

**T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

TARIM BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

**IN VİTRO KOŞULLARDA BAZI YEREL KENEVİR (CANNABİS SATİVA L.)
POPÜLASYONLARININ
ÇOĞALTIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burak ÖNOL

**ARALIK 2021
UŞAK**

**T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

TARIM BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

**IN VİTRO KOŞULLARDA BAZI YEREL KENEVİR (CANNABİS SATİVA L.)
POPÜLASYONLARININ
ÇOĞALTIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burak ÖNOL

UŞAK, 2021

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Burak ÖNOL



**İN VİTRO KOŞULLARDA
BAZI YEREL KENEVİR (CANNABİS SATİVA L.)
POPÜLASYONLARININ ÇOĞALTIMI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Burak ÖNOL

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
Tarım Bilimleri Ana Bilim Dalı**

Aralık 2021

ÖZET

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), Türkiye'nin 20 ilinde tarla koşullarında yetişen önemli bir tıbbi ve endüstriyel bitkidir. Bu çalışma, *In vitro* koşullar altında farklı tohum çimlendirme ve rejenerasyon teknikleri kullanılarak gelecekteki *In vitro* ıslah çalışmalarına zemin hazırlamayı amaçlamıştır. Çalışmada Uşak ve Samsun Vezirköprü Kenevir popülasyonları kullanılmıştır. Her iki kenevir popülasyonu için % 50 ticari çamaşır suyu uygulanmış ve ardından 3×5 dakika steril saf su ile durulama yapılarak yüzey sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda kontrol, GA3 ve BAP muamelesi ile agarla katılaştırılmış damıtılmış su, MS ve Gamborg B5 ortamı kullanılarak tohumların çimlendirilmesi sağlanmıştır. Sonuç olarak, kontrol olarak kullanılan *In vitro* ortamlardaki çimlenme oranı uygulamalara göre yetersiz kalmıştır. En iyi tohum çimlenmesi S.Vezirköprü kenevir popülasyonu kullanılarak Gamborg B5 ortamı üzerinde %73,33 ile elde edilmiştir. Bunu takiben agar ile katılaştırılmış damıtılmış su uygulaması ile %63,33 tohum çimlenmesi izlenmiştir. Sürgün rejenerasyonu için eksplantlar, *In vitro* koşullar altında geliştirilen bitkilerden elde edilmiştir. En iyi sürgün rejenerasyonu %83,33 ile 0,4 mg / l Thidiazuron içeren Gamborg B5 ortamında koltuk altı meristem eksplantından elde edilmiştir. Diğer eksplantlardan kayda değer bir sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Tüm bitkiler,

rejenerasyon ortamında köklenmiştir. Köklenen bitkiler, adaptasyon için kontrollü koşullar altında büyüme odasına aktarılmıştır. Ardından bu bitkiler, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasına başarıyla taşınmıştır. Çalışmada hedeflenen gelecekteki *In vitro* ıslah çalışmalarının temelini oluşturmak için tohum çimlenmesi ve sürgün rejenerasyonu ile ilgili, kayda değer önemde verilere ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Thidiazuron, 6-Benzilaminopürin, mikropropagasyon, MS, Gamborg B5

Sayfa Adedi : 68

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Mehmet Uğur YILDIRIM, Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

IN IN VITRO CONDITIONS
SOME LOCAL CANNABIS (CANNABIS SATIVA L.)
REPRODUCTION OF POPULATIONS
(M.Sc. Thesis)

Burak ÖNOL

UŞAK UNIVERSITY
GRADUATE EDUCATION INSTITUTE
Department of Agricultural Sciences

December 2021

ABSTRACT

Cannabis (*Cannabis sativa* L.), is an important medicinal and industrial plant grown under natural conditions in 20 provinces of Turkey. This study aimed to lay the groundwork for future *In vitro* breeding studies using different seed germination and regeneration techniques under *In vitro* conditions. Uşak and Samsun Vezirköprü cannabis populations were used in the study. The surface sterilization of both hemp populations was achieved using 50% commercial bleach by shaking seeds for 15 minutes, followed by rinsing with sterilized distilled water for 3×5 minutes. The seeds were germinated using MS medium (control), different concentrations of GA3 and BAP in MS medium, distilled water solidified with agar, and Gamborg B5 medium solidified with agar. *In vitro* germination percentage on MS medium used as a control was insufficient compared to the other treatments. The best seed germination (73.33%) was achieved on Gamborg B5 medium using the S.Vezirköprü cannabis population. Subsequently, 63.33% seed germination was achieved on the same population using distilled water solidified with agar. The explants for shoot regeneration were obtained from the plantlets germinated under *In vitro* conditions. The best shoot regeneration was obtained from stem node explants in Gamborg B5 medium containing 0.4 mg / l Thidiazuron with 83.33% regeneration percentage. Significant shoot regeneration could

not be obtained from other explants. All plants were rooted in the regeneration medium. The rooting plants were transferred to the growth chamber under controlled conditions for adaptation. Thereafter, these plants were successfully transferred to the experimental gardens of the Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Ankara University. Significant data on seed germination and shoot regeneration were obtained to form the basis of future *In vitro* breeding research aimed in the study.

Keywords : Thidiazuron, 6-Benzylaminopurine, micropropagation, MS, Gamborg B5

Number of Page : 68

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mehmet Uğur YILDIRIM, Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

TEŞŞEKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen başta danışmanlarım Doç. Dr. Mehmet Uğur YILDIRIM'a (Uşak Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü) ve Prof. Dr.Khalid Mahmood KHAWAR'a (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri ABD) teşekkür ederim. Ayrıca Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri bölümünün tüm bölüm imkanlarını kullanmam konusunda bana destek olan Prof. Dr. Hayrettin KENDİR (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı) ve Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri ABD) teşekkür ederim. Tez süresince manevi desteğini esirgemeyen Dr. Yasin ÖZGEN'e (Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri ABD) ve Dr. Muhammet Çağrı OĞUZ'a teşekkür ederim.

Son olarak değerli eşim ve bir tanecik kızıma sonsuz desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
HARİTA DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	11
3. MATERYAL ve METOT	22
3.1. MATERYAL	22
3.1.1. Bitki Materyali.....	22
3.1.2. Eksplant Materyali.....	22
3.2. METOT	23
3.2.1. Besin Ortamlarının Hazırlanması	23
3.2.2. Büyüme Düzenleyicilerin Hazırlanması.....	25
3.3. <i>IN VITRO</i> ÇALIŞMALAR.....	27
3.3.1. Ekipmanların Sterilizasyonu.....	27
3.3.2. Besi Yerinin Sterilizasyonu	27
3.3.3. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	27
3.3.4. Kenevir Tohumlarının Çimlenme ve Fide Oluşumu	28
3.3.5. Mikropropagasyon Çalışmaları	30
3.4. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	30
4. DENEYSEL BULGULAR	31
4.1. KENEVİR TOHUMLARINDA STERİLİZASYON İŞLEMİNİN ETKİSİ. 31	
4.2. TOHUM ÇİMLENDİRME OPTİMİZASYONU	33
4.2.1. GA ₃ Dozlarının Çimlenme Üzerine Etkisi.....	33
4.2.2. GA ₃ ve Farklı BAP Dozlarının Çimlenme Üzerine Etkisi.....	36

4.2.3. Steril Saf Suyun Çimlenme Üzerine Etkisi.....	38
4.2.4. Farklı Besi Yerlerinin Çimlenme Üzerine Etkisi.....	39
4.3. MİKROPROPAGASYON ÇALIŞMALARI	41
4.3.1. Farklı Besi Ortamlarında TDZ'nin Mikropropagasyon Çalışmalarına Etkisi	41
4.2.2. Çeşitli TDZ Dozlarının Farklı Bitki Eksplantlarında Mikropropagasyon Çalışmalarına Etkisi	42
4.4. TOPRAK ANALİZİ VE METEROLOJİK VERİLER	47
4.5. TOPRAKTA GELİŞİM AŞAMASI.....	48
5. TARTIŞMA	51
5.1. KENEVİR BİTKİSİNDE STERİLİZASYON İŞLEMİNİN ETKİSİ	51
5.2. TOHUM ÇİMLENDİRME OPTİMİZASYONU	51
5.2.1. GA ₃ Dozlarının Çimlenme Üzerine Etkisi.....	51
5.2.2. GA ₃ ve Farklı BAP Dozlarının Çimlenme Üzerine Etkisi	52
5.2.3. Steril Saf suyun Çimlenme Üzerine Etkisi	52
5.2.4. Ms ve Gamborg B5 Ortamlarını Çimlenme Üzerine Etkisi	53
5.3. MİKROPROPAGASYON ÇALIŞMALARI.....	54
5.3.1. Farklı Besi Ortamlarında TDZ'nin Mikropropagasyon Çalışmalarına Etkisi	54
5.3.2. Farklı Eksplantların TDZ'nin Farklı Dozları ile Mikropropagasyon Çalışmalarına Etkisi	54
5.3.3. Toprakta Gelişim Aşaması.....	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	56
6.1. SONUÇ.....	56
6.2. ÖNERİLER	56
7. KAYNAKLAR	58
8. ÖZGEÇMİŞ	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MS ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları.....	24
Çizelge 3.2. Bitki büyüme düzenleyicilerin saklama koşulları	26
Çizelge 4.1. Kenevir tohularında farklı dozlarda yüzey sterilizasyonunda uygulanan NaOCl etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan varyans analizi sonuçları.....	31
Çizelge 4.2. Kenevir tohumlarında farklı dozlarda yüzey sterilizasyonunda uygulanan NaOCl etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan Duncan analizi sonuçları.....	32
Çizelge 4.3. Kenevir bitkisinde farklı dozlarda GA ₃ uygulanan etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan varyans analizi sonuçları	34
Çizelge 4.4. Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan GA ₃ etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan t test analizi sonuçları	34
Çizelge 4.5. Kenevir bitkisinde GA ₃ ve farklı dozlarda BAP uygulamasının etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan varyans analizi sonuçları.....	36
Çizelge 4.6. Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan BAP etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan Duncan analizi sonuçları	37
Çizelge 4.7. TDZ'nin farklı bitki eksplantlarında mikropogasyon çalışmalarına etkisinin varyans analizi sonuçları	43
Çizelge 4.8. Kenevir bitkisinin farklı eksplantları üzerinde değişen TDZ dozların etkilerinin belirlenmek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları	44
Çizelge 4.9. Deneme yerine toprak analizi sonuçları	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kenevir bitkisinden elde edilen endüstriyel ürünler. (National Agricultural Marketing Council (South Africa) değiştirerek 2020).....	4
Şekil 1.2. Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılacak temel yöntemler	8
Şekil 3.1. 6-Benzilaminopürin (BAP) molekülü (Teixeira da Silva, Jaime A. ResearchGate. Ulaşım 2019-02-14.).....	25
Şekil 3.2. Giberellik Asit (GA ₃) molekülü	25
Şekil 3.3. Thidiazuron (TDZ) molekülü	26
Şekil 4.1. Kenevir tohumlarında farklı dozlarda yüzey sterilizasyonunda uygulanan NaOCl etkisinin çimlenme üzerine etkisi sonuçları	32
Şekil 4.2. Kenevir bitkisinde farklı dolarda uygulanan GA ₃ etkisinin belirlenmesi.....	35
Şekil 4.3. Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan BAP etkisinin belirlenmesi	37
Şekil 4.4. Kenevir bitkisinde steril saf suyun çimlenme üzerine etkisinin belirlenmesi	38
Şekil 4.5. Kenevir bitkisinde farklı besi yerlerinin çimlenme üzerine etkisinin belirlenmesi.....	40
Şekil 4.6. Kenevir bitkisinin farklı popülasyonları üzerinde farklı besi ortamlarında TDZ'nin mikropropagasyon çalışmalarına etkisinin belirlenmesi	41
Şekil 4.7. Kenevir bitkisinin farklı eksplantları üzerinde değişen TDZ dozların etkilerinin belirlenmesi	45

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1. Dünyada yaygın olarak bulunan <i>Cannabis</i> türleri [a] <i>C. sativa</i> (flickr.com) (b) <i>C. indica</i> (orijinal) (c) <i>C. ruderalis</i>	1
Resim 3.1. Kenevir bitkiciği eksplant bölgeleri/eksplantları.....	22
Resim 3.2. Sterilizasyonda kullanılan ekipmanlar; etüv(a), otoklav(b), sterilizatör(c)..	27
Resim 3.3. Bu çalışmada kullanılan Kenevir bitkisinin tohumlarının yüzey sterilizasyonu	28
Resim 3.4. Yüzey sterilizasyonu sonrası ekim çalışması	29
Resim 4.1. Yüzey sterilizasyonu sonrası çimlenmekte olan kenevir bitkisi tohumları ..	33
Resim 4.2. Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan GA3 sonrasında çimlenmekte olan kenevir bitkisi tohumları	35
Resim 4.3. Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan BAP uygulaması sonrasında çimlenmekte olan kenevir bitkisi tohumlarına örnek	38
Resim 4.4. Steril saf su içerisinde çimlenen tohumlar.....	39
Resim 4.5. (a)MS besi ortamında ve (b)Gamborg B5 besi yerinde çimlenen tohumlar.	40
Resim 4.6. Kenevir bitkisinin farklı popülasyonları üzerinde TDZ'nin mikropropagasyona etkisinin gözlemlenmesi.....	42
Resim 4.7. TDZ dozlarının farklı eksplantlar üzerine etkisinin (a),(b),(c),(d),(e) gözlemlenmesi	46
Resim 4.8. <i>In vitro</i> şartlarda elde edilen (a, b) S. Vezirköprü, (c) Uşak popülasyonuna ait bitkilerin iklim dolabında dış koşullara alıştırılması	47
Resim 4.9. Deneme yerine ait 2020 yılının sıcaklık, yağış ve rüzgar verileri	48
Resim 4.10. 10. Günün sonunda toprak koşullarına alınan kenevir bitkisi	50
Resim 4.11. 15. Gün tarla şartlarına alınan kenevir bitkisinin 17 gün sonra gözlemlenmesi	50

HARİTALAR DİZİNİ

Harita 1.1 Resmî Gazete Sayı: 29842 2016 ve Sivas Valiliğ 06.01.2021 tarih ve E-27
145502-160.99-3718439 sayılı yazı'ya göre kenevir yetiştiriciliğinin serbest olduğu iller
..... 6



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

°C

Santigrat derece

%

Yüzde

mg/L

Miligram/Litre

g/L

Gram/Litre

μM

Milimolar

Kısaltmalar

Açıklama

MR

Nem geri kazanımı

g

gram

mg

miligram

NAA

1- Naphthaleneacetic acid bitki büyüme düzenleyici hormon

IAA

Indoe-3-acetic acid büyüme düzenleyici hormon

BAP

6- Benzylaminopurine büyüme düzenleyici hormon

TDZ

Thidiazuron bitki büyüme düzenleyici hormon

GA₃

Gibberellic acid bitki büyüme düzenleyici hormon

MS

Murashige and Skoog bitki büyütme besi ortamı

2,4-D

2 4-dichlorophenoxyacetic acid hormon

2,4,5-T

2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid hormon

THCA

Tetrahydrocannabinolic acid

CBGA

Cannabigerolic acid

CBDA

Cannabidiolic acid

μM

Moların binde biridir

ISSR

Moleküler markörlerinler

GC	Gaz kromatografisi
THCV	Tetrahidrokannabivarin
pH	Asitlik veya bazlık değeri
N	Çözeltilinin 1 mililitresinde bulunan mili eşdeğer gram sayısıdır.
kPa	Metrik sistemin bir basınç birimidir
SPSS	İstatistik programı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
THC	Tetrahidrikannabinol
CBD	Cannabidiol
DAP	Diamonyum fosfat gübresi
V.K	Varyans kaynakları
S.D	Sapma değeri
K.O	Kareler ortalaması
dk	Dakika
ml	Mililitre, litrenin binde biri

1. GİRİŞ

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), Cannabaceae familyasına ait tek yıllık, lif, yağ ve tıbbi metabolit üretiminde kullanılan çok amaçlı bir bitkidir. Cannabis sınıfının içinde olan bitkiler [genellikle *C. sativa* (Şekil 1a), *C. indica* (Şekil 1b) ve *C. ruderalis* (Şekil 1c)] yaygın bir biçimde lif, yiyecek, endüstriyel ve ilaç hammadresi olarak kullanılabilen otsu bitkilerdir.



(a)

(b)

(c)

Resim 1.1 Dünyada yaygın olarak bulunan *Cannabis* türleri [a] *C. sativa* (flickr.com)
(b) *C. indica* (orijinal) (c) *C. ruderalis*(flickr.com)

Kenevir çok eski çağlardan itibaren Avrupa ve Asya’da kullanıla gelen bir kültür bitkisidir. M.Ö. 5000 yıllarına ait kenevir bitkisinden elde edilmiş kumaşlara rastlanmıştır. M.Ö. 2700’lü yıllarda kenevir bitkisi ilaç olarak kullanılmıştır. Çin’de, M.Ö. 2000-2200 yılları arasında daha sonraları ise Avrupa’da kullanımı yaygınlaşmıştır. M.Ö. 1500’lü yıllarda da Anadolu’da kenevir yetiştiriciliği yapıldığı bilinmektedir.

Cannabis cinsine ait kullanım alanlarına göre farklılık gösteren ve dünyada bilinen 779 kenevir türü bulunmaktadır. Kenevir bitkisi, kazık köklü, tek yıllık, uzun gün bitkisidir. Işık alma ihtiyacı en az 12-14 saat arasındadır (Gizlenci ve ark., 2019a).

Kenevir Bitkisi gündüz süresinin gece süresine göre daha fazla olduğu günlerde, ilkbahar ve yaz mevsimlerinde çiçeklenen bir bitkidir. Toprağın 4 metre derinliklerine kadar uzanan kuvvetli bir ana kökü vardır. Bitki sapı genellikle en üst bölgesi altı

köşeli, üst bölgesi dört köşeli, alt bölgesi de yuvarlaktır. Sapı ilk gelişim zamanında otsu, öz suyu fazladır. Sapı olgunlaştıkça oluklu odunsu bir görünüm almaktadır.

Sap boyu 6 metreye kadar uzayabilir. Yapraklar boğumlardan çıkmaktadır. Seyrek ekimlerde sap kalınlaşır ve dallanma fazlalaşır. Dişi bitkilerin sapı kalın, kısa boylu, dallanması çok olup, olgunlaşması geç olmaktadır. Erkek kenevir bitkisinin sapı daha ince yapılı, daha uzun boylu, dallanması az ve olgunlaşması daha hızlıdır (Gizlenci ve ark., 2019a).

Kenevir bitkisinde teknik sap uzunluğu kotiledon yapraklardan, tepe yaprakların almasıklı olduğu kısma kadar olan bölüm kabul edilir. Lifler sapın kabuk kısmındadır. Çoğunlukla erkeklerde lif oranı dişilerdeki lif oranından daha yüksektir.

Yapraklar ise bir sap üzerinde bileşik yapıda 3-11 yaprakçıktan oluşmaktadır. Yaprakçıkların her biri dişli ve ortadaki yaprakçık uzun yapıdadır. Yapraklar karşılıklı, teknik sapın ucundan itibaren ise almasıklı olarak sapa dizilmişlerdir (Ramaekers ve ark., 2009; Gizlenci ve ark., 2019a).

Kenevir iki evcikli bir bitkidir. Dişi ve erkek çiçek yapıları farklı bitkiler üzerinde bulunmaktadır. Ancak, bazı tıbbi olarak yetiştirilen türlerde hermafrodit yapı görülebilmektedir. Erkek kenevir bitkilerinde sapın uç kısmında, yaprak koltuk altlarından çıkan çiçekler esnek bir salkım biçimindedir.

Esas sapın uç kısmında da çiçek bulunmaktadır. Çiçek rengi genellikle beyazımtırak yeşildir. Kimi cinslerde pembe, yeşil ve mor karışımı tonlar oluşmaktadır. Dişi çiçek, dişi bitkilerde sapın tepe kısmındaki yaprak koltuk altlarından çıkan kısa sapçıklar üzerinde bulunmaktadır. Tüm çiçekler meyve veya tohum meydana getirir.

Tozlaşma su, kuşlar, böcekler, diğer hayvanlar, rüzgâr ve insanlar sayesinde gerçekleşir. Erkek kenevir bitkileri tozlaşmadan sonra olgunlaşmaya başlarlar. Tohumları yeşilimtırak, kahve renkli, sert ve yumurta şeklindedir. Kenevir bitkisinin tohumunda %21-23 protein, %22 oranında karbonhidrat ve %29-33 yağ içeriği vardır. Bin dane ağırlığı 15-55 g arasında değişiklik göstermektedir

Kullanım alanlarına göre kenevir bitkisi iki ana grup altında incelenir; Bunlardan birincisi içerdiği Tetrahidrokannabinol (THC) ötürü Marijuana olarak da

bilinen, uyuşturucu veya ilaç olarak kullanılan türlerdir (Ramaekers ve ark., 2009). Diğer grupta değerlendirilen endüstriyel kenevir bitkisi ise psiko-aktif bileşeni içermeyen veya çok düşük olan kısımdır. Tamamen tohum, lif ve kenevir bitkisinden elde edilen öz ve yağ gibi yan ürünler kullanarak yirmi beş binin üzerinde ürüne hammadde sağlayan cinslerdendir (Ajansı, OR. A. N. 2019).

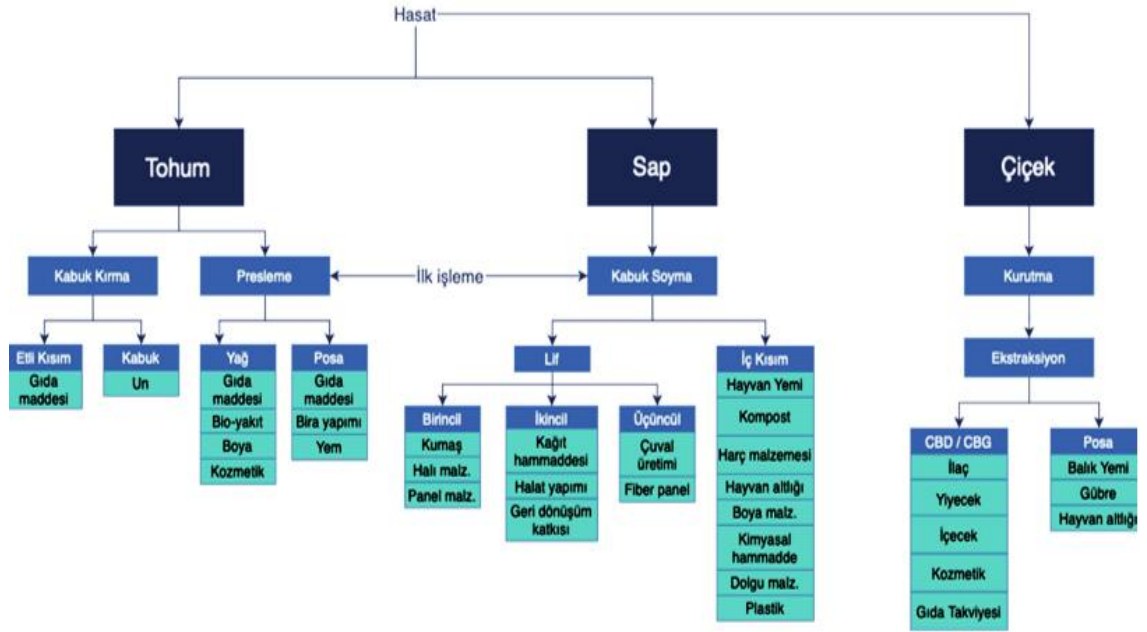
Günümüzde ekimine izin verilen ve üretilen tohumlar THC seviyesi %0,3 ün altında ve Türkiye’de de ekime elverişli kabul edilen yasal sınırlar dahilinde olan bitkilerdir. Kenevir bitkisinden çok fazla sayıda sanayi kolu için maliyeti düşük hammadde üretimi güvenli bir şekilde yapılabilmektedir (Ajansı, OR. A. N. 2019).

