



T.C.  
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp.  
*erzincanicum* Davis Et Kupicha TÜRÜNÜN  
MİKRO ÇOĞALTIMI VE DIŞ KOŞULLARA  
ADAPTASYONU

Gülşen AKÇA

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran-2023  
MUŞ  
Her Hakkı Saklıdır



T.C.  
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp.  
*erzincanicum* Davis Et Kupicha TÜRÜNÜN  
MİKRO ÇOĞALTIMI VE DIŞ KOŞULLARA  
ADAPTASYONU

Gülşen AKÇA

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Şeyma ÖNLÜ

Haziran-2023  
MUŞ  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL ve ONAYI

Gülşen AKÇA tarafından hazırlanan “*Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *erzincanicum* Davis et Kupicha türünün mikro çoğaltımı ve dış koşullara adaptasyonu” adlı tez çalışması 11/05/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Doç. Dr. Sedat BOZARI

MŞÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölüm

.....

#### Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Şeyma ÖNLÜ

MŞÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölüm

.....

#### Üye

Doç. Dr. Cennet YAMAN

Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,

Tarla Bitkileri Bölümü

.....

Doç. Dr. Sedat BOZARI

FBE Müdürü

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../...../..... Tarih ve ...../..... Nolu kararı ile onaylanmıştır.

Bu tez çalışması, Muş Alparslan Üniversitesi BAP Birimi tarafından BAP-21-FEF-4901-04 nolu proje ile desteklenmiştir.

## TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Gülşen AKÇA

Tarih:

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### *Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *erzincanicum* Davis Et Kupicha TÜRÜNÜN MİKRO ÇOĞALTIMI VE DIŞ KOŞULLARA ADAPTASYONU

Gülşen AKÇA

Muş Alparslan Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Şeyma ÖNLÜ

Bu tez çalışmasında, *Helichrysum arenarium* (L) Moench subsp. *erzincanicum* Davis Et Kupicha türünün mikroçoğaltımı, kallus eldesi ve dış koşullara alıştırma çalışmaları yürütülmüştür. *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* tohumları %7.5'luk sodyum hipoklorit solüsyonu ve 42°C etüvde 24 saat bekletilerek yüzey sterilizasyonu sağlanmıştır. Tohumlar, 1 mg/L BAP+ 1 mg/L GA<sub>3</sub> içeren MSB5 besin ortamında çimlendirilmiştir. Tohumlardan elde edilen steril bitkiciklerin 1 mg/L BAP içeren MSB5 besin ortamında sekiz hafta sonunda sürgün rejenerasyon oranı %99.1, eksplant başına sürgün sayısı ise 22.1 olarak tespit edilmiştir (p<0.05). Bir ayın sonunda 1 mg/L BAP içeren besin ortamında sürgünlerin etrafında kalluslar oluşmuştur. Kallusların çoğaltımı 2 mg/L TDZ + 1 mg/L NAA içeren MSB5 ortamında %80.2 oranında başarı sağlanarak yapılmıştır. 1 mg/L BAP içeren besin ortamında büyüyen sürgünlerde kararmalar meydana geldiğinden, 5 mg/L KIN + 0.5 mg/L IAA L içeren MSB5 ortamında transfer edilerek sürgün sayısı (%60) arttırılmıştır. Elde edilen sürgünler 1 mg /L IBA içeren besin ortamında %77.8 oranında köklendirilmiştir. Böylece endemik *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türü için etkili tohum sterilizasyonu ve mikroçoğaltım protokolü oluşturulmuştur.

2023, 40 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Endemik tür, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *erzincanicum* Davis Et Kupicha, Gibereellik asit, Kinetin, Mikroçoğaltım

## ABSTRACT

## MS THESIS

### MICROPROPAGATION AND ACCLIMATIZATION OF *Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *erzincanicum* Davis Et Kupicha

Gülşen AKÇA

Muş Alparslan University  
Natural and Applied Science  
Department of Biology

Advisor: Assist. Prof. Dr. Şeyma ÖNLÜ

In this thesis, studies of micropropagation, callus and acclimatization were carried out for *Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *erzincanicum* Davis Et Kupicha species. Seeds of *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* were kept in 7.5% sodium hypochlorite solution and 42°C oven for 24 hours to ensure surface sterilization. The seeds were germinated in MSB5 nutrient medium containing 1 mg/L BAP + 1 mg/L GA<sub>3</sub>. After 8 weeks, the shoot regeneration rate of sterile plantlets was 99.1% and the number of shoots per explant was 22.1 which obtained from MSB5 nutrient medium containing 1 mg/L BAP (p<0.05). At the end of one month, calluses were formed around the shoots in the nutrient medium containing 1 mg/L BAP. Reproduction of calli was done in MSB5 medium containing 2 mg/L TDZ + 1 mg/L NAA with rate of 80.2%. Since necrosis occurred in shoots growing in nutrient medium containing 1 mg/L BAP, the number of shoots were increased by transferring them to MSB5 medium containing 5 mg/L KIN + 0.5 mg/IAA (60%). The shoots obtained were rooted at a rate of 77.8% in nutrient medium containing 1 mg/L IBA. Thus, an effective seed sterilization and micropropagation protocol has been established for endemic *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* species.

**2023, 40 Pages**

**Keywords:** Endemic species, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *erzincanicum* Davis Et Kupicha, Gibberellic acid, Kinetin, Micropropagation

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca, değerli bilgilerini benimle paylaşan, rehberlik edip yol gösteren, yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Şeyma ÖNLÜ 'ye, istatistik analizlerime yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Selçuk AYDEMİR'e, yüksek lisans ders aşamasında değerli katkılar sunan Muş Alparslan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Yapıcı fikirleri ve tavsiyeleriyle çalışmalarımda emeği olan Mustafa KAHYA'ya, beraber çalışmaya başladığımız ilk günden bu yana ilgisini eksik etmeyen, aynı zamanda materyal teminimizi sağlayan Dr. Öğretim Üyesi Ahmet YENİKALAYCI'ya, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Öğr. Gör. Sefa IŞIK'a; hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan annelerim Emine ÇÖRÜK ve Huriye AKÇA 'ya; babalarım Halil ÇÖRÜK ve Ömer AKÇA 'ya, her koşulda yanımda olan desteğini ve sevgisini hep hissettiğim canım eşim Rıza Mert AKÇA ve tabi ki onun annesi olmaktan gurur duyduğum, belki de bu çalışmada en çok emeği olan biricik oğlum Ömer AKÇA 'ya en içten TEŞEKKÜRLERİMİ sunmayı bir borç bilirim.

Gülşen AKÇA  
MUŞ, Haziran 2023

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Helichrysum</i> Cinsi.....	3
2.1.1. Genel özellikleri.....	3
2.1.2. Geleneksel kullanımı .....	6
2.2. Bitki Doku Kültürü ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri .....	8
2.3. <i>Helichrysum</i> Cinsinde <i>İn vitro</i> Araştırmalar.....	10
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>15</b>
3.1. Materyal.....	15
3.2. Yöntem .....	15
3.2.1. Tohum yüzey sterilizasyonu.....	15
3.2.2. Sürgün sterilizasyonu .....	17
3.2.3. Besin ortamı ve kültür koşulları .....	18
3.2.4. Sürgün rejenerasyonu .....	19
3.2.5. Kallus gelişimi.....	20
3.2.6. Köklendirme çalışmaları .....	21
3.2.7. İstatistiksel Analizler .....	21
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>22</b>
4.1. Araştırma Bulguları .....	22
4.1.1. Tohum sterilizasyon sonuçları.....	22
4.1.2. Kültür ortamından alınan sürgünlerin sterilizasyon sonuçları .....	24
4.1.3. Sürgün rejenerasyonu sonuçları .....	24
4.1.4. KIN ve IAA büyüme düzenleyicilerinin sürgün rejenerasyon sonuçları .....	25
4.1.5. Kallus oluşumu.....	26
4.1.6. Köklendirme ve dış koşullara alıştırma sonuçları .....	29
4.2. Tartışma .....	31
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>36</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
M	: Molar
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
$\text{dm}^3$	: Desimetre küp
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\gamma$	: Gama
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat (Celcius) derece
%	: Yüzde

### Kısaltmalar

MS	: Murashige&Skoog
MSB5	: Murashige&Skoog + Gamborg B5 vitamin mix
LS	: Linsmaier&Skoog
NAA	: Naftelen Asetik Asit
IBA	: İndol 3-Bütirik Asit
BAP	: 6- Benzil Amino Purin
IAA	: İndol Asetik Asit
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksiasetik asit
TDZ	: Thidiazuron
ZEA	: Zeatin
KIN	: Kinetin
$\text{GA}_3$	: Gibberellik Asit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
HCl	: Hidroklorik asit
$\text{H}_2\text{O}_2$	: Hidrojen peroksit
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	: Metilen klorit
FeEDTA	: Ferrik EDTA
$\text{HgCl}_2$	: Cıva klorür
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
$\text{IC}_{50}$	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon inhibe etme gücü
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	: Etilen
PPM	: Plant Prezervative Mixture
Gamborg B5	: Gamborg medium
SH	: Schenk ve Hildebrandt
DKW	: Driver and Kuniyuki

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b> <i>H. arenarium</i> türünün Türkiye coğrafyasında yayılışı .....	5
<b>Şekil 2.2</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün Türkiye coğrafyasında yayılışı .....	6
<b>Şekil 3.1</b> <i>Helichrysum arenarium</i> (L) Moench subsp. <i>erzincanicum</i> Davis et Kupicha bitkisinin bahçedeki görünümü .....	15
<b>Şekil 4.1</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> tohumlarının MS vitamin, MSB5, MS Salt, Gamborg B5, LS, SH ve Gamborg B5 vitamin mix içeren besin ortamlarında çimlenme oranları .....	23
<b>Şekil 4.2</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün MSB5 besin ortamına 1 mg/L BAP ilave edilerek sürgün rejenerasyonu (a) bitkinin ilk aktarıldığı gün (b) bitkinin 8 hafta sonundaki hali .....	25
<b>Şekil 4.3</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün MSB5 besin ortamına KIN (5 mg/L)+IAA(0.5 mg/L) ilave edilerek sürgün gelişimi, (a) bitkiciklerin ilk aktarıldığı gün (b), (c) ve (d) bitkiciklerin 30 gün sonraki hali .....	26
<b>Şekil 4.4</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün, 2,4_D içeren MSB5 ortamının kallus gelişimi üzerine etkisi .....	27
<b>Şekil 4.5</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün, TDZ ve NAA içeren MSB5 ortamının kallus gelişimi üzerine etkisi.....	27
<b>Şekil 4.6</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün, TDZ ve Pikloram içeren MSB5 ortamının kallus gelişimi üzerine etkisi.....	28
<b>Şekil 4.7</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> bitkisinin, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki (a) 2,4_D, içeren MSB5 ortamda gelişim gösteren kalluslar (b) ve (c) 2mg/L TDZ+ 1mg/L NAA içeren ortamda gelişim gösteren kalluslar .....	28
<b>Şekil 4.8</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> bitkiciklerinin, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki IAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerin köklenmeye etkisi.....	29
<b>Şekil 4.9</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki IBA hormonunun köklenmeye etkisi (a) köklenmeye alınan bitkicik (b) 30 gün sonra 1 mg/L IBA içeren ortamda köklenen bitkicik .....	29
<b>Şekil 4.10</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki IBA hormonunun köklenmeye etkisi (a) ve (b) 1mg/L IBA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler (c) 1.5 mg/L IBA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler ve (d) 0.5 mg/L IBA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler.....	30
<b>Şekil 4.11</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki IAA hormonunun köklenmeye etkisi (a) köklenme ortamına alınan bitkicikler (b) 1 mg/L IAA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler (c) 1.5 mg/L IAA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler .....	30
<b>Şekil 4.12</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün, 1 mg/L IBA hormonunda köklenen bitkiciklerin perlit ve torf karışımında dış koşullara alıştıırılma aşaması (a) ve (b) bitkiciklerin hormondan ve besin ortamından arındırılarak torf ve perlit karışımına alınması (c) üzerlerine poşet geçirilerek havayla temasının engellenmesi (d) bir hafta sonunda bitkiciklerin görüntüsü .....	30

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> Türkiye'deki <i>Helichrysum</i> türlerinin bilimsel,yerel isimleri ve yetiştiği bölgeler .....	4
<b>Çizelge 3.1</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> tohum yüzey sterilizasyon uygulamaları .....	16
<b>Çizelge 3.2</b> Kültür ortamından toplanan sürgünlerin çamaşır suyu ve kimyasallar ile sterilizasyon uygulaması .....	17
<b>Çizelge 3.3</b> Kullanılan MS, Gamborg B5, LS, SH, Gamborg B5 vitamin mix, MS salt temel besin ortamlarının bileşenleri ve litredeki konsantrasyonları * .....	18
<b>Çizelge 3.4</b> Kullanılan Büyüme Düzenleyici Maddelerin, çözücüleri ve saklama koşulları* .....	18
<b>Çizelge 3.5</b> Steril edilen tohumların çimlenme teşviki için besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları .....	19
<b>Çizelge 3.6</b> Tohumdan büyüyen steril bitkiciklerin sürgün oluşumu için aktarıldığı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları.....	20
<b>Çizelge 3.7</b> <i>In vitro</i> ortamda yetişen ve tarladan alınan toprak üstü kısımların sürgün elde etmek amacıyla kullanıldığı besin ortamları ve büyüme düzenleyici kombinasyonları .....	20
<b>Çizelge 3.8</b> Kallus geliştirmek için kullanılan bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları .....	21
<b>Çizelge 3.9</b> Köklendirme için kullanılan IAA ve IBA büyüme düzenleyici oranları .....	21
<b>Çizelge 4.1</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> 'un MSB5 ortamında BAP ve GA <sub>3</sub> bitki büyüme düzenleyicilerinin tohum çimlenmeye etkisi .....	23
<b>Çizelge 4.2</b> Farklı oranlarda BAP içeren MSB5 besin ortamının <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> türünün kültür başlangıcından 8 hafta sonra sürgün oluşturma etkisi .....	24
<b>Çizelge 4.3</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> bitkilerinin, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki KIN ve IAA bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün gelişimi üzerine etkisi 25	
<b>Çizelge 4.4</b> <i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i> bitkisinin, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki 2,4_D, TDZ, NAA ve Pikloram bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus gelişimine etkisi .....	26

## 1. GİRİŞ

İnsanlık tarihinin başladığı günden beri bitkiler deneme yanılma yoluyla birçok şekilde tüketilmiştir. İnsan, hayvan ve bitkilerin sağlığı için kullanılmıştır. Bugün bile birçok ilacın etken maddelerini tıbbi ve aromatik bitkiler oluşturmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitki materyalleri ilaç olarak işlenerek/işlenmeden ya da şifalı ot (herbal) ürünler olarak kullanılmıştır (Bayram ve ark., 2010)

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre, hastalıklardan korunmak ve tedavi amacıyla, etken maddeyi taşıyan bitkisel drogları olduğu gibi veya bitkisel karışımlar halinde, "bitkisel ilaç" olarak adlandırılmıştır (Toksoy ve ark., 2010).

Dünya genelindeki bitkilerin yaklaşık % 12'sinin tıbbi değerinin olduğu bilinmektedir. Bununla beraber kimya alanındaki ilerlemelere rağmen modern farmakopedeki ilaçların yaklaşık olarak % 25'i bitkilerden elde edilmektedir. Geri kalan kısmı bitkilerdeki bileşikler örnek alınarak sentetik olarak üretilmektedir. Doğrudan veya dolaylı olarak insan beslenmesinde ve iyileşmesinde bitkilerin çok büyük bir payı olduğu görülmektedir. Kimyasal ilaçların insan sağlığına olan zararından sonra bitkisel tedavi, klasik tıbbin bir dalı haline gelmiştir. Bunun yanı sıra yapılan birçok çalışmayla bitkilerin mikroorganizmalar üzerindeki etkileri ortaya çıkmıştır. Sentetik birçok ilaca alternatif olan bitkisel ürünlerin, aynı zamanda terapötik etkisinin de olduğu rapor edilmiştir (Schippmann ve ark., 2002).

