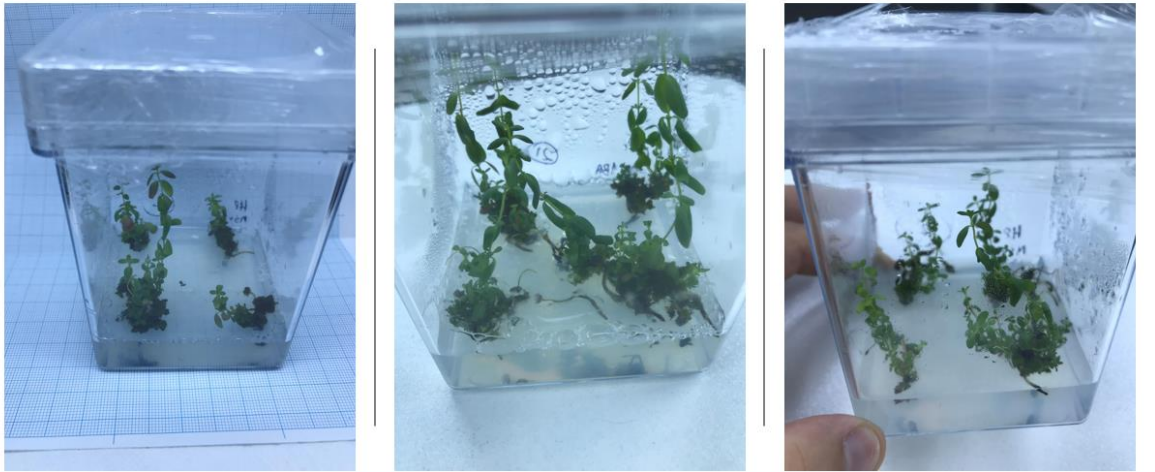
24 gün sonunda çimlenen tohumlar kallus oluşumuna teşvik ve sürgün oluşumunu arttırmak amacıyla MS+1 mg/L BA ortamına alınmıştır. Bitkiciklerde yaprak ve sürgün gelişimini arttırmak için 27 gün MS+ 1 mg/L BA ortamında bekletilmiştir.



Şekil 4.2. 1/2 MS ortamında kültüre alınan *H. perforatum* bitkisinin tohumlarından bir görüntü (15.gün)

4.2 Kallus kültürü ve tuz stresi uygulamaları

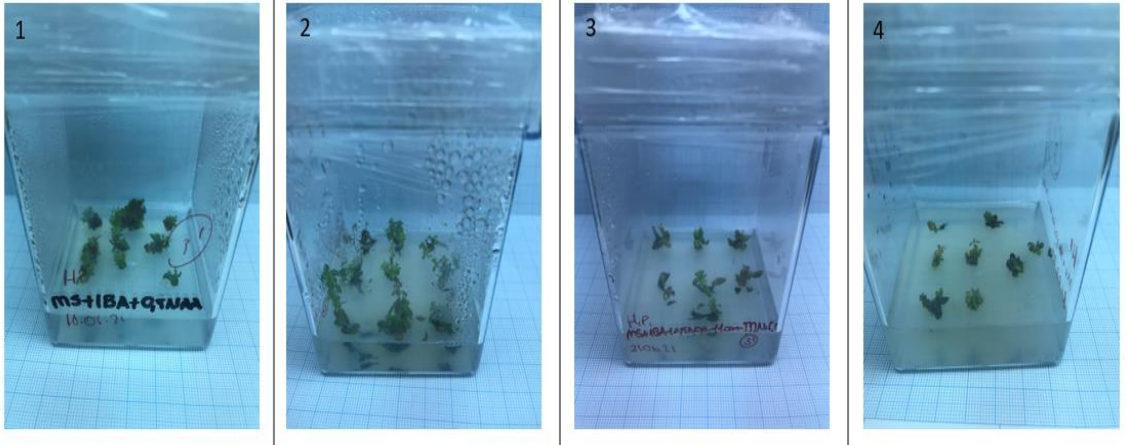
Sürgün ve yaprak gelişimi sağlanan bitkicikler tuz stresi uygulamalarına alınmıştır. Tuz stresi uygulamaları için Çizelge 3.4. 'da verildiği üzere hazırlanan besin ortamlarına gelişimi sağlanan bitkicikler alınmıştır.



Şekil 4.3. Tuz içeren besin ortamına alınmadan önce *H. perforatum* bitkisinden görünüm

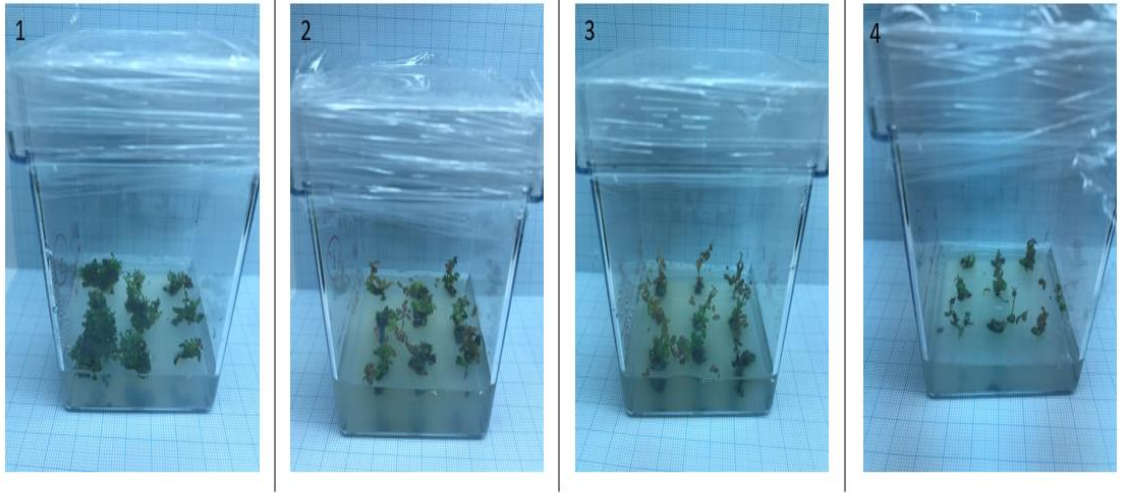
Bu kültüre alma çalışması için;

- Daha öncesinde kallusa teşvik edilen bitkicikler steril kabin içerisine alınmıştır.
- Bitkiciklerin gelişim göstermiş yaprak ve kalluslarından kesitler alınarak 8 farklı tuz konsantrasyonuna sahip her bir konsantrasyon için 9'ar magenta ayrılmıştır. 9 magentadan 3 tanesine yapraklar, 6 tanesine bitkiciklerin transferi sağlanmıştır. Yaprak içeren magentalarda ortalama 10 yaprak, bitkicik içeren magentalarda ise ortalama 6 tane olacak şekilde toplamda 72 magentada 240 yaprak ve 432 bitkicik magentalara alınıp bitki büyüme odasına kaldırılmıştır.
- 55 gün sonunda büyüme ve gelişimlerine devam eden bitkicikler farklı konsantrasyonda tuz içeren taze besin ortamlarına her bir grupta yaklaşık 9 magenta ve her bir magentada yaklaşık 6 bitki olacak şekilde toplamda 70 magentada 540 bitki şeklinde altkültür yapılmıştır.
- 27 gün sonunda gelişim gösteren bitkiler yaş ağırlıklarının ölçülmesi için her bir magentadan bitkiler çıkartılıp temizlenip her bir bitki için yaş ağırlıkları ölçülmüştür ve fenolik bileşiklerinin analizi için bitkicikler nemsiz ortamda kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 4.4. *H. perforatum* bitkisinin tuz ilaveli besin ortamına alınmasından 7 gün sonrasındaki görünümleri

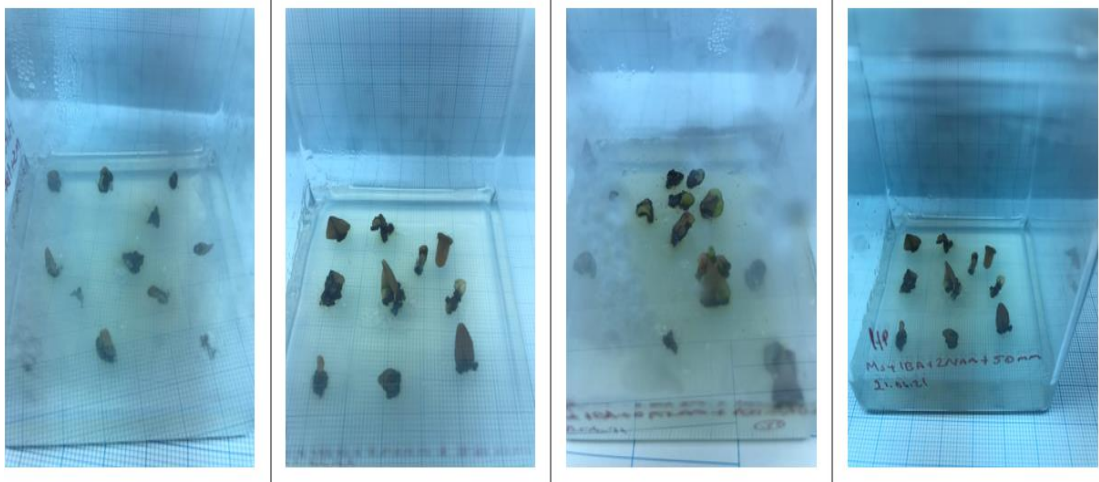
(MS+1 mg/L BA +2 mg/L NAA+k, 2: MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+50 mM NaCl 3: MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+100 mM NaCl 4: MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+150 mM NaCl)



Şekil 4.5. *H. perforatum* bitkisinin tuz ilaveli besin ortamına alınmasından 12 gün sonrasındaki görünümleri

(1:MS+1 mg/L BA +0,5 mg/L NAA+k, 2: MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+50 mM NaCl 3: MS+1 mg/L BA +0,5 mg/L NAA +100 mM NaCl 4: MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+150 mM NaCl)

Farklı tuz miktarlarına sahip besiyerlerine alınan bitkiler yeni kültüre alınmasından 12. gününde kontrol (MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA / MS+1 mg/L BA +2 mg/L NAA) ve 50 mM NaCl içeren (MS+1 mg/L BA +0,5 mg/L NAA/ MS+1 mg/L BA +2 mg/L NAA) bitki gruplarında yapraklar sert ve yeşil devam ederken 100 mM NaCl içeren (MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA/ MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA) ve 150 mM NaCl içeren (MS+1 mg/L BA +0,5 mg/L NAA / MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA) bitkilerde kararmalar meydana gelmiştir.