Kenevir bitkisinin yaklaşık 25 000 endüstriyel ürünün üretiminde hammadde olarak kullanılabildiği saptanmıştır (Robbins ve ark., 2013).

Bu alanların başlıcalarını;

- Kozmetik ürünleri,
- Beton katkı ürünleri
- Panel üretimi
- Gıda takviyeleri
- Kimyasal ilaç alternatifleri,
- Bio-dizel üretimi
- Çözünebilir plastik alternatifleri
- Kağıt hammaddesi, selüloz ve tekstil ürünleri ile kumaş üretimi oluşturmaktadır.

Kenevir hasat edilmesinin ardından tohum ve lifleri ayrı ayrı ya da birlikte işleme tabi tutulmaktadır. Bu işlemler ve sonrasında elde edilen ürünler iki ana başlık altında incelenmektedir.



Şekil 1.1 Kenevir bitkisinden elde edilen endüstriyel ürünler. (National Agricultural Marketing Council (South Africa 2020 değiştirerek)

Gövde yapısı ele alındığında, kuru madde miktarının %70'inin selülozdan oluştuğu görülmektedir. Bu kısmının %45'i karbondan oluşur. Geri kalan kısmının %22'si hemi-selüloz maddesinden meydana gelmektedir. Kenevir lifi doğal liflerin içerisinde yapı olarak en dayanıklılarından ve üretim olarak da en düşük maliyetli üretilenlerden birisidir (Kaya ve Öner, 2013).

Kenevir bitkisinin lifleri; sarımsı ve kahve gri renkte, 1-3 metre arasında uzunlukta, yüksek çekme direnci olan ve %12 nem geri kazanımına sahiptir (MR%). Zararlı güneş ışınlarını geçirmeyen ve yoğun parlaklığa sahiptir. Bu nitelikleri ile birçok sentetik ve doğal lifle kıyaslandığında avantaj sağlayabilmektedir (Montford ve Small, 2013).

Tohumları incelendiğinde ise 1 çay kaşığı kenevir tohumu 2500 mg Omega 6, 1000 mg Omega-3, 4,6 g yağ, 2,1 g protein ve 0,3 g lif içeriği görülmektedir (Abrams, 2013).

Endüstriyel kullanım alanının yanı sıra kenevir bitkisi sağlık sektöründe de tüm dünyada çok ciddi şekilde kullanılmaktadır.

Kenevir bitkisinin biyokütlesi ve fitokimyasalları, farmasötikler için değerli kaynaklardır. Tetrahidrokanabinol ve kannabidiol dâhil olmak üzere *C. sativa*'dan biyoaktif bileşikler içeren çeşitli preparatların çok çeşitli sağlık yararları ile bağlantılı olduğu bilinmektedir.

Tıp alanında kullanılan kenevir bitkisinin kanser hastaları için potansiyel yararları arasında çoğunlukla ağrı kesici ve uyku düzenleyici, iştah uyarımı, antiemetik etkiler bilinmektedir (Doblin ve ark., 2013). Yapılan araştırmaların çoğunluğunun belirti (semptom) mücadelesine yönelik yapıldığı tespit edilmiştir. A.B.D 'de bulunan eyaletlerin birçoğunda kenevir bitkisi hastalıkların tedavisinde reçeteli olarak hastalarda legal olarak kullanılmaktadır (Doblin ve Kleiman, 1991).

Denek hayvanları üzerinde yapılan bir çalışma, kannabinoidlerin belirli tümör tiplerinin büyümesine karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini saptanmıştır (Sánchez ve ark., 2001). Göğüs kanseri hücrelerinde CBD'nin (cannabidiol) zararlı hücre ölümleri üzerindeki etkisi hakkında yapılan *In vitro* çalışmalarda, CBD'nin vanilloid, CB1, CB2 reseptörlerinden bağımsız olarak zararlı hücre ölümüne sebep olduğu sonucu tespit edilmiştir. (National Toxicology Program, 1996; Blázquez ve ark., 2004; Śledziński ve ark., 2018).

Tüm bunların yanı sıra sürdürülebilir bir mâmül olması sebebi dünya kenevir sektörünün 2016'dan 2030 yılına kadar 4 katına çıkması tahmin edilmektedir (Prof. Dr. K. M. Khawar ile görüşme 2020).

Dünyada toplam 36 ülkede kenevir bitkisinin endüstriyel olarak üretimi yapılmaktadır (Aydoğan ve ark., 2020). Kenevir bitkisinin küresel pazarının hacmi 2017 yılında 4 milyar dolar, 2018 yılında ise 4,7 milyar doları bulduğu, 2025 yılında da 11 milyar dolara çıkacağı beklenmektedir. Kuzey Amerika'da yasal kenevir pazar hacmi, 2018'de yıllık %30 artışla 12 milyar A.B.D. dolarına ulaşmıştır. En büyük pazar, 10,4 milyar A.B.D. doları hacme sahip ABD'nin elinde bulunmaktadır (FAO, 2019). Bunu 1,6 milyar A.B.D. doları ile Kanada takip etmektedir.

Kenevir endüstrisi analistlerinden Arcview Market Research'ün raporuna göre, Kuzey Amerika'daki tüm yasal kenevir pazarının satışlarda 24,5 milyar dolara ulaşacağını tahmin ediyor. Kısa vadede ise 2021 yılına kadar %28'lik bir ek büyüme

öngörüsünde bulunulmuştur (FAO, 2019). 23 Mart 2020'de sadece Denver'da yapılan satışlar, 7 gün içerisinde %392 artmıştır (Kenevirhaber, 2020).

Türkiye'de endüstriyel kenevir lifi üretimi son 6 yıl boyunca yıllık ortalama yalnızca 1 ton olmuştur (TÜİK, 2020). Bu rakam Çin'de yıllık 44 000 tondur. Psikoaktif içeriği yüzünden kenevir uzun yıllar boyunca Türkiye de dâhil olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde ekimi yasaklanan bitkisel ürünlerin başında gelmektedir.

‘Kenevir Yetiştiriciliği ve Kontrolü Hakkında Yönetmelik’ (Resmî Gazete Sayı: 29842 2016) ve Sivas Valiliği 06.01.2021 tarih ve E-27 145502-160.99-3718439 sayılı yazı’ya göre kenevir yetiştiriciliği sınırlı olarak 20 ilde (Kütahya, Çorum, Amasya, Zonguldak, Burdur, Kastamonu, Bartın, İzmir, Antalya, Karabük, Kayseri, Malatya, Ordu, Samsun, Sinop, Uşak, Rize, Yozgat, Tokat ve Sivas) üretime izin verilmiştir.



Harita 1.1 Resmî Gazete Sayı: 29842 2016 ve Sivas Valiliği 06.01.2021 tarih ve E-27 145502-160.99-3718439 sayılı yazı’ya göre kenevir yetiştiriciliğinin serbest olduğu iller

Sap, lif, tohum ve buna benzer amaçlara yönelik izinli kenevir bitkisi yetiştiriciliği yapmak isteyenler, 1 Ocak-1 Nisan tarihleri arasında yetiştiricilik yapacakların bulundukları yerin en büyük mülki idare amirliğine başvuru yaparak gerekli izinleri ortalama 1 ay ve en çok 3 ay içinde alabilmektedirler.

Kenevir üreticisi, kenevir üretimi süresince düzenli olarak yapılacak kontrolleri kolaylaştırmakla ve hasat sonrasında yeni izin alınmadığı takdirde geriye kalan

kısımları imha etmekle sorumludurlar. THC içeriğine haiz olmayan diğer bitki kısımları endüstriyel olarak kullanılabilir.

Türkiye’de 1988’de yasal olarak 1200 ton olan kenevir tohumu üretimi, 2015 yılında 1 tona kadar gerilemiştir. 2017 yılında ise ekim alanı sadece 10 hektar lif, 2 hektar tohum amaçlı üretim gerçekleşmiş olup, 2018 ve 2019 yıllarında bitme noktasına gelmiştir. 12 hektara kadar gerileyen ekim alanı sadece Samsun ili Vezirköprü ilçesi Narlısaray Beldesi’nde bulunmaktadır. Son 20 yıllık TÜİK (1998-18) verileri incelendiğinde; özellikle 2001 yılında 160 ton olan üretimin 2013-17 arasında 1 tona kadar gerilemesi %160’lık bir gerileme tespit edilmesine sebep olmuştur (TÜİK, 2020).

Bu kısıtlanmanın en önemli sebebi; kenevirin çok sayıda alt türünün bulunması ve taksonomik olarak ayrımının yapılmasının mümkün olsa da günümüzde birbiriyle melezlenmiş ara türlerin çok fazla bulunması ve genotiplerin hangi alt türe ait olduklarının tespitinin olanaksız olmasıdır.

Türkiye koşullarında doğal ve kimyasal profilindeki tutarlılığı sağlamak amacı yeni çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

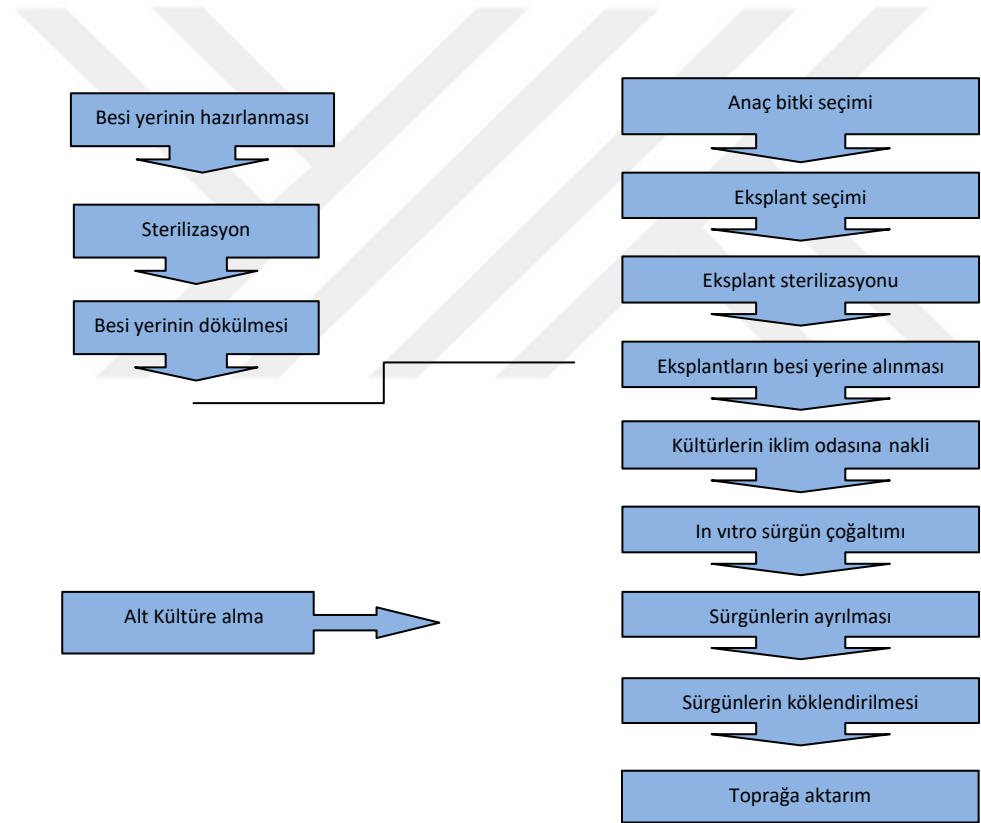
Klasik yöntemler kullanılarak çok uzun zaman alan ıslahın başarısını, fenotipik anaçlardan gelen genetik faktörler ile içinde bulundukları ortamın koşulları belirlemektedir (Hussein, 2014).

Bitki ıslahında kantitatif karakterleri etkileyen genlerin klasik ıslah metotlarıyla yeni bireylere aktarılmasında özellikle bağlantı (linkage) gibi birçok farklılık ortaya çıkmaktadır. Bu bağlantı bazı olumsuz karakterleri determine eden genlerin de geçmesini sağlamaktadır (Güleç, 2010). Klasik ıslah yönteminde melezleme ile aktarılan genin/genlerin özelliklerinin bitkiler üzerinde fenotipik karakterler olarak gözlenebilmesi için, çok sayıda bitki popülasyonuna ve bu bitkilerin yetiştirilebileceği çok büyük alanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkilerde istenmeyen özelliklerin ortadan kaldırılması, uzun yıllar geri melezlemeleri zorunlu kılmaktadır. Bunun gibi bazı sorunlar klasik bitki ıslahının önemli olumsuzluklarıdır (Özgen, 2005). Biyoteknolojik yöntemlerin kullanıma girdiği zamana kadar yapılan ıslah çalışmalarında daha çok ürün kalitesi ve miktarının artırılmasına çalışılmış, kültür bitkilerinde hastalık ve zararlılara

karşı dayanıklılık kazandırılması her zaman ikinci plana bırakılmıştır (Yildiz ve ark., 2010; Pelit ve ark., 2011).

Bitki biyoteknolojisine yönelik ilk çalışmalar 1900'li yılların başlarında gerçekleştirilmesine rağmen, modern biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanılması 1980'li yıllara dayanır.

Bitki biyoteknolojisinde kullanılan bir yöntem olan bitki doku kültürü; steril, kontrollü ve steril edilmiş besin ortamında bitki kısımlarının veya bitki hücrelerinin gelişmesine yönelik temel ve uygulamalı alanlar bakımından gerekli ve önemli bir yaklaşım sistemidir [(Bknz. Şekil 1.2) (Thorpe, 2007)].



Şekil 1.2 Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılacak temel yöntemler

Üretimi kısıtlı ve zor olan bitkiler için kullanılabilir hızlı bir yöntem olarak benimsenen doku kültürü yönteminin uygulanmasıyla bitkinin vejetatif üretiminin yaygınlaştığı, kısa sürede üretimine olanak sağlandığı, genetik stabilitenin sağlandığı, homojen bitki elde edilebildiği bilinmektedir.

Mikroçoğaltım farklı bitki türlerinde de uygulanabildiği için bitkilerin vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda üretimine olanak sağlamaktadır. Mikroçoğaltım, bitkiden alınan ve tam bir bitki oluşturma potansiyeline sahip bitki bölümlerinden (tohum, sürgün, polen, embriyo, gövde, yaprak, kök, tek bir hücre ya da kallus vb.) *In vitro* şartlarda yeni bitkilerin oluşturulması olarak tanımlanmaktadır.

Bitkilerin uygun ve gerekli kültür istekleri, besin maddeleri istekleri, büyüme düzenleyici hormonları biliniyorsa mikroçoğaltım yöntemi kullanılarak bütün bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Mansuroğlu ve Gürel 2001). Bitkilerin mikroçoğaltımı, sekonder metabolitlerin *In vitro* yöntemlerle çoğaltılması gibi faydalarının yanı sıra, bitkiye yılın her döneminde ulaşılabilmesi ve daha kısa kültür süresine ihtiyaç duyulması, nesli tehlikede olan bitki türlerinin korunması, üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerliğin (homojenite) sağlanması, zor üretilen türlerin daha kolay üretilmesi gibi ciddi avantajlar sağlamaktadır.

Kenevirin ekimi birçok ülkede yasal çerçevede ciddi şekilde düzenlenmiştir; bu nedenle alternatif *In vitro* büyüme teknikleri çok dikkat çekmektedir.

C. sativa bitkilerini nodal segmentlerde aksiler tomurcukların stimülasyonu veya uçlarda filizlenen tomurcuklardan kültür başlatma yoluyla *In vitro* olarak çoğaltma yöntemleri önem kazanmıştır (Lata ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009). Mikroçoğaltılmış bitkilerin genetik olarak kararlı olduğu gösterilmiştir.

Bu nedenle, bu klonal çoğaltım yönteminin uygun ve kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Chandra ve ark., 2010). Ayrıca, diğer vejetatif çoğaltım yöntemiyle karşılaştırıldığında kenevir bitkisinde *In vitro* mikroçoğaltım, en etkili çoğaltma yöntemidir (Lata ve ark., 2010a).

Aseptik bir teknik olarak mikroçoğaltma, kenevir üretiminde yüksek bir potansiyele sahiptir. Hastalık ve zararlılardan arındırılmış, hızlı bir çoğaltma tekniğidir. Bu yöntem ile değerli anaç bitkilerin korunması, yüksek kalitede gen kaynaklarının muhafazası ve kullanımı sağlanır (Lata ve ark., 2010b).

Kenevirin dişi ve erkek bitkisi bulunmaktadır. Ekilen tohumların %70-75 oranında dişi bitki olurken, %30-25'i erkek bitki elde edilmektedir. Yani, üretici tohumu tarlaya ekerken erkek veya dişi bitki tohumu ayırt edip ekme seçeneğine sahip

değildir (Aytac ve ark., 2018). Endüstriyel kenevirin CBD oranının yüksek, THC oranının ise çok düşük olması istenmektedir.

Toplumda sadece uyuşturucu olarak bilindiği ve endüstriyel üretim süreçlerinde petrol ürünlerinin kullanımı sebebiyle, kenevir bitkisi ekimi zamanla azalmıştır (Ulaş, 2018).

Büyük ölçekli tarlada kenevir ekiminin kontrolü zordur. Bitkilerdeki kannabinoid içeriği değişkendir ve birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle alternatif üretim yöntemleri araştırılmalıdır. Mikroçoğaltma tekniklerinin geliştirilmesi, genetik modifikasyon için gerekli bir adımdır. Bazı narkotik genotipler için umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, lif türlerinin mikro çoğaltılması daha fazla araştırma gerektirir.

Bu tez çalışmasında, kenevir (*Cannabis sativa*) bitkisinin, fizyolojik, morfolojik ve kimyasal profilindeki stabiliteyi sağlamak amacı ile *In vitro* şartlarda hızlı çoğaltım yöntemi ile çoğaltımını sağlamak ve ileride yapılabilecek *In vitro* ıslah çalışmalarına zemin hazırlamak ve kısa zamanda amaca uygun gen dizilimine sahip bitki materyallerinin genetik açılıma uğramadan eldesi amaçlanmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

Kenevir bitkisi uyuşturucu, sarhoş edici veya ilaç olarak kullanıldığında (esrar veya marijuana), bitkinin yaprakları ve çiçekli kısımları ifade edilir. *Cannabis sativa*, kenevir olarak en yaygın kullanılan bitkidir. Ancak *C. indica* ve *C. ruderalis* dâhil olmak üzere başka kenevir türleri de vardır. Esrar, psikoaktif etkileri için kullanıldığında öncelikle yakılarak solunur veya ağızdan yutulur. Esrarın birincil psikoaktif bileşeni, gevşeme, hafif öfori, sedasyon ve algısal bozulma üreten bir kannabinoid, delta-9-tetrahidrokanabinoldür (THC). Esrarda ve THC'de bulunan kannabidiol, kannabinol ve THCV (tetrahidrokanabivarin) dâhil olmak üzere 80'den fazla başka kannabinoid bulunmaktadır. Esrar tıbbi olarak ise iştah üzerindeki etkileri, göz içi basıncının azalması, analjezik etkileri ve diğer birçok bozukluk için kullanılır. Amerika Birleşik Devletleri'nde eyalet düzeyindeki son yasal gelişmeler, tıbbi amaçlar için esrar kullanımının ve bulunabilirliğinin artmasına yol açmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nin 18 eyaletinde bir çeşit tıbbi marijuana satılmaktadır (Pereira ve Wiegand, 2014). *Cannabis sativa L. (Cannabaceae)* bilinen en eski şifalı bitkilerdir ve yıllardır lif ve yağ üretimi için de kullanılmaktadır (Ulaş, 2018). Dünyadaki birçok ülke, son yıllarda esrar kullanımını suç olmaktan çıkarmışlardır. Türkiye'de de son yıllarda 20 (Amasya, Antalya, Bartın, Burdur, Çorum, İzmir, Karabük, Kastamonu, Kayseri, Kütahya, Malatya, Ordu, Rize, Samsun, Sinop, Tokat, Uşak, Yozgat, Zonguldak ve Sivas) ilde resmi izin ile kenevir üretimi için izin verilmiştir.

Bu çalışmada kenevir ve benzer esrar ve lif bitkilerinde rapor edilmiş doku kültürü ile elde edilen çalışmaların özetleri ve kuramsal temelleri verilmiştir.

Öktüren ve Sönmez (2005), Bitkilerin sağlıklı gelişmeleri ve dengeli büyüebilmeleri için hormonların bitki besin elementleri ile olan ilişkilerinin belirlenmesi ve buna bağlı olarak tarımsal üretimin yapılması gerektiğini kabul etmişlerdir. Hormonların birbirleriyle ilişkileri, bitki bünyesindeki etkileşimleri ve fonksiyonları bitki besin elementleri tarafından yönlendirildiğini belirtmişlerdir. Bu sebeple bitki bünyesindeki hormonların konsantrasyonu bitki besin elementlerinin miktarına, türevine ve bitkinin genetik özelliklerine bağlı olarak farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bretagne ve ark. (1994), farklı keten çeşitlerinde thidiazuron, zeatin ve BAP sitokininlerinin kotiledon, hipokotil ve sürgün ucu eksplantlarında sürgün gelişimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu üç sitokinin kaynağının rejenerasyon üzerine olan etkisi gerek yalnız, gerekse NAA, 2,4-D ve IAA ile birlikte incelenmiştir. Araştırmada kotiledon eksplantları kök oluştururken, sürgün ucundan gen aktarımı için gerekli seviyede sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. En olumlu sürgün rejenerasyonu 0,01 μ M NAA ve 0,1 μ M thidiazuron birlikte kullanıldığı hipokotil eksplantlarından elde etmişlerdir.

Kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin etki mekanizmalarını inceleyen bu çalışmada ise ; Yıldız ve Özgen (2006), naphtalene acetic acid (NAA), thidiazuron (TDZ), benzylaminopurine (BAP)' ın farklı dozlarının ve kombinasyonlarının keten çeşitlerinin hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkisi araştırmışlardır. Düşük sürgün rejenerasyonu transgenik bitkilerin elde edilmesinde sınırlayıcı önemli bir faktördür. Keten (*Linum usitatissimum* L.), yüksek kaliteli kuruyan yağı ve lifi nedeniyle önemli bitkilerden biridir. Keten bitkileri, *In vitro* teknikler kullanılarak hipokotil kısımlarından kolaylıkla rejenere olmaktadır. Araştırmalardan elde edilen en iyi sonuçlar, 1 mg/l BAP ve 0,02 mg/l NAA içeren MS ortamından; Madaras, 1886 Sel. ve Clarck çeşitlerinde sırasıyla eksplant ağırlığında 1054, 944 ve 800 mg, sürgün sayısında 9,8, 9,8 ve 15,4, Petri başına toplam sürgün sayısında 98.0, 96.0 ve 108.0 olarak elde edilmiştir. 1 mg/l'nin üzerinde artan TDZ dozları, eksplant üzerinde toksik etki göstermiş ve sürgün rejenerasyon frekansı önemli derecede düşmüştür. Çalışma sonucu TDZ'nin keten *In vitro* kültüründe yalnız başına kullanılması önerilmemiştir.