Türkiye Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan olmak üzere üç fitocoğrafik bölgenin kesişim noktasıdır. Bu durum birçok bitkinin kaynağı olmasını sağlamıştır. Endemik bitki bakımından da zengin olan ülkemiz yaklaşık 3700 endemik türe ev sahipliği yapmaktadır. Ancak bu türlerden sadece 400 kadarı ekonomik olarak kullanılmaktadır (Erik ve Tarıkahya Hacıoğlu, 2004).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin en önemli kullanım alanları ilaç, kozmetik, parfümeri, gıda ve baharat sektörüdür. Bunun yanı sıra süs bitkisi ve doğal pestisit olarak da değerlendirilmektedir. Bütün bu alanlar için kullanılan uçucu yağlar, aromatik bitkilerden yararlanılarak elde edilmektedir (Göktaş ve Gıdık, 2019).

Dünya nüfusunun 21.yüzyılın sonunda 13 milyara ulaşacağı ön görülmüştür. Diğer taraftan kentleşmenin ve birçok faktörlerin etkisiyle verimli tarım alanları gün geçtikçe azalmıştır. Bu durum birçok ülkeyi endişe ve korkuya sürüklemiştir. Geçmişteki tıbbi bitkilerle olan talep doğadan karşılanmıştır. Ancak dünya üzerindeki nüfusun hızla artmasıyla, doğal

ürünlere olan istek artmış ve talep karşılanamaz hale gelmiştir. Bununla birlikte bitkilerin birçoğu nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalmıştır. Her geçen günde bu tehlike giderek artmıştır (Babaoğlu ve ark., 2001). Bütün bu olumsuzluklara karşı bitkilerin korunması ve ekonomiye kazandırılması için en avantajlı yöntem bitki doku kültürüyle klonlarının üretilmesidir. Bitki doku kültürü, bitkinin çoğaltılması ve genetik yapısının korunması, hastaliksız ürünlerin ve sekonder metabolitlerin üretilmesiyle endüstriyel alan için önemli bir yöntemdir (Memon ve Memon, 2021).

Gerçekleştirilen bu çalışmanın amacı; ülkemizde doğal olarak yetişen ve endemik olan *Helichrysum arenarium* (L.) Moench subsp. *erzincanicum* türünün *in vitro* hızlı çoğaltımının yapılmasıdır. Steril şartlar altında etkili bir çimlendirme yönteminin geliştirilmesi ve bu bitkinin doku kültürü çalışmalarında kullanılabilir hale getirilmesidir. Halk hekimliğinde önemli bir yere sahip bu türün ekonomik ve bilimsel çalışmalarla hayata kazandırılması amaçlarımız arasındadır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1 *Helichrysum* Cinsi

#### 2.1.1 Genel özellikleri

*Asteraceae* (Papatyagiller) familyası tür bakımından geniş bir alana sahiptir. Çok belirgin karakteristik özellikleri vardır. Hemen hemen her yerde rastlanabilmektedir. *Asteraceae* familyası Türkiye florasında cins bakımından ikinci, tür sayısı bazında birinci sırada yer almaktadır (Karamenderes, 2002). Şimdiye kadar bitkilerden elde edilerek tanımlanan yaklaşık 7000 kimyasal bileşiğin 5000 kadarı bu familyaya aittir. Buda familyanın önemini ve kimyasal açıdan ne kadar zengin olduğunu göstermektedir (Zeybek ve Zeybek, 2002). Bu familya sütlü ve süt içermeyen; tek, iki ve çok yıllık otsu yapılar veya çalı formlarından oluşmaktadır. Yaprak özellikleri genellikle; karşılıklı, basit ya da bileşik nadiren de dairesel şekildedir. Çiçekler genellikle çok sayıdadır, bazen tek çiçek görülebilmektedir. Çiçekleri tek eşeyli veya hermafrodittir. Çiçekler kapitulum çiçek durumunda toplanmıştır (Karamenderes, 2002).

*Helichrysum* ismi, Yunanca güneş anlamına gelen “*helios*” ve altın anlamına gelen “*chrysos*” kelimelerinden türemiştir (Liu ve ark., 2019). Halk arasında altın otu, sonsuza dek süren, ölümsüz çiçek veya solmaz çiçek olarak da bilinmektedir (Czinner ve ark., 2001). Altın otu bitkisi güneş ışığını sever, düşük sıcaklıkta ve yüksek rakımlı yerlerde yetişmektedir. Nemli, taşlı, kireçli ve alkali topraklar yaşam koşulları için uygundur. Kurak ve ağır topraklarda yaşamlarını sürdürebilmektedir. Altın otu bitkisinin tohum büyüklükleri çok küçük olduğundan 1 gramda binlerce bulunabilmektedir (Şen ve Kalaycı, 2016).

*Helichrysum* cinsi yarı çalimsı formunda, öbeksi ve otsu çok yıllık bitkilerdir. Yaprak ve dal kısımları pamuk gibi yünsü salgı tüylerle kaplanmıştır ve grimsi beyaz renktedir. Gövdeler odunsu sürgünlerden, dal uçları genç sürgünlerden oluşmuştur. Yaprakları linear, yassı ve dalgalı kenarlıdır. Çiçekli gövdeler yaklaşık 20-25 cm boyutunda dik ve basit yapıdadır. Çiçekler sarı hepsi hermafrodit veya kenarda bir sıra dişi çiçek bulunur. Pappus sarımsı, kirli beyaz, yumuşak pürüzlü veya serttir (Tanker ve Sezik, 1978).

Dünya genelinde yaklaşık 120 adet bitki kökenli ilacın mevcut olduğu ve bunların sadece 95 tanesinin bitki türlerinden elde edildiği bilinmektedir. *Helichrysum arenarium* bitkisi de bu bitkilerin arasında yer almaktadır. *H. arenarium* bitkisi *Papatyagiller* (*Asteraceae*) familyasının bir üyesidir. Çok yıllık odunsu bir bitkidir (Kutluk ve ark., 2018). *H. arenarium*

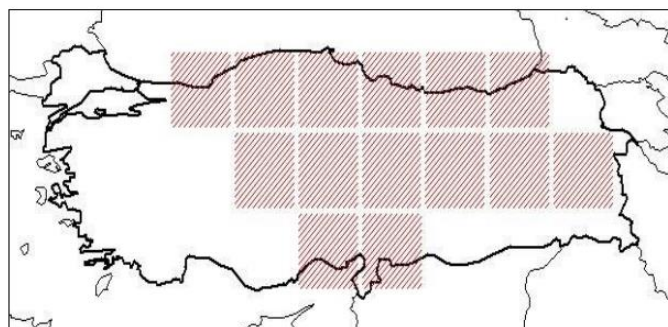
Amerika'dan Avrupa'ya, Balkanlar, Orta Asya dâhil olmak üzere pek çok coğrafi bölgenin bozkırlarında yetişmektedir. Dünya üzerinde, yaklaşık olarak 200'den fazla tür Güney Afrika'da bulunmaktadır (Kutluk ve ark., 2018). Türkiye'deki *Helichrysum* türlerinin bilimsel ve yerel isimleri ile yetiştiği bölgeler Çizelge 2.1' de gösterilmiştir (Güner ve Aslan, 2012; Eroğlu,2018; Duran, 2021).

**Çizelge 2.1** Türkiye'deki *Helichrysum* türlerinin bilimsel,yerel isimleri ve yetiştiği bölgeler

Tür Adı	Türkçe Adı	Bulunduğu İller	Endemik	
<i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench	subsp. <i>erzincanicum</i> Davis et Kupicha	Erzincan altınotu	Kastamonu, Ağrı, Erzincan, Kayseri	+
	subsp. <i>rubicundum</i> (C. KOCH) Davis et Kupicha	Yayla gülü	Iğdır, Kars, Ardahan, Ağrı, Malatya, Van	-
	subsp. <i>aucheri</i> (Boiss.) Davis et Kupicha	Yayla çiçeği	Çankırı, Kastamonu, Bitlis, Ankara, Erzurum, Kayseri Nevşehir, Sinop, Sivas	+
<i>H. armenium</i> DC.	subsp. <i>armenium</i> D.C	Altın otu, Aras altın otu	Gümüşhane, Artvin, Ardahan, Kırıkkale, Kırşehir, Kayseri, Erzincan, Bitlis, Bingöl, Van, Ağrı, Hakkâri, Erzurum	-
	subsp. <i>araxinum</i> (Kirp.) Takht.	Altın otu, Aras altın otu	Gümüşhane, Artvin, Ardahan, Kırıkkale, Kırşehir, Kayseri, Erzincan, Bitlis, Bingöl, Van, Ağrı, Hakkâri, Erzurum	-
<i>H. artvinense</i> P.H.Davis et Kupicha	Artvin ölmezi	Artvin		+
<i>H. chasmolyticum</i> P.H. Davis	Kaya ölmezi	Antalya, Burdur, Isparta		-
<i>H. chionophilum</i> Boiss.& Balansa	Yayla hencecalığı	Kayseri, Kahramanmaraş, Sivas, Mersin, Erzincan, Yozgat		-
<i>H. compactum</i> Boiss.	Böbrek altın otu	Antalya, Denizli		+
<i>H. goulandrionum</i> E. Georgiadou	Bozuntu	Kahramanmaraş		+
<i>H. graveolens</i> (M.Bieb.) Sweet	Hencecalık	Bursa, Düzce, Kastamonu, Sinop, Ordu, Giresun, Eskişehir, Sivas, Bitlis, Hakkâri		-
<i>H. heywoodianum</i> P.H.Davis	Kadim altın otu	Aydın, Söke, Samsun		+
<i>H. italicum</i> (Roth) G.Don	Balkaymak	Çanakkale, İzmir, Muğla, Balıkesir		+
<i>H. kitianum</i> Yıldız	Alaycık çiçeği	Kırşehir, Nevşehir, Kayseri, Yozgat, Kırıkkale		+
<i>H. luteoalbum</i> (L.) Rehb.	Saman çiçeği	Antalya, Bayburt, Kocaeli, Rize, Artvin		-
<i>H. noeanum</i> Boiss.	Gülazar	Ankara, Sivas, Niğde		+
<i>H. orientale</i> (L.) Gaertn.	Sarı solmaz	İzmir, Kütahya, Aydın		-
<i>H. pallasii</i> (Spreng.) Ledeb.	Kocaman çiçeği	Gümüşhane, Bayburt, Erzurum, Kars, Sivas, Van, Hakkâri, Antalya		-

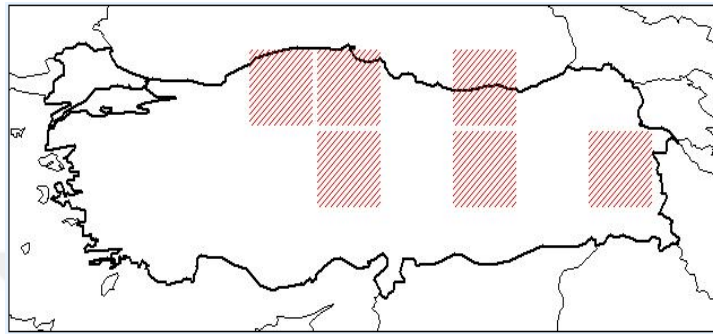
<i>H. pamphylicum</i> P.H.Davis et Kupicha	Beyaz kurna	Antalya	+
<i>H. peshmenianum</i> S.Erik	Solmaz otu	Niğde	+
<i>H. plicatum</i> D.C	subsp. <i>plicatum</i> D.C	Mantuvar	-
	subsp. <i>polyphyllum</i> (Ledeb.) Davis et Kupicha	Kalisar çiçeği	Bursa, Kütahya, Konya, Niğde, Ağrı, Van, Adana, Rize, Hakkâri, Bitlis
	subsp. <i>pseudoplicatum</i> (Nab.) Davis et Kupicha	Bozoğlan	-
	subsp. <i>isauricum</i> Parolly	Savran	Antalya, Karaman
<i>H. sanguineum</i> (L.) Kostel	Kırmızı guddeme	Hatay civarı	-
<i>H. sivasicum</i> Kit Tan & Yıldız	Sivas ölmezi	Sivas	+
<i>H. Stoechas</i> (L.) Moench	Kudama	Çanakkale, Bursa, Muğla, Hatay, Adana	-
<i>H. uncapitatum</i> Şenol, Seçmen & B.Öztürk	Mantı çiçeği	Denizli	+
<i>H. yuksekovaense</i> Yıldız	Reşko altın otu	Hakkâri Yüksekova	+
<i>H. yurterianum</i> Y.Gemici, Kit Tan, H.Yıldırım & M.Gemici	Gümüş hencecalık	Erzincan	+

Türkiye florasında 16'si endemik, 30 tane *Helichrysum* taksonu bulunmaktadır (Eroğlu, 2018). Türkiye'de; İç Anadolu'nun doğu kesiminde, Karadeniz bölgesinin neredeyse tamamında, Doğu Anadolu'nun bazı kesimlerinde, Akdeniz bölgesinin Hatay, Mersin bölümlerinde çoğunlukla görülmektedir (Anonim, 2018). Şekil 2.1'de *H. arenarium* türünün Türkiye coğrafyasındaki yayılışı görülmektedir (Bakis ve ark., 2011).



Şekil 2.1 *H. arenarium* türünün Türkiye coğrafyasında yayılışı

*H. arenarium* (L.) Moench subsp. *erzincanicum* Davis et Kupicha türü Türkiye coğrafyasında sadece Kastamonu, Ağrı, Erzincan ve Kayseri illerinde görülmektedir. Doğal vejetasyonunda yetişen çok yıllık, ot formunda ve endemik bir türdür. Şekil 2.2’de *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün Türkiye coğrafyasındaki yayılışı gösterilmektedir (Bakis ve ark., 2011).



Şekil 2.2 *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün Türkiye coğrafyasında yayılışı

### 2.1.2 Geleneksel kullanımı

Etnobotanik olarak kullanımı yaygın olduğundan, tıpta iyi bilinen bir türdür (Süzgeç ve ark., 2005). Halk hekimliğinde sarılık, kanser ve safra kesesi, solunum yolu hastalıkları, sindirim sistemi bozuklukları, bağışıklık güçlendirme, böbreklerdeki kum ve taşın düşürülmesi, ürogenital rahatsızlıkları tedavi etmek amacıyla çok eski yıllardan beri kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2019). Ülkemizde bitkisel çay olarak da tüketilmektedir (Eroğlu ve ark., 2010). Ayrıca güzel kokusundan dolayı uçucu yağları uzun yıllardır kozmetik sektöründe ve yaşlanmayı geciktirici ürünlerde hammadde olarak tercih edilmektedir (Liu ve ark., 2019). Erzurum ve çevresinde yetişen *Helichrysum* türleri, halk tarafından sarılık hastalığının tedavisinde su içerisinde kaynatılıp hastaya içirilmektedir (Anonim, 2018). Diğer yörelerimizde ise çıban ve iltihaplı yaraların tedavisinde bitkinin çiçekleri tereyağı ile kavrulup soğutulularak hastalıklı bölgeye sürülmektedir (Anonim, 2020).

Doğal bir böcek kovucu olması nedeniyle bahçelerde taze ve kuru buket aranjmanları şeklinde kullanılmaktadır. Kuruduktan sonra ise uzun süre doğal rengini koruması sebebiyle güzel bir dekor sağlamaktadır (Pawelek, 2015). Çok eskiden beridir kumaş güvelerine karşı evlerde çözüm olarak da kullanılmıştır (Czinner ve ark., 2000). Güney Amerika da tüberkülozu ve bununla ilgili semptomları tedavi etmede (Gradinaru ve ark., 2014), Orta Avrupa da ise geleneksel olarak antiseptik ve spazmolitik olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Akin ve Saki,

2019). Minik sarı çiçeklerinin güzelliğinden dolayı park ve bahçe süslemeciliği alanında özel olarak yetiştirilmektedir. Kurutulduktan sonra altın sarısı rengini koruduğu için 'Altın otu' denilmektedir (Güner ve Aslan, 2012; Duran, 2021).