Şekil 4.6. Tuz ilaveli besin ortamına alınan yapraklarda gözlenen kahverengileşme ve sararmalar

Tuz stresi uygulanan bitkilerin 13. günde kontrol gruplarında ilk kallus oluşumu görülürken 50 mM tuz stresinde büyüyen bitkilerde 15. günde, 100 mM tuz stresine sahip bitkilerde 20. günde kallus oluşumu gözlenmiştir ve 150 mM tuz stresine sahip bitkilerde 26. günde kallus oluşumu gözlenirken 26. günün sonunda kontrol gruplarında ve 50 mM tuz stresine sahip besin ortamında büyüyen bitkilerde yaprakları açık yeşil renkte ve oluşan kallusların büyüme ve gelişimleri devam ettiği gözlemlenirken 100 mM ve 150 mM tuz stresine sahip ortamda büyüyen bitkilerde yapraklarında sararmalar, büyüyen kalluslarda lokal kararmalar meydana gelmiştir.

Tuz stresini uygulanan bitkilerin 35. gününde kontrol gruplarının yapraklarında ve kalluslarında kararmalar gözlenmezken 50 mM tuz stresine sahip besin ortamında büyüyen bitkilerde yapraklarında nadiren sararmalar ve kalluslarında küçük kararmalar gözlenmiştir 100 mM ve 150 mM tuz stresine sahip besin ortamında büyüyen bitkilerde yapraklarında sararmalar ve kalluslarında kararmalar meydana gelmiştir.

Taze besin ortamına (altkültür) alınmadan önce bitkilerde;

- MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+K besin ortamında büyüyen bitkilerde 54 bitkiden 53 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiştir ve bitkiler yeşil renkte canlılığını devam ettirmiştir.
- MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+50 mM NaCl besin ortamında büyüyen bitkilerde 54 bitkiden 52 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiş ve çok küçük sararmalar meydana gelse bile kontrol grupları kadar yeşil renkte canlılığını devam ettirmiştir.
- MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+100 mM NaCl besin ortamında büyüyen bitkilerde 54 bitkiden 30 tanesinde kallus oluşumu gözlenirken, bu kallusların kontrol grubu ile kıyaslandığında boyut olarak çok küçük kaldığı ve yaprakların sararmalar, kalluslarda kararmalar olduğu gözlemlenmiştir.
- MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+150 mM NaCl besin ortamında büyüyen bitkilerde 54 bitkiden 37 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiştir ve diğer tüm gruplara göre yaprak sayısı, rengi, kallus boyutu olarak daha küçük olarak gözlemlenmiştir

- MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+K besin ortamında büyüyen bitkilerde 54 bitkiden 51 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiştir ve yapraklarımız yeşil kalluslarda kararmalar meydana gelmemiştir.
- MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+50 mM NaCl içeren besin ortamında büyüyen bitkilerde 54 bitkiden 48 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiştir ve bitkiler kontrol gruplarına kıyasla yapraklarda sayı ve yeşillik olarak neredeyse aynı durumdadır. Kalluslarında kararmalar meydana gelmemiştir.
- MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+100 mM NaCl içeren besin ortamında büyüyen bitkilerde 54 bitkiden 36 tanesinde kallus oluşumu gözlenirken bitkiler kontrol gruplarına göre yaprak sayısı, rengi, kallus boyutu olarak çok küçük haldedir.
- MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+150 mM NaCl içeren besin ortamında büyüyen bitkilerde 54 bitkiden 45 tanesinde kallus oluşumu gözlenmiştir ve diğer tüm gruplara göre yaprak sayısı, rengi, kallus boyutu olarak daha küçük olarak gözlemlenmiştir

Taze besin ortamına alınmadan önce kontrol yapıldığında deney başında ortama alınan yaprakların gelişimlerinin yavaş olması ve stres altındaki yapraklarda kararmalar meydana geldiği için deneylerin bir sonraki aşamalarında kullanılmamak üzere kaldırılmıştır.



Şekil 4.7. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ K içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin kallus gelişiminden görünüm (24. gün)



Şekil 4.8. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ 50 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin kallus gelişiminden görünüm (24. gün)



Şekil 4.9. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA 100 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görünüm ((24. gün)



Şekil 4.10. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ 150 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görünüm (24. gün)

Yukarıdaki görünümü verilen (Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10) MS+1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA içeren besin ortamında büyütülmüş bitkiler taze besin ortamına alınmasından 24 gün sonrasında çekilmiş fotoğraflardır.

48 gün sonunda taze besin ortamına alınan bitkiler her bir grupta 9 magenta ve her bir magentada 6 bitkicik olacak şekilde yeni besin ortamlarına aktarılmıştır. Daha sonra yeni ortamına alınan bitkiler 28 gün yeni ortamda büyümeleri beklenilmiş ve kuru ve yaş ağırlık bakımından ölçülmek üzere çıkarılmıştır. Yaş ağırlıkların ölçümü için öncelikle magentalardan bitkiler çıkartılmış üzerlerine kalan besiyer kalıntıları alınmış ve magentadaki her bir bitki tek tek tartılıp not alınmıştır. MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA içeren besin ortamında büyütülen bitkilerin ağırlıkları Çizelge 4.1. , Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3. 'da verilmiştir. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA içeren besin ortamında büyütülen bitkilerin ağırlıkları ise Çizelge 4.4., Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6. da verilmiştir.



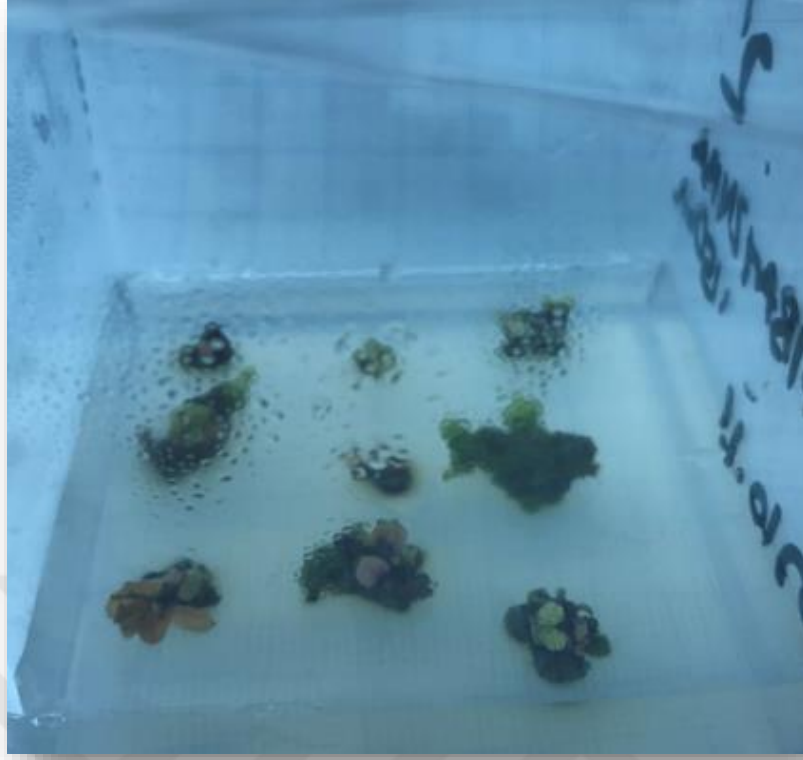
Şekil 4.11. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ K içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görünüm (26. gün)



Şekil 4.12. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 50 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görünüm (26. gün)

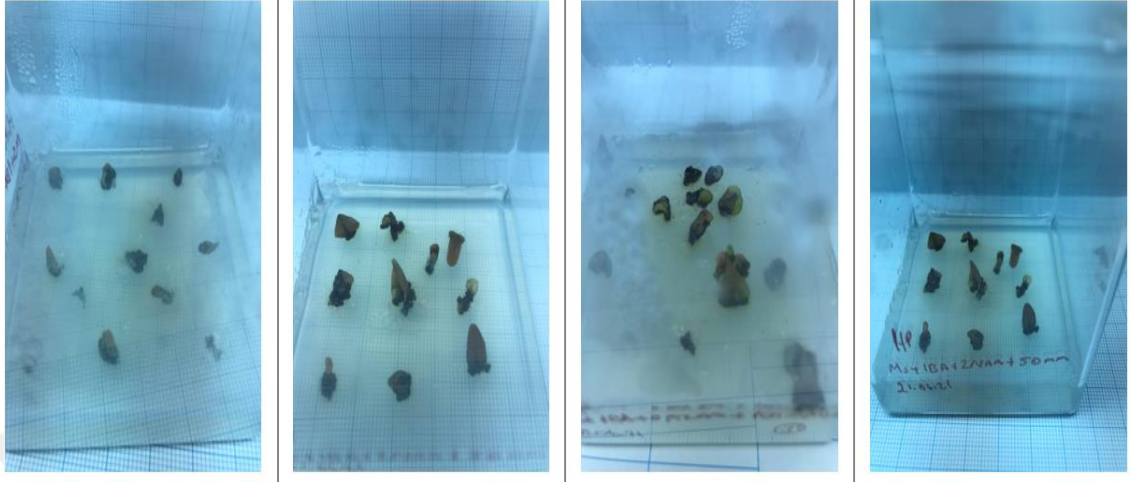


Şekil 4.13. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 100 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görünüm (26. gün)