Fisse ve ark. (1981), yapılan bu çalışmada kenevir dokuları organogenez ile çoğaltılmıştır. Alınan yaprak ve meristem eksplantlarından doğrudan sürgün oluşumu ve kallus üzerinden kök oluşumu gözlenirken kallus üzerinden sürgün oluşumunun çok zor olduğunu tespit etmişlerdir.

Mandolino ve Ranalli (1999), yaptıkları *In vitro* şartlardaki kenevir bitkisi kültürüyle başarı elde etmişlerdir. Çalışmada 2-4 D, IBA, BA, NAA bitki büyüme düzenleyicilerini kullanmışlardır. Eksplant olarak ise kotiledon, hipokotil, yaprak ve kök kullanmışlardır. Yapılan çalışma ile bu başarının hormonların bitki besin

elementleri ile olan ilişkilerinin belirlenmesi ve bitki büyüme düzenleyicilerin tespiti ile bağlantılı olduğunu göstermişlerdir.

Slusarkiewicz-Jarzina ve ark. (2005), bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı dozlarda kallus gelişimi ve bitki rejenarasyonu üzerindeki etkilerini farklı kenevir çeşitlerinde incelemişlerdir. Kallus oluşumlarını farklı bitki eksplantlarında (yaprak sapları, tomurcuklar ve internodlar) değişik dozlarda bitki büyüme düzenleyiciler (DICAMBA, KIN, 2-4-D, NAA) kullanarak tespit etmeye çalışmışlardır. En yüksek kallus oluşumu yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. Bitki rejenarasyonunu incelenen tüm kenevir çeşitlerinde görmüşlerdir. Dıcamba içeren MS ortamlarında yaprak sapından kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Kallus oluşumunu %1,35 olarak gözlemlenmişler ve toplam 46 bitkide rejenerasyon izlenmiştir.

Flores-Sanchez ve Verpoorte, (2008) kültüre alınan *C. sativa* bitkilerinde kannabinoid üretimi üzerine çalışmışlardır. Yapraktan başlatılan hücre kültürlerinde eksplantları, 1,55 g/l Gamborg B5 vitaminleri ile desteklenmiş ortamlara almışlardır. Başka bir kültür ortamında ise 1mg/l 2-4 D ve 1 mg/l Kinetin kullanmışlardır. Bu çalışmada kannabinoid artışında kullanılan kültür ortamlarının belirgin bir etkisinin olmadığını gözlemlenmişlerdir (Flores-Sanchez ve ark., 2009).

Jiang ve ark. (2015), kenevir bitkisinin *In vitro* şartlarda internodlarını kullanarak kallus oluşumunu teşvik etmişlerdir. Çalışma sonunda kallus oluşumu için en iyi kombinasyonun 1mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA içeren MS besi ortamı olduğunu rapor etmişlerdir.

Loh ve ark. (1983), *C.sativa* bitkisinde farklı süspansiyon kültürlerini kullanarak kallus oluşturmuşlardır. Embriyo, yaprak ve gövdeden aldıkları eksplantları farklı dozlarda oksin ve sitokinin 2,4-D ve 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T)] içeren MS besi ortamlarına ekmişlerdir. Yapılan çalışmada 3 mg / l 2, 4, 5-T içeren MS besi ortamının kallus gelişimi için en iyi ortam olduğu kanısına varmışlardır. Bu çalışmada sekonder metabolit üretiminin ve öncü bileşiklerin bitki doku kültürleri tarafından biyotransformasyonu, hem değerli maddelerin ticari sentezine hem de biyosentetik yollarının aydınlatılmasına yol açabileceği değerlendirilmiştir. *Cannabis sativa* L.'nin kallus ve süspansiyon kültürleri, çeşitli oksinler ve sitokinin

kombinasyonlarının embriyo, yaprak ve gövde eksplantlarında kullanılmasıyla indüklenmiştir. Kallus indüksiyonu ve sonraki hücre proliferasyonu için bitki büyüme düzenleyicilerinin optimal oranı, eksplantın kaynağına ve kültür moduna göre farklılık göstermektedir. Kannabidiol ile aşıl原因an kenevir süspansiyonları, ince tabakalı kromatografi ile deneye tabi tutulan iki ana kannabinoid üretmiştir. Gaz kromatografisi / kütle spektral analizi, her iki fenoliği de kannabielsinin diastereoizomerleri olarak tanımlamıştır. Olivetol ile aşıl原因an süspansiyon kültürleri, (m / z) 210'luk bir moleküler iyonla sahip tanımlanamayan bir kannabinoid üretmiştir.

Hussein (2014) çalışmasında, kallus kültürlerinden *In vitro* organogenez (katı ortamda farklılaşmamış hücre büyümesi) ve hücre süspansiyonunda THC ve diğer önemli kannabinoidlerin üretimi, kenevirin tüylü kök ve trikom kültürlerinden elde edilmiştir. Tüm bitkinin organogenez yoluyla rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kallus kültürlerini kurmuşlardır. Kallus kültürlerinden meristemoid gelişimini teşvik etmek için optimum kombinasyon, 0,5/5 konsantrasyonunda 1-naftaleneasetik asit (NAA) / 6-benzilaminopurin (BA) / adenin hemisülfat tuzu (AS) ile takviye edilmiş modifiye B5 ortamı kullanarak elde etmişlerdir. Sürgünlerin (yapraklı ancak köksüz küçük bitkiler) indüksiyonu ve rejenerasyon için en uygun ortam, B5 + 0,5 mg / l gibberelik asit (GA3) ($8,5 \pm 1,73$ sürgün / kallus) ve B5 + 0,25 mg / l thidiazuron (TDZ) + (3 mg / l GA3 ($7,25 \pm 1,03$ sürgün / kallus) olmuştur. Sürgünlerin en iyi kök oluşumu, 1,5 mg / l indol-3-asetik asit (IAA) içeren ortamdan elde edilmiştir. Erlenmeyer şişelerinde büyüyen *In vitro* koşullarda adapte edilmiş bitkiler, yaklaşık 0,33, 0,45 ve 157,1 mg / g taze ağırlıkta THCA, CBGA ve CBDA oluşturmuştur. Ex vitro koşullarda adaptasyonu sağlanmış bitkiler (8 hafta boyunca hidroponik olarak büyütülmüş), 1,54, 28,30, 6,0, 0,125 ve 1121,4 mg / g taze ağırlık konsantrasyonlarıyla THCA, THC, CBGA, CBG ve CBDA sentezlemişlerdir. Sonuçlar, *C. sativa*'nın farmakolojik olarak önemli kannabinoidlerinin üretimini ortaya çıkarmıştır; bununla birlikte hücre ve tüylü kök kültürlerinin biyosentetik yetenekleri, ölçeklenecek makul seviyelerde kanabinoid sağlamamıştır.

Wang ve ark. (2009), bu çalışma, Kenevir'in (*Cannabis sativa* L.) sürgün uçlarından bitki elde edilmesi için verimli bir *In vitro* çoğaltma ve adaptasyon prosedürünün standardizasyonunu açıklamaktadır. Kenevir fideleri, günde 16 saat ışık

altında 10 g/ L, sukroz, 5,5 g/ L agar içeren yarı güçlü 1/2 × MS ortamında çimlendirilmiştir. 0,2 mg/l TDZ, 0,1 mg/l NAA içeren MS ortamı, sürgün ucu başına maksimum 3,22 adet sürgün elde edilmiştir. Çoğalan sürgünler 0,1 mg /l IBA ve 0.05 mg/ l NAA içeren MS ortamında başarılı bir şekilde köklendirilmiştir. Elde edilen fidelerin % 85'inde adaptasyon sağlanmıştır. Protokol olarak, *In vitro* klonal çoğaltma için (sürgün çoğalması için 14 gün ve kök indüksiyonu için 40 gün) ve dış koşullara adaptasyon için 35-42 günü kapsayan bir 54 günlük döngü protokolü geliştirilmiştir.

Hartsel ve ark. (1983), MS besisi ortamında büyütükleri *C. sativa* bitkisinin CBD'nin CBE'ye biyotransformasyonu ile ilgili araştırmalar yapmıştır. B5 besiyeri vitaminleri içeren agar ile katılaştırılan besiyerlerine farklı dozlarda oksin ve sitokininler ekleyerek kullanmışlardır. Çalışma sonucunda 2,4,5-T içeren B5 besiyeri en uygun besiyeri olarak nitelendirmişlerdir. *In vitro* sürgün rejenerasyonu, rekalsitrant *Cannabis sativa* L'nin ıslahı için etkili bir şekilde katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir. *C. sativa* kısa gün çeşitleri Ferimon, Felina32, Fedora17 ve USO31, Dioecious nötr gün çeşidi Finola ile birlikte, önceden yayınlanmış protokoller ve kendi kendine tasarlanmış bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları dahil on rejenerasyon ortamı test edilmiştir. Tohumların çimlenmesinden köklü bitkiciklerin gelişimine kadar olan gelişim morfolojisi takip edilmiştir. Ek olarak, eksplantların ve *In vitro* rejenerantların ploidi seviyesi analiz edilmiştir. Hipokotilin, yanıt veren eksplantları sayesinde % 49,45'i ile *C. sativa* bitkilerinin *In vitro* koşullarda doğrudan rejenerasyonu için en iyi eksplant olduğu sonucuna varılmıştır. Kotiledon ve gerçek yaprak eksplantları ise, sırasıyla % 4,70 ve eksplant başına 0,42 sürgün oluşum ile zayıf bir yanıt vermiştir. Sürgün rejenerasyonu açısından değerlendirilen kültür ortamı ve incelenen çeşitler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Genel olarak, en iyi rejenerasyon ortamı ZEARIB 2,0 (mg / L) ve ZEARIB 1,0 (mg / L) + NAA 0,02 (mg / L) olup, yanıt veren hipokotillerin % 66,67'si olmuştur. Şaşırtıcı bir şekilde, bitki büyüme düzenleyicileri olmadan ortamda kültürlen hipokotiller, mükemmel bir rejenerasyon sağladığını (rejenerasyon gösteren hipokotillerin % 61,54'ü) ve rejenerantların kendiliğinden köklendiğini (% 17,94) göstermişlerdir. *In vitro* koşullarda elde edilen bitkiler, kültür başlatıldıktan sadece 6 hafta sonra ortama alıştırılmıştır. Gelişim morfolojisi çalışması, rejenere sürgünlerin ksilem kutuplarına bitişik pericycle hücrelerinden kaynaklandığını göstermektedir. İncelenen tüm çeşitlerin hipokotil ve

kotiledonlarında polisomati saptanmış, diploid (>% 80) ve mixoploid (diploid ve tetraploid hücreli) bitkiler rejenere edilmiştir. Bu protokol ile farklı *C. sativa* çeşitlerinde yüksek sürgün organogenez etkinliği sağlanmıştır. Bitkilerin önemli bir yüzdesinin mixoploid olması, *C. sativa*'da poliploid geliştirmek için alternatif bir yol sağlayabilmektedir. Sonuçlar, doğrudan *In vitro* rejenerasyonun, tıbbi uygulamalar için geliştirilmiş *C. sativa* materyallerinin geliştirilmesine önemli bir katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Kodym ve Leeb, (2019). Endüstriyel kenevirin (*C. sativa* L.) biyoteknolojik kullanımı (genetik transforasyon, gen düzenleme), güçlü rejenerasyon / *In vitro* çoğaltma protokollerinin olmaması nedeniyle engellenmektedir. Bu bariyeri kırmak için, ekzojen büyüme düzenleyicilerinin (oksinler, sitokininler) standart uygulamasını, en son analitik tekniklere dayanan birincil eksplantlarda endojen sitokinin konsantrasyonları ve yeni sentetiklerin eksojen uygulaması bilgisiyle birleştiren bir yaklaşım önerilmektedir. Sitokininler veya aktivite / fonksiyon düzenleyicilerinin etkileri sürgün rejenerasyonu / çoklu sürgün oluşumunu indüklemek için aseptik olarak çimlendirilmiş fidelerden izole edilmiş sekiz eksplant türünde test edilmiştir. Ortaya çıkan ana problemler kallus oluşumu ve güçlü apikal dormansi olmuştur. İkinci fenomen, oksin antagonisti α - (2-okso-2-feniletıl) indol-3-asetik asit (PEO-IAA) kullanılarak bastırılmıştır ve 6-benzilamino-9- (tetrahidroksipirani) purin (BAP9THP) içeren ortam kullanılarak izole edilmiş apikal meristemlerden çok sayıda sürgün kültürü elde edilmiştir. Endojen sitokinin konsantrasyonları, endojen ve eksojen olarak uygulanan sitokininler ve bunların sentetik türevleri arasındaki etkileşimleri ölçülmüştür. Bu ölçümler daha sonra, istenen *In vitro* tepkileri ve kallus oluşumunun inhibisyonu, tek filiz oluşumu ve çoklu sürgünlerin indüksiyonu dahil olmak üzere rejenerasyonu elde etmek için uygulanan konsantrasyonları ve spesifik sitokinin türevlerinin uygulama zamanlamasını optimize etmek için kullanılmıştır. İyi gelişmiş sürgünler, oksin (a-naftaleneasetik asit) içeren ortamda köklendirilmiştir. Protokol, USO-31 çeşidi kullanılarak geliştirilmiştir. Geliştirilen protokol Tygra, Monoica, Bialobrzskie, Fibrol endüstriyel kenevir çeşitlerinde başarıyla uygulanmıştır.

Deepa ve ark. (2018), *Cannabis sativa* L. bitkisinin vejetatif çoğaltım için alternatif bir *In vitro* çoğaltım sistemi geliştirmiştir. Mikroçoğaltım için TDZ ve substrat

olarak taşıyıcı blokları kullanılmış ve fotoototrofik mikroçoğaltma (PAM) yöntemini ortaya koymuşlardır. Stok bitkiler, cam kavanozlarda sterilizasyondan sonra ekilmiştir. Bu yöntemle sonra sürekli bir sürgün ucu ve boğumlar içeren kesimlerin sürekliliği sağlanmıştır. Pasif havalandırılmalı cam kaplarda 3 hafta içinde *In vitro* sürgün ucu kesimlerinde % 97,5 köklenme elde edilmiş ve başarılı şekilde dış koşullarına adapte edilmiştir. Thidiazuron (TDZ; N-fenil-1, 2, 3-thidiazole-5ylurea), çeşitli bitkilerde sürgün proliferasyonu ve rejenerasyonu dâhil *In vitro* kültür çalışmaları için rutin olarak kullanılan sitokinin benzeri bir bileşiktir. Son zamanlarda, tıbbi ve bahçe bitkileri dâhil olmak üzere bitkilerin *In vitro* çoğaltılmasında TDZ'nin kullanımı artmıştır. TDZ'nin mikro çoğaltmada, çoklu sürgün indüksiyonunda önemi tespit edilmiştir.

Wróbel ve ark . (2018), bu derlemede, bazı tıbbi bitkilerin mikroçoğaltılması için TDZ'nin kullanımındaki son eğilimleri anlatmıştır. Bu bölümde anlatılan şifalı bitkiler arasında Picrorhiza kurroa, Aronia melanocarpa, Scutellaria ocmulgee, Salvia miltiorrhiza, Aphyllorchis montana, Gentiana decumbens, Aconitum balfourii, Pelargonium sidoides, Withania somnifera, Curtha entculigo latifoliaa, Hedychium coronata, Curthensculigo latifolia, Hedychium arronat bulunmaktadır. Jatropha curcas, Medicago sativa, Crocus sativus, Zingiber officinale, C. sativa, Arnebia euchroma ve Azadirachta indica hakkında bilgiler verilmiştir.

Chandra ve ark. (2010), genç yaprak dokusundan kenevir (*Cannabis sativa* L.) bitkiciklerini hızla üretmek için verimli bir *In vitro* çoğaltma protokolü geliştirilmiştir. Gaz kromatografisi-alev iyonizasyon tespiti (GC-FID) kullanılarak, ilaç tipi bir kenevir çeşidinin (MX) yüksek THC veren seçkin dişi klonu taranmıştır. Bitkisel olarak çoğaltılmış klonları mikroçoğaltma için kullanılmıştır. İlaç tipi kenevir bitkisi, farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 μ M) indol-3-asetik asit (IAA), indol-3-bütirik asit (IBA), naftalen asetik asit (NAA) 2,4-diklorofenoksi-asetik asit (2,4-D) ile 1,0 μ M thidiazuron (TDZ) içeren Murashige ve Skoog ortamında yaprak eksplantından kallus üretimi için kullanılmıştır. Optimum kallus büyümesi ve bakımı, 0,5 μ M NAA ve 1,0 μ M TDZ içeren ortamda sağlanmıştır. İki aylık kalluslar, farklı sitokinin konsantrasyonları (BAP, KIN, TDZ) içeren MS ortamına alt kültüre alınmıştır. Sürgün indüksiyonu ve proliferasyon oranı en yüksek 0,5 uM TDZ'de olmuştur. Test edilen çeşitli oksinlerden (IAA, IBA ve NAA), rejenere sürgünler en iyi şekilde 2,5 uM IBA

ile takviye edilmiş $\frac{1}{2} \times MS$ ortamı kullanılarak elde edilmiştir. Köklü bitkiler başarılı bir şekilde toprakta adapte edilmiştir ve iç mekân yetiştirme odasında % 95'lik bir hayatta kalma oranında morfoloji ve kannabinoid içeriğinde büyük bir değişiklik olmaksızın olgunluğa kadar büyütülmüştür.

Chaohua ve ark. (2016), Kenevir bitkisi; lif, gıda ve ilaç veren, ekonomik açıdan önemli en eski bitkilerden biridir. 9-tetrahidrokanabinol (THC) ve Cannabidiol (CBD)'in doğal kaynağıdır. Bu iki molekül, farmasötik alanda muazzam bir terapötik potansiyele ve ticari değere sahiptir. Kenevir, oldukça heterozigot bir türdür. Diosous (erkek ve dişi çiçekler iki farklı bitkide görülür) ve rüzgârla tozlanan türler olduğundan, tohumdan yetiştirilirse biyokütle ürününün kimyasal profilini korumak zordur. Bitkiler tek bir dişi bitkiden elde edilen tohumlardan yetiştirilse bile bitkilerden bitkiye çeşitlilik gözlemlenmektedir. Bu nedenle, son üründe tutarlılığı korumak için seçkin dişi bitkiler, vejetatif çoğaltma ve / veya doku kültürü kullanılarak taranır ve çoğaltılır. Mikroçoğaltma, seçkin kenevir klonlarının korunmasında ve yeni germplazmın hızlı çoğalmasında hayati bir rol oynayabilir. Öte yandan, gelişmiş kannabinoid üretimi için genetik modifikasyonda da kullanılabilir. Esrarın *In vitro* çoğaltılması üzerine yapılan araştırmalar; kallus üretimi, hücre süspansiyon kültürleri, agrobacterium aracılı tüylü kök kültürleri ve bitkilerin rejenerasyonu için protokollerin geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır.

Kenevir (*Cannabis sativa* L.), dünya çapında yaygınlaşan tek yıllık çok amaçlı bir üründür. Kenevir genetik transformasyonu, mikro çoğaltma ve germplazm koruması için verimli bir rejenerasyon protokolüne ihtiyaç vardır. Bu çalışmada kenevir kotiledonlarını eksplant olarak kullanan, *In vitro* sürgün rejenerasyonu için hızlı bir protokol geliştirilmiştir. MS ortamındaki TDZ'nin kotiledonlardan *In vitro* sürgünlerin indüklenmesinde BA ve TDZ'den daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. En iyi sonuç, % 51,7 indüksiyon frekansı ve sürgün eksplantisi başına 3,0 sürgün, 0,4 mg/l TDZ ve 0,2 mg/l NAA (T4N2 ortamı) içeren MS ortamında kaydedilmiştir. *In vitro* sürgünler, kültürün başlamasından 3-4 hafta sonra 1,5-2 cm yüksekliğe ulaştı. O sırada, sürgünlerin yaklaşık % 80'i, alısmadan önce 4-5 hafta süreyle 0,5-2 mg/l IBA ile kombine edilmiş yarı-mukavemetli MS ortamında köklenmişlerdir. Daha genç kotiledonların dikimden 2-3 gün sonra (DAP), daha büyük olanlara (5-6 DAP) göre

eksplant olarak daha faydalı olduğu gözlenmiştir, çünkü önemli ölçüde daha yüksek bir rejenerasyon sıklığına sahip olmuşlardır. T4N2 besiyerinde sekiz çeşitten 3 DAP kotiledon kültürlenmiştir. Verimliliği test etmek için yapılan gözlemlerde rejenerasyon sıklığı % 35,7 ile % 54,8 arasında değişmiştir, Ayrıca, rejenerasyon protokolünün kısmen genotipe bağlı olmasına rağmen etkili olduğunu göstermiştir (Lata ve ark., 2016a)

Lata ve ark. (2016b), *C. sativa*'nın diocious ve allogamous doğası gereği, tohumdan büyütölmek kimyasal profilde tutarlılığı ve genel etkinliği korumak için en önemli kısıtlamadır. Bu nedenle, seçilen elit germplazmın doğrudan organogenez yoluyla mevcut optimize edilmiş *In vitro* çoğaltım protokolü ve genetik ve kimyasal profilinde kullanılan kalite güvence protokolleri, mikroçoğaltılmış *C. sativa* germplazmasının etkinliğini sağlamak için ideal bir yol sağlamaktadır. *C. sativa*'nın yüksek frekanslı bir sürgün organogenezi, 0,5 µM tidiazuron ortamında nod segmentlerinden elde edilmiştir. 500 mg / l aktif kömür ve 2,5 µM indol-3-bütirik asit ile desteklenen ½ × MS ortamında % 95 *In vitro* rejenerasyon elde edilmiştir. Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) ve Gas Chromatography-Flame Ionization Detection (GC-FID), kültürde 30 geçişe kadar mikroçoğaltılmış bitkilerde genetik stabiliteyi izlemek için başarıyla kullanılmıştır.

Lata ve ark. (2011), Bu çalışma, hoş kokulu (aromatik) bir doğal sitokinin olan meta-topolin (mT) kullanılarak *Cannabis sativa* L. nodal eksplantlarının *In vitro* köklenmesi ve hızlı sürgün proliferasyonu için basit, verimli ve tek adımlı bir rejenerasyon sistemini açıklamaktadır. Maksimum sürgün uzunluğuna sahip maksimum sayıda sürgün üreten eksplantlar açısından en iyi yanıt olarak kaydedilmiştir. İki alt kültür için aynı ortam üzerinde çoğaltılan sürgünler, 4-6 hafta içinde sağlıklı kökler oluşturabilmiştir. Kök indüksiyonu için oksin içeren ayrı bir ortam gerekli değildir. Elde edilen bitkicikler, iklim kontrollü yetiştirme odasında % 100 hayatta kalma oranıyla başarılı bir şekilde iklime alıştırılmıştır ve adaptasyon sağlanmıştır. *In vitro* çoğaltılmış bitkilerin genetik uygunluğu, ISSR kullanılarak test edilmiştir. Sonuç olarak, *In vitro* çoğaltılmış bitkilerden elde edilen tüm ISSR bulguları *In vitro* çoğaltılmış bitkilerin monomorfik olduğunu göstermektedir. Niteliksel ve kantitatif olarak, ana bitki ve *In vitro* çoğaltılmış bitkilerde gaz kromatografisi-alev iyonizasyon dedektörü (GC-FID)

kullanılarak kanabinoid profilleri ve içeriği birbirine benzer bulunmuştur. Dahası, rejenere bitkiler eko-fizyolojik ve fonksiyonel olarak ana bitkilerine benzerlik göstermişlerdir.