Lourens ve ark. (2004) Güney Afrika'da yetişen *Helichrysum*' un farklı türlerinin antimikrobiyal, antioksidan (DPPH) ve antiinflamatuvar (5-lipoksijenaz) aktivitesi incelenmiştir. *H. dasyanthum*, *H. felium*, *H. excisum*, *H. petiolare* türlerinin uçucu yağ bileşenleri belirlenmiştir. *H. dasyanthum*, *H. excisum*, *H. petiolare* uçucu yağ bileşenleri  $\alpha$ -pinen, 1.8-sineol ve *p*-simen gibi monoterpen bileşikler baskınken *H. felium* monoterpenin varlığı büyük ölçüde olmadığı ve seskiterpenlerden ise  $\beta$ -karyofilenin baskın olduğu belirtilmiştir. Aseton ve metanol ekstraktlarının yanı sıra uçucu yağlar gram-pozitif bakterilere karşı iyi aktivite sergilemiştir. Dört bitki türünün de antioksidan aktivitesi tahlili de aktif çıkmıştır. Uçucu yağların antiinflamatuvar etkisini göstergeni olarak kullanılan 5-lipoksijenaz testinde de aktivite göstermiştir. Antibakteriyel test sonuçlarında aseton ekstraktı *H. dasyanthum*' un minimum inhibitör konsantrasyon değeri 15.63 g/ml ile metanol ekstraktında *H. excisum*' un minimum inhibitör konsantrasyon değeri 62.5 g/ml değer göstermiştir. *H. dasyanthum* türü antioksidan aktivitesi (DPPH) testinde aseton ekstraktı IC<sub>50</sub> (9.53 mg/ml) değeriyle en etkili aktif serbest radikal temizleyici etki göstermiştir. Uçucu yağların antiinflamatuvar değerleri ise 25 ile 32 g/ml arasında değişmektedir.

Kramberger ve ark. (2021) Morfolojik olarak farklı iki *H. italicum* (Roth) G. bitkisi ve ticari olarak temin edilmiş olan *H. arenarium* (L.) karşılaştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır. *H. italicum*, (% 43.6) en yüksek radikal süpürme aktivitesini sergilemiştir. *H. arenarium* ise (% 4.4) radikal süpürme aktivitesi göstermiştir. *H. italicum* un antioksidan potansiyeli yalnızca bitkinin morfolojik tipine bağlı değildir, hasat zamanı da önemli olduğu bildirilmiştir. *H. italicum* 'un, *H. arenarium* 'a göre üstün özellikleri göz önüne alındığında, *H. italicum* 'un, tıbbi bir bitki olarak değerlendirilmesi önerilmiştir.

Eroğlu ve ark. (2010) Türkiye'de safra kesesi rahatsızlıklarında çok fazla kullanılmasından yola çıkarak, farklı *Helichrysum* türlerinin genotoksik etkileri araştırılmıştır. Mikronükleus, mitotik ve replikasyon indeksleri parametresi alınarak farklı konsantrasyonlardaki lenfosit kültürlerine genotoksik etkileri incelenmiştir. Su ve metanol çözücülerıyla beş farklı oranda (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 mg/ml) çalışmalar yapılmıştır. Değerlendirme sonucu *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* alt türünün alternatif tıpta serbestçe kullanılmaması gerektiği, *H. arenarium* subsp. *rubicundum* ve *H. arenarium* subsp. *aucheri* alt

türlerinde ise genotoksik etkisinin görülmemesinden dolayı alternatif tıpta kullanılabileceği bildirilmiştir.

Tepe (2005) dört farklı *Helichrysum* türünün (*H. noeanum*, *H. chionophilum*, *H. plicatum* ve *H. arenarium*) metanol ekstraktlarının *in vitro* antioksidan aktivitelerini incelemek üzere tasarlanmıştır. Ekstraktlar, antioksidan aktivitesi için iki tamamlayıcı test olan DPPH serbest radikal yakalama ve b-karoten/linoleik asit sistemleri tarafından taranmıştır. İlk durumda çalışılan *Helichrysum* türlerinin metanol ekstraktlarının herhangi bir antioksidan aktivite göstermezken, en aktif değeri *H. chionophilum* türü IC<sub>50</sub> (40.5 mg/ml) aktivite sergilemiştir. b-karoten/linoleik asit test sisteminde ise *H. noeanum* ve *H. arenarium* 'un linoleik asit oksidasyon oranları birbirine yakın çıkmıştır.

## 2.2 Bitki Doku Kültürü ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Bitki biyoteknolojisi; bitkinin çeşitli dokularından faydalanarak, genetik bir mühendislik tekniği uygulayarak, moleküler düzeyde bir bitkiyi iyileştirmeyi amaçlamıştır. Aynı şekilde tarımsal ve ekonomik önemi yüksek olan bitkilerin, mikroorganizmalar yardımıyla gen aktarımı yapılarak genetiğinin değiştirilmesi sağlanmıştır. Bu bağlamda aslında bitki biyoteknolojisini 'bitki doku kültürü ve rekombinant DNA teknolojisi ve genetik mühendisliği' olmak üzere iki ana başlık oluşturmuştur (Babaoğlu ve ark., 2001).

Bitki doku kültürü; steril koşullar altında, yapay bir besin ortamında, bitkinin çeşitli eksplantlarından yararlanarak, belirli kimyasal ve fiziksel ortam içerisinde kültüre alınmasıyla yeni doku, bitki ve bitkisel ürünlerinin üretilmesi olarak tanımlanmıştır. *In vitro* ortamda bitkinin vejetatif (kök, gövde, yaprak) veya generatif (tohum, anter, ovaryum) organlarını kullanarak çoğaltımı mümkündür (Kocaçalışkan, 2008) .

Bitki doku kültürünün kullanıldığı bazı uygulama alanları şu şekilde sıralanabilir:

- Bitki ıslahında yeni çeşit bitkilerin geliştirilmesi,
- Meristem kültürüyle bakteri, fungusit ve virüsten arı bitkilerin üretilmesi,
- Endemik ve nesli tehlikede olan türlerin üretilmesini ve korunmasını sağlamak,
- Gen aktarımını sağlamak,
- Kallus ve hücre süspansiyonları ile sekonder metabolit üretimi,
- Sentetik tohum üretilmesi,
- Anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü ile haploid bitki üretimi,
- *In vitro* seleksiyon, dölllenme ve germplazmanın korunması,
- Sitogenetik çalışmalar,

- Hücre, doku ve bitki beslenmesi,
- Morfogenetik çalışmaları,
- Somatik hücre melezlemesi
- Somaklonal varyasyon (Moreno ve ark., 2002; Babaoğlu ve ark., 2002; Thorpe, 2007).

Organogenez yani organ oluşumu, bitkinin hücre ya da dokularından yaprak, gövde ve kök gibi organların oluşumunu sağlayan bir olaydır. Bu süreç hücrelerin yeterince büyümesi, farklılaşması ve morfogenezis aşamalarından oluşmaktadır. Gelişim sürecinde kallus oluşumuna bağlı olarak iki fark ortaya çıkmıştır. Bu durumlar direk organogenez ve indirekt organogenez olarak adlandırılmıştır (George ve ark., 2008). Direk organogenez de eksplanttan oluşan sürgün veya kökten doğrudan bitki elde edilirken, indirekt organogenezden ise kallus oluşumundan sonra sürgün, kök ve nihayetinde bitki elde edilmiştir. Kallus, hücrelerin düzensiz bir şekilde yığılarak oluşturduğu dokulardır (Cardoza ve Stewart, 2004).

Bitki büyüme düzenleyiciler doku kültüründeki bitkinin büyüme ve gelişimini olumlu/olumsuz yönde etkileyen en önemli öğelerden biri olarak bilinmektedir. En yaygın kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri oksin, sitokinin, giberellin, absisik asit ve etilendir (Stewart, 2016). Oksinler bitkinin sürgün ve kök uçlarında doğal olarak bulunmaktadır. Bitkiden üretilen tek doğal formdaki oksin IAA (İndol Asetik Asit) 'dir. IBA (İndol Bütirik Asit), NAA (Naftalen Asetik Asit) ve 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) gibi oksinlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksinlerin tropizm hareketlerinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra tek başlarına ortamda kallus uyarımı ve sürgünlerin köklenmesi için kullanılmaktadır (Bourgaud ve ark., 2001).

Kök uçları ve çimlenmekte olan tohumlarda sentezlenen sitokininler; dokuların farklılaşmasında, kloroplast gelişiminde ve yapraklarda yaşlanmanın gecikmesinde rol oynarlar. Sitokininler bitkilerin büyümesinde en çok kullanılan düzenleyiciler arasındadır. En yaygın kullanılan sitokininler BAP (benzil amino pürin), TDZ (thidiazuron), KIN (kinetin) ve ZEA (zeatin) olarak bilinmektedir (Nordström ve ark., 2004).

Bitkilerde 100'den fazla giberellin bulunmaktadır. Bu gibberellinler, *Giberella fujikuroi* mantarından elde edilerek kullanılmaktadır. Bitki biyoteknolojisinde kullanılanları GA<sub>1</sub> ve GA<sub>3</sub>'dur (Moreno ve ark., 2002). Gibberellinlerin bitkide çiçeklenmenin düzenlenmesi, meyve oluşumunun ve büyümesinin, internodların uzaması gibi görevlerinin yani sıra dormansinin kırılmasında da etkili olduğu bilinmektedir. Bitkilerde bulunan bir diğer hormon olan absisik asit ise tohumun dormansi haline girmesinde ve stoma açıklıklarının düzenlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Etilen gaz formunda bulunan tek hormondur. Bitki ve meyve

olgunlaşmasının hızlanmasında ve hücre ölümlerinde görev almaktadır (Sezgin ve Kahya, 2018).

### 2.3 *Helichrsyum* Cinsinde *İn vitro* Araştırmalar

Stanilova ve ark. (2022) *H. arenarium* tohumlarını Bulgaristan'ının beş farklı bölgesinden 2019 yılının Temmuz ayında toplamıştır. Tohumlar sterilizasyon işleminden geçirildikten sonra, MS (Murashige&Skoog) besin ortamına ekilmiştir. Kontrol ortamına bitki büyüme düzenleyici eklenmemiştir. Diğer ortamlara ise BAP (1 mg/L), BAP (2 mg/L) +NAA (0.1 mg/L), KIN (2 mg/L) + NAA (0.1 mg/L), KIN (1 mg/L) + IBA (0.5 mg/L) ve Metatopolin (1 mg/L) + IBA (0.5 mg/L) hormon kombinasyonları eklenmiştir. Shumen bölgesinden alınan tohumlarda % 44 oranında çimlenme olduğu bildirilmiştir. Ancak, mikrobiyal kontaminasyon gözlemlenmiştir. Kontaminasyondan arındırılan fidelerin % 22'sinde doku ölümü olmuştur. Birkaç yapraklı ve iyi gelişmiş bir aylık fideler, farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda alt kültüre alınmıştır. Sitokinin türevlerinden olan KIN, sürgünlerin doğrudan organogenez oluşumuna etki etmiştir ve köklenme oluşumunu uyarmıştır. BAP kallus oluşumunu, indirekt organogenezi, yüksek su tutulumunu sağlamıştır. Meta-topolin ise doku ölümüne neden olmuştur. Hayatta kalan 73 tane bitkinin dış koşullara adaptasyonu gerçekleştirilmiştir.

Figas ve ark. (2016) bu çalışmada *H. arenarium* bitkisinden alınan yaklaşık iki yüz adet apikal tomurcuğu eksplant olarak kullanmıştır. Apikal tomurcuklar % 9'luk kalsiyum hipoklorit ( $\text{Ca}(\text{OCl}_2)$ ) ve Tween 20 içeren solüsyonda steril edilmiş ve steril saf su durulanmıştır. Steril edilen eksplantlar iki gruba ayrılmıştır; ilk grup sadece (1.0, 3.0, 4.0 ve 5.0 mg/L) KIN, ikinci grup ise KIN+IAA kombinasyonu içeren ((0.0 ve 1.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L) KIN + (0.0 ve 0.5 mg/L) IAA)) MS ortamına aktarılmıştır. 200 adet apikal tomurcuğun 158'i yenilenebilmiştir. Bu şekilde rejenere olan sürgünlerden bitki büyüme düzenleyicilerinin mikroçoğaltımı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. En iyi hormon kombinasyonu 5.0 mg/L KIN + 0.5 mg/L IAA ve sadece 5.0 mg/L KIN hormonun olduğu görülmüştür.

Clasquin ve Henry (2002) *H. arenarium* 'da yapmış oldukları mikro çoğaltım çalışmasında eksplant olarak sürgünler ve gövde kısımdaki boğumlar tercih edilmiştir. Eksplantlar akan suyun altında bekletilmiş ve 0.1 M  $\text{KMnO}_4$  solüsyonunda 30 dakika, %70'lik Etanol 'de 1 dakika, %15'lik hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) solüsyonunda 15 dakika ve %12'lik sodyum hipoklorit ( $\text{NaOCI}$ ) solüsyonunda ise 10 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, steril saf su ile durulanmıştır. Eksplantlar 2,4-D (1 mg/L) içeren MS ve Gamborg B5 besin ortamlarına aktarılmıştır. Sonuç olarak 1 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında, (1 mg/L) 2,4-

D Gamborg B5 besin ortamından daha çok kallus oluştuğu görülmüştür. Fakat besin ortamlarında sürgün gelişiminin gözlenmediği rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada *H. arenarium* yapraklarının çok tüylü olduğundan kontaminasyon sorununun aşılmasının zor olduğu da bildirilmiştir.

Perrini ve ark. (2009) *H. italicum* subsp. *microphyllum* türünde steril fide elde etmek için eksplant kaynağı olarak 4-5 mm uzunluğunda apikal tomurcuk ve koltuk altı sürgünleri kullanılmıştır. Eksplantlar % 0.1 (w/v) HgCl<sub>2</sub> solüsyonunda 15 dakika steril edilmiştir. Besin ortamı olarak; makro ve mikro elementler, (FeEDTA (30 mg/L), thiamine HCl (0.4 mg/L) ve myo-inositol (100 mg/L)) içermektedir. Kontrol grubu ve alternatif olarak 0.5 mg/L BAP, 1 mg/L BAP ve 0.5 mg/L BAP+ 0.1 mg/L IBA, 1 mg/L BAP+ 0.2 mg/L IBA ile zenginleştirilmiştir. Sukroz 20 g/l ve 30 g/l olarak iki farklı oranda kullanılmış ve üç kere alt kültür yapılmıştır. En iyi verim alınan kombinasyonun 1 mg/L BAP+ 0.2 mg/L IBA+ 20 g/l sukroz içeren ortamdır. Köklenme ortamı için kontrol ve üç farklı hormonlu (0.2 mg/L IBA, 0.2 mg/L IAA ve 0.2 mg/L NAA) ortam kullanılmıştır. En çok kök, büyüme düzenleyici içermeyen ortamda tespit edilmiştir. En iyi kök uzunluğu IBA ekli besin ortamında görülmüştür.

Aynı türde yapılan çalışmada, *H. italicum* subsp. *microphyllum*'da en iyi kallus ortamını bulmak için bir kontrol grubu ve TDZ (0.1, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L) ve NAA (1 mg/L) hormon konsantrasyonları eklenmiştir. 30 günlük gelişimleri gözlemlenip rejenere olan sürgünler ve kalluslar ayrılarak alt kültüre alınmıştır. Sürgünler hormon içermeyen ortamda %100 verimle gelişmiştir. Kallus için en iyi verim TDZ (1 ve 2 mg/L) + NAA (1 mg/L) hormon kombinasyonunda gözlenmiştir (Perrini ve ark. 2009).

Dilika ve Meyer (1998) *H. pedunculatum* türünde *in vitro* bitki üretimini ve antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. İlk aşamada kallus kültürü oluşturulmuş, ikinci aşamada ise kallusların antibakteriyel aktivitesi çalışılmıştır. Bitkinin genç yaprakları eksplant olarak kullanılmış ve % 0.35 sodyum hipoklorit içinde bekletilerek 5 kere steril saf su ile durulama işlemi yapılmıştır. Steril yaprak materyalleri 5 x 5 mm'lik parçalar halinde kesilmiştir. Kesilen yaprak parçaları 1 mg/L NAA ve 0.05 mg/L KIN içeren MS besin ortamına aktarılmıştır. Her 6 haftada bir 1 mg/L NAA ve 0.05 mg/L KIN içeren MS besin ortamına alt kültür yapılmıştır. Kalluslar 5 alt kültürden sonra, besin ortamını elimine etmek için suyla yıkanmıştır. Sonrasında Metilen klorür (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) içerisinde homojenleştirilerek sekonder metabolitler ekstrakte edilmiştir. Kallus ekstraktları ince tabaka kromatografisi (TLC) plaklarına doğrudan uygulanmıştır. Antibakteriyel çalışma için gram pozitif (*B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *M. kristinae*, *S. aureus*) ve gram negatif (*E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P.*

*aeruginosa* ve *S. marcescens*) bakteri suşları kullanılmıştır. Bakteriyel süspansiyonlarda ince tabaka kromatografi üzerine püskürtülerek birkaç dakika kurutulmuştur. Plakalar daha sonrasında 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. TLC plakları gözlemlendiğinde kallus kültürünün bitkiden daha fazla sekonder metabolit üretebileceği düşünülmüştür (Law ve Das, 1990). Gram pozitif bakterilerden çok gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Gram pozitif bakterilerden *M. kristinae* karşı diğerlerinden daha etkili olurken, gram negatif bakterilerden *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* suşlarında etkili olmuştur.