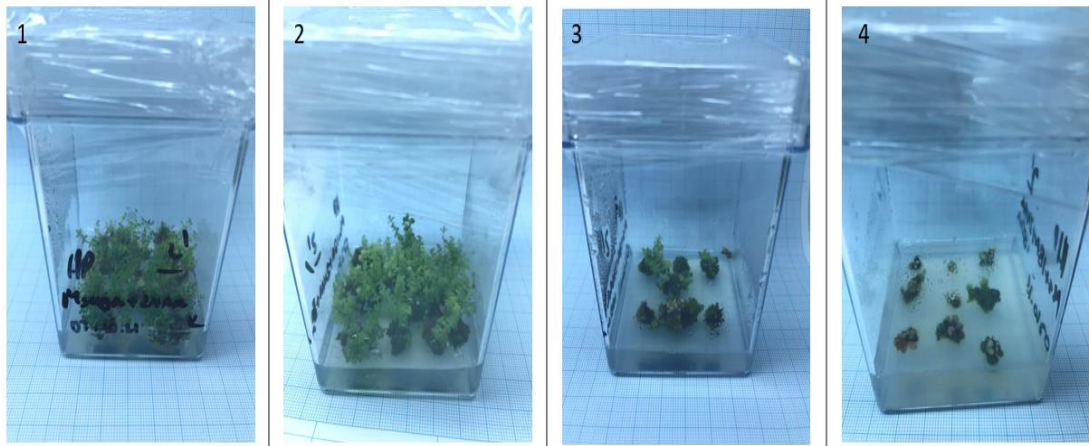


Şekil 4.14. MS+ 1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 150 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülmüş bitkilerin yaprak ve kallus gelişiminden görünüm (26. gün)

Yukarıdaki görünümü verilen (Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14) MS+1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA içeren besin ortamında büyütülmüş bitkiler taze besin ortamına alınmasından 26 gün sonrasında çekilmiş fotoğraflardır.



Şekil 4.15. Yaş ağırlıkları tartılmadan önce *H.perforatum* bitkisinin görünümü (25. gün)
 (1:MS+1 mg/L BA +0,5 mg/L NAA+k, 2: MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+50 mM NaCl 3:MS+1 mg/l BA +0,5 mg/L NAA+100 mM NaCl 4: MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+150 mM NaCl)



Şekil 4.16. Yaş ağırlıkları tartılmadan önce *H. perforatum* bitkisinin görünümü (25. gün)
 (1:MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+k, 2: MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+50 mM NaCl 3: MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+100 mM NaCl 4: MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+150 mM NaCl)

Çizelge 4.1. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+K sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları

Yaş Ağırlıklar (g)								
1.Magenta	2.Magenta	3.Magenta	4.Magenta	5.Magenta	6.Magenta	7.Magenta	8.Magenta	9.Magenta
5	8	7,1	7,2	5,3	2,9	4,5	4,3	6,1
7,3	4	5,6	4,5	9,2	5,1	11,4	2,4	3,7
2,5	4,2	2,1	3,5	8,3	5,4	8,1	3	4,8
4	3,4	6,2	4,7	2,9	4,3	7	4,5	5
4,8	2,3	3,4	3,3	5,2	5,8	2,6	7,1	4,8
3	3,2	10,5	5	2,6	5,7	3,4	4,2	3,7

Çizelge 4.2. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+50 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları

Yaş Ağırlıklar(g)								
1.Magenta	2.Magenta	3.Magenta	4.Magenta	5.Magenta	6.Magenta	7.Magenta	8.Magenta	9.Magenta
2,8	3,3	5,9	3,9	4	3	2,7	2,7	3,1
3,6	4,3	7,7	3,1	4,4	2,1	4,2	2,4	2,2
3,7	5,2	3,9	2,5	4,8	5,1	2,8	5,1	3,8
2,4	4,9	3,3	4,1	4	3	5,4	5,3	5,7
4,6	5,7	2,4	3,8	4,4	2,1	3,7	3,2	3,6
3,6	3,7	4,4	2,4	2,7	-	2,3	3,2	3,8

Çizelge 4.3. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+100 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları

Yaş Ağırlıklar (g)								
1.Magenta	2.Magenta	3.Magenta	4.Magenta	5.Magenta	6.Magenta	7.Magenta	8.Magenta	9.Magenta
2,6	0,8	1,6	1	1,9	2,2	1	0,9	1,9
1,9	1,9	1,6	3,3	2,2	2,1	0,7	1	2,2
2,1	1,6	2	1,2	1,6	2,3	1,2	1,7	2,5
2	1,2	1,6	1,3	1,9	2,4	1	2,2	1,8
2,7	1,5	2,5	0,9	4,2	3	1,8	1,9	2,2
1,1	0,6	3	-	2,7	3,1	1,2	2,4	3,7

Çizelge 4.4. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+150 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin kuru ağırlıkları

Yaş Ağırlıklar (g)								
1.Magenta	2.Magenta	3.Magenta	4.Magenta	5.Magenta	6.Magenta	7.Magenta	8.Magenta	9.Magenta
1,1	1,6	1,9	2,7	2,3	1,5	1,7	0,7	2
2	3	3,3	0,9	2,4	1,5	3	0,6	1
0,8	2,4	2,8	1,8	2,6	0,8	2,3	1	1,5
1,6	3,2	2,4	2,3	2	0,7	2	1,2	1,7
1,9	4	-	1,8	2	0,6	1,7	1,1	0,8

Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 'de verilen yaş ağırlıklar bitkilerin taze besin ortamına alınmasından 48 gün sonra tartım işlemi yapılmıştır. 150 mM NaCl içeren ortamda büyütülen bitkilerimiz ise diğer gruplardan 18 gün sonra tartılmıştır.

Çizelge 4.5. MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+K sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları

Yaş Ağırlıklar (g)								
1.Magenta	2.Magenta	3.Magenta	4.Magenta	5.Magenta	6.Magenta	7.Magenta	8.Magenta	9.Magenta
2,5	3,2	2,6	7,9	4,5	3,6	3,7	2,4	2,9
7,1	5,7	2,9	2,3	3,7	4,3	3,9	2,4	4
6,7	7,8	3,4	5,2	6,8	8,3	2,4	4,2	4,4
5,3	9,5	3,7	1,5	7	4,1	2,5	3,8	3,1
4,2	1,2	6,9	8,6	1,2	5,3	4	2,4	5,4
1,9	1,6	-	1,6	-	1	9,3	4,5	7,2

Çizelge 4.6. MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+50 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları

Yaş Ağırlıklar (g)								
1.Magenta	2.Magenta	3.Magenta	4.Magenta	5.Magenta	6.Magenta	7.Magenta	8.Magenta	9.Magenta
1,8	2,7	3,6	3,5	1,5	2,3	3,1	2,4	1,4
4,3	2,6	4,7	3,8	3,4	2,6	3,3	2,9	1,7
3,2	2,2	3,3	3,2	5,2	3,6	4,1	3,3	4,1
2,7	4	2,8	4,5	2,9	2,8	7,4	3,7	3,2
5,2	3,3	5,7	5,8	3,5	4,9	5,5	1,8	2
5	3	2,9	3,5	-	6,8	5	2,8	1,9

Çizelge 4.7. MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+100 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları

Yaş Ağırlıklar (g)								
1.Magenta	2.Magenta	3.Magenta	4.Magenta	5.Magenta	6.Magenta	7.Magenta	8.Magenta	9.Magenta
0,6	1,6	0,4	1,4	0,4	1,1	1,5	1,4	0,6
0,1	1,3	1,3	1,4	0,5	2,2	1,5	1,3	0,2
0,5	1,3	1,5	2,2	0,7	1,7	2,6	1,5	0,5
0,5	1,5	2	4,6	0,5	1,6	1,4	0,9	1
0,7	2,5	-	1,8	1	3,2	1,7	1,2	2,3
0,7	-	-	3,2	0,6	-	1,2	1,3	1,9

Çizelge 4.8. MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+150 mM NaCl sahip ortamda büyütülmüş bitkilerin yaş ağırlıkları

Yaş Ağırlıklar (g)								
1.Magenta	2.Magenta	3.Magenta	4.Magenta	5.Magenta	6.Magenta	7.Magenta	8.Magenta	9.Magenta
1,3	1	1,3	1,5	1,2	1,5	1,2	0,7	1
1,6	1,1	0,5	0,3	1	1,2	0,8	0,4	0,7
1,8	0,9	0,2	1,6	1	1,5	0,4	0,9	0,6
2	0,3	0,9	1,6	1,1	0,8	0,7	0,5	0,5
1,9	2,2	0,7	1,1	0,7	0,6	0,5	1	0,5

Çizelge 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 'de verilen yaş ağırlıklar bitkilerin taze besin ortamına alınmasından 48 gün sonra tartım yapılmıştır. 150 mM NaCl içeren ortamda büyütülen bitkilerimiz ise diğer gruplardan 18 gün sonra tartılmıştır.

Yaş ağırlıkları ölçülen bitkiler temizlenip tartıldıktan sonra kuru ağırlıklarının ölçülmesi için filtre kağıtlarının üzerine alınmıştır ve kuru ışsız ortamda 2 gün bekletilmiştir. Daha sonrasında kurutulan bitkiler kuru ağırlıkları ölçülmesi için tartım kaplarında toplanarak tartılmıştır.

Çizelge 4.9. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA ve farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlarda büyütülmüş bitkilerin kuru ağırlıkları

Kuru Ağırlıklar (g)		
MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+K	MS+1mg/L BA +0,5mg/L NAA+50mM	MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA +100mM
10,27	10,36	6,9

Çizelge 4.10. MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA ve farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlarda büyütülmüş bitkilerin kuru ağırlıkları

Kuru Ağırlıklar (g)		
MS+1mg/L BA +0,5mg/L NAA+K	MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA +50mM	MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA +100mM
10,85	9,56	5,2

4.3 İstatistiki analiz sonuçları

Yapılan çalışmalarda 2 adet besin ortamında ve 3 farklı tuz konsantrasyonuna sahip besin ortamlarında büyütülen bitkilerin, farklı tuz konsantrasyonları arasındaki farkları anlamak için öncelikle ortamlarda büyütülen bitkilerin ağırlık değerlerinin normal dağılıp dağılmadığı analiz edilmiştir.