Lata ve ark. (2010a), yaptıkları çalışmada genç yaprak dokularını kullanmışlardır. 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 mg/l TDZ,) içeren ortamlara aldıkları genç yaprak dokularında 1 mg/l TDZ içeren ortamın kallus üretimi için optimum olduğunu tespit etmişlerdir. *Cannabis sativa*'nın mikroçoğaltılmış bitkilerinin genetik stabilitesini ve 8 ay boyunca toprakta adaptasyonunu değerlendirmek için Inter-simple sekans tekrarı (ISSR) markörleri, kullanmışlardır. Toplam 15 ISSR primeri, 115 farklı üretilebilir bantla sonuçlanmış. Mikro çoğaltılmış bitkilerden alınan tüm ISSR profilleri, monomorfik ve ana bitkilerle karşılaştırılabilir bulunmuştur. Bu bulgu da klonlar ve ana bitkiler arasındaki genetik stabiliteyi doğrulamıştır. Kanabinoidlerin gaz kromatografisi / alev iyonizasyon tespiti (GC / FID) kullanılarak kimyasal analizi, ana bitki ve mikro çoğaltılmış bitkiler arasında ana ikincil metabolitlerdeki kalitatif ve kantitatif farklılıkların olup olmadığını daha da doğrulamak için yapılmıştır. Altı ana kannabinoid Tetrahidrokannabinol (9-THC), Tetrahidrokannabinol (THCV), Kannabidiol (CBD), Cannabichrome (CBC), Kannabigerol (CBG) ve Kannabinol (CBN) tanımlanmıştır ve ana bitki ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçları açıkça benzer bir kannabinoid profili ve iki bitki türü arasında THC içeriğinde önemsiz farklılıklar göstermiştir. Bu sonuçlar, hızlı *In vitro* çoğaltma için geliştirilen mikro çoğaltma protokolünün uygun ve *C. sativa*'nın klonal çoğaltım için geçerli olduğunu göstermektedir.

Lata ve ark. (2010b), Germplazmanın korunması ve çoğaltılması için sentetik (kapsüllenmiş) tohumların artan kullanımı, bitkicik dönüşümlerini takiben korunan propagüllerin genetik stabilitesinin değerlendirilmiştir. *C. sativa L.*'nin sentetik tohumlarının *In vitro* çoğaltma ve 6 ay boyunca farklı büyüme koşullarında saklama sırasında genetik stabilitesini, basit dizi tekrarı (ISSR) DNA parmak izi kullanarak değerlendirilmiştir. Her partiden rastgele seçilen bitkilerin moleküler analizi, 14 ISSR markörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Test edilen 14 primerden dokuzu 40 farklı ve tekrarlanabilir bant üretmiştir. *In vitro* depolanan bitkilerden alınan tüm ISSR profilleri monomorfik olarak ve klonlar arasındaki genetik stabiliteyi doğrulayan ana bitki ile karşılaştırılmıştır. Altı adet ana kannabinoidin [Δ 9-tetrahidrokannabinol,

tetrahidrokanabivarin, kannabidiol, kannabikromen, kannabigerol ve kannabinol] varlığı GC analizi ile teyid edilmiştir ve 6 aylık depolamadan sonra yeniden yetiştirilen klonlarda ve ana bitkide homojenlik izlenmiştir ve kannabinoid içeriğinden türetilen sentetik klonlar, bitkilerin stabilitesini doğrulamıştır.



3.MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Çalışmada kullanılan Uşak ve Samsun Vezirköprü popülasyonlarına ait tohumlar ‘Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü’nden temin edilmiştir.

3.1.2 Eksplant materyali

Steril edilen kenevir tohumlarının Petri kaplarında çimlendirilmesi ile elde edilen 10 – 12 günlük kenevir bitkiciklerinin yaprak, hipokotil, petiol, koltuk altı meristemleri (Bknz. Resim 3.1) rejenerasyon çalışmalarında kullanılmıştır.



Resim 3.1 Kenevir bitkiciği eksplant bölgeleri/eksplantları

3.2 Metot

3.2.1 Besin ortamlarının hazırlanması

Denemelerde MS mineral, tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog, Bknz. Çizelge 3.1) ile 0 -30 g/l sukroz içeren ve 4,5 - 7 g/l'lık agar (Micropropagation Type 1, Caisson, ABD) ile katılaştırılan 0, $\frac{1}{2} \times$ veya $1 \times$ MS besin ortamı (Murashige ve Skoog 1962) ile 0 ve $\frac{1}{2} \times$ Gamborg B5 ortamı kullanılmıştır. Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmış olup, besin ortamına farklı konstrasyonlarda bitki büyüme düzenleyiciler ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak $5,7 \pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır. Ardından, ortamlar 4,5 kPa basınç altında ve 121°C 'de 20 dk (dakika) tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresans ışığı altında 8 saat karanlık, 16 saat aydınlık fotoperiyodunda 24°C sıcaklıkta tutulmuştur.

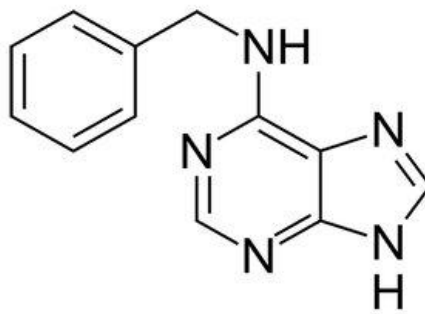
Çizelge 3.1 MS ortamında bulunan besin maddeleri ve konsantrasyonları (Murashige ve Skoog, 1962)

Besin Maddeleri/tuzları	Konsantrasyon (mg/l)
Nitrat Gubu	NH_4NO_3 1650
	KNO_3 1900
Halojen Gubu	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440
	KI 0.83
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025
Sülfat Gubu	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 370
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 370
	KH_2PO_4 170
Fosfat Gubu	H_3BO_3 6,20
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025
Demir Gubu	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,85
Vitaminler	Na_2EDTA 37,25
	Myo-Inositol 100,0
	Nikotinik Asid 0,50
	Pyrotinik Asid 0,50
	Thiamin-HCl 0,10
	Glysin 2,00

3.2.2 Büyüme düzenleyicilerinin hazırlanması

6-Benzilaminopürin (BAP) stok çözeltisinin hazırlanması:

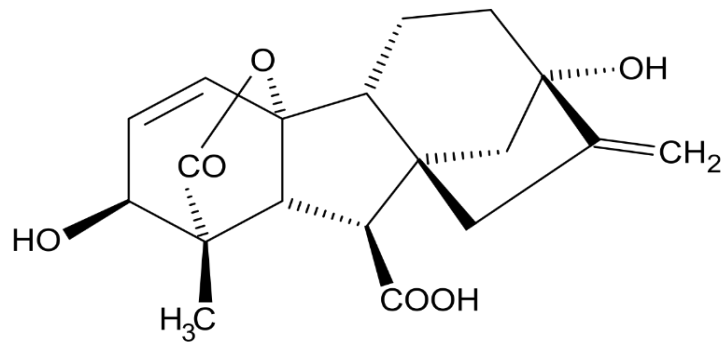
BAP stok çözeltisi hazırlanırken her 10 ml stok çözeltisinde 10 mg BAP kuru madde çözücüsü olan 1 N NaOH ile çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltisi, kullanılmak üzere + 4°C’de muhafaza edilmiştir (Bknz. Şekil 3.1, Çizelge 3.2).



Şekil 3.1 6-Benzilaminopürin (BAP) molekülü (Teixeira da Silva, Jaime A. *ResearchGate*. Ulaşım 2019-02-14)

Giberellik Asit (GA₃) stok çözeltisinin hazırlanması:

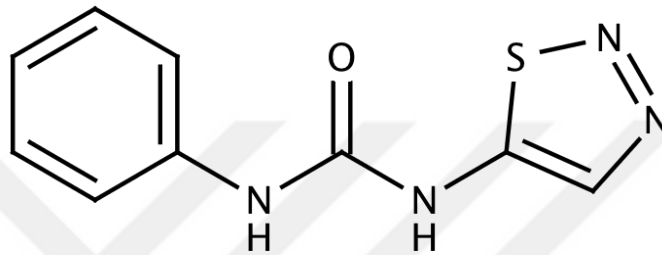
GA₃ stok çözeltisi hazırlanırken her 10 ml stok çözeltisinde 10 mg GA₃ kuru madde çözücüsü olan 1 N NaOH ile çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti kullanılmak üzere + 4°C’de muhafaza edilmiştir (Bknz. Şekil 3.2-Çizelge 3.2).



Şekil 3.2 Giberellik Asit (GA₃) molekülü (Wikipedia, 2020a)

Thidiazuron (TDZ) stok çözeltisinin hazırlanması:

TDZ stok çözeltisi hazırlanırken her 10 ml stok çözeltisinde 10 mg TDZ kuru madde çözücüsü olan dimethyl sulfoxide (DMSO) ile çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.3)(Çizelge 3.2).



Şekil 3.3 Thidiazuron (TDZ) molekülü (Wikipedia, 2020b)

Çizelge 3.2 Bitki büyüme düzenleyicilerin saklama koşulları

Büyüme Düzenleyiciler	Çözücü	Saklanma Koşulları (°C)
Benzilaminopürin (BAP)	1 N NaOH	+ 4
Giberellik Asit (GA₃)	1 N NaOH	
Thidiazuron (TDZ)	DMSO	

3.3 In Vitro Çalışmalar

3.3.1 Ekipmanların sterilizasyonu

Yapılan çalışmada kullanılan Petri kapları 200 °C 'de 2 saat etüvde bekletilerek steril hale getirilmiştir. Magenta kapları ise otoklavda 4,5 k Pa basınç altında ve 121 °C'de 20 dk tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Kullanılan pens ve bisturiler %70'lik (h/h) alkol ile temizlendikten sonra laminar hava akım kabini içerisinde steri250 sterilizatör cihazı ile 250 °C de steril edilmiştir (Resim 3.2).



(a)



(b)



(c)

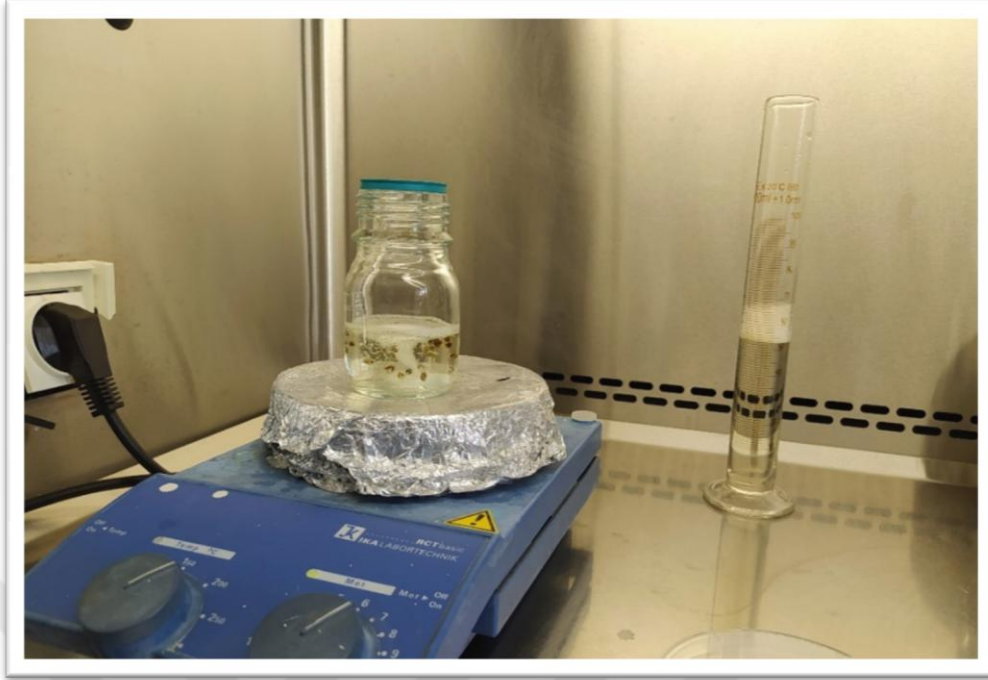
Resim 3.2 Sterilizasyonda kullanılan ekipmanlar; etüv (a), otoklav (b), sterilizatör (c)

3.3.2 Besi yerinin sterilizasyonu

Hazırlanan besi ortamları otoklavda basınçlı su buharı ile 4,5 k Pa basınç altında ve 121° C'de 20 dk boyunca steril edilmiştir

3.3.3 Tohumların yüzey sterilizasyonu

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için steril kabin içerisinde, steril şartlar altında manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığına sahip %50, %70, %90'lık ticari çamaşır suyu (%5 sodyum hipoklorid -NaClO-, içeren ACE – Fater, ABD) içerisinde 15 dk çalkalandıktan sonra, aynı sıcaklığa sahip steril saf su ile 3 × durulanmıştır (Bknz. Resim 3.3).

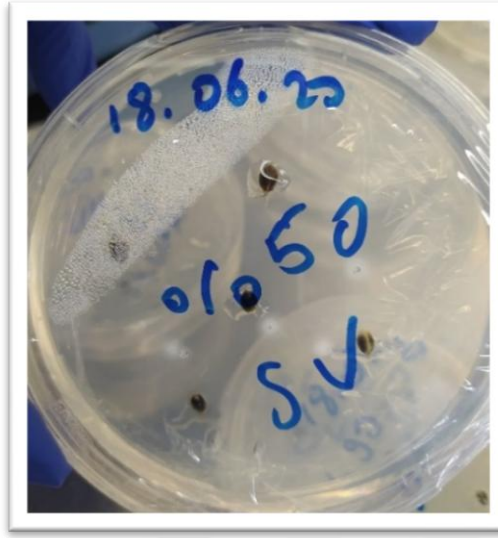


Resim 3.3 Bu çalışmada kullanılan Kenevir bitkisinin tohumlarının yüzey sterilizasyonu

Steril edilen tohumlar besi ortamlarına ekilmek suretiyle ortamlardaki kontaminasyon oluşumları izlenmiştir. Ayrıca kontrol gubu olarak herhangi bir sterilizasyon uygulaması yapılmamış olgun tohumlar kullanılmıştır.

3.3.4 Kenevir tohumlarının çimlenme ve fide oluşumu

Steril edilmiş kenevir tohumları her bir Petri kutusuna 5'er adet tohum olacak şekilde 3 tekerrürlü biçimde kültüre alınarak büyütme kabininde 10 gün bekletilerek fide oluşturmaları sağlanmıştır (Bknz. Resim 3.4).



Resim 3.4 Yüzey sterilizasyonu sonrası ekim çalışması

Yapılan sterilizasyon çalışmasından sonra belirlenen en uygun derişimdeki çamaşır suyu dozu çalışmanın geri kalanında kullanılmıştır. Çalışmalarda fiziksel ve kimyasal dormansiye kırmak ve en iyi çimlenme ortamını belirlemek için farklı kültür ortamları hazırlanmıştır.

- Yapılan çalışmada tohumdaki fizyolojik dormansiye kırmaya yönelik ve çimlenme oranını arttırmak için çeşitli konsantrasyonlarda giberellik asit (GA_3) içeren kültür ortamları hazırlanmıştır (0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 mg/l) . Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar ortamlara laminar akışlı kabin içersinde kültüre alınmıştır. Karanlık ortamda $25\pm 1^\circ C$ 'de 12 gün bekletilmiştir. Elde edilen bitkicikler $24^\circ C$ sıcaklıkta 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyoda bırakılarak gelişimleri gözlemlenmiştir.
- GA_3 dozunun en etkili dozu belirlendikten sonra farklı konsantrasyonlarda (0,5, 0,8, 1,0 mg/l) 6-Benzilaminopürin (BAP) uygulaması yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar kültüre alınmıştır. Karanlık şartlarda $25\pm 1^\circ C$ 'de 12 gün bekletilmiştir. Çimlenen tohumlar aynı sıcaklıkta 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyoda bırakılarak gelişimleri gözlemlenmiştir.
- Steril Saf su ; %50 Camasır Suyu 15 dk (dakika) ile steril edilen tohumlar steril saf suya aktarılmıştır. Karanlık ortamda %63,33 çimlenme sağlanmıştır. Yapılan

bu çalışmada kenevir tohumlarının çeper basıncı fiziksel dormansisine sahip olduğu tespit edilmiştir.

- Ortamın kendi ozmotik basıncını düşürmek için ortamdaki derişimi yükseltici kimyasallar ortadan kaldırılmıştır. Kültür ortamlarındaki katılaştırıcı litreye %0,7'lik agar (a/h - Micropropagation Type 1, Caisson, ABD), litreye 5 g/l agar olarak kullanılmıştır.
- Optimum şartları sağlamak için yapılan diğer çalışmada kültür ortamında 10 g/l sukroz, 2,2 g/l MS ve 5 g/l agar kullanılmıştır.

3.3.5 Mikropropagasyon çalışmaları

Çimlenen kenevir tohumlarından elde edilen bitkiciklerin yaprak eksplantları alınmış, 2,2 g/l MS, 10 g/l sukroz, 0,5 mg/l TDZ eklenen 5 g/l agar ile katılaştırılan steril kültür ortamlarına tekerrürlü olarak aktarılmıştır. Daha sonra 1,55 g/l Gamborg B5, 10 g/l sukroz 0,5 mg/l TDZ içeren farklı bir besi ortamı hazırlanmış ve steril yaprak eksplantları bu kültür ortamına aktarılmıştır.

Diğer bir çalışmada bitkiciklerden elde edilen yaprak dip kısmı, yaprak orta, yaprak uç kısmı, hipokotil, petiol, koltuk altı meristemlerinden eksplantlar alınmıştır. Eksplantlar 1,55g/l Gamborg B5, 10 g/l sukroz 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mg/l TDZ içeren ve 5 g/l agar ile katılaştırılan steril edilmiş besi ortamlarına laminar akışlı kabin içerisine 5'er eksplant 3'er tekerrürlü olarak aktarılmıştır.

3.4 Verilerin Değerlendirilmesi

Deneme desenleri 3 tekrarlamalı 100×10 mm'lik Petri kaplarından oluşmuştur. Varyans analizi için IBM SPSS 26 bilgisayar programı kullanılmıştır. Elde edilen 15'er adet ve 5'er tohumdan 3'er tekerürlü deneme verilerinin ortalaması One Way ANOVA ile karşılaştırılmıştır. İstatiksel olarak önemli derecede farklılığı gösteren muamele ortalamaları karşılaştırmak amacıyla Duncan testi yapılmıştır. Yüzde değerlere istatistik analizinden önce arcsin ($\sqrt{X}$) transformasyonu uygulanmıştır (Snedecor ve Cochran 1967).

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1 Kenevir Tohumlarında Sterilizasyon İşleminin Etkisi

Kenevir bitkisinin tohumları üzerinde farklı dozlarda değişen (Kontrol, %50, %70, %90) ticari çamaşır suyunun (NaOCl) etkilerinin belirlenmek amacıyla varyans analizi yapılmıştır (Bknz. Çizelge 4.1). Çizelgede gösterildiği gibi uygulanan ticari çamaşır suyu dozların kenevir popülasyonlarında etki yaparak önemli derecede ($p<0.01$) farklılık izlenmiştir. Elde edilen sonuçları Çizelge 4.1 verilmiştir. Çizelgede gösterildiği gibi uygulanan dozlar tohumlarda da çimlenme bakımından da önemli derecede ($p<0.01$) farklılık tespit edilmiştir. Çamaşır suyu dozları arasında $p<0.05$ düzeyinde etkileşim bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Kenevir tohumlarında farklı dozlarda yüzey sterilizasyonunda uygulanan NaOCl etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	K.O.	F
Popülasyonlar	1	1066,667	5,760*
Çamaşır suyu dozları	2	866,667	4,680*
Popülasyonlar × Çamaşır suyu dozları	2	155,556	0,840
Hata	48	185,185	
Genele Toplam	53		

** $p<0.01$ * $p<0.05$

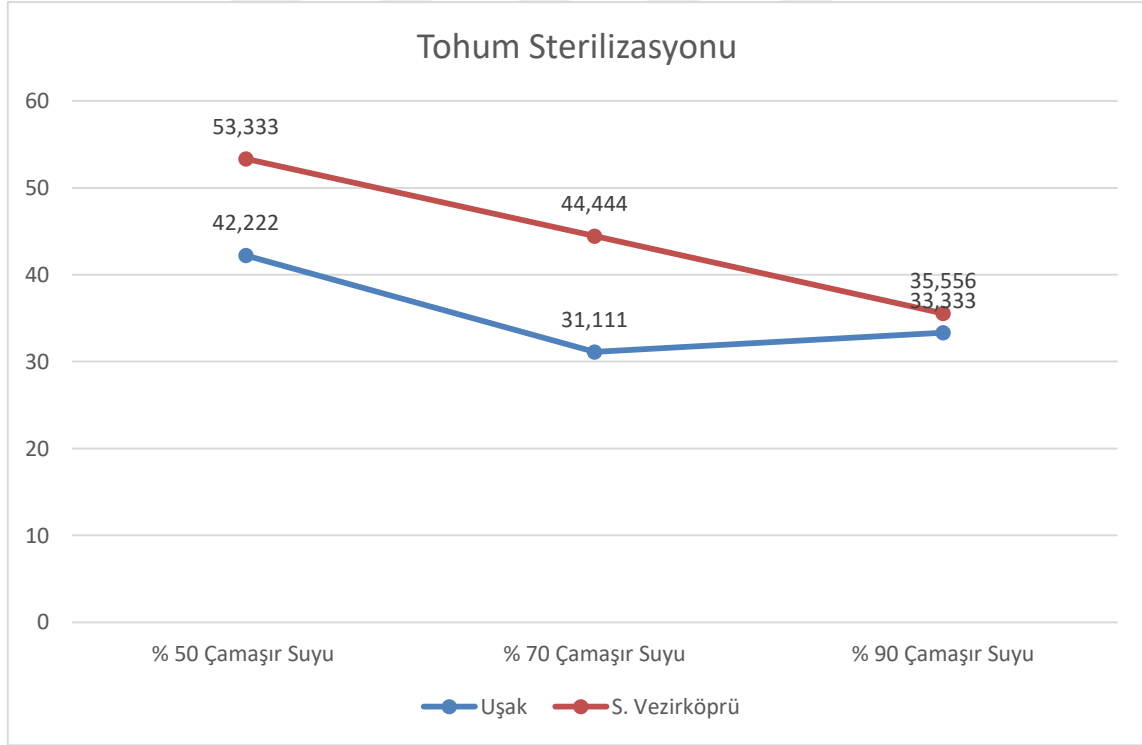
V.K: Varyans Kaynakları, S.D.: Sapma Seğeri, K.O: Kareler Ortalaması

Kenevir bitkisinin farklı popülasyonları üzerinde değişen çamaşır suyu dozlarının etkilerini belirlenmek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2 de verilmiştir. Çizelgede tespit edildiği gibi % 50 çamaşır suyu dozunda çimlenme %42,222-53,333 arasında değişmiştir. % 70 çamaşır suyu dozunda çimlenme %31,111-44,444 arasında değişmiştir. % 90 çamaşır suyu dozunda ise çimlenme %33,333-35,556 arasında değişmiştir. En fazla çimlenme oranı % 50 çamaşır suyu dozunda % 53,333 olarak tespit edilmiştir.