Prinsloo ve Meyer (2006) bu çalışmalarında *H. kraussii* bitkisinin genç yapraklarını ve aksiller tomurcuklarını kullanmıştır. % 1'lik sodyum hipokloritte 20-40 dakika arasında yüzey sterilizasyonu uygulayarak steril saf suyla 2 defa 5'er dakika süreyle yıkamıştır. Ardından 1 mg/L NAA ve 0.05 mg/L KIN içeren MS besin ortamına küçük parçalara bölünen yapraklar dikilmiş ve kalluslar oluşmuştur. Kallus kültürleri daha sonra hücre süspansiyon kültürü üretmek için kullanılmıştır. Süspansiyon kültüründe jasmonik asitin 3 farklı konsantrasyonuna (1.0 µM, 5.0 µM ve 10.0 µM), bir ve üç haftalık zaman aralığında maruz bırakılmıştır. Hücre süspansiyon kültürü çeşitli işlemlerden sonra TLC plakalarına püskürtmek suretiyle uygulanmıştır. Ardından *Basillus cereus* suşunu içeren bakteri süspansiyonu plakaların üzerine püskürtülmüştür. Sonuç olarak *H. kraussii* türün *Basillus cereus* bakteri türüne etki ettiği görülmüştür.

Dimitrova ve Nacheva (2018) yapmış oldukları çalışmada *H. italicum*' un bir yaşındaki bitkilerin aksiller tomurcuğunu eksplant olarak kullanmıştır. Steril edilen bitki kısımları 5 µM BAP + 0.005 µM IBA, 5 µM KIN + 0.005 µM IBA ve 5 µM ZEA + 0.005 µM IBA içeren MS besin ortamı ve ayrıca aynı hormon kombinasyonlarını içeren DKW besin ortamını kullanılmıştır. En yüksek sürgün gelişimi KIN içeren DKW besin ortamlarından elde edilmiştir. En iyi sürgün çoğaltma BAP ile desteklenmiş, MS ve DKW ortamlarında gerçekleşmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi için IBA (0.1 mg/L, 0.2 mg/L) ve NAA (0.1 mg/L, 0.2 mg/L) konsantrasyonları kullanılmıştır. Yapılan köklendirme çalışmasında NAA (0.2 mg/L) içeren ortamlarda %60-80 köklenme yüzdesi görülürken, kontrol ve IBA (0.1 mg/L, 0.2 mg/L) ortamlarında %90-100 başarılı köklendirme sonucu elde edilmiştir.

Botha ve ark. (2015) *H. umbraculigerum* için bir in vitro çoğaltma protokolünü optimize etmiştir. Yaprak kesimleri, % 70'lik etanol ve ardından 1 damla Tween-20 içeren %2'lik sodyum hipoklorit kullanılarak sterilize edilmiştir. Daha sonra distile suda yıkanmıştır. MS ortamına yapraklardan kare kesitler alınarak yerleştirilmiştir. Kontaminasyon olmayan yaprak kesimleri, farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ile takviye edilmiş MS ortamına

yerleştirilmiştir. Sürgünler, belirli bir TDZ konsantrasyonu içeren MS ortamında en verimli şekilde üretilmiştir. Bu sürgünler daha sonra ışığa taşınmış ve ardından kök üretmeye başlamıştır. Vermikülit tepsilerine yerleştirilen bitkiler nemini yüksek tutmak için plastik torbalara konmuştur. Yeşil ve canlı olan 15 bitki saksıya başarıyla alınmıştır.

Uz (2022) yapmış olduğu çalışmada *H. italicum* bitkisinin taze sürgünlerini eksplant olarak kullanmıştır. Ön sterilizasyon işlemi için eksplantlar 2-3 damla ticari çamaşır suyu ile 5 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda çevrilmiştir. Ardından 1 saat boyunca akan suyun altında bırakılmıştır. %70'lik etanol ile 10 saniye muamele edilmiştir. %15, %25, %35 çamaşır suyu konsantrasyonlarında 10 ve 20 dakika boyunca sterilizasyon yapılmıştır. Son olarak 3 defa 5'er dakika süreyle steril saf su ile yıkanmıştır. En iyi sterilizasyon yöntemi % 35'lik ticari çamaşır suyunda 10 dakika bekletilerek yapılan sterilizasyondur. Besin ortamı olarak MS ve Gamborg B5 kullanılmıştır. Fenolik salgılardan dolayı % 0.06 aktif karbon ilave edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak BAP (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L) + GA<sub>3</sub> (1.0 mg/L) + NAA (0.2 mg/L) hormon kombinasyonları kullanılmıştır. Gamborg B5 ortamında vitrifikasyon ve kararma olduğu için ilerlenememiştir. En çok sürgün oluşum yüzdesi 0.5 mg/L BAP+1.0 mg/L GA<sub>3</sub>+ 0.2 mg/L NAA içeren MS, en az sürgün yüzdesi hormon içermeyen MS ortamında meydana gelmiştir. Köklendirme için MS ve ½ MS besin ortamında IBA (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L) hormonu ilave edilmiştir. 30 günün sonunda köklenme olmuştur. En uzun kök ve en iyi kök sayısı 1.0 mg/L IBA içeren MS besin ortamında görülmüştür.

Thomaszewska-Sowa ve Figas (2014) bazı bitkilerin *in vitro* ortamda çoğaltılmasıyla ilgili yapmış oldukları bir derlemede, *H. arenarium* bitkisinin tıbbi değerinden dolayı Polonya'da koruma altında olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle mikro çoğaltma üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. En etkili sterilizasyon yöntemi %70'lik etanol solüsyonunda 1-2 saniye ve ardından Tween 20 ilave edilmiş % 9'luk Ca(ClO)<sub>2</sub> solüsyonunda 10 dakika dezenfeksiyon işlemine dayanmaktadır. Steril edilen tomurcuklar tiamin, nikotinik asit ve glisin ile zenginleştirilmiş 1 mg/dm<sup>3</sup> KIN eklenen MS ortamına yerleştirilmiştir. En yüksek sürgün sayısı (4 mg/dm<sup>3</sup>) KIN, (0.3 ve 4 mg/dm<sup>3</sup>) BAP ve (0.1 ve 4 mg / dm<sup>3</sup>) NAA ilave edilmiş MS ortamında elde edilmiştir.

Bryksa-Godzisz ve Paswelczak (2008) araştırmalarında bitki materyalini %10'luk ticari çamaşır suyu kullanarak sterilizasyon yapmıştır. LS (Linsmaier&Skoog) besin ortamına dezenfekte edilen tohumlar yerleştirilmiştir. Orijinal ortamlara göre element konsantrasyonların yarısını içeren ortamdaki elde edilen fideler MS ve MSB5 çoğaltma ortamına aktarılmıştır. 0.1 ve 1.0 mg/dm<sup>3</sup> konsantrasyonlarında kullanılan BAP ile desteklenmiş ortama aktarılmıştır. Bir

eksplanttan elde edilen sürgün sayısı 1.0 mg/dm<sup>3</sup> BAP hormonu eklenmiş MSB5 besin ortamında en yüksek olduğu gözlenmiştir.

Yurteri ve ark. (2021) *H. pallasi* türünün ZEA ve TDZ hormonlarının sürgün rejenerasyonu üzerine etkilerini incelemiştir. *İn vitro* koşullarda çimlendirilen bitkiciklerden alınan yaprak, gövde ve kök kısımları eksplant olarak kullanılmıştır. Tohumların ön sterilizasyonu % 70'lik etanolde 5 dakika bekletilerek yapılmıştır. Daha sonra 10 dakika Tween-40'da ardından 10 dakika boyunca % 20'lik ticari çamaşır suyunda bekletilmiştir. MS besin ortamına ekilen tohumlardan elde edilen sürgünler üç farklı hormon kombinasyonuna aktarılmıştır. Kontrol amaçlı MS ortamına hormon eklenmemiştir. Diğer ortamlara 1 mg/L TDZ ve 1 mg/L TDZ+0.1 mg/L ZEA hormonları rejenerasyon amaçlı kullanılmıştır. Yenilenen sürgünler 1 mg/L NAA ile desteklenmiş köklendirme ortamına yerleştirilmiştir. En yüksek kallus oluşumu 1 mg/L TDZ+0.1 mg/L ZEA hormon kombinasyonunda görülmüştür. Gövde gelişiminde en iyi ortam 1 mg/L TDZ, kök gelişiminde en iyi ortam 1 mg/L TDZ+0.1 mg/L ZEA ve yaprak gelişimde 1 mg/L TDZ+0.1 mg/L ZEA olarak belirtilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan *Helichrysum arenarium* (L) Moench subsp. *erzincanicum* Davis et Kupicha tohumları 2021 yılı Ekim ayında, Muş Alparslan Üniversitesi Uygulamalı Bilimler Fakültesine ait deneme alanlarında kültüre alınmış bitkilerden temin edilmiştir. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Elemanı Arş. Gör. Dr. Ümit Bingöl tarafından teşhis edilmiştir. Eksplant olarak kullanılan bitki kısımları (yaprak, koltukaltı meristemi ve apikal meristem) kullanılmış ve bitkilerden Mayıs 2022’de toplanmıştır.



Şekil 3.1 *Helichrysum arenarium* (L) Moench subsp. *erzincanicum* Davis et Kupicha bitkisinin bahçedeki görünümü

#### 3.2 Yöntem

##### 3.2.1 Tohum yüzey sterilizasyonu

*H. arenarium* subsp. *erzincanicum* tohumlarında altı farklı sterilizasyon metodu denenmiştir. Tohumlar suda bekletildikten sonra ağırlığı fazla olanların dibe çökme yaptığı, hafif ya da içi boş olanların ise yüzeyde kaldığı gözlemlenmiştir. Dip kısımda kalan tohumlar sterilizasyon işlemi için ayrılmıştır. Çimlendirme denemeleri 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 20 tohum olacak şekilde kurulmuştur. Farklı sterilizasyon metotları denenerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çimlendirme için farklı besin ortamlarına (MS, MSB5, LS, LSB5, SH, SHB5) ekilmiştir. Tohumlar Tween-20, NaOCl (sodyum hipoklorit (%1.5 aktif Cl<sup>-</sup> içeren, ACE)), etanol ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen Peroksit) kimyasalları Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.1 *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* tohum yüzey sterilizasyon uygulamaları

Tohum Sterilizasyon Uygulamaları	Etanol		NaOCl		Tween20 (damla)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Açıklama
	Konst. (%)	Süre (dk)	Konst. (%)	Süre (dk)		Konst. (%)	Süre (dk)	
<b>1. Metot</b>	70	1	5	15	-	-	-	İlk etanol sonra NaOCl uygulaması yapılmıştır.
<b>2. Metot</b>	70	5	20	15	3	-	-	İlk etanol sonra NaOCl (Tween20 ve 0.5 mg/L Amphotericin B eklenerek) uygulaması yapılmıştır.
<b>3. Metod</b>	70	3	-	-	-	1	10	İlk etanol sonra H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%1, 10 dk; %2, 20dk) uygulaması yapılmıştır.
	70	3	-	-	-	2	20	
<b>4. Metod</b>	70	1	20	20	2	-	-	İlk Amphotericin B de 1 gün bekletilmiştir, sonra etanol ve NaOCl uygulaması yapılmıştır.
<b>5. Metod</b>	-	-	-	-	-	-	-	Desikatör içerisinde, tohumlar ependorf tüplere yerleştirilmiştir. 100 ml NaOCl + 3 ml HCl desikatörün içerisinde karıştırılmış ve kapağı kapatılmıştır. Açığa çıkan gaz ile 3 saat sterilizasyon uygulaması yapılmıştır.
<b>6. Metod</b>	1. Grup							
5-SH (SodyumHipoklorit)	70	30	5	20	-	-	-	NaOCl uygulanan tohumlar 20 dk 25°C deki etüvde bekletilmiştir. Daha sonra etanol uygulaması yapılmıştır.
7.5-SH			7.5		-	-	-	
10-SH			10		-	-	-	
2. Grup								
5-SH+42°C	70	30	5	20	-	-	-	NaOCl uygulanan tohumlar 20 dk 25°C deki etüvde bekletilmiştir. Daha sonra etanol uygulaması yapılmıştır ve 24 saat 42°C inkübe edilmiştir.
7.5-SH+42°C			7.5		-	-	-	
10-SH+42°C			10		-	-	-	

6. metotta, iki farklı grup oluşturulmuştur. İlk grupta, NaOCl farklı konsantrasyonları (%5, %7.5 ve %10) kullanılmış ve etüvde bekletme yapılmamıştır. Diğer grupta ise, aynı çamaşır suyu konsantrasyonları kullanılmış ve etüvde bekletme çalışması yapılmıştır. 20 dakika %5, %7.5 ve %10'luk konsantrasyonlarda, inkübatörde 25°C de bekletilen tohumlar,

biyogüvenlik kabini içerisinde steril distile su ile 5 kez yıkandıktan sonra %70'lik etil alkol ile 30 saniye muamele edilmiştir. Steril distile su ile 5 kez tekrar yıkanmıştır. Etüvde boş steril kavanoz içerisinde, 42°C sıcaklıkta 24 saat bekletilerek sterilizasyon aşamaları tamamlamıştır. Çizelge 3.1'de gruplar belirtilmiştir (Battal ve ark., 2019).

### 3.2.2 Sürgün sterilizasyonu

*H. arenarium* subsp. *erzincanicum* 'un kültür ortamından alınan toprak üstü kısmı; yaprak, koltukaltı ve apikal meristem kısımlarına ayrılarak sürgün sterilizasyon uygulamaları yapılmıştır. Toprak üstü kısımlarında bitkinin çok tüylü olmasından dolayı kontaminasyon riski yüksektir. Sürgün denemeleri 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 5 eksplant olacak şekilde kurulmuştur. Farklı sterilizasyon metotları denenerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Eksplantlar musluk suyu altında 15 dk bekletilmiş ve NaOCl (%1.5 aktif Cl<sup>-</sup> içeren, ACE), Ca(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (kalsiyum hipoklorit), etanol, PPM (Plant Preservative Mixture) kimyasalları çizelge 3.2' de belirtildiği gibi uygulanmıştır.

**Çizelge 3.2** Kültür ortamından toplanan sürgünlerin çamaşır suyu ve kimyasallar ile sterilizasyon uygulaması

Sürgün Sterilizasyon Uygulamaları	Etanol		NaOCl		(Ca(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )		PPM	Tween20 (damla)	Açıklama
	Konst. (%)	Süre (dk)	Konst. (%)	Süre (dk)	Konst. (%)	Süre (dk)	Konst. (mg/L)		
1. Metot (Cengiz ve Kaçar,2019)	70	1	9	15	-	-	-	3	İlk etanol, sonra NaOCl'e Tween20 eklenerek uygulama yapılmıştır.
2. Metot (Figas,2016)	70	1	-	-	9	12	-	3	İlk etanol, sonra (Ca(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) 'e Tween20 eklenerek uygulama yapılmıştır.
3. Metot (Ayaz ve Memon,2021)	70	5	25	10	-	-	1	-	İlk etanol, sonra NaOCl'e PPM eklenerek 25°C etüvde 20 dk bekletilmiştir.
4. Metot (Uyanık,2017)	70	2	10	15	-	-	2	-	İlk etanol, sonra NaOCl'e PPM eklenerek uygulama yapılmıştır.
					-	-	3	-	
5. Metot (Erdaş,2019)	70	2	10	15	-	-	-	2	İlk etanol, sonra NaOCl'e Tween20 eklenerek uygulama yapılmıştır.
			10		-	-	-		
			15		-	-	-	2	
			15		-	-	-		
			20		-	-	-	2	
			20		-	-	-		

### 3.2.3 Besin ortamı ve kültür koşulları

Çalışma denemelerinde besin ortamı olarak, MS (Murashige ve Skoog's, 1962) mineral tuzları ve MS (Murashige ve Skoog, 1962) modifiye vitamin içeren, Gamborg B5 (Gamborg, 1968), LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) SH (Schenk ve Hildebrandt, 1972) ve Gamborg B5 vitamin mix (Gamborg, 1968) olmak üzere altı farklı besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Ayrıca besin ortamlarına %3 sukroz ve %0.6'lık agar ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında, 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Steril edilen besin ortamlarına 1 mg/L GA<sub>3</sub>, 1 mg/L BAP ve 1 mg/L Amphotericin B eklenmiştir. Tüm kültürler beyaz floresan (3000 lüks) ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24±2 °C sıcaklıkta tutulmuştur.