Bu analizler için 3 farklı yöntem vardır.

- Histogram grafiği veri setleri çarpık değilse ve normal dağılmış halde ise bu yöntem kullanılır.
- Shapiro-Wilks testi bu testler yapılırken örnek sayısı 30'dan küçük olması gerekir örneklerimiz çok fazla olduğu için bu test yöntemi kullanılmamıştır.
- One-Sample Kolmogorov-Smirnov Testi veriler sıralandığından farklı değişkenler arasındaki oranlar karşılaştırılır ve değişkenlerin oranları 0,05'ten büyükse veriler normal dağılıyordur.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov testi yapılan verilerin normalliği ortaya çıkarılmıştır. Ardından verilerin anlamlılığını ölçmek için KRUSKAL-WALLIS testi uygulanmıştır. KRUSKAL-WALLIS testine göre farklı gruplardan olan bitkilerin ağırlıklarının total ağırlıklara oranları karşılaştırılmıştır. Ortaya çıkan sonuçlarda tuz stresine sahip besi ortamlarında büyütülen bitkilerin büyüme ve gelişme oranlarının, tuz stresinin miktarı ile ters orantılı olduğunu ve ortamdaki tuz miktarı arttıkça *H. perforatum* bitkisinin büyüme ve gelişiminin yavaşladığı gözlemlenmiş ve istatistiki olarak kanıtlanmıştır.

Statistics

		MS+1 mg/L BA+0,5mg/L NAA	MS+1mg/L BA+0,5mg/L NAA+50mM NaCl	MS+1mg/L BA+0,5mg/L NAA+100mM NaCl	MS+1mg/L BA+0,5mg/L NAA+150mM NaCl	MS+1mg/L BA+2mg/L NAA	MS+1mg/L BA+2mg/L NAA+50mM NaCl	MS+1mg/L BA+2mg/L NAA+100mM NaCl	MS+1mg/L BA+2mg/L NAA+150mM NaCl
N	Valid	56	56	56	56	56	56	56	56
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		4,8821	3,5714	1,8018	1,5107	4,0286	3,3286	1,2143	,8096
Std. Error of Mean		,27796	,19009	,11615	,13894	,32516	,20118	,12359	,07792
Median		4,5000	3,6500	1,9000	1,6000	3,7500	3,2500	1,3000	,7500
Mode		3,00 ^a	2,40	1,90	,00	,00 ^a	3,30	,00	,00
Std. Deviation		2,08004	1,42251	,86917	1,03970	2,43331	1,50547	,92489	,58313
Variance		4,327	2,024	,755	1,081	5,921	2,266	,855	,340
Range		9,30	7,70	4,20	4,00	9,50	7,40	4,60	2,20
Minimum		2,10	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00
Maximum		11,40	7,70	4,20	4,00	9,50	7,40	4,60	2,20
Percentiles	25	3,3250	2,7000	1,2000	,7250	2,4000	2,6000	,5000	,4000
	50	4,5000	3,6500	1,9000	1,6000	3,7500	3,2500	1,3000	,7500
	75	5,7750	4,4000	2,2750	2,3000	5,3750	4,1000	1,6000	1,2000

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Şekil 4.19. Farklı oranlarda tuz içeren ortamlarda büyütülen *H. perforatum* bitkilerinin ağırlıklarının istatistiksel analizi

Yukarıda verilen grafikte farklı ortamlarda büyütülen bitkilerin ağırlıklarının ortalama, maksimum, minimum değerleri, standart sapması ve her yüzdelikte ağırlık bakımından miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı konsantrasyondan bitkilerin One-Kolmogorov-Smirnov analizi

One-Sample Kolmogorov-Smirnov analizleri	Mean	Std. Deviation (±)	Positive	Negative	Test Statistic	P-Value
Ms+1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+0 mM NaCl	4,8804	0,98929	0,590	-0,89	0,84	0,200
Ms+1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ 50 mM NaCl	3,5714	1,42251	0,66	-0,97	0,097	0,200
Ms+1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ 100 mM NaCl	1,80	0,86917	0,73	-0,69	0,73	0,200
Ms+1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA+ 150 mM NaCl	1,51	1,03970	0,105	-0,073	0,105	0,184
Ms+1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+0 mM NaCl	4,09	0,88315	0,099	-0,151	0,151	0,003
Ms+1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 50 mM NaCl	3,32	1,50547	0,107	-0,082	0,107	0,167
Ms+1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 100 mM NaCl	1,21	0,92489	0,111	-0,95	0,111	0,084
Ms+1 mg/L BA+ 2 mg/L NAA+ 150 mM NaCl	0,8096	0,58313	0,96	-0,83	0,096	0,200

KRUSKAL-WALLIS testi iki ya da daha çok örneklem ortalamasının birbirinden önemli bir farklılık gösterip göstermediğini test etmekte kullanılır. Tek yönlü varyans analizinin (ANOVA) parametrik olmayan karşılığıdır.

Çizelge 4.12. Farklı besin ortamlarında büyütülmüş bitkilerin KRUSKAL-WALLIS testi sonuçları

Test Statistics^{a,b}

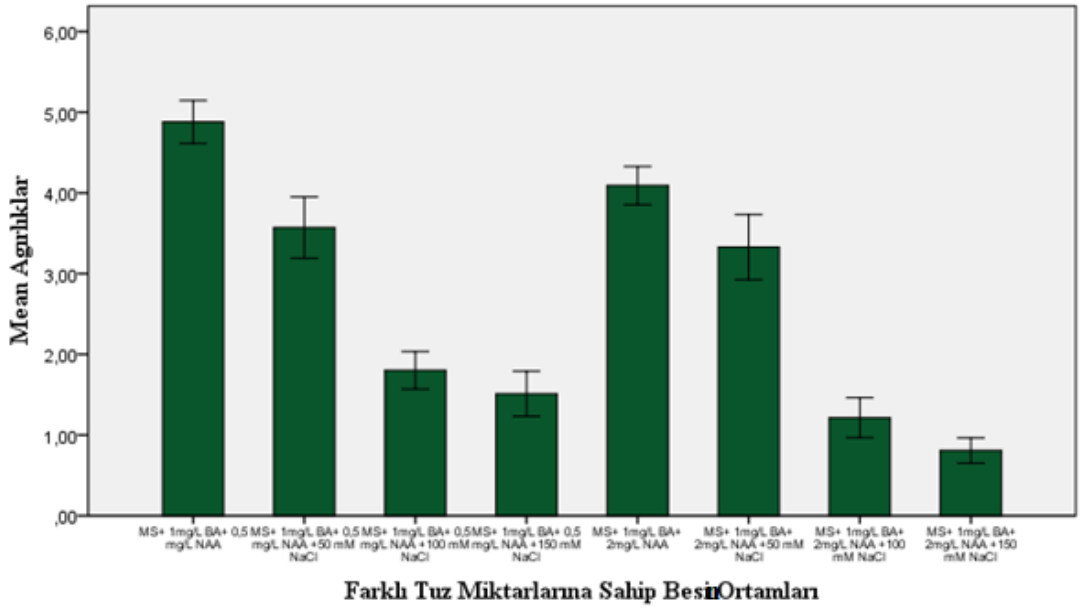
	Tüm Ağırlıklar
Chi-Square	293,716
df	7
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Farklı Tuz Miktarları

Yapılan KRUSKAL-WALLIS testi sonuçlarına göre “p” değeri 0,05 ‘den küçük olduğu ortaya çıkmıştır “p” değeri 0,05 ‘den küçük olması H1 hipotezine göre farklı stres ortamlarda büyüyen bitkiler arasında ağırlık bakımından karşılaştırıldığında önemli bir sayısal farklılıklar ortaya çıktığını ispatlamıştır.

Çizelge 4.13. Farklı besin ortamlarında büyütülen bitkilerin ağırlıklarının bar grafiği



Error bars: 95% CI

Yapılan istatistiki analizlere göre farklı besin ortamlarda büyütülen *H. perforatum* bitkisinin ağırlıkları baz alınarak yapılan çalışmalarda MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+ 50 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülen *H. perforatum* bitkisinin diğer besin ortamlarına göre büyüme, gelişme ve rejenerasyon oranlarının daha iyi olduğu istatistiksel olarak kanıtlanmıştır. Bu ortamda büyütülen bitkilerin diğer ortamlara göre yaprak rengi, kallus büyüklüğü ve ağırlık bakımından diğer ortamlardan daha sağlıklı ve büyük olduğu istatistiksel olarak kanıtlanmıştır.

4.4 Fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS ile analiz sonuçları

Fenolik bileşikler, tüm bitkilerde bulunan iyi bilinen fitokimyasallardır. Basit fenoller, benzoik ve sinamik asit, kumarinler, tanenler, ligninler, lignanlar ve flavonoidlerden oluşurlar. Son 25 yılda fenolik bileşiklerin tıbbi ve diyet molekülleri olarak ekstraksiyonu, tanımlanması ve miktar tayinine odaklanan araştırmalarda önemli gelişmeler meydana gelmiştir (Khoddami vd., 2013). Ayrıca fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri, bitkilerde biyolojik sistemlerin antioksidatif savunma mekanizmalarında olduğu gibi, gıda ürünlerinin dayanıklılıklarında da önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu etkilerinden dolayı her bir *H. perforatum* grubunda da daha güncel bir cihaz olan UPLC MS/MS cihazı ve yeni ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır.

Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen çözelti Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0.20µm filtrelerden geçirilerek UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edilmiştir. Ayrım Acquity UPLC BEH C18 kolonu (1.7µm 2.1x100mm) kullanılarak 40°C'da gerçekleştirilmiştir. Numune sıcaklığı 10°C ve enjeksiyon hacmi 1µl'dir. Mobil faz olarak A solvent hattında %0,5'lik CH₃COOH içeren H₂O, B solvent hattında ise %0.5'lik CH₃COOH içeren MetOH kullanılmıştır.

Analiz esnasında 30 adet fenolik bileşik taraması yapılmış ve her bir bileşik için 7 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu veriler kullanılarak *H. perforatum* türünde de Çizelge 4.14. belirtilen fenolik bileşikleri belirtilmiştir.