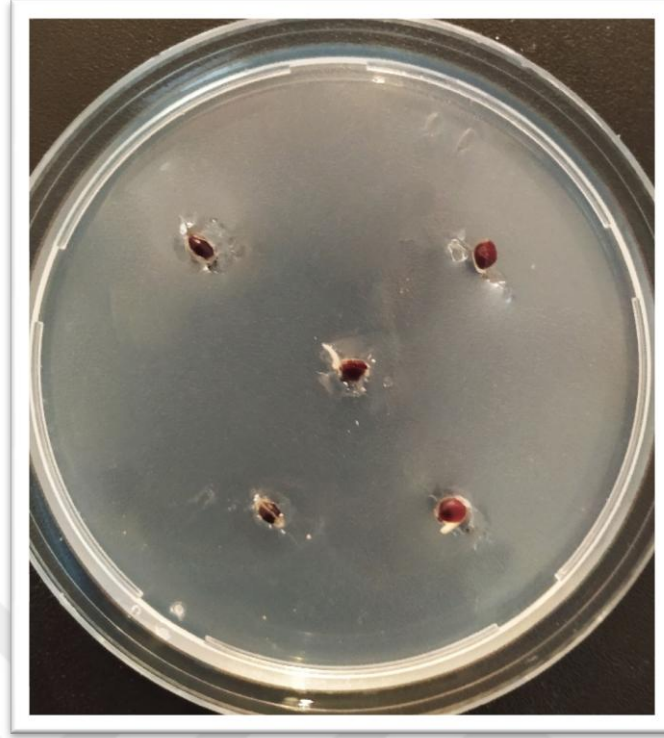
Çizelge 4.2 Kenevir tohumlarında farklı dozlarda yüzey sterilizasyonunda uygulanan NaOCl etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan Duncan analizi sonuçları

Çamaşır Suyu Dozları	Kenevir Popülasyonları		
	Uşak	S. Vezirköprü	Ortalama
50,00	42,222	53,333	47,778a
70,00	31,111	44,444	37,778b
90,00	33,333	35,556	34,444b
Ortalama	35,556	44,444	40.000

*Duncan anlizi sonuçlarına göre her satırda farklı harfler ile gösterilmiş ortalamalar arasında 0.05 düzeyinde farklılığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 Kenevir tohumlarında farklı dozlarda yüzey sterilizasyonunda uygulanan NaOCl etkisinin çimlenme üzerine etkisi sonuçları



Resim 4.1 Yüzey sterilizasyonu sonrası çimlenmekte olan kenevir bitkisi tohumları

4.2 Tohum Çimlendirme Optimizasyonu

4.2.1 GA₃ dozlarının çimlenme üzerine etkisi;

Kenevir bitkisinin tohumları üzerinde farklı GA₃ dozlarının (Kontrol, 0,20, 0,40, 0,50, 0,60, 0,80, 1, 1,20 mg/L) %50 ticari çamaşır suyu ile 15 dk yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlarda çimlenme üzerine etkisinin belirlenmesi için kurulan deneme sonuçları etkilerinin belirlenmek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelgede gösterildiği gibi uygulanan GA₃ dozları kenevir popülasyonlarında etki yaparak önemli derecede ($p<0.01$) farklılık gözlemlenmiştir. Uygulanan GA₃'ün farklı dozlarının, iki popülasyon tohumları arasında çimlenme bakımından önemli derecede farklılık yarattığı($p<0.01$) tespit edilmiştir. GA₃ dozları ve popülasyonlar arasında $p<0.05$ düzeyinde etkileşim bulunmuştur (Bknz. Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Kenevir bitkisinde farklı dozlarda GA₃ uygulanan etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan varyans analizi sonuçları

V.K	S.D	K.O	F
GA ₃	7	457,143	5,878**
Popülasyon	2	10400,000	133,714**
GA ₃ * Ç.S.	14	133,333	1,714*
Hata	48	77,778	
Genel Toplam	71		

**p<0.01 *p<0.05

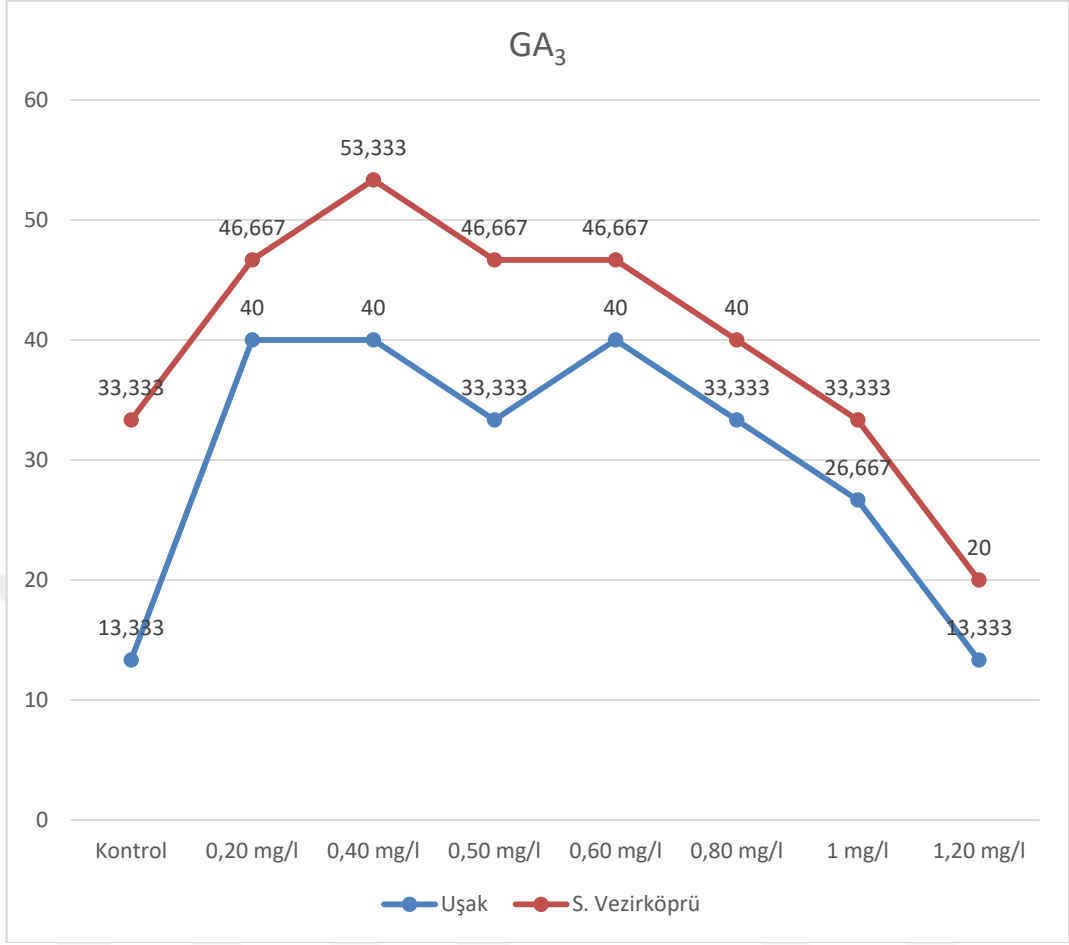
V.K: Varyans Kaynakları, S.D.: Sapma Seğeri, K.O: Kareler Ortalaması

Kenevir bitkisinin farklı popülasyonları üzerinde değişen GA₃ dozlarının etkilerini belirlenmek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir. Çizelgede tespit edildiği gibi Uşak popülasyonunda farklı GA₃ dozlarında çimlenme %13,333-40,000 arasında değişmiştir. Samsun Vezirköprü popülasyonundae farklı GA₃ dozlarında çimlenme %20,000-53,333 arasında değişmiştir. En fazla çimlenme oranı Samsun Vezirköprü çeşidinde 0,40 mg/l dozunda % 53,333 olarak tespit edilmiştir.

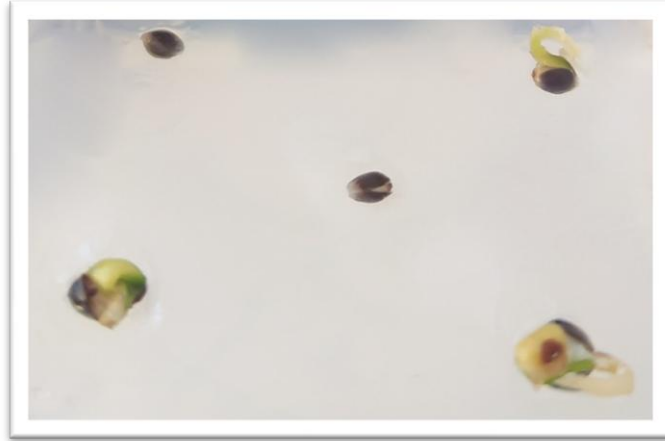
Çizelge 4.4 Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan GA₃ etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan t test analizi sonuçları

Popülasyonlar	GA ₃ dozları (mg/l)							
	Kontrol	0,20	0,40	0,50	0,60	0,80	1	1,20
Uşak	13,333	40,000	40,000	33,333	40,000	33,333	26,667	13,333
Samsun Vezirköprü	33,333	46,667	53,333	46,667	46,667	40,000	33,333	20,000
Ortalama	23,333	43,333	46,666	40,000	43,333	36,665	30,000	16,666

*Duncan analizi sonuçlarına göre her satırda ortalamalar arasında 0.05 düzeyinde farklılığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.2 Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan GA_3 etkisinin belirlenmesi



Resim 4.2 Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan GA_3 sonrasında çimlenmekte olan kenevir bitkisi tohumları

4.2.2 GA₃ ve farklı BAP dozlarının çimlenme üzerine etkisi;

Bir önceki çalışmada 0,40 mg/l GA₃ dozunda en yüksek sonuç alınmıştır. Yapılan bu çalışmada GA₃ dozu sabit tutularak farklı BAP dozları uygulanmıştır. Kenevir bitkisinin tohumları üzerinde farklı BAP dozlarının (Kontrol, 0,50, 0,80, 1,0 mg/L) %50 ticari çamaşır suyu ile 15 dakika yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlarda çimlenme üzerine etkisinin belirlenmesi için kurulan deneme sonuçları etkilerinin belirlenmek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. Çizelgede gösterildiği gibi kenevir popülasyonlarından elde edilen ortalama değerler arasında ($p<0.01$) farklılık ortaya konmuştur. Uygulanan BAP dozlarından elde edilen çimlenme ortalama değerleri bakımından da önemli derecede ($p<0.05$) farklılık ortaya koymuştur. Popülasyon ve BAP dozları arasında $p<0.05$ düzeyinde etkileşim tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5 Kenevir bitkisinde GA₃ ve farklı dozlarda BAP uygulamasının etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan varyans analizi sonuçları

V.K.	S.D.	K.O.	F
Popülasyon	1	1066,667	9,143**
BAP dozları	3	377,778	3,238*
Popülasyon * BAP dozları	3	44,444	0,381
Hata	16	116,667	
Genel toplam	23		

** $p<0.01$ * $p<0.05$

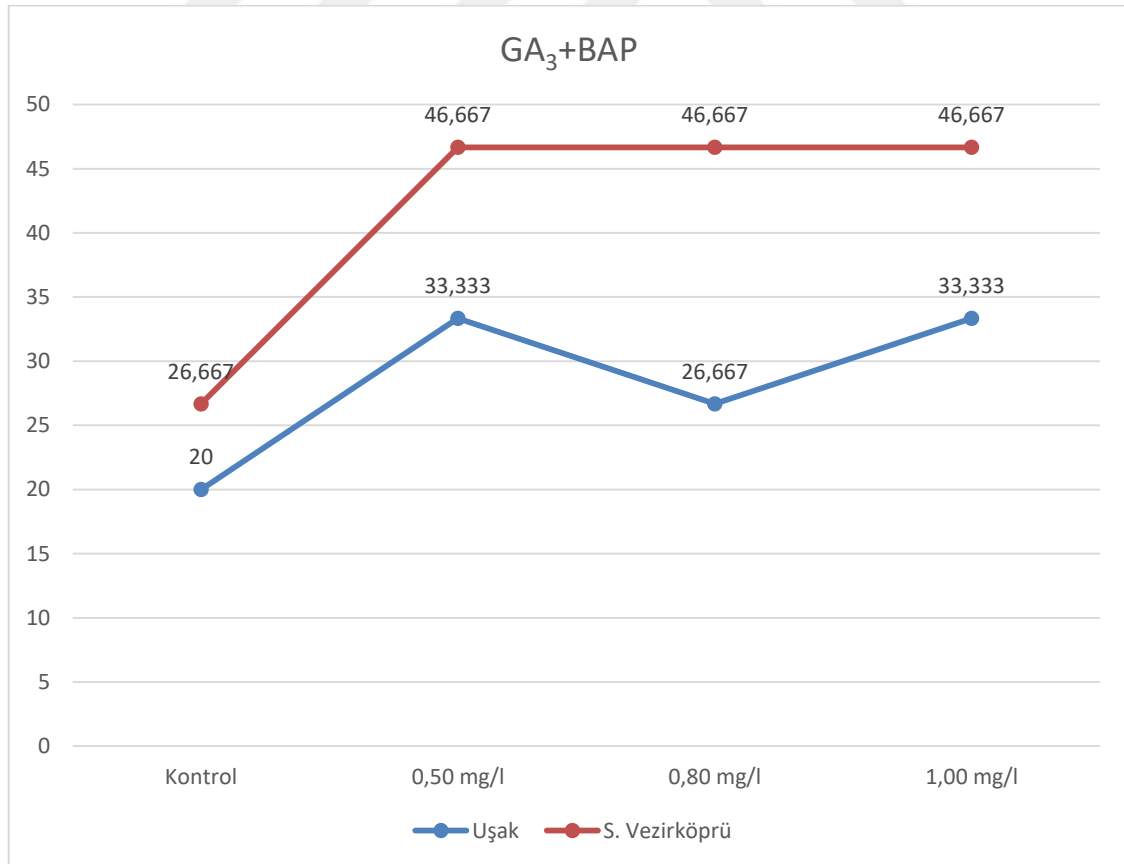
V.K: Varyans Kaynakları, S.D.: Sapma Seğeri, K.O: Kareler Ortalaması

Kenevir bitkisinin farklı popülasyonları üzerinde değişen BAP dozlarının etkilerini belirlenmek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelgede tespit edildiği gibi Uşak popülasyonunda farklı BAP dozunda çimlenme %20,000-33333 arasında değişmiştir. Samsun Vezirköprü popülasyonunda farklı BAP dozunda çimlenme %26,667-46,667 arasında değişmiştir. En fazla çimlenme oranı %46,667 ile Samsun Vezirköprü popülasyonunda tespit edilmiştir.

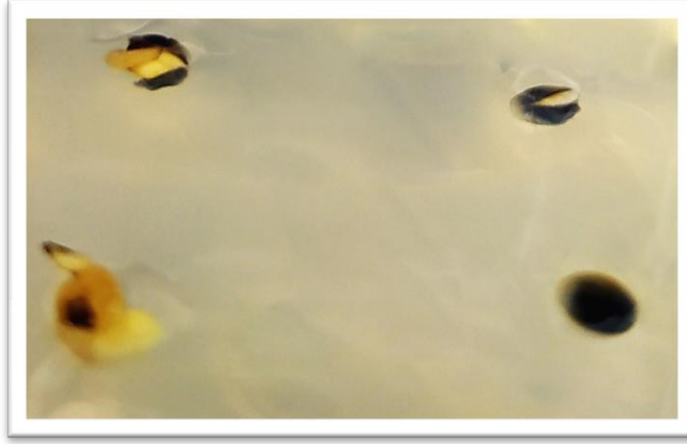
Çizelge 4.6 Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan BAP etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan Duncan analizi sonuçları

Bap dozları	UŞAK	SAMSUN VEZİRKÖPRÜ	Ortalma
Kontrol	20,00	26,67	23,33c*
0.50	33,33	46,67	40,00a
0.80	26,67	46,67	36,67b
1.00	33,33	46,67	40,00a
Ortalama	28,33A ¹	41,67B	35.00

*Duncan analizi sonuçlarına göre her satırda farklı harfler ile gösterilmiş ortalamalar arasında 0.05 düzeyinde farklılığı tespit edilmiştir.



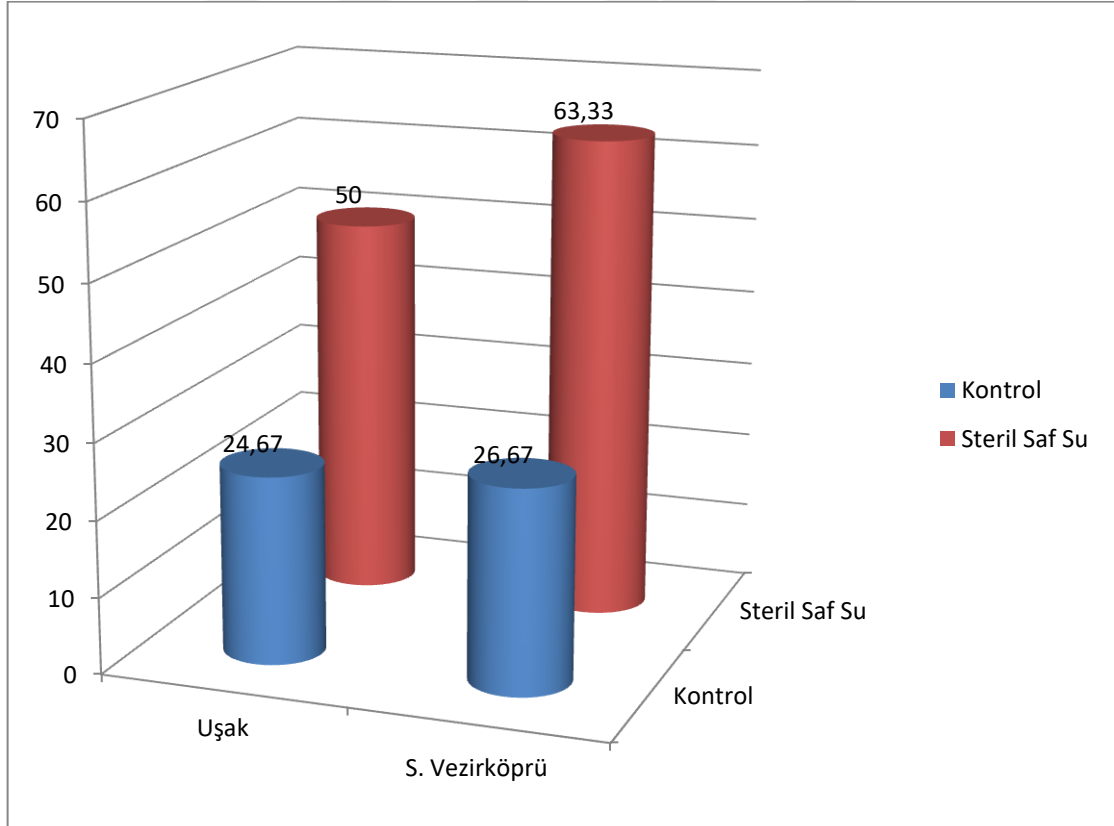
Şekil 4.3 Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan BAP etkisinin belirlenmesi



Resim 4.3 Kenevir bitkisinde farklı dozlarda uygulanan BAP uygulaması sonrasında çimlenmekte olan kenevir bitkisi tohumlarına örnek

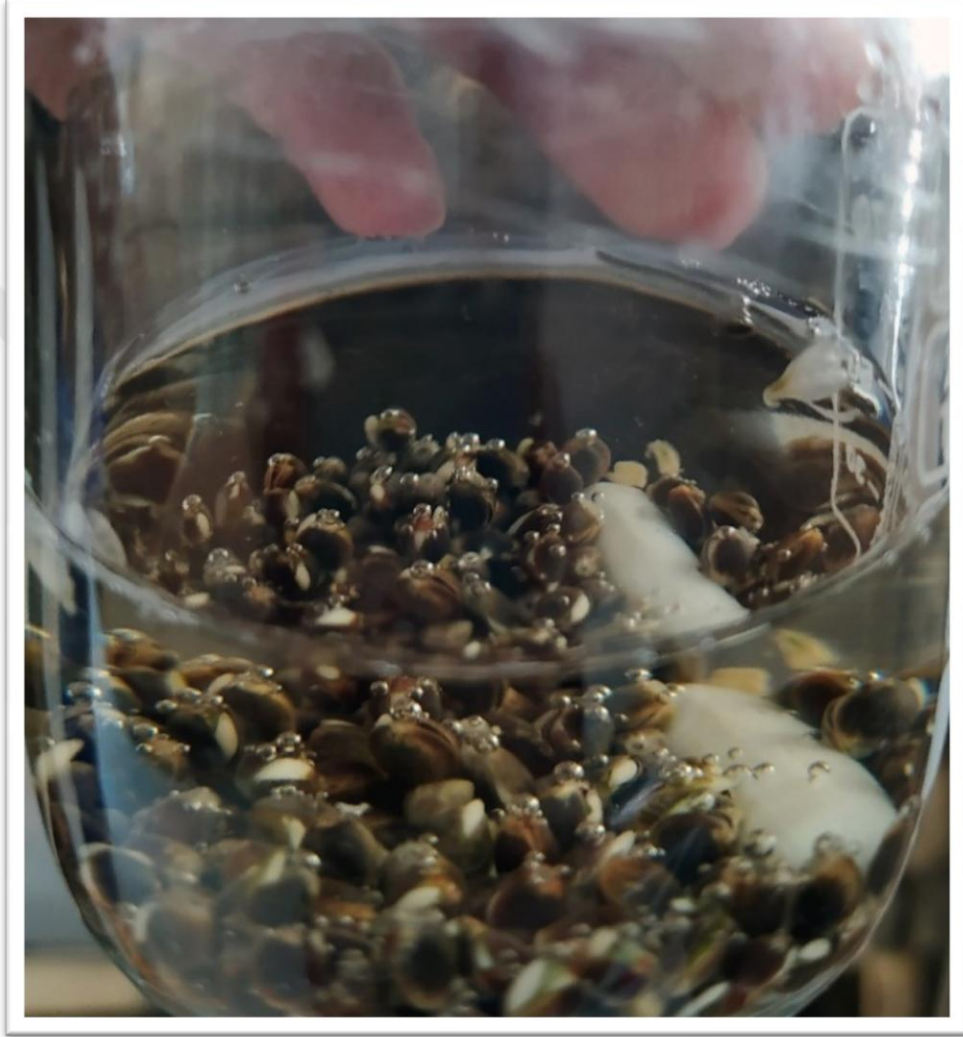
4.2.3 Steril saf suyun çimlenme üzerine etkisi;

Kenevir bitkisinin su ve “agar ile katılaştırılmış su” kullanılarak iki popülasyon üzerine çimlenme etkisini belirlenmek amacıyla kurulan deneme sonuçları Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4 Kenevir bitkisinde su ve “agar ile katılaştırılmış steril suyun” çimlenme üzerine etkilerinin belirlenmesi

Şekilde de görüldüğü gibi kenevir bitkisinde agar ile katılaştırılmış steril suyun üzerinde Uşak popülasyonunda %24,67, S.Vezirköprü popülasyonunda % 26,67 çimlenme bulunmuştur. Besi yeri içermeyen ve agar ile katılaştırılmayan steril suyun içinde Uşak popülasyonunda %50,00 S.Vezirköprü popülasyonunda % 63,33 çimlenme tespit edilmiştir.