Bitki büyüme düzenleyicileri uygun çözücülerde çözüldükten sonra, steril saf su ile istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Büyüme düzenleyiciler, 0.22 µm'lik şırınga filtresinden geçirilmiş ve steril hale getirilerek ortamlara ilave edilmiştir. Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözünme ortamları ve saklanma koşulları Çizelge 3.5'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3** Kullanılan MS, Gamborg B5, LS, SH, Gamborg B5 vitamin mix, MS salt temel besin ortamlarının bileşenleri ve litredeki konsantrasyonları \*

	Bileşikler	MS (mg/L)	Gamborg B5 (mg/L)	LS (mg/L)	SH (mg/L)	Gamborg B5 vitamin mix (mg/L)	MS salt (mg/L)
<b>Mikro Besin Elementleri</b>	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	0.10	-	0.025
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	0.20	-	0.025
	FeNaEDTA	36.70	36.70	36.70	19.80	-	36.70
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	3.00	6.20	5.00	-	6.20
	KI	0.83	0.75	0.83	1.00	-	0.83
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.90	10.00	16.90	10.00	-	16.90
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25	0.10	-	0.25
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.60	2.00	8.60	1.00	-	8.60
	KNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	930.47
<b>Makro Besin Elementleri</b>	CaCl <sub>2</sub>	332.02	113.23	332.02	151.00	-	332.02
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	-	170.00	-	-	170.00
	KNO <sub>3</sub>	1900.00	2500.00	1900.00	2500.00	-	969.53
	MgSO <sub>4</sub>	180.54	121.56	180.54	195.05	-	180.54
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00	-	1650.00	-	-	-
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	130.44	-	-	-	-
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134.00	-	-	-	-
	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	300.00	-	-
<b>Vitaminler</b>	Myo-Inositol	100.00	100.00	100.00	1000.00	100.00	-
	Thiamin-HCl	0.10	10.00	0.40	5.0	10.00	-
	NicotinicAcid	0.50	1.00	-	0.5	1.00	-
	Pyridoxine-HCl	0.50	1.00	-	5.0	1.00	-
	Glycine	2.00	-	-	-	-	-

\*: PlantTissueCulture Media | DuchefaBiochemie (duchefa-biochemie.com)

**Çizelge 3.4** Kullanılan Büyüme Düzenleyici Maddelerin, çözücüler ve saklama koşulları\*

Büyüme Düzenleyiciler	Çözücü	Saklama sıcaklığı (°C)
Giberellik Asit (GA <sub>3</sub> )	1N NaOH	4
<b>Oksinler</b>		
IBA	1N NaOH	4
NAA		
IAA		
2,4-D	Etanol	
Picloram	DMSO	
<b>Sitokinler</b>		
BAP	1N NaOH	4
KIN		
TDZ	DMSO	

\*: [Merck | English \(sigmaaldrich.com\)](https://www.sigmaaldrich.com)

### 3.2.4 Sürgün rejenerasyonu

MSB5 besin ortamına bitki büyüme düzenleyici eklenmeden her petride 20 tohum ve 3 tekrar olacak şekilde kültüre alınmıştır. Kültüre alındıktan sonra 20 gün sonra yapılan gözlemlerde ortamlarındaki çimlenme değerlendirilmiştir. BAP ve GA<sub>3</sub> hormonlarının tohum çimlenmesine etkisi araştırılmıştır.

**Çizelge 3.5** Steril edilen tohumların çimlenme teşviki için besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları

Besin Ortamı	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	
	GA <sub>3</sub> (mg/L)	BAP (mg/L)
MSB5	1.0	-
MSB5	1.0	1.0
MSB5	1.0	2.0

Tohum çimlendirme sonucu elde edilen steril bitkicikler (21 gün sonunda) sürgün geliştirmek için hazırlanan besin ortamlarına aktarılmıştır. Besin ortamı içerisine 2 mg/L Amphotericin B ve Çizelge 3.6'de belirtilen büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir.

**Çizelge 3.6** Tohumdan büyüyen steril bitkiciklerin sürgün oluşumu için aktarıldığı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları

Besin Ortamı	Bitki Büyüme Düzenleyicileri		
	BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	NAA (mg/L)
MSB5	1.0	-	-
MSB5	2.0	-	-
MSB5	3.0	-	-
MSB5	1.0	-	0.1
MSB5	2.0	-	0.1
MSB5	3.0	-	0.1
MSB5	-	1.0	0.5
MSB5	-	2.0	0.5
MSB5	-	3.0	0.5

**Çizelge 3.7** *In vitro* ortamda yetişen ve kültür ortamından alınan toprak üstü kısımların sürgün elde etmek amacıyla kullanıldığı besin ortamları ve büyüme düzenleyici kombinasyonları

Besin Ortamı	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	
	KIN (mg/L)	IAA (mg/L)
MSB5	0	0
MSB5	1.0	0
MSB5	1.0	0.5
MSB5	3.0	0
MSB5	3.0	0.5
MSB5	4.0	0
MSB5	4.0	0.5
MSB5	5.0	0
MSB5	5.0	0.5

### 3.2.5 Kallus gelişimi

Tohum çimlendirme sonucu elde edilen steril bitkicikler 1 mg/L BAP içeren besin ortamına sürgün rejenerasyonu için transfer edilmiştir. Bu ortamda elde edilen kalluslar Çizelge 3.8’de belirtilen hormon kombinasyonlarında çoğaltılmıştır.

**Çizelge 3.8** Kallus geliştirmek için kullanılan bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları

Besin Ortamı	Bitki Büyüme Düzenleyicileri			
	TDZ(mg/L)	NAA(mg/L)	Pikloram(mg/L)	2,4-D(mg/L)
MSB5	0.5	1.0	-	-
MSB5	1.0	1.0	-	-
MSB5	2.0	1.0	-	-
MSB5	1.0	-	0.5	-
MSB5	1.0	-	1.0	-
MSB5	1.0	-	2.0	-
MSB5	-	-	-	0.5
MSB5	-	-	-	1.0
MSB5	-	-	-	2.0

### 3.2.6 Köklendirme çalışmaları

Rejenere olan sürgünlerin boyları 1-2 cm uzunluğa ulaştığında köklendirme ortamları için hormon kombinasyonları yapılmıştır (Çizelge 3.9).

**Çizelge 3.9** Köklendirme için kullanılan IAA ve IBA büyüme düzenleyici oranları

Besin Ortamı	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	
	IAA (mg/L)	IBA (mg/L)
MSB5	0.5	0.5
MSB5	1.0	1.0
MSB5	1.5	1.5

### 3.2.7 İstatistiksel Analizler

Rejenerasyon denemeleri 3 tekerrürlü olarak Tesadüf Deneme Desenine göre kurulmuş olup, her bir tekerrürde 10 eksplantın kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler “SPSS for Windows” istatistik programında tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki fark Duncan çoklu karşılaştırma testi ile kıyaslanmıştır (Snedecor ve Cochran 1967).

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1 Araştırma Bulguları

Tohum çimlenme yüzdesi, sürgün oluşum yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve köklenme oranları belirlenmiştir.

#### 4.1.1 Tohum sterilizasyon sonuçları

##### 1. Sterilizasyon metodu için çimlenme sonucu:

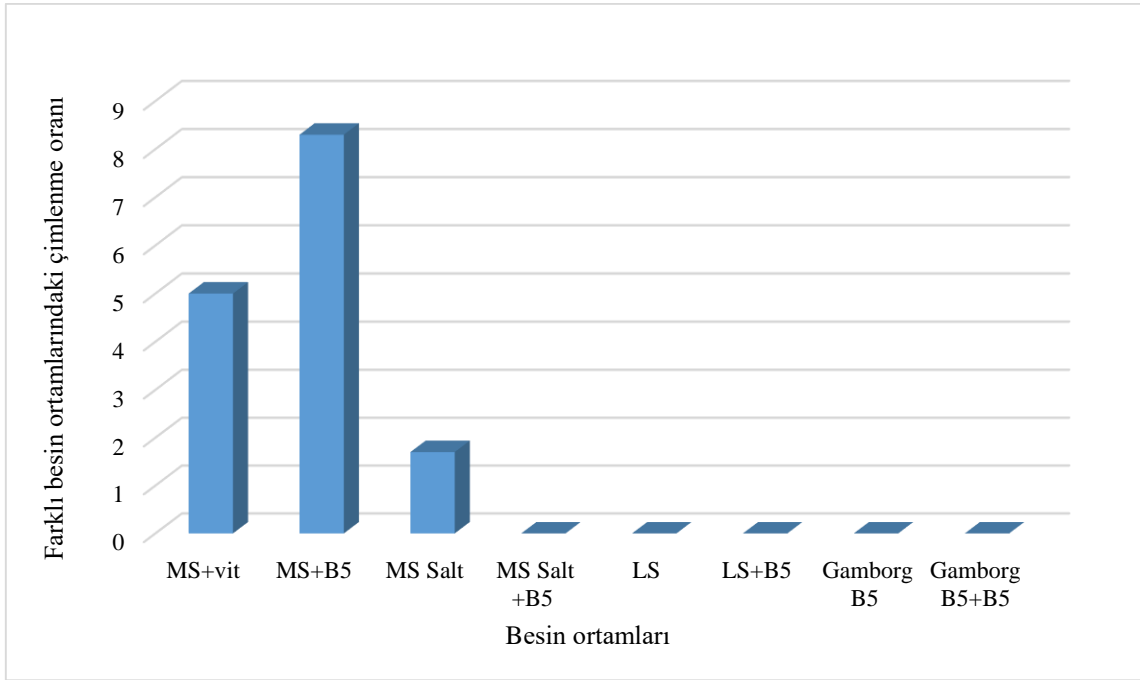
MS, MSB5, LS, LSB5, SH, SHB5 besin ortamlarından sadece MSB5 besin ortamından sonuç alınmıştır. MSB5 besin ortamında çimlenme oranının yaklaşık % 6.6 olduğu tespit edilmiştir.

2., 3., 4. ve 5. Sterilizasyon metodu için çimlendirme sonucu: İlk sterilizasyon metodunda çimlenmeye uygun ortamın MSB5 olduğu belirlenmiştir. Nitekim; ikinci tohum sterilizasyon metodunda kontaminasyon olmuş, çimlenme olmamıştır. Üçüncü metotta ise kontaminasyon olmamış fakat çimlenmede olmamıştır. Dördüncü ve beşinci sterilizasyon metodlarında da çimlenme olmamış, kontaminasyon gözlenmiştir.

##### 6. Sterilizasyon metodu için çimlendirme sonucu:

Yapılan sterilizasyon uygulamasında en iyi sonuç; 15. günün sonunda % 7.5'lük çamaşır suyu ile 24 saat 42°C'de bekletilen tohumlardan elde edilmiştir. Bu yöntemde kontaminasyon gözlenmemiştir.

Kültüre alındıktan sonra 21 gün sonra, Gamborg B5, LS, SH ve bunlara ilave edilen Gamborg B5 vitamin mix besin ortamlarında çimlenme olmadığı gözlenmiştir. En uygun sterilizasyon metodu olan % 7.5 çamaşır suyu+42°C etüvde bekletilme işlemi uygulanan tohumlarla farklı besin ortamında çimlenme oranları MS ve vitamin içeren ortamda %5, MS Salt 'da %1.7 iken MSB5'de % 8.3 olduğu görülmektedir (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* tohumlarının MS vitamin, MSB5, MS Salt, Gamborg B5, LS, SH ve Gamborg B5 vitamin mix içeren besin ortamlarında çimlenme oranları

En iyi çimlenme ortamının MSB5 olarak teyit edilmesiyle çimlenen tohum sayısını arttırmak için; 1 mg/L GA<sub>3</sub>, 1 mg/L GA<sub>3</sub>+1 mg/L BAP ve 1 mg/L GA<sub>3</sub>+ 2 mg/L BAP hormonları besin ortamına ilave edilmiştir. Çizelge 4.1 de *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* tohumlarının, MSB5 besin ortamında BAP ve GA<sub>3</sub> bitki büyüme düzenleyicilerinin çimlenmeye etkisi verilmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur. En iyi çimlenme oranı %27.22 ile 1mg/L BAP + 1 mg/L GA<sub>3</sub> içeren MSB5 besin ortamından elde edilmiştir.

**Çizelge 4.1** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* 'un MSB5 ortamında BAP ve GA<sub>3</sub> bitki büyüme düzenleyicilerinin tohum çimlenmeye etkisi

BAP ve GA <sub>3</sub> 'nın çimlenmeye etkisi (%)	Çimlenme Oranı (%)
	<i>H.arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i>
1 mg/L GA <sub>3</sub>	21.31 ± 2.1 <sup>b</sup>
<b>1 mg/L GA<sub>3</sub>+1 mg/L BAP</b>	<b>27.22 ± 2.6<sup>a</sup></b>
1 mg/L GA <sub>3</sub> +2 mg/L BAP	14.76 ± 1.2 <sup>c</sup>

Aynı sütundaki farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir. (±) standart sapma

#### 4.1.2 Kültür ortamında alınan sürgünlerin sterilizasyon sonuçları

Kültür ortamından alınan sürgünlerin sterilizasyon sonuçları; 2. ve 4. metotları dışında kontaminasyon ile karşılaşmıştır. Üçüncü ve beşinci sterilizasyon metodu kullanılarak yapılan çalışmaların sonucunda, steril fide elde edilememiştir. Bütün bitkiler kararma yaparak kaybedilmiştir.

#### 4.1.3 Sürgün rejenerasyonu sonuçları

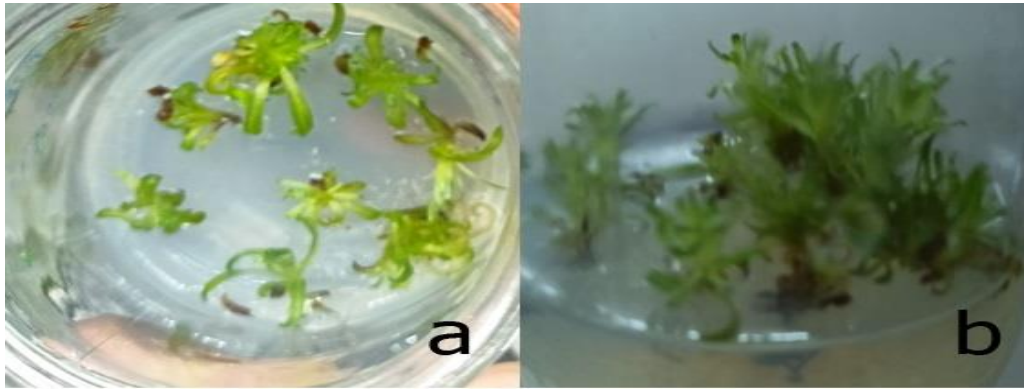
Tohumdan elde ettiğimiz steril bitkicikler 21. günün sonunda, üç farklı büyüme (0.5, 1, 2 mg/L BAP) düzenleyicisi içeren besin ortamlarına aktarılmıştır. En iyi sürgün rejenerasyonu, 1 mg/L BAP içeren MSB5 besin ortamından elde edilmiştir. Bu nedenle, sonraki uygulamalar 1 mg/L BAP+ MSB5 besin ortamı ile yapılmıştır.

