



**ÖLMEZ OTU (*Helichrysum italicum* (ROTH) G. DON) BİTKİSİNİN *in vitro*  
MİKROÇOĞALTIMI**

**İBRAHİM UZ**

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda SAVALAN**

**2022**

T.C.  
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÖLMEZ OTU (*Helichrysum italicum* (ROTH) G. DON) BİTKİSİNİN *in vitro*  
MİKROÇOĞALTIMI

İBRAHİM UZ

ORCID: 0000-0002-1164-3867

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda SAVALAN

HAZİRAN-2022

Her hakkı saklıdır.

## ÖZET

### ÖLMEZ OTU (*Helichrysum italicum* (ROTH) G. DON) BİTKİSİNİN *in vitro* MİKROÇOĞALTIMI

İbrahim UZ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda SAVALAN

Güney Marmara ve Ege bölgesinde yayılış gösteren ölmez otu bitkisi (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) kurak ve yarı kurak bölgelerde yetiştirilebilmektedir. Ayrıca zengin uçucu yağ ve sekonder metabolit içeriğinden dolayı geleneksel tedavi yöntemleri dahil modern tıp ve kozmetik alanında önemli bir yere sahiptir. Bitkilerin *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyonu yoluyla çoğaltılması birçok bitki türünde başarı ile yapılmış olmasına rağmen, ölmez otunda doku kültürü üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı, ölmez otu bitkisinde doku kültürü çalışmasının optimizasyonunun yapılması ve bir sonraki *in vitro*, moleküler ve sekonder metabolit çalışmalarına zemin sağlamaktır. Bunun yanı sıra bölgede kültür tarımı için sağlıklı ve hastaliksız fide üretimi yönteminin optimize edilerek bitkiyi tanıtmaktır. Eksplantların sterilizasyon aşamasında üç farklı (%15, %25 ve %35) çamaşır suyu konsantrasyonu 10 ve 20 dk süre ile denenmiştir. En başarılı sonuç 10 dk %35 çamaşır suyu içeren ortamdan elde edilmiştir. Steril edilen eksplantlar sürgün rejenerasyonu için BAP, GA ve NAA bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ve Gamborg B5 besin ortamlarına aktarılmıştır. Eksplantlarda en iyi rejenerasyon 0,5 mg BAP, 1mg/L GA ve 0,2 NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Gamborg B5 içeren denemelerde herhangi gelişim gözlenememiş olup eksplantlarda vitrifikasyon ve kararma oluşmuştur. Dört hafta sonunda 3 cm uzunluğa ulaşan sürgünler köklendirme ortamlarına (0 MS, 0,5 mg IBA, 1 mg IBA, 1,5 mg ve 2 mg IBA içeren MS ve ½MS) alınmıştır. Hazırlanan tüm ortamlarda dört hafta içerisinde %100 köklenme görülmüştür. Mikroçoğaltım çalışmaları sonucu üç ay içerisinde köklenmiş bitkiler aklimatizasyon aşamasına alındıktan sonra seradaki saksılara ve bir ay sonra tarlaya aktarılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Helichrysum italicum*, Ölmez otu, Rejenerasyon, Aklimatizasyon, ½ MS, Gamborg B5

## ABSTRACT

### *in vitro* MICROPROPAGATION OF IMMORTELE GRASS (*Helichrysum italicum* (ROTH) G. DON)

Ibrahim UZ

Department of Agricultural Biotechnology

MSc. Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Şeyda SAVALAN

Immortelle grass (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don), which spreads in the Southern Marmara and Aegean regions, can be grown in arid and semi-arid regions. In addition, due to its rich essential oil and secondary metabolite content, it has an important place in modern medicine and cosmetics, including traditional treatment methods. Although the propagation of plants by shoot regeneration *in vitro* has been achieved in many plant species, studies on tissue culture in immortelle are quite limited. This study aims to optimize the tissue culture study in immortelle and provide a basis for the next *in vitro*, molecular, and secondary metabolite studies. In addition, it promotes the plant by optimizing the healthy and disease-free seedling production method for cultural agriculture in the region. Three different (15%, 25% and 35%) bleach concentrations were tested for 10 and 20 minutes during the sterilization phase of the explants. The most successful result was obtained in the medium containing 35% bleach for 10 minutes. Sterilized explants were transferred to MS and Gamborg B5 nutrient media containing BAP, GA, and NAA plant growth regulators for shoot regeneration. The best regeneration in explants was obtained in MS medium containing 0,5 mg BAP, 1 mg/L GA, and 0.2 NAA. No growth was observed in trials containing Gamborg B5, and vitrification and darkening occurred in the explants. After four weeks, the shoots reaching a length of 3 cm were taken into MS and ½MS medium containing 0 MS, 0,5 mg IBA, 1 mg IBA, 1,5 mg and 2 mg IBA as rooting medium. 100% rooting was observed in all prepared media within four weeks. As a result of micropropagation studies, the rooted plants were transferred to the acclimatization stage within three months and then transferred to the pots in the greenhouse and to the field one month later.

**Keywords:** *Helichrysum italicum*, Immortelle plant, Regeneration, Acclimatization, ½ MS, Gamborg B5

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
TEŞEKKÜR .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti .....	6
1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	11
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>13</b>
2.1 Materyal .....	13
2.1.1 Bitki Materyali .....	13
2.1.2 Besin Ortamı ve <i>In vitro</i> Kültür Koşulları .....	13
2.2 Yöntem.....	15
2.2.1 Eksplant Alımı ve Yüzey Sterilizasyonu .....	15
2.2.2 Eksplantların Rejenerasyon Ortamlarına Aktarılması .....	16
2.2.3 Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	17
2.2.4 Dış Koşullara Alıştırma (Aklimatizasyon) .....	18
2.2.5 İstatistiksel Değerlendirme .....	18
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>19</b>
3.1 Yüzey Sterilizasyonu Bulguları .....	19
3.2 Mikroçoğaltım Çalışması Bulguları.....	20
3.2.1 Eksplant Başına Sürgün Sayısı Ortalaması.....	21
3.2.2 Sürgün Oluşum Yüzdesi .....	22
3.2.3 Sürgün Uzunluğu Ortalaması.....	22
3.3 Köklendirme .....	23
3.4 Köklenen Sürgünlerin Dış Koşullara Aktarılması (Aklimatizasyon) .....	26
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>28</b>
4.1 Yüzey Sterilizasyonu .....	28
4.2 Mikroçoğaltım.....	29
4.3 Köklendirme .....	30

4.4 Aklimatizasyon .....	31
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>33</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>35</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ ESERLER .....</b>	<b>38</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>Helichrysum italicum</i> bitkisinin sistematığı (Buran, 2021).....	1
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan besin ortamlarının içerikleri .....	14
Çizelge 2.2. Sterilizasyon uygulamaları .....	16
Çizelge 2.3. Sürgün rejenerasyonu ortamlarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları .....	17
Çizelge 2.4. Köklendirme ortamlarında kullanılan oksin ve konsantrasyonları.....	17
Çizelge 3.1. Sterilizasyon denemesi sonuçları .....	20
Çizelge 3.2. Mikroçoğaltım çalışması sonuçları .....	23
Çizelge 3.3. Köklendirme çalışması sonuçları .....	24

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>H. italicum</i> bitkisinin genel görünümü.....	2
Şekil 1.2. <i>Helichrysum italicum</i> türünün Türkiye’de yayılımı.....	3
Şekil 1.3. <i>Helichrysum</i> cinsinin Dünya’da yayılım gösterdiği alanlar.....	3
Şekil 1.4. Ölmez otu çiçekleri ile beslenen ipek böceklerinden elde edilen ipek ile işlenmiş şal takan Sardinya adası yerlisi.....	5
Şekil 2.1. Ölmez otu’nun ZİRAATBİYOTEK koleksiyon bahçesindeki görünümü.....	13
Şekil 2.2. Otoklav ile steril edilmiş besin ortamları.....	15
Şekil 2.3. Eksplant hazırlığı ve yüzey sterilizasyonu.....	16
Şekil 2.4. Eksplantların ortamlara aktarılması.....	17
Şekil 3.1. Kontamine olan ve kararan eksplantlar.....	19
Şekil 3.2. Steril edilen eksplantların besin ortamlarına aktarımı.....	21
Şekil 3.3. Gamborg B5 besin ortamına vitrifike olan ve kararan eksplantlar.....	21
Şekil 3.4. Eksplant başına sürgün sayısı alınan eksplantların görünümü.....	22
Şekil 3.5. Kök ortamında köklenen sürgün.....	24
Şekil 3.6. Köklenme denemelerinde kök sayısı ortalaması grafiği.....	25
Şekil 3.7. Köklenme denemelerinde kök uzunluğu ortalaması grafiği.....	25
Şekil 3.8. (a) <i>In vitro</i> koşullardan steril torfa aktarılan bitkiler (b) Sprey ile yaprakların nemlendirilmesi (c) Dış koşullara kademeli alıştırma için streç filmle kapatma işlemi.....	26
Şekil 3.9. (a) Üç haftalık aklimatizasyon aşamasından sonraki bitkilerin görünümü (b) Saksılara alınan bitkiler (c) Bahçe koşullarına alınan bitki.....	27



## SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°	Derece
μ	Mikro
α	Alfa
γ	Gama



## KISALTMALAR DİZİNİ

ml	Mililitre
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
L	Litre
g	Gram
dk	Dakika
sn	Saniye
cm	Santimetre
IBA	İndol 3-Butirik Asit
BA	Benziladenin
BAP	6-Benzilaminopürin
DKW	Driver ve Kuniyuki ve McGranahan Besin Ortamı
TDZ	Thidiazuron
NAA	Naftalin Asetik Asit
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı
NN	Nitch ve Nitch
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
HCl	Hidroklorik Asit
HgCl <sub>2</sub>	Civa II Kolorür
GA <sub>3</sub>	Giberellik Asit
K. O. Y.	Kök Oluşum Yüzdesi
K. S. S.	Köklenen Sürgün Sayısı
K. S. O.	Kök Sayısı Ortalaması
K. U. O.	Kök Uzunluğu Ortalaması
E. B. S. S. O.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı Ortalaması
S.O.Y.	Sürgün Oluşum Yüzdesi
S. U. O.	Sürgün Uzunluğu Ortalaması

## TEŞEKKÜR

Araştırma konusunun seçiminden tezin tamamlanmasına kadar tüm aşamalarda desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan değerli tez danışmanı hocam Dr. Öğr. Üyesi Şeyda SAVALAN'a, çalışmalarım esnasında bana bilgi ve tecrübeleriyle destek olan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Sefer DEMİRBAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Hayat TOPÇU'ya teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimimin başında bana kazandırmış oldukları bilgi, tecrübe ve akademik kültür için değerli hocalarım Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN ve Arş. Gör. Sibel TURAN'a teşekkürlerimi sunarım. Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen ve bu yolda beni teşvik eden sayın Fatih GÜLLÜOĞLU ve Mehtap KILIÇ'a teşekkür ederim. Bana her zaman destek olan sevgili arkadaşlarım Halil İbrahim UÇAR, Okay YAZICIOĞLU, Şüheda DUMAN ve Yunus BOZKURT'a teşekkür ederim. Hayatımın her anında maddi ve manevi olarak yanımda olan, elde ettiğim her başarıda büyük pay sahibi olan sevgili ailem Ahmet UZ, Ayfer BEŞE ve Elif UZ'a teşekkürlerimi sunarım.

İbrahim UZ

Ziraat Mühendisi

## 1. GİRİŞ

İnsanlar antik çağlardan bu yana hastalıkların tedavisi için doğada ilaç aramışlardır. O dönemlerde hangi bitkinin hangi şekilde kullanılması gerektiği konusunda yeterli bilgi olmadığından dolayı deneme yanılma yoluyla birçok hastalık doğadan toplanan tıbbi ve aromatik bitkiler ile tedavi edilmiştir. Zamanla belirli tıbbi bitkilerin bazı hastalıkların tedavisinde kullanılma nedenleri keşfedilmeye başlandıkça şifalı bitkilerin kullanımını giderek ampirik çerçeveyi terk etti ve açıklayıcı gerçeklere dayandı. 16. yüzyılda iatrokimyanın ortaya çıkışına kadar bitkiler tedavi ve korunma kaynağıydı. Bununla birlikte, sentetik ilaçların azalan etkinlikleri ve kullanımlarının artan kontrendikasyonları, doğal ilaçların kullanımını yeniden gündeme getirmiştir (Petrovska, 2012).

Tıbbi aromatik bitkilerin oldukça büyük bir kısmı floradan toplanarak iç ve dış piyasaya sürülmektedir. Ancak son yıllarda bu bitkilerin kültür tarımı yaygınlaştırılmaya çalışılmaktadır. Tarım ve Orman Bakanlığı bu konuda alternatif tarım ürünleri projeleri ile çiftçilere destek sağlayarak kültür tarımının yaygınlaşmasına katkı sağlamaktadır (Taşçı, Atılabey, Yüksel, Uzunoğlu ve Oral, 2015).

