Çankırı KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HELIANTHEMUM GERMANICOPOLITANUM BORNM.'UN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

Emine KAPDAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Emine KAPDAN tarafından hazırlanan "*Helianthemum germanicopolitanum* Bornm.'un *in vitro* çoğaltımı" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Doç. Dr. Sezer OKAY

Ankara Hacettepe Üniversitesi, Aşı Enstitüsü

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Dr.Öğr.Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HELIANTHEMUM GERMANICOPOLITANUM BORNM.'UN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

Emine KAPDAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Bu çalışmada, yarı kurak ve kurak alanlara sahip Çankırı ilinde, lokal endemik olarak yetişen, tıbbi aromatik bitkiler arasında yer alan ve ayrıca yok olma tehlikesi altında bulunan (EN) *Helianthemum germanicopolitanum* Bornm. bitkisinin, *in vitro* teknikler yardımı ile çoğaltımı ve aklimitizasyonu amaçlanmıştır. Bu doğrultuda *H. germanicopolitanum*' un *in vitro* yöntemle çoğaltımı için 3 farklı temel besin ortamı [**a)** Murashige ve Skoog (MS) **b)** Gamborg's B5 **c)** Nitsch & Nitsch (N&N)], 2 farklı katılaştırıcı (agar 7g/L-gelrite 2.1 g/L), 8 sitokinin ve 8 oksin [**a)** 6-benziladenin (BA)-(0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L), **b)** Kinetin (KIN)-(0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L), **c)** Indol-3-bütürik asit (IBA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L), **d)** α-naftalenasetikasit (NAA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L)] dozunun yer aldığı 64 farklı kombinasyonda hazırlanan bitki büyüme düzenleyicilerle birlikte besin ortamlarına 30 g/L sakkaroz ilave edilmiş ve ortamın pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır.

Bitkinin çoğaltımı aşamasında, sık sık yüzeysel ve içsel enfeksiyona rastlanmış ve bu durum geliştirilen protokolle çözüme ulaştırılmıştır.

In vitro çoğaltım aşamasında en iyi sürgün gelişimi **(1.141)** ve sürgün uzunluğu **(0.572)** Gamborg's B5 besin ortamında KIN (0.5 mg/L)+IBA (0.5 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılan ortamda elde edilmiştir. Maksimum sürgün sayısı **(19.5)** ise MS besin ortamında BA (1 mg/L)+IBA(0.5 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve agar ile katılaştırılan ortamda elde edilmiştir. Köklendirme aşamasında ise maksimum kök sayısına **(30)** MS besin ortamında katılaştırıcı olarak gelrite kullanılan ortamda ulaşılmıştır. Sürgün ve kök gelişimi bakımından *H. germanicopolitanum* bitkisini en iyi temsil eden 100 adet bitki aklimitizasyon aşamasına alınmıştır. Bu bitkilerden 32 tanesi dış koşullara uyum göstermiştir.

Aralık 2019, 41 sayfa

Anahtar kelimeler: Doku kültürü, endemik, *Helianthemum germanicopolitanum, in vitro* çoğaltım

ABSTRACT

Master Thesis

IN VITRO PROPAGATION OF
HELIANTHEMUM GERMANICOPALITANUM BORNM.

Emine KAPDAN

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisors: Dr. Mehmet SEZGİN

In this thesis, it was aimed to *in vitro* propagation and acclimatization of *Helianthemum germanicopolitanum* Bornm. plant which is a local endemic in Çankırı Province with arid and semi-arid lands, and an endangered (EN) species taking part among medicinal and aromatic plants. In this respect, 3 different basal media [a) Murashige and Skoog (MS) b) Gamborg's B5 c) Nitsch & Nitsch (N&N)], 2 different gelling agents (agar 7 g/L-gelrite 2.1 g/L), 8 cytokines and 8 auxin doses of plant growth regulators [**a)** 6-benzyladenin (BA)-(0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L), **b)** Kinetin (KIN)-(0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L), **c)** Indole-3-butyric acid (IBA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L), **d)** α-napthaleneaceticacid (NAA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L)] prepared in 64 different combinations with 30 g/L sucrose was added to the basal media and adjusted to pH 5.7 for in vitro propagation of *H. germanicopolitanum*.

During the *in vitro* propagation of the plant, external and internal infections were frequently encountered and this was solved by the developed protocol.

The best shoot growth **(1.141)** and shoot length **(0.572)** were obtained in the Gamborg's B5 basal media in combination with KIN (0.5 mg/L)+IBA (0.5 mg/L) PGR and solidified with gelrite. The maximum number of shoots **(19.5)** were obtained in the media containing BA (1 mg/L)+IBA (0.5 mg/L) PGR in MS media solidified with agar. At the rooting stage, the maximum number of roots **(30)** were reached in the MS media containing gelrite. In terms of shoot and root growth were taken to acclimatization stage 100 plants representing the best *H. germanicopolitanum.* 32 of these plants adapted to external conditions.

December 2019, 41 pages.

Key words: Tissue culture, endemic, *Helianthemum germanicopolitanum*, *in vitro* propagation

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"*Helianthemum germanicopolitanum* Bornm.'un *in vitro* çoğaltımı" adlı tez çalışması Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tez çalışması olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 116Z446 numaralı 3501-Kariyer Geliştirme Projesi olarak desteklenmiştir. Bize her aşamada her türlü desteği sunan TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

Çalışma konusunun seçiminden, çalışmanın sonlandırılmasına kadar her aşamada desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden sıkça yararlandığım danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN'e sonsuz saygı ve şükranlarımı iletirim.

Özellikle her aşamada sabırla ve gayretle bana destek olan eşim Fettah KAPDAN babam İsmail SATILMIŞ, annem Satı SATILMIŞ'a, laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini gördüğüm yüksek lisans öğrencileri Cibutili arkadaşlarıma sevgi ve saygılarımı sunarım.

Emine KAPDAN
Çankırı, Aralık 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
Master Thesis ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1.GİRİŞ 1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ 5
2.1 Cistaceae Familyasına Ait Diğer Türlerde *In Vitro* Çoğaltım 5
2.2 *Helianthemum* sp.'nin Tıbbi Aromatik Özellikleri ile İlgili Çalışmalar 6
2.3 *Helianthemum* sp.' nin *In vitro* Çoğaltımı ile İlgili Yapılan Çalışmalar 8
3. MATERYAL VE YÖNTEM 10
3.1 Materyal Temini 10
3.2 Araziden Toplanan Bitkilerin Sterilizasyonu 11
3.4 Eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi 16
3.5 Alt kültür 17
3.6 Köklendirme Aşaması 18
3.7 Aklimitizasyon Aşaması 20
3.8 İstatistiksel Analiz 21
4. BULGULAR 22
4.1 Alt Kültürlerde Sürgün Uzunluğu 22
4.2 Alt Kültürlerde Sürgün Sayısı 24
4.3 Alt Kültürlerde Kök Uzunluğu 26
4.4 Alt Kültürlerde Kök Sayısı 28
4.4.1 Köklendirme Aşamasında Kök Uzunluğu 29
4.4.2 Köklendirme Aşamasında Kök Sayısı 30
4.4.3 Köklendirme Aşamasında Sürgün Uzunluğu 31
4.4.4 Köklendirme Aşamasında Sürgün Sayısı 32
5.TARTIŞMA VE SONUÇ 34
KAYNAKLAR 38
ÖZGEÇMİŞ 41

SİMGELER DİZİNİ

$AgNO_3$	Gümüş nitrat
B-5	Gamborg's B5 besin ortamı
BA	Benziladenin
BDM	Büyüme düzenleyici madde
Cm	Santimetre
g	Gram
g/L	Gram/litre
GA_3	Gibberellik asit
GB	Gamborg's B5 besin ortamı
$HgCl_2$	Civa klorür
IAA	İndolasetik asit
IBA	Indolbütirik asit
KIN	Kinetin
mg/L	Miligram/litre
ml	Mililitre
M	Molar
µM	Mikromolar
MS	Murashige ve Skoog temel besin ortamı
NAA	Naftalenasetikasit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NN	Nitsch & Nitsch besin ortamı
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
EtOH	Etanol
2,4-D	2,4- Diklorofenoksiasetik asit
TDZ	Thidiazuron
WPM	Woody Plant Medium (temel besin ortamı)
ZEA	Zeatin
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 *H. germanicopolitanum* Bornm.'un yayılış alanı-Çankırı/TÜRKİYE.…..... 2

Şekil 1.2 *H. germanicopolitanum* Bornm.'un **a)** çiçekleri **b)** habitusu **c)** habitatı….. 3

Şekil 3.1 *H. germanicopolitanum'* un toplandığı arazi ve jeolojik formasyon görünümleri **(a)** Çankırı Kenbağ Mevkii **(b)** Karakışla Köyü Yolu Çakmaklıdere Vadisi ve İnandık Köyü ……..... 10

Şekil 3.2 *H. germanicopolitanum* bitkisi **a)** Tam çiçekli *H. germanicopolitanum* **b)** Araziden toplanarak laboratuvara getirilen *H. germanicopolitanum* **c)** *H. germanicopolitanum* çiçekleri yaprakları ve sürgünlerinin görünümü… 11

Şekil 3.3 *H. germanicopolitanum* 'da sterilizasyon için bitkinin hazırlanması **a)** Araziden getirilen bitkinin sürgünlerine ayrılması **b)** Sürgünlerin yıkanması **c)**Yapraklarından arındırılmış sürgünler **d)** Dikim için hazırlanmış eksplantlar ……..... 12

Şekil 3.4 Laminar flow kabin içerisinde steril tüpler ve besin ortamları…… 15

Şekil 3.5 Besin ortamlarının tüplere 10 ml dağıtılması …….. 15

Şekil 3.6 Aseptik koşullarda *H. germanicopolitanum* bitkisinin dikimi **a)** Laminar flow kabin içerisinde yapraklarından arındırılmış eksplantların tüplere dikimi **b)** Dikim yapılmış eksplantlar ……..… 16

Şekil 3.7 25±1ºC sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim kabininde inkübe edilen eksplantlar ……. 17

Şekil 3.8 *In vitro* şartlarda gelişim göstermeye başlayan eksplantlar **a)** N&N besin ortamında BA(0 mg/L)+NAA(1 mg/L) BDM kombinasyonunda gelrite ile katılaştırıldığı ortamda kök gelişimi **b)** MS besin ortamında BA (2 mg/L)+NAA (0.5 mg/L) BDM kombinasyonunda agar ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün oluşumu **c)** N&N besin ortamında KIN (2 mg/L)+NAA (0 mg/L) BDM kombinasyonunda agar ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün oluşumu **d)** Gamborg's B5 besin ortamının BA (0.5 mg/L)+NAA (1 mg/L) BDM kombinasyonunun agarlı ortamında kallus oluşumu ……..... 18

Şekil 3.9 Sürgün gelişimi gösteren eksplantların köklendirme ortamına alınması **a)** N&N besin ortamında IBA (0.5 mg/L) ve gelrite içeren ortama Eksplantların aktarılması **b)** Köklendirme amacıyla dikilmiş eksplantlar **c)** N&N besin ortamında KIN (0.5 mg/L) + IBA (0.1 mg/L) BDM kombinasyonu içeren ortamda kök ve sürgün gelişimi ……. 19

Şekil 3.10 Rejenerasyonu tamamlamış *H.germanicopolitanum* bitkisi **a)** Gamborg's B5 ortamında KIN (0.5 mg/L)+IBA(0.5 mg/L) ve gelrite içeren ortamda bitki rejenerasyonu **b)** *H.germanicopolitanum* bitkisinin kök ve sürgün oluşumu ……. 20

Şekil 3.11 Rejenere olan bitkilerde aklimitizasyon çalışması ……..……. 21

Şekil 4.1 *In vitro* şartlarda 2. Alt kültür sonunda sürgün gelişimi **a)** N&N besin ortamında KIN (0.5 mg/L)+IBA (0.5 mg/L) BDM kombinasyonunda gelrite ile katılaştırıldığı ortamda sürgün gelişimi **b)** MS besin ortamında KIN (1mg/L)+NAA (1 mg/L) BDM kombinasyonunda agar ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün ve kök oluşumu **c)** MS besin ortamında

BA (1 mg/L) +NAA (0 mg/L) BDM kombinasyonunda agar ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün oluşumu **d)** MS besin ortamının BA (1 mg/L)+NAA (0.25 mg/L) BDM kombinasyonunun agarlı ortamında sürgün oluşumu …….. 22

Şekil 4.2 Köklendirme ortamına alınan eksplantların kök ve sürgün gelişimi ile bitkiye dönüşmeleri **a)** N&N besin ortamında IBA (0.5 mg/L) ve agar içeren ortamda sürgün ve kök gelişimi **b)** MS besin ortamında NAA(0.5 mg/L) ve gelrite içeren ortamda sürgün ve kök gelişimi **c)** MS besin ortamında IBA(0.5 mg/L) ve agar içeren ortamda sürgün ve kök gelişimi **d)** N&N besin ortamında IBA(1mg/L) ve gelrite içeren ortamda sürgün ve kök gelişimi ……..……..... 26

