



**IŞKINDA (*Rheum ribes* L.) İN VİTRO
MİKROÇOĞALTIM VE SOMAKLONAL
VARYASYONUN BELİRLENMESİ**

Muhammed ALDAİF

Doktora Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. Murat AYDIN

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**IŞKINDA (*Rheum ribes* L.) İN VİTRO MİKROÇOĞALTIM VE SOMAKLONAL
VARYASYONUN BELİRLENMESİ**

(In Vitro Micropropagation and Determination of Somaclonal Variation in Rhubarb (*Rheum
ribes* L.))

DOKTORA TEZİ

Muhammed ALDAİF

Danışman: Prof. Dr. Murat AYDIN

Erzurum
Haziran, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Prof. Dr. Murat AYDIN danışmanlığında, Muhammed ALDAİF tarafından hazırlanan “İşkında (*Rheum Ribes L.*) İn Vitro Mikroçoğaltım ve Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi” başlıklı çalışması .. / .. / 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Güleray AGAR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Murat AYDIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Mahmt Sinan TAŞPINAR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç.Dr. Emre İLHAN <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç.Dr. Behcet İNAL <i>Siirt Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
İkinci Tez Danışmanı	Unvan Ad SOYAD <i>Üniversite Adı</i>	

Enstitü Yönetim Kurulunun
..../06/2023 tarih ve
sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2020-8422

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, Tablo, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Murat AYDIN danışmanlığında sunulan “Işıkında (*Rheum Ribes* L.) İn Vitro Mikroçoğaltım ve Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	11	30
Kuramsal Temeller	6	30
Materyal ve Yöntem	13	35
Bulgular	6	20
Tartışma	5	20
Tezin Geneli	5	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Muhammed ALDAİF	Prof. Dr. Murat Aydın
21.06.2023	21.06.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖK TEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Koordinatörlüğünde yürütülmüştür. Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamı destekleyen üniversitemiz BAP birimine de teşekkür ederim.

Doktora eğitim hayatıma başladığım ilk günden itibaren akademik çalışmalarda söz söyleme gücünü aşılayan, tezimin her aşamasında beni cesaretlendiren, yol gösteren, hoşgörü ve anlayışla zorda kaldığım her an destek olan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Murat AYDIN'a ömrüm boyunca teşekkürü bir borç bilir ve sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tez izleme komitesinde yer alan kıymetli önerileri ile destek olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR ve Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a en içten duygularıyla teşekkür ederim. Tez savunma jürisinde yer alan Sayın Doç. Dr. Emre İLHAN ve Sayın Doç. Dr. Behcet İNAL hocalarıma değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda yardımlarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Esra ARSLAN'a, Araş. Gör. Esma YİĞİDER'e, Doktora öğrencisi Esra YAPRAK'a ve Yüksek lisans öğrencisi Betül BAYRAKTAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında, özellikle yazım aşamalarında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Doktora öğrencisi Sümeyra UÇAR'a teşekkürü borç bilirim.

Bitki materyallerinin toplanmasında rehberlik eden ve yardımlarını esirgemeyen Erzurum Tarım ve Orman İl Müdürlüğü, Mera Teknik Ekip Başkanı Zir. Müh. Özlem YEŞİLKENT'e şükranlarımı sunarım.

Hayatımın her aşamasında beni fedakarlıkla yetiştirip bugünlere getiren babam ve anneme ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim kardeşlerime en içten şükranlarımı sunarım.

Zorluklarla dolu doktora çalışmalarım boyunca en zor anlarımda bile yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Halenur ALDAİF'a ve çocuklarıma (Cihad, Cana ve Melek) da şükranlarımı sunarım.

Son olarak bana güvenip desteklerini bir an bile esirgemeyen ve hep yanımda olan tüm kıymetli arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Muhammed ALDAİF

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İŞKINDA (*Rheum ribes* L.) İN VİTRO MİKROÇOĞALTIM VE SOMAKLONAL VARYASYONUN BELİRLENMESİ

Muhammed ALDAİF

Danışman: Prof. Dr. Murat AYDIN

Amaç: Bu araştırmanın amacı *Rheum ribes*'te farklı eksplantlardan somatik embriyogenesis ve/veya organogenesis yoluyla etkili ve tekrarlanabilir bir in vitro mikroçoğaltım sistemi geliştirmektir. Yine araştırmada, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin meydana geldiği sistemlerin somaklonal varyasyon bakımından değerlendirilmesi SCoT markör tekniği kullanılarak tespit edilmiştir.

Yöntem: Mikroçoğaltım çalışmaları iki aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada olgun tohumdan temin edilen embriyo ekseni eksplantı ile in vitro şartlarda çimlendirilen embriyo eksplantından elde edilen 7 günlük fidelerden alınan kotiledon ve hipokotil eksplantları farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarlarını içeren ortam ile kültür şartlarından oluşan 36 farklı yöntemde kültüre alınmıştır. İkinci aşamada ise, birinci aşamada en iyi kallus oluşumunun meydana geldiği ortamda kültüre alınan (30 nolu yöntem) embriyo ekseni, kotiledon ve hipokotil kaynaklı kalluslar eksplant olarak kullanılmış ve bu eksplantlar 8 farklı ortamda kültüre alınmıştır. Her iki aşama sonunda rejenerasyon etkinliği bakımından en iyi olan 15 adet rejenerasyon sistemi belirlenmiş ve bu sistemlerde meydana gelen rejenere bitkilerin genetik kararlılığı 20 adet SCoT primeri kullanılarak tespit edilmiştir.