Ölmez otu (*Helichrysum italicum*) *Asteraceae* familyasına ait, çalı formunda ve çok yıllık bir bitkidir (Şekil 1.1). Sarı renkli çiçekleri, tüylü yaprak ve gövdesi bulunup 90 cm kadar boylanabilmektedir. Gösterişli çiçeklerinin uzun süre görünüşünü koruduğundan dolayı halk arasında ölümsüz çiçek, solmaz çiçek ve ölmez otu olarak bilinmektedir. Ayrıca uzun süre etkisini sürdürebilen keskin bir kokuya sahiptir (Aksoy, Hamzaoğlu ve Budak, 2011).

Çizelge 1.1. *Helichrysum italicum* bitkisinin sistematigi (Buran, 2021)

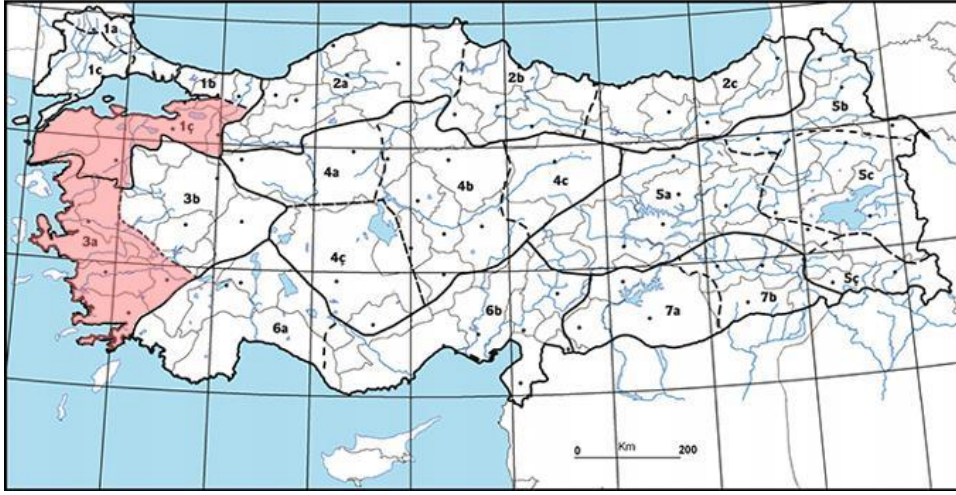
Bölüm	<i>Spermatophyta</i>
Alt bölüm	<i>Angiospermae</i>
Sınıf	<i>Dicotyledoneae</i>
Alt sınıf	<i>Asteridae</i>
Takım	<i>Asterales</i>
Familiya	<i>Asteraceae</i>
Cins	<i>Helichrysum</i>
Tür	<i>Helichrysum italicum</i>



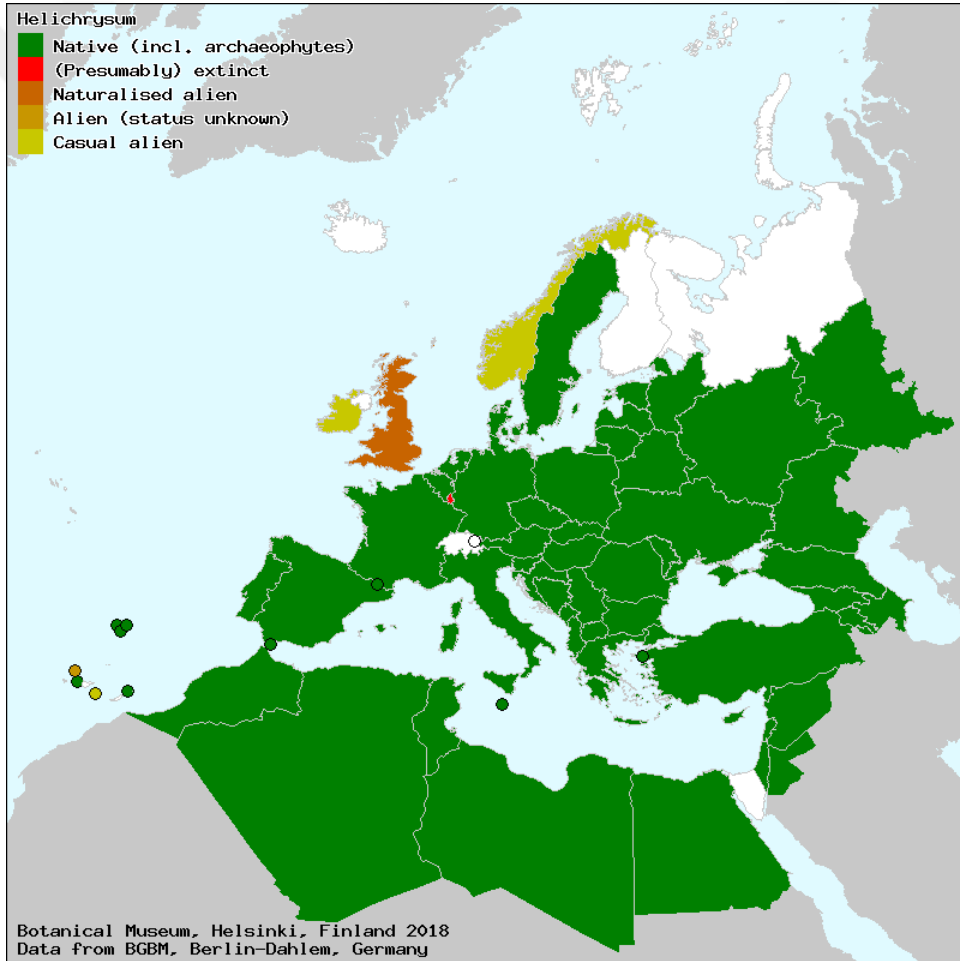
<https://antropocene.it/en/2017/05/20/helichrysum-italicum/> (Erişim Tarihi: 03.05.2022)

şekil 1.1. *H. italicum* bitkisinin genel görünümü

Bu cinsin dünya genelinde yayılım gösteren 600'den fazla türü bulunmaktadır. Anavatanı Afrika (Güney Afrika'da 244 tür) (şekil 1.3.), Madagaskar, Avustralya, Asya ve Avrasya'dır. Ayrıca; Amerika, İskandinavya, Atlantik, Avrupa, Balkanlar, Rusya, Sibirya, Kafkasya, Küçük Asya, Orta Asya, Moğolistan, in ve Türkiye'nin bozkırlarında kumlu ve yarı sert topraklarında yetişmektedir (Umaz ve Umaz, 2020). *Helichrysum italicum* türü Türkiyede Güney Marmara ve Ege bölgesinde yayılım göstermektedir (şekil 1.2.) (Güner ve Aslan., 2012).



Şekil 1.2. *Helichrysum italicum* türünün Türkiye’de yayılımı (Güner vd., 2012.)



[https://euromed.luomus.fi/euromed\\_map.php?taxon=416187&size=medium](https://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=416187&size=medium) (Erişim Tarihi: 03.05.2022)

Yeşil: Doğal yayılış, kırmızı: Nesli tükenmiş, kahverengi: Sonradan doğallaştırılmış, turuncu: Bölgeye dışardan getirilmiş, sarı: Geçici süreliğine yetiştiriciliği yapılan bölge.

Şekil 1.3. *Helichrysum* cinsinin Dünya’da yayılım gösterdiği alanlar

*Helichrysum* cinsinin adı, sırasıyla "güneş" ve "altın" anlamına gelen Yunanca "helios" ve "chryos" sözcüklerinden türetilmiştir (Perrini, Morone-Fortunato, Lorusso ve Avato, 2009a). *Helichrysum* türleri Türkiyede birçok farklı isimle bilinmektedir. Bunlardan en yaygın olanları ölmez otu ve altın otu' dur. Ayrıca; ölmez çiçek, solmaz çiçek, yayla çiçeği, sarı solmaz çiçek, arasaltın otu, Artvin ölmezi, Sivas ölmezi, Erzincan altın otu, kaya ölmezi, yayla gülü, yayla hencecalığı, böbrek altın otu, hencecalık, kadim altın otu, maranda, alaycık çiçeği, saman çiçeği, gülazar, kocamançiçeği, beyazkurna, mantuvar, savran, kalisar çiçeği, bozoğlan, kırmızı guddeme, kudama, mantı çiçeği, reşkoaltın otu ve gümüş hencecalık olarak da bilinmektedir (Demirbaş ve Ateş, 2021).

Bu cins, Türkiye florasında 15'i endemik olan ve Anadolu'da yaygın olarak bulunan 27 taksonla temsil edilmektedir (Albayrak, Aksoy, Sağdıç ve Hamzaoğlu, 2010). *Helichrysum* türleri kendisine özgü morfolojik özellikleri, çiçek yapısı ve renkleri sayesinde süs bitkisi değeri taşımaktadır. Ayrıca, bitkinin özellikle çiçek kısmından ve vejetatif aksamından elde edilen esansiyel yağlar ve diğer sekonder metabolitlerin antiinflamatuvar, antialerjik ve antimikrobiyal etkisinin olduğu bilinmektedir (Dimitrova ve Nacheva, 2018).

Homeros'un derlediği "Odesa" destanında anlatılan bir efsaneye göre Phaeacia adasında gemi kazası geçiren Ulysses, adanın kralının kızı Nausicaa ile tanışır. Nausicaa ölmez otundan elde edilen ve altın yağ olarak adlandırılan yağa atfedilen güzelliği ile bilinmektedir. Ulysses'in kazada aldığı ağır yaralarının iyileşmesi için bu yağdan hediye edilmiştir (Verma, Verma, Pandey ve Chakrabarty, 2021). O dönemlerden bu yana bilindiği üzere ölmez otu yağı kozmetik ve tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Halk arasında özellikle karaciğer, safra, mide, cilt ve böbrek rahatsızlıklarında tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Dimitrova ve Nacheva, 2018).

Ölmez otu biyokimyasal bileşenler açısından oldukça zengin bir bitkidir. Bulundurduğu biyokimyasal bileşenler ve miktarları bileşenlerin izole edildiği bitki aksamına, bitkinin bulunduğu döneme ve bitkinin yetiştirme koşullarına göre farklılık göstermektedir. Başlıca bulunan bileşenler ise  $\alpha$ -pinene, 2-methylcyclo-hexyl pentanoate, neryl acetate, 1,7-di-epi-acedrene,  $\gamma$ -curcumene ve thymoldür (Ninčević, Grdiša, Šatović ve Jug-Dujaković, 2019). Bulundurduğu bileşenler üzerine yapılan çalışmalarda özellikle  $\alpha$ -pinene bileşeninin T lösemi hücreleri, akciğer ve serviks kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstererek kanserin ilerlemesini önlediği bildirilmiştir (Staver vd., 2018).

Ölmez otu aynı zamanda doğal boyar madde olarak da kullanılmaktadır. Sardinya adası yerlilerinin yöresel halk kıyafeti üretiminde kullanmak üzere ölmez otunun çiçeklerini dut yaprakları ile karıştırarak ipek böceklerine yedirilmesi ile doğal olarak sarı renkte ipek elde ettikleri bilinmektedir (Şekil 1.4.) (Appendino vd., 2015).



Şekil 1.4. Ölmez otu çiçekleri ile beslenen ipek böceklerinden elde edilen ipek ile işlenmiş şal takan Sardinya adası yerlisi (Appendino vd., 2015)

Yetiştirme koşulları bakımından seçici olmayan ölmez otu, tarıma elverişsiz arazilerin değerlendirilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Kuraklığa karşı dayanıklılığı ise susuz arazilerde de verim alınabilmesini sağlamaktadır (Antunes vd., 2018).

*In vitro* mikroçoğaltım; bir bitki parçasının aseptik koşullarda ve kontrollü ortamlarda bitkinin totipotensi yeteneğinden faydalanarak çok fazla sayıda klonal üretime olanak sağlamaktadır. Mikroçoğaltım sonucu elde edilen bitkilerin genetik olarak aynı olması ve benzer formlarda olması mikroçoğaltımın en önemli avantajlarından. Ölmez otu çok küçük tohumlara sahip olması ve çimlenme performansının düşük olmasından dolayı çoğaltılması zor bir bitkidir. Çelikle çoğaltım yönteminde ise her bir ölmez otu fidesinden alınabilecek çeliklerin sınırlı sayıda olmasından dolayı yüksek miktardaki fide ihtiyaçlarının karşılanması oldukça zordur. Ölmez otunun *in vitro* mikroçoğaltımı bu sorunların aşılmasını sağlamaktadır. Bu



yüzden bu tezde ölmez otunun *in vitro* mikroçoğaltımının optimizasyonu yapılarak hem ticari olarak üretimine hem de daha sonra yapılacak *in vitro* çalışmalara katkı sağlanmış olacaktır.