Şekil 4.3 Aklimitizasyon aşamasında dış koşullara uyum gösteren *H. germanicopolitanum* bitkisi …….. 27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 BDM konsantrasyonlarının uygulanış tablosu…… 14

Çizelge 4.1 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşaması sonrasında sürgün uzunluklarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.001) ……... 22

Çizelge 4.2 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasından sonra sürgün sayılarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.001) ……... 24

Çizelge 4.3 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasında kök uzunluklarına ait "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05) ……... 27

Çizelge 4.4 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasında sürgün sayılarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.001)..... 28

Çizelge 4.5 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında kök uzunluklarına ait "BDM x temel besin ortamı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05) …… 29

Çizelge 4.6 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında kök sayılarına ait "BDM x BDM Dozu x temel besin ortamı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05) ……. 31

Çizelge 4.7 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında kök sayılarına ait "BDM Dozu x temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05) …….. 32

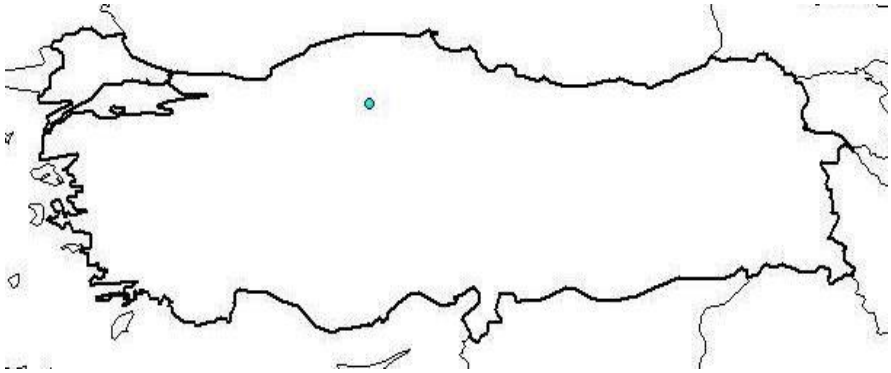
Çizelge 4.8 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında Sürgün uzunluklarına ait "BDM x temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05) …….. 32

Çizelge 4.9 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında sürgün sayılarına ait "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05) …….. 33

1.GİRİŞ

Ülkelerin tarihi ve kültürel zenginlikleri yanında biyolojik çeşitlilikleri de önem arz etmektedir. Tüm Avrupa'da yaklaşık 12000 adet bitki taksonu (tür, alttür, varyete vb.) ile 2750 adet endemik tür bulunmaktadır. Türkiye'de ise yaklaşık üçte biri endemik olmak üzere toplam 11000 adet bitki taksonu (tür, alttür, varyete vb.) bulunmaktadır (Ekim vd. 2000). Türkiye, endemik bitkiler bakımından bu kadar zengin olmasına rağmen bu konudaki çalışmalar, 1992-1997 yılları arasında DPT tarafından TÜBİTAK aracılığı ile desteklenen "Türkiye Endemik Bitkileri Projesi" yanı sıra flora çalışmaları yapan botanikçi bilim insanları sayesinde değer kazanmaya başlamıştır. Dünya'da bitki türlerinin, özellikle dar ve sınırlı yayılışa sahip endemiklerin, korunmaları konusunda ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Türkiye'de yetişen endemik ve endemik olmayan bitkiler, neslini devam ettirebilmek adına birtakım zorluklarla karşılaşmaktadır. Bitkileri tehdit eden başlıca faktörler; sanayileşme ve şehirleşme, tarım alanlarının genişletilmesi ve aşırı otlatma, turizm, ihracat ve değişik kullanım amaçları ile doğadan toplamalar, yangınlar, tarımsal mücadele ve kirlenme ilk akla gelenlerdir.

Çankırı il merkezinin bulunduğu bölge 3. Jeolojik zamanda meydana gelmiş jipsli yani alçı taşlı toprak yapısına sahiptir. Bu jipsli bölgelere has birçok endemik bitki bulunmaktadır. Çankırı il sınırlarında Flora of Turkey'in ilk dokuz cildinin kayıtlarına göre 52 familyaya ait 357 tür olmak üzere 360 adet takson bulunmakta ve bunlarında 119 tanesi endemiktir (Ekim vd. 2000; Bakış *et al.* 2011). Tür sayısının daha sonra yapılan flora çalışmalarıyla 1000'i bulduğu tahmin edilmektedir. Karadeniz ve İç Anadolu bölgeleri arasında, kurak ve yarı kurak bölgede yer alan Çankırı ili sınırları içerisinde lokal endemik olarak yetişen (Şekil 1.1) ve Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Korunma Birliği'nin (International Union for Conservation of Nature (IUCN)), Tehlike Altındaki Bitkiler Komitesi Sekreterliği'nin (Threatened Plant Committee (TPC)), Dünya Doğayı Koruma Vakfı (World Wildlife Foundation (WWF)) gibi kuruluşların yanı sıra ülkemizde de Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından tehlike altındaki bitkiler (EN) sınıfında yer alan *Helianthemum germanicopolitanum* Bornm., oldukça önemli bir türdür.

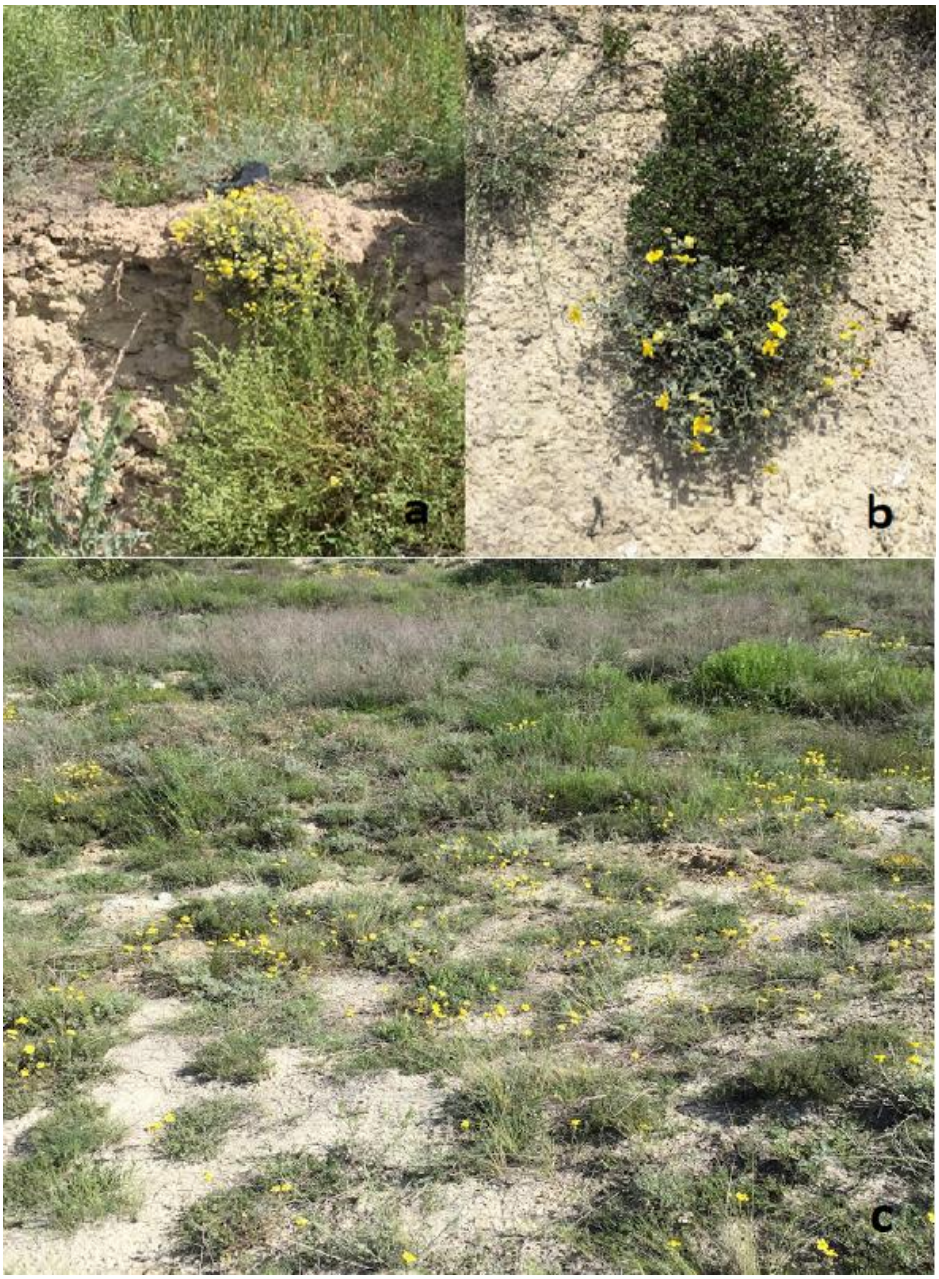


Şekil 1.1 *H. germanicopolitanum* Bornm.'un yayılış alanı-Çankırı/TÜRKİYE

Cistacea (Ladengiller), familyasına ait bitkiler, Akdeniz çevresindeki illerde, maki vejetasyonunda yetişebilen ağaççık, yarı çalı veya otsu formlardan meydana gelmektedir. Cistaceae familyasında sekiz cins ve 250-300 kadar tür bulunmaktadır (Bakış *et al.* 2011). Aşağıda bu sekiz cins verilmektedir:

1. *Fumana*
2. *X Halimiocistus*
3. *Halimium*
4. ***Helianthemum***
5. *Hudsonia*
6. *Lechea*
7. *Tuberaria*
8. *Cistus*'tur.

Bu familyaya ait 8 cinsten biri olan *Helianthemum'*un 16 tane türü bulunmaktadır. Bunlardan, *H. strickeri* GROSSER, *H. antitauricum* DAVIS ET COODE, *H. nummularium subsp. lycaonicum* Coode & Cullen türü haricindekiler endemik değildir. Çok yıllık, yarı çalı formdadır (Şekil 1.2). Step yerlerde, 800-1600 m yüksekliklerde yetişir. Bulunduğu iller: Ankara, Artvin, Bolu, Bursa, Çankırı, Eskişehir, Giresun, Gümüşhane, Hatay, İçel, Kastamonu, Kayseri, Kütahya, Malatya, Niğde, Rize, Samsun, Sinop, Sivas ve Trabzon (bulunduğu kareler: A2, A3, A4, A5, A7, A8, A9, B2, B3, B4, B5, B6, C5 ve C6 (Bakış *et al.* 2011).



Şekil 1.2 *H. germanicopolitanum* Bornm.'un **a)** çiçekleri **b)** habitusu **c)** habitatı

Endemik olan bazı türlerin doğal yetişme alanlarında korunması ve çoğalmalarının sağlanması önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra, bu bitkilerin hızlı bir şekilde kültüre alınma çalışmalarının da yapılması gerekmektedir. Çoğaltılan bitkilerin koleksiyona alınması ve *in vitro* devamlılığının sağlanması, yok olma tehlikesi altındaki bitkinin varlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Çölleşme ile mücadele kapsamında da toprağın korunması, N, P, K gibi bitki beslenmesinde hayati rol oynayan elementlerin

toprakta tutulması gibi oldukça önemli etkileri olan *Helianthemum* sp. bitkisinin korunması gerekmektedir. Türkiye'de kurak ve yarı kurak zonda yer alan Çankırı, toprak, bitki örtüsü, iklim ve su rejimi açısından giderek çöl ekosistemlerine benzer özellikler kazanmaya başlamıştır (Göl vd. 2010). Bu anlamda ekolojik özelliklerin korunması, öncelikle toprağın yerinde muhafaza edilmesi ile sağlanacaktır. *Helianthemum* sp. bitkisinin tıbbi yönden kullanım alanlarının yanı sıra gelişmiş kök yapısı ve az yağışlı iklim koşullarına gösterdiği uyum sayesinde (Suleiman *et al.* 2007) oldukça kıymetli bir bitki olduğu da açıktır.

Helianthemum sp. birçok tıbbi özellik taşıyan önemli bir bitkidir. Bitkinin Maya'lardan beri sindirim sistemi bozukluğu ishal, kanlı ishal, abdominal ve epigastrik ağrı tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Meckes 1999; İnan vd. 2012). *H. germanicopolitanum* bileşimindeki uçucu yağ, tanen ve müsilajın idrar söktürücü ve kabızlık giderici etkilerinin yanında, ülkemizde özellikle hemoroide karşı etkin bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir (Baytop 1999).