Çizelge 4.14. Tüm gruplara ait fenolik bileşik içeriği mg/kg (ppm) cinsinden verilmiştir.

No	Bileşenler	Geçişler (m/z)	^a Cone (V)	^b CE (V)	1. Grup (mg/kg)			2. Grup (mg/kg)		
					K	50mM	100mM	K	50mM	100mM
1	Pirogallol	125.01> 69.10, 79.04, 81.02	20	17, 14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	Homogentisik asit	167.03> 123.03, 122.08, 108.00	10	20, 10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	Protokateşuik asit	153.06> 108.00, 81.01, 91.01	10	20, 25, 20	30,98 5	10,005	33,9 52	29,905	30,326	36,897
4	Gentisik asit	153.05> 109.04, 108.03, 81.00	10	20, 12	41,02 2	50,135	57,6 02	40,003	39,658	40,582
5	Pirokatekol	153.06> 81.01, 108.00, 109.04	8	20, 25, 20	2,001	0,902	1,50 3	1,958	2,154	2,654
6	Galantamin	288.10> 198.00, 213.09, 230.95	20	32, 23, 17	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	136.98> 93.03, 65.10	10	25, 14	2,488	2,533	1,90 5	2,541	1,958	2,456
8	3,4-Dihidroksibenzaldehit	137.00> 91.93, 107.94, 136.00	8	21, 20, 18	1,322	1,005	1,20 0	1,400	1,489	1,635
9	Katekin hidrat	288.88> 109.15, 124.99, 245.26	30	25, 20, 15	4,058	3,904	3,99 9	4,257	4,289	4,275
10	Vanilik asit	166.98> 151.97, 108.03, 123.03	20	18, 12, 14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	Kafeik asit	179.10> 135.14, 107.10, 133.9	32	23, 23, 24	0,399	0,500	0,63 5	0,503	0,498	0,510
12	Şiringik asit	197.20> 123.00, 167.00, 182.00	15	22, 18, 14	0,433	0,499	0,40 1	1,600	1,854	1,951

Çizelge 4.14. (devamı)

13	Vanilin	150.95> 135.94, 91.90, 107.97	30	20, 20, 14	0,102	0,149	0,200	0,102	0,235	0,986
14	Epikatekin	189.18> 151.00, 203.00, 205.00	20	20, 20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	<i>p</i> -Kumarik asit	163.01> 119.04, 93.00, 117.01	5	27, 27, 15	2,069	2,100	2,200	3,067	2,987	3,178
16	Ferulik asit	193.03> 134.06, 178.00, 149.02	20	16, 12,13	48,06 9	49,20 3	55,007	35,147	33,524	37,834
17	Katekin gallat	441.00> 168.98, 288.97	30	20, 20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	Rutin	609.00> 254.99, 270.93, 299.90	17	55, 55, 40	4,598	3,988	4,365	5,367	3,938	4,854
19	<i>Trans</i> -2-hidroksi sinnamik asit	163.04> 119.04, 117.01, 93.07	10	25, 22, 13	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	Mirisetin	316.90> 107.07, 137.01, 150.97	30	30, 25, 25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	Resveratrol	227.01> 143.01, 159.05, 185.03	30	25, 18, 18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	<i>Trans</i> -Sinnamik asit	146.98> 103.03, 62.18	30	10, 10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	Luteolin	284.91> 107.01, 133.05, 151.02	20	30, 33, 30	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	Kuersetin	303.00> 137.00, 153.00, 229.00	20	30, 32, 30	141,3 24	140,5 47	152,63 7	139,34 1	140,502	171,357
25	Naringenin	270.98> 107.00, 119.04, 150.97	20	25, 25, 20	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Çizelge 4.14. (devamı)

26	Genistein	271.00> 153.00, 215.00, 243.00	20	27, 25, 24	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	Apigenin	269.10> 107.00, 117.00, 149.00	20	30, 30, 25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	Kamferol	284.90> 158.97, 117.10, 227.14	10	34, 40, 30	0,200	0,187	0,154	0,304	0,211	0,435
29	Hesperetin	301.02> 108.01, 136.00, 163.99	20	36, 30, 24	0,501	0,400	0,451	0,235	0,247	0,331
30	Krisin	252.99> 63.05, 107.05, 142.99	20	30, 25, 25	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aCone : Cone Voltaj

^bCE : Collision Enerji

ND: Algılanmamış Sonuç

Yukarıdaki Çizelge 4.14’ de 1 grup olarak verilen “MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA” ve 2 grup olarak verilen “MS+1 mg/L+2 mg/L NAA” ortamı temsil etmektedir.

5.TARTIŞMA

Skyba vd., 2012 yaptığı çalışmada *H. perforatum* sürgün uçlarına düşük sıcaklıkla ilişkili stres faktörüne maruz bırakılmıştır. Düşük sıcaklıklara maruz kalan bitkilerde hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi bitkiler için zararlı reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu katalize edebilen ve biyolojik makromoleküllere ve membranlara kalıcı zararlar verebilen etkiler gözlenmiştir. Denemeler sonucunda soğuk stresinin bitki büyüme ve gelişimini negatif yönde etkilediği ve bazı fizyolojik belirteçler, düşük sıcaklıkların iyileşmeden sonra bile bitkilerde devam eden stres ortamı oluşturduğu belirtilmiştir (Skyba vd., 2012). Bu çalışmalar doğrultusunda *H. perforatum* bitkisinin soğuk stresine maruz kalması durumunda sürgün uçlarında büyüme ve gelişmenin yavaşlaması gözlenmiştir, bizim çalışmamızda ise tuz stresine maruz bırakılan *H. perforatum* bitkisinin tuz stresi arttıkça bitki yaprak ve kalluslarda büyüme ve gelişmenin yavaşladığı gözlemlenmiştir.

Cui vd., 2010 yaptığı çalışmada *H. perforatum* bitkisinin kök kültürlerinin üretilmesinde kullanılan besin ortamlarında bulunan başlangıç sükröz konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Murashige ve Skoog (MS) ortamı kullanılarak yapılan çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda (%1,3,5,7,9) sükröz içeren besin ortamlarında bitkiler büyütülmüştür ve farklı miktarlardaki sükrözün bitki biyokütlesi üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda %3 sükröz takviye edilen ortamların optimum biyokütle birikimi gösterdiği rapor edilmiştir ayrıca yüksek miktarlarda sükröz konsantrasyonu (%5,7,9) içeren besin ortamlarında nispeten daha yüksek ozmotik basınç nedeni ile biyokütle birikimi engellendiği raporlanmıştır. Bu deneyler sonucunda, optimal adventif kök gelişiminin %3 sükröz içeren MS besin ortamında optimum biyokütleyle ulaştığı ve artan sükröz konsantrasyonunun ozmotik stres ile sonuçlandığını ve bunun sonucunda sekonder metabolitlerin biriktiği raporlanmıştır (Cui vd., 2010). Bu çalışmalar doğrultusunda çalışmamızda %3 sükröz içeren besin ortamı kullanılmıştır. %3 sükröz+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA ve 50 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülen *H. perforatum* 'lar farklı büyüme düzenleyicileri ve farklı tuz miktarına sahip ortamda büyütülen bitkilere göre biyokütle bakımında daha verimli olduğu istatistiki olarak belirlenmiştir.

Hiperisin, *H. perforatum* 'dan izole edilen antiviral, antimikrobiyal, antitümör özelliklere sahip bir fenolik bileşiktir (Komarovská vd., 2009). Üretiminde artış sağlamak için *Agrobacterium* ile gen aktarım teknikleri denense de *H. perforatum* bitkisi genetik iyileştirme ve *Agrobacterium* aracılı transformasyona karşı inatçı bir bitkidir (Franklin vd., 2008). Tavakoli vd., (2020) yaptığı çalışmada *H. perforatum* bitkisinin kök sistemleri üzerinde UV-B ışığının farklı dozlarında (60-90 dakika) etkilerinin bitki büyüme sistemleri üzerine etkileri ve daha sonrasında geri kazanım tedavisi ile *H. perforatum*'dan elde edilen hiperisinin miktar olarak stres altında değişip değişmediği incelenmiştir. Çalışmada UV ışığını 90 dakikalık uygulamalarda hiperisin seviyelerinde bitki büyümesi ve hiperisin üretiminde artış gözlenirken 60 dakikalık uygulamalarda iyileşme kıyaslanabilir olmamıştır. Sürekli stres uygulamalarının ardından, bitkiler düzenleyici geri besleme döngüleri nedeni ile büyüme ve gelişmelerinde yavaşlamalar meydana gelmiş ve UV-B ışınlarının bitki büyüme ve gelişmesinin yavaşlatması, yaprak uçlarında ve dokularda yaralanmalar meydana getirdiği bildirilmiştir (Tavakoli vd., 2020). Bu çalışmaya ek olarak *H. perforatum* kök süspansiyon kültüründe düşük sıcaklıkların hiperisin verimine etkisini değerlendirmek için başka bir deney yapılmıştır. Üç haftalık kök sistemleri üzerine 1 gün, 3 gün ve 7 gün olmak üzere 4°C, 8°C ve 16°C uygulanarak hiperisin miktarının artırılması hedeflenmiştir. Yapılan deneyler doğrultusunda 4°C sıcaklıkta hiperisin miktarı maksimuma ulaştığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada ise 2 farklı besin ortamında 3 farklı konsantrasyonda (0,50,100,150 mM NaCl) tuz uygulamasında elde edilen kallus ve sürgünlerde UPLC-MS/MS analizi yapılarak bitki fenolik bileşiklerinde nasıl değişim gösterdiği gözlenmiştir. Örneğin Çizelge 4.4.1' de verildiği gibi MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA içeren ortamda büyütülmüş *Hypericum perforatum* bitkisinde “Vanilin” bileşiğinin üretimi artarken, “Katekin hidrat” miktarı azalmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda tuz stresinin bitki fenolik bileşikleri üzerinde farklı etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir.