## 1.1 Literatür Özeti

Andrade vd. (1999) *Lavandula vera*'da yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında halihazırda *in vitro*'da bulunan lavantaların sürgünlerini eksplant olarak kullanmışlardır. Sürgün geliştirme ortamlarında bitki büyüme düzenleyici olarak BA, TDZ, KIN ve 2-iP farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Gelişen sürgünlerden elde edilen verilere göre BA ve TDZ içeren ortamlar diğer ortamlara göre daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Bu iki bitki büyüme düzenleyicilerinin ise 1 mg/L konsantrasyonu en iyi sonucu vermiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi için IBA ve NAA kullanılan bu çalışmada MS'in ¼ oranda seyreltilmiş ile normal oranı da kıyaslanmıştır. Köklendirme ortamlarında en iyi sonuç ¼ MS 0,2 mg/L NAA içeren ortamda elde edilmiştir.

Clasquin ve Henry (2002) *Helichrysum arenarium*'da yapmış oldukları mikroçoğaltım çalışmasında sürgünler eksplant olarak tercih edilmiştir. Sürgünlerin yüzey sterilizasyonu aşamasında ise akan su altında bekletilmiş olan sürgünler 0,1 M KMnO<sub>4</sub> solüsyonunda 30 dk, %70'lik EtOH solüsyonunda 1 dk, %15'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda 15 dk ve %12'lik NaOCI solüsyonunda ise 10 dk süre ile manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Steril saf su ile durulanan eksplantlar 1 mg/L 2,4-D içeren MS ve Gamborg B5 besin ortamlarına aktarılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 1 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında Gamborg B5 besin ortamına göre daha çok kallus oluştuğu görülmüştür. Ancak her iki besin ortamında da sürgün gelişimi gözlemlenmemiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada ölmez otunun yapraklarının çok tüylü olduğundan dolayı kontaminasyon sorununun aşılmasının zor olduğu bildirilmiştir.

Giovanni vd. (2003) *H. italicum* ve *H. stoechas*'ta yaptıkları çalışmada sürgünlerin meristematik uçları eksplant olarak kullanılmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu için %70'lik EtOH solüsyonunda 30 sn bekletildikten sonra %1 NaClO ve iki damla Tween 20'den oluşan solüsyonda 20 dk bekletilmiştir. Ardından steril saf su ile üç defa durulama işlemi yapılarak yüzey sterilizasyonu aşaması tamamlanmıştır. Steril edilmiş eksplantlar hormonsuz MS ortamlarına aktarılarak steril kalan eksplant verileri alınmıştır. Sterilizasyonda *H. italicum*'da %88, *H. stoechas*'ta ise %69,5 başarı elde edilmiştir. Sürgün gelişimi için BAP'ın 1,33 µM ve 2,66 µM konsantrasyonları kullanılmıştır. İki türde de en iyi sürgün gelişimi 2,66

$\mu\text{M}$  BAP içeren denemelerde elde edilmiştir. Köklenme için IAA ve NAA'nın farklı konsantrasyonları kullanılmış olup denemelerin hepsinden %100 başarılı sonuç elde edilmiştir.

Perrini vd. (2009) yapmış oldukları çalışmada *in vitro* koşullarda ölmez otu yapraklarından organogenezis ile rejenerasyon sağlamışlardır. Besin ortamı olarak MS ve NN besin ortamlarını kombine ederek ve ekleme yaparak modifiye etmişlerdir. MS makro elementleri, NN mikro elementleri, FeEDTA (30 mg/L), thiamine HCL (0,4 mg/L) ve myo-inositol (100 mg/L) ile oluşturdukları besin ortamına TDZ ve NAA farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir. Yaprak eksplantları 10 mm uzunluğunda kesilip hazırlanmış olan ortamlara aktarılmıştır. Petri kaplarındaki eksplantların 30 günlük gelişimleri gözlemlenip rejenere olan sürgünler alt kültüre alınmıştır. Ardından sürgünler hormon içermeyen besi yerlerine aktarılıp köklenmesi sağlanmıştır. Yapılan bu çalışmada ölmez otu bitkisinin organojenik kapasitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Köklenme istatistiği incelendiğinde ise hormon bulunmayan ortamda %100'e yakın köklenme elde edildiği belirtilmiştir.

Morone-Fortunato vd. (2010) yapmış oldukları çalışmanın mikroçoğaltım kısmında *H. italicum*'un apikal ve aksillar tomurcukları eksplant olarak kullanılmıştır. Çalışmada *H. italicum*'un İtalya'nın farklı lokasyonlarından toplanan 20 farklı genotipi kullanılmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu %0,1 (w/v) HgCl<sub>2</sub> solüsyonu ile 15 dk çalkalandıktan sonra steril saf su ile durularak gerçekleştirilmiştir. Temel besin ortamı olarak BM kullanılan bu çalışmada sürgün gelişimi için bitki büyüme düzenleyici olarak 1 mg/L BAP + 0,2 mg/L IBA kullanılmıştır. Genotiplerin sürgün geliştirme performansına bakıldığında 16 genotipin %50'nin üzerinde sürgün gelişimi gözlemlenirken kalan 4 genotipte %33-47 arasında sürgün gelişimi gözlemlenmiştir. Köklendirme çalışmasında ise bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortam ile 0,2 mg/L IBA içeren ortamlar denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki ortamda da %50-100 arasında köklenme görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada farklı genotiplerin mikroçoğaltım aşamalarında büyük farklılıkları gösterdiği bildirilmiştir.

Petrova vd. (2015) adaçayında yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında ise eksplant olarak *in vitro*'da çimlendirdikleri tohumdan elde ettikleri sürgünler kullanılmıştır. Sürgün geliştirme ortamlarında temel besin ortamı olarak MS ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak BAP, ZT, TDZ ve 2-iP'nin IAA ile kombinasyonları kullanılmıştır. Sürgün geliştirmede en iyi sonucun elde edildiği ortam 0,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L IAA olduğu belirtilmiştir. Köklendirme ortamında  $\frac{1}{2}$  MS besin ortamına %2 sakkaroz, 20 mg/L maya ekstraktı ve 10 mg/L Askorbik asit eklenmiştir. Köklendirme ortamında bitki büyüme düzenleyicileri olarak IAA, IBA ve

NAA'nın 0,1-1 mg/L konsantrasyonları kullanılmıştır. Köklendirmede en iyi sonucun elde edildiği ortamın ise 1 mg/L IBA içeren ortam olduğu bildirilmiştir.

Figas vd. (2016) *H. arenarium*'da yapmış oldukları çalışmada eksplant olarak sürgün uçlarını kullanmışlardır. Eksplantlar ön sterilizasyon olarak bol su ile yıkanmış ve ardından %70 EtOH solüsyonunda 1 dk bekletilmiştir. Ardından %9 Ca(OCl<sub>2</sub>) ve Tween 20 içeren solüsyonda 12 dk bekletilip daha sonra steril saf su ile durularak yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Steril edilen eksplantlar kontrol olarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı ile birlikte 1, 3, 4 ve 5 mg/L KIN ve 1, 3, 4 ve 5 mg/L KIN + 0,5 IAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamlarına aktarılmıştır. En yüksek sürgün oluşumu 5mg/L KIN ile 0,5mg/L IAA içeren ortamlarda elde edilmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi 0 MS, 0,5mg/L IAA ve 0,5mg/L IBA ortamlarında denemeler kurulmuştur. Bu denemelerin sonuçlarına göre 10 haftanın sonunda en yüksek köklenme oranı, kök sayısı ve kök uzunluğu açısından en iyi ortamın 0,5mg/L IBA olduğu görülmüştür. Aklimatizasyon aşamasında bitkilerin sulanmasında normal suyun yanı sıra %25 MS içeren sulama suyu kullanılmıştır. Bir ayın sonunda normal su ile sulamada %56 başarılı sonuç elde edilirken %25 MS içeren su ile yapılan sulamada %74,67 başarılı sonuç elde edilmiştir.

El-Banna (2017) kekik bitkisinde yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında sürgün uçları ve koltuk altı tomurcukları kullanılmıştır. Eksplantlar deterjan ile yıkandıktan sonra birkaç saat akan su altında bekletilmiştir. Ardından %3 sodyum hipoklorit solüsyonunda 12-15 dk bekletilip steril saf su ile durularak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. MS temel besin ortamına %3 sakkaroz ve %0,7 agar eklenerek hazırlanan besin ortamlarına farklı oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiştir. Sürgün gelişimi için bitki büyüme düzenleyicisi olarak BA, KIN, TDZ ve 2ip 0-3mg/L olarak kullanılmıştır. Sürgün uçlarında en iyi sürgün gelişimi 1mg/L KIN içeren besin ortamına elde edilmiştir. Koltuk altı tomurcuklarında ise en iyi sürgün gelişimi 2mg/L BA içeren besin ortamında elde edilmiştir. Köklendirme aşaması için IBA, NAA ve IAA 0-1,5mg/L olarak kullanılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan ortamlarda %75 köklenme görülürken 1,5mg/L IBA, 1mg/L NAA ve 1,5mg/L NAA içeren ortamlarda %100 köklenme görülmüştür.

Dimitrova ve Nacheva (2018) yapmış oldukları çalışmada ise eksplant olarak *H. italicum*'un taze sürgünleri kullanılmıştır. Steril edilmiş sürgünler 5 µM BAP + 0,005 µM IBA, 5 µM KIN + 0,005 µM IBA ve 5 µM Zeatin + 0,005 µM IBA içeren DKW ve MS besin ortamları kullanılmıştır. En yüksek sürgün gelişimi KIN içeren DKW besin ortamlarından elde

edilmiştir. En yüksek sürgün çoğalması ise BAP içeren MS ve DKW ortamlarında gerçekleşmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi için IBA ve NAA'nın farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Yapılan çalışmada NAA içeren ortamlarda %60-80 başarılı sonuç elde edilirken kontrol ve IBA'lı ortamlarda ise %90-100 başarılı sonuç elde edilmiştir.

Kozhuharova vd. (2019) yapmış oldukları çalışmada eksplant olarak *H. italicum*'da farklı çoğaltım tekniklerinin kıyaslaması yapılmıştır. Çalışmada *in vitro* koşullarda tohum çimlendirme ve sürgün uçlarından mikroçoğaltım denemeleri yapılmıştır. Sera koşullarında ise hidroponik ortamda çelik köklendirmesi yapılmıştır. Tohum çimlendirme denemesinde tohumlara %0,1 GA uygulanarak çimlenme oranı %24,4 arttırılmıştır. Mikroçoğaltım denemesinde eksplant başına 6,4 sürgün gelişimi ile 2 mg BAP + 0,2 mg NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Hidroponik ortamda yapılan çelik köklendirme denemesinde ise %77,8 oranında başarı elde edilmiştir.

Royandazagh (2019) *Lilium candidum*'da yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında eksplant olarak soğan kullanılmıştır. Soğanların yüzey sterilizasyonu için 1-2 damla ticari deterjan ile yıkandıktan sonra 3 saat akan su altında bekletilmiştir. Ardından %70 EtOH solüsyonunda 3 sn bekletilmiştir. Daha sonra %50 ticari çamaşır suyu çözeltisinde 10 dk manyetik karıştırıcıda tutulmuştur. Durulamak için üç kere 5 dk süre ile steril saf sudan geçirilmiştir. Besin ortamları MS, %3 sakkaroz, %0,7 bitki agarı, aktif karbon ve bitki büyüme düzenleyicisi olan TDZ ve NAA'nın farklı konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Steril edilen soğanların sağlıklı ve genç pul yaprakları kabin içerisinde ayrılarak besin ortamlarına aktarılmıştır. Eksplantlar soğuk uygulaması için +4°C'de 7 gün bekletilmiştir. Ardından 24°C'de üç hafta süreyle kültüre alınmıştır. Üç haftanın sonunda eksplantların uç kısımlarında soğan oluşumları gözlemlenmiştir. Soğanların çapının artması için %5 sakkaroz içeren 0 MS ortamına aktarılmıştır. Soğan gelişiminde en iyi sonucun elde edildiği besin ortamında kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonunun 0,27 µM TDZ + 1,08 µM NAA olduğu bildirilmiştir.

Yesmin (2019) şeker otunda yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında sürgün uçları ve aksillar tomurcuklar eksplant olarak kullanılmıştır. Eksplantlar 30 dk akan su altında bekletildikten sonra deterjan ile yıkandıktan sonra saf su ile durulanmıştır. Ardından %0,2 antifungal Bavistin çözeltisinde 3 dk bekletilmiştir ve daha sonra 4-5 kez saf su ile yıkanmıştır. Steril kabine alınan eksplantlar 1 dk %70 EtOH solüsyonunda bekletildikten sonra üç kere steril saf su ile durulanmıştır. Son olarak %0,1 HgCl<sub>2</sub> çözeltisinde 2-3 dk bekletildikten sonra 5-6 kez steril saf su ile durularak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Mikroçoğaltım aşamasında

MS temel besin ortamlarına BAP ve KIN 0,5-5mg/L ile 0,2-0,5mg/L NAA eklenerek denemeler kurulmuştur. Köklendirme aşaması için ise MS ve ½MS besin ortamlarında IBA, IAA ve NAA 0,2-0,5mg/L oranlarında kullanılmıştır. En iyi sürgün gelişimi ve sürgün uzunluğu 1,5mg/L BAP ile 0,5mg/L NAA içeren ortamda aksillar tomurcuk eksplantında elde edilmiştir. Köklendirmede ise en yüksek köklenme oranı MS besin ortamında 0,2mg/L IBA içeren ortamda %93 oranı ile elde edilmiştir. Köklenen bitkiler steril edilmiş bahçe toprağı ile kompostun 1:1 oranda karıştırılması ile elde edilen karışımda üzeri kapatılmış saksılarda 2-3 haftalık aklimatizasyon işleminde geçirildikten sonra tarla koşullarına aktarılmıştır.