Bu tez çalışmasında, *H. germanicopolitanum*'un *in vitro* çoğaltımı ile ilgili ilk çalışma olması bakımından özgün değer taşımaktadır. Çalışmada yoğun, hızlı ve klonal bir çoğaltım imkânı sağlayan ve önemli bir biyoteknolojik yöntem olan doku kültürü ile *H. germanicopolitanum* bitkisi sürgün ucu ve nod (boğum) gibi farklı eksplantlar kullanılarak *in vitro* şartlarda çoğaltılmıştır. *H. germanicopolitanum* eksplantları ilk kez *in vitro* koşullarda 3 farklı besin ortamı, 64 farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu ve 2 farklı katılaştırıcı kullanılarak kültüre alınıp, köklendirme ve aklimizasyon çalışmaları hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Cistaceae Familyasına Ait Diğer Türlerde *In Vitro* Çoğaltım

Kadan *et al.* (1991), Rosaceae familyasının üyelerinin yerine kullanabilecek olan, *Erwinia amylovora* bakteri türüne dirençli olan küçük çiçekli ladende (*Cistus* × *purpureus* Lam.) yaptıkları *in vitro* mikroçoğaltım çalışmasında tür sayısını artırmak için serada yetiştirdikleri ladenleri kullanarak *in vitro* ortamda mikroçoğaltım yapmışlardır. Bu çalışmada eksplant olarak: iki yaprak arası segmentleri ve nodül bölgelerini kullanmışlardır. 0.007 mg/L BAP'lü ortamda kültüre alınan eksplantlar üç hafta sonra sürgün oluşturmuşlardır. 0.01 mg/L BAP ve 0.005 mg/L IAA ile kullanılarak hazırladıkları ortamda üç hafta sonra 6 sürgün gelişimi gözlemişlerdir. Bunun yanında 0.005 mg/L IBA içeren ortamda alt kültüre aldıkları ortamda ise sadece iki adet sürgün gelişmiştir. Bu yapılan çalışmada %55 oranında başarılı olmuşlardır.

Iriondo *et al.* (1995) 6 Kayagülü (*Cistus*) türünde *in vitro* çoğaltım adlı çalışmada (*Cistus albidus* L., *C. clusii* Dunal, *C. ladanifer* L., *C. laurifolius* L., *C. psilosepalus* L., ve *C. salvifolius* L.) mikroçoğaltım yapmışlardır. Tohumları steril ettikten sonra büyüme düzenleyici olmaksızın %3 sakkaroz ve %0.7 agar (Difco Bacto) içeren MS (Murashige and Skoog, 1962) ortamına eksplantları inkübe etmişlerdir. Otuz gün sonra 0.5-1.0 cm aralığında nodül arası ve apikal uçlardan alınan eksplantları üç farklı büyüme düzenleyici ihtiva eden MS (1.MS + 0.02 mg/L KIN 2.MS + 0.02 mg/L BAP 3, bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS) ortamında alt kültüre almışlardır. Her dört hafta 0.5-1.0 cm boyutundaki eksplantları aynı içerikte ki ortamlarda alt kültüre almışlardır. Üçüncü alt kültürden sonra sürgünler köklendirme için MS ortamına veya (0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ve 0.1mg/L) IBA içeren ortamlarda alt kültüre almışlardır. Otuz gün sonra ki gözlemlerinde *Cistus clusii* düşük oranlar da (%73-%80) gelişme gösterirken diğer beş tür %80-%97 oranında gelişme göstermiş ve başarı sağlamışlardır.

Zygomala *et al.* (2003), Girit Ladeni'nin *(Cistus creticus* L.*)* tohumlarından *in vitro* çoğaltım adlı yaptıkları çalışmada, tohumları WPM temel besin ortamına modifiye etmişler ve 30 gün sonra çimlenen tohumlardan ilk sürgün rejenerasyonu gerçekleştirmişlerdir. Yine WPM ortamı kullanarak dozlarda büyüme düzenleyicileri

ekleyerek IBA (0.02, 0.04 ve 0.08 mg/L) , NAA (0.001 ve 0.002 mg/L) ve Zeatin (0.2 mg/L ve 0.5 mg/L) ekleyerek başarılı bir *in vitro* çoğaltım gerçekleştirmişlerdir.

Ruta *et al.* (2010), *Cistus clusii'*da sürgünlerinden ve nodüllerinden *in vitro* çoğaltım çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada iki seksiyon yapmışlardır ilk olarak 0.5 cm bazal eksplantları inkübe etmişlerdir, ikinci olarak da 1–1.5 cm boyutunda elde ettikleri terminal uç kısımlarını 0.5 mg/L BAP içeren MS ve NN temel besin ortamlarında alt kültüre almışlardır. İlk dikimlerin de %14-16 oranında enfekte meydana gelmiştir. En iyi köklendirme 0.1 mg/L IBA eklenen ortamda gözlemişlerdir. Gelişen bitkilere aklimitizasyon uygulanmıştır.

Madesis *et al*. (2011), Girit ladeninde (*Cistus creticus* L.) *in vitro* olarak mikroçoğaltım ve sürgün rejenerasyonu çalışması yapmışlardır. *In vitro* çoğaltım için üç yıllık bitkilerden eksplantlar almışlardır. Elli adet sürgün ucunu ilk önce kararmasını önlemek amacı ile antioksidan çözelti içerisinde (askorbik asit 100 mg/L) 20 dk. bekletmişlerdir. Ardından %100 etanol ile 30 dk. muamele edip, steril su ile durulamışlardır. Daha sonra sodyum hipoklorit (NaOCl) ile 15 dk. steril edip, steril saf su ile üç defa yıkamışlardır. Toplanan eksplantların yapraklarından sürgün rejenerasyonu yapmışlardır. MS ortamına eklenen 0.1 mg/L TDZ ve 0.1 mg/L NAA ile dört hafta sonra 2.5 mm boyutunda sürgünler elde etmişlerdir. Büyüme düzenleyiciler olmaksızın MS ortamında yaptıkları mikroçoğaltımda 24 mm boyutunda sürgünler elde etmişlerdir. Gelişen bitkiler aklimitizasyon ile toprağa aldıklarında ise 100mm boyutunda bitkiler elde etmişlerdir. Bunun yanı sıra gelişen kalluslardan organogenesis uygulaması denemişlerdir. Bu yöntem de ise MS ortamına 0.1 mg/L NAA'ya ek olarak 0.1 mg/L TDZ veya 0.2 mg/L TDZ eklemişlerdir. En yüksek verimi ise 0.1 mg/L TDZ ve 0.1 mg/L NAA eklenen MS ortamında (%33) gözlemişlerdir.

2.2 *Helianthemum* sp.'nin Tıbbi Aromatik Özellikleri ile İlgili Çalışmalar

Güneydoğu İspanya'da geleneksel olarak tıbbi amaçlı kullanılan 11 farklı *Helianthemum* sp. türünde, polifenoller, antioksidanlar ve antimikrobiyal aktivitelerin araştırıldığı çalışmada (Moraga *et al*. 2013), yapraklarından elde ettikleri metanolikler

ve diğer ekstraktların *Helianthemum* sp.'nin tıbbi olarak kullanımıyla doğrudan ilgili olduğunu vurgulamışlardır. *Helianthemum* sp.'nin çiçekleri, yaprakları ve diğer kısımlarının, yanık tedavisinde, sindirim sistemi hastalıklarında, hemoroit tedavisinde, solunum yetmezliğinde, iltihap sökücü olarak, ağrı kesici olarak ve antiseptik olarak kullanıldığını, ishal, kanlı ishal ve ateşli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak yararlanıldığını ifade etmişlerdir.

Hussain *et al*. (2013) aralarında Arap yarımadasında ağrı kesici ve iltihap giderici olarak kullanılan *Helianthemum lippii*'nin de bulunduğu 5 farklı tıbbi bitkinin uçucu yağ ve besin maddesi analizlerini yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada kuru madde, sodyum karbonat, ham yağ, proteinler, lif, azot, karbonhidrat, K, Na, Ca, Fe, P, Mg vs. parametrelerini incelemişlerdir.

Aralarında *Helianthemum lippii*'nin de bulunduğu bazı bitkilerde, fenolik içerikler ve *in vitro* antioksidan aktivitelerini inceleyen Benhammou *et al*. (2014) *H.lippii*'nin kök, yaprak ve meyvelerinde en yüksek antioksidan aktivite oranına, total antioksidan kapasite değerleri ile toplam flavonoid değerlerine ulaşmışlardır.

Helianthemum kahiricum Dell.'da uçucu yağ kompozisyonlarının GC ve GC/MS ile incelendiği çalışmada %36.2 hekzanoik asit, %7.3 tetradekanoik asit, %6.5 linoleik asit ve %4.7 oranında da dodekanoik asit elde etmişlerdir (Javidnia *et al*. 2007).

Terfezia bouderi Chatin çöl mantarının, Güney Tunus'ta kumullarda yayılış gösteren, endemik *Helianthemum sessiliflorum* Desf.'un büyüme, kök gelişimi ve besin depolama özellikleri üzerine etkilerini araştıran Slama *et al.* (2012) iki farklı toprak tipini, jipsli ve kumlu balçık, denemişlerdir. Mikorizal fidanlar *H. sessiliflorum* Desf.'da dikkate değer şekilde boy artımı ve yaprak sayısında artış göstermiştir.

Turgeman *et al*. (2011)'de ise *Terfezia bouderi* Chatin mikoriza mantarların *H. sessiliflorum* Desf.'un fotosentez oranını %35, transpirasyon kapasitesini %18 respirasyon kapasitesini %49 artırdığını ortaya koymuşlardır.

Kuraklık stresinin büyüme ve su alımındaki etkisi mikorizal bir fungus olan *Terfezia claveryi* ile *H. almeriense* ile birlikteliğinde Morte *et al*. (2000) tarafından gözlenmiştir. Kök ve sürgün gelişimini olumlu etkilediği ayrıca normal yaşam koşulları altında kuraklık stresi ile baş edebildiği %88 oranında fotosentez gerçekleştirebildiği ifade etmişlerdir.

2.3 *Helianthemum* sp.' nin *In vitro* Çoğaltımı ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Morte ve Honrubia (1992)'de *Helianthemum almeriense* bitkisinin sürgün ucu ve nodal eksplantlarını *in vitro* koşullarda kültüre almışlardır. MS (Murashige and Skoog 1962) besin ortamına yalnızca 0.01 mg/L KIN ilave ettikleri kombinasyonda köklenmeyi sağlayabilmişlerdir.

Helianthemum lippii L. var. *sessiliforium* bitkisinin *in vitro* mikro çoğaltımını çalışan Hamza *et al.* (2012), eksplant olarak bitkinin nodlarını kullanmışlardır. MS besin ortamına BA'nin (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 ve 2 mg/L) farklı dozlarını ilave etmişler ve 1.5 mg/L BA içeren ortamda en iyi kallojenik yapı ile %98 oranda sürgün elde etmeyi 4 hafta sonunda başarmışlardır. Ardından yine MS ortamına 0-1 mg/L IBA ilave ederek köklendirmeyi ve %90 oranında da dış koşullara alıştırma işlemini başarmışlardır.

Hamza *et al.* (2013) yine *Helianthemum lippii* L. var. *sessiliforium* bitkisinde bu defa aksiler tomurcukları eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. MS besin ortamına BA'nın (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, ve 2 mg/L) farklı dozları ile NAA'in (0.5 ve 1 mg/L) dozlarını ilave etmişlerdir. Elde ettikleri sürgünleri MS ortamının (MS/2, MS/4, MS/6 ve MS/8) kuvvetlerine, tuz konsantrasyonlarını azaltarak, NAA'in (0.25, 0.5, 0.75, 1 ve 1.5 mg/L) değişen oranlarını ekleyerek köklenmeyi sağlamışlardır. Bitkileri büyütme kabininde %90-95 nemli ortamlarda 2 ay beklettikten sonra seraya aktarmışlardır.

Hamza ve Neffati (2014)'de hem tıbbi özellikleri, hem bir yem bitkisi olarak kullanılan aynı zamanda mükemmel gelişmiş kök sistemleri sayesinde çölleşmeyi durduran bir bitki olan *Helianthemum kahiricum* Dell.'un mikro çoğaltımını araştırdıkları yayınlarında, koruma programının gerekli çoğaltım tekniklerinden biri olan *in vitro*

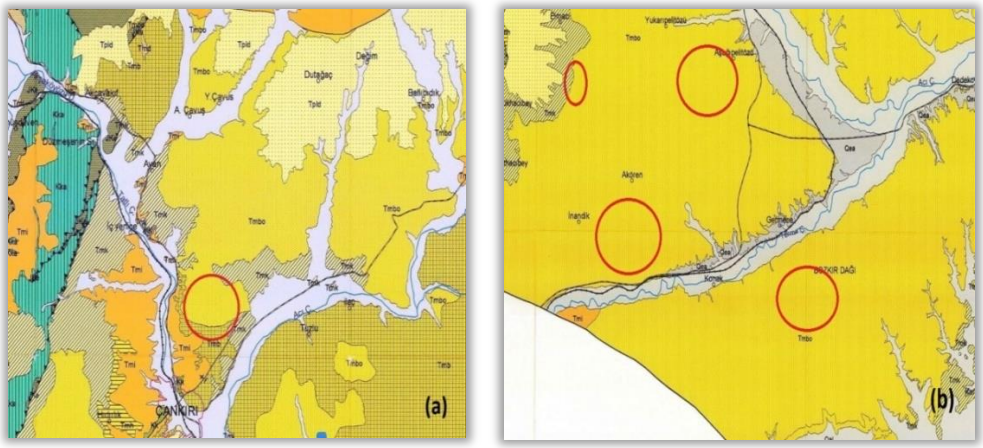
çoğaltımın önemini vurgulamışlardır. Değişik oranlarda kullanılan sitokinin ve oksin dozlarının bitkinin gelişiminde ne kadar etkili olduğunu hatta bazı durumlarda oksin kullanmadan kök gelişimin %98 oranına ulaştığını ifade etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan Biyoteknoloji Laboratuvarında 2017-2019 yılları arasında yürütülmüştür.