Bulgular: Doku parametreleri üzerine eksplant tipinin ve farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarlarını içeren ortam ile kültür şartlarından oluşan yöntemin etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir. Eksplant başına en fazla bitki sayısı (1,15 adet) embriyo ekseni ve hipokotil eksplantlarının 3,0 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 1,0 mg/l GA3 içeren MS ortamında kültüre alındığı yöntemden elde edilmiştir. SCoT analiz sonuçlarına göre ana bitki ile rejenerasyon etkinliği en iyi olan sistemden meydana gelen rejenere bitkiler arasındaki benzerlik katsayısı 0,904 ile 0,991 arasında değişim göstermiştir. Ana bitkiyle en yüksek benzerlik 0,991 ile hipokotil eksplantının 6 nolu rejenerasyon sisteminde (3,0 BAP + 1,0 NAA içeren MS ortamı) kültür edilmesi sonucunda meydana gelen bitkilerde belirlenmiştir.

Sonuç: *Rheum ribes*'te farklı eksplantlardan (embriyo ekseni, hipokotil, kotiledon ve bu eksplantlardan kaynaklı kallus eksplantları) somatik embriyogenesis ve/veya organogenesis yoluyla etkili ve tekrarlanabilir in vitro mikroçoğaltım sistemleri geliştirilmiştir. Dahası, SCoT markör analiz sonuçlarına göre, elde edilen benzerlik değerlerinin mikroçoğaltım açısından kabul edilebilir düzeydedir. Bu sonuçlara göre, araştırma kapsamında geliştirilen rejenerasyon sistemlerinin, tıbbi ve endemik olan bu bitkinin büyük ölçekli yayılımı, germplazm korunması ve genetik transformasyon için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bitki rejenerasyonu, embriyo ekseni, hipokotil, kotiledon, organogenesis, somatik embriyogenesis, SCoT.

Haziran 2023, 133 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

IN VITRO MICROPROPAGATION AND DETERMINATION OF SOMACLONAL VARIATION IN RHUBARB (*Rheum ribes* L.)

Muhammed ALDAIF

Supervisor: Prof. Dr. Murat AYDIN

Purpose: The objective of this study was to develop an efficient and reproducible in vitro micropropagation system through somatic embryogenesis and/or organogenesis from different explants in *Rheum ribes*. Once more in the study, the evaluation of the systems with the highest regeneration efficiency in terms of somaclonal variation was determined using the SCoT marker technique.

Method: Micropropagation experiments were conducted in two stages. In the first stage, embryo axis which was obtained from mature seed as well as cotyledon and hypocotyl which were taken from 7-day-old seedlings formed as a result of germination of mature embryos under in vitro conditions, explants were cultured in 36 different methods which consist medium containing different plant growth regulators and their concentrations as well as culture condition. In the second stage, calli from the embryo axis, cotyledon, and hypocotyl were employed as explants in the medium where the best callus production occurred in the first stage (method 30), and these explants were cultivated in 8 different media. At the end of both stages, the 15 regeneration systems with the best regeneration efficiency were determined and the genetic stability of the regenerated plants formed in these systems was determined by using 20 SCoT primers.

Findings: It was determined that the effects of the explant type and the method, which included different culture conditions as well as a medium containing different plant growth regulators and their concentration, were significant on plant tissue parameters. The maximum number of plants per explant (1.15 units) was obtained from the method in which embryo axis and hypocotyl explants were cultured in MS medium containing 3.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA + 1.0 mg/l GA3. According to the results of the SCoT analysis, the similarity coefficient between the mother plant and the regenerated plants formed from the system with the best regeneration efficiency varied between 0.904 and 0.991. The highest similarity with the mother plant was determined, with 0.991, in the plants formed as a result of culturing the hypocotyl explant in the number 6 regeneration system (MS medium containing 3.0 BAP + 1.0 NAA).

Results: Efficient and reproducible in vitro micropropagation systems have been developed in *Rheum ribes* through somatic embryogenesis and/or organogenesis from different explants (embryo axis, hypocotyl, cotyledon, and callus explants originating from these explants). Moreover, according to the results of the SCoT marker analysis, the similarity values obtained are at an acceptable level in terms of micropropagation. According to these results, it was concluded that the regeneration systems developed within the scope of the research can be used for large-scale propagation, germplasm protection, and genetic transformation of this medicinal and endemic plant.

Keywords: Plant regeneration, embryo axis, hypocotyl, cotyledon, organogenesis, somatic embryogenesis, SCoT.

June 2023, 133 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	14
MATERYAL ve YÖNTEM	25
MATERYAL	25
Bitki materyali.....	25
Kullanılan cihaz ve aletler.....	26
İn vitro Kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar	26
Sterilizasyon işlemlerinde kullanılan kimyasallar	28
Somaklonal varyasyon belirlemede kullanılan materyaller	28
YÖNTEM.....	29
Mikroçoğaltım Çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	29
Somaklonal varyasyon belirlemede kullanılan çözeltiler.....	31
Mikroçoğaltım Aşaması	33
Mikroçoğaltım aşamalarının uygulanışı.....	35
Somaklonal varyasyonun belirlenmesi	40
İstatistiksel Analizler.....	42
ARAŞTIRMA BULGULARI	43
Mikroçoğaltım.....	43
Birinci aşama.....	43
İkinci aşama	73
Somaklonal Varyasyon	82
TARTIŞMA.....	87
SONUÇLAR ve ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	120

