



**T. C.**

**ORDU ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLER VE SODYUM  
ALJİNATLA KAPLAMANIN *CISTUS CRETICUS*  
KOTİLEDON EKSPANTLARININ *İN VİTRO*  
REJENERASYONUNA ETKİSİ**

**İLKNUR TÜRKMEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TARLA BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI**

**ORDU 2024**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**İLKNUR TÜRKMEN**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### FARKLI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLER VE SODYUM ALJİNATLA KAPLAMANIN *CISTUS CRETICUS* KOTİLEDON EKSPLANTLARININ *İN VİTRO* REJENERASYONUNA ETKİSİ

İlknur TÜRKMEN

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 49 SAYFA

(Prof. Dr. Şevket Metin KARA)

Türkiye florasında doğal olarak bulunan Cistaceae (Ladengiller) familyasının bir üyesi olan *Cistus creticus* L. (pembe laden), içerdiği fenolik bileşikler ve uçucu yağlar nedeniyle tıbbi değeri yüksek olan bitkilerden birisidir. Bununla birlikte, bilimsel literatürde pembe ladenin *in vitro* rejenerasyonu konusundaki araştırmalar yetersizdir. Bu çalışma, alginatla kaplamanın ve bazı bitki büyüme düzenleyicilerin pembe ladende *in vitro* rejenerasyon üzerine etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. *In vitro* koşullarda çimlendirilen laden tohumlarından elde edilen kotiledon boğum eksplantları, sodyum aljinatla kaplamalı ve kaplamasız olarak, bitki büyüme düzenleyicilerin (BA, NAA ve TDZ) farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. Eksplantların farklı bitki büyüme düzenleyiciler ve sodyum alginata verdikleri morfolojik tepkiler kapsamında kallus ağırlığı, kök, sürgün, yaprak sayıları ve uzunlukları analiz edilmiştir. Çalışmada denenen bütün uygulamalarda kotiledon eksplantlarında kallus oluşmuş, kök, sürgün, boğum ve yaprak gelişmesi görülmüştür. Bitki büyüme düzenleyicileri bütün özelliklerde önemli farklılıklara yol açmış ancak alginatla kaplamanın etkisi sadece kallus ağırlığında önemli olmuştur. Eksplantların sodyum alginatla kaplanması, kök sayısı ve kök uzunluğu dışındaki özelliklerde, bitki büyüme düzenleyicilerin etkisini artırmıştır. Bu araştırma, *C. creticus* türünde sodyum alginatla kaplanmış kotiledon eksplantlarının farklı bitki büyüme düzenleyiciler içeren MS ortamında kültüre alınmasına ilişkin ilk çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** Cistaceae, Eksplant Kaplama, Pembe Laden, Sodyum Aljinat

## ABSTRACT

### EFFECT OF DIFFERENT PLANT GROWTH REGULATORS AND SODIUM ALGINATE ENCAPSULATION ON *IN VITRO* REGENERATION OF *CISTUS CRETICUS* COTYLEDON EXPLANTS

İlknur TÜRKMEN

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

FIELD CROPS

MASTER THESIS, 49 PAGES

(Prof. Dr. Şevket Metin KARA)

*Cistus creticus* L. (pink laden), a member of the Cistaceae family naturally found in the flora of Turkey, is one of the plants with high medicinal value due to its phenolic compounds and essential oils. However, there is a lack of information in the scientific literature regarding *in vitro* regeneration of pink laden. This study was carried out to determine the effect of alginate encapsulation and plant growth regulators on *in vitro* regeneration of pink laden. Cotyledon internode explants obtained from *in vitro* germinated pink laden seeds were cultured in MS medium containing different concentrations and combinations of plant growth regulators (BA, NAA and TDZ) with and without sodium alginate encapsulation. The morphological responses of the explants to different plant growth regulators and sodium alginate were analyzed for callus weight, number and length of roots, shoots and leaves. Callus formation and the growth of root, shoot, internode and leaf was observed in cotyledon explants in all treatments tested in the study. Plant growth regulators caused significant differences in all traits, but the effect of alginate encapsulation was significant only in callus weight. Encapsulation the explants with sodium alginate increased the effect of plant growth regulators in all traits except root number and root length. This is the first study on the culture of sodium alginate-encapsulated cotyledon explants of *C. creticus* in MS medium treated with different plant growth regulators.

**Key Words:** Cistaceae, Pink Laden, Seed Coating, Sodyum Aljinat

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında önerileri ve yönlendirmeleriyle yardım ve desteğini benden esirgemeyen, bana inanan değerli danışman hocam Prof. Dr. Şevket Metin KARA'ya çok teşekkür ediyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmamın yürütülmesinde özverili yardım ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve özellikle laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Araştırma Görevlisi Mehmet Muharrem Özcan'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmasından elde edilen verilerin analizlerinin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Fatih ÖNER'e çok teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasında bana yardımcı olan arkadaşım Betül BAŞELİ'ye ve manevi olarak her zaman yanımda olan Tansu UZUN'a teşekkür ediyorum.

Ayrıca, yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar desteğini benden esirgemeyen sevgili eşim Fatih DEMİR'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını, canım annem Fatma TÜRKMEN ve sevgili babam Mehmet TÜRKMEN'e sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	V
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VI
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	VII
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	IX
<b>EKLER LİSTESİ</b> .....	X
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	7
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	13
3.1 Materyal.....	13
3.2 Yöntem .....	13
3.2.1 Kullanılan Alet ve Ekipmanların Hazırlığı.....	13
3.2.2 Tohumların Sterilizasyonu .....	14
3.2.3 Kullanılan Besin Ortamı.....	14
3.2.4 <i>İn Vitro</i> Koşullarda Tohumların Çimlendirilmesi.....	15
3.2.5 <i>İn Vitro</i> Rejenerasyon Çalışması .....	16
3.2.5.1 Kotiledon Yaprak ve Boğum Eksplantlarının İzolasyonu.....	16
3.2.5.2 Kotiledon Boğum Eksplantının Kültüre Alınması.....	17
3.2.5.3 Kotiledon Yaprak Eksplantının Kültüre Alınması.....	18
3.2.6 Sentetik Tohum Kaplama ve Kültüre Alınması.....	19
3.2.7 Kültür Koşulları .....	20
3.2.8 Elde Edilen Bitkilerin Aklimatizasyonu.....	20
3.2.9 Çalışmada İncelenen Parametreler .....	21
3.2.10 İstatistiksel Analizler .....	21
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA</b> .....	22
4.1 Kotiledon Boğum Eksplantlarında <i>İn Vitro</i> Rejenerasyon .....	22
4.1.1 Sürgün Sayısı.....	22
4.1.2 Sürgün Uzunluğu .....	23
4.1.3 Boğum Sayısı .....	25
4.1.4 Yaprak Sayısı .....	26
4.1.5 Yaprak Uzunluğu .....	27
4.1.6 Kök Sayısı .....	28
4.1.7 Kök Uzunluğu .....	29
4.1.8 Kallus Ağırlığı.....	30
4.1.9 Canlılık Oranı.....	31
4.2 Kotiledon Yaprak Eksplantında <i>İn Vitro</i> Rejenerasyon .....	32
4.2.1 Kallus Ağırlığı.....	32
4.3 Elde Edilen Bitkilerin Aklimatizasyonu.....	33
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	37
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	39
<b>EKLER</b> .....	44
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	49

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 3.1 <i>Cistus Creticus</i> Bitkisi ve Çiçeği .....	13
Şekil 3.2 15 Günlük Fidecik.....	16
Şekil 3.3 Kotiledon Boğum Eksplantı.....	16
Şekil 3.4 Kotiledon Yaprak Eksplantı .....	16
Şekil 3.5 Kültüre Alınmış Kotiledon Boğum Eksplantları .....	17
Şekil 3.6 Kültüre Alınmış Kotiledon Yaprak Eksplantları.....	18
Şekil 3.7 Sentetik Tohum Kaplamaya İlişkin Bazı Görseller; A) Kotiledon Boğum Eksplantı B) %3'Lük Sodyum Aljinatta Bekletilmesi C) Steril Mikropipet İle Çekilmesi D) %1,5 Lik Kalsiyum Klorid Çözeltisine Aktarılması E) Çözelti İçerisindeki Sentetik Tohumlar F) Sentetik Tohum .....	19
Şekil 3.8 Aklimatizasyon için Saksılara Aktarılan Laden Bitkileri.....	20
Şekil 3.9 Saksılara Aktarılan Bitkilerin Canlılık Oranı (%) .....	32
Şekil 3.10 Elde Edilen Bitkilerin Dört Haftalık Gelişimi.....	33

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 3.1</b>	Ms Besin Ortamı İçeriği .....	14
<b>Çizelge 3.2</b>	Çalışmada Kullanılan Büyüme Düzenleyicilerin Çözücüleri ve Stok Solüsyonların Saklama Koşulları .....	15
<b>Çizelge 3.3</b>	Kotiledon Boğum Eksplantlarının Kültüre Alındığı MS Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyiciler .....	17
<b>Çizelge 3.4</b>	Kotiledon Yaprak Eksplantlarının Kültüre Alındığı MS Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyiciler.....	18
<b>Çizelge 4.1</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Sayısının Varyans Analizi..	22
<b>Çizelge 4.2</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Oramında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Sayıları .....	23
<b>Çizelge 4.3</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Uzunluğu İçin Varyans Analizi .....	24
<b>Çizelge 4.4</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Uzunlukları (cm).....	24
<b>Çizelge 4.5</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Boğum Sayılarının Varyans Analizi .....	25
<b>Çizelge 4.6</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Boğum Eksplantlarında Boğum Sayıları .....	25
<b>Çizelge 4.7</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Yaprak Sayısı İçin Varyans Analizi. ....	26
<b>Çizelge 4.8</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Yaprak Sayıları.....	26
<b>Çizelge 4.9</b>	Farklı Hormonlarla İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Yaprak Uzunluğunun Varyans Analizi .....	27
<b>Çizelge 4.10</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Yaprak Uzunlukları (mm).....	28
<b>Çizelge 4.11</b>	Farklı Hormonlarla İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kök Sayılarının Varyans Analizi .....	28
<b>Çizelge 4.12</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kök Sayıları .....	29
<b>Çizelge 4.13</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kök Uzunluğunun Varyans Analizi .....	29
<b>Çizelge 4.14</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kök Uzunlukları .....	30
<b>Çizelge 4.15</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kallus Ağırlığının Varyans Analizi	30
<b>Çizelge 4.16</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kallus Ağırlıkları (mg).....	31



<b>Çizelge 4.17</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kotiledon Yaprak Eksplantlarında Kallus Ağırlığının Varyans Analizi.....	32
<b>Çizelge 4.18</b>	Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kotiledon Yaprak Eksplantlarında Tartılan Kallus Ağırlıkları (mg).....	33

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

---

<b>%</b>	: Yüzde
<b>BA</b>	: Benzil adenin
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>dk</b>	: Dakika
<b>HCL</b>	: Hidroklorik asit
<b>IAA</b>	: Indol asetik asit
<b>IBA</b>	: Indol bütirik asit
<b>l</b>	: Litre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>MS</b>	: Murashige ve Skoog
<b>N</b>	: Normalite
<b>NAA</b>	: Naftalen asetik asit
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>NaClO</b>	: Sodyum Hipoklorit
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>ppm</b>	: Milyonda bir kısım
<b>TDZ</b>	: Thidiazuron
<b>w/v</b>	: Ağırlıkça yüzde
<b>μ mol</b>	: Mikromolar

---

## EKLER LİSTESİ

### Sayfa

<b>EK 1:</b> Çalışmadan elde edilen sentetik tohumların alt kültüre alınmadan önce oluşturdukları sürgün, kök, yaprak gibi yapılarının bazı görselleri.....	45
<b>EK 2:</b> Çalışmada yaprak eksplantından elde edilen kallus yapılarına ait bazı görseller .....	46
<b>EK 3:</b> Kaplanmamış kotiledon boğum eksplantından sadece MS ortamında elde edilen bitkilere ait bazı görseller .....	47
<b>EK 4:</b> Kaplanmış kotiledon boğum eksplantından sadece MS ortamında elde edilen bitkilerin bazı görselleri .....	48

## 1. GİRİŞ

İlman iklim kuşağında yer alan ve üç farklı fitocoğrafik bölgenin kesişme noktasında bulunan Türkiye, çok farklı iklim tiplerini ve toprak yapılarını bünyesinde barındırmaktadır (Uçar ve Turgut, 2009). Bu nedenle bitki çeşitliliği oldukça fazladır ve Türkiye çok sayıda bitkinin gen merkezidir. Anadolu'nun zengin bitki örtüsü çeşitliliği ve farklı iklim tipleri ülkenin farklı bölgelerinde çok farklı tıbbi ve aromatik bitkinin doğal olarak yetişebilmesine imkân sağlamaktadır (Karık ve ark., 2016). Gıda, kozmetik, parfümeri, geleneksel ve modern tıpta ilaç olarak kullanımının yanı sıra çok çeşitli alanlarda önem arz eden bazı hammaddenin kaynağını oluşturan tıbbi ve aromatik bitkilere olan talep giderek artmaktadır. Bununla birlikte, artan talep, tıbbi ve aromatik bitki türlerinin doğadan aşırı ve bilinçsizce toplanmasına ve doğal florada birçok bitki türünün neslin azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, özellikle endemik ve nesli azalma veya yok olma tehlikesi altında olan değerli tıbbi ve aromatik bitki türlerinin kültür şartlarında üretim imkanlarının ortaya konulması ve diğer taraftan da *in vitro* çoğaltım yöntemlerinin belirlenmesi önemli öncelikler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Cistaceae (Ladengiller) familyası, Kuzey Yarım Küre'de kalan Akdeniz iklim kuşağının ılıman bölgelerinde yayılış gösteren, bünyesinde 8 cins (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*, *Crocantemum*, *Hudsonia*, *Lechea*) ve 180 tür barındıran, küçük çalı formunda veya otsu bitkilerden oluşmaktadır (Coode, 1988; Tanker ve ark., 2019). Cistaceae familyasının önemli cinslerinden olan *Cistus* cinsinin Türkiye'de 5 tür (*Cistus creticus* L., *Cistus parviflorus* Lam., *Cistus salviifolius* L., *Cistus monspeliensis* L. ve *Cistus laurifolius* L.) ile temsil edildiği bilinmektedir (Sargın ve Selvi, 2016). Ancak, yapılan son çalışmalarda yeni bir tür bulunarak (*C. x florentinus*) tür sayısı 6'ya yükselmiştir (Gökmen ve Duman, 2021).