Taştekin (2020) yapmış olduğu tez çalışmasında sarı kantaron bitkisinin mikroçoğaltımını gerçekleştirmiştir. Eksplant olarak yaprak ve aksillar tomurcuklar kullanılmıştır. Eksplantların ön sterilizasyonu 3 damla antibakteriyel sabun damlatılan saf suda 10 dk bekletildikten sonra akan su altında 15 dk bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Ardından %70'lik EtOH solüsyonunda 1 dk bekletilmiştir. Daha sonra %35'lik çamaşır suyu solüsyonunda 3 dk manyetik karıştırıcıda bekletildikten sonra 3 kere 5 dk steril saf su ile durularak sterilizasyon işlemi başarı ile sonlandırılmıştır. Steril edilen eksplantlarda sürgün gelişimi için BAP ve NAA 0,5-2,5mg/L konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sürgün gelişiminde en iyi ortamın 0,5mg/L BAP ile 2,5mg/L NAA içeren ortam olduğu gözlemlenmiştir.

Khan vd (2021) nanede yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında sürgün uçları eksplant olarak kullanılmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu aşamasında öncelikle 10 dk akan su altında bekletilmiştir. Ardından Steril kabin içerisine alınan eksplantlar %2 Tween 80 içeren solüsyonda 10 dk çalkalanmıştır. Bu aşamadan sonra iki kere steril saf su ile durulanan bitkiler %0,1 (w/v) HgCl<sub>2</sub> solüsyonuna kısa bir süreliğine daldırılıp çıkarılmıştır. Son olarak steril saf su ile 2-3 kere durularak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. MS temel besin ortamına farklı miktarlarda BAP, NAA ve IAA eklenerek ortamlar hazırlanmıştır. Kültüre alındıktan üç hafta sonra elde edilen verilere göre en iyi sürgün gelişiminin 150µl BAP ve 20µl NAA içeren ortamda elde edilmiştir.

Petrova vd. (2021) limon otunda yaptığı çalışmada eksplant olarak *in vitro*'da çimlendirilen tohumlardan elde edilen sürgünler kullanılmıştır. Tohumların sterilizasyonu için ilk olarak deterjan ile yıkandıktan sonra 20 dk akan su altında tutulmuştur. Ardından %70 EtOH'de 2 dk bekletilmiştir. Sterilizasyonun bu aşamasından sonra iki farklı deneme kurulmuştur. Bu denemelerden birinde %50 ticari çamaşır suyu (ACE) solüsyonu ve birkaç

damla Tween 20'de 10 dk bekletilmiştir. Diğer denemede ise %0,1 HgCl<sub>2</sub> çözeltisinde 10 dk bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Ardından üç kere steril saf su ile durulanarak sterilizasyon tamamlanmıştır. Tohumların çimlendirilmesi için yapılan çalışma %2 sakkaroz ve %0,7 agar içeren MS besin ortamlarına 0, 5 ve 10mg/L GA eklenerek gerçekleştirilmiştir. Mikroçoğaltım aşamasında sürgünlerin geliştirilmesi için sitokinin olarak BAP, KIN, ZT ve 2-iP kullanılmış olup oksin grubundan olan IBA veya NAA ile kombine edilmiştir. Geliştirilen sürgünler ½MS içeren bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamlarda köklendirilmiştir. Köklenen bitkiler 2:1:1:1 oranında toprak, torf, perlit ve kum içeren saksılara aktarılıp üzerleri temiz bir kap ile kapatılarak aklimatize edilmiştir. Yapılan sterilizasyon çalışmasında HgCl<sub>2</sub> ile yapılan sterilizasyonda %100 başarı elde edilmiştir. Tohum çimlendirme denemesinde ise GA'nın çimlenmeyi olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir. Mikroçoğaltım denemesinde ise 1,5mg/L BAP ile 0,5mg/L NAA içeren ortamda en iyi sürgün gelişimi ve sürgün uzunluğu elde edilmiştir.

Hirakawa ve Tanno (2022) yılında şerbetçi otunun üç farklı çeşitinde yaptıkları çalışmada şerbetçi otunun aksillar tomurcuklarından mikroçoğaltım protokolü oluşturmuşlardır. Eksplantların sterilizasyonu aşamasında %70 EtOH'de 1 dk bekletildikten sonra ardından %1 sodyum hipoklorit solüsyonunda ise 5 dk bekletilmiştir. Ardından üç kere steril saf su ile durulanarak sterilizasyon tamamlanmıştır. Steril edilen eksplantlar %2 glikoz, %0,8 agar ½MS içeren besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyicisi olarak BA ve GA 0,1-0,5 mg/L aralığında eklenmiştir. Üç haftalık kültür süresinden sonra elde edilen mikroçoğaltım sonuçlarına göre 0,01 mg/L BA ile 0,05 mg/L GA içeren besin ortamında en iyi kardeşlenme ve sürgün uzunluğu elde edilmiştir. GA içermeyen kontrol ortamında ise sürgün uzunluğunun 0,025 mg/L ve 0,05 mg/L GA içeren ortamlara göre daha kısa olduğu gözlemlenmiştir. Gelişen sürgünlerin köklendirilmesi için %2 glikoz ve 0,05 mg/L NAA içeren ½MS besin ortamında 2 hafta içerisinde başarı ile köklendirilmiştir. Köklenen bitkiler 3:1:1 torf, vermikülit ve akadama içeren toprak karışımında kontrollü olarak sera koşullarına alınmıştır.

## 1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don; “Altın otu”, “Ölmez otu” ve “Balkaymak” olarak bilinmektedir. Türkiye'nin doğusunda yayılım göstermekle beraber gümüş yapraklı, altın renkli çiçekleri olan, olumsuz yetiştirme koşullarına karşı dayanıklılık gösteren uzun ömürlü bir bitkidir (Akaberi, Sahebkar, Azizi ve Emami, 2019). Tıbbi ve aromatik bitkilerin mikroçoğaltımı, değerli bileşenler içeren bitkilerin klonal çoğaltılmasını sağlayan alternatif ve

modern bir yöntemdir (Giovannini, Amoretti, Savona, Guardo ve Ruffoni, 2003). Sürgün rejenerasyonu yoluyla bitki çoğalması çok çeşitli bitki türlerinde elde edilmiş olmasına rağmen, *H. italicum*'da doku kültürü üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu tez ile ölmez otu bitkisinde doku kültürü çalışmasının optimizasyonunun yapılması ve bir sonraki *in vitro*, moleküler ve sekonder metabolit çalışmalarına zemin sağlamak amaçlanmaktadır. Bunun yanı sıra bölgede kültür tarımı için sağlıklı ve hastalısız fide üretimi yönteminin optimize edilerek literatüre katkı sağlanacaktır.



## 2. MATERİYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında kullanılan başlangıç bitki materyali Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Üretim Birimi (ZİRAATBİYOTEK) koleksiyon bahçesinden alınmıştır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Ölmez otu'nun ZİRAATBİYOTEK koleksiyon bahçesindeki görünümü

#### 2.1.2 Besin Ortamı ve *In vitro* Kültür Koşulları

Yapılan çalışmada besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog 1962) temel besin ortamı ve Gamborg B5 (Gamborg, Murashige, Thorpe ve Vasil, 1976) (Çizelge 2.1.) besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlarda karbon kaynağı olarak %3 sakkaroz kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlarda katılaştırıcı olarak 6,5 g/L bitki agarı (Duchefa) kullanılmıştır. Alt kültüre alınan sürgünlerin fenolik salgıladığı gözlemlendiğinden dolayı ortamlara %0,06 aktif karbon eklenmiştir. Denemelerde kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (BAP, GA, NAA ve



IBA) uygun çözücülerle çözülmüştür. Daha sonra saf su ile istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonlar hazırlanarak ortamın ihtiyaçlarına uygun miktarlarda ilave edilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan besin ortamlarının içerikleri

<b>Mikro Elementler</b>	<b>MS (mg/L)</b>	<b>Gamborg B5 (mg/L)</b>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
FeNaEDTA	36,70	36,70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20	3,00
KI	0,83	0,75
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,90	10,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	2,00
<b>Makro Elementler</b>		
CaCl <sub>2</sub>	332,02	113,23
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	-
KNO <sub>3</sub>	1900,00	2500,00
MgSO <sub>4</sub>	180,54	121,56
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	-
NH <sub>4</sub> 2SO <sub>4</sub>	-	134,00
<b>Vitaminler</b>		
Glisin	2,00	-
Myo-Inositol	100	100,00
Nikotik asit	0,50	1,00
Pyridoksine HCl	0,50	1,00
Tiamin HCl	0,10	10,00

Besin ortamlarının pH'sı, 1 N NaOH ya da HCl kullanılarak 5,6-5,8'e ayarlanmıştır. Hazırlıkları tamamlanan besin ortamları 121°C, 1,2 kg/cm<sup>2</sup> (Tekbal-STR100) basınç altında 20 dk süreyle steril edilmiştir (Şekil 2.2). Bütün kültürler 24±2°C'de ve 16 saatlik aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot ile mavi-kırmızı led ışık altında kültüre alınmıştır.



Şekil 2.2. Otoklav ile steril edilmiş besin ortamları

## 2.2 Yöntem

### 2.2.1 Eksplant Alımı ve Yüzey Sterilizasyonu

Koleksiyon bahçesinde bulunan ölmez otu fidanlarının taze sürgünleri eksplant olarak tercih edilmiştir. Haziran ayında alınan sürgünler ön sterilizasyon için 2-3 damla ticari deterjan ile 5 dk süreyle manyetik karıştırıcı üzerinde yıkandıktan sonra yaklaşık 1 saat boyunca akan çeşme suyu altında bırakılmıştır. Ön sterilizasyonu tamamlanan eksplantlar steril kabin içerisine alınarak ilk önce %70'lik etil alkol solüsyonu içinde 10 sn bekletilmiştir. Daha sonra %15, %25 ve %35 oranlarında seyreltilmiş ticari çamaşır suyu çözeltisinde manyetik karıştırıcıda 10 ve 20 dk olmak üzere iki farklı süre boyunca steril edilmiştir. Son olarak 3 defa 5'er dk süre ile otoklavlanmış distile sudan geçirilmiştir (Şekil 2.3.) (Daneshvar, 2019). Elde edilen steril eksplantlar sürgün rejenerasyonunu geliştirmek için farklı doz ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyici içeren besi ortamlarında *in vitro* kültür ortamları için hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 2.2. Sterilizasyon uygulamaları

Uygulama	Ticari Çamaşır Suyu Solüsyonu	Süre
S1	%15	10dk
S2	%25	10dk
S3	%35	10dk
S4	%15	20dk
S5	%25	20dk
S6	%35	20dk



Şekil 2.3. Eksplant hazırlığı ve yüzey sterilizasyonu

### 2.2.2 Eksplantların Rejenerasyon Ortamlarına Aktarılması

Steril edilen eksplantlar farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarına aktarılarak rejenerasyon sağlanmıştır (Şekil 2.4.). Bu aşamada katı MS besin ortamlarına ve Gamborg B5 besin ortamlarına BAP, GA ve NAA farklı kombinasyonlar ile ilave edilmiştir (Çizelge 2.3.). Besin ortamlarına ilave edilecek bitki büyüme düzenleyicilerinin dozu 0,2-2 mg/L olarak değişmektedir. Kontrol olarak her iki besin ortamının bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besin ortamları hazırlanmıştır. Çalışmalar beş tekerrürlü olarak hazırlanmış olup en iyi sürgün gelişimini sağlayan kültür ortamı belirlenmiştir.