Farag ve Wessjohann, (2012) çalışmalarına göre geleneksel iltihap ve bulaşıcı hastalık tedavilerinde kullanılan 7 farklı *Hypericum* türü (*H. daliense*, *H. hengshanense*, *H. himalaicum*, *H. japonicum*, *H. petiolulatum subsp. yunnanense*, *H. seniawinii* ve *H. wightianum*) üzerinde kimyasal bileşimlerinin biyoaktiviteleri üzerindeki çalışmalar sınırlı olduğu için yaptıkları çalışmada *Hypericum* türlerinden 52 ana bileşeni UPLC-MS metabolomikleri kullanılarak kimyasal profilleri belirlenmiştir. Bu türlerden

tanımlanan 52 ana bileşenden 11'inin daha önce anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Frag ve Wessjohann, 2012). Yaptığımız çalışmada ise toz haline getirilmiş *H. perforatum* bitkisinin metanolde çözülmesi ve ardından UPLC-MS/MS analizleri ile ortaya çıkan 30 fenolik bileşikten “Pirokatekol (Linda vd., 2021), Galantamin (Wu vd., 2020), p-Hidroksibenzoik asit (Akcan ve Tugba, 2014), Vanilik asit (Onat vd., 2021), Kafeik asit (Aldemir ve Memmedov, 2019), Şiringik asit (Değirmencioğlu, 2019), Ferulik asit (Ou vd., 2003), Luteolin (Rakariyatham vd., 2018), Kuersetin (Li vd., 2016), Naringenin (Zeng vd., 2018), Genistein (Lee vd., 2019), Apigenin (Feng vd., 2015), Hesperetin (Krishnan vd., 2017)” bileşiklerinin anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu literatürde bildirilmiştir.

Matam vd., (2020) yaptığı çalışmada *H. perforatum* 'un başlıca biyoaktif bileşiklerinden biri olan ve ilaç geliştirmede önce bir molekül olarak kabul edilen hiperisin türlerinin farklı çözücülerde UPLC-QE-MS ile ayrımının farklarına bakılmıştır. Bu çalışmada, hiperisinlerin (hiperisin, psödohiperisin, protohiperisin ve protopsödohiperisin), bunların varsayılan öncüllerinin (emodin ve skyrin) ve yeni skyrin türevlerinin (oxyskyrin, iridoskyrin, rubrosskyrin ve luteoskrin) eşzamanlı ölçümü için etanol, aseton %80 metanol, etilasetat ve diklorometan içinde *H. perforatum* L.'nin *in vitro* sürgün kültürlerinden ekstrakte edilen bileşikler UPLC-QE-MS yöntemi kullanılarak ayrılmıştır. UPLC verilerinin analizleri, etanolün tüm hedef bileşiklerin verimli miktar tayini için en iyi özütleyici olduğu belirtilmiştir, ancak bunların tümü aseton ve %80 metanol içinde de ekstrakte edilebilir olduğu gözlemlenmiştir. (Matam vd., 2020). Çalışmamızda *H. perforatum* bitkisinin %80 metanol ile çözülmesi sağlanmış ve UPLC-MS/MS analizleri yapılmıştır analizler sonucunda 30 farklı fenolik bileşik elde edilmiştir, örneğin Çizelge 4.14. ‘de verdiği üzere “Vanilin” fenolik bileşiğinin her iki besin ortamının kontrol gruplarındaki miktarı “0,102” iken MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+ 150 mM NaCl içeren ortamdan alınan bitkilerin fenolik bileşiği “0,200” ‘e çıkmış ancak MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+150 mM NaCl içeren ortamdan alınan bitkilerin vanilin içeriği “0,986” ya çıkmıştır. Farklı besin ortamlarının tuz stresine maruz kaldıklarında bitkilerdeki fenolik bileşik içerikleri üzerine etkileri büyüme düzenleyicilerinin farklılıkları ile değiştiği gözlemlenmiştir.

Eray, N. ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmada *H. perforatum* bitkisinin zengin fenolik içeriği ve antioksidan potansiyeli nedeniyle bitki doku kültürü yöntemleri ile

optimize edilmiş bir geliştirme protokolü oluşturması amaçlanmıştır. Doğadan ve aseptik fidelerden elde edilen bitki örneklerinin liyofilize tozlarından hazırlanan metanol bazlı ekstraktlar ile abiyotik stres faktörleri ve sinyal moleküllerinden elde edilen kallusların fenolik kompozisyonu HPLC-MS/MS kullanılarak analiz edilmiştir. Kromatografik bulgular kalluslarda temel fenolik bileşikleri olarak kersetin, psödohiperisin ve kısmen klorojenik asit bileşiklerinin olduğunu göstermiştir. Eroglu, E ve arkadaşlarının (2021) yaptığı çalışmada ise *H. perforatum* bitkisinin yağı kullanılmış ve LC-MS/MS analizleri yapılarak içerdiği fenolik bileşikleri bakımından 19 bileşik arasında, 186 mg/L ile kersetin en baskın bileşik olarak bulunmuştur. *H. perforatum* bitkisinde toplam fenolik bileşik bakımından 417 mg/L ile gallik asit bulunmuştur (Eray vd., 2020; Eroglu ve Girgin, 2021). Çalışmalarımızda farklı besin ortamında büyütülen *H. perforatum* bitkisinin metanol ile çözülmesi ve ardından UPLC-MS/MS analizleri yapılmıştır yapılan çalışmalar sonucunda 30 bileşik arasında, 141,3 mg/kg ile “Kuersetin” en baskın bulunan fenolik bileşik olurken 0,102 mg/kg ile “Vanilin” en az miktarda bulunan fenolik bileşiktir. Tuz stresi bitkideki sekonder metabolit biyokütlesini farklı seviyelerde etkilediği rapor edilmiştir.

Tüm bu çalışmalar ve bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada *Hypericum perforatum* bitkisinin farklı NaCl miktarlarına sahip besin ortamında büyütülmesi ve daha sonrasında bu tuz stresi uygulamaları (0,50,100,150 mM NaCl) ile bitki büyüme ve gelişmesi üzerine etkilerine ve *H. perforatum* bitkisinde fenolik bileşiklerinin üretimi üzerine etkileri taranmıştır. Bitkiler kallus oluşumuna indüklenmiş ve gelişimi beklenmiştir daha sonrasında kallus gelişimi gösteren bitkiler farklı konsantrasyonda NaCl içeren besin ortamlarına alınmış ve tuz stresine maruz bırakılmıştır. Tuz stresine maruz kalan bitkilerin yaprak rengi, kallus büyüklüğü ve rengi, kuru ağırlığı ve yaş ağırlıkları bakımından farklılıkları KRUSKAL-WALLIS analizine göre istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Ardından kurutulmuş kallus ve bitkicikler metanol içerisinde çözülmüş ve UPLC-MS/MS analizleri yapılarak fenolik bileşik analizi gerçekleştirilmiştir. UPLC-MS/MS sonuçlarına göre 30 adet fenolik bileşik belirlenmiştir. Tuz stresi uygulamalarından sonra Çizelge 4.14 ‘de verilen bu 30 fenolik bileşikten MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA içeren besin ortamında kontrol grubuna kıyasla “Herperetin, Kamferol, Rutin, Şiringik asit, Katekin hidrat, 3,4-Dihidroksibenzaldehit, p-Hidroksibenzoik asit, Pirokatekol” MS+1 mg/L BA+0,5 mg/L NAA+150 mM NaCl içeren ortamda büyütülen bitkilerin fenolik içerik

miktarlarında azalma, MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA içeren besin ortamında kontrol grubuna kıyasla “Kuersetin, Ferulik asit, p-Kumarik asit, Vanilin, Gentisik asit, Protokateşuik asit” MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA+150 mM NaCl içeren ortamda büyütülmüş bitkilerin fenolik içeriklerinin miktarlarında artma gözlemlenirken, “Homogentisik asit, Pirogallol, Galantamin, Vanilik asit, Epikatekin, Katekin gallat, Trans-2-hidroksi Sinnamik asit, Mirisetin, Resveratrol, trans-Sinamik asit, Luteolin, Naringenin, Genistein, Apigenin, Krisin” fenolik bileşiklerinin her iki besin ortamında da miktarları tespit edilememiştir.

Daha önceden *Hypericum* türleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Hypericum perforatum* 'da da farklı konsantrasyondaki tuz stresinin miktarı ile orantılı olarak bitki büyüme ve gelişmesinin olumsuz etkilendiği ayrıca ortamda bulunan tuz konsantrasyonu arttıkça bazı fenolik bileşiklerin miktarında azalmalar bazılarında ise artmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir ve daha sonrasında yapılacak çalışmalara ışık tutabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan deneylerde toplanan tohumların sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve doku kültürü ortamına alınmıştır. Doku kültürü ortamına alınan *Hypericum perforatum* bitkisinin çimlenmesi sağlanmış ve çimlenen bitkilerin farklı seviyelerde tuz içeren ortamlarda büyüme (0-50-100-150 mM NaCl) ve gelişmelerinin incelenmesi yapılmıştır. Bu incelenmelerin ardından farklı seviyelerde tuz içeren besin ortamında büyütülen bitkiler Şekil 4.2.3' de verildiği gibi yaprak rengi, kallus rengi bakımından ve Şekil 4.3.1 de verildiği gibi kallus ağırlığı yönünden karşılaştırmalı analizlere tabi tutulmuş ve anlamlı sonuçlar elde edilmiş. Daha sonra farklı büyüme düzenleyiciler ve farklı konsantrasyonda tuz içeren besin ortamında büyütülen bitkilerin UPLC-MS/MS analizleri yapılarak farklı konsantrasyonlardaki tuz miktarının bitkideki fenolik bileşiklerin üretiminde her 2 besin ortamı için kontrol gruplarının kendi aralarında ve farklı konsantrasyonlar ile karşılaştırılması yapılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda yukarıda belirtildiği üzere farklı büyüme düzenleyicilerin tuz stresi altında fenolik bileşik üretiminde değişiklikler meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Miktarları belirlenen fenolik bileşiklerden bazılarında ortamdaki tuz konsantrasyonu arttıkça kendi kontrol gruplarına göre üretim miktarlarında artmalar meydana gelirken, bazı fenolik bileşiklerin kendi kontrol grupları ile kıyaslanmalarında üretim miktarlarında azalmalar meydana gelmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda *H. perforatum* bitkisi için MS+ 1 mg/L BA+ 0,5 mg/L NAA + 50 mM NaCl içeren besin ortamında büyütülen bitkilerin NaCl' den kaynaklanan tuz stresine karşı toleransının diğer besin ortamda büyütülen bitkilerin toleransına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Fenolik bileşik miktarı bakımından ise MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA içeren besin ortamının diğer besin ortamına göre daha yüksek seviyelerde fenolik bileşik ürettiği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmalara ek olarak daha sonrasında *H. perforatum* bitkisi ile yapılacak çalışmaların hedefine göre bitki doku kültürü yöntemlerinde kullanılacak besin ortamının ve tuz stresinin seçiminde çalışmalarımız ışık tutabilir. *H. perforatum* bitkisinin hiperisin, hiperforin gibi diğer önemli fenolik bileşiklerinin analizleri yapılırken tuz stresinin ve büyüme düzenleyicilerinin arasında miktarlar değiştirilerek bu önemli fenolik bileşiklerin miktarlarında arttırmaya yönelik çalışmalar yapılabilir.