*Cistus creticus* L. türü, Karadeniz Bölgesi kıyı şeridinde Zonguldak, Sinop, Ordu, Rize ve Trabzon illerinde doğal olarak yayılış göstermektedir. (Gökmen ve Duman, 2021). Bu tür Anadolu'da yöresel olarak pembe laden, tüylü laden, laden otu, pamukluk, pamuk otu, kaya gülü ve tavşan çalısı gibi adlarla bilinirler. *C. creticus* L. türü çok yıllık, çalimsı özellikte, 50-70 cm boylanabilen kokulu bir bitkidir (Sargın ve ark., 2014).

*C. creticus* L. türü fenolik bileşikler ve uçucu yağlar bakımından zengin bir içeriği bulunan ve çok çeşitli kullanımı olan önemli tıbbi ve aromatik bitkilerden biridir (Lahcen ve ark., 2020). Halk hekimliğinde çok eski zamanlardan beri peptik ülser, diyare, idrar yolu enfeksiyonu, yüksek ateş ve romatizma gibi farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Bu türün güçlü antiviral, antioksidan, antibakteriyel ve antifungal etkiler gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Stępień, 2017; Lahcen ve ark., 2020). *C. creticus* L. bitkisinin zengin polifenolik madde içeriği sayesinde DNA koruyucu etkilere sahip olduğu ileri sürülmektedir (Kılıç ve ark., 2019). *C. creticus* L. Ekstrelerinin kanser hücreleri ile ilişkili olarak sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ve kanser hücrelerinin gelişimi üzerinde inhibe edici etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Stępień ve ark., 2018). Bir başka çalışmada pembe ladenin, Alzheimer hastalığının önlenmesi ve tedavisinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Loizzo ve ark., 2013). Macaristan'da yapılan bir çalışmada, *C. creticus* ekstresinin COVID-19 virüsü mücadelesinde destekleyici bir tedavi yöntemi olduğu ve insanlar üzerinde etkilerinin görüldüğü kanıtlanmıştır (Jankovics ve ark., 2021). Ayrıca, *C. creticus* bitki ekstralarının nanoteknolojik yöntemler kullanılarak patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri de ortaya konulmuştur (Erdoğan ve ark., 2023). Son yıllardaki bu çalışmalar, pembe ladenin modern tıp için son derece önemli bir bitki olduğunu ortaya koymaktadır.

Pembe laden, içerdiği doğal reçineler sayesinde yaprak yüzeyinden ladano denen bileşik salgılamaktadır ki, bu bileşik parfümeri ve kozmetik sanayisinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Madesis ve ark., 2011). Ayrıca her dem yeşil olması, fakir topraklarda yetişebilmesi yönleriyle erozyon ile mücadele, yol kenarları ıslahı ve peyzaj düzenlemelerinde kullanılmaya oldukça uygundur (Cengiz, 2015).

*C. creticus* tohum ile çoğalmaktadır ancak tohum kabuğu serttir ve tohumlarda dormansi olduğu için tohumların çimlenmesi genellikle düşük ve düzensizdir (Iriundo ve ark., 1995). Dormansinin giderilmesi ve çimlenmenin teşvik edilmesi amacıyla laden tohumları sıcaklık, asit ve hormon uygulaması vb. gibi bazı ön işlemlere tabi tutulmaktadır (Zygomala ve ark., 2003; Tavşanoğlu ve ark., 2014). Diğer taraftan pembe ladenin dormansi özelliğinden dolayı yangın sonrası vejetasyon oluşturulmasında da yararlanıldığı bilinmektedir (Çatav, 2013; Papaefthimiou ve ark., 2014).

Farklı alanlarda kullanım potansiyeli yüksek olan bu tür ülkemizde doğadan fazla toplanan türler arasında yer almaktadır. Gelecekte bitki popülasyonlarının aşırı sömürülmesi sonucu birçok nadir türün yok olmasının söz konusu olacağı ve *C. creticus* türünün de nesli tehlike altında olan türler arasında yer alabileceği ileri sürülmektedir. Ayrıca *C. creticus* türünün tohumlarında, sert kabuklarından kaynaklı dormansi görüldüğü için tohumla çoğaltımları zor olmaktadır. Bu bağlamda, *C. creticus* L. bitkisinde *in vitro* rejenerasyon çalışmalarının geliştirilmesi ve standart bitki materyali üretim protokolünün belirlenmesi, doğal popülasyonlarının sömürülmesini önleyerek bu türün korunmasını sağlayabilir.

*In vitro* rejenerasyon oluşumu, bitkilerin totipotensi özelliğine yani tek bir hücreden benzer bitki elde edilmesi esasına dayanır ve doku kültürü sistemi bitkinin rejenerasyon özelliğinden faydalanmaktadır (Maheshwari, 1995). Doku kültürü, steril şartlar altında uygun besin ortamlarında, bitkinin tohum, yaprak, boğum, sürgün, doku parçaları gibi üretken hücrelerinin bulunduğu kısımlardan yeni bir bitki, yeni hücreler vb. gibi yapıların elde edildiği çalışma teknikleridir (Sökmen ve Gürel, 2001). Bitki doku kültürü uygulamaları içerisinde *in vitro* çoğaltım, germplasm muhafazası, somaklonal varyasyon, hastalıktan arı bitki, haploid ve dihaploid üretilmesi, organogenez ve somatik embriyogenez gibi birçok yöntem vardır (Babaoğlu ve ark., 2001). Bu yöntemler geleneksel çoğaltma yöntemlerine alternatif olarak kontrollü büyüme koşullarında mevsime bağlı olmaksızın düzenli bitki üretimine imkân verirler. Bitki doku kültürü teknikleri, özellikle kitlesel yayılım, genetik kaynakların korunması, biyoaktif bileşiklerin incelenmesi, üretimi ve genetik iyileştirme amacıyla bazı tıbbi ve aromatik bitkilerde son yıllarda giderek daha fazla uygulanmaktadır (Bürün, 2016).

*In vitro* rejenerasyon elde etmek için organogenez yöntemi genellikle kullanılan tekniklerden biridir ve organogenez yöntemi kültüre alınmış doku ve hücrelerin farklılaşarak yeni bir sürgün veya kök gibi dokuya bağlı yapıların meydana gelmesidir (Sökmen ve Gürel, 2001). Bu yöntemle *in vitro* rejenerasyon olayının gerçekleşmesi direkt veya dolaylı yollardan olmaktadır. Direkt rejenerasyon kültüre alınan eksplant kaynağından sürgün kök gibi yapılar oluşmasına neden olurken, dolaylı rejenerasyon farklı hücre topluluğunu oluşturan kallus yapısının, çeşitli etkenlere bağlı olarak (bitki besin elementleri, ışık vb.) değişime uğraması ve yeni

sürgün, kök gibi yapıların oluşması sürecini kapsamaktadır (Lakhera ve ark., 2018). *İn vitro* çoğaltım için genellikle direkt rejenerasyon tercih sebebidir çünkü dolaylı yoldan jenerasyona sebep olan kallus yapısını oluşturan farklı hücre topluluğu, bitki besin elementlerinin etkisinde yeni embriyo ve sürgünler oluşturabilir bu nedenle genetik varyetede istenmedik sonuçlar elde edebiliriz. Başarılı bir jenerasyon sistemi oluşturmak için doğru eksplant seçimi, bitki büyüme düzenleyicilerin seçimi ve miktarı, bulunulan ortamın sıcaklık, nem, ışık gibi parametrelerinin doğru seçilmesi çok önemlidir (Sökmen ve Gürel, 2001; Dursun, 2019). Direkt organesis yönteminde kotiledon boğum eksplant kaynağının hızlı elde edilebilir olması, sürgün rejenerasyonu oluşturma yeteneklerinin fazla olması gibi nedenlerle sıklıkla çalışmalarda eksplant olarak tercih edildiği bildirilmiştir (Erdoğan ve ark., 2013; Ekinci ve Uzun, 2021). *İn vitro* rejenerasyon çalışmalarında kullanılan bir diğer yöntemde kapsüllenmiş tohumlar oluşturmaktır.

Sentetik tohum teknolojisi, tohumla üretilmeyen bitkilerin çoğaltılması, nesli tehlike altında olan bitkilerin üretilerek gen bankasına aktararak korunması ve dormansi problemi yaşayan bitkilerde alternatif bir yöntem olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Bektaş ve Sökmen, 2016). Bitkilerin çoğaltılmasında hızlı kolay ve ucuz bir yöntem sunar. Elde edilen sentetik tohumlar küçük yapıları sayesinde depolanabilir, taşınabilir ve direkt olarak araziye ekimleri yapılabilir. Yapay tohumlardan elde edilen bitkilerin genetik olarak birbirlerine benzemesi ve virüsten arınmış bitki elde edilmesine imkân tanır (Stephen ve Jayabalan, 2000; Sökmen ve Gürel, 2001; Bürün, 2016; Erdem ve Uysal, 2021). Bunların yanı sıra, sentetik tohumlar mevsime bağlı olmadan yılın herhangi bir zamanında üretilebiliyor olması gibi pek çok avantaja sahiptir (Magray ve ark., 2017).

*İn vitro* jenerasyon çalışmalarında, sentetik tohum üretimi son zamanlarda bitkilerin klonal ve hızlı çoğaltımında sıklıkla çalışılan bir yöntem olmuştur. Gelişen teknoloji ile *in vitro* şartlarda bitkinin doku veya organında bulunan somatik hücrelerden embriyo elde edilebilmektedir. Bu embriyoları diğerlerinden farklı kılan temel nokta genetik açılımın söz konusu olmamasıdır. Somatik embriyo sonucunda gelişen ürün embriyonun kendisi ile birebir benzerdir. Somatik embriyoları jel matriks ile kaplayarak sentetik tohumlar elde edilebilmektedir (Parrot ve ark., 1993; Islam ve Bari, 2012). Somatik embriyo direkt veya dolaylı yollardan oluşabilir. Kaplama

materyali olarak seçilen eksplant kaynağı üzerinden direkt veya oluşan kallus yapılarını oksin grubu büyüme düzenleyiciler ile kültüre alarak daha sonra bitki büyüme düzenleyici olmayan ortama aktarılması ile dolaylı olarak somatik embriyolar oluşmaktadır (Telli, 2010; Baltacı, 2018).

Sentetik tohum üretimi, çalışılacak bitki eksplantının belirlenmesinden sonra seçilen materyalin uygun bir matrisle kapsüllenmesi sürecini içermektedir (Saxena ve ark., 2019). Yapay tohum oluşturmak için somatik embriyo yöntemi başlarda sık kullanılırken son zamanlarda boğum, sürgün ucu, gibi vejetatif yapılarda kaplama materyali olarak kullanılmaktadır (Islam ve Bari, 2012; Dönmez, 2022; Kara ve ark., 2023). Somatik embriyoların materyal olarak kullanımında çift karakterli yapı göstermeleri, farklı zamanlarda olgunlaşabilmesi, somatik embriyo elde etmek için belli bir süreç işlemesi, somatik embriyo oluşturma yöntemi laboratuvar çalışmalarını kısıtlayabilmektedir. *In vitro* rejenerasyonda boğum kısımlarının kolay elde edilebilmesi ve hızlı sürgün oluşturma özelliği kaplama materyali olarak kullanılmasına avantaj sağlamıştır. Bitkinin boğum kısımlarının sentetik tohum üretimi için en fazla tercih edilen eksplant kaynağı olduğu bilinmektedir (Benelli, 2016; Kara ve ark., 2023).

*C. creticus* türünde doku kültürü yöntemleri kullanılarak bazı *in vitro* rejenerasyon çalışmaları yapılmıştır. Pela ve ark., (2000) indol asetik asit (IAA), 6-benziladenin (BA) ve naftalin asetik asit (NAA) hormonları ile *C. creticus* bitkisinde sürgün uçları ve yan tomurcuklardan *in vitro* kök ve kallus oluşumunu incelemişler ve Murashige ve Skoog (MS) ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlarda 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) veya NAA uygulamalarında başarılı köklenme sağlamışlardır. Diğer taraftan, *C. creticus* türü, Zygomala ve ark., (2003) tarafından yürütülen bir çalışmada *in vitro* ortamda çoğaltılmıştır. Çalışmada, ortama farklı konsantrasyonlarda indol bütirik asit (IBA; 0.98, 1.97 ve 3.94 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) veya NAA (0.1 ve 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) ilave edildikten sonra köklenme gerçekleşmiş ve kallus oluşumu için zeatin (0.2 ve 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) kullanılmıştır. Madesis ve ark., (2011) tarafından *C. creticus* bitkisinin *in vitro* çoğaltımında koltuk altı tomurcukları ile yaprak eksplantlarının kullanıldığı çalışmada, 0.1 veya 0.2 mg l<sup>-1</sup> Thidiazuron (TDZ) ve 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonu, 4-6 haftalık kültürden sonra sürgün oluşumunu tetiklemiş, en yüksek sürgün oluşumu (%33,3) 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA ile 0.1 mg l<sup>-1</sup> TDZ ortamında görülmüş, daha



fazla gelişme ve köklenme ise yalın MS ortamında gerçekleşmiştir. Bu verilerden de görüleceği üzere, *C. creticus* türünde *in vitro* çoğaltım konusunda yürütülen araştırma sayısı yetersiz olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca kullanılan explant kaynakları, denenen ortam ve hormon tipleri de sınırlı sayıda kalmıştır. Bu nedenle, *C. creticus* türünde tam bir *in vitro* rejenerasyon protokolü belirtilememiştir.

Ekonomik açıdan önemli olan ve nesli kaybolma tehlikesi altında bulunan bazı tıbbi ve aromatik bitkilerde *in vitro* koşullarda elde edilmiş bitki eksplantları (boğum, yaprak, sap vb.) ve somatik embriyolar kullanılarak sentetik tohum elde edilen bazı çalışmalar bulunmaktadır (Manjkhola ve ark., 2005; Islam ve Bari 2012; Dönmez, 2022). Yine tohumla çoğalmada problem yaşayan dormansi dönemi uzun olan bitkilerde sentetik tohum üretimi yapılmıştır (Kara ve ark., 2023). Ancak bilimsel literatürde, *Cistus creticus* L. bitkisinde sentetik tohum üretimi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

*C. creticus* türünde, farklı eksplant kaynakları, besi yeri ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerle yapılan çalışmaların oldukça yetersiz ve ayrıca *in vitro* koşullarda sentetik tohum üretimi konusunda hiçbir çalışmanın bulunmaması bu araştırmanın bilimsel gerekçesini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, *C. creticus* kotiledon boğum eksplantlarında sodyum alginatla kaplamanın ve MS ortamına ilave edilen bazı bitki büyüme düzenleyicilerin (BA, NAA ve TDZ) *in vitro* bitki rejenerasyonu üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür

## 2. GENEL BİLGİLER

Morte ve Honrubia (1992) *Helianthemum almeriense* Pau'nun (Cistaceae) *in vitro* çoğaltılmasına yönelik çalışma yapmışlardır. Eksplant olarak sürgün ucu ve düğüm bölümleri kullanılarak, MS besin ortamında 0.46 mg l<sup>-1</sup> kinetin ile desteklenmiş ortamda kültüre alınmış ve köklenme oranı olarak %92'ye ulaşmışlardır. Daha sonra, köklenen sürgünler turba-kum-vermikülit karışımına aktararak bitki büyümeleri sağlanmıştır.