Şekil 2.4. Eksplantların ortamlara aktarılması

Çizelge 2.3. Sürgün rejenerasyonu ortamlarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları

Uygulamalar		BAP (mg/L)	GA(mg/L)	NAA (mg/L)
(R1)	MS	0	0	0
(R2)	MS	0,5	1	0,2
(R3)	MS	1,0	1	0,2
(R4)	MS	1,5	1	0,2
(R5)	MS	2,0	1	0,2
(R6)	GAMBORG B5	0	0	0
(R7)	GAMBORG B5	0,5	1	0,2
(R8)	GAMBORG B5	1,0	1	0,2
(R9)	GAMBORG B5	1,5	1	0,2
(R10)	GAMBORG B5	2,0	1	0,2

### 2.2.3 Sürgünlerin Köklendirilmesi

Rejenerasyon için hazırlanan özel besin ortamlarında gelişen sürgünler, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1 ve 2 mg/L) IBA içeren MS ve ½ MS besin ortamına aktarılarak köklendirme çalışması yapılmıştır (Çizelge 2.4.). Köklendirme çalışmaları steril cam kavanozlarda gerçekleştirilmiştir. Her kavanoza 4-5 adet sürgün yerleştirilmiştir.

Çizelge 2.4. Köklendirme ortamlarında kullanılan oksin ve konsantrasyonları

Uygulamalar		IBA (mg/L)	Uygulamalar		IBA (mg/L)
K1	MS	0	K6	½MS	0
K2	MS	0,5	K7	½MS	0,5
K3	MS	1,0	K8	½MS	1,0
K4	MS	1,5	K9	½MS	1,5
K5	MS	2,0	K10	½MS	2,0

#### 2.2.4 Dış Koşullara Alıştırma (Aklimatizasyon)

Köklenen bitkiler temiz su ile yıkanarak besin ortamlarından arındırılmıştır. Ardından daha önceden steril edilmiş ve nemlendirilmiş torflarla doldurulan viyollere dikimi yapılmıştır. Bitkilerin ani nem kaybını önlemek amacıyla viyol uygun bir kaba alındıktan sonra üzeri streç filmle tamamen kapatılarak bitki büyüme odasına alınmıştır. Üç hafta boyunca kademeli olarak streç filmde delikler açılarak dış koşullara alışması sağlanmıştır. Üç haftanın sonunda bitkiler tarla koşullarına aktarılmıştır.

#### 2.2.5 İstatistiksel Değerlendirme

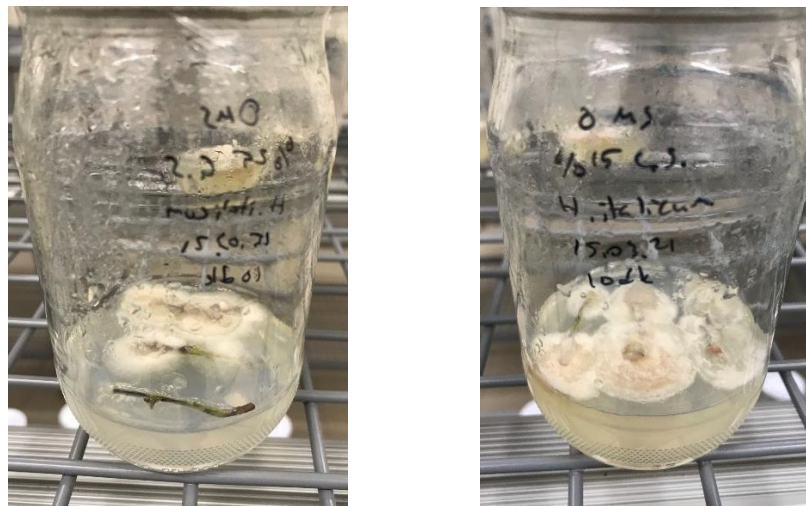
Yapılan denemeler üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Rejenerasyon çalışmalarından elde edilen verilerin istatistiki değerlendirmeleri SPSS ver. 22 istatistik programının One-Way Anova post hoc. testlerinden Duncan testi ile yapılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1967).

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Yüzey Sterilizasyonu Bulguları

Bahçe koşullarındaki bitkilerden alınan eksplantların fazla yaprakları alındıktan sonra 2-3 damla ticari deterjan ile 5 dk yıkanmıştır. Ardından 1 saat akan çeşme altında bekletilmiştir. Daha sonra %70'lik etil alkol solüsyonunda 10 sn bekletilmiştir. Eksplantlar ticari çamaşır suyunun (%5 NaClO) %15, %25 ve %35 oranlarında seyreltilmiş solüsyonlarında 10 dk ve 20 dk sürelerle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Çizelge 2.2.). Steril saf su ile üç tekerrürlü 5 dakika süreyle durulandıktan sonra sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Steril edilen eksplantlar 0 MS içeren besin ortamlarına 5 tekerrürlü ve her kavanozda 3 eksplant olacak şekilde aktarılmıştır. Yüzey sterilizasyonu bulguları 7-14 gün süre aralığında kontaminasyon durumları takip edilerek elde edilmiştir.

Çizelge 3.1'e göre elde edilen bulgular %15 ticari çamaşır suyu ile yapılan her iki denemede de %100 kontaminasyon görülmüştür (Şekil 3.1.). Bir diğer deneme olan %25 ticari çamaşır suyu içeren sterilizasyon çalışmasında 10 dk süre ile yapılan denemede %60 ve 20 dk süre ile yapılan denemede ise %40 kontaminasyon oluşmuştur. En iyi sonucun elde edildiği %35 ticari çamaşır suyu içeren denemede 10 ve 20 dk süre ile yapılan denemede %20 kontaminasyon görülmüş olmasına rağmen 20 dk bekletilen eksplantlarda kararma oranı yüksek olduğundan dolayı 10 dk ile yapılan denemenin en iyi sonuca ulaştırdığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.).



Şekil 3.1. Kontamine olan ve kararan eksplantlar

Çizelge 3.1. Sterilizasyon denemesi sonuçları

Uygulama	Kontaminasyon**	Ölü Eksplant**
S1	10,00 ±0,00a	10,00 ±0,00a
S2	6,00±1,00b	8,00±0,57ab
S3	2,00±0,57c	2,00±0,57c
S4	10,00±0,00a	10,00±0,00a
S5	4,00±0,57bc	6,00±0,57b
S6	2,00±0,57c	3,00±0,57c

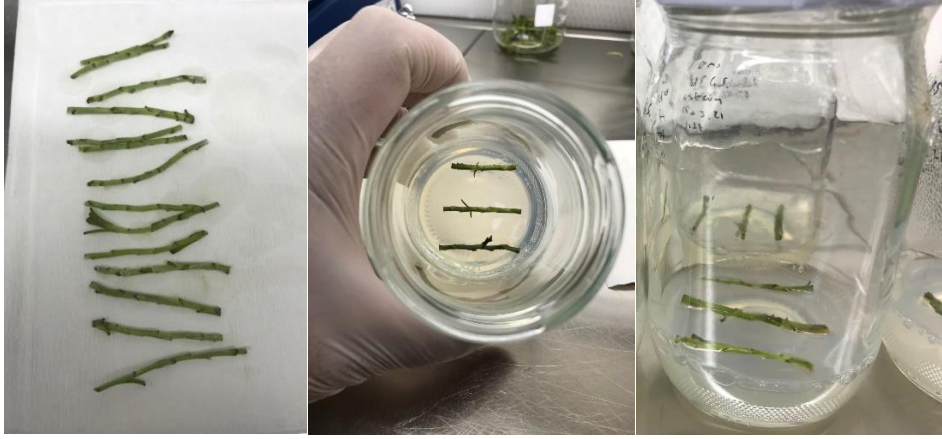
$p \leq 0,01$

*\*\*Her sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar Duncans çoklu testine göre; 0.01 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak farklıdır.*

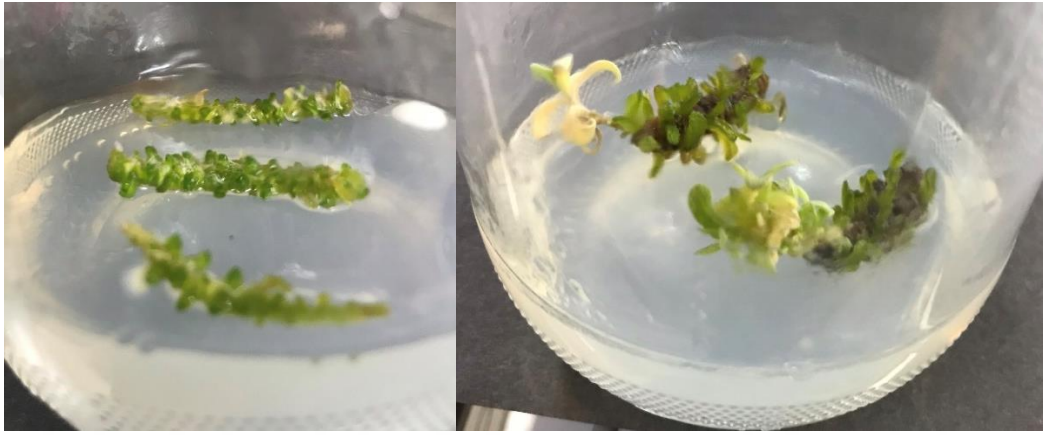
### 3.2 Mikroçoğaltım Çalışması Bulguları

Bu tezde yapılan mikroçoğaltım çalışmasında MS ve Gamborg B5 temel besin ortamları kullanılmıştır. Besin ortamlarına %3 sakkaroz ve 6,5g/L bitki agarı eklendikten sonra pH'ı 5,6-5,8'e ayarlanıp 121°C, 1,2 kg/cm<sup>2</sup> 20 dakika otoklavla sterilizasyon yapılmıştır.

Otoklavlanan besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek on farklı besin ortamı hazırlanmıştır (Çizelge 2.3.). Besin ortamlarına beş tekerrürlü kavanoz başına üç eksplant aktararak kültüre alınır (Şekil 3.2.). Kültüre alındıktan 30 gün sonra yapılan gözlemlerde Gamborg B5 temel besin ortamına alınan eksplantların tamamında vitrifikasyon gerçekleşmiştir. Deneme aynı ortamlarla tekrar kurulmuş olmasına rağmen sonucun değişmediği gözlemlenmiştir. MS temel besin ortamına alınan eksplantlarda; eksplant başına gelişen sürgünler, sürgün oluşum yüzdesi ve sürgün uzunluğu ortalaması olarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.2. Steril edilen eksplantların besin ortamlarına aktarımı

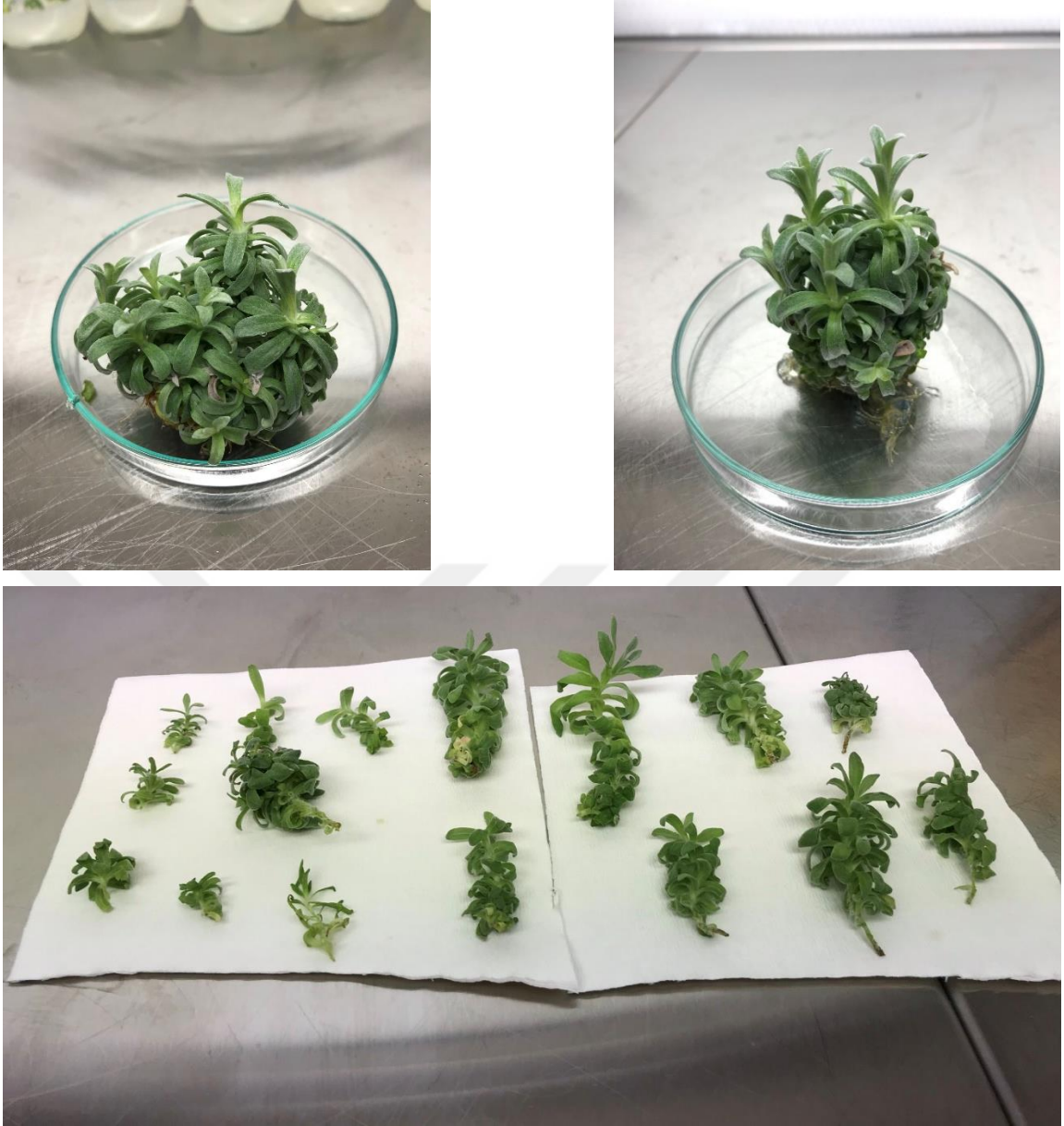


Şekil 3.3. Gamborg B5 besin ortamına vitrifike olan ve kararın eksplantlar

### 3.2.1 Eksplant Başına Sürgün Sayısı Ortalaması

Duncan testi sonuçlarına göre eksplant başına sürgün oluşum sayısı MS temel besin ortamlarında 2 ile 12,40 arasında değişmektedir (Çizelge 3.2.). Eksplant başına en az sürgün oluşumu R1 besin ortamında gözlemlenmiştir. Eksplant başına en yüksek sürgün oluşumu ise R2 besin ortamında gözlemlenmiştir. Gamborg B5 besin ortamlarında herhangi bir gelişim gözlemlenmeyip vitrifikasyon oluştuğu için sonuç elde edilememiştir (Şekil 3.3.).