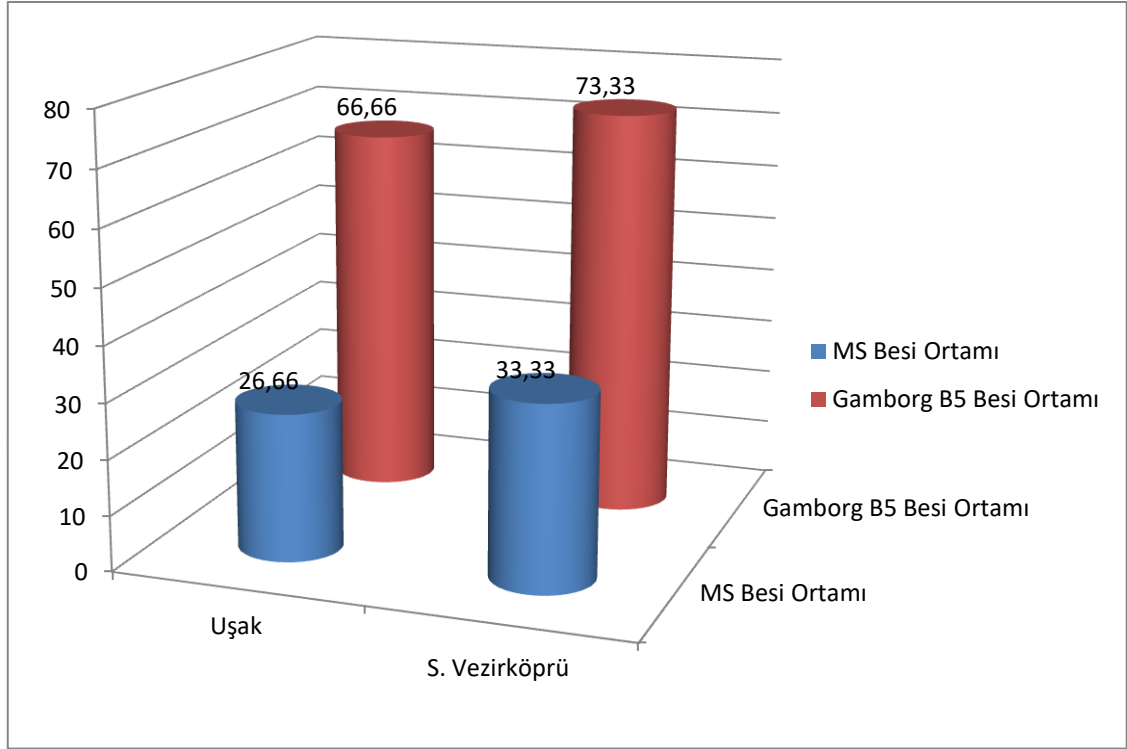


Resim 4.4 Steril saf su içerisinde çimlenen tohumlar

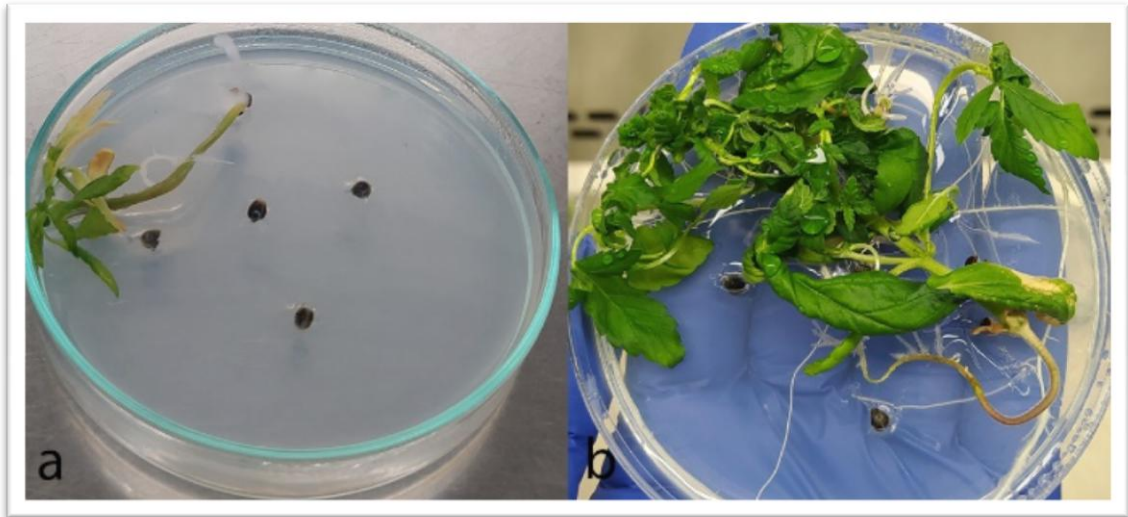
4.2.4 Farklı besi yerlerinin çimlenme üzerine etkisi;

MS ve Gamborg B5 besi yerlerinin çimlenme üzerinde etkisinin belirlenmesi için kurulan deneme sonuçları Grafik 4.2’de verilmiştir. Çimlenme MS besi ortamında Uşak popülasyonunda %26,67, ve S.Vezirköprü popülasyonunda % 33,33 bulunmuştur.

Ayrıca, Gamborg B5 besi ortamında ise çimlenme Uşak popülasyonunda %66,66 ve S.Vezirköprü popülasyonunda % 73,33 olarak izlenmiştir.



Şekil 4.5 Kenevir bitkisinde farklı besi yerlerinin çimlenme üzerine etkisinin belirlenmesi

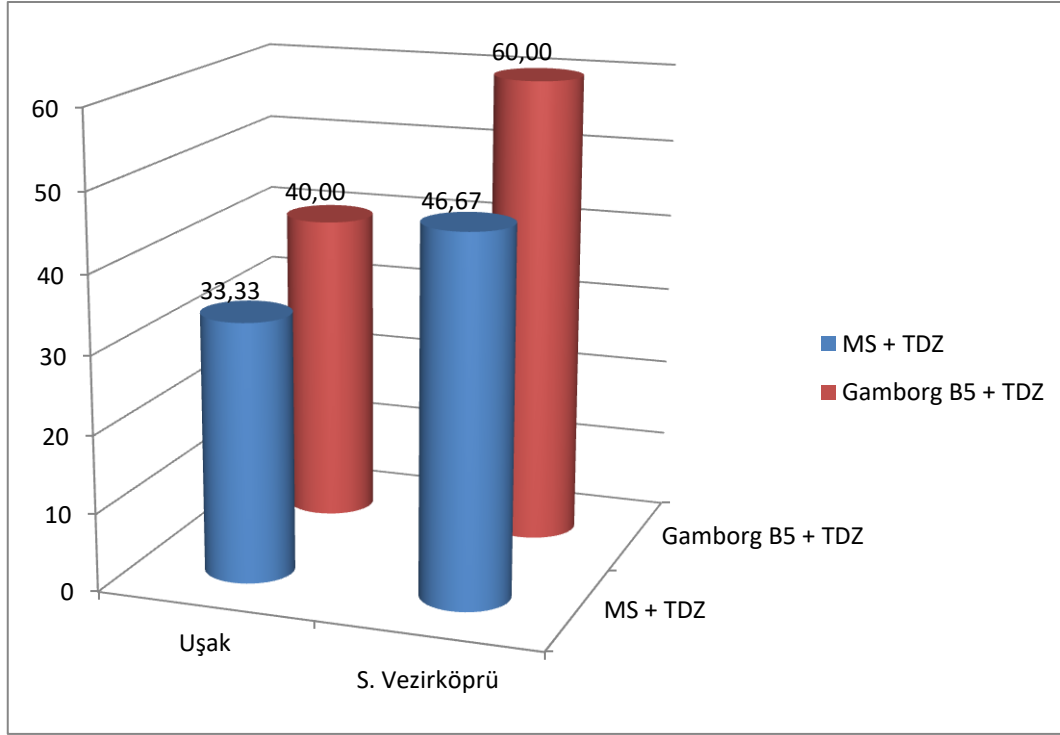


Resim 4.5 (a)MS besi ortamında ve (b)Gamborg B5 besi yerinde çimlenen tohumlar

4.3 Mikropropagasyon Çalışmaları

4.3.1 Farklı besi ortamlarında TDZ'nin mikropropagasyon çalışmalarına etkisi;

MS ve Gamborg B5 besi yerlerinde TDZ'nin yaprak eksplantlarında mikropropagasyon üzerine etkisinin belirlenmesi için kurulan deneme sonuçları çizelge 4.6'te verilmiştir.



Şekil 4.6 Kenevir bitkisinin farklı popülasyonları üzerinde farklı besi ortamlarında TDZ'nin mikropropagasyon çalışmalarına etkisinin belirlenmesi

Mikropropagasyon başarısı Uşak popülasyonunda MS besi yerinde %33,33, S.Vezirköprü popülasyonunda % 46,67 bulunmuştur. Gamborg B5 besi yerinde ise Uşak popülasyonunda %40,00, S.Vezirköprü popülasyonunda % 60,00 olarak tespit edilmiştir.



Resim 4.6 Kenevir bitkisinin farklı popülasyonları üzerinde TDZ'nin mikropropagasyona etkisinin gözlemlenmesi

4.3.2 Çeşitli TDZ dozlarının farklı bitki eksplantlarında mikropropagasyon çalışmalarına etkisi;

Kenevir bitkisinin farklı eksplantları üzerinde değişen TDZ dozların etkilerinin belirlenmek amacıyla varyans analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelgede gösterildiği gibi uygulanan TDZ dozlarının kenevir popülasyonlarında önemli derecede ($p<0.01$) farklılık gösterdikleri izlenmiştir. Eksplantlar ile rejenerasyon bakımından da önemli derecede ($p<0.01$) farklılık tespit edilmiştir. TDZ dozları ve eksplant tipleri arasında $p<0.05$ düzeyinde etkileşim bulunmuştur(Bknz. Çizelge 4.8). Çizelge 4.7 Kenevir bitkisinin farklı eksplantları üzerinde değişen TDZ dozların etkilerinin belirlenmek amacıyla yapılan varyans analizi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.7 TDZ'nin farklı bitki eksplantlarında mikropropagasyon çalışmalarına etkisinin varyans analizi sonuçları

V.K	S.D.	K.O.	F
TDZ dozları	4	1949,739	9,693**
Eksplant tipleri	5	4822,711	23,975**
TDZ × eksplant tipleri	20	245,906	1,222*
Hata	60	201,156	
Genel toplam	89		

** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

V.K: Varyans Kaynakları, S.D. Sapma Seğeri, K.O: Kareler Ortalaması

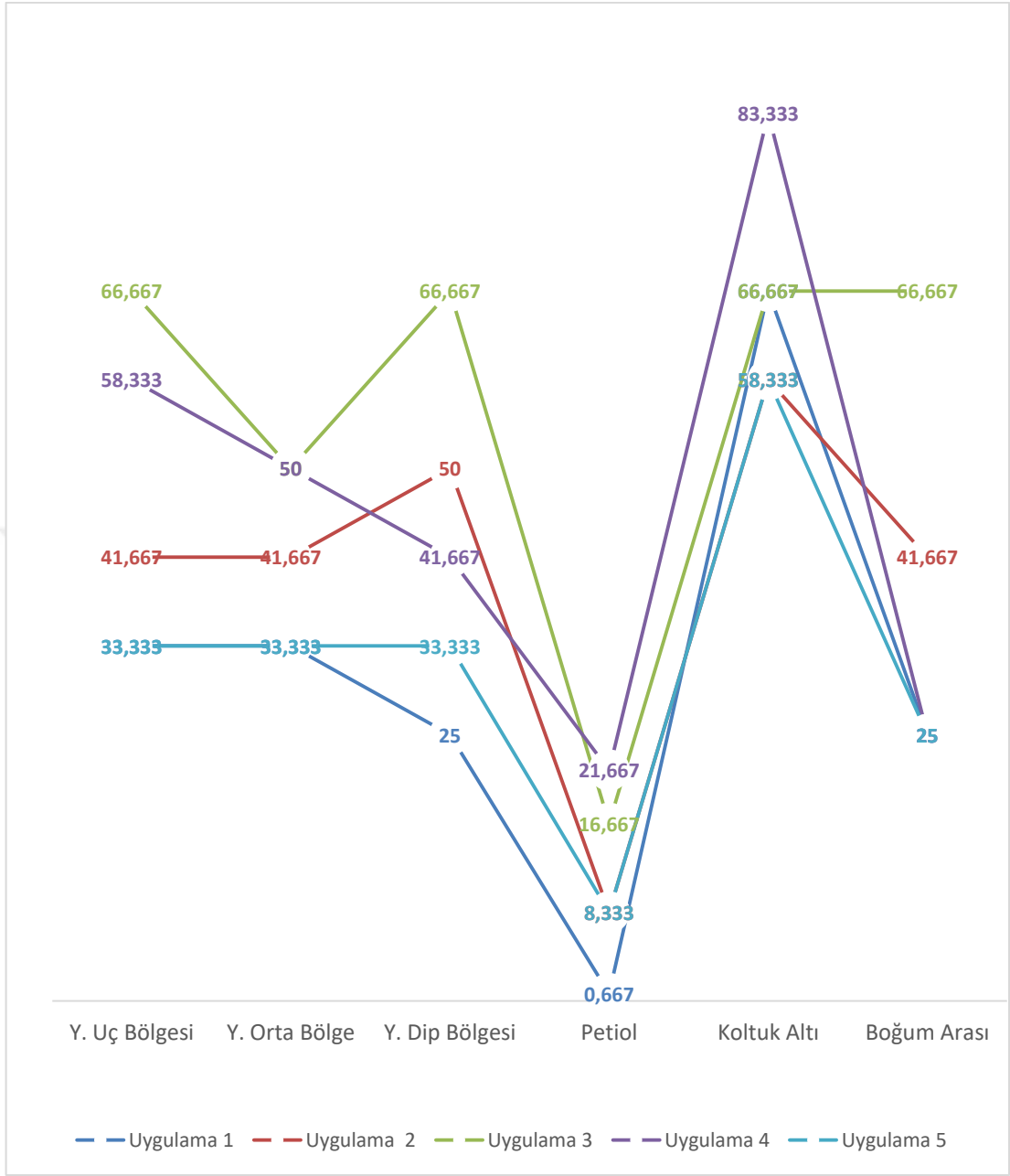
Kenevir bitkisinin farklı eksplantları üzerinde değişen TDZ dozların etkilerinin belirlenmek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.8' de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi yaprak uç bölgesi eksplanttında kallus oluşumu %33,333-66,667 arasında değişmiştir. En fazla kallus oluşum oranı 0,3 mg/l TDZ içeren Gamborg B5 ortamında bulunmuştur. Yaprak orta bölgesi eksplanttında kallus oluşumu %33,333-50,000 arasında değişmiştir. En fazla kallus oluşum oranı 0,4 mg/l TDZ içeren Gamborg B5 ortamında bulunmuştur.

Yaprak dip bölgesi eksplanttında kallus oluşumu %25,000-66,667 arasında farklılaşmıştır. En fazla kallus oluşum oranı 0,3 mg/l TDZ içeren Gamborg B5 ortamında görülmüştür. Petiol eksplanttında kallus oluşumu %0,667-21,667 arasında değişmiştir. En fazla kallus oluşum oranı 0,4 mg/l TDZ içeren Gamborg B5 ortamında bulunmuştur. Koltuk altı eksplanttında kallus oluşumu %58,333-83,333 arasında izlenmiştir. En fazla kallus oluşum oranı 0,4 mg/l TDZ içeren Gamborg B5 ortamında bulunmuştur. Boğum arası eksplanttında kallus oluşumu %25,000-66,667 arasında görülmüştür. En fazla kallus oluşum oranı 0,3 mg/l TDZ içeren Gamborg B5 ortamında bulunmuştur. Çalışmada en fazla kallus oluşum oranı koltuk altı eksplantında 0,4 mg/l TDZ içeren Gamborg B5 ortamından elde edilmiştir.

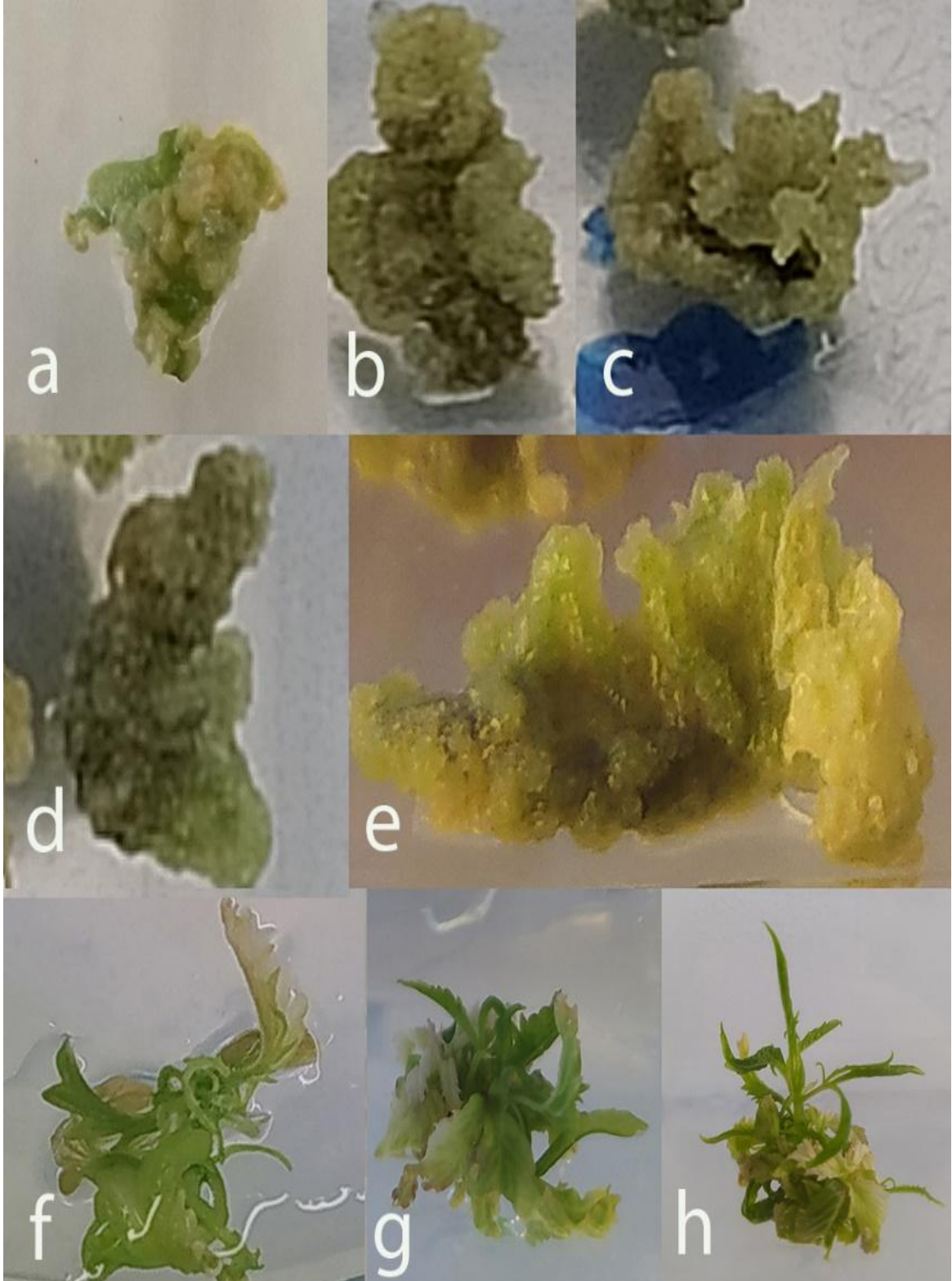
Çizelge 4.8 Kenevir bitkisinin farklı eksplantları üzerinde değişen TDZ dozların etkilerinin belirlenmek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları

Eksplant tipi	Kallus oluşum yüzdesi				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Yaprak					
Uç Bölgesi	33,333b*	41,667ab	66,667a	58,333ab	33,333b
Yaprak					
Orta Bölgesi	33,333b	41,667ab	50,000ab	50,000ab	33,333b
Yaprak					
Dip Bölgesi	25,000b	50,000ab	66,667a	41,667ab	33,333b
Petiol	0,667b	8,333b	16,667a	21,667a	8,333b
Koltuk					
Altı	66,667b	58,333b	66,667b	83,333a	58,333b
Boğum					
Arası	25,000b	41,667b	66,667a	25,000b	25,000b

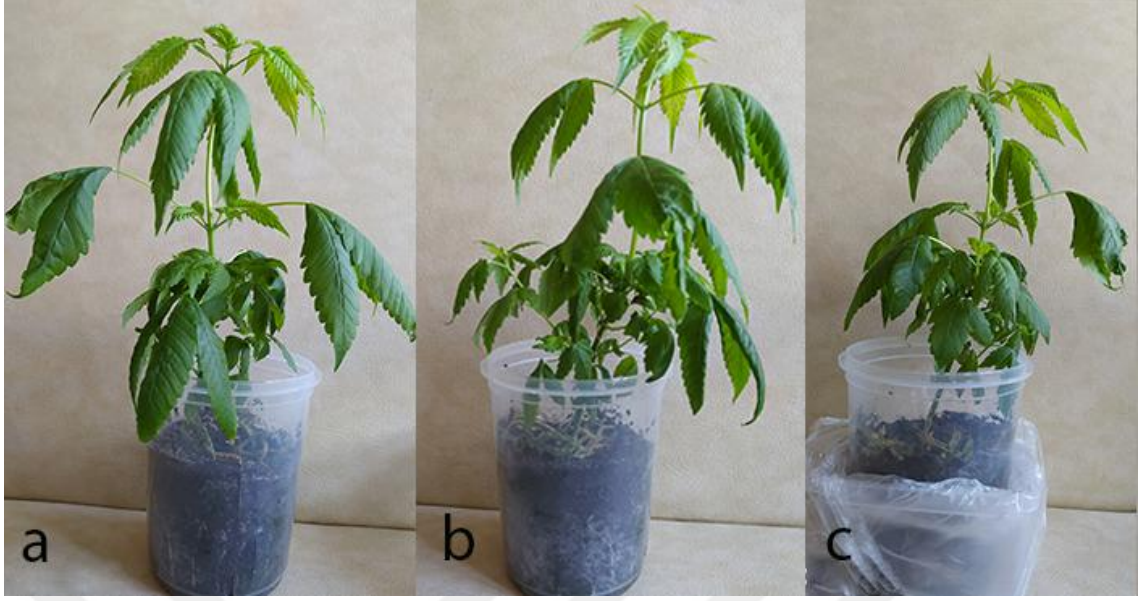
*Duncan analizi sonuçlarına göre her satırda farklı harfler ile gösterilmiş ortalamalar arasında 0.05 düzeyinde farklılığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.7 Kenevir bitkisinin farklı eksplantları üzerinde değişen TDZ dozlarının etkilerinin belirlenmesi



Resim 4.7 TDZ dozlarının farklı eksplantlar üzerine etkisinin (a),(b),(c),(d),(e),(f),(g),(h) gözlemlenmesi



Resim 4.8 *In vitro* şartlarda elde edilen (a, b) S. Vezirköprü, (c) Uşak popülasyonuna ait bitkilerin iklim dolabında dış koşullara alıştırılması

4.4 Toprak Analizi ve Meteorolojik Veriler

Araştırma yerinin toprak özellikleri incelendiğinde killi- tınlı bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Topraktaki organik madde miktarı % 1,17’dir. Toprak tuzluluk oranı % 0,037; toprak pH’sı 7,27; yüzde kireç oranı % 5,43 dir. Değişebilir K (K_2O) oranı 179 (kg/da), toplam azot (N) % 0,115; yarıyışlı P (P_2O_5) 5,72(kg/da) ve su ile doymuşluk ise %72 olarak tespit edilmiştir.