3.1 Materyal Temini

Türkiye'de yalnızca Çankırı ili sınırları içerinde doğal yayılış gösteren (Turkey A4 Çankırı), lokal endemik ve yok olma tehlikesi altındaki (EN) *H. germanicopolitanum*, Karakışla yolu yol kenarında, Çakmaklıdere vadisi üst kısımlarında, jipsli tepelerde 650-800 m yükseltide 40º29'30" N - 033º39'36" E koordinatlarında ve Kalecik-Çankırı yolu İnandık yol ayrımında, jipsli ve kireçli tepelerde 831 m yükseltide 40º23'15" N - 033º35'01" E koordinatlarında bulunmaktadır (Şekil 3.1) (Cullen and Coode 1965; Yeşilyurt *et al*. 2015). Bunun yanısıra Çankırı Kenbağ mevkii, Çankırı Esentepe mahallesi Esentepe-Doğantepe yol arası mevkiinde yayılış göstermektedir. Nisan-Mayıs aylarında vejetasyon döneminin başlangıcıyla birlikte arazide görülmeye başlayan bitkinin, Haziran-Temmuz ve Ağustos aylarında tam çiçekli hali bulunabilmektedir. Bitkiler 10 Mayıs 2017, 5 haziran 2017 yılında iki kez, 2018 yılı 12 mayıs ve 5 Haziranda, 21 mayıs 2019'da Kenbağ mevkiiden bitkilerin doğal yaşam alanlarına, üremelerine ve çoğalmalarına zarar vermeyecek şekilde ve sınırlı miktarda çelik alınarak (Şekil 3.2) laboratuvar ortamına getirilmiştir.



Şekil 3.1 *H. germanicapolitanum'*un toplandığı arazi ve jeolojik formasyon görünümleri **(a)** Çankırı Kenbağ Mevkii **(b)** Karakışla Köyü Yolu Çakmaklıdere Vadisi ve İnandık Köyü



Şekil 3.2 *H. germanicopolitanum* bitkisi **a)**Tam çiçekli *H. germanicopolitanum* **b)**Araziden toplanarak laboratuvara getirilen *H. germanicopolitanum* **c)***H. germanicopolitanum* çiçekleri yaprakları ve sürgünlerinin görünümü

3.2 Araziden Toplanan Bitkilerin Sterilizasyonu

Araziden toplanarak laboratuvara getirilen bitkiler *in vitro* koşullarda dikime alınmadan önce yüzey sterilizasyonu için akan musluk suyu altında 20 dk. yıkandıktan sonra %70'lik etanolde 3 dk bekletilmiştir. %15 klor içeren ticari sodyum hipokloritin birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş %20'lik solüsyonunda, 10 dakika boyunca sterilize edilmiş ve ardından sodyum hipokloritin dokulardan uzaklaşması için 3 defa 5'er dakika süre ile steril saf su ile aseptik koşullarda çalkalanmıştır. Ancak bu protokol *H.germanicopolitanum* eksplantları için sterilizasyonda yeterli olmamıştır. Bu nedenle,

uygulanan sterilizasyon protokolü yerine, aşağıdaki protokol modifiye edilerek uygulanmıştır.

1. Bitki akan musluk suyu altında 30 dk. boyunca yıkanmıştır,
2. 1 g/L Cuprosan GW-(Bayer®) ile 20 dk. muamele edilmiştir
3. 1 g/L $HgCl_2$ ile 15 dk. muamele edilmiştir,
4. %70'lik EtOH ile 10 dk. muamele edilmiştir,
5. Bitkiler üzerlerindeki yapraklar temizlendikten sonra en az 2 cm olacak şekilde ve üzerinde en az 2 göz olacak şekilde kesilmiştir,
6. Hacmen %15 klorin içeren ticari NaOCl'in %30'luk konsantrasyonuna, klorinin etkinliğini artırmak amacıyla 1-2 damla Tween 20 ilave edilerek 15 dk. muamele edilmiştir,
7. Steril saf su ile 3 kez 5'er dk. durulanarak dikime hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.3 *H. germanicopolitanum*' da sterilizasyon için bitkinin hazırlanması **a)**Araziden getirilen bitkinin sürgünlerine ayrılması **b)**Sürgünlerin yıkanması **c)**Yapraklarından arındırılmış sürgünler **d)**Dikim için hazırlanmış eksplantlar

3.3 Besin Ortamların Hazırlanması

H. germanicopolitanum Bornm. bitkisinin, sürgün uçları, nodları eksplant kaynağı olarak kullanılarak, biyoteknolojik yöntemlerden biri olan doku kültürü ile *in vitro* şartlarda çoğaltılmıştır. Bu yöntemde, başlangıç aşamasında farklı bileşimlerdeki besin ortamları kullanılmıştır. Bu aşamada temel besin ortamlarının, katılaştırıcı tipinin ve büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonlarının (Çizelge 3.1) etkileri araştırılmıştır.

1) **Temel besin ortamları (Thengane *et al.* 1994; Sahraroo *et al.* 2015)**
   a)MS (Murashige and Skoog 1962)
   b)Gamborg's B5 (Gamborg *et al*. 1968)
   c)Nitsch & Nitsch (Nitsch and Nitsch 1969)
2) **Katılaştırıcılar** (Sezgin and Dumanoğlu 2014)
   a)Agar (7 g/L)
   b)Gelrite (2.1)
3) **Büyümeyi düzenleyici maddeler ve kombinasyonları** (Hamza *et al*. 2012; Pandey and Singh 2012; Singh and Dwivedi 2013)
   a)6-benziladenin (BA)-(0 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L)
   b)Kinetin (KIN)-(0 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L)
   c)Indol-3-butirik asit (IBA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L)
   d)α-naftalenasetik asit (NAA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L)

H. germanicopolitanum için 3 temel besin ortamı, 2 katılaştırıcı, 8 sitokinin dozu ve 8 oksin dozunun yer aldığı 384 farklı kombinasyonda hazırlanan besin ortamlarına 30 g/L sakkaroz ilave edilmiş ve ortamın pH'ı 5.7'ye ayarlanmıştır. Besin ortamlarında, eksplantların dikiminden sonra oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacı ile PPM (Plant Preservative Mixture-(Duchefa®)) 1 ml/L olarak ilave edilmiştir. Besin ortamları, her bir BDM kombinasyonu, katılaştırıcı ve tekerrür miktarına yeterli olacak şekilde hazırlanmış (100 mL) ve erlenmayer içerisinde sterilizasyon amacıyla otoklava konulmuştur. Besin ortamlarının sterilizasyonu dijital kontrollü otoklav ile 121ºC ve 1.2 atm basınç altında 20 dk. süreyle yapılmıştır (Sezgin ve Dumanoğlu 2014). Otoklavdan çıkarılan besin ortamları laminar hava akışlı kabin içerisinde katılaşmasından hemen

önce steril tüplere (130x10 mm) 10'ar mL olarak dağıtılmıştır. Her tüpte 1 adet eksplant olacak şekilde tüm kombinasyonlar 10'ar tekerrür halinde hazırlanmıştır (Şekil 3.4 ve 3.5) (Hamza *et al*. 2012; 2013; Pandey and Singh 2012).

Çizelge 3.1 BDM konsantrasyonlarının uygulanış tablosu

1	BA(0 mg/L)+IBA(0 mg/L)	**33**	KIN(0 mg/L)+IBA(0 mg/L)
2	BA(0 mg/L)+IBA(0.25 mg/L)	**34**	KIN(0 mg/L)+IBA(0.25 mg/L)
3	BA(0 mg/L)+IBA(0.5 mg/L)	**35**	KIN(0 mg/L)+IBA(0.5 mg/L)
4	BA(0 mg/L)+IBA(1 mg/L)	**36**	KIN(0 mg/L)+IBA(1 mg/L)
5	BA(0 mg/L)+NAA(0 mg/L)	**37**	KIN(0 mg/L)+NAA(0 mg/L)
6	BA(0 mg/L)+NAA(0.25 mg/L)	**38**	KIN(0mg/L)+NAA(0.25 mg/L)
7	BA(0 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	**39**	KIN(0 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)
8	BA(0 mg/L)+NAA(1 mg/L)	**40**	KIN(0 mg/L)+NAA(1 mg/L)
9	BA(0.5 mg/L)+IBA(0 mg/L)	**41**	KIN(0.5 mg/L)+IBA(0 mg/L)
10	BA(0.5 mg/L)+IBA(0.25 mg/L)	**42**	KIN(0.5 mg/L)+IBA(0.25 mg/L)
11	BA(0.5 mg/L)+IBA(0.5 mg/L)	**43**	KIN(0.5 mg/L)+IBA(0.5 mg/L)
12	BA(0.5 mg/L)+IBA(1 mg/L)	**44**	KIN(0.5 mg/L)+IBA(1 mg/L)
13	BA(0.5 mg/L)+NAA(0 mg/L)	**45**	KIN(0.5 mg/L)+NAA(0 mg/L)
14	BA(0.5 mg/L)+NAA(0.25 mg/L)	**46**	KIN(0.5mg/L)+NAA(0.25 mg/L)
15	BA(0.5 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	**47**	KIN(0.5 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)
16	BA(0.5 mg/L)+NAA(1 mg/L)	**48**	KIN(0.5 mg/L)+NAA(1 mg/L)
17	BA(1 mg/L)+IBA(0 mg/L)	**49**	KIN(1 mg/L)+IBA(0 mg/L)
18	BA(1 mg/L)+IBA(0.25 mg/L)	**50**	KIN(1 mg/L)+IBA(0.25 mg/L)
19	BA(1 mg/L)+IBA(0.5 mg/L)	**51**	KIN(1 mg/L)+IBA(0.5 mg/L)
20	BA(1 mg/L)+IBA(1 mg/L)	**52**	KIN(1 mg/L)+IBA(1 mg/L)
21	BA(1 mg/L)+NAA(0 mg/L)	**53**	KIN(1 mg/L)+NAA(0 mg/L)
22	BA(1 mg/L)+NAA(0.25 mg/L)	**54**	KIN(1 mg/L)+NAA(0.25 mg/L)
23	BA(1 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	**55**	KIN(1 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)
24	BA(1 mg/L)+NAA(1 mg/L)	**56**	KIN(1 mg/L)+NAA(1 mg/L)
25	BA(2 mg/L)+IBA(0 mg/L)	**57**	KIN(2 mg/L)+IBA(0 mg/L)
26	BA(2 mg/L)+IBA(0.25 mg/L)	**58**	KIN(2 mg/L)+IBA(0.25 mg/L)
27	BA(2 mg/L)+IBA(0.5 mg/L)	**59**	KIN(2 mg/L)+IBA(0.5 mg/L)
28	BA(2 mg/L)+IBA(1 mg/L)	**60**	KIN(2 mg/L)+IBA(1 mg/L)
29	BA(2 mg/L)+NAA(0 mg/L)	**61**	KIN(2 mg/L)+NAA(0 mg/L)
30	BA(2 mg/L)+NAA(0.25 mg/L)	**62**	KIN(2 mg/L)+NAA(0.25 mg/L)
31	BA(2 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)	**63**	KIN(2 mg/L)+NAA(0.5 mg/L)
32	BA(2 mg/L)+NAA(1 mg/L)	**64**	KIN(2 mg/L)+NAA(1 mg/L)



Şekil 3.4 Laminar flow kabin içerisinde steril tüpler ve besin ortamlarının görünümü



Şekil 3.5 Besin ortamlarının tüplere 10 mL olarak dağıtılmasının görünümü

3.4 Eksplantların dikimi ve inkübe edilmesi

H. germanicopolitanum bitkisinin yapraklarından arındırılarak üzerinde en az iki adet göz (tomurcuk) bulunduran nod ve sürgün uçları eksplant kaynağı olarak sterilizasyon aşamasından sonra tüplere dikilmiştir (Şekil 3.6). Rejenerasyon kapsamında tüm kültürler 25±1ºC sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 µmol·m^{-2}·s^{-1}), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim kabininde (Şekil 3.7) 4 hafta süreyle inkübe edilmiş ve her gün düzenli olarak kontrol edilmiştir.



Şekil 3.6 Aseptik koşullarda *H. germanicopolitanum* bitkisinin dikimi **a)** Laminar flow kabin içerisinde yapraklarından arındırılmış eksplantların tüplere dikimi **b)** Dikim yapılmış eksplantların görünümü

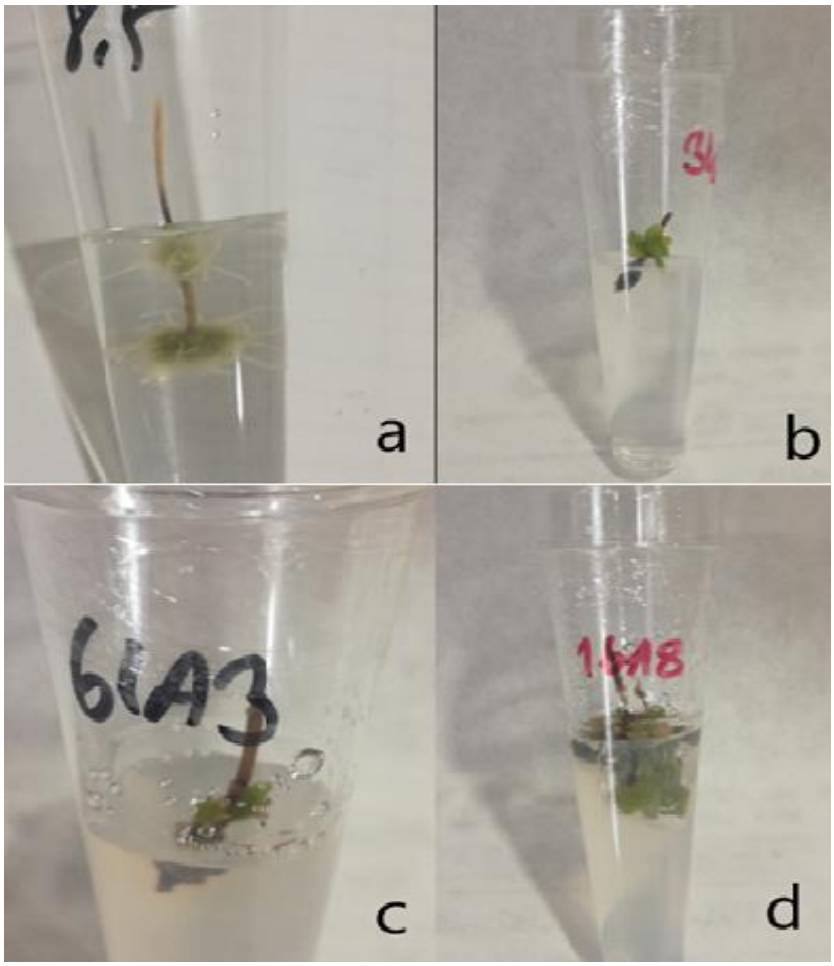


Şekil 3.7 25±1ºC sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 µmol·m^{-2}·s^{-1}), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim kabininde inkübe edilen eksplantlar

3.5 Alt kültür

Yapraklarından arındırılarak sterilizasyonu yapılan ve sonrasında da dikimleri gerçekleştirilen *H. germanicopolitanum* bitkisinin eksplantları, iklim odasında inkübe edilmiş ve günlük olarak kontrol edilmiştir. Eksplantların gelişimleri dikildikleri besin ortamları, MS (Murashige and Skoog 1962), Gamborg's B5 (Gamborg *et al*. 1968), N&N (Nitsch and Nitsch 1969) ve içerdikleri büyüme düzenleyici madde (BDM) kombinasyonlarına bağlı olarak alt kültüre alınarak çoğaltımları hedeflenmiştir.

Başlangıç aşamasını takiben eksplantların sürgün ve kök gelişimini gerçekleştirebilmeleri adına 4 hafta ara ile 3 defa alt kültür yapılmıştır. Alt kültür ortamları; başlangıç aşamasındaki besin ortamları, BDM kombinasyonlarını ve katılaştırıcılarını içermektedir. Sürgün ve kök gelişimi gösteren eksplantlara ait kök uzunluğu, kök sayısı, sürgün uzunluğu ve sürgün sayılarına ait veriler alınmıştır. Bu aşamada doğrudan sürgün gelişimi gösteren eksplantlar (Şekil 3.8) köklendirme ortamlarına aktarılmıştır.

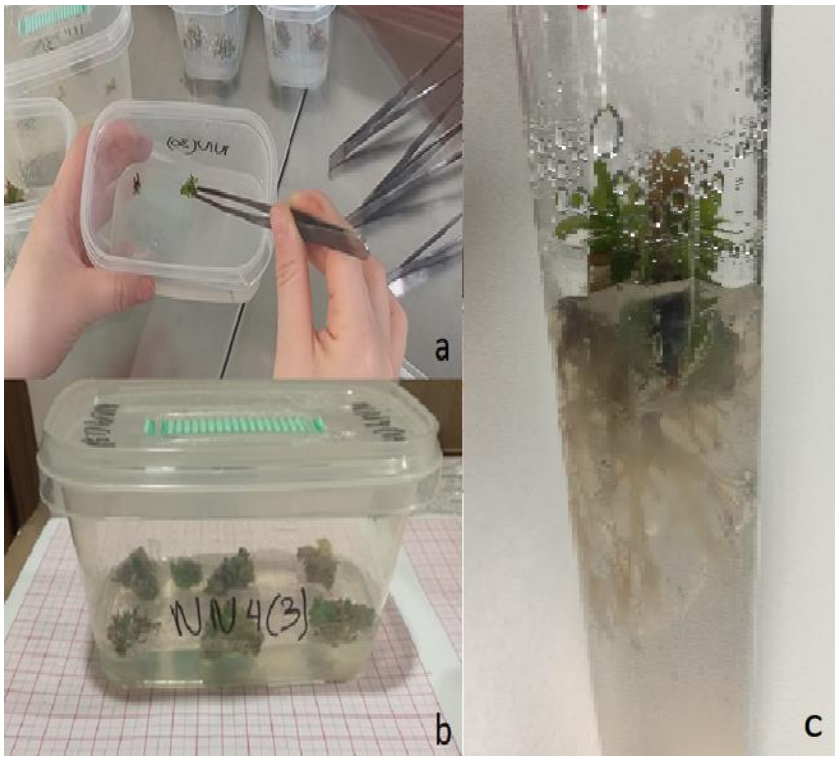


Şekil 3.8 *In vitro* şartlarda gelişim göstermeye başlayan eksplantlar **a)** N&N besin ortamında BA(0 mg/L)+NAA(1 mg/L) BDM kombinasyonunda gelrite ile katılaştırıldığı ortamda kök gelişimi **b)** MS besin ortamında BA(2 mg/L)+NAA(0.5 mg/L) BDM kombinasyonunda agar ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün oluşumu **c)** N&N besin ortamında KIN(2 mg/L)+NAA(0 mg/L) BDM kombinasyonunda agar ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün oluşumu **d)** Gamborg's B5 besin ortamının BA(0.5 mg/L)+NAA(1 mg/L) BDM kombinasyonunun agarlı ortamında kallus oluşumu

3.6 Köklendirme Aşaması

Köklendirme aşamasında ise, sürgün gelişimi gösteren eksplantları, temel besin ortamı içerisine, oksin grubu BDM [Indol-3-butirik asit (IBA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L) - α-naftalenasetik asit (NAA)-(0 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L)] ile birlikte agar veya gelrite ilave edilerek dikimleri yapılmıştır. Dikimler 125x65x80 mm ölçülerinde yaklaşık 120 mL besin ortamı bulunan steril kaplar içerisine yapılmıştır (Şekil 3.9). Bitkiler 4 hafta süre ile köklendirme ortamında tutulmuştur. Köklendirme aşamasında tüm kültürler 25±1^{o}C sıcaklık ve 16 saat aydınlık (6 µmol·m^{-2}·s^{-1}), 8 saat

karanlık koşullara sahip iklim kabininde muhafaza edilmiştir. Bu aşamada sürgün gelişimi de gözlemlenmiştir. Köklenen bitkilerde kök sayıları (adet) ve uzunlukları (cm) ile aynı zaman da sürgün sayısı ve uzunlukları da ölçülmüştür (Şekil 3.10) (Mandal 2013; Stelmaszczuk and Kozak 2013). 4 hafta sonrasında yine aynı kombinasyonları içeren ortamlara aktarılmıştır.



Şekil 3.9 Sürgün gelişimi gösteren eksplantların köklendirme ortamına alınması **a)**N&N besin ortamında IBA (0.5 mg/L) ve gelrite içeren ortama eksplantların aktarılması **b)**Köklendirme amacıyla dikilmiş eksplantlar **c)** N&N besin ortamında KIN(0.5 mg/L)+IBA (0.1 mg/L) BDM kombinasyonu içeren ortamda kök ve sürgün gelişimi



Şekil 3.10 Rejenerasyonu tamamlamış *H.germanicopolitanum* bitkisi **a)**Gamborg's B5 ortamında KIN(0.5 mg/L) + IBA(0.5 mg/L) ve gelrite içeren ortamda bitki rejenerasyonu **b)***H. germanicopolitanum* bitkisinin kök ve sürgün oluşumu

3.7 Aklimitizasyon Aşaması

Sürgün ve kök gelişimi gösteren bitkiler aklimitizasyon aşamasına alınmıştır. Bu aşamada besin ortamından çıkarılan bitkiler, köklerindeki besin ortamı bulaşığından arındırılmak amacıyla önce saf su ile yıkanmıştır. Bitkiler daha sonra hacimce (3:1:1 v/v) oranında çiçek toprağı, kum, perlit karışımdan oluşan ve topraktan geçebilecek herhangi bir kontaminasyonu önlemek amacıyla önceden otoklav ile 121^{o}C ve 1.2 atm. basınç altında 90 dk. süreyle steril edilen karışımına dikilmiştir. Dikim sonrasında bitkiler pisetle günaşırı yaklaşık 50 mL sulanmıştır. Küçük plastik saksılara dikilen bitkilerin üzeri nem kaybını önlemek amacıyla streç filmle sarılmış ve streç filmin üzeri birkaç yerinden delinmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 Rejenere olan bitkilerde aklimitizasyon çalışması

Bitkiler 25^{o} C sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 µmol·m^{-2} s^{-1}), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim kabininde 8 hafta muhafaza edilmiştir (Mandal 2013; Singh ve Dwivedi 2013). Saksıların üzerindeki streç film bu 8 haftalık süre içerisinde bitki gelişimi gözlenerek aşamalı olarak açılmıştır. Bu aşamada saksılar günaşırı olmak üzere sulanmıştır. Dört hafta sonra bitkiler dış ortamda saksılara alınmıştır (Şekil 3.11).

3.8 İstatistiksel Analiz

Denemelerden elde edilen veriler yinelemelerin ortalaması olarak varyans analizi yöntemi (ANOVA) ile SPSS Paket Programı ile F-testine göre kontrol edilmiştir ($P \leq$ 0.05, 0.01, 0.001). Ortaya çıkan önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %5 hata sınırı esas alınarak saptanmış ve farklılıklar harfler yardımıyla belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Eksplantların gelişimleri dikildikleri besin ortamları ve içerdikleri BDM kombinasyonlarına bağlı olarak kallus, sürgün ve kök oluşumları gözlenmiştir. Başlangıç aşamasından sonra yapılan her alt kültür çalışmasında *H. germanicopolitanum*' a ait sürgün ve kök sayıları belirlenmiştir.

4.1 Alt Kültürlerde Sürgün Uzunluğu

H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, eksplantlar başlangıç aşamasından sonra alındıkları alt kültürlerde oluşturdukları sürgün uzunlukları ölçülmüş ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P \leq 0.001$). *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşaması sonrasında sürgün uzunluklarına ait veriler Çizelge 4.1 'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşaması sonrasında sürgün uzunluklarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi ($P \leq 0.001$)

	Besin Ortamı					
	MS		**Gamborg's B5**		**N&N**	
BDM	**Agar**	**Gelrite**	**Agar**	**Gelrite**	**Agar**	**Gelrite**
1	0(i)*	0	0	0(i)	0(i)	0(i)
2	0.3(ghi)	0	0	0	0	0
3	0	0.01(i)	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0.15(i)	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0.05(hi)	0	0
8	0.2(hi)	0	0	0	0	0.05(hi)
9	0	0	0.15(i)	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0.16(i)	0.1(i)	0	0
12	0	0	0	0	0.2(hi)	0
13	0	0.21(i)	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0.03(i)	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0.16(i)	0.18(i)	0	0	0
19	0.5(cde)	0	0.49(cde)	0	0	0
20	0.02(i)	0	0.05(hi)	0	0	0
21	0	0	0	0.1(i)	0	0
22	0.01(i)	0.05(hi)	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0.03(i)
26	0	0	0	0	0.05(hi)	0

27	0.04(hi)	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0.03(i)
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0.25(ghi)	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0.03(i)
40	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	**1.141(a)**	0	0.092(hi)
44	0	0	0	0	0	0
45	0.25(ghi)	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	**0.847(ab)**	0	0
51	0	0.655(bcd)	0	0.431(defg)	0	0
52	0.07(hi)	0	0	0.364(fghi)	0	0
53	0	0	0	0.25(ghi)	0	0.35(fghi)
54	0	0	0	0.75(bc)	0	0.05(hi)
55	0	0	0	0	0	0
56	0	0.05(hi)	0	0.14(hi)	0	0.03(i)
57	0	0	0	0.22(ghi)	0	0.369(efgh)
58	0.06(hi)	0	0	0	0.45(cdef)	0
59	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0.05(hi)
61	0	0.09(hi)	0	0	0	0
62	0	0	0	0.473(cdef)	0.05(hi)	0.02(i)
63	0.07(hi)	0	0.521(cde)	0	0	0.05(hi)
64	0	0	0.280(ghi)	0	0	0

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında bu aşamasında sürgün uzunluklarının "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonunda, Gamborg's B5 besin ortamında KIN (0.5 mg/L) + IBA (0.5 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılan ortamda en iyi sürgün uzunluğu elde edilmiştir. Bununla birlikte yine aynı besin ortamına KIN (1 mg/L) + IBA (0.25 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılmış ortamda da sürgün uzunlukları istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur.

4.2 Alt Kültürlerde Sürgün Sayısı

H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, eksplantlar başlangıç aşamasından sonra alındıkları alt kültürlerde oluşturdukları sürgün sayıları alınmış ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (P≤0.001). *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasında sürgün sayılarına ait veriler Çizelge 4.2'de sunulmuştur.

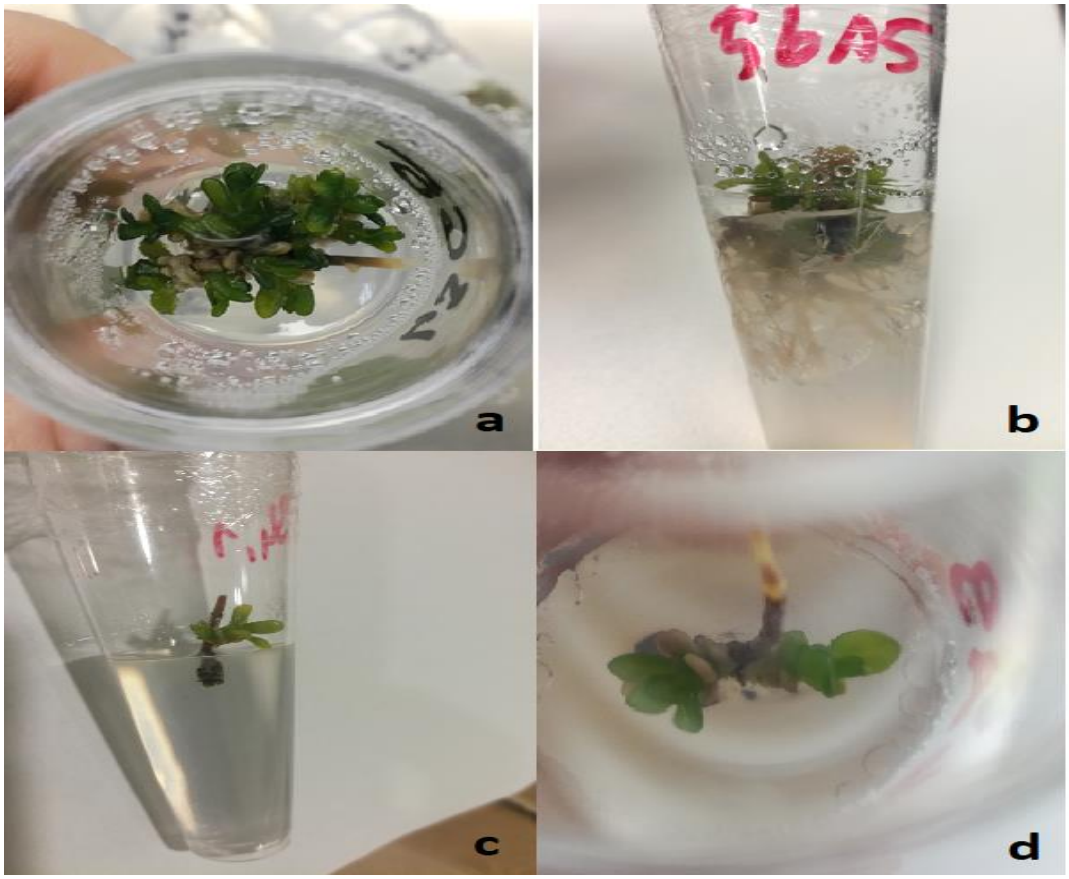
Çizelge 4.2 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasından sonra sürgün sayılarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.001)

	Besin Ortamı					
	MS		**Gamborg's B5**		**N&N**	
BDM	**Agar**	**Gelrite**	**Agar**	**Gelrite**	**Agar**	**Gelrite**
1	0	0	0	0	0(i)	0(i)
2	0.5(hi)*	0	0	0	0	0
3	0	0.5(hi)	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	1.5(ghi)	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0.3(hi)	0	0
8	2.4(ghi)	0	0	0	0	0.1(i)
9	0	0	3.0(fghi)	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	3.1(fghi)	0.5(hi)	0	0
12	0	0	0	0	10.0(defg)	0
13	0	**18.10(ab)**	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0.1(i)	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	11.8(defg)	0.8(hi)	0	0	0
19	**19.5(a)**	0	2.0(ghi)	0	0	0
20	0.1(i)	0	0.4(hi)	0	0	0
21	0	0	0	0.2(i)	0	0
22	1.5(ghi)	0.1(i)	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0.5(hi)
26	0	0	0	0	1.0(hi)	0
27	0.4(hi)	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0.1(i)
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	1.7(ghi)	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
38	0	1.0(hi)	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0.2(i)

40	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	2.353(ghi)	0	15.385(bcd)
44	0	0	0	0	0	0
45	13.5(cdef)	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	3.842(fghi)	0	0
51	0	9.273(defgh)	0	8.308(efghi)	0	0
52	0	0	0	1.786(ghi)	0	0
53	0	0	0	0.5(hi)	0	14.5(cde)
54	0	0	0	1.4(ghi)	0	16.5(bc)
55	0	0	0	0	0	0
56	0	0.1(i)	0	0.7(hi)	0	14.0(cde)
57	0	0	0	0.2(i)	0	**19.062(a)**
58	13.5(cdef)	0	0	0	**18.0(ab)**	0
59	0	0	0	0	0	0
60	0	0.4(hi)	0	0	0	0.2(i)
61	0	4.5(fghi)	0	0	0	0.0
62	0	0	0	3.273(fghi)	8.0(efghi)	0.1(i)
63	0.3(hi)	0	1.929(ghi)	0	0	0.2(i)
64	0	0	3.4(fghi)	0	0	0

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında başlangıç aşamasında sürgün sayılarının "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonunda, MS besin ortamında BA (1 mg/L) + IBA (0.5 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve agar ile katılaştırılan ortamda ve N&N besin ortamında KIN (2 mg/L) + IBA (0 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılan ortamda en iyi sürgün sayısı elde edilmiştir. Bununla birlikte yine MS besin ortamının gelrite ile katılaştırıldığı ve BA(0.5 mg/L) + NAA(0 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ortam ile N&N besin ortamının agar ile katılaştırıldığı KIN(2 mg/L) + IBA(0.25 mg/L) BDM eklenmiş ortamda da sürgün sayıları (Şekil 4.1) istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur.



Şekil 4.1 *In vitro* şartlarda 2. Alt kültür sonunda sürgün gelişimi **a)** N&N besin ortamında KIN(0.5 mg/L)+IBA(0.5 mg/L) BDM kombinasyonunda gelrite ile katılaştırıldığı ortamda sürgün gelişimi **b)** MS besin ortamında KIN(1 mg/L)+NAA(1 mg/L) BDM kombinasyonunda agar ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün ve kök oluşumu **c)** MS besin ortamında BA(1 mg/L) + NAA(0 mg/L) BDM kombinasyonunda agar ile katılaştırıldığı ortamlarda sürgün oluşumu **d)** MS besin ortamının BA(1 mg/L)+NAA(0.25 mg/L) BDM kombinasyonunun agarlı ortamında sürgün oluşumunun görünümü

4.3 Alt Kültürlerde Kök Uzunluğu

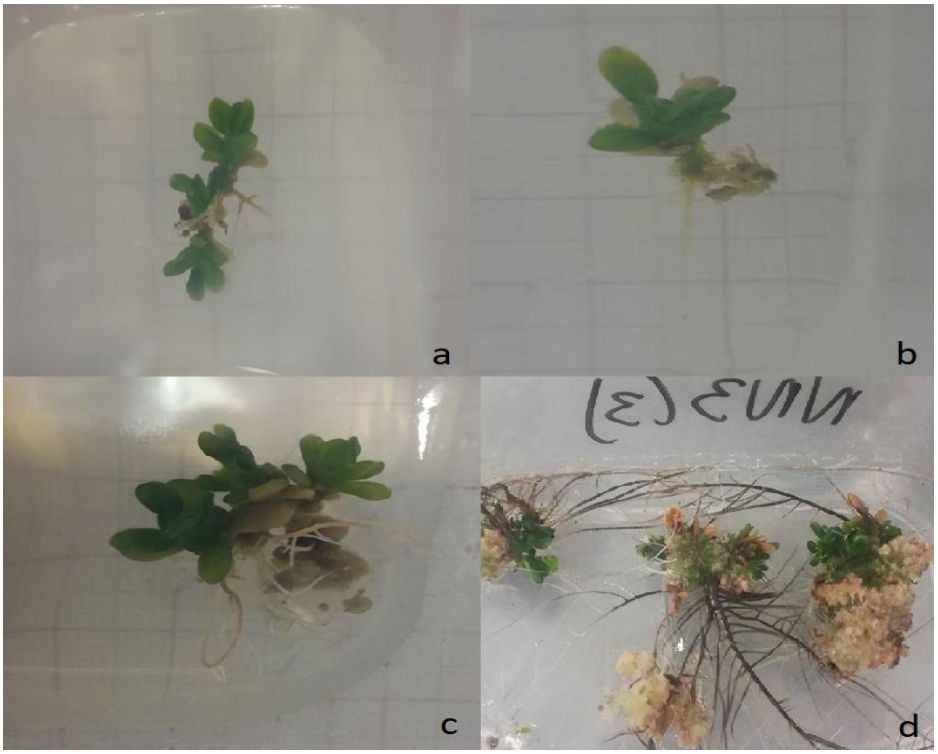
H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, eksplantlar başlangıç aşamasından sonra alındıkları alt kültürlerde oluşturdukları kök uzunlukları ölçülmüş ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P \leq 0.05$). *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasında kök uzunluklarına ait veriler Çizelge 4.3' de sunulmuştur.

Çizelge 4.3 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasında kök uzunluklarına ait "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05)

	Katılaştırıcı	
Besin Ortamı	**Agar**	**Gelrite**
MS	0(c)*	0(c)
Gamborg's B5	0.002(b)	0(c)
N&N	0(c)	**0.004(a)**

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında başlangıç aşamasında kök uzunluklarının (Şekil 4.2) "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonunda, N&N besin ortamında katılaştırıcı olarak gelrite kullanılan ortamlarda istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur.



Şekil 4.2 Köklendirme ortamına alınan eksplantların kök ve sürgün gelişimi ile bitkiye dönüşmeleri **a)** N&N besin ortamında IBA(0.5 mg/L) ve agar içeren ortamda sürgün ve kök gelişimi **b)** MS besin ortamında NAA(0.5 mg/L) ve gelrite içeren ortamda sürgün ve kök gelişimi **c)** MS besin ortamında IBA(0.5 mg/L) ve agar içeren ortamda sürgün ve kök gelişimi **d)** N&N besin ortamında IBA(1 mg/L) ve gelrite içeren ortamda sürgün ve kök gelişiminin görünümü

4.4 Alt Kültürlerde Kök Sayısı

H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, eksplantlar başlangıç aşamasından sonra alındıkları alt kültürlerde oluşturdukları kök sayıları alınmış ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (P≤0.05). *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasında kök sayılarına ait veriler Çizelge 4.4'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında başlangıç aşamasında sürgün sayılarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.001)

	Besin Ortamı					
	MS		**Gamborg's B5**		**N&N**	
BDM	**Agar**	**Gelrite**	**Agar**	**Gelrite**	**Agar**	**Gelrite**
1	0(g)	0(g)	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	**0.5(a)**
9	0	0	**0.4(ab)**	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0.1(cef)	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0.1(cef)	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0.1(cef)	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0.2(bce)	0
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0

40	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0.077(cefg)
44	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0.3(bc)
62	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında başlangıç aşamasında sürgün sayılarının "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonunda, N&N besin ortamında BA(0 mg/L) + NAA(1 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılan ortamda en iyi kök sayısı elde edilmiş ve istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur.

4.4.1 Köklendirme Aşamasında Kök Uzunluğu

H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, alt kültür aşamasından sonra alındıkları köklendirme ortamlarında oluşturdukları kök uzunlukları ölçülmüş ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamada kullanılan IBA ve NAA' in etkilerine, kullanılan doz miktarına, besin ortamına ve katılaştırıcıların etkilerine bakılmıştır. Buna göre "BDM x temel besin ortamı" arasındaki interaksiyonun etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($P \leq 0.05$). *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında kök uzunluklarına ait veriler Çizelge 4.5'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında kök uzunluklarına ait "BDM x temel besin ortamı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05)

	Büyüme Düzenleyici Madde (BDM)	
Besin Ortamı	**NAA**	**IBA**
MS	0.223(e)*	0.685(cde)
Gamborg's B5	0.538(de)	**1.914(a)**
N&N	0.749 (bcd)	0.972(bc)

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında köklendirme aşamasında kök uzunluklarının "BDM x temel besin ortamı" arasındaki interaksiyon, istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. IBA'in NAA'e göre kök gelişimde etkisi daha etkili olmuştur. Besin ortamlardan Gamborg's B5'in potasyum ve amonyumca diğer ortamlara göre daha zengin oluşu köklenmeyi artırıcı etki göstermiştir.

4.4.2 Köklendirme Aşamasında Kök Sayısı

H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, alt kültür aşamasından sonra alındıkları köklendirme ortamlarında oluşturdukları kök sayıları alınmış ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamada kullanılan IBA ve NAA'nın etkilerine, kullanılan doz miktarına, besin ortamına ve katılaştırıcıların etkilerine bakılmıştır. Buna göre "BDM x BDM Dozu x temel besin ortamı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05) ile birlikte "BDM Dozu x temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi de istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (P≤0.05). *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında kök sayılarına ait veriler Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7' de sunulmuştur.

Çizelge 4.6 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında kök sayılarına ait "BDM x BDM Dozu x temel besin ortamı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05)

	Besin Ortamı					
	MS		**Gamborg's B5**		**N&N**	
BDM Dozu	NAA	IBA	NAA	IBA	NAA	IBA
0 mg/L	5.0(de)*	2.25(efg)	0(g)	0(g)	0(g)	0(g)
0.25 mg/L	0.833(fg)	3.667(efg)	0(g)	0(g)	1.4(fg)	4.0(efg)
0.5 mg/L	3.429(efg)	**15.0(a)**	6.0(de)	**16.25(a)**	12.333(bc)	5.877(de)
1 mg/L	0(g)	1.8(fg)	5.067(de)	10.042(bc)	12.839(bc)	11.230(bc)

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

Çizelge 4.7 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında kök sayılarına ait "BDM Dozu x temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05)

	Besin Ortamı					
	MS		**Gamborg's B5**		**N&N**	
BDM Dozu	**Agar**	**Gelrite**	**Agar**	**Gelrite**	**Agar**	**Gelrite**
0 mg/L	2.5(fghi)*	0(i)	0(i)	0(i)	0(i)	0(i)
0.25 mg/L	5.381(fg)	1.833(ghi)	0(i)	0(i)	4.25(fgh)	1.15(hi)
0.5 mg/L	1.25(hi)	**30.0(a)**	4.0(fgh)	17.25(b)	9.406(cde)	8.803(cde)
1 mg/L	0(i)	1.8(ghi)	4.275(fg)	10.833(cd)	11.659(cd)	12.411(cd)

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında köklendirme aşamasında kök sayılarının "BDM x BDM Dozu x temel besin ortamı" arasındaki interaksiyon ile birlikte "BDM Dozu x temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkileri istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Köklenmede besin ortamlarının etkisinin yanı sıra kullanılan oksin grubu BDM etkili olmuştur. BDM'nin 0.5 mg/L dozu tüm denemelerde (Çizelge 4.6) olumlu sonuç verirken MS besin ortamının gelrite ile katılaştırıldığı ortamda ve Gamborg's B5 ortamında da (Çizelge 4.7) kök sayısı bakımından yine en iyi sonuçları vermiştir. Köklendirme çalışmalarında Gamborg's B5 ve MS ortamlarına ilave edilen 0.5 mg/L IBA ve katılaştırıcı olarak gelrite kullanımı *H. germanicopolitanum*' da köklendirme başarısı için yeterli olmuştur.

4.4.3 Köklendirme Aşamasında Sürgün Uzunluğu

H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, alt kültür aşamasından sonra alındıkları köklendirme ortamlarında oluşturdukları sürgün uzunlukları ölçülmüş ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamada kullanılan IBA ve NAA'in etkilerine, kullanılan doz miktarına, besin ortamına ve katılaştırıcıların etkilerine bakılmıştır. Buna göre "BDM x temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (P≤0.05). *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında sürgün uzunluklarına ait veriler Çizelge 4.8'da sunulmuştur.

Çizelge 4.8 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında sürgün uzunluklarına ait "BDM x temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05)

	Besin Ortamı					
	MS		Gamborg's B5		N&N	
BDM	Agar	Gelrite	Agar	Gelrite	Agar	Gelrite
IBA	0.312(def)*	0.513(bc)	0.046(f)	**0.572(ab)**	0.325(cdef)	0.416(bcd)
NAA	0.204(ef)	0.405(bcd)	**0.599(ab)**	0.367(cde)	0.313(def)	**0.636(a)**

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında köklendirme aşamasında sürgün uzunluklarının "BDM x temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyon, istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. NAA'in IBA'e göre sürgün gelişimde etkisi daha iyi olmuştur. Besin ortamlardan N&N sürgün gelişimi bakımından en iyi grubu oluştururken, Gamborg's B5 besin ortamında da sürgün uzunlukları N&N besin ortamına oldukça yakın miktarda meydana gelmiştir.

4.4.4 Köklendirme Aşamasında Sürgün Sayısı

H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, alt kültür aşamasından sonra alındıkları köklendirme ortamlarında oluşturdukları sürgün sayıları alınmış ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamada kullanılan IBA ve NAA'in etkilerine, kullanılan doz miktarına, besin ortamına ve katılaştırıcıların etkilerine bakılmıştır. Buna göre "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (P≤0.05). *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında sürgün sayılarına ait veriler Çizelge 4.9'da sunulmuştur.

Çizelge 4.9 *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında sürgün sayılarına ait "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (P≤0.05)

	Katılaştırıcı	
Besin Ortamı	Agar	Gelrite
MS	11.296(cd)*	6.950(e)
Gamborg's B5	**29.842(a)**	11.696(cd)
N&N	15.993(b)	10.224(de)

*Farklı harfler uygulamalar arasındaki farklılığı göstermektedir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında köklendirme aşamasında sürgün uzunluklarının "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonunda, Gamborg's B5 besin ortamında katılaştırıcı olarak agar kullanılan ortamlarda istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Sürgün sayısı bakımından oldukça çok sayıda kardeşlenen eksplantlar yoğun ve klonal bir üretim için oldukça yeterli olacağı gözlenmiştir.

4.5 Aklimitizasyon

Sürgün ve kök gelişimi bakımından *H. germanicopolitanum* bitkisini en iyi temsil eden 100 adet bitki aklimitizasyon aşamasına alınmıştır. Bitkiler sera aşamasından sonra dış koşulara dikilmişlerdir. Bu bitkilerden 32 tanesi dış koşullara uyum göstermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Aklimitizasyon aşamasında dış koşullara uyum gösteren *H. germanicopolitanum* bitkisi

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma lokal endemik ve tehlike altındaki bitkiler listesinde **(EN)** yer alan tıbbi ve aromatik özellikleri olan *Helianthemum germanicopolitanum* Bornm. bitkisinin sürgün uçları ve nodlarının eksplant kaynağı olarak kullanılarak, değişik dozlarda ayarlanmış bitki büyüme düzenleyiciler ve organik maddeler içeren farklı besin ortamlarında kültüre alınarak çoğaltımını amaçlanmıştır.

Bitkinin sürgün, nod ve apikal kısımları birçok bitkide olduğu gibi *Helianthemum* sp. cinslerinde de doku kültürü ile çoğaltım aşamasında başlangıç eksplantı olarak başarıyla kullanılmaktadır (Morte *et al.* 1994, Hamza *et al.* 2012, Martinez *et al.* 2012, Hamza *et al*. 2013, Hamza *et al*. 2014, Salih *et al.* 2019). Bu kapsamda sürgünler kullanılarak *in vitro* çoğaltım amaçlı 1992 yılından günümüze kadar yapılan çalışmalar güncelliğini koruyarak devam etmektedir.

Çankırı ili sınırları içerisinde lokal endemik olarak yetişen *H. germanicopolitanum*, genellikle Mayıs ayının son iki haftası içerisinde tam çiçeklenme dönemine ulaşarak fizyolojik anlamda gelişimini tamamlamaktadır. Tam çiçekli ve sürgünlerinin taze olarak kaldığı Mayıs ve Temmuz ayları içerisinde *in vitro* çoğaltım amacı ile araziden laboratuvar ortamına getirilen bitkilerin sterilizasyonu aşamasında enfeksiyon ile karşılaşılmıştır. Bitkinin *in vitro* şartlarda gelişim gösterebilmesi için enfeksiyon sorunun aşılması gerekmiştir. Gözlemlerimizde enfeksiyonun, eksplant üzerindeki yaprakların besin ortamına temas edenlerde hemen gerçekleştiği belirlenmiştir. Aynı zamanda bu yaprakların besin ortamına tam olarak temas etmediği De Wit (Duchefa®) tüplerinde de enfeksiyonun oluşma zamanının birkaç gün ötelendiği fark edilmiştir. Yani enfeksiyonun temel kaynağının aslında, eksplant üzerinde bulunan yaprakların tüysü yapısı ve yaprak koltuklarında yerleşmiş olan fungustan kaynaklı olduğu anlaşılmıştır. Tüpler içerisinde fungus hiflerinin oluşumları gözlenmiştir. Bu nedenle, uygulanan sterilizasyon protokolü literatür taramaları yapılarak modifiye edilmiştir (Şekil 3.3). Sterilizasyon probleminin giderilmesinin ardından bitkiler MS, Gamborg's B5 ve NN temel besin ortamlarına 64 farklı kombinasyonda hazırlanan büyüme düzenleyici madde eklenmiştir. Bu ortamlara agar ve gelrite ilave edilerek

katılaştırılmaları sağlanmıştır. Denemede tüm kombinasyonlar onar tekerrürlü olarak hazırlanmıştır.

H. germanicopolitanum eksplantlarında başlangıç aşamasında sürgün uzunluklarına ait "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonun etkisi (Çizelge 4.1) Gamborg's B5 besin ortamında KIN(0.5 mg/L) + IBA(0.5 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılan ortamda en iyi sürgün uzunluğu elde edilmiştir. Bununla birlikte yine aynı besin ortamına KIN(1 mg/L) + IBA(0.25 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılmış ortamda da sürgün uzunlukları istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Başlangıç aşamasında *in vitro* çoğaltım için Gamborg's B5 besin ortamındaki farklı BDM dozlarında en başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Gamborg's B5'in potasyum ve amonyumca diğer ortamlara göre daha zengin oluşu köklenmeyi ve sürgün oluşumunu artırıcı etki gösterdiğini düşünmekteyiz. Martinez *et al.* (2012), Hamza *et al.* (2013) ve Salih *et al.* (2019)'un yaptıkları çalışmalar da sadece MS ve DKW besin ortamlarını kullanmışlardır. Çalışmamızda ise üç farklı besin ortamı kullanarak *H. germanicopolitanum*' un *in vitro* çoğaltımı için BDM kombinasyonlarıyla birlikte bir optimizasyon çalışması ortaya konulmuştur.

H. germanicopolitanum eksplantlarında başlangıç aşamasında sürgün sayılarının "temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonunda (Çizelge 4.2), MS besin ortamında BA(1 mg/L) + IBA(0.5 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve agar ile katılaştırılan ortamda (sürgün sayısı **19.5**) ve N&N besin ortamında KIN (2 mg/L) + IBA (0 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılan ortamda en iyi sürgün sayısı (**19.062**) elde edilmiştir. Bununla birlikte yine MS besin ortamının gelrite ile katılaştırıldığı ve BA(0.5 mg/L) + NAA(0 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ortam (**18.10**) ile N&N besin ortamının agar ile katılaştırıldığı KIN(2 mg/L) + IBA(0.25 mg/L) BDM eklenmiş ortamda da sürgün sayıları (**18.0**) istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Çalışmamızdan farklı besin ortamı olarak Martinez *et al.* (2012) *H. marminorense'*de yaptıkları çalışmada WPM ortamında 0.5 mg/L 2iP BDM içeren ortamda en iyi sürgün gelişimini gözlemlemişlerdir. Çalışmamıza paralel olarak ise Hamza *et al*. (2013) *Helianthemum lippii* L. var

sessiliforium‘de yaptıkları çalışmada 0.5 ve 1.0 mg/L BAP içeren MS ortamında, Salih *et al.* (2019) *H. lippii* L. var *sessifolium’*da yaptıkları çalışmada en yüksek sürgün gelişimini yine aynı ortamda alt kültüre alınan BA’nin farklı dozlarında (0.5-1.0-1.5-2.0 mg/L) meydana geldiğini ifade etmişlerdir.

H. germanicopolitanum eksplantlarında başlangıç aşamasında en iyi kök sayısı ve kök uzunluğunun “temel besin ortamı x BDM kombinasyonu x katılaştırıcı” arasındaki interaksiyonunda (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4), N&N besin ortamında BA(0 mg/L) + NAA(1 mg/L) BDM kombinasyonu bulunan ve gelrite ile katılaştırılan ortamda en iyi kök sayısı (**0.5**) elde edilmiş ve istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. *H. germanicopolitanum* eksplantların da başlangıç aşamasında kök uzunluklarının “temel besin ortamı x katılaştırıcı” arasındaki interaksiyonunda, N&N besin ortamında katılaştırıcı olarak gelrite kullanılan ortamlarda istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Hamza *et al.* (2013) *Helianthemum lippii* L. var *sessiliforium* da yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında en iyi kök gelişimi ve en yüksek kök uzunluğunu BDM içermeyen MS ortamında elde etmişlerdir. Köklendirme çalışmalarında Gamborg’s B5, MS, N&N besin ortamına ilave edilen 0.5 mg/L IBA ve katılaştırıcı olarak gelrite kullanımı *H. germanicopolitanum*’da köklendirme başarısı için yeterli olacaktır. Martinez *et al.* (2012) *H. marminorense*’ de yaptıkları çalışmada, WPM ortamında BDM içermeyen ortamda en iyi kök sayısı ve kök gelişimini gözlemlemişlerdir. Hamza *et al.* (2015) de *H. kahiricum* ‘da 1 mg/l IBA içeren MS ortamında gözlemlemişlerdir bunun yanı sıra çalışmamıza paralel olarak 1 mg/L NAA kullanılarak hazırlanan MS ortamında da önemli derecede gelişim gözlemişlerdir.

H. germanicopolitanum in vitro çoğaltımında, alt kültür aşamasından sonra alındıkları köklendirme ortamlarında oluşturdukları kök sayıları alınmış ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamada kullanılan IBA ve NAA’in etkilerine, kullanılan doz miktarına, besin ortamına ve katılaştırıcıların etkilerine bakılmıştır. Köklenmede besin ortamlarının etkisinin yanı sıra kullanılan oksin grubu BDM etkili olmuştur. BDM’nin 0.5 mg/L dozu tüm denemelerde (Çizelge 4.6) olumlu sonuç verirken MS besin ortamının gelrite ile katılaştırıldığı ortamda (kök sayısı **30**) ve Gamborg’s B5 ortamında da (Çizelge 4.7) kök sayısı bakımından yine en iyi sonuçları

vermiştir. Köklendirme çalışmalarında Gamborg's B5 (kök sayısı **16.25**) ve MS (kök sayısı **15**) ortamlarına ilave edilen 0.5mg/L IBA ve katılaştırıcı olarak gelrite kullanımı *H. germanicopolitanum'* da köklendirme başarısı için başarılı olmuştur. Bunun yanı sıra *H. germanicopolitanum* eksplantlarında köklendirme aşamasında sürgün uzunluklarının "temel besin ortamı x katılaştırıcı" arasındaki interaksiyonunda (Çizelge 4.9), Gamborg's B5 besin ortamında katılaştırıcı olarak agar kullanılan ortamlarda (sürgün uzunluğu **29.842**) istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Sürgün sayısı bakımından oldukça çok sayıda kardeşlenen eksplantlar yoğun ve klonal bir üretim için oldukça başarılı gözükmektedir.

Aklimitizasyon aşamasında sürgün ve kök gelişimini tamamlayan bitkilere dış koşullara alıştırma uygulaması yapılmıştır. Fizyolojik olarak düzgün gelişim gösteren bitkilerden %32'si başarılı bir şekilde aklimitize edilmiştir.

Sonuç olarak TÜBİTAK tarafından hazırlanan Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesinde de (Anonim 2011), sürdürülebilir kalkınma hedefi doğrultusunda, "Gen kaynaklarının karakterizasyonu, muhafazası ve biyolojik çeşitliliğin korunmasına yönelik teknolojiler geliştirebilmek" hedefi belirtilmiştir. Bu çalışmada, tıbbi ve aromatik özelliklerinin yanı sıra IUCN tarafından yok olma tehlikesi altındaki (endangered, **EN**) bitkiler listesinde bulunan ve lokal endemik olan *Helianthemum germanicopolitanum* Bornm. bitkisinin *in vitro* çoğaltımı açısından ilk ve tektir. Başlangıç aşamasında kullanılan üç farklı besin ortamı, 64 farklı BDM kombinasyonu ve iki farklı katılaştırıcının denenmesi açısından oldukça kapsamlı bir optimizasyon çalışmasıdır. Bu konu ileride çalışılacak olan *H. germanicopolitanum* ve diğer endemik bitkilerin *in vitro* çoğaltımı ve rejenerasyonu konusundaki araştırmalarda önemli bir ön kaynak olarak kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

Anonim, 2011. Ulusal Gıda Ar-Ge ve Yenilik Stratejisi Ek-3. https://www.tubitak.gov.tr/sites/default/files/ek3_ulusal_gida_arge_yenilik_stratejisi.pdf. Erişim Tarihi:05.10.2019.

Bakış, Y., Babaç, M. T., & Uslu, E. (2011, May). Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES). In Proceedings of the 6th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics, (pp. 136-140), IEEE.

Baytop, T. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevleri, II. Baskı ISBN: 975-420-021- 1.İstanbul, 480s.

Benhammou, B.N., Belyagoubi, L. and Bekkara, F.A. 2014. Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian plants. Journal of Medicinal Plant Research, 8(40); 1198-1207.

Cullen, J., & Coode, M. J. E. 1965. Flora of Turkey and the east Aegean Islands (Vol. 3). Edinburgh University Press.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima,O. 1968. "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell". Experimental Cell Research, 50,151-158.

Göl, C., Yılmaz, H. ve Ediş, S. 2010. Çankırı Karatekin Üniversitesi, Orman Fakültesi Araştırma ve Uygulama Ormanı Topraklarının Bazı Özellikleri ve Sınıflandırması. III. Ulusal Ormancılık Kongresi, 3, 941-952.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi ve Tabiatı Koruma Derneği, Barışcan Ofset, Ankara.

Hamza, A., Hamrouni L., Hanana, M., Hamza, F., Maher, G. and Neffati, M. 2012. "*In vitro* micropropagation of *Helianthemum lippii* L. var *sessiliforuim* (Cistaceae):valuable pastoral plant". Middle-East Journal of Scientific Research, 11(5); 652-655.

Hamza, A., Maher, G. and Neffati, M. 2013. "Micropropagation of *Helianthemum lippii* L. var *sessiliforuim* (Cistaceae) an important pastoral plant of North African arid areas". African Journal of Biotechnology, 12(46); 6468-6473.

Hamza, A. and Neffati, M. 2014. "Prospects of increasing the presence of *Helianthemum kahiricum* Dell. pastoral North African plant by means of micropropagation". African Journal of Biotechnology, 13(7); 827-833.

Hussain, A., I.A. Qarshi, H. Nazir, I. Ullah, M. Rashid and Z.K. Shinwari. 2013. In vitro Callogenesis and Organogenesis in *Taxus wallichiana* Zucc. The Himalayan Yew. Pak. J. Bot.,45(5); 1755-1759.

İnan, E., İpek, G. ve İpek, A. 2012. Çankırı'nın Endemik Tıbbi Bitkileri. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5 (2); 38-40.

Iriondo, J.M., Prieto, C. and Pérez, G. 1995. *In vitro regeneration* of *Helianthemum Polygonoides* Peinado et al an endangered salt meadow species. Botanic Gardens Micropropagation News, 2(1); 2-5, United Kingdom.

Javidnia, A., Nasiri, R. and Miri, A. 2007. Jamalian composition of the essential oil of *Helianthemum kahiricum*. Journal of Essential Oil Research, 19(1); 52-53.

Kadan, J., Dorion, M. and Bigot, C. 1991. In vitro propagation of *Cistus* × *purpureus* Lam. Scientia Horticulturae, 46(1-2); 155-160.

Madesis, P., Konstantinidou, E., Tsaftaris, A. and Obeidat, I. N. 2011. Micropropagation and shoot regeneration of *Cistus creticus* ssp. Creticus Elpiniki, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(8); 54.

Mandal, J. 2013. *In vitro* flowering and micropropagation of *Hyptis suaveolens* (Linn.) Poit. An important medicinal herb. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 19(3); 233-247.

Martinez, S.F., Cano, M. and Casas, J. L. 2012. "*In vitro* propagation of *Helianthemum marminorense*" . Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 21(2);300-304.

Meckes, M. 1999. Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. Phytotherapy Research, 13(2);102-105.

Moraga, A.R., Argandona, J., Mota, B., Perez, J., Verde, A., Fajardo, J., Navarroa, J.G., Lopez, R.C., Ahrazem, O., and Gomez, G.L. (2013). Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activitiesof extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. Journal of ethnopharmacology, 148(1); 287-296.

Morte, M.A. and Honrubia, M. 1992. *In vitro* propagation of *Helianthemum almeriense* Pau (Cistaceae). Agronomie, EDP Sciences 12(10); 807-809.

Morte, M. A., Cano, A., Honrubia, M. and Torres, P. 1994. In vitro mycorrhization of micropropagated *Helianthemum almeriense* plantlets with *Terfezia claveryi* (desert truffle). Agricultural Science in Finland, 3(3); 309-314.

Morte, A., Lovisolo, C., Schubert, A. 2000. "Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association Helianthemum almeriense-Terfezia claveryi", Mycorrhiza, 10(3);115-119.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". Physiologia Plantarum, 15(3); 473-497.

Nitsch, J.P. and Nitsch, C. 1969. "Haploid plants from pollen grains". Science 163(3862); 85-87.

Pandey, B.N. and Singh, N.B. 2012. "Micropropagation of *Dendrocalamus strictus* nees from mature nodal explants". Journal of Applied and Natural Science, 4(1); 5-9.

Ruta, C. and Irene, M.F. 2010. In vitro propagation of *Cistus clusii* Dunal, an endangered plant in Italy. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 46(2); 172-179.

Sahraroo, A., Mirjalili, M.H., Corchete, P., Babalar, M. and Fattahi Moghadam, M.R. 2015. "Establishment and characterization of a Satureja khuzistanica Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new *in vitro* source of rosmarinic acid". Cytotechnology, 68(4); 1415-1424.

Salih, A. M. A., Omran, Z. S.and Al-Ani K.N. 2019. Micropropagation of *Helianthemum lippii* L. var *sessifolium*. Journal of Biology and Life Science, 10(1); 33-39.

Sezgin, M. and Dumanoğlu, H. 2014. "Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.)", *In vitro* Cell.& Dev. Biol. Plant. 50(1); 58-68.

Singh, P. and Dwivedi, P. 2013. "Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of Stevia rebaudiana, an anti-diabetic medicinal herb". Biotech, 4(4); 431-437.

Slama, C.A., Goraia, M., Fortasb, Z., Boudabousc, A., Neffati, M. 2012. Growth, root colonization and nutrient status of *Helianthemum sessiliflorum* Desf. Inoculated with adesert truffleTerfezia boudieri. Saudi Journal of Biological Sciences 19(1); 25-29.

Stelmaszczuk, M. and Kozak, D. 2013. "Micropropagation of Allium neapolitanum Cirillo", Acta Sci Pol Hortorum Cultus, 12, 193-206.

Thengane, S.R., Joshi, M.S., Khuspe, S.S. and Mascarenhas, A.F. 1994." Anther culture in Helianthus annuus L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration". Plant Cell Reports, 13(3-4); 222-226.

Turgeman, T., Ben Asher, J., Roth Bejerano, N., Kagan-Zur, V., Kapulnik, Y. and Sitrit, Y. 2012. Mycorrhizal association between the desert truffle Terfezia boudieri and *Helianthemum sessiliflorum* alters plant physiology and fitness to arid conditions. Mycorrhiza, 21(7); 623-630.

Yeşilyurt, E.B., Erik, S., Özmen, E., Akaydın and G. 2015. Cite as Comparative morphological, palynological and anatomical characteristics of Turkish rare endemics *Helianthemum germanicopolitanum* and *Helianthemum antitauricum* (Cistaceae). Plant Systematics and Evolution, 301(1); 125–137.

Zygomala, A.M., Ioannidis C. and Koropouli X. 2003. Rapid in vitro multiplication of *Cistus ladanifer* L. var. maculates Dun, I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. eds A.S. Economou and P. E., 391-396.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emine KAPDAN
Doğum Yeri: Çankırı
Doğum Tarihi: 29.06.1989
Medeni Hali: Evli
Yabancı Dili: İngilizce
Adres: Buğday Paz. Mah. Yıldız Sok. Berat Apt. Kat 3 No: 8
Tel: 0545 212 10 70
E-posta: yarenef.180707@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise: Çankırı 15 Temmuz Şehitleri Anadolu Lisesi
Ön Lisans: Hitit Üniversitesi MYO Harita-Kadastro Programı
Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Formasyon: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Eğitim Fakültesi
Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Yayınları (SCI ve diğer)

1- Sözlü Sunum: **Kapdan, E.,** Sezgin, M., Kahya, M. (2019). "Ardıç (*Juniperus* L.) türlerinin halk arasında ve modern tıp'ta hastalıkların tedavisinde kullanımı", 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian BioChe 2019) June 28-29, 2019/Ankara, Turkey.

2- Makale: Sezgin, M., ve **Kapdan, E**. (2019). "Propagation of some medicinal and aromatic plants in Turkey by biotechnology methods", Commagane Journal of Biology, 3(2);124-131.