Şekil 3.4. Eksplant başına sürgün sayısı alınan eksplantların görünümü

### 3.2.2 Sürgün Oluşum Yüzdesi

Sürgün oluşumu yüzdesi %19,99 ile %66,66 arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 3.2.). Sonuçlara göre en yüksek sürgün oluşum yüzdesi R2 ve R4 besin ortamlarında görülmektedir. En düşük sürgün oluşum yüzdesi ise R1 besin ortamında görülmüştür.

### 3.2.3 Sürgün Uzunluğu Ortalaması

Sürgün uzunluğu ortalaması MS temel besin ortamlarında 0,42cm ile 2,64cm arasında değişim göstermektedir (Çizelge 3.2.). En yüksek sürgün uzunluğu ortalaması R2 besin ortamında görülürken, en düşük sürgün uzunluğu ortalaması R1 besin ortamında görülmüştür.

Gamborg B5 besin ortamlarında herhangi bir gelişim gözlemlenemediğinden sürgün uzunluğu ortalaması alınamamıştır.

Çizelge 3.2. Mikroçoğaltım çalışması sonuçları

Uygulama	E. B. S. S. O.**	S. O. Y.	S. U. O.**
R1	2,00±0,44c	19,99 ±2,4b	0,42±0,37c
R2	12,40±1,80a	66,66±10,2a	2,64±0,19a
R3	7,20±1,39b	46,66±12,2ab	1,70±0,25b
R4	7,00±1,04b	53,33±8,2a	1,88±0,17b
R5	5,40±0,67bc	46,66±12,2ab	2,0±0,17b
R6	0	0	0
R7	0	0	0
R8	0	0	0
R9	0	0	0
R10	0	0	0

$p \leq 0,01$

\*\*Her sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar Duncans çoklu testine göre; 0.01 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak farklıdır.

Not: E. B. S. S. O.: Eksplant başına sürgün sayısı ortalaması, S.O.Y.: Sürgün oluşum yüzdesi, S. U. O.: Sürgün uzunluğu ortalaması

### 3.3 Köklendirme

Mikroçoğaltım çalışması sonucunda elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi çalışmanın başarıyla sonuçlanabilmesi için oldukça önemlidir. *In vitro* koşullarda elde edilen sürgünlerin köklendirme aşaması için MS temel besin ortamı 1/1 ve 1/2 oranlarda kullanılmıştır. Bu besin ortamlarında bitki büyüme düzenleyicilerinden oksin grubunda yer alan IBA'nın 0,5-2 mg/L arasında farklı oranları kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre tüm eksplantların 30 günün sonunda köklendiği görülmüştür (Şekil 3.5.). En yüksek kök uzunluğu ortalaması 1/1 MS ve 1 mg/L IBA içeren besin ortamında elde edilmiştir (Şekil 3.7.). En düşük kök uzunluğu ise bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen 1/1 MS besin ortamında elde edilmiştir. Kök sayısı ortalaması incelendiğinde ise en yüksek kök sayısının 1/1 MS ve 1mg/L IBA içeren besin ortamında olduğu görülmüştür (Şekil 3.6.). En düşük kök sayısı ortalamasına ise 1/2 MS içeren bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besin ortamında görülmüştür (Çizelge 3.3.).

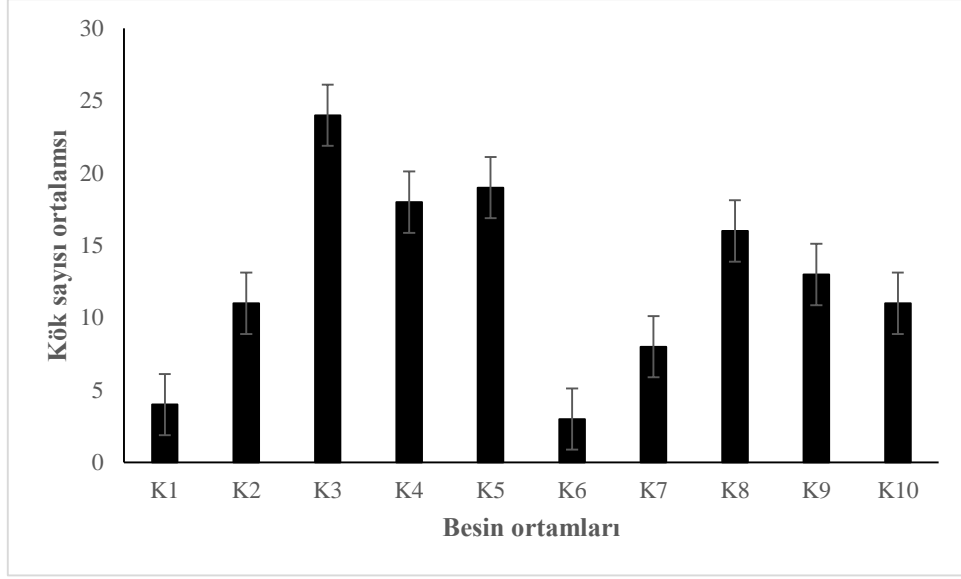


Şekil 3.5. Kök ortamında köklenen sürgün

Çizelge 3.3. Köklendirme çalışması sonuçları

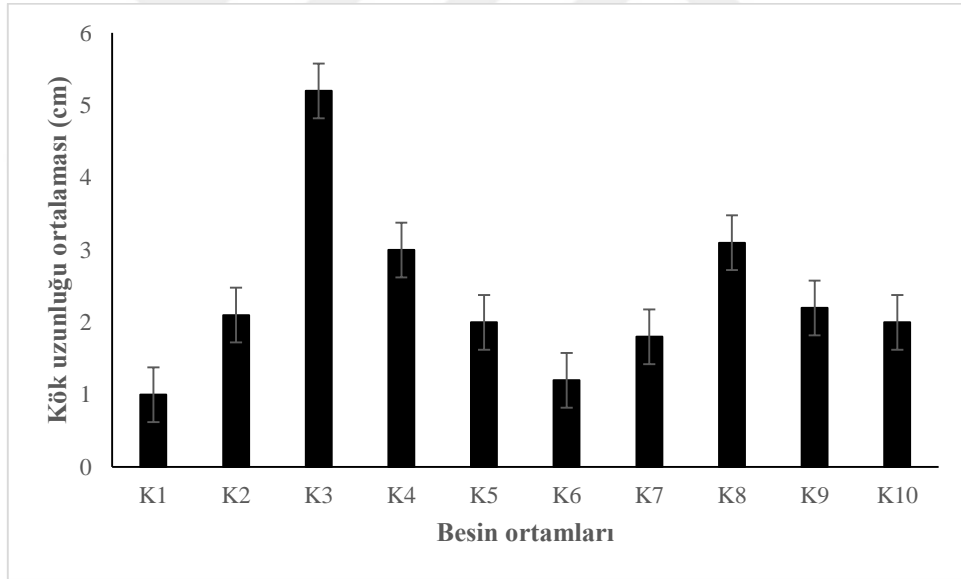
UYGULAMA	K. O. Y.	K. S. S. (adet)	K. S. O. (adet)	K. U. O. (cm)
<b>K1</b> 0 MS	%100	15	4	1
<b>K2</b> MS + 0,5 mg/L IBA	%100	15	11	2,1
<b>K3</b> MS + 1 mg/L IBA	%100	15	24	5,2
<b>K4</b> MS + 1,5 mg/L IBA	%100	15	18	3
<b>K5</b> MS + 2 mg/L IBA	%100	15	19	2
<b>K6</b> 0 ½MS	%100	15	3	1,2
<b>K7</b> ½MS + 0,5mg/L IBA	%100	15	8	1,8
<b>K8</b> ½MS + 1 mg/L IBA	%100	15	16	3,1
<b>K9</b> ½MS + 1,5 mg/L IBA	%100	15	13	2,2
<b>K10</b> ½MS + 2 mg/L IBA	%100	15	11	2

Not: K. O. Y.: Kök oluşum yüzdesi, K. S. S.: Köklenen sürgün sayısı, K. S. O.: Kök sayısı ortalaması, K. U. O.: Kök uzunluğu ortalaması.



*Dipnot: K1: 0 MS, K2: MS + 0,5 mg/L IBA, K3: MS + 1 mg/L IBA, K4: MS + 1,5 mg/L IBA, K5: MS + 2 mg/L IBA, K6: 0 ½MS, K7: ½MS + 0,5mg/L IBA, K8: ½MS + 1 mg/L IBA, K9: ½MS + 1,5 mg/L IBA, K10: ½MS + 2 mg/L IBA*

Şekil 3.6. Köklenme denemelerinde kök sayısı ortalaması grafiği



*Dipnot: K1: 0 MS, K2: MS + 0,5 mg/L IBA, K3: MS + 1 mg/L IBA, K4: MS + 1,5 mg/L IBA, K5: MS + 2 mg/L IBA, K6: 0 ½MS, K7: ½MS + 0,5mg/L IBA, K8: ½MS + 1 mg/L IBA, K9: ½MS + 1,5 mg/L IBA, K10: ½MS + 2 mg/L IBA*

Şekil 3.7. Köklenme denemelerinde kök uzunluğu ortalaması grafiği

### 3.4 Köklenen Sürgünlerin Dış Koşullara Aktarılması (Aklimatizasyon)

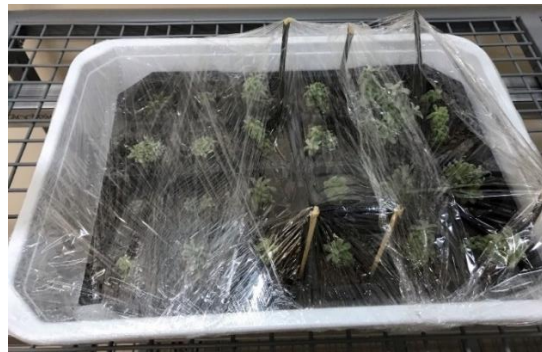
Yapılan ön çalışmalarda ölmez otunun aklimatizasyon aşamasında çok fazla bitki kaybı olmuştur. Bu durum göz önünde bulundurularak bu süreç daha sık kontroller yapılarak gerçekleştirilmiştir. Köklenen bitkiler temiz su ile bitkiye ve köklerine zarar vermeyecek şekilde besin ortamından arındırılana kadar yıkanmıştır. Ardından bitkiler daha önceden otoklavda 121°C, 1,2 kg/cm<sup>2</sup> basınçta 20 dk steril edilmiş ve nemlendirilmiş torflarla doldurulan viyollere dikilmiştir. Viyollerdeki bitkiler sprej ile nemlendirilip sulaması yapıldıktan sonra üzerini streç film ile kapatılabilecek bir kaba konulup hava almayacak şekilde streçlendikten sonra bitki büyüme odasına alınmıştır (Şekil 3.8.). İlk haftanın sonunda streç filmin üzerinde birkaç delik açılarak ortamın nemi düşürülmüştür. İkinci hafta delik sayısı arttırıldıktan sonra üçüncü haftada ise streç film tamamen kaldırılmıştır. Dördüncü haftada saksılanarak seralara alınan bitkiler daha sonra tarla koşullarına aktarılmıştır (Şekil 3.9.).