Ayrıca farklı besin ortamları, farklı büyüme düzenleyicileri ve farklı tuzlar kullanılarak *H. perforatum* bitkisinin morfolojik değişikliklerine bakılabilir bu değişim esnasında ilgili gen gruplarının ekspresyon seviyelerinin tuz içeren ortamlara alınmadan öncesinde ve sonrasında değişimleri gözlenebilir.

Bu deneylerin daha sonrasında *H. perforatum* bitkisi ile yapılacak başka çalışmalara destek vermek için kullanılabilir. Hızla kötüleşen toprak tuzluluğuna karşı bitki doku kültürü çalışmaları ile ön hazırlık sağlayabilir.



KAYNAKÇA

- Ahmad, P., Azooz, M., & Prasad, M. J. H. (2013). Salt stress in plants.
- Akcan, K., & Tugba, D. (2014). A New Analytical Method for the Determination of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activities in Different Wheat Grass Varieties. *%J Ekoloji Dergisi*, 23(90).
- Aldemir, O., & Memmedov, H. J. A. A. D. (2019). Propolisin Bileşenlerinden Olan Kafeik Asit Fenil Esterin Antiinflamatuvar Etkileri. *11(2)*, 43-47.
- Alfermann, A., Petersen, M. J. P. C., Tissue, & Culture, O. (1995). Natural product formation by plant cell biotechnology. *43(2)*, 199-205.
- Altan, A., Damlar, İ., Aras, M., & Alpaslan, C. J. A. K. T. D. (2015). Sarı kantaronun (*hypericum perforatum*) yara iyileşmesi üzerine etkisi. *24(4)*, 578-591.
- Ashraf, M. J. F.-M., Distribution, Functional Ecology of Plants. (2004). Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *199(5)*, 361-376.
- Bach-Rojecky, L., Kalodera, Z., & Samarsjja, A. p. (2004). The antidepressant activity of *Hypericum perforatum* L. measured by two experimental methods on mice. *54(2)*, 157-162.
- Berghöfer, R., & Hölzl, J. J. P. m. (1987). Biflavonoids in *Hypericum perforatum*1; Part 1. Isolation of I3, II8-Biapigenin. *53(02)*, 216-217.
- Berghöfer, R., & Hölzl, J. J. P. m. (1989). Isolation of I 3', II 8-Biapigenin (Amentoflavone) from *Hypericum perforatum*. *55(01)*, 91-91.
- Brondz, I., Greibrokk, T., Groth, P. A., & Aasen, A. J. J. T. L. (1982). The relative stereochemistry of hyperforin-an antibiotic from *hypericum perforatum* L. *23(12)*, 1299-1300.
- Butterweck, V., Petereit, F., Winterhoff, H., & Nahrstedt, A. J. P. m. (1998). Solubilized Hypericin and Pseudohypericin from *Hypericum perforatum* Exert Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test3. *64(04)*, 291-294.
- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. J. B. R. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *26*, e00450.
- Chatterjee, S., Nöldner, M., Koch, E., & Erdelmeier, C. J. P. (1998). Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *31(S 1)*, 7-15.

- Cui, X.-H., Murthy, H. N., Wu, C.-H., Paek, K.-Y. J. P. C., Tissue, & Culture, O. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *103*(1), 7-14.
- Cushman, J. C., & Bohnert, H. C. o. i. p. b. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current opinion in plant biology*, *3*(2), 117-124.
- Çırak, C., & Kurt, D. (2014). Önemli tıbbi bitkiler olarak *Hypericum* türleri ve kullanım alanları.
- Çırak, K. D. A. E. T. A. E. D. (2014). Önemli Tıbbi Bitkiler Olarak *Hypericum* Türleri . *24*(1), 38-52.
- Çulha, Ş., & Çakırlar, H. J. A. K. Ü. F. v. M. B. D. (2011). Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *11*(2), 11-34.
- Çırak, C., Radušienė, J., Janulis, V., & Ivanauskas, L. J. B. H. (2007). Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. *117*(1), 29-36.
- Değirmencioglu, A. (2019). Taze ve Kurutulmuş Yaban Mersini (*Vaccinium myrtillus*) Meyve ve Yaprak Ekstraktlarının Probiyotik ve Patojen Bakteriler Üzerine Etkileri. *17*(3), 342-350.
- Dörnenburg, H., Knorr, D. J. E., & technology, m. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *17*(8), 674-684.
- Ekmekçi, E., Mehmet, A., & Tekin, K. J. A. T. B. D. (2005). Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi. *20*(3), 118-125.
- Eray, N., Dalar, A., & Turker, M. J. S. A. J. o. B. (2020). The effects of abiotic stressors and signal molecules on phenolic composition and antioxidant activities of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* (St. John's Wort). *133*, 253-263.
- Eroglu, E., & Girgin, S. N. J. S. A. J. o. B. (2021). A unique phenolic extraction method from olive oil macerate of *Hypericum perforatum* using DMSO: Assessment of in vitro anticancer activity, LC-MS/MS profile, total phenolic content and antioxidant capacity. *139*, 6-11.
- Falk, H., & Schmitzberger, W. J. M. f. C. C. M. (1992). On the nature of "soluble" hypericin in *Hypericum* species. *123*(8), 731-739.
- Farag, M. A., & Wessjohann, L. A. J. P. M. (2012). Metabolome classification of commercial *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) preparations via UPLC-qTOF-MS and chemometrics. *78*(05), 488-496.

- Feng, W.-m., Guo, H.-h., Xue, T., Wang, X., Tang, C.-w., Ying, B., . . . Cui, G. J. R. a. (2015). Anti-inflammation and anti-fibrosis with PEGylated, apigenin loaded PLGA nanoparticles in chronic pancreatitis disease. *5*(102), 83628-83635.
- Flowers, T. J. J. o. E. b. (2004). Improving crop salt tolerance. *55*(396), 307-319.
- Franklin, G., Conceição, L. F., Kombrink, E., & Dias, A. C. P. J. P. (2008). Hypericum perforatum plant cells reduce Agrobacterium viability during co-cultivation. *227*(6), 1401-1408.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. J. F. i. p. s. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *5*, 151.
- Güner, A., & Aslan, S. (2012). *Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler):* Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2013). Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* (pp. 25-87): Springer.
- Hasegawa, M., Bressan, R., & Pardo, J. M. J. T. i. p. s. (2000). The dawn of plant salt tolerance genetics. *5*(8), 317-319.
- Hudson, J., Lopez-Bazzocchi, I., & Towers, G. J. A. r. (1991). Antiviral activities of hypericin. *15*(2), 101-112.
- Jian Kang, Z. e. (2007). Plant salt stress.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. J. M. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *18*(2), 2328-2375.
- Kirakosyan, A., Sirvent, T. M., Gibson, D. M., Kaufman, P. B. J. B., & biochemistry, a. (2004). The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *39*(1), 71-81.
- Kirakosyan, A., Vardapetyan, R., & Charchoglyan, A. J. R. J. o. P. P. (2000). The content of hypericin and pseudohypericin in cell cultures of *Hypericum perforatum*. *47*(2), 270-273.
- Kitanov, G. M. J. B. S., & Ecology. (2001). Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *29*(2), 171-178.
- Klemow, K. M., Bartlow, A., Crawford, J., Kocher, N., Shah, J., Ritsick, M. J. H. m. b., & aspects, c. (2011). Medical attributes of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). 211-237.
- Komarovská, H., Giovannini, A., Košuth, J., & Čellárová, E. J. Z. f. N. C. (2009). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Hypericum tomentosum* L. and *Hypericum tetrapterum* Fries. *64*(11-12), 864-868.