Çizelge 4.2 'de *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkicikleri BAP hormonu içeren MSB5 ortamına alınmıştır. İstatistiksel uygulamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur. En iyi sürgün oluşturma % 61.2 ile 1 mg/L BAP içeren MSB5 besin ortamından elde edilmiştir.

**Çizelge 4.2** Farklı oranlarda BAP içeren MSB5 besin ortamının *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün kültür başlangıcından 8 hafta sonra sürgün oluşturma etkisi

Büyüme düzenleyicileri (mg/L)	Sürgün oluşturan eksplant oranı (%)
<b>BAP</b>	<i>H. arenarium</i> subsp. <i>erzincanicum</i>
0.5 mg/L BAP	19.8 ± 1.6 <sup>c</sup>
<b>1 mg/L BAP</b>	<b>61.2 ± 4,2<sup>a</sup></b>
2 mg/L BAP	38.03 ± 2,8 <sup>b</sup>

Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.  
(±) standart sapma



**Şekil 4.2** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün MSB5 besin ortamına 1 mg/L BAP ilave edilerek sürgün rejenerasyonu (a) bitkinin ilk aktarıldığı gün (b) bitkinin 8 hafta sonundaki hali

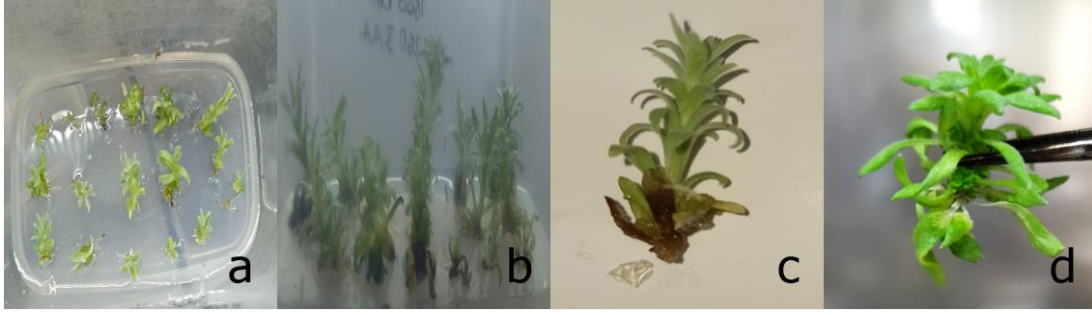
#### 4.1.4 KIN ve IAA büyüme düzenleyicilerinin sürgün rejenerasyonu sonuçları

KIN ve IAA'nın farklı hormon kombinasyonlarını içeren MSB5 ortamına, 1 mg/L BAP'dan elde edilen sürgünler aktarılmıştır. Otuzuncu günün sonunda elde edilen bitkiciklerin boylarında uzamıştır. Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkicikleri farklı konsantrasyonlarda KIN ve IAA içeren ortama aktarılmıştır. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur. En iyi sürgün gelişimi %60 ile KIN (5mg/L) + IAA (0.5 mg/L) içeren MSB5 besin ortamında gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.7'de elde edilen bitkiciklerin fotoğrafları gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkilerinin, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki KIN ve IAA bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün gelişimi üzerine etkisi

Büyüme Düzenleyici Kombinasyonları	KIN ve IAA'nın Sürgün Oluşturma Yüzdesi (%)
KIN (0)+IAA(0)	26.6 ± 1.3 <sup>c</sup>
KIN (1 mg/L)+IAA(0)	-
KIN (1 mg/L)+IAA(0.5 mg/L)	-
KIN (3 mg/L)+IAA(0)	-
KIN (3 mg/L)+IAA(0.5 mg/L)	53.3 ± 2.7 <sup>a</sup>
KIN (4 mg/L)+IAA(0)	53.3 ± 2.7 <sup>a</sup>
KIN (4 mg/L)+IAA(0.5 mg/L)	46.7 ± 2.3 <sup>b</sup>
KIN (5 mg/L)+IAA(0)	33.3 ± 1.6 <sup>c</sup>
<b>KIN (5 mg/L)+IAA(0.5 mg/L)</b>	<b>60 ± 3.1<sup>a</sup></b>

Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir. (±) standart sapma



**Şekil 4.3** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün MSB5 besin ortamına KIN (5 mg/L)+IAA(0.5 mg/L) ilave edilerek sürgün gelişimi, (a) bitkiciklerin ilk aktarıldığı gün (b), (c) ve (d) bitkiciklerin 30 gün sonraki hali

#### 4.1.5 Kallus oluşumu

*In vitro* koşullarda tohum çimlendirilerek elde edilen steril bitkicikler 1 mg/L BAP içeren besin ortamına alınmıştır. Otuz günün sonunda sürgünlerin yanında ve üzerinde oluşan kalluslar, farklı uygulamalarla alt kültüre alınmıştır. 2,4-D hormonu kullanılarak yapılan ilk uygulamada kalluslar sertleşmiş ve kararmıştır. TDZ, NAA ve Pikloram hormonlarının farklı kombinasyonları ile çalışmalar yapılmıştır.

Çizelge 4.4’de elde edilen kallusların yapısı ve rengi belirtilmiştir. Uygulamalar da en iyi hormon kombinasyonu 2 mg/L TDZ +1 mg/L NAA olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur. En iyi kallus % 80.2 ile TDZ (2mg/L) + NAA (1 mg/L)içeren MSB5 besin ortamında gözlenmiştir.

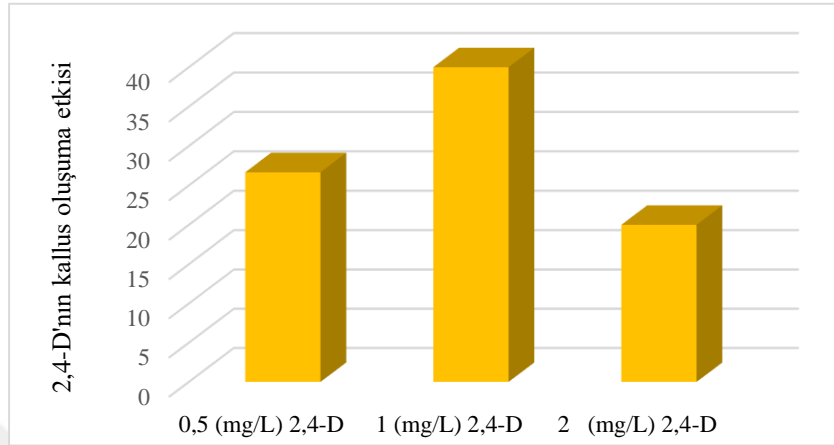
**Çizelge 4.4** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkisinin, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki 2,4\_D, TDZ, NAA ve Pikloram bitki büyüme düzenleyicilerinin kallus gelişimine etkisi

2,4-D (mg/L)		Kallus yapısı ve rengi	Kallus Oluşum Oranı (%)
0.5		Kahverengi az gelişmiş	27.1 ± 2.4 <sup>b</sup>
1		Kahverengi gelişmiş	38.7 ± 3.1 <sup>a</sup>
2		Açık Kahverengi ve az gelişmiş	17.8 ± 1.6 <sup>c</sup>
TDZ (mg/L)	Pikloram (mg/L)		
1	0.5	Kahverengi ve az gelişmiş	26.7 ± 2.8 <sup>a</sup>
1	1	Kahverengi, az gelişmiş	33.3 ± 3.1 <sup>a</sup>
1	2	Açık Kahverengi ve az gelişmiş	20.0 ± 2.4 <sup>b</sup>
TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)		
0.5	1	Kahverengi, az gelişmiş	26.7 ± 4.8 <sup>c</sup>
1	1	Yeşil ve kahverengi, az gelişmiş	60.1 ± 10.2 <sup>b</sup>
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>Yeşil, gelişmiş</b>	<b>80.2 ± 16.8<sup>a</sup></b>

Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 düzeyinde önemlidir.

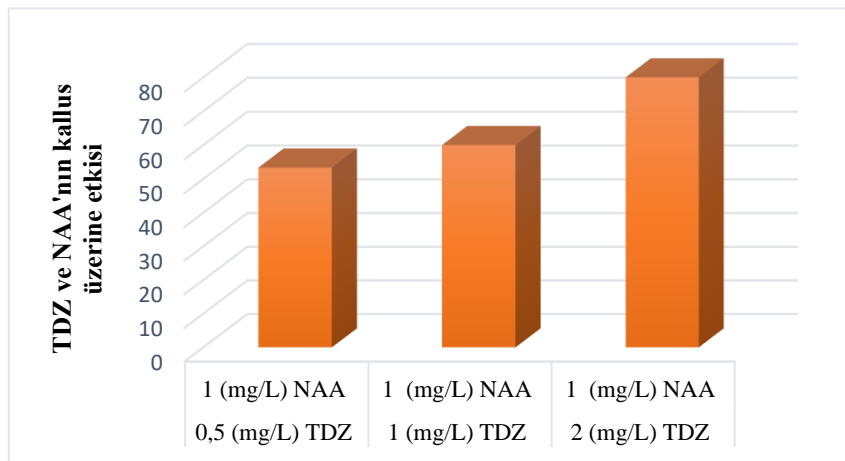
(±) standart sapma

Şekil 4.4' de *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkiciklerinin 1 mg/L BAP içeren MSB5 besin ortamında oluşan kallus kültürleri alınarak; (0.5, 1 ve 2 mg/L) 2,4-D bitki büyüme düzenleyici içeren MSB5 ortama aktarılmıştır. En iyi ortam 1 mg/L 2,4-D içeren ortam olsa da bir süre sonra bu ortamda kalluslar kararır yapmıştır.



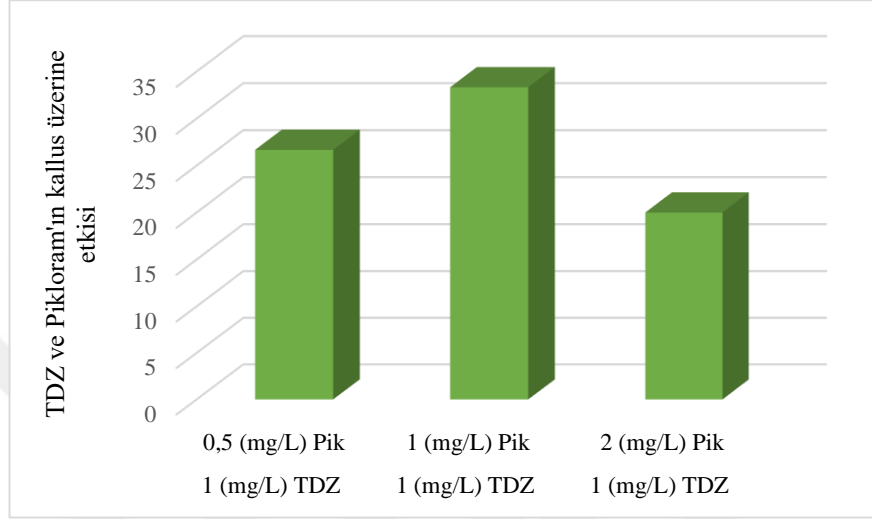
Şekil 4.4 *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün, 2,4\_D içeren MSB5 ortamının kallus gelişimi üzerine etkisi

Şekil 4.5' de *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkiciklerinin 1 mg/L BAP içeren MSB5 besin ortamında oluşan kallus kültürleri alınarak; (0.5, 1 ve 2 mg/L) TDZ+ (1 mg/L) NAA hormon kombinasyonu içeren MSB5 ortama aktarılmıştır. En iyi kallus gelişimi 1 mg/L NAA+ 2 mg/L TDZ hormon kombinasyonu içeren ortam olmuştur. Çalışmalarda kallus geliştirmek için 1 mg/L NAA+ 2 mg/L TDZ hormonları kullanılmıştır.

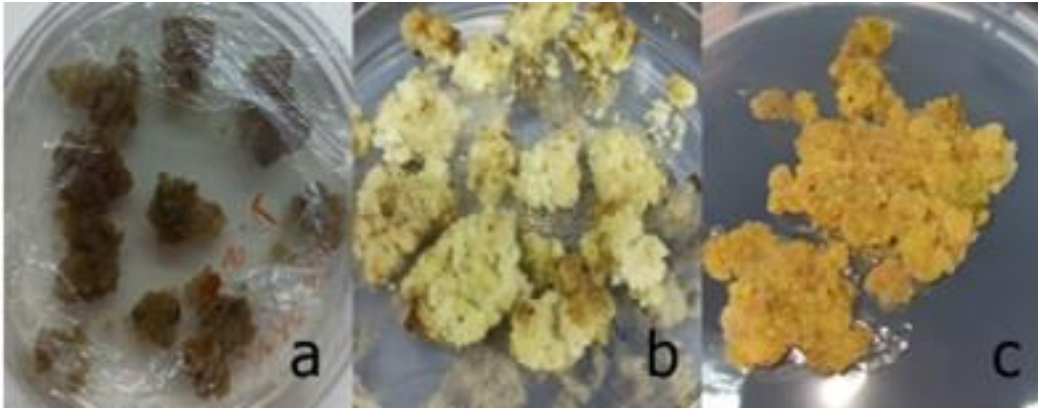


Şekil 4.5 *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün, TDZ ve NAA içeren MSB5 ortamının kallus gelişimi üzerine etkisi

Şekil 4.6' de *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkiciklerinin 1 mg/L BAP içeren MSB5 besin ortamında oluşan kallus kültürleri alınarak; 1 mg/L TDZ ve (0.5, 1 ve 2 mg/L) pikloram hormon kombinasyonu içeren MSB5 ortama aktarılmıştır. Kallus gelişimi 1 mg/L TDZ ve 1 mg/L pikloram hormon kombinasyonunda yüksek olduğu görülmüştür. Ancak kallus gelişimi sağlanamamıştır.



Şekil 4.6 *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün, TDZ ve Pikloram içeren MSB5 ortamının kallus gelişimi üzerine etkisi

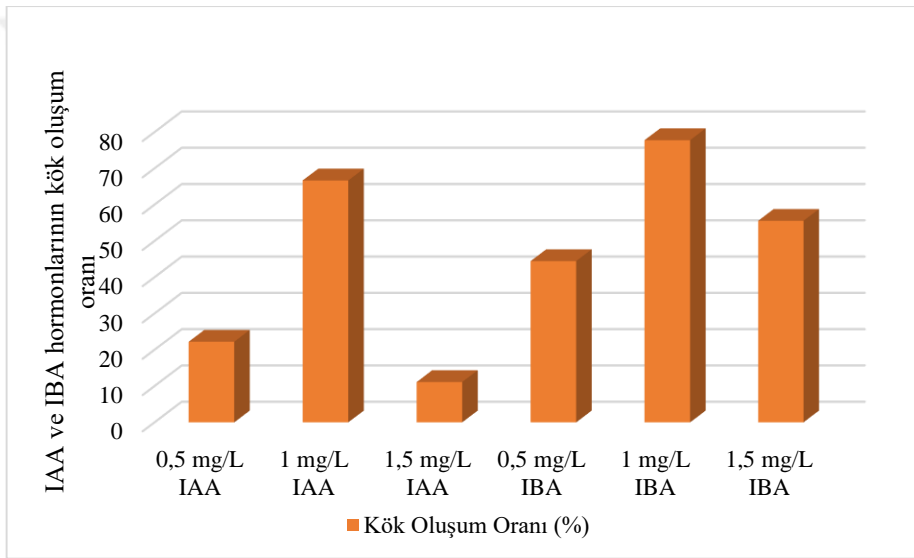


Şekil 4.7 *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkisinin, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki (a) 2,4\_D, içeren MSB5 ortamda gelişim gösteren kalluslar (b) ve (c) 2mg/L TDZ+ 1mg/L NAA içeren ortamda gelişim gösteren kalluslar

#### 4.1.6 Köklendirme ve dış koşullara alıştırma sonuçları

KIN ve IAA kullanılarak elde edilen sürgünler IBA ve IAA' nın farklı oranlarda (0.5, 1, 1.5 mg/L IAA ve 0.5, 1, 1.5 mg/L IBA) hormon içeren MSB5 besin ortamına aktarılmıştır. Otuz günün sonunda sürgünler köklenmiştir. Yapılan uygulamada kontrol grubunda kök oluşumu gözlenmemiştir. Köklenme, 1 mg/L IBA içeren besin ortamında en iyi sonucu vermiştir. Bu ortamda köklenen bitkiler aklimatizasyon için kullanılmıştır.