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.8. (a) *In vitro* koşullardan steril torfa aktarılan bitkiler (b) Sprej ile yaprakların nemlendirilmesi (c) Dış koşullara kademeli alıştırma için streç filmle kapatma işlemi



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.9. (a) Üç haftalık aklimatizasyon aşamasından sonraki bitkilerin görünümü (b) Saksılara alınan bitkiler (c) Bahçe koşullarına alınan bitki

## 4. TARTIŞMA

Ölmez otu bitkisinin vejetatif ve generatif olarak çoğaltımının kısıtlı olmasından dolayı mikroçoğaltım yönteminin optimizasyonu oldukça önemlidir. Mikroçoğaltım çalışmalarında farklı eksplantlar, temel besin ortamları, bitki büyüme düzenleyicileri ve kültür koşulları kullanılarak birkaç eksplanttan yüksek miktarda bitki elde edilebilmektedir. Bu tez çalışmasında ölmez otu bitkisinin mikroçoğaltımının optimizasyonu amaçlanmıştır.

### 4.1 Yüzey Sterilizasyonu

Sterilizasyon aşaması ölmez otu bitkisinin yapraklarının tüylü olmasından dolayı oldukça zordur. Bu çalışmada, tarla koşullarındaki bitkiden alınan eksplantların yüzey sterilizasyonu için %70 EtOH solüsyonunda 30 sn bekletildikten sonra ticari çamaşır suyunun üç farklı konsantrasyondaki solüsyonlar ve bu solüsyonların 10 ile 20 dklık uygulamaları ile denemeler kurulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre %15 oranında yapılan denemelerin tamamı kontamine olurken en iyi sonuca %35'lik ticari çamaşır suyu solüsyonunun 10 dklık uygulamasında ulaşılmıştır (Çizelge 3.1.). Moreno-Fortuna vd. (2010) *H. italicum*'da yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında %0,1 (w/v) HgCl<sub>2</sub> çözeltisinde 15 dk manyetik karıştırıcıda tuttıkları eksplantlarda başarılı sonuç elde ettiklerini bildirmişlerdir. Giovanni vd. (2003) aynı cinste yaptığı bir başka çalışmada ise, Eksplantların yüzey sterilizasyonu için %70'lik EtOH solüsyonunda 30 sn bekletildikten sonra %1 NaClO ve iki damla Tween 20'den oluşan solüsyonda 20 dk bekleterek en iyi sonuca ulaşmışlardır. *H. arenarium*'da Figas vd. (2016) yaptığı sterilizasyon çalışmasında eksplantlar %70 EtOH solüsyonunda 1 dk bekletilmiştir. Ardından %9 Ca(OCl<sub>2</sub>) ve Tween 20 içeren solüsyonda 12 dk bekletilip daha sonra steril saf su ile durularak başarılı sonuç elde etmişlerdir. *H. arenarium*'da yapılan bir diğer çalışmada, Clasquin ve Henry (2002) sterilizasyon aşamasında eksplantları 0,1 M KMnO<sub>4</sub> solüsyonunda 30 dk, %70'lik EtOH solüsyonunda 1 dk, %15'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda 15 dk ve %12'lik NaOCI solüsyonunda ise 10 dk süre ile manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırarak başarı bir sterilizasyon protokolü bildirmişlerdir.

## 4.2 Mikroçoğaltım

Ölmez otu özellikle ilaç ve kozmetik sanayisinde oldukça öneme sahip bir bitkidir. Bu bitkinin özellikle çiçeklerinden ve vejetatif aksamından elde edilen esansiyel yağlar ve diğer sekonder metabolitlerin antienflamatuvar, antialerjik ve antimikrobiyal etkisinin olduğu bilinmektedir (Dimitrova ve Nacheva, 2018). Ülkemizde doğal yayılım gösteren ölmez otu, zorlu yetiştirme koşullarında ve çorak arazilerde başarılı sonuç gösterdiğinden dolayı ülke ekonomisine önemli katkı sağlayabilme potansiyeline sahiptir. Bu yüzden vejetatif çoğaltım yöntemlerinden biri olan *in vitro* mikroçoğaltım yöntemi, hastalıklardan arı ve yüksek miktarlarda fide üretiminin yapılabilmesi için önemlidir. Bu tezde yapılan mikroçoğaltım çalışmasında iki farklı temel besin ortamı (MS ve Gamborg B5) kullanılmıştır. Bu besin ortamlarına bitki büyüme düzenleyicisi olarak BAP, GA ve NAA'nın farklı dozları eklenerek rejenerasyon ve sürgün gelişimi sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek sürgün oluşum yüzdesi MS temel besin ortamında 0,5mg/L BAP, 1mg/L GA ve 0,2mg/L NAA içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 3.2.). En yüksek sürgün uzunluğu ve eksplant başına sürgün sayısı ortalaması da aynı temel besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarında elde edilmiştir. Gamborg B5 temel besin ortamı ile kurulan denemelerde herhangi bir gelişim gözlemlenmemiş olup vitrifikasyon gerçekleşmiştir. Clasquin ve Henry (2002) *H. arenarium*'da yaptığı çalışmada da elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak Gamborg B5 ile kurulan denemelerde sürgün gelişimi olmayıp kallus ve vitrifikasyon oluşumu gözlemlenmiştir. Giovanni vd. (2003) *H. italicum* ve *H. stoechas*'da yaptıkları çalışmada her iki türde de 2,66 µM BAP içeren ortamlarda en iyi sürgün gelişimi elde edilmiştir. Dimitrova ve Nacheva'nın (2018) *H. italicum*'da yaptığı bir diğer mikroçoğaltım çalışmasında ise DKW ve MS temel besin ortamlarına BAP, KIN ve ZT ekleyerek denemeler kurulmuştur. Çalışmanın sonucunda ise en iyi sürgün gelişim ortamının 5 µM BAP + 0,005 µM IBA içeren MS ve 5 µM KIN + 0,005 µM IBA içeren DKW temel besin ortamları olduğu bildirilmiştir. Perrini vd. (2009b) *H. italicum* yapraklarında kallus oluşturup ardından organogenezis ile sürgün gelişimini elde etmeyi amaçlamışlardır. Besin ortamı olarak MS ve NN ortamlarını kombine ve modifiye ederek mikroçoğaltım çalışması gerçekleştirmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak TDZ ve NAA'nın farklı konsantrasyonları kullanılan bu çalışmada en iyi sürgün gelişimi sonucuna bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan ortamlarda ulaşılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen verilere göre *H. italicum*'un organojenik kapasitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir. *H. arenarium*'da Figas vd. (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise KIN ve KIN ile IBA kombinasyonları denenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre 5mg/L KIN ile 0,5mg/L IAA içeren



ortamlarda en iyi sürgün gelişimi sağlanmıştır. Taştekin (2020) sarı kantaron bitkisinin mikroçoğaltım aşamasında 0,5mg/L BAP ile 2,5mg/L NAA içeren ortamda en iyi sürgün gelişimi elde edilmiştir. Nanede yapılan mikroçoğaltım çalışmasında Khan vd. (2021) BAP'ı NAA ve IBA ile kombinledikleri denemelerde en iyi sonucun BAP ile NAA kombinasyonundan elde edildiğini ortaya koymuşlardır. Hirakawa ve Tanno'nun (2022) şerbetçi otunda yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında ½MS'e ekledikleri farklı konsantrasyonlardaki BA ve GA bitki büyüme düzenleyicileri ile denemeler kurmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre daha düşük konsantrasyondaki BA (0,01mg/L) içeren ortamda en iyi sürgün gelişimi elde edilmiştir. Sabina Yesmin'im (2019) şeker otunda yaptığı bir çalışmada MS'e eklenen BAP, KIN ve NAA kombinasyonları ile ortamlar hazırlanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre en iyi sürgün gelişimi ve sürgün uzunluğu 1,5mg/L BAP ile 0,5mg/L NAA içeren ortamlarda elde edilmiştir. Petrova vd. (2021) limon otunda yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında MS'e eklenen BAP, KIN, ZT ve 2-iP'nin IBA ve NAA kombinasyonları ile ortamlar hazırlanmıştır. Şeker otunda elde edilen sonuçlara benzer olarak 1,5mg/L BAP ile 0,5mg/L NAA içeren ortamda en iyi sürgün gelişimi ve sürgün uzunluğu elde edilmiştir. Fortuna vd. (2010) *H. italicum*'da yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında eksplantlar 20 farklı genotipten alınarak bu genotiplerden elde edilen sonuçlar incelenmiştir. Sürgün gelişimi için 1mg/L BAP ve 0,2mg/L IBA kullanılan bu çalışmada genotiplerin aynı koşullarda farklı tepkiler verdiği ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 16 genotipte %50 üzerinde sürgün gelişimi elde edilirken kalan 4 genotipte %33-47 arasında sonuca ulaşılmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında Gamborg B5 bulunan besin ortamlarında elde edilen sonuçlar Clasquin ve Henry'nin (2002) *H. arenarium* bitkisinde yaptıkları çalışma ile uyumludur. MS besin ortamlarında 0,5mg/L BAP, 1mg/L GA ve 0,2mg/L NAA bitki büyüme düzenleyicisinde elde edilen sonuç ise literatürde bulunan diğer çalışmalardan farklı olarak daha düşük konsantrasyonda en iyi sonuca ulaşıldığı gözlemlenmiştir.

### 4.3 Köklendirme

Köklendirme aşaması doku kültürü çalışmalarının sonuca ulaşabilmesi için en önemli aşamalarından biridir. Özellikle odunsu bitkilerde köklendirme aşaması oldukça zor olabiliyorken otsu bitkilerde nispeten daha kolay sonuca ulaşılabilir. Bu tez çalışmasında ölmez otunun köklendirilmesi için MS ve ½MS içeren ortamlara 0-2mg/L IBA eklenerek köklendirme elde edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 4 haftanın sonunda kurulan tüm denemelerde köklenme oluştuğu görülmüştür. Ölmez otunun köklenme

performansının yüksek olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir. Perrini vd. ölmez otunda bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan MS ortamında %100'e yakın köklenme elde ettiklerini bildirmişlerdir. Figas vd. ise *H. arenarium*'da köklenme için 0 MS, 0,5mg/L IAA ve 0,5mg/L IAA içeren ortamlarla denemeler kurmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre bütün ortamlarda %85-100 arasında köklenme gözlemlenmiş olup kök uzunluğu ve kök sayısına bakıldığında ise 0,5mg/L IBA içeren ortamda en iyi sonuca ulaşılmıştır. Yine bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer olarak Giovanni vd. *H. italicum* ve *H. stoechas*'ta yaptıkları çalışmada 0 MS, IAA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarında yapılan denemelerde %100 köklenme elde edilmiştir. Bir başka çalışmada Dimitrova ve Nacheva (2018) *H. italicum*'da NAA ile kurulan denemelerde %60-80 başarılı sonuç elde edilirken IBA ile kurulan denemelerde %90-100 arasında başarılı sonuca ulaşılmıştır. Anrade vd. (1999) *Lavandula vera*'da yaptıkları çalışmada normal oranda MS ve ¼MS besin ortamlarına IBA ve NAA'nın farklı konsantrasyonları eklenerek köklendirme elde edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en iyi köklenme oranına ¼ MS 0,2 mg/L NAA içeren ortamda ulaşılmıştır. El-Banna (2017) kekikte yaptığı çalışmada ise 0 MS, IBA ve NAA farklı konsantrasyonlarda kullanılarak köklendirme denemeleri kurulmuştur. Sonuçlara göre kontrol ortamında %75 köklenme oluşurken 1,5mg/L IBA, 1mg/L NAA ve 1,5mg/L NAA içeren ortamlarda %100 köklenme görülmüştür. Hirakawa ve Tanno (2022) şerbetçi otunda yaptıkları çalışmada en iyi köklenme oranına 0,05 mg/L NAA içeren ½MS besin ortamında 2 hafta içerisinde ulaştıklarını bildirmişlerdir. Petrova vd. (2021) limon otunda yaptıkları çalışmada bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında %100 köklenme elde edilmiştir. Şeker otunda yapılan bir çalışmada ise Yesmin (2019) köklendirme aşaması için ise MS ve ½MS besin ortamlarında IBA, IAA ve NAA 0,2-0,5mg/L oranlarında kullanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek köklenme oranı 0,2mg/L IBA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında literatür çalışmalarından farklı olarak ½MS bulunan ortamda bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmadan da başarılı bir şekilde köklenme sağlanmıştır.