Iriondo ve ark., (1995) Cistecea familyasının 6 türünde (*Cistus albidus* L., *C. clusii*, *C. ladanifer* L., *C. laurifolius* L., *C. psilosepalus* L. ve *C. salvifolius* L.) *in vitro* çoğaltım yöntemi üzerinde çalışmışlardır. Eksplant olarak genç fidelerin düğüm kısımlarını kullanılmış ve eksplantlar saf MS besin ortamı ile hormon ilave edilmiş (BAP, 0.88 mg l<sup>-1</sup>+ KIN, 0.93 mg l<sup>-1</sup>) MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada meydana gelen sürgünler aynı ortamlarda kültüre alınmış, köklenme IBA uygulamasıyla desteklenmiş ve bu şekilde elde edilen bitkileri dış ortama alıştırmışlardır.

Pela ve ark., (2000) yaptıkları bir çalışmada *C. creticus* türünde sürgün uçları ve yan tomurcukları eksplant kaynağı olarak kullanarak, *in vitro* ortamda kök ve kallus oluşumunu incelemişlerdir. Bitki eksplantları farklı konsantrasyonlarda NAA, 2.4-D, BAP ve IAA ilave edilmiş MS ortamına ekilmiştir. İkinci alt kültürde, farklı konsantrasyonlarda MS + 2.4-D veya NAA uygulamalarında üzerinde başarılı köklenme elde etmişler. Sürgün ucu ve düğüm eksplantlarının bir kısmı 7 hafta boyunca aynı çoğaltma ortamında (MS + 0.89 mg l<sup>-1</sup> BAP + aktif kömür 0.25 g l<sup>-1</sup>) bırakılarak köklenme yüzdesi, kök uzunluğunu ve kök sayısı gibi parametreler incelenmiştir. *C. creticus* mikro sürgünleri bitki büyüme düzenleyicileri olmayan MS ortamında adventif kökler oluşturmuşlardır. Yan tomurcuk eksplantlarından alınan sürgünlerin çoğalması, sürgün ucu eksplantlarından alınan sürgünlerin çoğalmasına göre daha yüksek olmuştur. Eksplant olarak kullanılan yan tomurcuklardan veya sürgün uçlarından elde edilen kallusun ortalama taze ve kuru ağırlığı, 1.136 mg l<sup>-1</sup> BAP ve 0.175 mg l<sup>-1</sup> IAA içeren ortamda sırasıyla 238.47 mg ve 20.471 mg, 226.03 mg ve 25.43 mg olduğunu belirtmişlerdir.

Zygomala ve ark., (2003) Yunanistan'da yaptıkları bir çalışmada tıbbi ve aromatik özelliklere sahip bir tür olan *Cistus creticus* L. türünü *in vitro* çoğaltmışlardır. Sert tohum kabuğunun etkisini gidermek için, otoklavda 100 C'de 20 dakika ısıtma işlemi uygulandıktan sonra tohumlar kalsiyum hipoklorit (%1,5 20 dakika) ve etanol (%70 1 dakika) ile dezenfekte edilmiş, yeni sürgünlerin alındığı ilk alt kültürden 30 gün sonra sürgün oluşumu elde edilmiştir. Aynı ortamda alt kültürlenen segmentler, tek başına veya ortama farklı konsantrasyonlarda IBA (0.98, 1.97 ve 3.94 mg l<sup>-1</sup>) veya NAA (0.1 ve 0.5 mg l<sup>-1</sup>) ilave edildikten sonra köklenmiş ve kallus indüksiyonu için zeatin (0.2 ve 0.5 mg l<sup>-1</sup>) kullanılmıştır.

Gopi ve Ponmurugan (2006) yaptıkları çalışmada *Ocimum basilicum* L. türünde somatik embriyogenez yoluyla tam bitki rejenerasyonu için etkili bir protokol geliştirmişlerdir. Eksplant kaynağı yaprak kısmını kullanmışlardır. Eksplantların *in vitro* çoğaltım için MS besin ortamına belirlenen dozlarda BAP, NAA ve KIN hormonları eklenmiş ve somatik embriyolar, BAP 1.0 mg l<sup>-1</sup> +NAA 1.0 mg l<sup>-1</sup> + KIN 0.5 mg l<sup>-1</sup> ile desteklenen MS ortamından elde edilmiştir. Aynı ortamda önce embriyo çimlenmesi daha sonra bitki oluşumu gerçekleştirilmiş dış ortama aktarılan bitkilerin hayatta kalma oranı %80 olarak belirtilmiştir.

Uçar ve Turgut (2009) önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olan dağ çayının *Sideritis perfoliata*, *Sideritis stricta* ve *Sideritis erythrantha* türlerinde *in vitro* çoğaltım çalışması yürütmüşlerdir. Bu üç türde farklı oranlarda GA<sub>3</sub> ilave edilmiş MS ortamında çimlendirme işlemi uygulanmış, ancak çimlenmenin genelde görülmediği, görülen türlerde de çok düşük kaldığını belirtmişlerdir. *In vitro* rejenerasyon için tohum, boğum, yaprak, yaprak sapı, sürgün ucu ve boğum arası eksplantlarını kullanmışlar ve hazırlanan MS ortamına farklı dozlarda BAP ve NAA kombinasyonları içeren hormonlar ilave etmişlerdir. Çalışma sırasında eksplantlardan kaynaklı kontaminasyon görüldüğü rapor edilmiştir. Ayrıca, *Sideritis stricta* türünde *in vitro* çoğaltım için eksplant kaynağı olarak sürgün ucu kullanılmış ve TDZ 'nin farklı dozlarda ilave edildiği MS ortamına ekilmişlerdir. TDZ'nin yüksek konsantrasyonunu (1.5 mg l<sup>-1</sup>) içeren besin ortamlarında gelişim oranı az olurken, rejenerasyonun hormon içermeyen yalın MS ortamında daha fazla olduğu ifade edilmiştir.

Ruta ve Fortunato (2010) İtalya'da yaptıkları araştırmalarında nesli tükennemekte olan *Cistus clusii* genotipiyle bir *in vitro* çoğaltım çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada eksplant kaynağı olarak sürgün uçları ve boğumlar, farklı besin ortamlarında (MS makro besinleri, Nitsch ve Nitsch mikro besinleri, sükroz, demir, tiamin, miyoinositol ve agar) kültüre alınmış ve *in vitro* çoğalma aşaması için eksplantlar, 6-benzilaminopurin ( $0.5 \text{ mg/l}^{-1}$ ) içeren bir kültür ortamında hızla koltuk altı tomurcukları oluşturmuşlardır. Köklenme için en iyi sonucu,  $0.1 \text{ mg/l}^{-1}$  indol bütirik asit ilaveli bir kültür ortamında elde etmişlerdir. Köklenen bitkiler sera koşullarına alıştırıldıktan sonra fenotipik homojenliklerinin değerlendirilmesi amacıyla tarlaya aktarılmışlar ve karyotipleme, *in vitro* çoğaltılan bitkiciklerin ana bitkilerle aynı kromozom sayısına sahip olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucunda *in vitro* çoğaltımın, İtalya'da nesli tükennemekte olan *C. clusii* türünün korunmasında yararlı bir araç olabileceği ifade edilmiştir.

Telli (2010) eksplant kaynağı olarak sap ve yaprakların kullanıldığı bir çalışmada, *Gentiana cruciata* L. Bitkisinde, kalluslardan somatik embriyo elde ettiğini rapor etmektedir. Somatik embriyoları %2 alginik asit (w/v) içerisine ilave edilmiş  $\frac{1}{2}$  MS ve  $15 \text{ g l}^{-1}$  sukroz ile hazırlanan çözelti ile muamele ettikten sonra 100 ml ( $\text{CaCl}_2$ ) kalsiyum klorür ile kaplamış ve böylece sentetik tohum üretimini başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir.

Madesis ve ark., (2011) tarafından Yunanistan'da yapılan bir çalışmada *C. creticus* bitkisinin *in vitro* çoğaltımında koltuk altı tomurcukları ve yaprak eksplantları kullanılarak  $0.1$  veya  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  TDZ ve  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA kombinasyonunun, 4 ila 6 haftalık kültürden sonra sürgünleri tetiklediği ve en yüksek sürgün oluşumunun (%33.3)  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA ile  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  TDZ ortamında olduğu gözlenmiş ancak daha fazla gelişme ve köklenme sadece MS olan ortamdan elde edilmiştir.

Kumar ve Thomas (2012) *Clitoria ternatea* L.'nin rejenerasyonu için etkili bir yöntem gerçekleştirmişler. Yapılan çalışmada kotiledon eksplantından gelişen kallusların oluşturduğu embriyoları kalsiyum aljinat ile kaplamışlar. Bu embriyoları %3 sükroz,  $1.0 \text{ mg/l}$  BA ve  $0.2 \text{ mg/l}$  NAA içeren MS ortamı içeren kalsiyum aljinat ile kaplamışlar. Oluşan sentetik tohumları belirledikleri hormon dozlarında (BA  $1.0$ - $4.0 \text{ mg l}^{-1}$ , NAA  $0.1$ - $0.7 \text{ mg l}^{-1}$  ve IBA  $0.1$ - $0.7 \text{ mg l}^{-1}$ ) kombinasyon halinde

ekmişlerdir. En yüksek yapay tohum çimlenmesini (%92) 2 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA ile oluşturulan MS besin ortamında elde ettiklerini ve çimlenen sentetik tohumları başarılı bir şekilde toprağa aktardıklarını belirtmişlerdir.

Islam ve Bari (2012) tıbbi bir bitki olan *Mentha arvensis*'in sürgün ucu ve boğum kısımları, MS besin ortamı kullanarak, sodyum aljinat ile kaplamışlar ve kaplama materyaline BAP, KİN ve NAA'nın farklı doz ve kombinasyonlarını ilave ederek sentetik tohum üretim potansiyelini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, en yüksek sürgün oluşumu (%80) boğum eksplantında, en fazla sürgün sayısı  $9.87 \pm 0.58$  ile 2.0 mg l<sup>-1</sup> BAP ve 0.2 mg l<sup>-1</sup> NAA eklenmiş MS besin ortamında oluşurken, en fazla sürgün uzunluğu 1.0 mg l<sup>-1</sup> BAP ve 0.5 mg l<sup>-1</sup> NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Erdoğan ve ark., (2013) burçakta belirli hatlarda MS besin ortamında çimlendirdikten sonra gelişen bitkiciklerden kotiledon boğum eksplantları olarak bunları farklı dozlarda TDZ, BAP veya NAA içeren MS ortamında kültüre almışlardır. En yüksek sürgün sayısını 4 mg l<sup>-1</sup> BAP+0.25 mg l<sup>-1</sup> NAA olan MS besin ortamından elde ettiklerini bildirmişlerdir. Köklendirme için farklı dozlarda uygulanan IBA hormonu denenmiş ve en yüksek köklenme (%100) 2 mg l<sup>-1</sup> IBA uygulanan ortamdan alındığını belirtmişlerdir.

Cheruvathur ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz'un kotiledon ve yaprak eksplantlarından elde ettikleri kallusları sodyum aljinatın farklı dozlarını (%3, %4 ve %5) içeren MS besin ortamında bekletip daha sonra kalsiyum klorür (100 ve 125 mM) ile 30 dk boyunca kaplanmışlardır. En yüksek sentetik tohum çimlenmesi %92 oranında, %3'lük sodyum aljinat ve 100 mM kalsiyum klorür ile elde edilen yapay tohumların 0.2 mg l<sup>-1</sup> MS olan ortamında elde etmişlerdir.

Baskaran ve ark., (2015) tıbbi bir bitki olan *Mondia whitei* türünde somatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi ile etkili bir bitki rejenerasyon yöntemi ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri embriyoları farklı oranlarda sodyum aljinat ve kalsiyum klorür ile kaplamışlar ve en iyi sonucu %3 sodyum aljinat 100 mM sodyum klorür ile kapladıkları sentetik tohumlardan almışlar. Bu sentetik tohumların %96'sı canlı kalmış ve %73 çimlenme oranı gözlenmiş ve sera ortamına aktarıldıklarında %90 adaptasyon göstermişlerdir.

Bektaş ve Sökmen (2016) *Serapias vomeracea*'nın (orkide) uygun mikro çoğaltım tekniklerinin olmaması ve yerel toplayıcıların bitkinin ekolojik dağılımına verdiği zarardan dolayı nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olduğu için etkin bir *in vitro* çoğaltım ve sentetik tohum üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada TDZ'nin farklı dozlarını (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, ve 2.0 mg l<sup>-1</sup>) ve IBA'nın 1.0 mg l<sup>-1</sup> dozunu Orchimax besin ortamında denemişlerdir. Elde edilen protokorm yapılar %3 sodyum aljinat ve 75 mM kalsiyum klorür ile kaplanmış ve belirlenen hormon dozları (2 mg l<sup>-1</sup> Zeatin + 1 mg l<sup>-1</sup> IBA) Orchimax ortamına ekleyerek sentetik tohumları *in vitro* ortamda kültüre almışlar ve %80 çimlenme elde etmişlerdir.

Mohammed (2016) önemli bir tıbbi bitki olan altın çilekte (*Physalis peruviana* L.) sentetik tohum protokolü oluşturmak için elde ettiği stok bitkinin kotiledon boğum kısmını sodyum aljinat ile kaplayarak, bu türün ilk sentetik tohum protokolünü oluşturmuştur. Burada kotiledon boğum eksplantının hızlı sürgün verme özelliğinden yararlanıldığını beyan etmiştir.

Louro ve ark., (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Cistus salviifolius* L.'nin düğüm kısmından mikro çoğaltımına yönelik başarılı bir protokol geliştirilmiştir. Bu kapsamda, gibberellik asit (0.5 mg l<sup>-1</sup>) ve 6-Benzilaminopurin (0.5 mg l<sup>-1</sup>) içeren MS bazal ortamının, *in vitro* çoğaltma için en iyi ortam olduğunu ve Indol-3-butirik asidin (IBA) 0.5 mg l<sup>-1</sup> dozu ile desteklenen aynı bazal ortamda başarılı köklenme elde edildiğini bildirmişlerdir.