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Bazı <i>Rheum</i> Türlerinde Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmalarında Kullanılan Eksplant ve Ortam İçerikleri.....	11
Tablo 2. Araştırmada Kullanılan Alet ve Cihazlar	26
Tablo 3. MS Temel Besi Ortamının Kimyasal İçeriği ve Miktarları.....	27
Tablo 4. MS Ortamına İlave Olarak Kullanılan Kimyasal ve Miktarları	27
Tablo 5. DNA İzolasyonu, PCR ve Elektroforez İşlemlerinde Kullanılan Kimyasallar	28
Tablo 6. Somaklonal Varyasyon Belirlenmede Kullanılan SCoT Primerleri.....	29
Tablo 7. BBD'lerin (1 mg/ml) Solüsyonlarının Hazırlanmasında Çözücü ve Seyreltici Olarak Kullanılan Kimyasallar İle Saklama Sıcaklıkları	30
Tablo 8. Çimlendirme Denemelerinde Kullanılan Besi Ortamları	35
Tablo 9. 1. Aşamada Kullanılan Yöntemlerin Ortam İçeriği ve Kültür Şartları.....	37
Tablo 10. Mikroçoğaltımın 2.Aşamasında Kullanılan Ortamlardaki BBD Kombinasyonu....	38
Tablo 11. SCoT PCR Bileşenleri, Miktarları ve PCR Şartları.....	41
Tablo 12. Tohum ve Embriyo Eksplantlarının Farklı Ortamlara Göre Çimlenme Oranı (%) ve Ortalama Çimlenme Süreleri (gün) ¹	44
Tablo 13. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre KOO (%) ve Renkleri ¹	46
Tablo 14. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre DOO (%) ¹	51
Tablo 15. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İOO (%) ¹	54
Tablo 16. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre DSEO (%) ¹	57
Tablo 17. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İSEO (%) ¹	60
Tablo 18. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre DOBS (adet/eksplant) ¹	63
Tablo 19. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İOBS (adet/eksplant) ¹	65
Tablo 20. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre DSEBS (adet/eksplant) ¹	67
Tablo 21. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İSEBS (adet/eksplant) ¹	69
Tablo 22. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre EBBS (adet/eksplant) ¹	71
Tablo 23. Eksplant Tiplerinin Ortamlara Göre İOO (%) ¹	74
Tablo 24. Eksplant Tiplerinin Ortamlara Göre İSEO (%) ¹	76
Tablo 25. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İOBS (adet/eksplant) ¹	78
Tablo 26. Eksplant Tiplerinin Ortamlara Göre İSEBS (adet/eksplant) ¹	79
Tablo 27. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre EBBS (adet/eksplant) ¹	80

Tablo 28. Somaklonal Varyasyon Kullanılan Yöntem	82
Tablo 29. Çalışmada Kullanılan SCoT Primerlerinin Bant Bilgileri ve Polimorfizm Oranı ..	83
Tablo 30. Jaccard Benzerlik Katsayısı Kullanılarak 20 SCoT Primeri ile Belirlenen 15 Yöntem/Ortam ve Kontrol Arasındaki Genetik Benzerlik Değerleri	84



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Işkın <i>Rheum ribes</i> ve yakın akraba <i>Rheum telianum</i> türlerinin Türkiye’deki yayılışı..	3
Şekil 2. Işkın (<i>Rheum ribes</i>)’in genel görünümü.	4
Şekil 3. Bitki rejenerasyon yolu	8
Şekil 4. Bitki büyüme düzenleyicilerinin ve brassinositeroidlerin temel yapıları	9
Şekil 5. İki bitki büyüme düzenleyicisi olan oksin ve sitokinin farklı oranlarının etkileri.	10
Şekil 6. SCoT PCR amplifikasyonunun ilkesi.	13
Şekil 7. Işkın tohumların toplanması.....	25
Şekil 8. Tohumların hazırlanması	33
Şekil 9. Tohumların sterilizasyonu.....	34
Şekil 10. İn vitro çimlendirmede kullanılan tohum ve embriyo eksplantları.....	35
Şekil 11. Birinci aşamada kullanılan eksplantlar.	36
Şekil 12. Eksplantların kültür edilmesi	36
Şekil 13. PCR işleminin hazırlanışı ve uygulanması.	41
Şekil 14. Jel Elektroforez işleminin uygulanması.	42
Şekil 15. Tohum ve embriyo eksplantlarında in vitro çimlenme.	45
Şekil 16. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen kallusların görünümü.....	48
Şekil 17. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen direkt organogenesis oluşumu.	52
Şekil 18. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen indirekt organogenesis oluşumu ...	55
Şekil 19. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen direkt somatik embriyogenesis oluşumu..	58
Şekil 20. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen indirekt somatik embriyogenesis oluşumu	61
Şekil 21. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen bitkilerin görünümü.....	72
Şekil 22. Farklı eksplant ve ortamlarda indirekt organogenesis oluşumu.....	75
Şekil 23. Farklı eksplant ve ortamlarda indirekt somatik embriyogenesis oluşumu.....	77
Şekil 24. Farklı eksplant ve ortamlarda meydana gelen bitkilerin görünümü.....	81
Şekil 25. Ana bitki (1) ile rejenerasyon sistemleri arasındaki genetik ilişki dendrogramı.	84
Şekil 26. Bazı SCoT primerlerinden elde edilen jel elektroforez görüntüleri.....	85