#### 4.4 Aklimatizasyon

Köklenen bitkilerin dış koşullara aktarılabilmesi için kademeli bir alıştırma sürecinden geçmesi gerekmektedir. *In vitro* koşullarda yüksek nem ve sabit sıcaklıkta tutulan bitkilerin nem ve sıcaklıklarının kontrol edilerek dış koşullara alıştırıldığı bu aşama oldukça önemlidir. Özellikle otsu bitkilerde bu aşamada bitki kayıplarının yaşanmaması için koşulların kontrolü ve takibi çok önemlidir. Bu tez çalışmasında aklimatizasyon aşamasında bitkiler sağlıklı bir

şekilde kayıp olmadan dış koşullara başarılı bir şekilde aktarılmıştır. Köklenen bitkiler steril edilmiş torflara aktarıldıktan sonra sulama ve yaprak nemlendirmesi yapıldıktan sonra üzerleri hava almayacak şekilde streç filmle kapatılıp tam kontrollü bitki büyüme odalarına aktarılmışlardır. İlk hafta boyunca streç tamamen kapalı olarak bekletildikten sonra streç üzerinde delikler açılarak içerdeki nem miktarı kademeli olarak düşürülmüştür. İkinci haftada delik sayısı arttırılarak devam eden aklimatizasyon işlemi üçüncü haftanın sonunda streç tamamen kaldırılarak tamamlanmıştır. Daha sonra bitkiler sera ve tarla koşullarına aktararak aklimatizasyon işlemi başarılı bir şekilde sonuçlandırılmıştır. Aklimatizasyon aşamasında bitkinin isteklerine göre farklı toprak karışımları ve sulama suları kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında steril torfun saf su ile sulanması ile bu aşama gerçekleştirilmiştir. Hirakawa ve Tanno (2022) şerbetçi otunun aklimatizasyon işlemini 3:1:1 torf, vermikülit ve akadama içeren toprak karışımında saf su ile sulama yaparak gerçekleştirmiştir. Petrova vd. (2021) ise limon otunun aklimatizasyon aşamasını 2:1:1:1 oranında toprak, torf, perlit ve kum içeren toprak karışımını saf su ile sulayarak gerçekleştirmiştir. Yesmin (2019) şeker otunda yaptığı çalışmada bahçe toprağı ile kompostun 1:1 oranda karışımının saf su ile sulanması ile aklimatizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Figas vd. (2016) *H. arenarium*'un aklimatizasyonu aşamasında su ve %25 MS içeren su ile sulama yapmışlardır. Su ile yapılan sulamada %56 oranında aklimatize edilmiş bitki elde edilirken %25 MS içeren su ile yapılan sulamada %75 aklimatize bitki elde edilmiştir. Literatür çalışmalarında bitkiler aklimatize edilirken birçok farklı toprak karışımı ve besin takviyeleri kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında yapılan aklimatizasyon aşaması ise sadece torf ve saf su kullanılarak sık sık kontrol edilerek başarı ile sonuçlandırılmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ölmez otu bitkisi Türkiye’de doğal yayılış gösteren tıbbi ve aromatik bitkiler arasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu bitki ilaç, kozmetik ve boya sektörü başta olmak üzere birçok sektörde kullanılan uçucu yağ ve biyokimyasal bileşenlere sahiptir. Küresel ısınmadan dolayı kuraklığa dayanıklı bitkilerin üretimi ve ıslah edilmesi oldukça önemlidir. Ölmez otu susuz tarımının yapılabilmesi ve kuraklığa toleransının yüksek olmasından dolayı ön plana çıkmaktadır. Ayrıca ölmez otundan elde edilen ürünlerin ekonomik değeri yüksektir. Ülke ekonomimizde tarım büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle sahip olunan tarım arazilerinin iyi değerlendirilmesi çok önemlidir. Ölmez otu yetiştirme koşulları açısından seçici olmadığı hatta çorak arazilerde bile verim verebildiğinden dolayı ülke ekonomisine katkı sağlayabilecek potansiyele sahiptir. Bu nedenlerle ölmez otunun *in vitro* koşullarda sağlıklı ve kaliteli fidelerinin üretilmesi, çiftçilere tanıtımı ve kültür tarımının yapılması için teşvik edilmesi gerekmektedir.

Tüylü yapraklarından dolayı sterilizasyon aşamasının oldukça zor olduğu ölmez otunun sterilizasyonu için yapılan literatür taramasında elde edilen bilgilere göre kullanılan kimyasallar içerisinde en düşük maliyete sahip olan ve özellikle doğaya en az zararlı olduğu bilinen çamaşır suyu (NaClO) tercih edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre steril ve sağlıklı bitki elde etmek için ticari çamaşır suyu solüsyonunun konsantrasyonu önemli olduğu kadar sürenin de önemli olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda uzun süre tutulan bitkilerin yanmasından dolayı daha kısa süreli bekletilen denemede başarılı sonuç elde edilmiştir.

Mikroçoğaltım aşamasında daha önce yapılan çalışmalara göre daha düşük konsantrasyonda bitki büyüme düzenleyicisi (0,5mg/L BAP, 1mg/L GA ve 0,2mg/L NAA) kullanılarak başarılı sonuç elde edilmiştir.

Köklendirme aşamasında ise yapılan denemeler sonucunda bitki büyüme düzenleyici bulunmayan ½MS temel besin ortamında %100 köklenme elde edilmiştir. Bu çalışma sayesinde köklendirme aşamasının maliyeti oldukça düşmüştür.

Aklimatizasyon aşaması bu bitki için oldukça önemlidir. Bitki kaybının önlenmesi için kontrollü alıştırmaya aşamasında nem ve sıcaklığın kademeli bir şekilde dış koşullarla dengelenmesi gerekmektedir. *In vitro* koşullarda çok yüksek nem ve optimum sıcaklıktan dolayı bu aşamada ani nem kaybı veya ısı şoku bitkinin ölmesine neden olmaktadır.

Yapılan çalışmaların sonucu olarak daha az miktarlarda ve doğaya daha az zararlı kimyasallar kullanılarak ölmez otunun mikroçoğaltımının optimizasyonu sağlanmıştır. Bu sayede kültür tarımı için yüksek miktarda fide üretiminde kullanılacak hızlı ve ekonomik yöntem oluşturulmuştur. Ayrıca bu tez çalışması, ölmez otunda ileride yapılacak olan *in vitro*, moleküler ve sekonder metabolit çalışmalarına zemin oluşturmaktadır.



## KAYNAKLAR

- Akaberi, M., Sahebkar, A., Azizi, N., ve Emami, S. A. (2019). Everlasting flowers: Phytochemistry and pharmacology of the genus *Helichrysum*. *Industrial Crops and Products*, 138, 111471.
- Aksoy, A., Hamzaoglu, E., ve Budak, Ü. (2011). Türkiye *Helichrysum* Mill. (Asteraceae) Türlerinin Taksonomik Revizyonu. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi. Araştırma Projesi, Proje No: FBA08-519, 1-76
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., ve Hamzaoglu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food chemistry*, 119(1), 114-122.
- Andrade, L. B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G. F., ve Rota, L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Vol. 56).
- Antunes, C., Pereira, A. J., Fernandes, P., Ramos, M., Ascensão, L., Correia, O., ve Máguas, C. (2018). Understanding plant drought resistance in a Mediterranean coastal sand dune ecosystem: differences between native and exotic invasive species. *Journal of plant ecology*, 11(1), 26-38.
- Appendino, G., Tagliatalata-Scafati, O., Minassi, A., Pollastro, F., Ballero, M., Maxia, A., Sanna, C. *Helichrysum italicum*: The sleeping giant of Mediterranean herbal medicine. *Herbalgram* 2015; 105: 34 – 45.
- Buran, Y. B. (2021). Türkiye’de yetiştirilen *Helichrysum italicum* (roth) g.don kültürünün uçucu yağ analizi. (Yüksek Lisans Tezi). Yüksek Öğretim Kurumu Başkanlığı Tez Merkezi. (709147)
- Clasquin, S., ve Henry, M. (2002). Micropropagation d’*Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Acta Botanica Gallica*, 149(2), 189–195.
- Daneshvar Royandazagh, S. (2019). Efficient approaches to in vitro multiplication of *Lilium candidum* L. with consistent and safe access throughout year and acclimatization of plant under hot-summer Mediterranean (Csa Type) climate. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3), 734–742.
- Demirbaş, S., Ateş, M. (2021). Doğanın insanlığa sunduğu tıbbi bitkiler. Yer: iksad publishing house
- Dimitrova, N. G., ve 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.
- Driver, J. A., ve Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4), 507-509.
- El-Banna, H. Y. (2017). Micropropagation of thyme plant (*Thymus vulgaris*). *Journal of Plant Production*, 8(11), 1221-1227.

- Figas, A., Tomaszewska-Sowa, M., Sawilska, A., ve 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. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., ve Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro*, 12(7), 473-478.
- Giovannini, A., Amoretti, M., Savona, M., di Guardo, A., ve Ruffoni, B. (2003). Tissue culture in *Helichrysum* spp. *Acta Horticulturae*, 616, 339–342.
- Güner, A., & Aslan, S. (Eds.). (2012). Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları.
- Hirakawa, T., ve Tanno, S. (2022). *In vitro* Propagation of *Humulus lupulus* through the induction of axillary bud Development. *Plants*, 11(8).
- Khan, S., Shende, S. M., ve Bonde, D. R. (2021). *In vitro* micropropagation of mint (*Mentha*). *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 10, 1688-1692.
- Kothavade, P. S., Nagmoti, D. M., Bulani, V. D., ve Juvekar, A. R. (2013). Arzanol, a potent mPGES-1 inhibitor: Novel anti-inflammatory agent. In *The Scientific World Journal* (Vol. 2013).
- Kozhuharova, A., Traykova, B., Shopova, Y., ve Stanilova, M. (2019). Alternative biotechnological approaches for propagation of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (*Asteraceae*). *ARPHA Conference Abstracts*, 2.
- Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Lorusso, E., ve Avato, P. (2010). Essential oils, genetic relationships and *In vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 639–649.
- Murashige, G, Skoog F (1962). A Revised Medium for Rapid Growthand Bioassays With Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant* 15:473-497
- Ninčević, T., Grdiša, M., Šatović, Z., ve Jug-Dujaković, M. (2019). *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don: Taxonomy, biological activity, biochemical and genetic diversity. In *Industrial Crops and Products* (Vol. 138). Elsevier B.V.
- Petrova, M., Nikolova, M., Dimitrova, L., ve Zayova, E. (2015). Micropropagation and evaluation of flavonoid content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. *Genetics and Plant Physiology*, 5(1), 48-60.
- Petrova, M., Nikolova, M., Dimitrova, M., & Dimitrova, L. (2021). Assessment of the effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation and metabolic profiles of *Melissa officinalis* l. (lemon balm). *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 11(3), e4077-e4077.
- Perrini, R., Morone-Fortunato, I., Lorusso, E., ve Avato, P. (2009a). Glands, essential oils and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman. *Industrial Crops and Products*, 29(2–3), 395–403.

- Perrinia, R., Ruta, C., ve Morone Fortunato, I. (2009b). Regeneration through organogenesis from leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. *Acta Horticulturae*, 812, 217–222.
- Petrova, M., Nikolova, M., Dimitrova, M., ve Dimitrova, L. (2021). Assessment of the effect of plant growth regulators on *In vitro* micropropagation and metabolic profiles of *Melissa officinalis* L. (lemon balm). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(3), 1–5.
- Petrovska B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1–5.
- Snedecor, G. W., ve Cochran, W. G. (1967). *Statistical methods*, 593 pp. Iowa State Univ., Ames.
- Staver, M. M., Gobin, I., Ratkaj, I., Petrovic, M., Vulinovic, A., Dinarina-Sablic, M., ve Broznic, D. (2018). In vitro Antiproliferative and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Flowers and Leaves of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don Growing in Central Dalmatia (Croatia). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 21(1), 77–91.
- Taşçı, K., Atılabey, F. M., Yüksel, B., Uzunoğlu, P. T., ve Oral. (2015). Orta Anadolu Kalkınma Ajansı tıbbi ve aromatik bitkiler sektör raporu. Kayseri: Orta Anadolu Kalkınma Ajansı. Erişim adresi: [https://www.oran.org.tr/images/dosyalar/20180803161223\\_0.pdf](https://www.oran.org.tr/images/dosyalar/20180803161223_0.pdf)
- Taştekin, D., (2020). Dış koşul ve *In vitro* koşullarda yetişen sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.) bitkisinin fitokimyasal içeriğinin karşılaştırılması. (Yüksek Lisans Tezi). Yüksek Öğretim Kurumu Başkanlığı Tez Merkezi. (628667)
- Umaz, A. ve Umaz, K. (2020). İki Farklı Lokasyona ait Altın Otunun (*Helichrysum arenarium*) Uçucu Bileşenlerinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10 (3), 592-600.
- Verma, P.K., Verma, S., Pandey, N. ve Chakrabarty, D. (2021). Antimicrobial Products from Plant Biodiversity. In *Bioprospecting of Plant Biodiversity for Industrial Molecules* (eds S.K. Upadhyay and S.P. Singh).
- Yesmin, S. (2019). *In Vitro* Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29(2), 277–284.



## TEZDEN ÜRETİLMİŞ ESERLER

### Uluslararası Konferans Bildirileri

Uz, İ., Yatkın, S., Daneshvar, R. S., Demirbaş, S., Topçu, H., (2021). Micropropagation of *Helichrysum italicum*. III. BALKAN AGRICULTURAL CONGRESS, 29.08.2021-01.09.2021, ss. 109