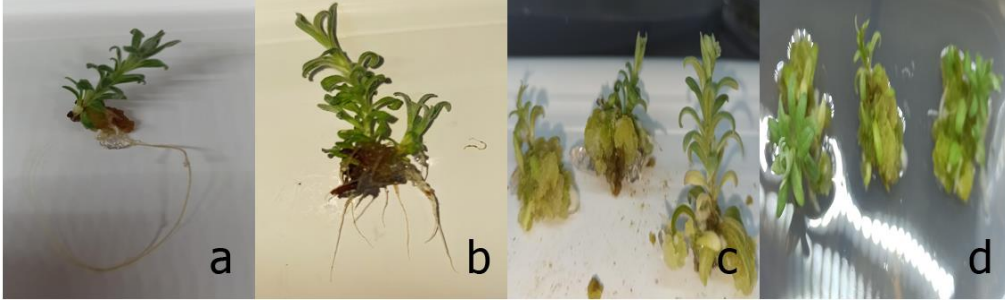
Şekil 4.8'da *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün, KIN (5 mg/L) + IAA (0.5 mg/L) MSB5 ortamından elde edilen sürgünlerin köklenme sonuçları gösterilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki IBA ve IAA bitki büyüme düzenleyicilerinde kök gelişimi incelenmiştir. Kök gelişiminin %77.8 oranla 1 mg/L IBA içeren MSB5 ortam olduğu tespit edilmiştir.



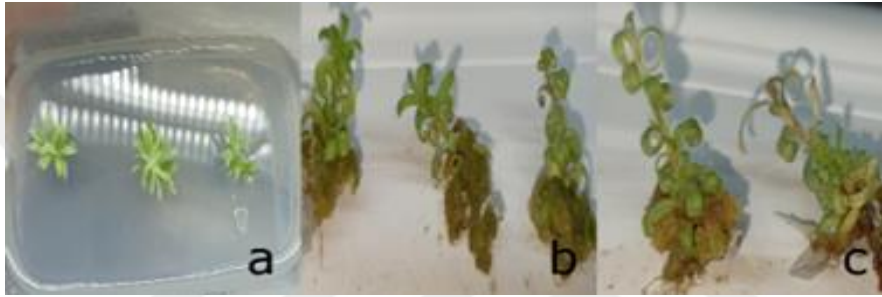
Şekil 4.8 *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkiciklerinin, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki IAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerin köklenmeye etkisi.



Şekil 4.9 *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki IBA hormonunun köklenmeye etkisi (a) köklenmeye alınan bitkicik (b) 30 gün sonra 1 mg/L IBA içeren ortamda köklenen bitkicik



**Şekil 4.10** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki IBA hormonunun köklenmeye etkisi (a) ve (b) 1 mg/L IBA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler (c) 1.5 mg/L IBA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler ve (d) 0.5 mg/L IBA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler



**Şekil 4.11** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün, MSB5 ortamına eklenen farklı konsantrasyonlardaki IAA hormonunun köklenmeye etkisi (a) köklenme ortamına alınan bitkicikler (b) 1 mg/L IAA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler (c) 1.5 mg/L IAA içeren ortamda köklenmeye alınan bitkicikler



**Şekil 4.12** *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünün, 1 mg/L IBA hormonunda köklenen bitkiciklerin perlit ve torf karışımında dış koşullara alıştıırılma aşaması (a) ve (b) bitkiciklerin hormondan ve besin ortamından arındırılarak torf ve perlit karışımına alınması (c) üzerlerine poşet geçirilerek havayla temasının engellenmesi (d) bir hafta sonunda bitkiciklerin görüntüsü

Köklenen bitkicikler steril edilen 1 litre torf ve 1 litre perlit karışımında dış koşullara alıştıırma işlemi yapılmıştır. Bitkiciklere 2 günde bir sulama yapılmış ve üzerine geçirilen poşetlere delikler açılmıştır. Fakat ilk haftanın sonunda bazı bitkiciklerin üzerinde küflenme meydana gelmiş ve bitkicikler gelişmemiştir. Diğer bitkicikler ise kararmıştır, böylece dış koşullara alıştıırma yapılan bitkicikler kaybedilmiştir.

## 4.2 Tartışma

Tez çalışmasında *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* bitkisinin tohumu kullanılarak yapılan sterilizasyon işleminde, tohumun çok küçük olması ve tüysü yapısı nedeniyle bazı zorluklarla karşılaşmıştır. Farklı oranlarda dezenfektanlar ( $H_2O_2$ , NaOCl, Tween 20) kullanılarak uygulanan sterilizasyonlarda tohumlar çimlenmemiştir. Kullandığımız sodyum hipoklorit oranları (%5, 10, 20) ile kontaminasyon oluşmuştur, aynı zamanda çimlenme meydana gelmemiştir. Yüksek konsantrasyonlarda sodyum hipoklorit gibi ajanların kullanılması, tohumların çimlenmesine engel olabileceği düşünülmektedir. Battal ve ark., 2019'da *Alcea kurdica* Alef. bitkisinde yaptıkları çalışma kaynak alınarak uygulanan sterilizasyon metodundan sonuç alınmıştır. *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* tohumlarına uygulanan %7.5 SH+42 °C muamele ile kontaminasyon aşılmıştır. Düşük oranda sodyum hipoklorit (%7.5) tohumun yapısına zarar vermezken, 42 °C sıcaklık muamelesi ile tohumun tüysü yüzeyinde var olabilecek bakteri-fungus veya sporların ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Böylece tohumların çimlenmesi sağlıklı bir besin ortamında gerçekleşmiştir.

Figas ve ark. (2016) *H. arenarium* 'da bitkinin apikal meristemlerini %9'luk Ca (OCl<sub>2</sub>) ile steril etmiş ve başarılı olmuştur. Çalışmamızda kültür ortamından toplanan yaprak, koltukaltı ve apikal meristemlere % 9'luk Ca (OCl<sub>2</sub>) ile sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Eksplantlar MSB5 ortamında inkübe edilmiştir. Kontaminasyon ve eksplantların kararması nedeniyle bu uygulamadan sonuç alınamamıştır. Çalışmamızda kullandığımız bitkinin endemik ve alttür olması, *H. arenarium* türünden farklı sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir.

Uyanık (2017) yapmış olduğu tez çalışmasında farklı oranlarda PPM kullanarak adaçayı bitkisinde sterilizasyonu uygulamasında başarılı sonuçlar almıştır. Bu çalışma kaynak alınarak, *H. arenarium* subsp. *erzincanicum* türünde bitkinin yaprak, koltukaltı ve apikal meristemleri için % 10 NaOCl+ 1 mg/L PPM ve % 10 NaOCl + 2 mg/L PPM' de sterilizasyon çalışması yapılmıştır. Ajan olarak kullanılan PPM'e bağlı olarak bitkilerde kontaminasyon olmamıştır. Fakat bu kez kararma ve doku ölümleriyle karşılaşmıştır. Bu durum toprak üstü kısımları kullanılarak yapılan sterilizasyon uygulamalarında ilerlemeyi engellemiştir. Uyanık (2017) yapmış olduğu tez çalışmasında farklı oranlarda PPM kullanarak adaçayı bitkisinde sterilizasyon uygulamasında başarılı sonuçlar almıştır. Çalışılan türlerin farklı olması, bitkilerin kullanılan ajanlara dayanıklılığını değiştirebilmektedir.

Birçok otsu bitki için mikro çoğaltım çalışmalarının uygulanabilirliği yapılan çalışmalarla görülmüştür. Bitki doku kültürlerinin başarısı genotipe, kültür koşullarına, eksplantın tipine, doğadan toplandığı döneme ve bitkinin yetiştirme koşullarına göre

değişmektedir. Doku kültüründeki rejenerasyon kapasitesi yetişkin yani bitkinin çiçek açtıktan sonraki dönemi ile genç çiçeklenmeden önceki dönem arasında fark olduğu yapılan çalışmalarla görülmüştür (Hürkan, 2021).

Besin ortamları, bir bitkinin büyümesi için gerekli makro elementleri, mikro elementleri ve vitaminleri içermektedir. Optimum büyüme için gerekli besin içeriği türe ve çeşide özgü olabildiğinden optimum besin ortamının belirlenmesi gerekmektedir. Besin ortamı kültürü başlatma, sürgün teşviği, çoğalma ve köklenme aşamalarında hayati rol oynamaktadır (Bolat ve Kara, 2017). Tez çalışmamızda mikro çoğaltım çalışmaları için MS mineral tuzları, MSB5, LS, SH gibi farklı besin ortamları kullanılmıştır. Bunlar içerisinde tohumun çimlenmesi, sürgün ve kallus gelişiminin en iyi olduğu ortam MSB5 olmuştur. Figas ve ark. (2016) yaptıkları rejenerasyon çalışmalarında MS besin ortamını kullanmış ve olumlu sonuçlar almıştır. Farklı türler veya endemik bitkiler *in vitro* ortamda temel besin tuzlarının yanı sıra, değişik vitaminlere ihtiyaç duyabilmektedir. Çalışmamızda MS temel besin ortamına ilave olarak B5 vitaminlerinin yer alması, tohum çimlendirme ve sürgün gelişimini olumlu yönde etkilemiştir.

Tohum çimlenmesi için; ışık, sıcaklık, nem gibi fiziksel faktörlerin yanı sıra, endojen büyüme faktörleri ( $GA_3$ ) de gereklidir. *Arabidopsis*'te bildirildiği gibi hücre genişlemesi ve modifikasyonunda yer alan gen ekspresyonunu uyararak, tohum örtüsünün zayıflığını tetikleyen embriyonik  $GA_3$  salınmaktadır (Gupta ve Chakrabarty, 2013). Zhang ve ark. (2005) patates bitkisinde uyguladıkları  $GA_3$  ve BAP hormonları ile sürgün boyunda ve yumrulara artışın sağlandığını bildirmiştir. İlk olarak büyüme düzenleyici içermeyen MSB5 besin ortamında tohumlarımızın çimlenme oranı % 6.6 olarak tespit edilmiştir. Tohumlarda çimlenme oranını arttırmak ve çimlenmeyi teşvik amacıyla BAP ve  $GA_3$  bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları kullanılmıştır. En iyi sonuç; % 27.22 ile 1 mg/L BAP + 1 mg/L  $GA_3$  içeren besin ortamından elde edilmiştir. Giberellik asidin tohumda var olan dormansiyi kırarak çimlenmeyi sağladığı, BAP hormonunun sürgün boyunun uzamasını sağladığı yaptığımız çalışma ile desteklenmektedir. Böylece hormonsuz besin ortamına göre, tohum çimlenme oranı 4 kat arttırılmıştır.

Sitokinin ilk olarak hücre bölünmesini destekleyen bir bitki hormonu olarak keşfedilmiştir. Sitokininler sürgün rejenerasyon sürecinde yer alan birincil bitki büyüme düzenleyicileridir. Optimum Sitokinin konsantrasyonları, hücre bölünmesini yönlendiren RNA, DNA ve Protein sentezini önemli ölçüde arttırırken aşırı konsantrasyonlar (daha yüksek veya daha düşük) bitki türü fark etmeksizin bodur sürgünler aşırı kallus üretimi veya sürgün ucu nekrozu gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır (Chauhan ve ark., 2012; Girijashankar, 2012;

Amghar ve ark., 2021). Tohum çimlenmesi, apikal gelişimi, yaprak genişlemesi, üreme gelişimi ve yaşlanmanın gecikmesi dahil olmak üzere bitki büyümesi ve gelişiminin çeşitli yönlerini etkilediği bilinmektedir (Ashikari ve ark., 2005). *In vitro* çalışmalarda bitki büyüme düzenleyicilerinin kombine olarak kullanılması başarıyı arttıran bir faktör olarak görülmüştür.

Amghar ve ark. (2021), argan bitkisinde yaptıkları organogenesis çalışmalarında, GA<sub>3</sub>'in çimlenme oranını arttırdığını, MS besin ortamında 1 mg/L BAP ve 2 mg/L GA<sub>3</sub>'in ise adventif sürgün sayısında artış meydana getirdiğini bildirmiştir. Ayrıca karanlık ortamda 2 mg/L BAP içeren MS besin ortamında adventif sürgün rejenerasyonun en yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 1 mg/L BAP içeren MSB5 ortamında % 61.2 ile sürgün rejenerasyonu en yüksek orandadır. Böylece BAP hormonun sürgün rejenerasyonunda genel olarak başarılı olduğu, yapılan çalışmalar ile desteklenmektedir.

Giovannini ve ark. (2003) *H. stoechas* ve *H. italicum* bitkilerinde mikro çoğaltım çalışmaları yapmıştır. Çalışmaları BAP ilave edilen ortamda sürgün sayıları ikiye katlamıştır. Figas ve ark. (2016) apikal meristemleri eksplant olarak kullanmış, KIN ve IAA hormon kombinasyonlarının etkisi araştırmıştır. Yapılan çalışmada MS besin ortamında KIN ve IAA hormonları, sürgün vermenin yanısıra boy uzamasını olumlu yönde etkilemiştir. Diğer yandan Dimitrova ve Nacheva (2018) *H. italicum* türünde yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında, 5 µM KIN ile desteklenmiş DKW ortamda en yüksek sürgün rejenerasyonunu sağlamıştır. Çalışmamızda en iyi sürgün gelişimi % 60 oranında 5 mg/L KIN ve 0.5mg/L IAA içeren MSB5 besin ortamından elde edilmiştir.

Kallus kültürü bitkinin farklı ve genç organ dokuları kullanılarak farklılaşmamış hücre yığınları oluşturmasıdır. Kallus kültürleri elde edildikten sonra devamlı alt kültür yapılarak çoğaltma işlemi hızlandırılmaktadır. Kallusların gelişme ortamlarına farklı bitki büyüme düzenleyiciler, değişik miktarlarda eklenerek kök yada sürgün gelişimine teşvik edilip bitkicikler elde edilmektedir (Evans ve ark., 1981). Çalışmamızda kalluslar 1 mg/L BAP ortamında oluşmuştur. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, TDZ ve Pikloram hormonlarını içeren MSB5 ortamına aktarılmıştır. Canlı, kırılğan ve yeşil kalluslar, en iyi 1 mg/L NAA ve 2 mg/L TDZ içeren MSB5 ortamında gelişim göstermiştir. *H. pallasii* türünde ise kallus üretimi için 1 mg/L TDZ kullanılarak canlı, yeşil ve yüksek oranda kallus (%81.3) elde edilmiştir (Yurteri ve ark., 2021).

Oksinler bitkilerin kök indüksiyon sürecinde önemli bir rol oynayan bitki büyüme düzenleyicileridir. *In vitro* rejenere sürgünlerin köklenme kapasitesi genotipe bağlı olarak değişmektedir. Köklenme için optimum bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonunun çeşidine

özgü olduğu bilinmektedir (Babaoğlu ve ark., 2001). Literatür incelendiğinde köklendirme için IAA, IBA ve NAA oksin hormonlarının en sık kullanılan olduğu bildirilmiştir. Sadece kök indüksiyonu değil aynı zamanda kök uzaması da oksin konsantrasyonuna son derece duyarlıdır (Koca, 2015). Ayrıca, Thomaszewska-Sowa ve Figas (2014), *Asteraceae* familyasının başka bir üyesi olan *Silphium perfoliatum* L. mikro çoğaltımı üzerine yaptıkları araştırmada, herhangi fitohormon içermeyen bir ortam kullanarak köklendirilmede bitkilerin %100 oranında kök oluşumu sağlanmıştır. Bununla birlikte, altın otu bitkisinde, oksinlerin eklenmesi kök oluşumunu olumlu yönde etkilemiştir. Tez çalışmamızda ise en ideal oksin oranının 1 mg/L IBA (%77.8) içeren MSB5 besin ortamı olduğu gözlenmiştir. Bitki türüne göre köklenme oranı hormonlu veya hormonsuz ortamlarda değişmekle birlikte, genel olarak IBA büyüme düzenleyicisinin köklenmeyi teşvik ettiği ve sürgün boyunda artış meydana getirdiği bildirilmektedir (Yurteri ve ark., 2021).

Aklimatizasyon aşamasında köklenen bitkiciklerin dış koşullara alıştırdığı bir süreçtir. Kademeli olarak ilerleyen bu süreçte daha önce *in vitro* ortamda büyüyen bitkicikler oldukça hassastır. Bu yüzden bitkilerin yakından takibi yapılması önemlidir. Tez çalışmamızda aklimatizasyon için ilk aşama olan bitkiciklerin köklendirilmesi gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada steril edilmiş 1:1 oranında torf ve perlit içerisinde aktarım yapılmıştır. Üzerleri kapatılarak nem ve sıcaklığın kontrol edildiği ortama alınmıştır. Üzerleri kapalı olan bitkicikler kademeli olarak nem miktarını düşürmek için delikler açılmıştır. İkinci haftanın sonunda bitkicikler kaybedilmiştir. Alternatif olarak torf ve perlitten başka vermikülit, kum, akadama içeren ortamlarında denenebileceği düşünülmektedir. Sawilska ve ark. (2009) *H. arenarium* türünü sera ve tarla koşullarına adapte etmede mantar mikorizalarının etkili olduğunu, Figas ve ark. (2016) MS solüsyonu ile sulamanın adaptasyonu arttırabileceğini vurgulamışlardır.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, endemik bir bitki türü olan *H. arenarium subsp erzincanicum'* un; farklı sterilizasyon metotları, farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak mikroçoğaltım çalışmaları yapılmıştır. Böylece, *Helichrysum* cinsinin diğer türleri veya alt türleri için de uygulanabilecek, temelde tohum sterilizasyonuna dayanan, farklı oksin ve sitokin türevleri ile etkili protokoller oluşturulması sağlanmıştır. Çalışmamızda, dış koşullara alıştırmaya aşamasında yaşanan problemlerin, farklı protokoller oluşturularak aşılabileceği düşünülmektedir. Çalışılan türün endemik olması, farklı iklim ve sıcaklık isteklerine sahip olması, bitkinin genotipik ve fenotipik yapısı; *in vitro* tekniklerde yapılabilecek manipülasyonlarla aklimitizasyonu tekrar çalışılabilir. Ayrıca hücre süspansiyon kültürleri ile faydalı biyoaktif bileşenlerin üretimi ve fitojenlere karşı biyolojik deneylerde kullanılmak üzere çalışmalara devam edilebileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Anonim,2018, Dokap tıbbi aromatik bitkilerin laboratuvar analizleri, <https://www.kalkinmakutuphanesi.gov.tr/dokuman/dokap-tibbi-aromatik-bitkilerin-laboratuvar-analizleri/1635> [Erişim Tarihi: 15/01/2022].
- Anonim,2020, Dokap tıbbi aromatik bitkilerin laboratuvar analizleri, <https://www.kalkinmakutuphanesi.gov.tr/dokuman/tibbi-ve-aromatik-bitkilerin-uretiminin-yayginlastirilmasi-projesi-egitim-kitabi/1638> [Erişim Tarihi:15/01/2022).
- Amghar, I., Diria, G., Boumlik, I., Gaboun, F., İraqi, D., Labhilili, M., Mentag, R., Meziani, R., Mazri, M.A., İbriz, M. 2021. An efficient regeneration pathway through adventitious organogenesis for the endangered *Argania spinosa* (L.) Skeels, *Vegetos*, 34, 355-367.
- Akin, M., Saki, N. 2019. Antimicrobial, DPPH scavenging and tyrosinase inhibitory activities of *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium* and *Rosa damascena* mill. ethanol extracts by using TLC bioautography and chemical screening methods, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 42 (7-8), 204-216.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H., Matsuoka, M. 2005. Cytokinin oxidase regulates *Rice grain* production, *Science*, 309 (5735), 741-745.
- Ayaz, E., Memon, A. 2021. Development of the aromatic medicinal plants, *Mentha x piperita* and *Mentha pulegium* through *in vitro* callus induction and micropropagation, *Turkish journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9 (1), 159-165.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M. 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, Edt. (M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi*, 1, 1-35.
- Babaoğlu, S., Yorgancıoğlu, M., Akbudak, M. 2002. Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri: bitki biyoteknolojisi-1, doku kültürü ve uygulamaları, Edt. (Babaoğlu S., Gürel E., Özcan S.). *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*,26-32.
- Bakis, Y., Babac, M. T., & Uslu, E. (2011) "Updates and improvements of Turkish plants data service (tübives)" in health informatics and bioinformatics (Hıbt), 2011 6th International Symposium On (Pp. 136-140).
- Battal, A., Görmez, G., Türker, M. 2019. Tıbbi öneme sahip hatmiler için etkili bir çimlendirme yöntemi: tohum kabuğuna çentik atılması, *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8 (3), 843-851.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansi, S., Yılmaz, G., Kızıl, O.A.S., Telci, İ. 2010. Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları, *Tmmob Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği. Teknik Kongresi*, 11, 15.
- Bolat, İ., Kara, Ö. 2017. Bitki besin elementleri: Kaynakları, işlevleri, eksik ve fazlalıkları, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 19 (1), 218-228.
- Botha, K., Crampton, B., Heyman, H. 2015. The *in vitro* propagation of *Helichrysum umbraculigerum*, *Plantamedica*, 81 (16), Pm,236.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant science*, 161 (5), 839-851.
- Bryksa-Godziszand, M., Pawełczak, A. 2010. *In vitro* propagation of the yellow everlasting *Helichrysum arenarium* (L.) Moench from root explants, *Propagation of Ornamental Plants*, 10 (1), 14-17.

- Cardoza, V., Stewart, C.N. 2004. Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40 (6), 542-551.
- Chauhan, D.K., Thakur, A., Dass, A., Lima, J., Malik, S. 2012. Direct organogenesis from leaf explants of *Garcinia indica* Choisy: An important medicinal plant, *Indian Journal of Biotechnology*, 216-219.
- Cengiz, M., Kaçar, Y.A. 2019. Bazı turunçgil anaçlarının klasik ve yeni nesil doku kültürü teknikleri ile mikroçoğaltımı. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(9): 1469-1478.
- Clasquin, S., Henry, M. 2002. Micropropagation *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Acta Botanica Gallica*, 149 (2), 189-195.
- Czinner, E., Lemberkovics, É., Bihátsi-Karsai, E., Vitányi, G., Lelik, L. 2001. Composition of the essential oil from the inflorescence of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Journal of Essential Oil Research*, 12 (6), 728-730.
- Czinner, E., Lemberkovics, É., Bihátsi-Karsai, E., Vitányi, G., Lelik, L. 2000. Composition of the essential oil from the inflorescence of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Journal of Essential oil research*, 12 (6), 728-730.
- Dilika, F., Meyer, J. 1998. Antibacterial Activity Of *Helichrysum pedunculatum* callus cultures, *South African Journal of Botany*, 64 (5), 312-313.
- Dimitrova, N.G., Nacheva, L. 2018. Micropropagation of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don—a medicinal plant with ornamental value, *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 7 (2-3), 97-101.
- Duran, B. (2021), “Türkiye’de yetiştirilen *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don kültürünün uçucu yağ analizi”, Yüksek Lisans Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Gazi Üniversitesi, Ankara, 35.
- Erdaş, N. (2019), “*Epilobium hirsutum* L. bitkisinin fitoremediasyon kapasitesinin araştırılması ve in vitro şartlarda çoğaltımı”, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya, 58-67
- Erik, S., Tarıkahya Hacıoğlu, B. 2004. Türkiye florası üzerine, *Kebikeç*, 9.
- Eroğlu, H.E. 2018. Türkiye *Helichrysum* taksonlarının Türkçe ve diğer dillerdeki isimleri, *Avrasya Terim Dergisi*, 6 (1), 26-34.
- Eroğlu, H.E., Hamzaoğlu, E., Aksoy, A., Budak, Ü., Albayrak, S. 2010. Cytogenetic effects of *Helichrysum arenarium* human lymphocytes cultures, *Turkish journal of Biology*, 34 (3), 253-256.
- Evans, D.A., Sharp, W.R., Flick, C.E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis, *Plant tissue culture: Methods and Application in agriculture/Edited By Trevor A. Thorpe*.45.
- Figas, A., Tomaszewska-Sowa, M., Sawilska, A., Keutgen, A.J. 2016. Improvement of *in vitro* propagation and acclimation of *Helichrysum arenarium* L. Moench, *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 15 (4), 17-26.
- Gamborg, O. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of *Soybean* root cultures, *Exp Cell Res*, 50, 148-151.
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. 2008. Plant propagation by tissue culture 3rd Edition, *The Netherland, The back ground springer*.

- Girijashankar, V. 2012. *In vitro* regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18 (1), 79-87.
- Göktaş, Ö., Gıdık, B. 2019. Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları, *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (1), 145-151.
- Gradinaru, A.C., Silion, M., Trifan, A., Miron, A., Aprotosoae, A.C. 2014. *Helichrysum arenarium* subsp. *arenarium*: Phenolic composition and antibacterial activity against lower respiratorytract pathogens, *Natural Product Research*, 28 (22), 2076-80.
- Gupta, R., Chakrabarty, S. 2013. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved, *Plant Signaling & Behavior*, 8 (9), e25504.
- Güner, A., Aslan, S., 2012, Türkiye Bitkileri Listesi:(Damarlı Bitkiler), *Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları*.28-36.
- Hürkan, Y.K. 2021. Bitki doku kültürü besiyerine eklenen bazı önemli organik ekstraktlar üzerine derleme, *Environmental Toxicology and Ecology*, 1 (1), 1-7.
- Karamenderes, C. (2002), “*Achillea L.* cinsinin "*Millefolium Seksiyonu*" üzerinde farmasötik botanik yönünden araştırmalar”, Doktora Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ege Üniversitesi, İzmir, 6-7.
- Koca, A.S. (2015), “Çeltikte (*Oryza sativa L.*) endosperm destekli olgun embriyo kültüründe kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna tohum iriliğinin etkisi”,Yüksek Lisans Tezi *Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara Üniversitesi, Ankara, 42-51.
- Kocaçalışkan, İ. 2002, Bitki Kültürleri (Organ, Doku ve Hücre) Ders Kitabı, *Fen Edebiyat Fakültesi*, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya, 136.
- Kramberger, K., Jenkopražnikar, Z., Barucaarbeiter, A., Petelin, A., Bandelj, D., Kenig, S. 2021. A comparative study of The antioxidative effects of *Helichrysum italicum* and *Helichrysum arenarium* Infusions, *Antioxidants*, 10 (3), 380.
- Kutluk, I., Aslan, M., Orhan, I., Özçelik, B. 2018. Antibacterial, antifungaland antiviral bioactivities of selected *Helichrysum* species, *South African Journal of Botany*, 119, 252-257.
- Law, K.H., Das, N.P. 1990. Studies on the formation and growth of *Uncaria elliptica* tissue culture, *Journal of Natural Products*, 53 (1), 125-130.
- Linsmaier, E.M., Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of *Tobacco* tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 18 (1), 100-127.
- Liu, X., Jing, X., Li, G. 2019. A processto acquire essentialoil by distillation concatenated liquid-liquid extraction and flavonoids by solid-liquid extraction simultaneously from *Helichrysum arenarium* (L.) Moench inflorescences under tonic liquid-Microwave mediated, *Separation and Purification Technology*, 209, 164-174.
- Lourens, A.C., Reddy, D., Baser, K.H., Viljoen, A.M., Van Vuuren, S.F. 2004. *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species, *Journal of Ethnopharmacology*, 95 (2-3), 253-8.
- Memon, A., Memon, F.K. 2021. *In Vitro* callus induction and shoot regeneration system of a metal accumulat or plant, *Brassica nigra L*, *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9 (11), 1993-1998.
- Moreno, L., Bello, R., Primo-Yúfera, E., Esplugues, J. 2002. Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens*, *Phyto Therapy Research*, 16 (S1), 10-13.

- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Åstot, C., Dolezal, K., Sandberg, G. 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin, cytokinin-regulated development, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 101 (21), 8039-8044.
- Pawełek, J. 2015. Water management in Poland in view of water supply and sewage disposal infrastructure development, *Infrastruktura I Ekologia Terenów Wiejskich* (2).
- Perrini, R., Morone-Fortunato, I., Lorusso, E., Avato, P. 2009. Glands, essential oil and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman, *Industrial Crops and Products*, 29 (2-3), 395-403.
- Prinsloo, G., Meyer, J. 2006. *In vitro* production of phytoalexins by *Helichrysum kraussii*, *South African Journal of Botany*, 72 (3), 482-483.
- Sawilska, A.K.; Jendryczak, E.; Welc, M.; Kieliszewska-Rokicka, B. 2009. Influence of mycorrhizal fungi on the growth and development of sandy everlasting *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Acta Agrobot.* 2009, 62, 67–76.
- Schenk, R.U., Hildebrandt, A. 1972. Medium and techniques for induction and growth of Monocotyledonous and dicotyledonous plant cell Cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50 (1), 199-204.
- Schippmann, U., Leaman, D.J., Cunningham, A. 2002. Impact of cultivation and gathering of Medicinal plants on bio diversity: Global Trends and issues, Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, *Forestry and Fisheries*.
- Sezgin, M., Kâhya, M. 2018. Phytohormones, *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology*, 8 (1), 35-39.
- Snedecor, G.W. ve Cochran, W.G. 1967. Statistical methods. 6th Edition, Ames, Iowa, The Iowa State University.
- Stanilova, M., Traykova, B., Vladimirov, V., Petrova, M., Semerdjieva, I., Yankova-Tsvetkova, E. 2022. *In Vitro* Micropropagation of *Helichrysum arenarium* (Asteraceae) as a tool for introducing the species in agriculture, *Proceedings of The Bulgarian Academy of Sciences*, 75 (10), 1454-1461.
- Stewart, C.N. 2016, *Plant biotechnology and genetics: Principles, Techniques, and Applications*, John Wiley&Sons,
- Süzgeç, S., Meriçli, A.H., Houghton, P.J., Çubukçu, B. 2005. Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity, *Fitoterapia*, 76 (2), 269-272.
- Şen, N., Kalaycı, G. 2016. Altın otu bitkisinden (*Helichrysum arenarium*) tanen ve kumarinin kimyasal kompozisyonu, *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 42 (2), 226-231.
- Tanker, N., Sezik, G. 1978. Türkiye'de yetişen *Helichrysum* türleri üzerinde farmasötik botanik yönünden araştırmalar: researches on species of *Helichrysum* growing in Turkey, *From The Point of View of Pharmaceutical Botany*.7.
- Tepe, B. 2005. *In vitro* Antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey, *Food chemistry*, 90 (4), 685-689.
- Thorpe, T.A. 2007. History of plant tissue culture, *Molecular biotechnology*, 37 (2), 169-180.

- Toksoy, D., Bayramoglu, M., Hacisalihoglu, S. 2010. Usage and the economic potential of the medicinal plants in eastern black sea region of Turkey, *Journal of Environmental Biology*, 31 (5), 623-628.
- Thomaszewska-Sowa, M., Figas, A. 2014. Environmental and ecological aspects of cultivation of selected energy and herbal plants propagated by in vitro culture, *Infrastruktura I Ekologia Terenow Wiejskich (Iv/3)*.
- Uyanık, M. (2017), “Türkiye’de tehlike altındaki bazı endemik Salvia türlerinin in vitro çoğaltımı ve tarla şartlarına adaptasyonu”,Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara Üniversitesi, Ankara,33-45.
- Uz, İ. (2022), “Ölmez otu (*Helichrysum italicum* (Roth) G. don) bitkisinin in vitro mikroçoğaltım”,Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ,19-25.
- Yurteri, E., Aksu, M., Küplemez, H., Özcan, A., Seyis, F. 2021. Effects of thidiazuran and zeatin on plant regeneration in *Helichrysum pallasii*, *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 7 (3), 533-539.
- Zeybek, U., Zeybek, N., 2002, Farmasötik botanik kapalı tohumlu bitkiler (angiospermae) sistematığı ve önemli maddeleri ders kitabı, *Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Basımevi Bornova İzmir, (3),300.
- Zhang, Z., Zhou, W., Li, H. 2005. The role of GA, IAA and BAP in the regulation of in vitro shoot growth and microtuberization in potato, *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 363-369.