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir)
UV	Ultraviyole
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
µmo	Mikromol
µm	Mikrometre
g	Gram
mg/l	Miligram/litre
KOO	Kallus oluşum oranı
DOO	Direkt organogenesis oluşum oranı
İOO	İndirekt organogenesis oluşum oranı
DSEO	Direkt somatik embriyogenesis oluşum oranı
İSEO	İndirekt somatik embriyogenesis oluşum oranı
DOBS	Direkt organogenesis kaynaklı bitki sayısı
İOBS	İndirekt organogenesis kaynaklı bitki sayısı
DSEBS	Direkt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki sayısı
İSEBS	İndirekt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki sayısı
EBBS	Eksplant başına rejenere bitki sayısı
DNA	Deoksiribonükleik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol-3-Bütirik Asit
BAP	6-Benzilaminopurin
KIN	Kinetin
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit
NAA	1-Naftaleneasetik asit

mT	meta-Topolin
TDZ	Thidiazuron
GA3	Giberellik asit
MS	Murashige and Skoog
NaOCl	Sodyum hipoklorit
MES	2-(N-Morfolino) etansülfonik asit
pH	Asitlik derecesi
SE	Somatik embriyogenesis
BBD	Bitki büyüme düzenleyiciler
PVP	Polivinilpirolidon
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
CTAB	Etil Three Metil Amonyum Bromid
dNTP	Deoksinükleotid Tri Fosfat
EDTA	Etilendiamin-Tetra Asetik Asit Di Sodyum Tuzu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Taq	Taq polimeraz enzimi
TBE	Tris/Borate/EDTA
TE	Tris EDTA (buffer) DNA Deoksiribonükleik Asit
Tris	Tris(hidroksimetil) aminometan
SCoT	Start Codon Targeted (Başlangıç kodonu hedefli)
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi
ISSR	(Inter Simple Sequence Repeats) Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
SSR	(Simple Sequence Repeat) Basit Dizi Tekrarları
TB	Toplam bant sayısı
MB	Monomorfik bantları
PB	Polimorfik bantları
PO	Polimorfizm oranı
PIC	Polymorphism Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
D	(Discriminating power) Ayırt etme gücü
R	(Resolving power) Çözme gücü
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

GİRİŞ

İnsanın temel ihtiyaçlarının kaynağı olan bitkiler gıda, tarım, ilaç, kozmetik, endüstri vb. alanlarda kullanılmaktadır (Pandith and Khan 2022). Özellikle bitkisel kökenli ilaçlara yönelik araştırmalardaki ilerlemeler ve deneyimler sonucunda, tıbbi ve aromatik bitkiler hastalıkların tedavisinde sağlık alanında geniş bir yelpazeye yayılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmalarına göre tıbbi amaçla kullanılan bitki sayısı yaklaşık 20.000'dir ve bu bitkilerin %20'si bitkisel ilaç olarak kullanılırken sadece %10'unun ticareti yapılmaktadır (Özkan and Deniz 2023). Yine, Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre, Asya ve Afrika ülkelerinin yaklaşık %75'i hala çeşitli hastalıkların tedavisi için geleneksel/alternatif tıp yöntemlerine güvenmektedir (Wani *et al.* 2013; Pandith *et al.* 2014). Aynı zamanda dünya genelinde doğal ürünlerin kullanımına yönelik talebin giderek artması, tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımını her geçen gün dahada fazla arttırmaktadır (Cadar *et al.* 2021).

Polygonaceae familyası birçok tıbbi ve aromatik bitki türünü bünyesinde bulundurmaktadır. Polygonaceae familyası çok çeşitli bitkilerin yer aldığı çift çenekli ve kapalı tohumlu bitki grubundadır (Sanchez and Kron 2009). Ayrıca Polygonaceae familyası küresel ölçekte 48 cins ve 1200 tür içermektedir (Christenhusz and Byng 2016). Polygonaceae familyasına ait çok yıllık otsu bitki olan ravent (*Rheum*) yabani bir bitki olup, yüzyıllar boyunca belirli toplumlarda tıbbi açıdan büyük öneme sahip bitki türlerinden biri olmuştur (Pandith and Khan 2022). *Rheum* cinsinin tüm türlerinin temel kromozom sayısını $x = 11$ olduğu bildirilmiştir (Darlington and Wylie 1956; Fedorov 1969). Bilinen *Rheum* türlerinin yaklaşık %40'ının tetraploid, %48'inin diploid ve kalan %12'sinin ise hem diploid hem de tetraploid olduğu bilinmektedir (Ruirui *et al.* 2010; Saggoo and Farooq 2011).

Rheum cinsi yaklaşık 60 türden oluşsa da (Sun *et al.* 2012), 'The Plant List' web sayfasında mevcut kayıtlara göre sadece 44 türün ismi kabul edilmiştir (Theplantlist 2023). Dünyada *Rheum* cinsi (ravent), başlıca Qinghai-Tibet Platosu ve bitişik alanlarındaki dağlık bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır (Wan *et al.* 2011). Çeşitli morfolojiye ve önemli endemizme sahip olan bu bölgeler, yaklaşık 60 bitki türünü bünyesinde bulunduran ve 500 ile 5400 metre yükseklikteki sıcak, alpin ve sub-alpin bölgelerde kayalık, gözenekli ve humus açısından zengin topraklarda dağılım gösteren birçok cinse hem köken hem de çeşitlilik merkezleri oluşturmaktadır (Wu *et al.* 2003; Wan *et al.* 2011).