Dilmen (2019) yaptığı çalışmada yağ gülünü (*Rosa damascene*) *in vitro* çoğalmış, eksplant kaynağı olarak boğum bölümünü kullanmış ve MS ortamında sürgün elde etmiştir. Elde ettiği sürgünleri, sıvı besiyeri olan MS ortamına ilave edilen farklı dozlardaki BA ve NA ile yaptığı farklı kombinasyonlarda kültüre almıştır. Sürgün gelişmesinin gözlemlemesi sonucu, sadece 30 mg l<sup>-1</sup> sakkaroz içeren sıvı ½ MS ortamında en etkili sonucun alındığı görülmüştür.

Alp (2020) çalışmasında kullandığı türlerin (*Cyclamen persicum*, *C. graecum*, *C. cilicium*, *C. coum* ve *C. pseudibericum*) sentetik tohum üretimi için somatik embriyo ve sürgün ucunu eksplant olarak kullanmıştır. Eksplant kaynaklarını kaplamak için kaplama materyaline belirlediği dozlarda hormonlar (BA 1 ve 2 mg /l

ve NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup>) ilave ederek % 3'lük sodyum aljinat ile kaplamış ve MS besin ortamına ekim yapmıştır. BA'nın çimlenmede olumlu etkisi olduğunu bildirmiştir.

Dönmez (2022) yaptığı çalışmada, mersin bitkisinde (*M. communis*) eksplant olarak sürgün ucunu kaplayarak sentetik tohum elde etmiştir. *In vitro* rejenerasyonu için kaplamalı ve kaplamasız eksplant kaynağını kıyaslamıştır. Bu çalışmasında belirlenen 6-Benzylaminopurine (BAP) dozlarında (0, 0.5, 1, 2 mg l<sup>-1</sup>) MS besin ortamında kültüre almış ve MS besin ortamında alt kültüre almıştır. Oluşan sürgünlerin köklenmesi için 1 mg l<sup>-1</sup> IBA eklediği MS besin ortamına almış ve kaplamalı kaplamasız kök oluşumunu kıyaslamıştır. Yaptığı çalışma sonucunda sadece MS içeren ortamda en yüksek çimlenmeye ulaşırken, *in vitro* çoğaltma için BAP 'ın 0.5 ve 1 mg l<sup>-1</sup> dozlarının en etkili olduğuna ulaşmıştır.

Secgin ve Okumuş (2022) yaptıkları araştırmada hipokotil eksplant kaynağını sodyum aljinat ile kaplayarak, MS besin ortamında çimlenme gücünü, saksıda yetiştirme, depolama gibi parametreleri inceleyerek domates bitkisinde sentetik tohum oluşturma yöntemini denemişlerdir. Sonuç olarak ilk gün %80 çimlenme elde ederken depolama arttıkça çimlenme düşmüştür. Sentetik tohum üretilebilir sonucunu almışlardır.

Ioannidis ve Koropouli (2024) yaptıkları çalışmada ekolojik ve tıbbi öneme sahip bir tür olan *C. creticus* türünün farklı besin ortamlarında *in vitro* büyümesi ve organogenezi üzerine inorganik tuz konantrasyonlarının etkisini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada Murashige ve Skoog (MS), odunsu bitki besiyeri (WPM) ve Driver ve Kuniyaki Ceviz besiyeri (DKW) ortamları kullanılmıştır. Besin ortamı farklılığı sürgün ve kök oluşumu dışındaki bütün özellikleri etkilemiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Çalışmada bitki materyali olarak Karadeniz Bölgesi'nde doğal olarak yetişen Cistaceae (Ladengiller) familyasından *Cistus creticus* L. (pembe laden) türü kullanılmıştır (Şekil 3.1). Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkiler Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülen bu çalışmada, tohumlar Ordu ilinin merkez Kuylu Mahallesi'nde doğal floradan seçilen bitkilerden, bitkilerin tohum bağlama döneminde toplanmıştır. Toplanan tohumlar çimlenme testleri başlayana kadar +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Eksplant kaynağı olarak 2 mg l<sup>-1</sup> gibereellik asit ilave edilmiş MS besin ortamında kültüre alınan tohumlardan elde edilen kotiledon yaprak ve boğum eksplantları kullanılmıştır.



Şekil 3.1 *Cistus Creticus* Bitkisi ve Çiçeği

#### 3.2 Yöntem

*In vitro* ortamda bitki rejenarasyonu ve sentetik tohum kaplama çalışması; hazırlık aşaması, tohumlardan *in vitro* koşullarda fideciklerin elde edilmesi, kotiledon yaprak ve boğum eksplantlarının izolasyonu, yalın ve hormon ilaveli MS ortamlarında kaplamalı ve kaplamasız eksplantların kültüre alınması, alt kültür uygulaması ve aklimatizasyon süreçlerini içermektedir.

##### 3.2.1 Kullanılan Alet ve Ekipmanların Hazırlığı

Çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar; pens, bistüri, petri, magenta kapları, filtre kâğıdı, sodyum aljinat, kalsiyum klorid solüsyonları ve sterilizasyonda



kullanılacak saf su otoklavda 121 °C 'de 20 dakika ve 1.2 atmosfer basınç altında sterilizasyon işlemine tabii tutulmuştur. Çalışmalara başlamadan önce steril kabin %70'lik ethanol ile silinmiş ve 15 UV ışığı altında yüzey sterilizasyonu yapılmıştır.

### 3.2.2 Tohumların Sterilizasyonu

Pembe laden tohumları %70'lik ethanolde 1 dakika bekletildikten sonra, 2-3 damla tween-20 solüsyonu ihtiva eden %1'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisine konularak 140 rpm hızdaki çalkalayıcıda 30 dakika tutulmuştur. Çalkalama işlemi sonrasında steril kabin içerisine alınan magenta kapları, 3 kez steril sudan geçirilmiştir.

### 3.2.3 Kullanılan Besin Ortamı

Araştırmada, %3 (w/v) sukroz içeren, %0.8 (w/v) agar ile karıştırılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1** MS Besin Ortamı İçeriği

Bileşenler	mg/L
Amonyum nitrat (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650.00
Borik asit (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6.200
Kalsiyum klorit, Anhidrit (CaCl <sub>2</sub> )	332.20
Kobalt klorit (CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	0.025
Bakır sülfat, Pentahidrat (CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	0.025
EDTA, Disodyum, Dihidrat (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	37.26
Demir sülfat, Heptahidrat (FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	27.80
Glisin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	2.00
Magnezyum sülfat, Anhidrat (MgSO <sub>4</sub> )	180.70
Manganez sülfat, Monohidrat (MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	16.900
Sodyum molibdat, Dihidrat (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	0.250
Myo-inositol (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	100.00
Nikotinik asit (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	0.500
Potasyum iyodür (KI)	0.830
Potasyum nitrat (KNO <sub>3</sub> )	1900.00
Potasyum fosfat, Monobazik, Anhidrit (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170.00
Pridoksin, Hidroklorit (C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl)	0.500
Tiamin, Hidroklorit (C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS · HCl)	0.100
Çinko sülfat, Heptahidrat (ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	8.600

Araştırmada, bitki büyüme düzenleyici olarak 6-benzyladenine (BA), naftalin asetik asit (NAA), kinetin (KN) ve Thidiazuron (TDZ) kullanılmış, sonrasında stok solüsyonları hazırlanarak besin ortamlarına belirlenen miktarlarda ilave edilmiştir (Çizelge 3.2). Ortamların PH'sını yükseltmek için 1 N sodyum hidroksit (NaOH) veya düşürmek için 1 N hidroklorik asit (HCl) kullanılarak ortam pH'sı 5.6-5.8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her 1 litrelik ortam için 0.8 g agar ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan ortamlar otoklavda 1.2 atmosfer basınç altında 121 °C'de 20 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Daha sonra, sterilize edilen besin ortamları eşit miktarda petri kaplarına alınarak steril kabin içerisine yerleştirilmiştir.

**Çizelge 3.2** Çalışmada Kullanılan Büyüme Düzenleyicilerin Çözücüleri ve Stok Solüsyonların Saklama Koşulları

Büyüme Düzenleyicileri	Çözücü	Saklama Koşulları (°C) (Stok solüsyon)
BA	1 N NaOH	+4
NAA	1 N NaOH	+4
TDZ	1-2 damla DMSO	+4
KN	1 N NaOH	+4

DMSO: Dimetil sülfoksit

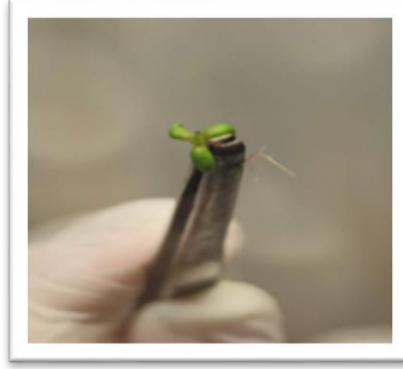
### 3.2.4 *In Vitro* Koşullarda Tohumların Çimlendirilmesi

Çimlendirme denemeleri öncesinde, *C. creticus* tohumları 35 saniye (100°C) sıcak suda ve %98'lik sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) içerisinde 1, 5, 15 ve 30 dakika bekletildikten sonra, saf su ile yıkanmış ve petri kaplarında çimlenme testine alınmışlardır. Bu ön çalışma sonucunda, en iyi çimlenme tohumların 15 dk %98'lik sülfürik asit içinde bekletilmesinden elde edilmiştir. Bu nedenle, daha sonraki çimlendirme denemelerinde laden tohumları önce %98'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde 15 dk bekletilmiş ve daha sonra, steril kabinde, 2 mg l<sup>-1</sup> gibberellik asit ilaveli MS besi ortamı içeren sahip petri kaplarına ekilmişlerdir.

### 3.2.5 *İn Vitro* Rejenerasyon Çalışması

#### 3.2.5.1 Kotiledon Yaprak ve Boğum Eksplantlarının İzolasyonu

Kotiledon yaprak ve boğum eksplantları, 2 mg l<sup>-1</sup> gibberellik asit ilaveli MS ortamında yetişen 15 günlük fideciklerden elde edilmişlerdir (Şekil 3.2). *İn vitro* koşullarda elde edilen bitkicikler, steril kabin içerisinde pens ve bistüri yardımı ile kesilerek kotiledon yaprak ve boğum eksplantları elde edilmiştir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



Şekil 3.2 15 Günlük Fidecik



Şekil 3.3 Kotiledon Boğum Eksplantı



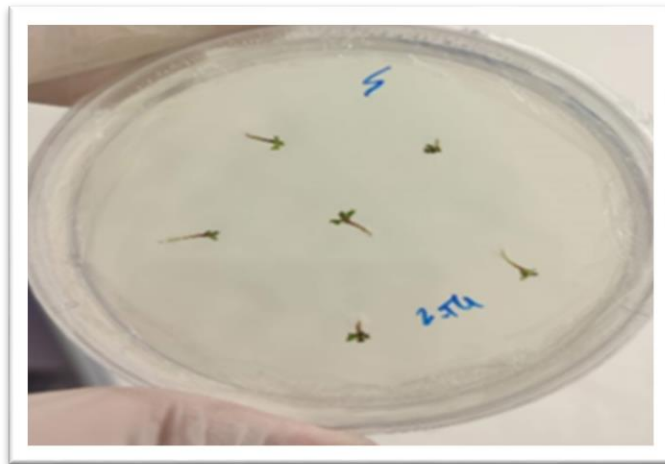
Şekil 3.4 Kotiledon Yaprak Eksplantı

### 3.2.5.2 Kotiledon Boğum Eksplantının Kültüre Alınması

Elde edilen kotiledon boğum eksplantları direkt rejenerasyon için TDZ, BA ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerin farklı kombinasyonlarında (Çizelge 3.3) MS besi ortamında kültüre alınmışlardır (Şekil 3.5). Kültüre alma çalışması, 4 tekerrürlü ve her petride 6 eksplant olacak şekilde yürütülmüştür. Dört haftalık kültürden sonra daha fazla büyüme ve gelişme için magenta kaplarında aynı ortamlarında alt kültüre alındı. Kültüre alınan ortamlarda ek olarak köklendirme yapılmadı çünkü yeterli düzeyde kök oluşumu gerçekleştiği görülmüştür. Alt kültürden bir ay sonra veriler alınmıştır.

**Çizelge3.3** Kotiledon Boğum Eksplantlarının Kültüre Alındığı MS Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyiciler

Bitki Büyüme Düzenleyicileri
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA
Kontrol (Yalnız MS)



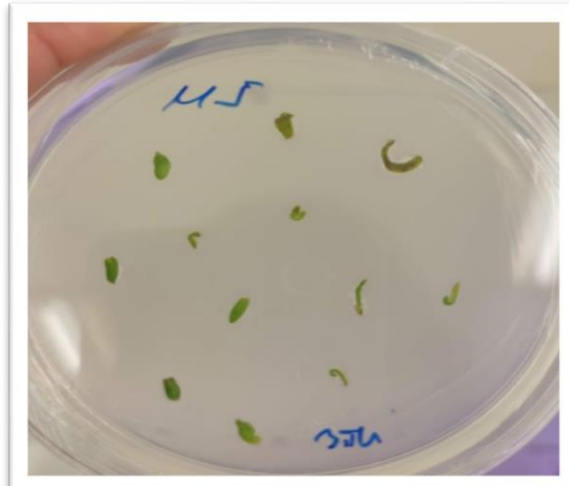
**Şekil 3.5** Kültüre Alınmış Kotiledon Boğum Eksplantları

### 3.2.5.3 Kotiledon Yaprak Eksplantının Kültüre Alınması

*In vitro*'da elde edilen kotiledon yaprak eksplantları dolaylı rejenerasyon için Çizelge 3.4'te verilen bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiş MS besi ortamında kültüre alınmış (Şekil 3.6) ve bitki büyüme düzenleyici ilave edilmemiş MS ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Kültür çalışması 4 tekerrürlü ve her petride 12 eksplant olacak şekilde yürütülmüş, bir ay sonra aynı kombinasyon ve ortam koşullarında alt kültür çalışması gerçekleştirilmiştir. Alt kültürden bir ay sonra veriler alınmıştır.

**Çizelge3.4** Kotiledon Yaprak Eksplantlarının Kültüre Alındığı MS Ortamına İlave Edilen Bitki Büyüme Düzenleyiciler

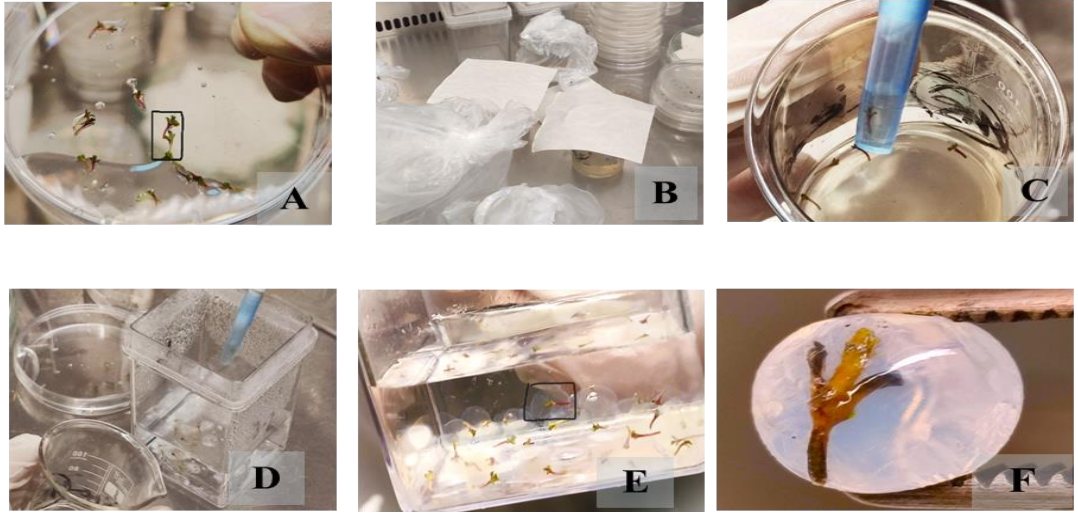
Bitki Büyüme Düzenleyicileri
1 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.1 mg/l <sup>-1</sup> NAA
1 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg/l <sup>-1</sup> NAA
0.2 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg/l <sup>-1</sup> NAA
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ +0.1 mg/l <sup>-1</sup> NAA
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA+ 0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg/l <sup>-1</sup> NAA
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.1 mg/l <sup>-1</sup> KN + 0.1 mg/l <sup>-1</sup> NAA
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> KN + 0.1 mg/l <sup>-1</sup> NAA
Kontrol (yalın MS)



**Şekil 3.6** Kültüre Alınmış Kotiledon Yaprak Eksplantları

### 3.2.6 Sentetik Tohum Kaplama ve Kültüre Alınması

Sentetik tohum elde edilmesi için direk rejenerasyon potansiyeli yüksek, hızlı elde edilebilir kotiledon boğum eksplantı kullanılmıştır. Moheemmet (2016), yaptığı çalışmada kaplama materyali olarak kotiledon boğum eksplantı kullanarak sentetik tohum elde etmiştir. Bu çalışmaya dayanarak *in vitro*'da elde edilen kotiledon boğum eksplantları Çizelge 3.3'te belirtilen hormon kombinasyonları ilave edilmiş sodyum aljinat ile kaplanmıştır. Bunun için eksplantlar %3'lük sodyum aljinat içinde 30 dk bekletildikten sonra ucu kesilmiş steril pipet uçları ile dikkatli bir şekilde %1,5'lük kalsiyum klorit çözeltisine aktarılmış ve 30 dk bekletildikten sonra kurutma kağıdına alınmıştır. Kurutma kağıdında 30 dk kurutulan sentetik tohumlar, kaplama materyaline ilave edilmiş aynı hormon kombinasyonlarını içeren MS besi ortamına, her petride 6 eksplant olacak şekilde 4 tekerrürlü ekilmişlerdir. Böylece kaplanmış ve kaplanmamış kotiledon boğum eksplantların birbiriyle karşılaştırmak mümkün olmuştur.



**Şekil 3.7** Sentetik tohum kaplamaya ilişkin bazı görseller; A) Kotiledon boğum eksplantı B) %3'lük sodyum aljinatta bekletilmesi C) Steril mikropipet ile çekilmesi D) %1,5'lik kalsiyum klorit çözeltisine aktarılması E) Çözelti içerisindeki sentetik tohumlar F) Sentetik tohum

### 3.2.7 Kültür Koşulları

*In vitro* ortamda besin ortamına alınan kotiledon yaprak ve boğum eksplantları, kaplanmış kotiledon boğum eksplantları kültürlenme için kontrollü şartlarda beyaz floresan ışığı altında 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta  $24\pm 1$  °C’de iklim dolabına alınmışlardır.

### 3.2.8 Elde Edilen Bitkilerin Aklimatizasyonu

Kültür ortamında kök ve sürgün gelişimi iyi olan *Cistus creticus* bitkileri seçilerek, dış koşullara alıştırılmak üzere viyol saksılara (şekil 3.7) aktarılmıştır. Dış ortam materyali olarak 1:1 oranında cocopeat ve perlit kullanılmıştır. Saksılarda oluşabilecek nem kaybı için üzerine şeffaf naylon poşet geçirilerek kontrollü şartlar altında (16 saat aydınlık/8 saat karanlık, %65 nem,  $24\pm 1$  °C sıcaklık) tutulmuşlardır (Şekil 3.9). Nem kaybını yavaş azaltmak için poşetler üzerinde 4-5 günlük aralıklarla küçük delikler açılmıştır. Saksı zerindeki poşetler üç hafta sonra kaldırılmış ve dördüncü haftada morfolojik gözlemler yapılmıştır.



Şekil 3.8 Aklimatizasyon için Saksılara Aktarılan Laden Bitkileri

### 3.2.9 Çalışmada İncelenen Parametreler

1. **Sürgün Sayısı:** *İn vitro* rejenerasyon denemelerinde, sürgünler sayılarak kaydedilmiştir.
2. **Sürgün Uzunluğu:** *İn vitro* rejenerasyon denemelerinde gelişen sürgünlerin uzunluğu cetvel ile ölçülerek cm cinsinden ifade edilmiştir.
3. **Boğum Sayısı:** *İn vitro* rejenerasyon denemelerinde, bitkilerdeki boğumlar sayılarak kaydedilmiştir.
4. **Kök Sayısı:** *İn vitro* rejenerasyon denemelerinde, bitkilerde oluşan kökler sayılarak kaydedilmiştir.
5. **Kök Uzunluğu:** *İn vitro* rejenerasyon denemelerinde, bitkilerde gelişen köklerin uzunluğu cetvel ile ölçülerek cm cinsinden ifade edilmiştir.
6. **Yaprak Sayısı:** *İn vitro* rejenerasyon denemelerinde bitkilerde meydana gelen yapraklar sayılarak belirlenmiştir.
7. **Yaprak Uzunluğu:** *İn vitro* rejenerasyon denemelerinde bitkilerin yaprak uzunluğu cetvel ile ölçülerek cm cinsinden ifade edilmiştir.
8. **Kallus Ağırlığı:** *İn vitro* rejenerasyon denemelerinde, kallusların yaş ağırlıkları hassas terazide tartılarak g olarak ifade edilmiştir.
9. **Canlılık oranı:** *İn vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda oluşan bitkilerden, aklimatizasyon sonrasında morfolojik gözlemler alınarak, bitkilerin canlılık oranı % olarak hesaplanmıştır.

### 3.2.10 İstatistiksel Analizler

Araştırmadan elde edilen veriler tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak, JMP paket programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuşlar ve uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan testi ile ortaya konulmuştur. Yüzde olarak ifade edilen verilere, analiz öncesinde arcsin transformasyonu uygulanmıştır.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Cistus creticus* L. bitkisinin kotiledon boğum ve yaprak eksplantlarında, farklı bitki büyüme düzenleyicilerin (BA, NAA ve TDZ) ilave edildiği MS ortamında *in vitro* rejenerasyon sağlanmış ve kotiledon boğum eksplantları sodyum aljinat ile kaplanmak suretiyle sentetik tohum üretim potansiyeli ortaya konulmuştur. Çalışmada, boğum eksplantına ait veriler üzerinde durulan her özellik için ayrı başlıklar halinde incelenmiş, buna karşılık yaprak eksplantında sadece kallus oluşumuna ilişkin veriler alınabilmektedir.

#### 4.1 Kotiledon Boğum Eksplantlarında *In Vitro* Rejenerasyon

##### 4.1.1 Sürgün Sayısı

Farklı hormonlarla muamele edilen ortamlardaki kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında sürgün sayısına ilişkin verilerin varyans analizi Çizelge 4.1’de, ortalama sürgün sayıları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Sürgün sayısı üzerine hormon (H) ve kaplama x hormon interaksiyonunun (K×H) etkisi önemli, kaplamanın (K) etkisi ise önemsiz çıkmıştır. Kaplama x hormon interaksiyonunun önemli olması, hormon etkisinin eksplantların sodyum aljinatla kaplamalı veya kaplamasız oluşuna göre farklı olduğunu ifade etmektedir.

**Çizelge 4.1** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Sayısının Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Kaplama (K)	1	0.36	0.36	1.94
Hormon (H)	8	12.20	1.52	8.33**
K x H	8	13.57	1.70	9.27**
Hata	54	9.88	0.18	
Genel	71	35.99		

\*\* : p<0.01

**Çizelge 4.2** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Sayıları

Hormon Uygulaması	Kaplama		Ortalama
	Var	Yok	
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	2.10 bcde*	3.10 ab	2.60 A*
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.82 cde	2.27 abcd	2.04 AB
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.43 de	2.47 abcd	1.95 AB
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA	2.29 abcd	1.55 de	1.92 AB
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	2.83 abc	1.92 cde	2.37 AB
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	2.67 abc	1.78 cde	2.22 AB
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	<b>1.00 e</b>	1.41 de	<b>1.20 C</b>
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.92 cde	1.79 cde	1.86 BC
Yalın MS (hormon yok)	<b>3.37 a</b>	1.85 cde	<b>2.61 A</b>
<b>Ortalama</b>	2.16	2.02	

TDZ: Thidiazuron, BA: 6-benzyladenine, NAA: Naftalin asetik asit

\*: Aynı büyük/küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

Çizelge 4.2’den çalışmada kullanılan hormon kombinasyonlarının tamamında ve yalın MS ortamında sürgün oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir. En yüksek sürgün sayısı (2.61) yalın MS ortamından elde edilirken, en düşük sürgün sayısı (1.20) 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA hormon kombinasyonundan elde edilmiştir. Kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarında 2.16 olan ortalama sürgün sayısı, kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında 2.02 olmuştur. Çalışmada kullanılan hormonların etkisi kaplama yapılıp, yapılmamasına göre istatistiki olarak çok önemli derecede farklılık göstermiştir. En yüksek sürgün sayısı 3.37 ile yalın MS ortamında kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarından elde edilirken, en düşük sürgün sayısı 1.00 ile 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonu uygulanan ortamda kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarından alınmıştır.

#### 4.1.2 Sürgün Uzunluğu

Farklı hormonlar ilave edilmiş MS ortamında kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında ölçülen sürgün uzunluğu verilerinin varyans analizi Çizelge 4.3’te, ortalama sürgün uzunlukları Çizelge 4.4’te verilmiştir. Varyans analizine göre, sürgün uzunluğu üzerine hormon ve kaplama x hormon interaksyonunun etkisi önemli, kaplamanın etkisi önemsizdir.

**Çizelge 4.3** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Uzunluğu İçin Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Kaplama (K)	1	0.004	0.004	0.34
Hormon (H)	8	3.54	0.44	34.7**
K x H	8	0.68	0.08	6.1**
Hata	54	0.69	0.01	
Genel	71	4.8		

\*\* : p<0.01

**Çizelge 4.4** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Sürgün Uzunlukları (cm)

Hormon Kombinasyonları	Kaplama		Ortalama
	Var	Yok	
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.36 cdefg*	1.49 bcdef	1.43 BC*
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.25 efgh	1.39 cdefg	1.32 CD
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.13 gh	1.24 efgh	1.18 DE
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.51 bcdef	1.59 bcd	1.55 B
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.61 bc	1.44 bcdef	1.53 B
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.53 bcde	1.44 bcdef	1.48 BC
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	<b>1.00 h</b>	1.22 fgh	<b>1.11 E</b>
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.48 bcdef	1.30 defg	1.39 BC
Yalın MS (hormon yok)	<b>2.11 a</b>	1.73 b	<b>1.92 A</b>
<b>Ortalama</b>	1.44	1.43	

TDZ: Thidiazuron, BA: 6-benzyladenine, NAA: Naftalin asetik asit

\*: Aynı büyük/küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

Çizelge 4.4'ten görüldüğü gibi, farklı hormonlar uygulanan MS ortamlarında ölçülen sürgün uzunlukları 1.11 cm ile 1.92 cm arasında değişmiş ve en yüksek sürgün uzunluğu yalın MS ortamında ölçülmüştür. Hormonların etkisi, eksplantlarda kaplama yapılıp, yapılmamasına göre değişmektedir. En küçük sürgün uzunluğu 1.00 cm ile 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA içeren MS ortamdaki kaplamalı boğum eksplantlarından alınırken, en büyük sürgün uzunluğu (2.11 cm) kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarının yalın MS ortamında ölçülmüştür.

### 4.1.3 Boğum Sayısı

Farklı hormonlar uygulanan MS ortamlarında kültüre alınan kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında boğum sayısına ilişkin verilerin varyans analizi Çizelge 4.5'te, ortalama boğum sayıları Çizelge 4.6'de verilmiştir. Varyans analizine göre, boğum sayısı üzerine hormon ve kaplama x hormon interaksiyonunun etkisi önemli, ancak kaplamanın etkisi önemsiz olduğu görülmektedir.

**Çizelge 4.5** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Boğum Sayılarının Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Kaplama (K)	1	1.94	1.94	3.30
Hormon (H)	8	50.07	6.25	10.6**
K x H	8	30.43	3.80	6.47**
Hata	54	31.74	0.58	
Genel	71	114.19		

\*\* : p<0.01

**Çizelge 4.6** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Boğum Eksplantlarında Boğum Sayıları

Hormon kombinasyonu	Kaplama		Ortalama
	Var	Yok	
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.79 de*	4.17 ab	2.98 AB*
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.68 de	2.94 bcde	2.31 BC
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	<b>1.00 e</b>	2.26 bcde	1.63 C
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA	3.06 bcd	2.83 bcde	2.94 AB
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	3.95 abc	3.01 bcd	3.48 AB
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	3.16 bcd	3.38 abcd	3.27 AB
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.00 e	1.79 de	<b>1.39 C</b>
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	2.13 cde	2.67 bcde	2.40 BC
Yalın MS (hormon yok)	<b>5.31 a</b>	2.98 bcd	<b>4.15 A</b>
<b>Ortalama</b>	2.56	2.89	

TDZ: Thidiazuron, BA: 6-benzyladenine, NAA: Naftalin asetik asit

\*: Aynı büyük/küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

Çizelge 4.6'da çalışmada kullanılan bütün hormon uygulamalarında ve ayrıca yalın MS ortamında eksplantlarda boğum oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir. En yüksek boğum sayısı (4.15) yalın MS ortamından elde edilirken, en düşük boğum sayısı (1.39) 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonundan alınmıştır. Kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarında 2.56 olan ortalama boğum sayısı, kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında 2.89 olmuştur. Kaplama ve hormon

kombinasyonlarının birlikte incelenmesi, en yüksek boğum sayısının 5.31 ile hormon içermeyen yalın MS ortamındaki kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarından alındığını ortaya koymuştur. Buna karşılık en düşük boğum sayısı (1.00) 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ hormon uygulaması ve ayrıca 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA içeren ortamda kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarından alınmıştır.

#### 4.1.4 Yaprak Sayısı

Farklı hormonlar ilave edilmiş MS ortamında kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında yaprak sayısına ilişkin verilerin varyans analizi Çizelge 4.7’de, ortalama yaprak sayıları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Varyans analizi, yaprak sayısı üzerine hormon ve kaplama x hormon interaksiyonunun etkisinin istatistiki olarak önemli, kaplamanın etkisinin ise önemsiz olduğunu ortaya koymuştur.

**Çizelge 4.7** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Yaprak Sayısı İçin Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Kaplama (K)	1	0.007	0.007	0.0037
Hormon (H)	8	9.67	1.20	9.67**
K x H	8	8.74	1.09	8.74**
Hata	54	113.28	2.09	
Genel	71	422.48		

\*\* : p<0.01

**Çizelge 4.8** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Yaprak Sayıları

Hormon Kombinasyonu	Kaplama		Ortalama
	Var	Yok	
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	6.63 abc*	9.18 ab	<b>8.05 A*</b>
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	4.93 cd	7.54 abc	6.24 AD
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	3.10 de	5.88 abcd	4.49 DE
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA	6.42 abcd	4.71 cde	5.57 BCD
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	8.42 abc	5.34 cd	6.88 ABC
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	8.02 abc	5.71 bcd	6.87 ABC
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	<b>1.00 e</b>	5.34 cd	<b>2.98 E</b>
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	4.87 cd	4.68 cde	4.77 CDE
Yalın MS (hormon yok)	<b>9.48 a</b>	4.99 cd	7.23 AB
<b>Ortalama</b>	5.91	5.89	

TDZ: Thidiazuron, BA: 6-benzyladenine, NAA: Naftalin asetik asit

\*: Aynı büyük/küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

Araştırmamızda, yalın ve farklı hormon kombinasyonları ilave edilmiş MS ortamlarının tamamında yaprak oluşumu gerçekleşmiştir. Yaprak sayısı en fazla 8.05 ile 0.1 mg/l<sup>-1</sup>TDZ uygulamasından elde edilirken, 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonu 2.98 ile en düşük yaprak sayısına yol açmıştır. Kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarında 5.91 olan yaprak sayısı, kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında 5.89 olarak bulunmuştur. Kaplama ve hormon uygulamaları birlikte incelendiğinde, en yüksek yaprak sayısının 9.48 ile yalın MS ortamında kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarından elde edildiği görülmektedir. Buna karşılık, en düşük yaprak sayısı (1.00) 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA hormon kombinasyonu içeren MS ortamında kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarından alınmıştır.

#### 4.1.5 Yaprak Uzunluğu

Farklı hormonlar eklenen MS ortamlarında kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında yaprak uzunluğuna ait verilerin varyans analizi Çizelge 4.9’da, ortalama yaprak uzunlukları Çizelge 4.10’da verilmiştir. Yaprak uzunluğu üzerine hormon ve kaplama x hormon interaksiyonunun etkisi önemli, buna karşılık kaplamanın etkisi önemsizdir.

**Çizelge 4.9** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Yaprak Uzunluğunun Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Kaplama (K)	1	0.05	0.05	0.64
Hormon (H)	8	21.09	2.63	29.6**
K x H	8	4.17	0.52	5.87**
Hata	54	4.80	0.09	
Genel	71	30.13		

\*\* : p<0.01

Çalışmada kullanılan farklı hormon kombinasyonlarında boğum eksplantlarında ölçülen yaprak uzunlukları 3.50 mm ve 1.46 mm arasında değişmiş ve hormon uygulaması yalın MS ortamına göre yaprak uzunluğunun azalmasına yol açmıştır. En yüksek (33.66 mm) ve en düşük (1.00 mm) yaprak uzunlukları sırasıyla hormon içermeyen ve 1.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA içeren MS ortamlarında kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarında ölçülmüştür.

**Çizelge 4.10** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Yaprak Uzunlukları (mm)

Hormon Kombinasyonu	Kaplama		Ortalama
	Var	Yok	
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	2.27 cdef*	2.72 bcd	2.50 BC*
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	2.05 def	2.37 cdef	2.21 CD
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	2.11 def	1.63 fg	1.88 DE
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA	2.62 bcde	2.99 abc	2.80 B
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	2.80 bcd	2.53 cde	2.66 BC
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	2.48 cde	2.48 bcde	2.55 BC
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	<b>1.00 g</b>	1.93 ef	<b>1.46 E</b>
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	2.75 bcd	2.13 def	2.44 BC
Yalın MS (hormon yok)	<b>3.66 a</b>	3.33 ab	<b>3.50 A</b>
<b>Ortalama</b>	2.42	2.47	

TDZ: Thidiazuron, BA: 6-benzyladenine, NAA: Naftalin asetik asit

\*: Aynı büyük/küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

#### 4.1.6 Kök Sayısı

Farklı hormonlar ilave edilen MS ortamında kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında kök sayısına ilişkin verilerin varyans analizi Çizelge 4.11’de, ortalama kök sayıları ise Çizelge 4.12’de verilmiştir. Varyans analizine göre, kök sayılarının değişiminde hormon uygulamalarının çok önemli etki yaptığı, buna karşılık kaplama ve kaplama x hormon interaksiyonunun etkisinin önemsiz olduğu anlaşılmaktadır.

**Çizelge 4.11** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kök Sayılarının Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Kaplama (K)	1	0.34	0.34	0.55
Hormon (H)	8	104.69	13.08	21.26**
K x H	8	8.84	1.10	1.79
Hata	54	33.23	0.61	
Genel	71	147.11		

\*\* : p<0.01

Çizelge 4.12, çalışmamızda kullanılan yalın ve hormon ilave edilmiş MS ortamlarının tamamında kök oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir. En yüksek kök sayısı (4.81) hormon içermeyen MS ortamından elde edilirken, en düşük kök sayısı (1.00) kaplamalı ve kaplamasız TDZ uygulamaları (0.1mg, 0.5mg, 1.5mg) ile 1.5mg/l-1TDZ + 0.5mg/l-1 NAA hormon kombinasyonundan elde edilmiştir. Kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarında 2.11 olan ortalama kök sayısı, kaplamasız

kotiledon boğum eksplantlarında 1.98 olmuştur.

**Çizelge 4.12** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kök Sayıları

Hormon Kombinasyonu	Kaplama		Ortalama
	Var	Yok	
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.00	1.00	1.00 C*
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.00	1.00	1.00 C
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.00	1.00	1.00 C
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA	2.79	2.53	2.66 B
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	2.87	2.59	2.73 B
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.94	2.89	2.41 B
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.00	1.00	1.00 C
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.71	1.93	1.82 BC
Yalın MS (hormon yok)	5.75	3.88	<b>4.81 A</b>
<b>Ortalama</b>	<b>2.11</b>	<b>1.98</b>	

TDZ: Thidiazuron, BA: 6-benzyladenine, NAA: Naftalin asetik asit

\*: Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

#### 4.1.7 Kök Uzunluğu

Farklı hormonlar uygulanan MS ortamında kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında kök uzunluğu verilerinin varyans analizi Çizelge 4.13'te, kök uzunlukları ise Çizelge 4.14'te verilmiştir. Varyans analizi, kök uzunluğunda hormon etkisinin çok önemli, kaplama ve kaplama x hormon interaksiyonunun etkisinin önemsiz olduğunu göstermiştir.

**Çizelge 4.13** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kök Uzunluğunun Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Kaplama (K)	1	0.005	0.005	0.06
Hormon (H)	8	12.45	1.55	18.36**
K x H	8	0.94	0.11	1.39
Hata	54	4.57	0.08	
Genel	71	17.97		

\*\* : p<0.01

Çalışmamızda yalın MS ortamının yanı sıra denenen bütün hormon kombinasyonlarında kök oluşumu gözlenmiş ve kök uzunlukları 2.22 cm ve 1.00 cm arasında değişmiştir. Kaplama ve hormon uygulamaları birlikte ele alındığında, en uzun köklerin (2.44 cm) yalın MS ortamında kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarından elde edildiği görülmektedir. Buna karşılık, en kısa kökler (1.00 cm)



TDZ ile muamele edilen kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında ölçülmüştür.

**Çizelge 4.14** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kök Uzunlukları

Hormon Kombinasyonu	Kaplama		Ortalama
	Var	Yok	
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.00	1.00	1.00 C*
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.00	1.00	1.00 C
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.00	1.00	1.00 C
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.61	1.87	1.74 B
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.94	1.57	1.75 AB
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.30	1.53	1.41 BC
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.00	1.00	1.00 C
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.30	1.47	1.38 BC
Yalın MS (hormon yok)	2.44	2.00	<b>2.22 A</b>
<b>Ortalama</b>	1.40	1.38	

TDZ: Thidiazuron BA: 6-benzyladenine NAA: Naftalin asetik asit

\*: Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

#### 4.1.8 Kallus Ağırlığı

Farklı hormonlar ilave edilen MS ortamında kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarında kallus ağırlığına ilişkin verilerin varyans analizi Çizelge 4.15'te, ortalama kallus ağırlıkları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Varyans analizine öge, kallus ağırlığında hormon, kaplama ve kaplama x hormon interaksyonunun etkisi çok önemlidir.

**Çizelge 4.15** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kallus Ağırlığının Varyans Analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Kaplama (K)	1	0.72	0.72	25.13**
Hormon (H)	8	7.95	0.99	32.32**
K x H	8	1.47	0.18	5.99**
Hata	54	1.66	0.03	
Genel	71	11.85		

\*\* : p<0.01

**Çizelge 4.16** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kaplamalı ve Kaplamasız Kotiledon Boğum Eksplantlarında Kallus Ağırlıkları (mg)

Hormon Kombinasyonu	Kaplama		Ortalama
	Var	Yok	
0.1 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	1.91 abc*	1.35 defg	1.61 A
0.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	<b>2.08 a</b>	1.49 cdef	<b>1.78 A*</b>
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ	2.04 ab	1.39 defg	1.72 A
0.1 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.00 g	1.00 g	1.00 B
0.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.00 g	1.002 g	1.00 B
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA	1.01 g	1.002 g	1.00 B
1.5 mg/l <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.57 cde	1.62 bcd	1.60 A
1.5 mg/l <sup>-1</sup> BA + 0.5 mg/l <sup>-1</sup> NAA	1.15 efg	1.06 fg	1.10 B
Yalın MS (hormon yok)	<b>1.00 g</b>	<b>1.00 g</b>	1.00 B
<b>Ortalama</b>	1.41 <sup>A</sup>	1.21 <sup>B</sup>	

TDZ: Thidiazuron, BA: 6-benzyladenine, NAA: Naftalin asetik asit

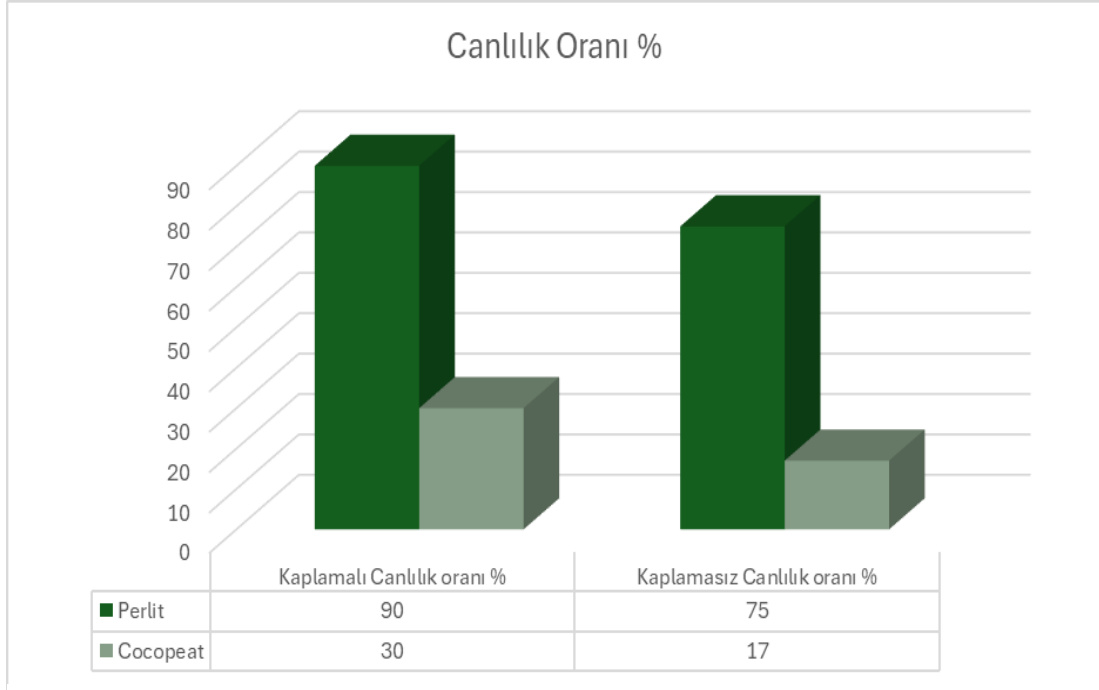
\*: Aynı büyük/küçük ve üstel harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

Çizelge 4.16'dan, çalışmada kullanılan hormon uygulamalarının tamamında ve yalın MS ortamında kallus oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir. Ortamlar arasında, üç TDZ uygulamasının diğer uygulamalara göre kallus ağırlığını çok önemli derecede artırdığı ve en yüksek kallus ağırlığının (1.78 g) 0.5 mg/l<sup>-1</sup>TDZ uygulamasından elde edildiği görülmektedir. Benzer şekilde, TDZ'nin NAA ile uygulaması da kallus ağırlığını yalın MS ortamına göre istatistiki olarak artırmıştır. Buna karşılık, üç farklı dozda BA uygulamaları yalın MS ortamına göre kallus ağırlığında önemli bir farklılık oluşturmamıştır. Kaplamasız boğum eksplantlarında 1.21 gram olan ortalama kallus ağırlığı, kaplamalı kotiledon boğum eksplantlarında 1.41 gram olarak gerçekleşmiştir. Kaplama ve hormon etkisi birlikte ele alındığında, sodyum aljinatla kaplamanın TDZ'nin kallus ağırlığı üzerine olan etkisini artırdığı görülmektedir.

#### 4.1.9 Canlılık Oranı

Rejenerasyon çalışması sonucunda, bitki büyüme düzenleyici ilave edilmemiş MS ortamındaki bitkiler arasından iyi gelişme gösterenler seçilmiş ve saksılara aktarılarak canlılık oranları (%) belirlenmiştir. Sodyum aljinatla kaplamalı ve kaplamasız olarak MS ortamında kültüre alınan eksplantlardan gelişen bitkilerin canlılık oranları incelendiğinde en yüksek canlılığın perlit ortamında kaplamalı bitkilerde %90, kaplamasız bitkilerde ise %75 oranında gerçekleştiği görülmüştür. Cocopeat ortamında ise bitkilerin hayatta kalma oranı kaplamalı ortamda %30,

kaplamasız ortamda %17 olarak elde edilmiştir. Kaplamanın canlılık oranı üzerinde arttırıcı olumlu etki yaptığı görülürken, elde edilen bitkilerin perlit ortamında daha iyi gelişme gösterdiği ortaya çıkmıştır (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9** Saksılara Aktarılan Bitkilerin Canlılık Oranı (%)

## 4.2 Kotiledon Yaprak Eksplantında *İn Vitro* Rejenerasyon

### 4.2.1 Kallus Ağırlığı

Farklı hormonlar ilave edilen MS ortamında kotiledon yaprak eksplantlarında kallus ağırlığına ilişkin verilerin varyans analizi Çizelge 4.17'de ortalama kallus ağırlıkları Çizelge 4.18'de verilmiştir. Varyans analizi, kallus ağırlığı üzerine hormon uygulamalarının etkisinin  $p < 0,05$  düzeyinde önemli olduğunu ortaya koymuştur.

**Çizelge 4.17** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kotiledon Yaprak Eksplantlarında Kallus Ağırlığının Varyans Analizi

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Hormon	8	12.74	1.59	4,88**
Hata	27	8.81	0.32	
Genel	35	21.56		

\*\*  $p < 0,01$  düzeyinde önemli

**Çizelge 4.18** Farklı Hormonlar İlave Edilen MS Ortamında Kotiledon Yaprak Eksplantlarında Tartılan Kallus Ağırlıkları (mg)

Hormon Uygulamaları	Ortalama
1 mg/l-1 BA + 0.1 mg/l-1 NAA	0,24 cd*
1 mg/l-1 BA + 0.5 mg/l-1 NAA	0,57 bcd
0.1 mg/l-1 TDZ + 0.1 mg/l-1 NAA	0,98 abc
0.2 mg/l-1TDZ + 0.1 mg/l-1 NAA	1,09 ab
0.5 mg/l-1 BA + 0.1 mg/l-1 TDZ +0.1 mg/l-1 NAA	1,64 a
0.5 mg/l-1 BA+ 0.5 mg/l-1TDZ + 0.1 mg/l-1 NAA	1,42 a
0.5 mg/l-1 BA + 0.1 mg/l-1 KN + 0.1 mg/l-1 NAA	0,11 d
0.5 mg/l-1 BA + 0.5 mg/l-1 KN + 0.1 mg/l-1NAA	0,01 d
Yalın MS (hormon yok)	0,01 d

TDZ: Thidiazuron, BA: 6-benzyladenine, NAA: Naftalin asetik asit

\*: Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak önemli fark (0.01) yoktur.

Çizelge 4.17'den, çalışmada kullanılan 9 farklı hormon uygulaması arasında sadece yalın MS ortamı ile 0.5 mg/l-1 BA + 0.5 mg/l-1 KN + 0.1 mg/l-1NAA kombinasyonunda kallus oluşumunun neredeyse hiç gerçekleşmediği görülmektedir. En yüksek kallus ağırlığı (1.64 g) 0.5 mg/l-1 BA+0.1 g/l-1 TDZ +0.1 mg/l-1 NAA hormon kombinasyonundan elde edilmiştir.

### 4.3 Elde Edilen Bitkilerin Aklimatizasyonu

Aklimatizasyon sonucunda kontrollü şartlar altında 4 haftanın sonunda Şekil 3.10' da görüldüğü gibi başarılı bir şekilde bitki büyümesi gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.10** Elde Edilen Bitkilerin Dört Haftalık Gelişimi

Çalışmamızda, kotiledon boğum eksplantlarının sodyum aljinatla kaplanması sadece kallus ağırlığında istatistiki olarak önemli farklılığa yol açmış ve kallus ağırlığını artırmıştır. Diğer taraftan, kök sayısı ve kök uzunluğu dışındaki özelliklerde kaplama x bitki büyüme düzenleyici interaksyonunun önemli olması, bitki büyüme düzenleyicilerin özellikler üzerine etkilerinin eksplantın aljinatla kaplanmış olup, olmamasına göre değiştiğini ifade etmektedir. Bitki büyüme düzenleyici eklenmemiş yalın MS ortamında kültüre alınan sodyum aljinatla kaplanmış kotiledon boğum eksplantları, kallus ağırlığı dışındaki bütün özelliklerde en yüksek değerleri vermiştir. Buna karşılık, 0.1 mg l<sup>-1</sup> TDZ+ 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonu içeren yalın MS ortamında kültüre alınan aljinatla kaplanmış kotiledon eksplantları neredeyse bütün özelliklerde en düşük değerlerin alınmasına yol açmıştır. Diğer taraftan, bitki büyüme düzenleyici ilave edilmemiş yalın MS ortamında kültüre alınan kotiledon boğum eksplantlarının sodyum aljinatla kaplanması sürgün sayısı, boğum sayısı ve yaprak sayısında 2 katına varan artışların oluşmasını sağlamıştır.

Literatür taramalarında *Cistus creticus L.* bitkisinde herhangi bir eksplantın aljinatla kaplanarak *in vitro* bitki rejenerasyonunun sağlanması konusunda yürütülen bir çalışmanın olmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmadan elde edilen bulguların literatürle karşılaştırılmalı olarak tartışması yapılamamıştır. Bitki biyoteknolojisinde kaplama çoklukla sentetik tohum (kapsüllenmiş somatik embriyo) üretiminde kullanılan bir tekniktir (Gray ve Prohit, 1991; Tripathi, 2017). Ancak son yıllarda bazı bitkilerde somatik embriyo üretim şansının düşük ve maliyetin yüksek olmasından dolayı sürgün uçları, yanal tomurcuklar, boğum ve kotiledon segmentleri gibi, tam bir bitkiyi verebilecek embriyonik olmayan vejetatif bitki parçalarının eksplant olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başladığı görülmektedir (Standardi ve Micheli, 2013; Kulus ve Zalewska, 2014; Alhady ve Reda, 2017; Dönmez, 2022).

Tohumla çoğaltma, bitkilerdeki en yaygın çoğaltma yöntemi olmakla birlikte, çoğu bitki türünün tohumlarında çeşitli sebeplerden kaynaklanan ve tohumlara ancak bazı ön işlemler uygulanarak giderilebilen dormansi görülmektedir (Odabaş ve ark., 2020). *Cistus Creticus L.* türünde de sert, geçirimsiz tohum kabuğundan kaynaklanan dormansi, bu türün tohumla çoğaltımını oldukça zorlaştırmaktadır (Pela ve ark., 2000; Zygomala ve ark., 2003). Aralarında çok sayıda tıbbi ve aromatik bitkinin de yer aldığı

dormansi gösteren bu bitkilerin kolay ve hızlı üretiminde bitki doku kültürü teknikleri oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

İn vitro rejenerasyonda besi ortamındaki oksin-sitokinin dengesinin iyi ayarlanması ve uygun eksplant kaynağının seçilmesinin başarıyı artıran en önemli faktörlerin aşında geldiği bilinmektedir. Bu kapsamda, tıbbi ve aromatik bitkilerde *in vitro* bitki rejenerasyonunun sağlanması için farklı eksplant kaynaklarıyla TDZ, BA, IBA, IAA ve NAA gibi bitki büyüme düzenleyicilerin farklı doz ve kombinasyonlarda denendiği çalışmalar yürütülmektedir (Uçar ve Turgut, 2009; Islam ve Bari, 2012; Sezgin ve Kapdan, 2019).

Bilimsel literatürde *C. creticus* bitkisinin *in vitro* rejenerasyonuna ilişkin olarak yürütülen çalışmalarının sınırlı sayıda olduğu görülmektedir (M'Kada et al., 1991; Morte and Honrubia, 1992; Iriundo et al., 1995; Madesis ve ark., 2011). Ayrıca literatürde, *Cistus creticus* türünün *in vitro* bitki rejenerasyonunda kotiledon boğum eksplantlarının kullanıldığına ilişkin herhangi bir bildirim bulunmamaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerde yürütülen çalışmalarda genellikle sürgün uçları, yanal tomurcuklar, boğum segmentleri eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Arıcı ve ark., 2017; Sezgin ve Kapdan, 2019). Ancak, burçak (Erdoğan ve ark., 2004), bezelye (Jackson ve Hobbs, 1990) ve bakla (Khalafalla ve Hattari, 1999) gibi baklagillerde yapılan çalışmalarda, bizim çalışmamızda olduğu gibi, kotiledon boğum eksplantının kullanıldığı ve yüksek oranda rejenerasyon sağlandığı rapor edilmektedir.

*C. creticus* 'un yaprak eksplantlarının *in vitro* rejenerasyonu için TDZ ve NAA bitki büyüme hormonlarının denendiği bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda yalnız TDZ uygulamalarına göre, TDZ+NAA kombine uygulamasında kallus oluşumu, sürgün ve kök gelişiminin daha fazla olduğu ve NAA'nın TDZ'nin etkisini olumlu yönde artırdığı ve 0.1 mg l<sup>-1</sup> TDZ+ 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonundan en yüksek değerlerin elde edildiği rapor edilmiştir (Madesis ve ark., 2011). Diğer taraftan, uygulanan TDZ dozları arttıkça (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.2 ve 3.0 mg l<sup>-1</sup>) kallus, kök ve sürgün oluşumu önemli derecede azalmıştır. Bu bulgulara benzer şekilde, bizim çalışmamızda da MS ortamına eklenen TDZ dozu arttıkça (0.1, 0.5 ve 1.5 mg l<sup>-1</sup>) kaplamalı ve kaplamasız kotiledon eksplantlarında sürgün, boğum ve yaprak sayıları ile sürgün ve yaprak uzunlukları önemli derecede azalmıştır. Diğer taraftan, tıbbi ve

aromatik bitkilerde yürütülen bazı araştırmalarda TDZ'nin düşük dozlarının sürgün gelişimini artırdığı, yüksek konsantrasyonlarda TDZ içeren ortamlarda ise gelişmenin azaldığı bildirilmektedir (Mirici, 2004). Ayrıca, Uçar ve Turgut (2009) *Sideritis stricta* türünde yüksek TDZ konsantrasyonu içeren ortamlarda gelişme oranının azaldığını ve en fazla rejenerasyonun, bizim çalışmamızda olduğu gibi, bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamından (MS0) alındığını rapor etmiştir. Diğer taraftan, Madesis ve ark. (2011)'nin çalışmasından farklı olarak, bizim çalışmamızda ortama NAA ilave edilmesi (1.5 mg l<sup>-1</sup> TDZ+ 0.5 mg l<sup>-1</sup> NAA) sürgün, boğum ve yaprak gelişiminde artış yerine önemli azalmalara yol açmıştır. Nitekim incelenen bütün özelliklerde en düşük değerler 1.5 mg/l<sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA kombine uygulamasında gerçekleşmiştir.

Bunlara ilaveten, kallus ağırlığı hariç, diğer bütün özelliklerde, BA ilave edilen MS ortamlarında, TDZ ilave edilen ortamlara göre önemli artışlar olduğu ve BA'nın rejenerasyon üzerine olumlu etkisinin TDZ'den çok daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Buna karşılık, 0.5 mg/l<sup>-1</sup> BA veya TDZ içeren MS ortamına 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA ilave edilmesinin hiçbir özellikte olumlu katkılar yapmadığı ve azalmalara yol açtığı gözlenmiştir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, pembe laden (*Cistus creticus L.*)’de, sodyum aljinatla kaplamalı ve kaplamasız kotiledon boğum eksplantlarının farklı konsantrasyon ve kombinasyonda bitki büyüme düzenleyiciler içeren MS ortamında *in vitro* rejenerasyonu incelenmiştir.

Araştırmada, başlangıç materyali olarak Ordu ili merkez Kuyulu mahallesinde doğal floradaki bitkilerden alınan laden tohumları kullanılmıştır. Laden tohumları GA<sub>3</sub> ilave edilmiş MS ortamında çimlendirilmiş ve çimlenen tohumlardan elde edilen kotiledon boğum eksplantları sordum alginatla kaplamalı ve kaplamasız olarak farklı konsantrasyon ve kombinasyonda bitki büyüme düzenleyici (BA, NAA ve TDZ) içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. Kültür sonunda gelişen bitkiciklerde kallus ağırlığı, kök sayısı, kök uzunluğu, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, boğum sayısı, yaprak sayısı ve yaprak uzunluğu incelenmiştir.

Varyans analizi sonuçları, bitki büyüme düzenleyicilerin incelenen bütün özelliklerde önemli farklılıklara yol açtığını, buna karşılık sodyum alginatla kaplamanın etkisinin kallus ağırlığı dışındaki diğer özelliklerde önemli olmadığını ortaya koymuştur. Diğer taraftan, kaplama x bitki büyüme düzenleyici interaksyonu sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, boğum sayısı, yaprak sayısı, yaprak uzunluğu ve kallus ağırlığında önemli farklılıklara yol açarken, kök sayısı ve kök uzunluğunda önemli etki göstermemiştir.

İncelenen özelliklerin çoğunda, eksplantların sodyum alginatla kaplanması, bitki büyüme düzenleyicilerin etkisini artırmıştır. Yaprak sayısı ve kallus ağırlığı dışındaki bütün özelliklerde, en yüksek değerler bitki büyüme düzenleyici içermeyen yalın MS ortamından elde edilmiştir. Diğer taraftan, incelenen özelliklerin tamamında en düşük değerlerin 1.5 mg/l<sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonunda gerçekleştiği dikkati çekmektedir. Kallus ağırlığı hariç, diğer özelliklerde, BA kullanılan ortamlarda, TDZ kullanılan ortamlara göre önemli artışlar olmuştur. Buna karşılık, 0.5 mg/l<sup>-1</sup> BA veya TDZ içeren MS ortamına 0.5 mg/l<sup>-1</sup> NAA ilave edilmesinin hiçbir özellikte olumlu katkılar yapmadığı ve azalmalara yol açtığı gözlenmiştir.

Bu çalışma ile, önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olan pembe laden türünde sodyum alginatla kaplamamış/kaplanmamış kotiledon boğum eksplantlarının farklı



konsantrasyon ve kombinasyonlarda BA, TDZ ve NAA içeren MS ortamında *in vitro* rejenerasyonu başarıyla sağlanmıştır. Bu bulgular, kotiledon boğum eksplantının rejenerasyon kapasitesinden pembe ladenin *in vitro* oğaltımında pratik olarak yararlanılabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, ileriye yönelik araştırmalarda farklı kaplama ve eksplant kaynaklarının yanı sıra bitki büyüme düzenleyicilerin farklı tip ve dozlarının denenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Alhady, A., Reda. & MA. (2017). *In vitro* plant regeneration from alginate encapsulated shoot tips of *Casimairoa edulis* L. *Egyptian Journal of Desert Research*, 67 (2), 315- 325.
- Alp, H.A. (2020). Türkiye’de yetişen bazı sıklamen türlerinin yumrularında somatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi araştırmaları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana. 1-218.
- Arıcı, ŞE., Şan, B. & Kaza, S. (2017). Yağ gülü (*Rosa damascena* mill)’nün in vitro koşullarda klonal çoğaltımı. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(2), 239-252.
- Baboğlu, M., Gürel, E. & Özcan, S. (2001). Bitki biyoteknolojisi doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 374s.
- Baltacı, AM. (2018). Oğulotu (*Melissa Officinalis*) bitkisinde meristem ve somatik embriyo kültürlerinden sentetik tohum elde etme olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kayseri. 1-45.
- Baskaran, P., Kumari, A. & van Staden, J. (2015). Embryogenesis and synthetic seed production in *Mondia whitei*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 121, 205–214.
- Bektaş, E. & Sökmen, A. (2016). *In vitro* seed germination, plantlet growth, tuberization, and synthetic seed production of *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq. *Turkish Journal of Botany*, 40(6), 584-594.
- Benelli, C. (2016). Encapsulation of shoot tips and nodal segments for *in vitro* storage of Kober 5BB grapevine rootstock. *Horticulturae*, 2(3):10.
- Bürün, B. (2016). Bitki biyoçeşitliliğinin korunmasında biyoteknolojinin kullanımı ve Türkiye’deki çalışmalar. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 10(1), 1-16.
- Cengiz, İD. (2015). Laden’lerin (*Cistus* sp.) yol şevleri islahında kullanılma olanakları. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Ana Bilim Dalı, İstanbul. 1-90.
- Cheruvathur, MK., Kumar, GK. & Thomas, TD. (2013). Somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113(1), 63-71.
- Christodoulakis, N. S., Georgoudi, M. & Fasseas, C. (2014). Leaf structure of *Cistus creticus* L. (Rock Rose), a medicinal plant widely used in folk remedies since ancient times. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 20(2), 103–114.
- Coode, MJE., Davis, P. Mill, R. & Tan, K. (1988). Cistaceae flora of Turkey and the east aegean islands. *Edinburgh, Edinburgh University Press*, (10),61.
- Çatav, ŞS. (2013). *Cistus salviifolius* L.’un (Cistaceae) yangın sonrası çimlenme özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Muğla. 64.

- Dilmen, R. (2019). Yağ Gülü (*Rosa Damascena* Mill.)'Nün *in vitro* çoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Isparta. 1-33.
- Dönmez, D. (2022). Regeneration of plants from alginate-encapsulated shoot tips of myrtle (*Myrtus communis* L.). *Erwerbs-obstbau*, 64(2), 307-314.
- Dursun, B. (2019). Melez Kabak (*Cucurbita pepo* L.) genotiplerinde *in vitro* rejenerasyon. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, İstanbul. 1-150.
- Ekinci, N. & Uzun, S. (2021). 6-Benzilaminopurin ve Thidiazuron'un bazı yonca çeşitlerinde *in vitro* sürgün rejenerasyonuna etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (21), 600-603.
- Erdem, M. & Uysal, H. (2021). Synthetic seed. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 2(2), 68-74.
- Erdoğan, Y., Çöçü, S., Parmaksız, İ., Sancak, C. & Arslan, O. (2013). Bazı burçak hatlarında (*Vicia ervilia* L. Wild.) kotiledon boğum eksplantından adventif sürgün rejenerasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 10 (2) 206-210.
- Erdoğmuş, SF., Durmuş, ŞN. & Özdemir S. (2023). *Cistus creticus* ekstrelerinin kontrollü salımını gerçekleştiren katı lipid nanopartiküllerin (KLN) geliştirilmesi ve antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2505-2515.
- Gray, DJ. & Purohit, A. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seeds technology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10, 33-61.
- Gopi, C. & Ponmurugan, P. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. *Journal of Biotechnology*, 126 (2), 260-264.
- Gökmen, FŞ. & Duman, H. (2021). *Cistus × florentinus* Lam. (Cistaceae): Türkiye florası için yeni bir melez kaydı. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 8(3), 30-40.
- Ioannidis, K. & Koropouli, P. (2024). Effects of different media and their strengths in *in vitro* culture of three different *Cistus creticus* L. populations and their genetic assessment using simple sequence repeat molecular markers. *Horticulturae*, 10(1), 104.
- Iriondo, JM., Moreno, C. & Perez C. (1995). Micropropagation of six rockrose (*Cistus*) species. *HortScience*, (30), 1080-1081.
- Islam, MS. & Bari, MA. (2012). *In vitro* regeneration protocol for artificial seed production in an important medicinal plant *Mentha arvensis* L. *Journal of Bio-Science*, 20 (1),99-108.
- Jankovics, I., Borsos, M., Mirani, S. & Dénes, B. (2021). Early use of polyphenol-rich *Cistus creticus* extract containing nasopharyngeal spray is associated with significantly shorter duration of symptoms in mild COVID-19 patients: A retrospective case control study. *Journal of Community Medicine and Public Health Reports*, 2-9.

- Jackson, JA. & Hobbs, SLA. (1990). Rapid multiple shoot production from cotyledonary node explants of pea (*Pisum sativum* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology*, 26, 835-838.
- Kara, Z., Yazar, K. & Doğan, O. (2023). Sentetik tohum ve bağcılıkta kullanımı. *Bahçe* 52 (Özel Sayı 1), 418-433.
- Karık, Ü., Oğur, E. & Çiçek, F. (2016). Türkiye tıbbi ve aromatik bitkiler genetik kaynakları. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 26 (1), 62 – 71.
- Khalafalla, MM. & Hattari, K. (1999). A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Growth Regulation*, 27, 145-148.
- Kilic, D.D., Siriken, B. & Erturk, O. (2019) Antibacterial, antioxidant and DNA interaction properties of *Cistus creticus* L. extracts. *J Int Environmental Application Science*, 14, 110-5.
- Kulus, D. & Zalewsk, M. (2014). *In vitro* plant recovery from alginate-encapsulated *chrysanthemum* × *grandiflorum* (ramat.) kitam. shoot tips. *Propagation of Ornamental Plants*, 14 (1), 3-12.
- Kumar, GK. & Thomas, TD. (2012). High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea* Linn. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 110(1),141-151.
- Lakhera, K., Kumar, A., Rani, A., Dixit, R. & Rana, S. (2018). Plant tissue culture and its application. *Bulletin of Pure & Applied Sciences- Botany*, 37 (6), 32-37.
- Lahcen, SA., El Hattabi, L. & Benkaddour, R. (2020). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus creticus* leaves. *Chemical Data Collections* ,26,100346.
- Loizzo, MR., Jemia, MB. & Senatore, F. (2013). Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food Chemical Toxicol*,59,86-94.
- Louro, R., Peixe, A. & Silva. SC. (2017). New Insights on *Cistus salviifolius* L. micropropagation. *Botanical Sciences*, 6(3), 12–16.
- Maheshwari, SC. (1995). *In vitro* culture of wheat and genetic transformation-retrospect and prospect. *Critical reviews in plant sciences*, 14(2), 149-178.
- Madesis, P., Konstantinidou, E., Tsaftaris, A. & Nianiou-Obeidat, I. (2011). Micropropagation and shoot regeneration of *Cistus creticus* ssp. *creticus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(8), 54–58.
- Magray, MM., Wani, KP., Chatto, MA. & Ummyiah, HM. (2017). Synthetic seed technology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 662-674.
- Manjkhola, S., Dhar, U. & Joshi, M. (2005). Organogenesis, embryogenesis, and synthetic seed production in *Arnebia euchroma* a critically endangered medicinal plant of the Himalaya. *In vitro Cellular & Developmental BiologyPlant*, 41(3), 244-248.

- Mohammed, A. (2016). Development Of An *In vitro* regeneration protocol, synthetic seed production and determination of antioxidant activity of goldenberry (*Physalis Peruviana* L.). Abant Izzet Baysal University The Graduate School Of Natural And Applied Sciences, Master Of Science, Bolu, 1-98.
- Morte, MA. & M. Honrubia. (1992). *In vitro* propagation of *Helianthemum almeriense* Pau (Cistaceae). *Agronomie*, 12(10),807–809.
- Mirici, S. (2004). Endemik Geven (*Astragalus polemoniicus* Bunge) Bitkisinin yaprak sapı ve yaprak eksplantlarından yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(34), 31-34.
- M'kada, J., Dorion, N. & Bigot, C. (1991). *In vitro* propagation of *Cistus x purpureus* Lam. *Scientia Horticulturae*, 46 (1-2), 155-160.
- Odabaş, S., Özcan., MM. & Kara. ŞM. (2020). Bazı kimyasal uygulamaların siyah mürver (*Sambucus nigra* L.) tohumlarında dormansinin kırılması ve çimlenme üzerine etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7 (4), 920-927.
- Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S. & Kanellis, AK. (2014). Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Frontiers in Chemistry*, 2(35), 1-19.
- Parrot, WA., Merkle, SA. & Williams, EG. (1993). Somatic embryogenesis: Potential for use in propagation and gene transfer systems, Editors: Murray, D.R., Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology, C.A.B International, UK., 158-200.
- Pela, Z., Pencheva, M., Gerasopoulos, D. & Maloupa, E. (2000). *In vitro* induction of adventitious roots and proliferation of *Cistus creticus creticus* L. plants. *Acta Horticultureae*, 541, 317-322.
- Ruta, C. & Fortunato, M. (2010). *In vitro* propagation of *Cistus clusii* Dunal, an endangered plant in Italy. *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 46, 172–179.
- Sargin, SA., Selvi, S. & Acar, M. (2014). Türkiye' de yayılış gösteren *Cistus* L. (Cistaceae) cinsi üzerinde taksonomik ve morfolojik araştırmalar. *Ulusal Botanik/Bitki Bilimi Kongresi*, 25-28 Ekim 2014, Antalya.
- Sargin, SA. & Selvi, S. (2016). Türkiye'de yayılış gösteren *Cistus* L. (Cistaceae) cinsinin karşılaştırmalı yaprak anatomisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2): 41-48.
- Saxena, A., Shukla, M., & Saxena, P. (2019). Synthetic seeds: Relevance to endangered germplasm conservation *in vitro*. *Synthetic Seeds: Germplasm Regeneration, Preservation and Prospects*, 21-60.
- Secgin, Z. & Okumuş, A. (2022). Alginate in synthetic seed production in tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) Effect of rates on storage time. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 3(1), 30-35.
- Sezgin, M. & Kapdan, E. (2019) Propagation of some medicinal and aromatic plants in Turkey by biotechnological methods. *Comm. J. Biol.*, 3(2), 124-131.

- Sökmen, A. & Gürel, E., (2001). Sekonder metabolit üretimi: Bitki biyoteknolojisi i., doku kültürü ve uygulamaları, Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., Selçuk Üniversitesi, Konya, 211-261.
- Standardi, A. & Micheli, M. (2013). Encapsulation of *in vitro*-derived explants: an innovative tool for nurseries. *Methods in Molecular Biology*, 11013:397-418.
- Stephen, R. & Jayabalan, N. (2000). Artificial seed production in coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Plant Tissue Culture*, 10(1), 45-49.
- Stępień, AE. (2017). Cytotoxic and anti-cancer activity of the *Cistus* species of herbal plants. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 15 (2), 165-168.
- Stępień, A., Aebisher, D. & Bartusik-Aebisher, D. (2018). Biological properties of *Cistus* species. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 16(2),127-132.
- Tanker, N., Koyuncu, M. & Coşkun, M. (2019). Farmasötik Botanik. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:123, Ankara, 219-220s.
- Tavşanoğlu, Ç., Erik, S., Yeşilyurt, EB. & Ergan, G. (2014). Cistaceae familyasında tohum karakterleri ile yangın sonrası çimlenme arasındaki ilişkinin belirlenmesi. *TÜBİTAK*, Ankara, (1002-113Z512), 1-57.
- Telli, O. (2010). *In vitro* koşullarda *Gentiana Cruciata* L. bitkisinden sentetik tohum üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, İzmir. 1-60.
- Tripathi, M. (2017). Synthetic seed technology and its applications: A Review. *International Journal of Plant Biotechnology*, 3(1), 11-16.
- Uçar, E. & Turgut, K. (2009). Bazı dağ çayı (*Sideritis*) türlerinin *in vitro* çoğaltımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22 (1),51-57.
- Zygomala, AM., Ioannidis, C. & Koropouli, X. (2003). *In vitro* propagation of *Cistus creticus* L. *Acta Hort.* 616, 391-396.

# **EKLER**

## EKLER

**EK 1:** Çalışmadan elde edilen sentetik tohumların alt kültüre alınmadan önce oluşturdukları sürgün, kök, yaprak gibi yapılarının bazı görseller





**EK 2:** Çalışmada yaprak eksplantından elde edilen kallus yapılarına ait bazı görseller



**EK 3:** Kaplanmamış kotiledon boğum eksplantından sadece MS ortamında elde edilen bitkilere ait bazı görseller



**EK 4:** Kaplanmış kotiledon boğum eksplantından sadece MS ortamında elde edilen bitkilerin bazı görselleri



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	İlknur TÜRKMEN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Fakülte	Ziraat Fakültesi
Bölümü	Tarla Bitkileri
Mezuniyet Yılı	15.06.2020
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Programı	Tezli Yüksek Lisans
Mezuniyet Tarihi	2024