- Kozai, T., & Kubota, C. (2005). Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system* (pp. 19-30): Springer.
- Krishnan, G., Subramaniyan, J., Subramani, P. C., Muralidharan, B., & Thiruvengadam, D. J. a. j. o. p. s. (2017). Hesperetin conjugated PEGylated gold nanoparticles exploring the potential role in anti-inflammation and anti-proliferation during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *12*(5), 442-455.
- Laakmann, G., Schüle, C., Baghai, T., & Kieser, M. J. P. (1998). St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *31*(S 1), 54-59.
- Lavie, G., Valentine, F., Levin, B., Mazur, Y., Gallo, G., Lavie, D., . . . Meruelo, D. J. P. o. t. N. A. o. S. (1989). Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *86*(15), 5963-5967.
- Lee, S. R., Kwon, S. W., Lee, Y. H., Kaya, P., Kim, J. M., Ahn, C., . . . Jeung, E.-B. J. B. c. (2019). Dietary intake of genistein suppresses hepatocellular carcinoma through AMPK-mediated apoptosis and anti-inflammation. *19*(1), 1-12.
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., . . . Yin, Y. J. N. (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *8*(3), 167.
- Linda, R., ABDULLAH, M. R., RAHAYU, A., LIM, L., & TAKEUCHI, T. J. S. M. (2021). Separation of Polar Compounds using Poly (Ethylene Oxide) Bonded Stationary Capillary Liquid Chromatography. *50*(11), 3241-3250.
- Lopez-Bazzocchi, I., Hudson, J., Towers, G. J. P., & photobiology. (1991). Antiviral activity of the photoactive plant pigment hypericin. *54*(1), 95-98.
- Matam, P., Pradeep, M., Kachlicki, P., & Franklin, G. (2020). Simultaneous determination of naphthodianthrones, emodin, skyrin and new bisanthrones in *Hypericum perforatum* L. in vitro shoot cultures.
- Miadokova, E., Chalupa, I., Vlckova, V., Sevcovicova, A., Nadova, S., Kopaskova, M., . . . Derivatives, T. E. o. N. P. (2010). Genotoxicity and antigenotoxicity evaluation of non-photoactivated hypericin. *24*(1), 90-95.
- Miller, A. L. J. A. m. r. a. j. o. c. t. (1998). St. John's wort (*Hypericum perforatum*): clinical effects on depression and other conditions. *3*(1), 18-26.
- Mishenkova, E., Derbentseva, N., Garagulya, A., & Litvin, L. (1975). *Antiviral properties of St John's wort and preparations produced from it*. Paper presented at the Transactions of the Congress of Microbiologists of the Ukraine.

- Nahrstedt, A., & Butterweck, V. J. P. (1997). Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *30*(S 2), 129-134.
- Onat, K. A., SEZER, M., Bekir, Ç. J. J. o. t. I. o. S., & Technology. (2021). Fenolik Bileşiklerden Sinnamik Asit, Kafeik Asit ve p-kumarik Asit'in Bazı Biyolojik Aktiviteleri. *11*(4), 2587-2598.
- Ou, L., Kong, L.-Y., Zhang, X.-M., Niwa, M. J. B., & Bulletin, P. (2003). Oxidation of ferulic acid by *Momordica charantia* peroxidase and related anti-inflammation activity changes. *26*(11), 1511-1516.
- Ouzounis, T., Rosenqvist, E., & Ottosen, C.-O. J. H. (2015). Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: a review. *50*(8), 1128-1135.
- Parida, A. K., Das, A. B. J. E., & safety, e. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *60*(3), 324-349.
- Patocka, J. J. J. o. A. B. (2003). The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *1*(2), 61-70.
- Peron, A. P., Mariucci, R. G., de Almeida, I. V., Düsman, E., Mantovani, M. S., Vicentini, V. E. P. J. B. c., & medicine, a. (2013). Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of a natural antidepressant, *Hypericum perforatum* L.(St. John's wort), on vegetal and animal test systems. *13*(1), 1-9.
- Qados, A. M. A. J. J. o. t. S. S. o. A. S. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *10*(1), 7-15.
- Rakariyatham, K., Wu, X., Tang, Z., Han, Y., Wang, Q., Xiao, H. J. F., & function. (2018). Synergism between luteolin and sulforaphane in anti-inflammation. *9*(10), 5115-5123.
- Rasool, S., Hameed, A., Azooz, M., Siddiqi, T., & Ahmad, P. (2013). Salt stress: causes, types and responses of plants. In *Ecophysiology and responses of plants under salt stress* (pp. 1-24): Springer.
- Rauter, A. P., Palma, F. B., Justino, J., Araújo, M. E., & dos Santos, S. P. (2013). *Natural products in the new millennium: prospects and industrial application* (Vol. 47): Springer Science & Business Media.
- Repcak, M., & Martonfi, P. J. B. (1997). The localization of secondary substances in *Hypericum perforatum* flower.
- Robson, N., & Adams, P. J. B. (1968). Chromosome numbers in *Hypericum* and related genera. *20*(2), 95-106.

- Saddiqe, Z., Naeem, I., & Maimoona, A. J. J. o. e. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *131*(3), 511-521.
- Sanders, D. J. C. B. (2000). Plant biology: the salty tale of *Arabidopsis*. *10*(13), R486-R488.
- Scalbert, A. J. P. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *30*(12), 3875-3883.
- Schempp, C., Winghofer, B., Lüdtkke, R., Simon-Haarhaus, B., Schöpf, E., & Simon, J. J. B. J. o. D. (2000). Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *142*(5), 979-984.
- Schey, K., Patat, S., Chignell, C., Datillo, M., Wang, R., Roberts, J. J. P., & photobiology. (2000). Photooxidation of Lens α -Crystallin by Hypericin (Active Ingredient in St. John's Wort)¶. *72*(2), 200-203.
- Sirvent, T. M., Krasnoff, S. B., & Gibson, D. M. J. J. o. c. e. (2003). Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivores. *29*(12), 2667-2681.
- Skyba, M., Petijová, L., Košuth, J., Koleva, D. P., Ganeva, T. G., Kapchina-Toteva, V. M., & Čellárová, E. J. J. o. p. p. (2012). Oxidative stress and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. plants subjected to low temperature treatment. *169*(10), 955-964.
- Smith, R. H. (2012). *Plant tissue culture: techniques and experiments*: Academic Press.
- Solomon, D., Adams, J., & Graves, N. J. J. o. a. d. (2013). Economic evaluation of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of mild to moderate depression. *148*(2-3), 228-234.
- Tavakoli, F., Rafieiolhossaini, M., Ravash, R., Ebrahimi, M. J. P. s., & behavior. (2020). Subject: UV-B radiation and low temperature promoted hypericin biosynthesis in adventitious root culture of *Hypericum perforatum*. *15*(7), 1764184.
- Wood, S., Huffman, J., Weber, N., Andersen, D., North, J., Murray, B., . . . Hughes, B. J. P. M. (1990). Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives. *56*(06), 651-652.
- Wu, Xu, X., Wang, B., Li, X.-M., Cheng, Y.-Y., Li, M., . . . immunology, s. (2020). Anti-foodborne enteritis effect of galantamine potentially via acetylcholine anti-inflammatory pathway in fish. *97*, 204-215.
- Wu, F. (2000). Analysis of the problems in continues cropping system of protective vegetable and the controlling ways. 157-163.

- Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W. B., Michalowski, C. B., & Bohnert, H. J. J. T. P. C. (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *7*(8), 1129-1142.
- Yazaki, K., Okada, T. J. B. i. A., & Forestry. (1994). Medicinal and aromatic plants VI. *26*, 167-178.
- Yazdani, M., Mahdieh, M. J. I. J. o. B., Biochemistry, & Bioinformatics. (2012). Salinity induced apoptosis in root meristematic cells of rice. *2*(1).
- Zdunek, K., & Alfermann, A. J. P. M. (1992). Initiation of shoot organ cultures of *Hypericum perforatum* and formation of hypericin derivatives. *58*(S 1), 621-622.
- Zeng, W., Jin, L., Zhang, F., Zhang, C., & Liang, W. J. P. r. (2018). Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. *135*, 122-126.
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, *6*(2), 66-71.
- Web1:https://static.wixstatic.com/media/e07aa2_62b80f05259c4b74a752b44ea78eee04~mv2.jpg/v1/fit/w_900%2Ch_605%2Cal_c%2Cq_80/file.jpg (Erişim Tarihi: 31.12.21-14.00)
- Web2:<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/32/4phenylcoumarin.PNG/640px-4-phenylcoumarin.PNG> (Erişim Tarihi: 31.12.21-14.00)
- Web3:<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cd/Hypericin2DACS.svg/1200px-Hypericin2DACS.svg.png> (Erişim Tarihi: 31.12.21-14.00)
- Web4:https://lh3.googleusercontent.com/proxy/Ld12RSRHz2K_r6HrtsODovLLQAUeHCNA0gg00B5LP-zxsjziQjNX-9nzKsA9leDMqKCyqRm5jlO_KmmfEESjfx-Xf0-pGO823ipU5eflPInh5dgzmBR-1H3ipUShXxDjUUU0dTy4Kw (Erişim Tarihi: 31.12.21-14.00)
- Web5:<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cd/Hypericin2DACS.svg/1200px-Hypericin2DACS.svg.png> (Erişim Tarihi: 31.12.21-14.00)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Y***t K***Ç
Uyruk : T.C.
Doğum Tarihi :2*.1*.1**6
Doğum Yeri : E*****t / B*****R
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 5*5*40*4*6
E-posta : y*****c10@g***l.com

Eğitim

ALINAN DERECE	ALDIĞI KURUM/ÜNİVERSİTE	MEZUNİYET YILI
LİSANS	ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	2019

İş Tecrübesi

YIL	YER	POZİSYON/GÖREV
2021	BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ "LİLİUM CANDİDUM L.'NİN MERİSTEMATİK DOKULARININ KRİYOPREZERVASYONU SONRASINDA ETKİN BİR REJENERASYON SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI	BURSİYER
2018	ÇANAKKALE 18 MART ÜNİVERSİTESİ ÜNİVERSİTE HASTANESİ	STAJYER
2013	ÖZEL EDREMİT KÖRFEZ HASTANESİ	STAJYER

Yabancı dil	Başlangıç	Orta	İleri
Okuma		X	
Konuşma		X	
Yazma		X	

Katıldığı Eğitimler ve Bilimsel Faaliyetler

- İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi (2018)
- Uluslar Katılımlı Nobelyum Bilim Kongresi (Nisan 2018) (Katılımcı, görevli)
- Erzurum Teknik Üniversitesi Afiş Sunumu (EKSTREMOFİLLER) (2016)
- Erzurum Teknik Üniversitesi İklim Değişikliği ve Transgenik Biyoteknoloji Çalıştayı (2 Adet Poster Sunumu) (2019)
- Erzurum Teknik Üniversitesi GDO Münazaraları (3 Adet Poster Sunumu) (2018-2019)
- MSKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Sempozyumu Sözlü Sunum (*Hypericum perforatum*'da Tuz Stresinin Kallus Oluşumuna Etkisi)
- 2021 -Moleküler Araştırma Yöntemleri Eğitimi (2021)

Hobiler

1. Spor yapmak
2. Kitap okumak
3. Seyahat etmek
4. Yürüyüş yapmak