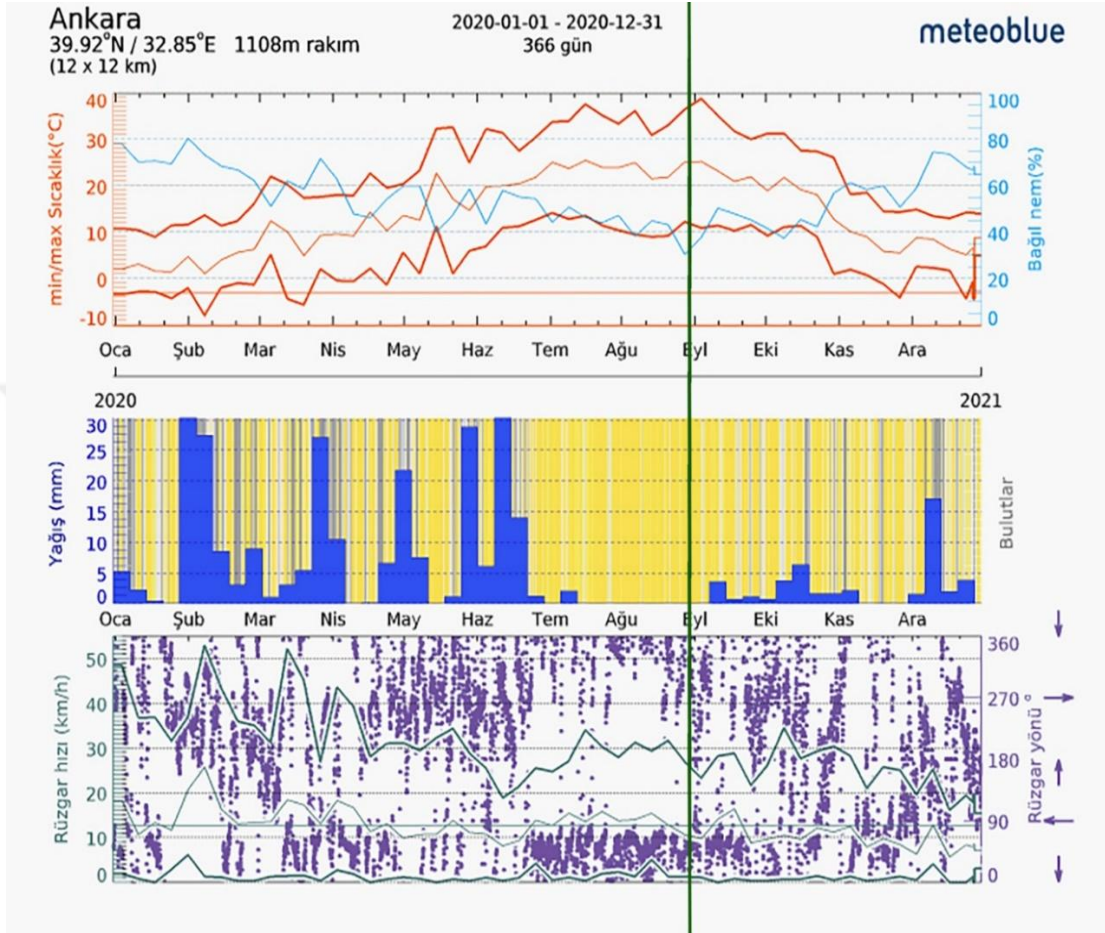
Çizelge 4.9 Deneme yerine toprak analizi sonuçları*

Tekstür	Organik madde (%)	Tuz (%)	pH	Kireç (%)	Değişebilir K (kg/da) (K_2O)	Toplam N (%)	Yarıyışlı P (kg/da) (P_2O_5)	Su ile doymuşluk
Killi-Tınlı	1,17	0,037	7,27	5,43	179	0,115	5,72	72

*Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümünde yapılmıştır.

Deneme yerine ait 2020 yılının sıcaklık, bağıl nem, yağış ve rüzgâr verilerine bakıldığında Eylül ve Aralık ayı arasında en yüksek sıcaklık 39,1 °C, en düşük sıcaklık (-)8,6 °C gözlemlenmiştir. Deneme yerine ait 2020 yılının sıcaklık, bağıl nem, yağış ve rüzgâr verilerine bakıldığında Eylül ve Aralık ayı arasında en yüksek bağıl nem %77 en düşük bağıl nem % 11 olarak tespit edilmiştir. Deneme yerine ait 2020 yılının sıcaklık, bağıl nem, yağış ve rüzgâr verilerine bakıldığında Eylül ve Aralık ayı arasında en

yüksek yağış 17 mm en düşük yağış 0,5 mm izlenmiştir. Deneme yerine ait 2020 yılının sıcaklık, bağıl nem, yağış ve rüzgar verilerine bakıldığında Eylül ve Aralık ayı arasında en yüksek rüzgar hızı 36 km/s en düşük rüzgar hızı 2 km/s görülmüştür.



Resim 4.9 Deneme yerine ait 2020 yılının sıcaklık, yağış ve rüzgar verileri (https://www.meteoblue.com/tr/hava/historyclimate/weatherarchive/ankara_t%c3%bcrk_323786?fcstlength=1y&year=2020&month=2)

4.5 Toprakta Gelişim Aşaması

Kenevir bitkisi, yüksek bir adaptasyon yeteneğine sahip olup subtropik bölge iklim kuşağından ılıman bölge iklim hattına kadar yayılmıştır. Türkiye’de kenevir bitkisinin yazlık ekimi yapılmaktadır. Ekimden önce topraktaki nem miktarı önemlidir. Bu yüzden yağış gereksinimi fazladır. 0⁰C’nin altındaki sıcaklıklara oldukça hassas olan kenevir bitkisi -5 °C’den daha düşük sıcaklıklarda da tamamen zarar gördüğünden tohum üretimi için 0⁰C dereceden daha düşük olmayan en az 150 günlük ve lif için ise 120 günlük bir olgunlaşma zamanına ihtiyacı vardır (Gizlenici ve ark., 2019).

Kenevir bitkisi için en uygun topraklar; orta-ağır, drenajı iyi, havadar, derin, besin maddelerince verimli, toprak pH sı 6-7,5 arasında olan, gevşek, tınlı ve organik maddece zengin, kireçli, alüviyal topraklardır. Kumlu topraklar, hafif asitli, , hafif kurak, tınlı ve ağır topraklar ile geçirgenliği düşük drenajı zayıf olan topraklar kenevir bitkisi ekimi için uygun değildir (Gizlenici ve ark., 2019).

Kenevir bitkisi toprakta fazla besin maddesi olmasını ister. Kenevir bitkisi toprak nemini sevmesine karşın aşırı nemli toprak pH'ı düşüreceğinden kenevirin besin maddesi alımını güçleştirmektedir. Toprağın sürekli olarak göllenmeye maruz kalması kenevir bitkisinin yapraklarında deformasyon ve sararmaya yol açmaktadır. Kenevir bitkisi eğer sürekli olarak su içerisinde kalırsa bitki kökleri hava alamaz bitki duraklama dönemine girer (Gizlenici ve ark., 2019).

Bilindiği üzere yapılan laboratuvar çalışmalarından elde edilen bitkilerin dış koşullara adapte olması sürdürülebilirliğin sağlanması için önemlidir.

In vitro rejenerasyon aşamasında sürgün gelişimine paralel olarak kök oluşumu sağlandığı için bitkiler doğrudan toprağa aktarılmıştır. Bu şekilde *In vitro* köklendirme aşaması atlanarak kontaminasyon, sürgünlerin köklenmemesi gibi olası olumsuzluklar engellenmiş ve zamandan tasarruf sağlanmıştır. Rejenere olan sürgünler, içerisinde nemli torf – toprak karışımı bulunan Magentalara aktarılmıştır. Magentaların üzerilerine nemli poşet geçirilerek belirli zaman aralıklarında üzerinde delikler açılmak suretiyle henüz dış ortam şartlarına alışmamış bitkiciklerin aniden su kaybederek ölmesi engellenmiştir. Dış koşullara adaptasyonda *In vitro* koşullardan çıkarılan bitkiler kapalı toprak ortamlarına alınmıştır. Nem oranları her gün kontrol edilmiştir. 3. Günün sonunda kapalı sistem kademeli olarak açılmaya başlanmış bu işlem 7 gün sürmüştür.



Resim 4.10 10. Günü sonunda toprak koşullarına alınan kenevir bitkilerinden bir örnek

Alıştırma aşamında 10. günün sonuna kadar kenevir bitkileri gelişimlerine devam etmiştir. Ardından 15. günde bitkiler tarla şartlarına alınmıştır.



Resim 4.11 Çalışma sonucu elde edilen bitkilerinden rasgele seçilmiş bir örnek, kenevir bitkisinin tarla şartlarına şaşırdıktan 17 gün sonra gözlemlenmesi

5. TARTIŞMA

5.1 Kenevir Bitkisinde Sterilizasyon İşleminin Etkisi

Genellikle çamaşır suyu olarak satın alınan sodyum hipoklorit, bitki materyalinin yüzey sterilizasyonu için en sık kullanılan kimyasal maddedir. Ticari çamaşır suyu, %5,25 sodyum hipoklorittir. Genellikle orijinal konsantrasyonun %0-%90'u oranında seyreltilir. Bitki materyali çoğunlukla bu solüsyona tek başına veya manyetik karıştırıcı ile 10 - 20 dakika, bazen de daha fazla süre daldırılır/karıştırılır. Her eksplant türü için fitotoksisite nedeniyle konsantrasyon ve zaman arasında deneysel olarak bir denge belirlenmek amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmada kenevir bitkisinin 2 popülasyon tohumları üzerinde farklı dozlarda (Kontrol, %50, %70, %90) ticari çamaşır suyunun (NaOCl) kullanımı ile %100 sterilizasyon sağlanmış olup, çimlenme oranlarında önemli derecede farklı etkileri izlenmiştir. Benzer şekilde, daha önce diğer bitkilerin tohumları üzerinde yapılan sterilizasyon çalışmalarında da çamaşır suyunun kullanımı uygun bulunmuştur (Bhojwani ve Razdan, 1986; Kai ve ark., 2007; Mihaljević ve ark., 2013; Bello ve ark., 2018; Hesami ve ark., 2019).

5.2 Tohum Çimlendirme Optimizasyonu

5.2.1 GA₃ dozlarının çimlenme üzerine etkisi

Çimlenme sürecinde karbonhidrat, protein ve diğer rezervlerin tohum metabolizmasını doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Bu olası bir dormansi nedenidir. Bunun yanı sıra, dormansi aynı zamanda tohum çimlenme sürecinde temel bir rol oynayan büyüme düzenleyici hormonların arasındaki bir dengeye de bağlanabilir. Kenevir bitkisinin tohumları üzerinde farklı GA₃ dozlarının (Kontrol, 0,20, 0,40, 0,50, 0,60, 0,80, 1,0, 1,20 mg/L) çimlenme üzerine etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Uşak popülasyonunda 0,20 ve 0,40 mg/l de %40 ve Samsun Vezirköprü popülasyonunda 0,40 mg/l dozunda % 53,333 çimlenme oranıyla en yüksek değerler tespit edilmiştir. Görüldüğü üzere farklı popülasyon ve hatlarda farklı oranda dormansi oluşabilir. Oluşan bu dormansiyi kırmak amacıyla GA₃ dozlarıyla oynanması ile uygun dozların belirlenmesi gerekmektedir. Bu yüzde farklı popülasyon ve çeşitlerde dormansiyi kırmak için farklı dozlarda GA₃

kullanılabilir. Gibberellik asit, dormansi halinin üstesinden gelmede hem de rezervlerin hidrolizinin kontrolünde rol oynar. Tohumlarda bu asidin yeterli seviyelerinin varlığı, hidrolitik enzimlerin, özellikle α -amilazın sentezini, aktivasyonunu ve salgılanmasını uyarak embriyo büyümesi için gerekli olan indirgeyici şekerleri ve aminoasitleri serbest bırakır (Mayer ve Poljakoff-Mayber, 1963; Khan, 1971).

5.2.2 GA₃ ve farklı BAP dozlarının çimlenme üzerine etkisi

Bitki hormonlarının çimlenme sürecinde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Nadjafia ve ark., 2006). Gibberellik asit (GA₃), çimlenmeyi indükleyerek birincil uyku durumunu kontrol etmek için önerilen hormonlardan biridir (Ritchie ve Gilroy, 1998). Gibberellinlerin tohumlara dışarıdan uygulanması tohum uyku halini kırabilir ve fide oluşumuna yardımcı olabilir (Greipsson, 2001). Diğer bitki büyüme maddelerinin, özellikle sitokinin aktivitesine sahip olanların, bazı bitkilerde tohum çimlenmesi veya uyku hali kırılmasında etkili olabileceği gösterilmiştir (Prasad ve ark., 1983; Thomas ve Van Staden, 1995; Kabar, 1998). Bir önceki çalışmada, kenevir bitkisinin tohumları üzerinde en optimum sonuçları 0,40 mg/l GA₃ içeren MS ortamdan ile izlenmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmada 0,40 mg/l GA₃ dozu sabit tutularak farklı BAP dozları (Kontrol, 0,50, 0,80, 1,0 mg/L) uygulanmıştır. Uşak popülasyonunda farklı GA₃ dozunda çimlenme %20,000-33,333 arasında değişmiştir. En fazla çimlenme oranı % 46,667 ile Samsun Vezirköprü popülasyonunda tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre GA₃+BAP beraber kullanıldığında tohum çimlendirilmesinde inhibasyon veya dormansi oluşumuna sebep olduğu izlenmiştir. Bu çalışmanın bu sonucu, GA₃ ile beraber BAP'in kenevir tohumunda dormansinin üstesinden gelmede etkili olmadığını göstermiştir.

5.2.3 Steril saf suyun çimlenme üzerine etkisi

Kenevir popülasyon/çeşitlerinin çimlendirilmesini güçlendirmek için hidro-priming ve ozmopriming tohum ön işlem teknikleri uygulanmıştır (Ashraf ve Foolad, 2005; Paparella ve ark., 2015). Ön muamele çalışmalarının, ticari açıdan önemli bitkilerin tohum çimlenme performansı üzerindeki etkisini araştırmada birkaç çalışma bulunmasına rağmen, kenevir bitkisi yetiştiriciliği için, ön muamele ile tohum hazırlamanın uygulanması ihmal edilmiş bir yöntemdir. Bu çalışma, ozmoprimin ve

hidropriming'in Petri kaplarında erken fide çimlenmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve ayrıca ozmopriming ve hidropriming'in çimlenme parametreleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmak için yapılmıştır. Besi yeri içeren ozmotik priming muamele ile katı kontrol ortamında Uşak popülasyonunda en fazla %24,67 ve S.Vezirköprü popülasyonunda % 26,67 çimlenme not edilmiştir. Buna kıyasla Besi yeri içermeyen hidropriming uygulamasında Uşak popülasyonunda en fazla çimlenme % 50 ve S.Vezirköprü popülasyonunda % 63,33 olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın bu sonucu, ozmopriming ile kıyasla hidropriming uygulamasının kenevir tohumunda dormansinin üstesinden gelmede etkili olduğunu anlaşılmıştır.

5.2.4 Ms ve Gamborg B5 ortamlarını çimlenme üzerine etkisi

Bitki doku kültürleri için en yaygın kullanılan ortamlardan biri, Murashige ve Skoog (MS) tarafından tütün doku kültürü için geliştirilen ortamdır (Owen ve ark., 1991; Khan ve ark., 1999; Sarwar ve ark., 2009; Sattar ve ark., 2010). MS ortamının önemli özelliği, çok yüksek nitrat, potasyum ve amonyak konsantrasyonudur. Vitaminlerden Glisin MS besi ortamda bulunurken Gamborg B5 ortamda bulunmamaktadır. Gamborg ve diğerleri tarafından oluşturulan B5 ortamı birçok araştırmacı tarafından da kullanılmaktadır (Freytag ve ark., 1988; Bregitzer, 1992; Tsoi ve Doran, 2002; Jacob ve Malpathak, 2005). B5 ortamındaki inorganik besin seviyeleri MS ortamındakinden daha düşüktür. Nikotinik Asit, Piridoksin HC1 ve Tiamin HC1 MS ortam la kıyasla daha yüksek oranda bulunmaktadır. Bu Gamborg B5 ortam ile kıyasla MS ortamda yüksek azot ve K ile az miktarda vitaminler içeren MS besi ortamında inhibasyon tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kenevir tohum çimlenme MS besi ortamında Uşak popülasyonunda %26,666, S.Vezirköprü popülasyonunda % 33,333 bulunmuştur. Gamborg B5 besi ortamında ise çimlenme Uşak popülasyonunda %66.666, S.Vezirköprü popülasyonunda % 73,33 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucu, MS besi ortamı ile kıyasla Gamborg B5 besi ortamının kenevir tohumunda tohum çimlendirilmesinde daha etkili olduğunu anlaşılmıştır.

5.3 Mikropropagasyon Çalışmaları

5.3.1 Farklı besi ortamlarında TDZ'nin mikropropagasyon çalışmalarına etkisi

TDZ, sitokinin benzeri en aktif bitki büyüme düzenleyici maddeler arasındadır ve birçok inatçı (fazla miktarda fenolik bileşiler içeren) bitki türünde bitki rejenerasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. TDZ bitki rejenerasyonu için olumlu etki yaparken eksplantlar ve gelişen sürgünler üzerinde olumsuz yan etkiler bırakabilmektedir. En yaygın yan etkisi yaprakların ve gelişen sürgünlerin küçük kalması ve birçok sitokinininden daha fazla sürgün oluşturmaya sebep olmasıdır (Mok ve ark., 1982; Mok ve Mok, 1985; Preece ve ark., 1987; Singha ve Bhatia, 1988; Huetteman and Preece, 1993). Ayrıca, TDZ'yi olabildiği kadar düşük dozlarda kullanmak olumsuz yan etkilerinden kaçınmak için faydalıdır. TDZ kullanılarak her eksplanttan sürgün rejenerasyonu elde edilmesi zordur. Bu çalışmada Uşak popülasyonunun MS besi yerinde % 33,33 ve S.Vezirköprü popülasyonunun da % 46,66 rejenerasyonu izlenmiştir. Gamborg B5 besi yerinde ise Uşak popülasyonunda % 40, S.Vezirköprü popülasyonunda % 60 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre kenevir bitkisinde TDZ'ile çalışırken Gamborg B5 ortamın rejenerasyon için daha uygun olduğu izlenmiştir.

5.3.2 Farklı eksplantların TDZ'nin farklı dozları ile mikropropagasyon çalışmalarına etkisi

Optimize edilmiş TDZ dozu yaprak uç, yaprak orta, yaprak dip bölge, petiol, boğum arası, koltuk altı eksplantlarının rejenerasyonu için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre;

Kenevir bitkisinin farklı eksplantları üzerinde değişen TDZ dozların etkisi önemli derecede farklılık göstermiştir.

Çalışmada En fazla kallus ve sürgün oluşum oranı koltuk altı eksplantında 0,4 mg/l TDZ içeren ortamda % 58,333-83,333 arasında tespit edilmiştir. TDZ konsantrasyonlarının koltuk altı meristemlerinden ve diğer eksplantlardan sürgün proliferasyonunda faydalı olduğu tespit edilmiştir. TDZ, sürgün uzamasını ve rejenerasyonunu engelleyebilir (Pijut ve ark., 1991; Gribaudo ve Fronda, 1991; Khawar

ve ark., 2004). Bu çalışma sonuçları da benzerlik göstermiş olup, yalnız koltuk altı meristemden sürgün rejenerasyon gösterip, diğer eksplantlarda (yaprak uç, orta ve dip kısımlarda kısmen, petiol veya yaprak sapında tamamen, koltuk altı arasında nekroz oluşumu) önemli derecede sürgün rejenerasyonu izlenmemiştir.

Bilindiği üzere yapılan laboratuvar çalışmalarından elde edilen bitkilerin dış koşullara adapte olması sürdürülebilirliğin sağlanması için önemlidir.

5.3.3 Toprakta gelişim aşaması

Kenevir bitkisi yetiştiriciliği için uygun toprak yapısı; orta-ağır, drenajı iyi, havadar, , derin, besin maddelerince verimli, toprak pH sı 6-7,5 arasında olan, gevşek, tınlı ve organik maddece zengin, topraklar olmalıdır. Kumlu topraklar, ağır topraklar ile drenajı zayıf olan topraklar kenevir bitkisi ekimi için uygun değildir (Gizlenci ve ark., 2019b). Araştırma sonunda tarla şartlarına alınan kenevir bitkisinin dikildiği toprağın analizlerine göre toprak yapısının uygun olduğu görülmüştür (Bknz. Resim 4.9).

Kenevir bitkisi kışıl ekime uygun bir bitki değildir. İklim koşulları değerlendirildiğinde ekilen 0 °C'nin altındaki sıcaklıklara dayanımı çok düşük olan kenevir bitkisi -5 °C'den daha düşük sıcaklıklarda da tamamen zarar görmektedir. Bu sebeple Türkiye'de kenevir bitkisinin yazlık ekimi yapılmaktadır (Bknz. Çizelge 4.8).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 Sonuç

- i. Çalışmada kenevirin Uşak ve Samsun Vezirköprü popülasyonları kullanılmıştır. Tohum sterilizasyonu için % 50, 70 ve 90 konsantrasyonda çamaşır suyu kullanılmıştır. Her iki popülasyonun yüzey sterilizasyon için % 50 çamaşır suyu uygun bulunarak tercih edilmiştir.
- ii. Tohum çimlendirmek amacıyla GA₃, GA₃ ve BAP ile ozmopriming ve hidropriming uygulamaları yapılmıştır. En iyi çimlendirme hidropriming uygulama ile elde edilmiştir.
- iii. Ayrıca, tohum çimlendirmek için ½ × MS ortamı ve ½ × Gamborg B5 ortamı kullanılmıştır. MS ortamına kıyasla Gamborg B5 ortamında tüm uygulamalara göre en yüksek tohum çimlendirilmesi elde edilmiştir.
- iv. Sürgün rejenerasyon için koltuk altı meristem, koltuk altı arası, yaprak dip, orta ve ucu ile petiol eksplantları kullanılmıştır. Yalnız koltuk altı meristem eksplantlarda sürgün rejenerasyonu izlenmiştir.
- v. Köklendirmek için her hangi bir oksin kullanılmamıştır.
- vi. Köklendirilmiş bitkiler tarla koşullarına şaşırtılmadan önce saksılara aktarılmıştır. Daha sonra elde edilen bitkiler Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümün çevirilmiş Deneme alanına aktarılmıştır ve başarılı şekilde büyümeye devam etmişlerdir.