Rheum cinsi Asya'ya (Afganistan, Ermenistan, Azerbaycan, Bhutan, Çin, Hindistan, İran, Irak, Kazakistan, Lübnan, Moğolistan, Myanmar, Nepal, Pakistan, Suriye, Türkiye) özgü bir bitki olup, dağılım merkezi Asya'nın orta ve kuzey bölgeleridir (Pandith and Khan 2022). Özellikle, Hindistan'ın alt kıtasında *Rheum* cinsinin sekiz türü yer alırken bu türlerin altısı Keşmir bölgesinde dağılım göstermektedir (Srivastava, 2014). Diğer taraftan *Rheum* cinsi Avrupa ülkelerinde de yaygındır (Wu *et al.* 2003). Ancak bu bölgelerin dışında farklı bölgelerde de yetişmektedir (Libert and Englund 1989). Genel olarak, yüksek tıbbi değere sahip ravent türleri Batı Çin'in yüksek platolarında, Tibet'in kuzeyinde ve Moğolistan'ın güneyinde yer alırken, az tıbbi etkilere sahip türler ise Bhutan, Kuzey Hindistan, Himalaya, Sibirya, Asya ve Avrupa'da yer almaktadır (Foust 2014).

Türkiye'deki *Rheum* cinsi üzerine ilk detaylı çalışma Cullen (1967) tarafından yapılmış ve sadece bir türün (*Rheum ribes*) Türkiye'de bulunduğunu bildirmiştir. Ancak daha sonra Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Florası'nda yapılan çalışmalar sonucunda, Adıyaman şehir merkezine yaklaşık 20 km uzaklığında bulunan Kayatepe köyünde farklı bir *Rheum* popülasyonu bulunmuştur. *Rheum ribes* ile karşılaştırıldığında türün özellikleri bakımından farklılık göstermesi sonucunda yeni tür *Rheum telianum* olarak tanımlanmıştır. Bu yeni tür Türkiye'de tel ışkını olarak adlandırılmıştır (İlçim and Karahan 2020).

Rheum cinsinin İngilizce adı Rhubarb Türkçe adı ise Ravent'tir. Bitki, Türkiye'de "Işkın, Işgın, Eşgin, Uşkun, Uşgun, Uçgun, Revas, Rives ve yayla muzı" olarak da bilinmektedir. Işkın, Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yetişen tek yerli *Rheum* türü olarak kabul edilmiştir. Bu yabancı ravent türü Sivas, Kars, Erzincan, Tunceli, Elâzığ, Muş, Ağrı, Iğdır, Bitlis, Erzurum, Van, Bingöl, Hatay, Malatya, Adıyaman, Kahramanmaraş ve Hakkâri illerinde dağılım göstermektedir (Tosun and Kızılay 2003; Bulut *et al.* 2016; Erbay and Sarı 2018; Üstün *et al.* 2018; Taşkın and Bulut 2019) (Şekil 1).



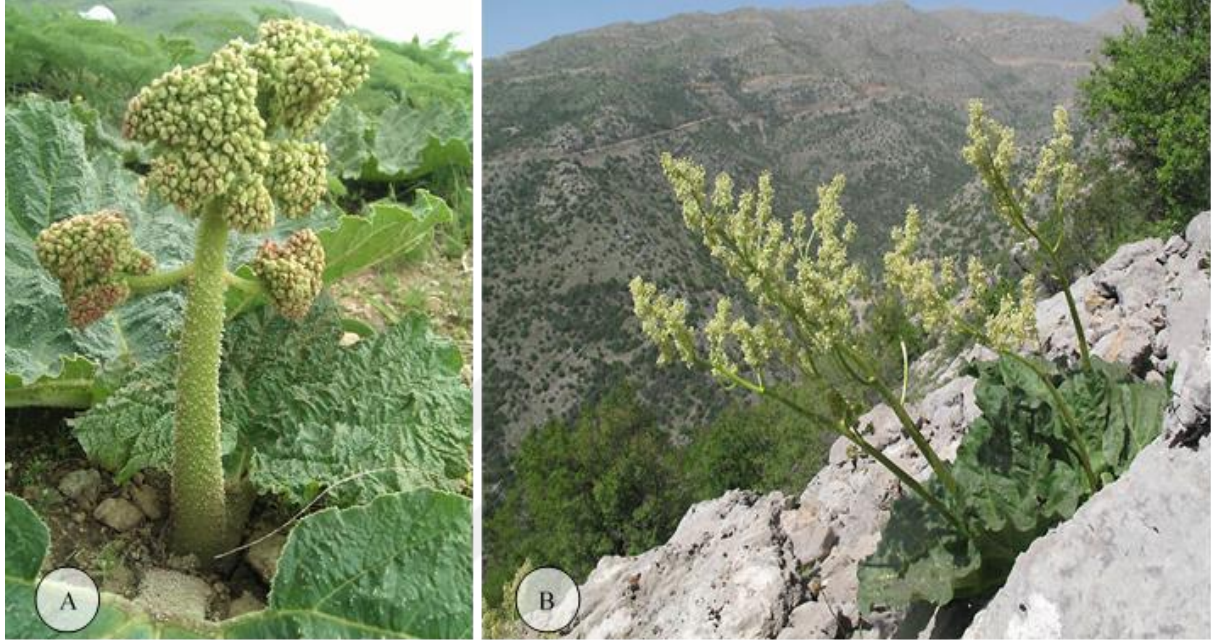
Şekil 1. Işkın (*Rheum ribes*) ve yakın akraba (*Rheum telianum*) türlerinin Türkiye’deki yayılışı

Işkın (*Rheum ribes* L.), Polygonaceae familyasına ait olan tıbbi endemik bir bitkidir. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri’nde Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında 1000 – 4000 m yüksekliklerde yetişen tıbbi endemik bir bitkidir. Bu bitki genellikle sarımsı beyaz çiçek açan, 40–150 cm boylarında, çok yıllık, kazık köklü, kısa ve kalın rizomlar taşıyan otsu yabani bir türdür (Andiç *et al.* 2009). Ayrıca bitkinin uzun ve etli saplara sahip büyük yaprakları ve bileşik çiçek salkımları mevcuttur. Aynı zamanda, tohumları 9–15 mm boyunda iken sürgünleri 40 cm yüksekliğe kadar büyüyeabilen ve üstte yapraksız, tabanda ise yapraklıdır (Şekil 2) (Baytop 1984). Ravent, kabukları gövdeden uzaklaştırılarak çiğ olarak yenen ve yendiğin zaman ekşi tat (pH: 3.56) veren ve yeşil renge sahip bir bitkidir (Cullen 1967; Baytop 1997; Mohammed *et al.* 2018; Özyurt vd. 2021).

Türkiye’deki ışkın, karasal iklim özelliklerine sahip, genel olarak toprağı sığ veya orta derinlikte olan çok taşlı bölgelerde doğal olarak yetişmektedir (Baytop 1984). Bu bölgelerde yıllık ortalama yağış miktarı ortalama 400 kg/m²’dir ve bu yağışların yaklaşık %40’ı Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında düşmektedir. Yine bu bölgelerde ortalama en yüksek sıcaklık 37°C iken en düşük ortalama sıcaklık -37°C’dir. Eylül ayında erken donlar, Mayıs ayı sonunda ise geç donlar gözlenmektedir (Önal *et al.* 2019; MGM 2023).

Işkın türleri genelde, %0,636 kül, %0,206 nitrojen, %1,292 ham protein, %1,798 ham lif, %1,760 total şeker, %1,643 invert şeker, %0,112 sükroz, %0,967 asit, 5,196 mg/100g C vitamini, 3,752 µg/g Fe, 1,132 µg/g Zn, 0,016 µg/g Pb, 0,501 µg/g Cu, 0,423 µg/g içermektedir (Andiç *et al.* 2009; Kızıll ve Tonçer 2014). Aynı zamanda, A, B, C ve E vitaminleri, alüminyum, kalsiyum, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, fosfor, çinko, bakır ve selenyum gibi

mineraller açısından zengin bir kaynaktır ve krisofanol, fizyon, rehin, rutin, aloe-emodin, fizyon-8-o-glukozit, aloe-emodin-8-O-glukozit, sennozid a, rhaponticin ve flavonoidler dahil olmak üzere kimyasal bileşenleri bulunmaktadır (Munzuroğlu *et al.* 2000; Sayyah *et al.* 2009; Naemi *et al.* 2014). Diğer taraftan ışkın, tanen bakımından oldukça zengindir (Baytop 1999; Zeidali *et al.* 2021).



Şekil 2. Işkın (*Rheum ribes*)’in genel görünümü (Babos 2011; POWO 2023).

Malik *et al.* (2010), tarafından yapılan bir çalışmada, 6 aylık ravent köklerinde iki bileşik (krisofanol glikozit ve emodin glikozit), 9-12 aylık bitki köklerinde ise beş bileşiğin (krisofanol glikozit, emodin glikozit, krisofanol, emodin ve fizyon) belirgin bir şekilde mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Bunun temel nedeni bu bileşiklerin dokudaki miktarının mekansal ve zamansal düzeyde farklılıklar göstermesidir (Pandith *et al.* 2014). Aynı zamanda bu bileşiklerin yoğunluğu doku tipine göre de farklılık göstermektedir. Bu teoriyi desteklemek adına Rokaya *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada önemli flavonoid/antrokinon bileşenlerinde erken hasat edilen raventin rizomu ve yapraklarının daha az metabolit içerdiği sonucuna varmıştır, bu nedenle bitkisel ilaçlarda etkinliklerini kaybettiklerini belirtmişlerdir. Diğer taraftan yapılan farklı çalışmalarda Rheum’un içerdiği kimyasal bileşik çeşitliliği bakımından oldukça zengin olduğu belirlenmiştir. Bu kimyasal bileşikler (antrokinonlar, antosiyaninler, stilbenler, flavonoidler, diantironlar, antiraglikozitler, steroller, polifenoller, uçucu yağlar, organik asitler ve vitaminler) izole edilmiş ve yapıları birçok çalışma sonucunda aydınlatılmıştır (Agarwal *et al.* 2001; Chengzhong *et al.* 2005; Ye *et al.* 2007; Han *et al.* 2008; Rokaya *et al.* 2012; Bilal *et al.* 2013; Pandith *et al.* 2014; Foust, 2014; Uyar *et al.* 2014; Xiang *et al.* 2020; Pandith and Khan 2022).

Birden fazla ravent türü, birçok ülkede geleneksel tıp sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Zahedi *et al.* 2015; Khiveh *et al.* 2017 Roghani-Shahraki *et al.* 2021). Bu bitkinin türleri halk arasında antidiyabetik, antispazmodik, antibakteriyel, anti-inflamatuvar, anti-Alzheimer antioksidan, antikanser ve anti tümör olarak bilinmektedir (Baytop, 1999; Özbek vd. 2002; Kuo *et al.* 2002; Tosun and Kızılay 2003; Krenn *et al.* 2003; Bonjar, 2004; Choi *et al.* 2005; Bazzaz *et al.* 2005; Alaaddin *et al.* 2007; Mohammed and Karim, 2010; Rajkumar *et al.* 2010; Abdulla *et al.* 2014; Keser *et al.* 2019; Yuan *et al.* 2020). Aynı zamanda, kan basıncını düzenleyici, sinir, karaciğer, böbrek, mide hastalıkları üzerinde koruyucu etkileri ile çiçek ve kızamık gibi salgın hastalıklar üzerine önemli etkiye sahiptir (Baytop 1999; Özbek *et al.* 2002; Abu-Irmaileh and Afifi 2003; Sayyah *et al.* 2009; Abdul Wahed *et al.* 2018). Bu etkileri ile ravent, farklı bölgelerde yüzyıllar boyunca farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmış uzun bir geçmişe sahiptir. Yapılan çalışmalar ile *Rheum* cinsi yüksek metabolit içeriğe sahip olduğu bulunmuştur. Özellikle bitkinin içerdiği antrokinonlar, stilbenoidler ve flavonoidler gibi metabolitlerin ve/veya türevlerinin çeşitli hastalıkların tedavisi için farmakolojik etkililiğinin yüksek olduğu bilimsel araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur (Krafczyk *et al.* 2008; Pandith *et al.* 2018).

Gecibesler *et al.* (2021), *Rheum ribes* bitkisinden sekonder metabolitlerin izolasyonunu ve sentezlenen yeni yarı-sentetik antrokinonların biyolojik aktivitesini inceleyen bir çalışma gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar, bitkinin etanolik özütünü kullanarak izolasyon işlemleri yapmış ve elde edilen bileşiklerin yapısını spektroskopik yöntemlerle belirlemişlerdir. *Rheum* bitkisinden etanolik özüt kullanılarak izole edilen bileşikler arasında “emodin, physcion, chrysophanol, rhein, aloe-emodin and sennoside A” gibi antrakinon türevleri ve flavonoid bileşikler yer almaktadır. Ayrıca, sentezlenen yeni yarı-sentetik antrakinon bileşiklerinin de yapıları doğrulanmıştır. Bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri, antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör etkinliklerini içeren bir dizi in vitro deney kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, *Rheum ribes* bitkisinden izole edilen bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, ayrıca sentezlenen yarı-sentetik antrokinon bileşiklerinin antitümör aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Halk tarafından ışık, yetiştiği bölgede gövde kısmı, dış kabuğu soyularak tüketilmektedir. Bitlis’te turşusu yapılarak, Hakkâri’de uçkunlu kek ve uçkunlu dondurma olarak, Tunceli’nin bazı bölgelerinde ateşte pişirilerek, Erzurum ve Elazığ’da ise sebze olarak tüketilmektedir (Güvenç ve Kaya 1996; Avcı 2005). Diğer taraftan yetiştiği bölge içinde besin olarak tüketilmekle beraber tıbbi açıdan kullanımı da oldukça yaygındır (Korkmaz and Karakuş 2015, Mohtashami *et al.* 2021; Mahroozade *et al.* 2021).

Türkiye genetik çeşitlilik ve endemik bitki türleri bakımından zengin bir ülke olmasının yanı sıra Türkiye tıbbi bitkilerin ticareti bakımından önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Türkiye’de, genel olarak doğadan toplanan ve iç ve dış ticareti yapılan 347 tıbbi bitki türü bulunmaktadır ve bunların hemen hemen %30’unun dış ticareti yapılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011; UNComtrade, 2017). Bunun ışığında tıbbi bitkilerin ve bitkisel ilaçların üretimi ve tüketimi ile uluslararası ticareti oldukça önemli bir şekilde artmaktadır. Bu sebepten dolayı tıbbi bitkilere olan talep son zamanlarda oldukça artmaktadır. Bunların önemli bir kısmı doğadan toplanmaktadır (Bayramoğlu vd. 2009).

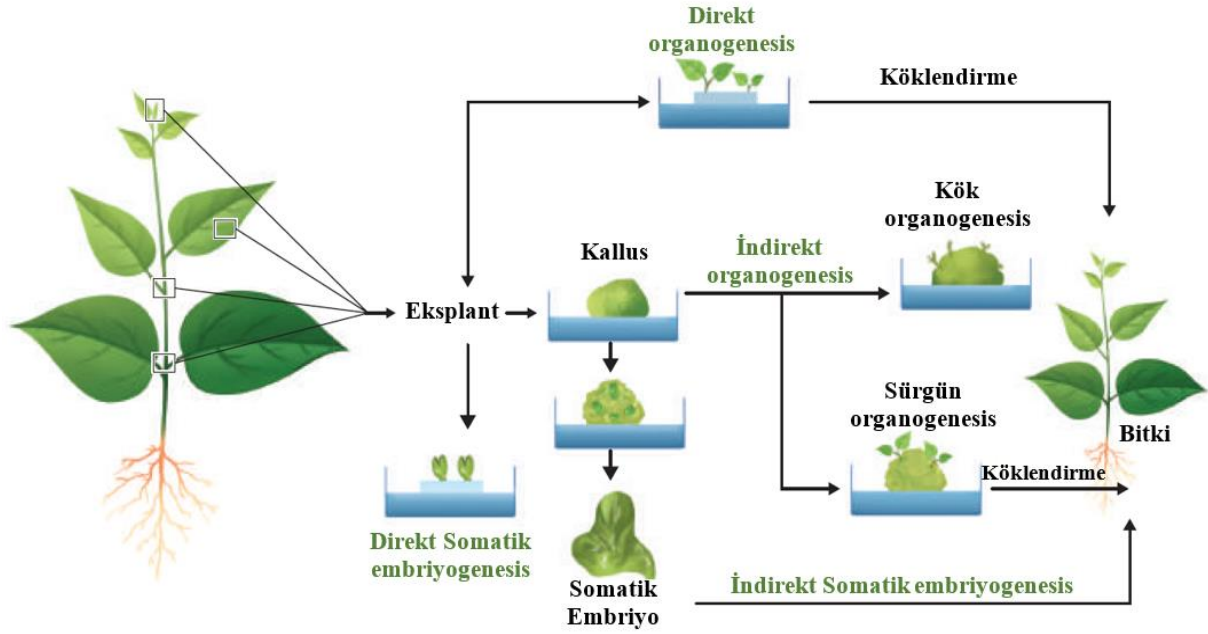
Bu bitkilerin büyüme ortamlarında meydana gelen streslerin yanı sıra insanlar tarafından bilinçsizce toplanmaları bu bitkilerin nesillerinin tükenme riskini arttırmaktadır. Bununla birlikte, bitkisel ilaçların bir hammadde kaynağı olarak doğadan toplanması, genetik çeşitliliğin kaybolmasına ve habitat tahribatına neden olmaktadır. Antik çağlardan beri farklı rahatsızlıkları iyileştirmeye yönelik bitkisel tedavilere rağmen, bugün bile çok sayıda tıbbi bitki yabani yaşam alanlarından toplanmaktadır (Canter *et al.* 2005). Tıbbi bitkilerin doğadan bilinçsizce toplanması, tohumunun oluşmasını engellemekte ve bir sonraki dönemde ürün kaybına sebep olmaktadır. Bu durum ilerleyen yıllarda tıbbi bitkilerde ciddi kayıplara yol açabilmektedir. Bu sorun tıbbi bitkilerin kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu sınırlamanın önüne geçebilmek için etkili *in vitro* çoğaltma tekniğine ihtiyaç duyulmaktadır (Arvas 2017). Bu nedenle doku kültürü yöntemleri tıbbi bitkilerin çoğaltımı için alternatif bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem gerek nesli tükenmekte olan ve gerekse yetiştiriciliği oldukça zor olan önemli tıbbi ve aromatik bitkilerin *in vitro* çoğaltımını mümkün kılmaktadır (Coelho *et al.* 2020).

Bitki biyoteknolojisi alanlarında yeni yollar açan doku kültürü teknikleri ile tüm bir bitkiden alınan bir parça (eksplant) ile kısa süre içinde ve aseptik şartlarda bir bitkinin çoğaltımı mümkündür (Babaoğlu vd. 2001; Dağla 2012). Genel olarak bitki doku kültürü bitki ıslahında (*in vitro* seleksiyon, *in vitro* melezleme, *in vitro* döllenme, *in vitro* germplazm muhafazası, gen transferi ve somaklonal varyasyon) ve bitki ıslahı dışında (mikroçoğaltım, meristem kültürü, sentetik tohum üretimi ve kimeralar, sekonder metabolit üretimi) uygulama alanlarına sahiptir (Tripathi and Tripathi 2003; Aydın *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2019a).

Bitki doku kültürünün uygulama alanlarından biri olan mikroçoğaltım tekniği ile hızlı ve kısa sürede birçok bitki elde edilebilmektedir (Lemma *et al.* 2020; Zhou ve Wu 2006). Somatik embriyogenesis ve organogenesis mikroçoğaltım tekniğinde sıklıkla kullanılan rejenerasyon sistemleridir (Moyo *et al.* 2009). Somatik embriyogenesis, somatik dokulardan üretilen, bağımsız vasküler sisteme sahip olup kök ve sürgün aksini içeren iki kutuplu bir

yapının oluşmasına yol açan eşeysiz bir üreme sürecidir (Babaoğlu vd. 2001). Aynı zamanda, yaprak, kök veya çiçeğin kültürlenmiş eksplanttan somatik bir embriyonun geliştirildiği bir süreçtir. Somatik embriyogenesis, direkt somatik embriyogenesis ve indirekt somatik embriyogenesis olmak üzere iki süreçle gerçekleşmektedir. Direkt somatik embriyogenesis, embriyolar doğrudan tek hücrelerden veya bir ara kallus fazı olmadan bir hücre grubundan oluşmaktadır. İndirekt somatik embriyogenesis ise eksplanttan kallusun üretildiği ve daha sonra embriyoların oluştuğu bir süreçtir (Razdan 2002; Asghar *et al.* 2023). Somatik embriyogenik oluşum safhalarında embriyo yapıları monokotiledon ve dikotiledon bitkilere göre farklılık göstermektedir. Dikotiledon bitkilerde embriyo gelişimi globular, kalp, torpido, kotiledon yapıları şeklinde meydana gelirken, monokotiledon bitkilerde ise globular, skutellar ve koleoptilar embriyo yapıları şeklindedir (Şekil 3) (Babaoğlu vd. 2001; Elhiti *et al.* 2013). Organogenesis, bağımlı vasküler sisteme sahip, kök veya sürgün aksini içeren yapının oluşmasına yol açan süreçleri kapsamaktadır. Aynı zamanda bir organın bir eksplanttan (kök, yaprak veya çiçek) geliştirildiği bir süreç olarak da bilinmektedir (Razdan 2002; Smith, 2012). Organogenesis, direkt organogenesis ve indirekt organogenesis olmak üzere iki kısma ayrılır. