

Hypericum aviculariifolium subsp. *depilatum* var. *depilatum* ve *H. pruinatum* da In Vitro Tohum Çimlenmesi

Ertan Sait Kurtar¹, Cüneyt Çırak^{2*}

¹Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Konya, TÜRKİYE

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bafra Meslek Yüksekokulu, Samsun, TÜRKİYE

*e-mail: kalinor27@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* ve *H. pruinatum*'da etkili bir çimlenme protokolü geliştirmek ve müteakip bitki gelişimini izlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar farklı oranlarda benzil adenin (BA), gibberellik asit (GA) ve indol asetik asit (IAA) içeren temel MS (Murashige ve Skoog) ortamlarında magenta kutuları içerisinde kültüre alınmışlardır. 12. günün sonunda kökçük geliştirmiş ve 1-2 yaprakçık oluşturmuş fideler sayılmış ve her deneysel ortam için çimlenme oranları % olarak belirlenmiştir. Ortamlarının çimlenme üzerine etkileri her iki türde de önemli ($P < 0.01$) olarak tespit edilmiş, en yüksek çimlenme oranına 2 mg/l BA, 0.1 mg/l IAA ve 0.5 mg/l GA ile desteklenmiş MS tuzları içeren G9 ortamında ulaşılmıştır (*H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* için %76.2; *H. pruinatum* için %89.4). Bu ortamda alt kültüre alınan çimlenmesini tamamlamış genç bitkicikler 6 hafta sonra ortalama 8-10 cm uzunluğa ulaşmış ve başarılı bir şekilde sera şartlarına adapte edilmişlerdir.

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş: 27.06.2019

Kabul: 24.09.2019

Anahtar kelimeler:

Kantaron, çimlenme, dormansi, in vitro kültür, bitki büyüme düzenleyicileri.

In vitro seed germination of *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* and *H. pruinatum*

ABSTRACT

In the present study, it was aimed to describe an effective germination protocol and to screen subsequent plant development for *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* and *H. pruinatum*. Surface sterilized seeds were cultured in MS (Murashige and Skoog) media including various doses of benzyl adenine (BA), gibberellic acid (GA) and indole acetic acid (IAA) in magenta boxes. At the end of 12th day of the culture, number of the seeds developing radicle and 1-2 leaflets were counted and recorded as % of germination for each experimental medium. The effects of media on germination rates were found to be significant ($P < 0.01$) and the highest rates were reached in MS medium, supplemented with 2 mg/l BA, 0.1 mg/l IAA and 0.5 mg/l GA (76.2 % for *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* and 89.4 % for *H. pruinatum*). The germinated seeds, sub-cultured in the same medium produced sterile seedlings, 8-10 cm in height after 6 weeks and were acclimatized successfully under greenhouse conditions.

ARTICLE INFO

Research article

Received: 27.06.2019

Accepted: 24.09.2019

Keywords:

Centaury, germination, dormancy, in vitro culture, plant growth regulators.

GİRİŞ

Hypericum cinsi (Hypericaceae) dünyanın çöl ve kutup bölgeleri hariç hemen her yerinde yayılış gösteren 484 türe sahip olup kapalı tohumlular alt-bölümünün %22'sini oluşturan en kalabalık 100 taksondan biridir (Carine ve Christenhusz 2010). Bu türler içerisinde *Hypericum perforatum* L. en bilinen ve hafif-orta derecede depresyon tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan birçok farmakopyaya dahil edilmiş olan türdür (Xiang ve ark. 2017). *Hypericum* türleri yüzyıllar pek çok kültür tarafından tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerdir ve geleneksel Türk hekimliğinde "sarıkantaron, askerotu, peygamber çiçeği, kan

otu ve binbirdelik otu” gibi isimler altında yatıştırıcı, yara iyileştirici, dezenfektan ve spazm çözücü olarak kullanılmaktadırlar (Bingöl ve ark. 2011). Türkiye *Hypericum* türleri için önemli bir merkezdir ve mevcut 96 türün 46’sı endemiktir (Güner ve ark. 2012)

Türkiye’nin kurak taşlı ve kalkerli yüksek rakımlı kuzey bölgelerinde doğal olarak yetişen *Hypericum aviculariifolium* Jaup. and Spach subsp. *depilatum* (Frey and Bornm.) Robson var. *depilatum* bu endemik türlerden biridir ve doğal yayılış alanı oldukça sınırlıdır (Davis 1988) (Şekil 1a). Yapılan güncel çalışmalarla bu türün güçlü anti-bakteriyel (Gül ve ark. 2017) ve anti-oksidan (Maltaş ve ark. 2013) etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. *Hypericum pruinaum* Boiss. & Bal. Türkiye florasına kayıtlı nadir rastlanan bir tür olup Türkiye’nin kuzeyinde yüksek rakımlarda ve Kafkasya’da doğal yayılış göstermektedir (Şekil 1b). *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*’un aksine bu türle ilgili hiçbir farmakolojik kayıt bulunmamaktadır. Daha önceki çalışmalarda her iki türün de hiperisinler (Çırak ve ark. 2006a), hiperforinler (Çırak ve ark. 2015), organik asitler (Çırak ve ark. 2007a; 2013), flavonoidler (Çırak ve ark. 2014a) ve uçucu yağlar (Çırak ve Bertoli 2013) içerdiğini belirlenmiştir. Bu sekonder metabolitler önemli ilaç hammaddeleri olup *Hypericum* özütlerinin anti-depressant (Ramalhete ve ark. 2016), anti-anjiyogenik (Schiavone ve ark. 2014), nöroprotektif (Ma ve ark. 2018), antiviral, fotodinamik (Shih ve ark. 2018), anti-tümör (Kim ve ark. 2018) ve anti-bakteriyel (Rodriguez-Amigo ve ark. 2015) aktivitelerinin anılan biyoaktif kimyasallardan kaynaklandığı bildirilmiştir. Daha önce yürütülen bu çalışmaların sonuçlarının işaret ettiği üzere, her iki tür de önemli ölçüde tıbbi-farmakolojik potansiyele sahiptir.



Şekil 1. Çiçeklenme dönemindeki yabancı *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (A) ve *H. pruinaum* (B) bitkileri.

Günümüzde *H. perforatum* (Bruni ve Sacchetti 2009), *H. brasiliense* (Abreu ve ark. 2003), *H. androsaemum* (Valentao ve ark. 2003), *H. origanifolium* (Bertoli ve ark. 2015), *H. perforatum* (Çırak ve ark. 2007b), *H. montbretii* (Çırak ve Radusiene 2007) ve *H. triquetrifolium* (Çırak ve ark. 2014b) gibi *Hypericum* türleri ilaç ve gıda katkısı özelliklerinden dolayı herbal endüstriye satılmak üzere doğal floradan büyük ölçüde toplanmaktadır ve sadece *H. perforatum* pazarının dünya ölçeğindeki ekonomik değeri yaklaşık 1 milyar Amerikan dolarıdır (Solomon ve ark. 2013). *Hypericum* kökenli herbal ve farmakolojik ürünlere olan talebin her geçen gün artışı özellikle ülkemizde yabancı *Hypericum* popülasyonları üzerindeki baskıyı artırmakta, bu türlerin floramızdaki varlığını tehdit etmektedir, zira *Hypericum*’lara dair yabancı bitki toplayıcılığı tür ayrımı gözetmeksizin yapılmaktadır. Sonuç olarak ülkemiz florasındaki *Hypericum* türleri ciddi tehdit altındadır (Çırak ve Kurt 2014). Bu çalışma ile Türkiye için endemik ve nadir türlerden olan *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* ve *H. pruinaum*’da çimlenme gereksinimlerini tanımlamak ve etkili bir fide elde etme yöntemi tanımlamak amaçlanmıştır; adı geçen türlerin kültüre alınması ve korunmasına dair bir başlangıç yapmak hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

H. aviculariifolium subsp. *depilatum* var. *depilatum* ve *H. pruinaum*’un morfolojik ve kimyasal yapıları daha önceki çalışmalarda detaylı olarak tanımlanmıştır (Çırak ve Bertoli 2013; Çırak ve ark. 2006a; 2013; 2014a; 2015). Her iki türe ait tohumlar Türkiye’nin Amasya ili Gümüşhacıköy ilçesi Gümüş nahiyesinde (40° 49’ enlemi; 35° 09’ boylamı; 989 m rakım) doğal olarak yetişen bitkilerden 2017 yılı Eylül ayında toplanmış ve 6 ay buzdolabında (4 °C) muhafaza edilmiştir.

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için %70’lik etil alkolde 30 saniye ve %10’luk ticari sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika tutulmuş, daha sonra 3’er kez steril saf su ile yıkanmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar farklı oranlarda benzil adenin (BA), giberellik asit (GA) ve indol asetik asit (IAA) içeren temel MS (Murashige ve Skoog) ortamlarında magenta kutuları içerisinde kültüre alınmışlardır (Çizelge 1). Ortamların pH’sı 5.8’e ayarlanmış ve müteakiben 120 °C de 20 dakika boyunca otoklav cihazında sterilize edilmişlerdir. Kültürler 12/12 saat fotoperiyotta; 2400 lüks ışık şiddetinde 24 °C de iki hafta boyunca inkübe edilmişlerdir (Çırak ve ark. 2004a). Üç tekerrürlü yürütülen çalışmada her bir uygulama için 50 adet tohum kullanılmış, bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen temel MS besi ortamından kontrol olarak istifade edilmiştir.

Tanımlanan *in vitro* kültürün 12. gününde kökçük geliştirmiş ve 1-2 yaprakçık oluşturmuş tohumlar sayılmış (Şekil 2) ve her deneysel ortam için çimlenme oranı % olarak belirlenmiştir.

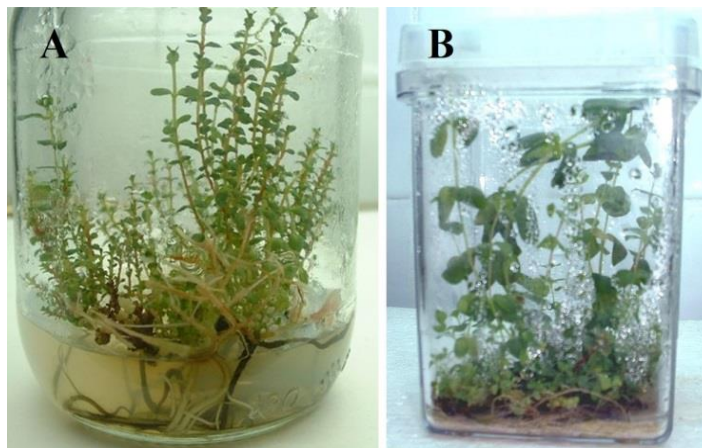


Şekil 2. In vitro ortamda çimlenen tohumlar

Çizelge 1. Kullanılan temel MS ortamlarının hormonal bileşimi

Çimlendirme Ortamları	Kullanılan hormonlar (mg/l)		
	BA	IAA	GA
Kontrol	-	-	-
G1	1.0	0.1	-
G2	1.0	0.1	0.1
G3	1.0	0.1	0.5
G4	1.5	0.1	-
G5	1.5	0.1	0.1
G6	1.5	0.1	0.5
G7	2.0	0.1	-
G8	2.0	0.1	0.1
G9	2.0	0.1	0.5

En yüksek çimlenme oranının gözlemlendiği G9 ortamında çimlenmesini tamamlayan genç bitkicikler müteakip bitki gelişimini gözlemlenmek amacıyla aynı ortamda ve aynı şartlarda alt-kültüre alınmışlardır. Altı hafta sonra bitkicikler ortalama 8-10 cm uzunluğa ulaşmış (Şekil 3A-B); magenta kutularından çıkarılarak musluk suyu ile yıkanmış; kök kısımları *in vitro* ortam kalıntılarından temizlemiş ve 20 cm çapında, steril toprak, kum ve çiftlik gübresi karışımı (2:1:1) ile doldurulmuş saksılara alınmışlardır. İki hafta boyunca laboratuvar ortamında dış şartlara göreceli olarak alıştıran bitkiler altı hafta boyunca kontrollü sera şartlarında aynı saksılar içerisinde yetiştirilmiş ve çiçeklenme evresine ulaşmışlardır (Şekil 4A-B).



Şekil 3. *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (A) ve *H. pruinaum* (B) da steril fideler.

Farklı çimlenme ortamlarında gözlenen çimlenme oranlarına ait ortalamalar her tür için ayrı olarak varyans analizine tabi tutulmuş; ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile ($P < 0.01$) mukayese edilmiştir. Verilerin istatistik analizi için MSTAT-C istatistik yazılımı kullanılmıştır (Russell D. Freed, Crop and Soil Sciences Department, Michigan State University).



Şekil 4. *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (A) ve *H. pruinatum* (B) da *in vitro* çimlenmeyi müteakip saksılarda dış şartlara alıştırılan ve 6 hafta sonunda sera şartlarında çiçeklenen bitkiler.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı hormonal kombinasyonlara sahip *in vitro* kültür ortamlarının çimlenme üzerine etkileri her iki türde de çok önemli ($P < 0.01$) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* tohumları bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen kontrol ortamında çimlenmemişlerdir. Benzer şekilde *H. pruinatum* tohumları da kontrol ortamında ancak gözlenen en düşük oranda çimlenebilmişlerdir. Bununla birlikte her iki türde de özellikle artan BA konsantrasyonlarına bağlı olarak çimlenme oranları önemli ölçüde yükselmiş; en yüksek değerlere 2 mg/l BA, 0.1 mg/l IAA ve 0.5 mg/l GA ile desteklenmiş MS tuzları içeren G9 ortamında ulaşılmıştır (*H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* için %76.2; *H. pruinatum* için %89.4). İncelenen diğer ortamlarda da çimlenme, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek olmuştur. Çimlenmeye müteakip aynı G9 ortamında alt-kültüre alınan ve 8-10 cm boya ulaştıktan sonra sera şartlarında saksılarda kültüre alınan bitkiler %98 oranında hayatta kalmış ve tohumların alındığı kaynak bitkilere benzer bir gelişme göstererek 6 hafta sonunda çiçeklenmişlerdir. Çiçeklenen bu bitkiler herhangi bir morfolojik anormallik sergilememişlerdir.

Çizelge 2. *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* ve *H. pruinatum* da farklı *in vitro* kültür ortamların çimlenme üzerine etkileri.

Ortamlar	Çimlenme oranı (%)	
	<i>H. aviculariifolium</i> subsp. <i>depilatum</i> var. <i>depilatum</i>	<i>H. pruinatum</i>
Kontrol	0.0 h*	2.4 h
G1	14.8 g	22.6 f
G2	32.7 e	44.3 d
G3	47.4 d	58.3 c
G4	18.9 fg	28.2 ef
G5	51.8 cd	56.4 c
G6	59.2 c	71.8 b
G7	21.6 f	39.7 e
G8	66.4 b	76.5 ab
G9	76.2 a	89.4 a

*Aynı küçük harflerle işaretli ortalamalar arasında $P < 0.01$ düzeyinde farklılık yoktur.

Çimlenme embriyonun büyüüp gelişmesiyle yeni bir bireyin oluştuğu hayati öneme sahip bir fizyolojik olaydır (Walck ve ark. 2011). Ayrıca bitkilerin hayat döngülerinin ilerleyen safhalarında deneyimleyecekleri şartları belirleyen ilk ve en önemli

geçiş evresidir (Donohue ve ark. 2010). Çimlenme genellikle tohum dormansisinin değişik tipleriyle kendini belli eden çok sayıda genetik ve çevresel faktör tarafından etkilenmektedir (Bewley ve ark. 2013). Dormansi, çimlenmenin olabilmesi için gerekli koşulları tanımlayan bir tohum özelliğidir (Thompson ve Ooi 2010; Finch-Savage ve Footitt 2012) ve fide oluşumunun en avantajlı yer ve zamanda gerçekleşmesini sağlayan kantitatif bir yapıya sahiptir (Bewley ve ark. 2013; Willis ve ark. 2014). Baskin ve Baskin (2008; 2014)'e göre 5 tip dormansi vardır: 1- Fizyolojik dormansi: tohum su geçirgen bir kabuğa ve tam gelişmiş bir embriyoya sahiptir. Ancak kökçüğün çıkışı engelleyen sert tohum kabuğu mevcuttur yahut tohum/meyve kabuğundan çimlenmeyi önleyici bir kimyasal inhibitör salgılanmaktadır. Ayrıca embriyo gelişimi için mutlak ışığa ihtiyaç duyulur (Wang ve ark. 2017). 2- Morfolojik dormansi: tohum çimlenme öncesi biraz daha gelişmeye ihtiyaç duyan tam gelişmemiş bir embriyoya sahiptir. 3- Morfo-fizyolojik dormansi: embriyo hem gelişmemiştir hem de fizyolojik olarak dormanttır. 4- Fiziksel dormansi: tohum tam olarak gelişmiş bir embriyoya sahiptir ancak tamamen su geçirmez meyve ya da tohum kabuğu çimlenmeyi önlemektedir. 5- Bileşik dormansi: tohumun tam olarak gelişmiş bir embriyosu vardır ancak hem bu embriyo fizyolojik olarak dormanttır ve çimlenme için mutlak ışığa ihtiyaç duyar, hem de tohum yahut meyve kabuğu su geçirmezdir.

Hypericum türlerinde çimlenme oranları genellikle düşük olup tohumlar genetik kökenleri (Perez-Garcia ve ark. 2006) ve döllenme biyolojisine (Carta ve ark. 2015) bağlı olarak farklı tiplerde dormansiye sahiptirler. Bu türlerde çimlenme, ışığa duyulan mutlak gereksinim, sert ve geçirimsiz tohum kabuğu, tohum veya meyve kabuğundan salgılanan çimlenme önleyici inhibitör maddeler ve embriyonun dormant oluşu ile tezahür eden fizyolojik ve bileşik dormansi ile sınırlandırılmaktadır (Çırak ve ark. 2011a). Özellikle ışığın varlığı *Hypericum* türlerinde çimlenme için temel şarttır. İlk olarak Campbell (1985) en yaygın ve bilinen tür olan *H. perforatum*'da karanlık şartlarda %1-2 civarında olan çimlenme oranının 1200 lüks sürekli aydınlatma şartlarında % 70'e yükseldiğini; Çırak ve ark. (2004b) 2000 lüks sürekli aydınlatma ile bu oranın %80'in üzerine çıktığı bildirmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda *H. gramineum* (Ash ve ark. 1998), *H. brasiliense* (Bertelle ve ark. 2004), *H. androsaemum*, *H. scabrum*, *H. lydiunum*, *H. tetrapterum* (Çırak ve ark. 2006b), *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (Çırak ve ark. 2007c), *H. orientale*, *H. perfoliatum*, *H. pruinatum*, *H. organifolium* (Çırak 2007), *H. triquetrifolium*, *H. heterophyllum* (Çırak ve ark. 2011b), *H. leptophyllum* (Çamaş ve Çalışkan 2011), *H. philonotis* (Coronado ve ark. 2015) ve *H. elodes* (Carta ve ark. 2016) tohumlarının da çimlenebilmek için mutlak suretle ışığa ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir. Söz konusu bu çalışmalarda, ışığın dışında, çimlenmenin *H. perforatum* (Çırak ve ark. 2004b), *H. scabrum*, *H. lydiunum*, *H. tetrapterum* (Çırak ve ark. 2006b), *H. orientale*, *H. organifolium* (Çırak 2007), *H. triquetrifolium*, *H. heterophyllum* (Çırak ve ark. 2011b) ve *H. leptophyllum* (Çamaş ve Çalışkan 2011) da sert tohum kabuğu tarafından sınırlandırıldığı, *H. pruinatum*, *H. perfoliatum* (Çırak 2007), *H. philonotis* (Coronado ve ark. 2015) ve *H. elodes* (Carta ve ark. 2016) de embriyonun dormant olduğu, *H. perforatum* (Çırak ve ark. 2004b) ve *H. triquetrifolium* (Çırak ve ark. 2011b) da çimlenmenin ayrıca meyve iç kabuğundan salgılanan bir kimyasal inhibitör tarafından baskılandığı bildirilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* (Çırak ve ark. 2007c) ve *H. pruinatum* (Çırak, 2007) tohumlarındaki dormansinin tanımlaması yapılmıştır. Sonuçlara göre her iki türde de çimlenmeyi etkileyen en önemli faktör ışığın varlığıdır. Dolayısıyla bu çalışmada *Hypericum* türlerinde en yüksek çimlenme oranlarını veren 2400 lüks ışık şiddeti ve 12/12 saat fotoperiyot altında yürütülmüştür (Çırak ve ark. 2004a). Önceki çalışma sonuçları, ayrıca, *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* tohumlarının meyve kabuğundan salgılanan bir inhibitörle bulaşık olduğunu; bu inhibitörün musluk suyu ile yapılan basit bir yıkama ile giderilebildiğini; hem bu endemik türün hem de *H. pruinatum*'un embriyolarının dormant olduğunu ve GA uygulamalarının bu dormant embriyoları uyarımda son derece etkili olduğunu ortaya koymuştur. Anılan bu çalışmalarda musluk suyu ile yıkama ve farklı dozlarda GA uygulamalarıyla her iki türde de dormansinin kırıldığı, *H. pruinatum*'da % 80'e varan oranda çimlenme sağlandığı (Çırak, 2007), ancak *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum*'da ulaşılan en yüksek çimlenme oranının % 29 olduğu (Çırak ve ark. 2007c) bildirilmiştir. Her iki türün tohumlarının farklı hormonlarla desteklenmiş temel MS besi ortamlarında *in vitro* kültüre alındığı bu çalışmada ise *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* % 76.2, *H. pruinatum* da ise % 89.4 çimlenme oranlarına ulaşılmış, üstelik çimlenen bu tohumlar aynı ortamda alt kültüre alındığında güçlü *in vitro* fideler geliştirmiş, bu fideler saksılara alınıp sera şartlarında yetiştirildiğinde %98 oranında hayatta kalmış ve 6 hafta sonra çiçeklenerek normal gelişimlerini tamamlamışlardır. Daha başarılı bu güncel sonuçlar *in vitro* ortamda mevcut besin içeriğine ve bilhassa bitki büyüme düzenleyicilerin farklı fizyolojik etkilerine atfedilebilir. Zira absisik asit (ABA), etilen, giberellinler (GA), oksinler (indol asetik asit, IAA gibi) sitokininler (benzil adenin, BA gibi) gibi bitki büyüme düzenleyicileri, ya da yaygın olan isimleriyle hormonlar tohum çimlenmesi ve dormansisini etkileyen önemli unsurlardır (Graeber ve ark. 2012). Bu hormonlar arasında ABA patojen saldırısı ya da su basması gibi stres şartları altında bitki fizyolojisini olumlu etkilemekle birlikte, tohum gelişimi esnasında farklı dokularda biriktiğinde çimlenmeyi kesin bir şekilde önlemektedir (Miransari ve Smith, 2014). Giberellinler tohum dormansisini kontrol etmemekle birlikte dormant tohumları aktive eden hormonlardır ve bu aktivasyon değişik yollarla gerçekleşir. İlk olarak giberellinler absisik asidi yıkıma uğratan katabolik enzimleri aktive ederek ve absisik asit oluşumuyla sonuçlanan metabolik yolu baskılayarak çimlenmeyi önemli ölçüde artırır (Miransari ve Smith 2009; Atia ve ark. 2009). Giberellinler ayrıca tohumun endospermdeki besinleri parçalayarak çimlenmekte olan embriyo için enerji sağlayan amilaz, proteaz ve glukonaz gibi enzimlerin üretiminden sorumlu genleri aktive ederek de çimlenmeyi uyarırlar (Yamaguchi, 2008).

Bu hormonlar özellikle embriyonun dormant olması durumunda çimlenmeyi önemli seviyede iyileştirirler (Cerabolini ve ark. 2004) ve çimlenmeyi artırıcı etkileri 20-25 °C aralığındaki sabit sıcaklıklarda daha da belirgindir (Chen ve ark. 2008). Nitekim değişik dozlarda GA uygulamalarının *H. perforatum* (Çırak ve ark. 2004b; Perez-Garcia ve ark. 2006), *H. androsaemum* (Çırak ve ark. 2006b), *H. perfoliatum* (Çırak 2007), *H. scabrum*, *H. lydum*, *H. triquetrifolium*, *H. tetrapterum* (Çırak ve ark. 2006b, 2011b) ve *H. philonotis* (Coronado ve ark. 2015) gibi birçok *Hypericum* türünde çimlenmeyi artırdığı bildirilmiştir. IAA gibi oksinler hücre büyümesi ve gelişmesi, vasküler dokular ve polen oluşumu gibi hayati fizyolojik olaylarda anahtar rol oynayan hormonlar olup, embriyo büyümesi ve gelişiminin dokular arası oksin nakli tarafından kontrol edildiği bildirilmektedir (Popko ve ark. 2010). Oksinlerle ilgili genlerin ifadesine dair çalışmalar bu hormonların çimlenme esnasında ve sonrasında tohum kökçük ucunda bulduklarını, çimlenme için olduğu kadar fide gelişimi için de elzem olduklarını ortaya koymuştur (Bialek ve ark. 1992; Hentrich ve ark. 2013). Nitekim araştırmamızda her iki türde de gözlenen güçlü fide gelişiminin kullanılan *in vitro* ortamın IAA içeriğinden kaynaklandığını söylemek mümkündür. BA gibi sitokininler tohum çimlenmesini teşvik eden ve çimlenmenin her aşamasında aktif olan bileşiklerdir (Nikolic ve ark. 2006; Riefler ve ark. 2006). Sitokininlerin çimlenmeyi uyarıcı etkileri büyük ölçüde tuzluluk, kuraklık ve ağır metal birikimi gibi faktörlerin olumsuz etkilerini baskılamak suretiyle ortaya çıkmaktadır (Peleg ve Blumwald 2011). Bu çalışmada çimlenme ortamı olarak kullanılan temel MS besisi ortamının içerdiği tuzların sebep olduğu oksidatif stres muhtemelen ortamdaki BA ile baskılanmış ve çimlenme incelenen her iki türde de önemli ölçüde artmıştır.

SONUÇ

Çimlenme gereksinimlerinin tespit edilmesi yabancı türlerin korunması ve kültüre alınmasında ilk adımdır. Nitekim tohumla çoğaltma endemik ve nadir türlerin *ex situ* (ortam-dışı) korunmasında olduğu kadar bitkisel üretimde de en uygun ve etkili yöntem olarak kabul edilmektedir. Çalışma konusu olan endemik *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* ve nadir rastlanan bir tür olan *H. pruinaum* kanıtlanmış biyoaktif kimyasal madde içerikleriyle umut vadeden tıbbi bitkilerdir. Bu türlerin çimlenme gereksinimleri daha önceki çalışmalarda tanımlanmış olmakla birlikte, daha yüksek çimlenme oranlarını yakalamak ve etkili bir şekilde fide/bitki elde etmek bu çalışmada mümkün olmuştur. Nitekim, her iki türde de yüzey sterilizasyonundan sonra 2 mg/l BA, 0.1 mg/l IAA ve 0.5 mg/l GA ile desteklenmiş temel MS ortamında *in vitro* kültüre alınan tohumlar yüksek oranda çimlenmiş; çimlenen tohumlar aynı ortamda alt kültüre alındığında güçlü steril fideler oluşturmuş; bu fideler başarılı bir şekilde dış şartlara alıştırılarak yüksek oranda hayatta kalmışlardır. Sonuçlar *H. aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* ve *H. pruinaum* türlerinin korunması ve kültüre alınması bakımından önemli olup, bu endemik ve nadir türlerle ilgili müteakip çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Abreu IN, Azevedo MTA, Solferini VM, Mazzafera P (2003). *In vitro* propagation and isozyme polymorphism of the medicinal plant *Hypericum brasiliense*. Biol. Plant. 47: 629-632.
- Ash JE, Groves RH, Willis AJ (1998). Seed Ecology of *Hypericum gramineum*, an Australian forb. Aust. J. Bot. 45: 1009-1022.
- Baskin JM, Baskin CC (2008). Some considerations for adoption of Nikolaeva's formula system into seed dormancy classification. Seed Sci. Res. 18: 131-137.
- Baskin CC, Baskin JM (2014). Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination, second ed. Elsevier/Academic Press, San Diego.
- Bertelle FML, Beatriz PM, Augusto LA (2004). Light, temperature and potassium nitrate in the germination of *Hypericum perforatum* L. and *H. Brasiliense* Choisy seeds. Bragantia 63: 193-199.
- Bertoli A, Çırak C, Seyis F (2015). *Hypericum origanifolium* Willd.: The essential oil composition of a new valuable species. Ind. Crop Prod. 77: 676-679.
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy. New York, Springer.
- Bingöl U, Coşge B, Gurbuz B (2011). *Hypericum* species in flora of Turkey. In: Odabas MS, Çırak C (Eds) *Hypericum*. Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol. 5 (Special Issue 1): 86-90.
- Bruni R, Sacchetti G (2009). Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). Molecules 14: 682-725.
- Campbell MH (1985). Germination, emergence and seedling growth of *Hypericum perforatum*. Weed Res. 25: 259-266.
- Carine MA, Christenhusz MJM (2010). About this volume, the monograph of *Hypericum* by Norman Robson. Phytotaxa 4: 1-4.
- Carta A, Bedini G, Giannotti A, Savio L, Peruzzi L (2015). Mating system modulates degree of seed dormancy in *Hypericum elodes* L. (Hypericaceae). Seed Sci. Res. 25: 299-305.
- Carta A, Probert R, Puglia G, Peruzzi L, Bedini G (2016). Local climate explains degree of seed dormancy in *Hypericum elodes* L. (Hypericaceae). Plant Biol. 18: 76-82.