6.2 Öneriler

- a) Kenevir bitkisi tohum sterilizasyonunda toksik etkiden kaçınmak için %50 Çamaşır suyu konsantrasyonu kullanılmalıdır.
- b) Kenevir bitkisinde tohumluk için hasat zamanından kaynaklı GA₃ kullanımı yapılmalıdır fakat yeterli değildir.
- c) Kenevir bitkisindeki hücre basıncı fiziksel dormansisinden kaynaklı olarak hidropriming ön muamelesi yapılmalıdır.
- d) *In Vitro* şartlarda kenevir yetiştiriciliğinde mutlak suretle besi ortamının derişimi azaltılmalıdır.

- e) *In vitro* şartlarda kenevir bitkisinde her popülasyon için farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyiciler kullanılmalıdır.
- f) Kenevir bitkisinde THC ve CBD üretimi için mutlak suretle *In vitro* şartlar kullanılmalıdır.
- g) Kenevir bitkisinin mikropagasyon çalışmalarında TDZ kullanımı uygundur.
- h) Kenevir bitkisinde gerek tohum çimlenmesi gerekse mikropagasyon çalışmalarında Gamborg B5 kullanımı uygundur.
- i) Kenevir bitkisinin toprak istekleri göz önünde bulundurularak uygun bölgelere ekimi yapılmalıdır.
- j) Kenevir bitkisinin iklimlenme isteği göz önünde bulundurularak ekimi yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- ‘Kenevir Yetiştiriciliği ve Kontrolü Hakkında Yönetmelik’, Resmî Gazete Sayı: 29842
2016 ve Sivas Valiliğ 06.01.2021 tarih ve E-27 145502-160.99-3718439 sayılı yazı.
- Abrams, D. I. (2016). Integrating cannabis into clinical cancer care. *Current oncology*, 23(Suppl 2), S8.
- Ajansı, OR. A. N. (2019). Kenevir Yetiştiriciliği, Orta Anadolu Kalkınma Ajansı, 38s, Ankara.
- Ashraf, M.; Foolad, M.R. (2005). Pre-sowing seed treatment –A shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions. *Adv. Agron*, 88, 223–271.
- Aydoğan, M., Terzi, Y. E., Gizlenici Ş., Acar M., Esen, A., & Meral, H. (2020). Türkiye’de kenevir yetiştiriciliğinin ekonomik olarak yapılabilirliği: Samsun ili Vezirköprü ilçesi örneği. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 35(1), 35-50.
- Aytac, S., Arslanoglu, S. F., & Ayan, A. K. (2018). High-temperature inhibition of seed germination of hemp (*Cannabis* sp.). *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(12), 8200-8204.
- Bello, O. A., Esan, E. B., & Obembe, O. O. (2018, November). Establishing surface sterilization protocol for nodal culture of *Solanecio bialfrae*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 210, No. 1, p. 012007). IOP Publishing.
- Bhojwani, S. S., & Razdan, M. K. (1986). *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier.
- Blázquez C, González-Feria L, Alvarez L, et al. Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res* 64 (16): 5617-23, 2004.
- Bregitzer, P. (1992). Plant regeneration and callus type in barley: effects of genotype and culture medium. *Crop Science*, 32(5), 1108-1112.
- Bretagne, B., Chupeau, M. C., Chupeau, Y., & Fouilloux, G. (1994). Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Reports*, 14(2), 120-124.
- Chandra, S., Lata, H., Mehmedic, Z., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2010). Assessment of cannabinoids content in micropropagated plants of *Cannabis sativa* and their comparison with conventionally propagated plants and mother plant during developmental stages of growth. *Planta medica*, 76(07), 743-750.
- Chaohua, C., Gonggu, Z., Lining, Z., Chunsheng, G., Qing, T., Jianhua, C., ... & Jianguang, S. (2016). A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial crops and products*, 83, 61-65.

- Deepa, A. V., Anju, M., & Thomas, T. D. (2018). The applications of TDZ in medicinal plant tissue culture. In *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. Springer, Singapore, 297-316.
- Doblin RE, Kleiman MA., (1991) Marijuana as antiemetic medicine: a survey of oncologists' experiences and attitudes. *J Clin Oncol* 9 (7): 1314-9.
- FAO, Food and Agriculture Organization of Hemp Cultivation and Production Statistical Data, FAOSTAT, 2019. <http://www.fao.org/faostat/> [Erişim tarihi: 21 Mart 2020].
- Fisse, J., Braut, F., Cosson, L., & Paris, M. (1981). Étude *In vitro* des capacités organogénétiques de tissus de Cannabis sativa L.; effet de différentes substances de croissance. *Pl. Méd. Phytoth*, 15, 217-223.
- Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry reviews*, 7(3), 615-639.
- Flores-Sanchez, I. J., Peč, J., Fei, J., Choi, Y. H., Dušek, J., & Verpoorte, R. (2009). Elicitation studies in cell suspension cultures of Cannabis sativa L. *Journal of biotechnology*, 143(2), 157-168.
- Freytag, A. H., Anand, S. C., Rao-Arelli, A. P., & Owens, L. D. (1988). An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in Beta vulgaris L. *In vitro. Plant cell reports*, 7(1), 30-34.
- Gizlenci Ş., Acar M., Yiğen Ç., Aytaç S., (2019b). Kenevir Tarımı, *Tagem*, Samsun, 15-16.
- Gizlenci, Ş. Acar, M. Yiğen, Ç. Aytaç, S. (2019a), Kenevir Tarımı, *Samsun*, 9-11.
- Greipsson, S. (2001). Effects of stratification and GA3 on seed germination of a sand stabilising grass Leymus arenarius used in reclamation. *Seed. Sci. Technol.* 29, 1-10.
- Gribaudo I & Fronda A (1991) Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *In vitro*. *HortScience* 26: 1083
- Güleç, T. E., Yıldırım, A., & Sönmezoğlu, Ö. A. (2010). Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3(2), 67-79.
- Hartsel, S. C., Loh, W. T., & Robertson, L. W. (1983). Biotransformation of cannabidiol to cannabielsoin by suspension cultures of Cannabis sativa and Saccharum officinarum. *Planta medica*, 48(05), 17-19.
- Hesami, M., Naderi, R., & Tohidfar, M. (2019). Modeling and optimizing *In vitro* sterilization of chrysanthemum via multilayer perceptron-non-dominated sorting genetic algorithm-II (MLP-NSGAI). *Frontiers in plant science*, 10, 282.
- <https://kenevirhaber.com/> (Erişim tarihi: 12.12.2020).
- Huetteman, C. A., & Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant cell, tissue and organ culture*, 33(2), 105-119.

- Hussein S.H.F. 2014. Cannabinoids production in Cannabis sativa L: An *In vitro* approach. Technical biochemistry (Technical University of Dortmund), GERMANY.
- Jacob, A., & Malpathak, N. (2005). Manipulation of MS and B5 components for enhancement of growth and solasodine production in hairy root cultures of Solanum khasianum Clarke. *Plant cell, tissue and organ culture*, 80(3), 247-257.
- Jiang, Y., Xia, Z., Tang, Y., Han, Q., & Han, C. (2015). Preliminary studies on the tissue culture of Cannabis sativa L.(industrial hemp). *Agricultural Science & Technology*, 16(5), 923.
- Kabar, K. (1998). Comparative effects of Kinetin, Benzyladenine, and Gibberellic Acid on Absciscic Acid Inhibited Seed Germination and Seedling Growth of Red Pine and Arbor Vitae. *Turk. J. Bot.* 22, 1-6.
- Kai, H. U., Li-jun, Z., & Xue-mei, B. (2007). Analysis of the cause of contamination and explant sterilization in plant tissue culture. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 35(3), 680.
- Kaya, S., & Öner, E., Kenevir Liflerinin Eldesi, Karakteristik Özellikleri ve Tekstil Endüstrisindeki Uygulamaları (2020). *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(1), 108-123.
- Khan, A. A. (1971). Cytokinins: permissive role in seed germination. *Science*, 171(3974), 853-859.
- Khan, P. S. V., Hausman, J. F., & Rao, K. R. (1999). Effect of agar, MS medium strength, sucrose and polyamines on *In vitro* rooting of Syzygium alternifolium. *Biologia plantarum*, 42(3), 333-340.
- Khawar, K. M., Sancak, C., Uranbey, S., & Özcan, S. (2004). Effect of thidiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (Lens culinaris Medik.) via organogenesis. *Turkish Journal of Botany*, 28(4), 421-426.
- Kodym, A., & Leeb, C. J. (2019). Back to the roots: protocol for the photoautotrophic micropropagation of medicinal Cannabis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(2), 399-402.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2009). Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of Cannabis sativa L.—an important medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(1), 79-86.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2010a). High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ^9 -tetrahydrocannabinol yielding Cannabis sativa L. *Planta medica*, 76(14), 1629-1633.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2016a). In vitro propagation of Cannabis sativa L. and evaluation of regenerated plants for genetic fidelity and cannabinoids content for quality assurance. In *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition* (pp. 275-288).

- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2010b). Assessment of the genetic stability of micropropagated plants of *Cannabis sativa* by ISSR markers. *Planta medica*, 76(01), 97-100.
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2016b). In vitro mass propagation of *Cannabis sativa* L.: a protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 3(1), 18-26.
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2011). Molecular analysis of genetic fidelity in *Cannabis sativa* L. plants grown from synthetic (encapsulated) seeds following *In vitro* storage. *Biotechnology letters*, 33(12), 2503-2508.
- Loh, W. T., Hartsel, S. C., & Robertson, L. W. (1983). Tissue culture of *Cannabis sativa* L. and *In vitro* biotransformation of phenolics. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 111(5), 395-400.
- Mandolino, G., & Ranalli, P. (1999). *Advances in biotechnological approaches for hemp breeding and industry* (pp. 185-212). Haworth Press, Binghamton, NY.
- Mansuroğlu S., Gürel E. (2001). Mikroçoğaltım. Edited by Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S. *Bitki Biyoteknolojisi: I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*. pp. 262–281.
- Mayer, A. M., & Poljakoff-Mayber, A. (1963). The germination of seeds. *The germination of seeds*.
- Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Čmelik, Z. & Jurković, Z. (2013). In vitro sterilization procedures for micropropagation of ‘Oblačinska’ sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 58(2), 117-126.
- Mok MC & Mok DWS (1985) The metabolism of [$\sim$ 4C]- thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. *Physiol. Plant* 65:427-432.
- Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ, Shudo K, Isogai Y & Okamoto T (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry* 21: 1509-1511
- Montford, S. and Small, E. (1999) A comparison of the biodiversity friendliness of crops with special reference to hemp (*Cannabis sativa* L.). *J. Int. Hemp. Assoc.* 6, 53–63
- Murasnige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tohaoco tissue cultures. *Physiol. plant*, 15(3), 473-497.
- Nadjafia, F., Bannayan, M., Tabrizia, L. & Rastgoo, M. (2006). Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *J. Arid. Environ.* 64, 542-547.

National Toxicology Program. (1996). NTP toxicology and carcinogenesis studies of 1-trans-delta (9)-tetrahydrocannabinol (CAS No. 1972-08-3) in F344 rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *National Toxicology Program technical report series*, 446, 1-317.

Owen, H. R., Wengerd, D., & Miller, A. R. (1991). Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. *Plant Cell Reports*, 10(11), 583-586.

Öktüren, F., & Sönmez, S. (2005). Bitki Besin Maddeleri ile Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicileri (Hormonlar) Arasındaki İlişkiler. *Derim*, 22(2), 20-32.

Özgen, M. 2005. Gıda üretiminde yeni eğilimler: Genetiği değiştirilmiş Sempozyumu. Dünya Gıda Günü. 14-15 Ekim 2005, Ankara. Bildiriler: 170-184

Paparella, S.; Araújo, S.S.; Rossi, G.; Wijayasinghe, M.; Carbonera, D.; Balestrazzi, (2015). A. Seed priming: State of the art and new perspectives. *Plant Cell Rep.* 34, 1281–1293.

Pelit, S., Yildiz, M., Telci, C., & Önel, B. (2011). The effect of *In vitro* competition on callus formation and shoot regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum sp.*). *Current opinion in Biotechnology*, (22), S45-S46.

Pereira J, Wiegand T, (2014). Marijuana. in Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), Academic Press, PP 157-159. ISBN 9780123864550.

Pijut PM, Michler CH & Voelker TM (1991) Effects of embryo explant orientation, thidiazuron, and agar on eastern white pine (*Pinus strobus* L.) adventitious shoot initiation. Proc Intl. Symposium on Applications of Biotechnology to Tree Culture, Protection and Utilization. Columbus OH . p: 126

Prasad, V. N., Gupta, V. N. P. & Bajracharya, D. (1983). Alleviation by gibberellic acid and kinetin of the inhibition of seed germination in Maize (*Zea mays* L.) under submerged conditions. *Ann. Botany*. 52, 649-652.

Preece JE, Huetteman CA, Puella CH & Neuman MC (1987) The influence of thidiazuron on *In vitro* culture of woody plants. *HortScience* 22:1071 (Abstr)

Ramaekers, J. G., Kauert, G., Theunissen, E. L., Toennes, S. W., & Moeller, M. R. (2009). Neurocognitive performance during acute THC intoxication in heavy and occasional cannabis users. *Journal of psychopharmacology*, 23(3), 266-277.

Ritchie, S. & Gilroy, S. (1998). Gibberellins: regulating genes and germination. *New Phytol.* 140, 363-383.

Robbins, L., Snell, W., Halich, G., Maynard, L., Dillon, C., & Spalding, D. (2013). Economic Considerations for Growing Industrial Hemp: Implications for Kentucky's Farmers and Agricultural Economy. *Department of Agricultural Economics, University of Kentucky: Lexington, KY, USA*.

- Sánchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T., (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61 (15): 5784-9.
- Sarwar, S., Zia, M., Rehman, R., Fatima, Z., Sial, R., & Chaudhary, M. (2009). In vitro direct regeneration in mint from different explants on half strength MS medium. *African Journal of Biotechnology*, 8(18).
- Sattar, S., Hussnain, T., & Javaid, A. (2010). Effect of NaCl salinity on cotton (*Gossypium arboreum* L.) grown on MS medium and in hydroponic cultures. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 20, 87-89.
- Singha S & Bhatia SK (1988) Shoot proliferation of pear cultures on medium containing thidiazuron and benzylamino purine. *HortScience* 23:803 (Abstr)
- Śledziński, P., Zeyland, J., Słomski, R., & Nowak, A. (2018). The current state and future perspectives of cannabinoids in cancer biology. *Cancer medicine*, 7(3), 765-775.
- Slusarkiewicz-Jarzina, Aurellia., Ponitka, A., & Kaczmarek, Z. (2005). Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot*, 47, 145-151.
- Snedecor, G. W., & Cochran, W. G. (1967). Statistical methods, Ed 6, pp 258-296. Ames, IA: Iowa State UP.
- Thomas, T. H. & Van Staden, J. (1995). Dormancy break of celery (*Apium graveolens* L.) seeds by plant derived smoke extract. *J. Plant Growth Regul.* 17, 195-198.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37(2), 169-180.
- Tsoi, B. M. Y., & Doran, P. M. (2002). Effect of medium properties and additives on antibody stability and accumulation in suspended plant cell cultures. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(3), 171-180.
- TÜİK, Bitkisel Üretim İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu, 2020. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/>, [Erişim Tarihi: 21 Mayıs 2020].
- Ulaş, E. (2018). Gerçek Köye Dönüş Projesi: Kenevir. Hatice Bahtiyar (Editör), Hiperlink Yayınları, 217s, İstanbul.
- Wang, R., He, L. S., Xia, B., Tong, J. F., Li, N., & Peng, F. (2009). A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture. *Pak. J. Bot*, 41(2), 603-608.
- Wikipedia <https://en.wikipedia.org/wiki/Thidiazuron>. Ulaşım 2020-08-14b.
- Wikipedia https://en.wikipedia.org/wiki/Gibberellic_acid. Ulaşım 2020-08-14a.
- Wróbel, T., Dreger, M., Wielgus, K., & Słomski, R. (2018). The application of plant *In vitro* cultures in cannabinoid production. *Biotechnology*, 445-454.

Yildiz, M., & Özgen, M. (2006). A comparison of growth regulators for adventitious shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). *International journal of food, agriculture and environment*, 4(3-4), 171-174.

Yildiz, M., Özcan, S., Kahramanoğulları, C. T., Day, S., & Özat, H. (2010). The effect of drying and submersion pretreatment on adventitious shoot regeneration from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Turkish Journal of Botany*, 34(4), 323-328.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Burak ÖNOL

Doğum tarihi ve yeri :

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Ankara Üniversitesi/Ziraat Fakültesi	2015
ÖnLisans	Ege Üniversitesi/Kimya	2009
Lise	Maltepe Askeri Lisesi	2004

Mesleki Deneyim

Yıl	Yer	Görev
2009-2021	Ankara Üniversitesi	Laborant

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- ❖ Telci, C., Yıldız, M., Pelit, S., Öno1, B., Erkılıç, E.G. and Kendir, H. 2011. The effect of surface-disinfection process on dormancy-breaking, seed germination, and seedling growth of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. under *in vitro* conditions. *Propagation of Ornamental Plants* 11: 10-16.
- ❖ Yıldız, M., Telci, C., Öno1, B. and Özcan, S. 2011. Oxidative stress in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* culture. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 4(2): 113-117.
- ❖ Pelit, S., Yıldız, M., Telci, C. and Öno1, B. 2011. The effect of *in vitro* competition on callus formation and shoot regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum* sp.). European Biotechnology Congress, *Current Opinion in Biotechnology* 22: 45-46, İstanbul, Turkey
- ❖ Yıldız, M., Korkmaz, N., Kurumlu, S., Öno1, B. and Telci, C. 2011. Germination and growth patterns of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) lines and cultivars at different ploidy levels. European Biotechnology Congress, *Current Opinion in Biotechnology* 22: 131-132, İstanbul, Turkey
- ❖ Yıldız, M., Telci, C., Öno1, B. and Kurumlu, S. 2011. *In vitro* explant growth and shoot regeneration from petiole explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) lines at different ploidy levels. European Biotechnology Congress, *Current Opinion in Biotechnology* 22: 132, İstanbul, Turkey
- ❖ Sadou, O., Kayan, M., Aycan, M., Öno1, B. and Yıldız, M. 2014. The effect of endogenous plant hormones on shoot regeneration from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). 3rd International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, 2-6 June, Sarajevo, Bosnia Herzegovina.
- ❖ Yıldız, M., Pelit, S., Telci, C., Koçak, N., Öno1, B. ve Erkılıç, E.G. 2011. *In vitro* şartlar altında kültüre alınan eksplant yoğunluğunun doku kültürü tepkisi üzerine etkisi. *Uluslararası Katılımlı 1. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi ve Fuarı*, Nisan 27-30, Eskişehir.

- ❖ Yıldız, M., Telci, C. ve Önel, B. 2011. Yüzey sterilizasyonu işleminin eksplantın sürgün rejenerasyon kapasitesi üzerine etkisi. *Uluslararası Katılımlı 1. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi ve Fuarı*, Nisan 27-30, Eskişehir.
- ❖ Önel, B., Darçın, E.S., Kayan, M., Aycan, M., Karahan, E., Yıldız, M., Bor'un Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) Fide Gelişimi Üzerine Etkisi, 2. Ulusal Botanik Kongresi, 2015, Afyonkarahisar, Türkiye
- ❖ Kayan, M., Önel, B., Aycan, M., Beyaz, R., Darçın, E.S., Yıldız, Ç., Karahan, E., Yıldız, M., Ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) Fide Gelişim Döneminde Tuz Stresine Morfolojik ve Fizyolojik Tepkileri, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 2015, Çanakkale, Türkiye
- ❖ Kayan, M., Aycan, M., Yıldız, M., Köm, D., Önel, B., Koç, Y., Bitkilerde Tuz Stresi ve Tuzluluğun Fotosentez Üzerine Etkisi, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 2015, Çanakkale, Türkiye
- ❖ Aycan, M., Kayan, M., Önel, B., Yıldız, Ç., Köm, D., Yıldız, M., Markör Destekli Seleksiyon Yöntemi ve Islah Çalışmalarında Kullanımı, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 2015, Çanakkale, Türkiye
- ❖ Sebahattin Özcan, Emine Anayol, Ömer Karakoç, Allahbaksh Joiya, Selma Onarici, Deniz Köm, Muhammad Aasim, Sancar Fatih Özcan, Burak Önel, M. Çağrı Oguz, Khalid Mahmood Khawar, Levent Ünlü., Toksik Cry Endotoksin Proteinlerinin Sinirlendirildiği Böceklerle Dayanikli ve Herbisite Toleransli Transgenik Pamuk Hatlarinin Gelistirilmesi, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 7-10 Eylül 2015 Çanakkale
- ❖ Received: 15 September 2015 / Accepted: 3 February 2016 / Published online: 7 March 2016 Korean Society for Plant Biotechnology and Springer Japan 2016--Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton--Online ISSN 1863-5474--Print ISSN 1863-5466-2016
- ❖ Tübitak - Ticaret Bakanlığı 1512 nolu proje çağrısı kapsamında 2180398 nolu proje ortaklığı Onol B., Seçer S. (2018)
- ❖ Murat Aycan, Muhammet Çağrı Oguz, Yasin Ozgen, Burak Onol and Mustafa Yildiz. Gamma Radiation Effect on *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Gene Transfer in Potato (*Solanum tuberosum* L.).2021

- ❖ Önoğlu B., Yıldırım M.U., Breaking Seed Dormancy and Regeneration in Cannabis Sativa L., International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences 2021

Sertifikalar

:

- 15/08/2015 – 16/08/2015 Stratejik yönetim sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 ISO 9001:2008 Kalite yönetim sistemi sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 ISO 9001:2008 İç tetkikçi sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 ISO 22000 Gıda güvenliği yönetim sistemi sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 OHSAS 18001 İş sağlığı ve güvenliği sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 Entegre yönetim sistemi sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 ISO 9001:2015 Revizyonu sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 ISO 14001 Çevre yönetim sistemi sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 Bireysel koçluk sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 NLP Practitioner sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 Takım çalışması ve yönetim becerileri sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 İkna teknikleri sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 Etkili konuşma ve diksiyon sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 Etkili iletişim, beden dili ve imaj yönetimi
- 15/08/2015 – 16/08/2015 Stres ve zaman yönetimi sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 Mülakat teknikleri sertifikası
- 15/08/2015 – 16/08/2015 Innovatic yenilikçi düşünce ile yöneticilik ve liderlik teknikleri sertifikası