- Cerabolini B, Rossella A, Roberta M, Ceriani SP, Barbara R (2004). Seed germination ve conservation of endangered species from the Italian Alps, *Physoplexis comosa* ve *Primula glaucescens*. Biol. Conserv. 117: 351-356.
- Chen SY, Shing-Rong K, Ching-Te C (2008). Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (*Myrica rubra*) seeds. Tree Physiol. 28: 1431-1439.
- Coronado MES, Olvera C, Guzman JM, Rubalcava MLM, Orozco S, Anaya AL, Segovia AO (2015). Complex dormancy in the seeds of *Hypericum philonotis*. Flora 213: 32-39.
- Çamaş N, Çalışkan Ö (2011). Breaking of seed dormancy in *Hypericum leptophyllum* Hochst., an endemic Turkish species. J. Med. Plant. Res. 5: 6968-6971.
- Çırak C (2007). Seed germination protocols for *ex situ* conservation of some *Hypericum* species from Turkey. Am. J. Plant Physiol. 2: 287-294.
- Çırak C, Bertoli (2013). Aromatic profiling of wild and rare species growing in Turkey: *Hypericum aviculariifolium* Jaub. and Spach subsp. *depilatum* (Freyn and Bornm.) Robson var. *depilatum* and *Hypericum pruinaum* Boiss. and Bal. Nat. Prod. Res. 27: 100-107.
- Çırak C, Kurt D (2014). *Hypericum* species as important medicinal plants. J. Aegean Agric. Res. Institute 24: 42-58.
- Çırak C, Radusiene J (2007). Variation of hyperforin in *Hypericum montbretii* during its phenological cycle. Nat. Prod. Res. 21: 1151-1156.
- Çırak C, Ayan A, Kevseroğlu K, Çalışkan Ö (2004a). Germination rate of St. John's Worth (*Hypericum perforatum* L.) seeds exposed to different light intensities and illumination periods. J. Biol. Sci. 4: 279-282.
- Çırak C, Ayan AK, Kevseroğlu K (2004b). The effects of light and some presoaking treatments on germination rate of St. John's Worth (*Hypericum perforatum* L.) seeds. Pak. J. Biol. Sci. 7:182-186.
- Çırak C, Sağlam B, Ayan AK, Kevseroğlu K (2006a). Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some *Hypericum* species from Turkey during the course of ontogenesis. Biochem. Syst. Ecol. 34: 1-13.
- Çırak C, Ayan AK, Kevseroğlu K (2006b). Physical and physiological seed dormancy of some *Hypericum* species growing in Turkey. Plant Breed. Seed Sci. 53: 3-8.
- Çırak C, Radusiene J, Janulis V, Ivanauskas L (2007a). Chemical constituents of some *Hypericum* species growing in Turkey. J. Plant Biol. 50: 632-635.
- Çırak C, Radusiene J, Janulis V, Ivanauskas L (2007b). Secondary metabolites in *Hypericum perforatum*: variation among plant parts and phenological stages. Bot. Helv. 117: 29-36.
- Çırak C, Kevseroğlu K, Ayan AK (2007c). Breaking of seed dormancy in a Turkish endemic *Hypericum* species: *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* by light and some pre-soaking treatments. J. Arid Environ. 68: 159-164.
- Çırak C, Kevseroğlu K, Odabaş MS (2011a). Farklı *Hypericum* türlerinde görülen tohum dormansisi ve giderilme metotları. Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, Cilt II, 318-323, Samsun.
- Çırak C, Odabaş MS, Ayan AK (2011b). Seed germination of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum heterophyllum*. In: Odabas MS, Çırak C (Eds) *Hypericum*. Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol. 5 (Special Issue 1): 105-107.
- Çırak C, Radusiene J, Çamaş N, Çalışkan Ö, Odabaş MS (2013). Changes in the contents of main secondary metabolites in two Turkish *Hypericum* species during plant development. Pharm. Biol. 51: 391-399.
- Çırak C, Radusiene J, Ivanauskas L, Jakstas V, Çamaş N (2014a). Phenological changes in the chemical content of wild and greenhouse-grown *Hypericum pruinaum*: Flavonoids. Turkish J. Agric. Forest. 38: 362-370.
- Çırak C, Radusiene J, Karpaviciene B, Çamaş N, Odabaş MS (2014b). Changes in phenolic content of wild and greenhouse-grown *Hypericum triquetrifolium* during plant development. Turkish J. Agric. Forest. 37: 307-314.
- Çırak C, Radusiene J, Ivanauskas L, Jakstas V, Çamaş N, Kurt D (2015). Phenological changes in the chemical content of wild and greenhouse-grown *Hypericum pruinaum*: hypericins, hyperforins and phenolic acids. Res. & Rev. J. Bot. 4: 37-47.
- Davis PH (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, Edinburgh University Press.
- Donohue K, de Casas RR, Burghardt L, Kovach K, Willis CG (2010). Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 41: 293-319.
- Finch-Savage WE, Footitt S (2012). To germinate or not to germinate: a question of dormancy relief not germination stimulation. Seed Sci. Res. 22: 243-248.
- Gül LB, Özdemir N, Gül O, Çırak C, Çon AH (2017). Bioactive properties and antimicrobial activity of some *Hypericum* species growing wild in Black Sea region of Turkey. Ith International Medicinal and Aromatic Plants Congress. May 06-10, Konya, Turkey.
- Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT (2012). List of Turkish Flora (Vascular Plants). Publication of Nezahat Gökyiğit Botanical Garden and Flora Research Fondation, İstanbul. Available online at <http://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c=Hypericum>.
- Kim H, Kim SW, Seok KH, Hwang CW, Ahn JC, Jin J, Kang HW (2018). Hypericin-assisted photodynamic therapy against anaplastic thyroid cancer. Photodiagn. Photodyn. 24: 15-21.

- Ma L, Pan X, Zhou F, Liu K, Wang L (2018). Hyperforin protects against acute cerebral ischemic injury through inhibition of interleukin-17A-mediated microglial activation. *Brain Res.* 1678: 254-261.
- Maltaş E, Uysal A, Yildiztugay E, Aladağ MO, Yıldız S, Küçüködük M (2013). Investigation of antioxidant and antibacterial activities of some *Hypericum* species. *Fresen. Environ. Bull.* 22: 862-869.
- Miransari M, Smith DL (2009). Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gib-berellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. *Biotechnol.* 8: 270-275.
- Miransari M, Smith DL (2014). Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99: 110-121.
- Perez-Garcia F, Huertas M, Mora E, Pena B, Varela F, Gonzalez-Benito ME (2006). *Hypericum perforatum* L. seed germination: interpopulation variation and effect of light, temperature, presowing treatments and seed desiccation. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 53: 1187-98.
- Ramalhete N, Machado A, Serrano R, Gomes ET, Mota-Filipe H, Silva O (2016). Comparative study on the in vivo antidepressant activities of the Portuguese *Hypericum foliosum*, *Hypericum androsaemum* and *Hypericum perforatum* medicinal plants. *Ind. Crop. Prod.* 82: 29-36.
- Rodriguez-Amigo B, Delcanale P, Rotger G, Juarez-Jimenez J, Viappiani C (2015). The complex of hypericin with β -lactoglobulin has antimicrobial activity with potential applications in dairy industry. *J. Dairy Sci.* 98: 89-94.
- Schiavone BIP, Verotta L, Rosato A, Marilena M, Gibbons S, Bombardelli E, Franchini C, Corbo F (2014). Anticancer and antibacterial activity of hyperforin and its derivatives. *Anticancer Agents Med. Chem.* 14: 1397-1401.
- Shih CM, Wu CH, Wu WJ, Hsiao YM, Ko JL (2018). Hypericin inhibits hepatitis C virus replication via deacetylation and down-regulation of heme oxygenase-1. *Phytomedicine* 46: 193-198.
- Solomon D, Adams J, Graves N (2013). Economic evaluation of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of mild to moderate depression. *J. Affect. Disord.* 148: 228-34.
- Thompson K, Ooi MKJ (2010). To germinate or not: more than just a question of dormancy. *Seed Sci. Res.* 20: 209-211.
- Valentao P, Dias A, Ferreira M, Silva B, Andrade PB, Bastos ML, Seabra RM (2003). Variability in phenolic composition of *Hypericum androsaemum*. *Nat. Prod. Res.* 17: 135-140.
- Walck JL, Hidayati SN, Dixon KW, Thompson K, Poschlod P (2011). Climate change and plant regeneration from seed. *Glob. Change Biol.* 17: 2145-2161.
- Wang J, Baskin JM, Baskin CC, Liu G, Yang X, Huang Z (2017). Seed dormancy and germination of the medicinal holoparasitic plant *Cistanche deserticola* from the cold desert of northwest China. *Plant Physio. Biochem.* 115: 279-285.
- Willis CG, Baskin CC, Baskin JM, Auld JR, Venable DL, Cavender-Bares J, Donohue K, Casas R. (2014). The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist* 203: 300-309.
- Xiang QN, Venkatanarayanan N, Ho CYX (2017). Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis. *J. Affect. Disord.* 210: 211-221.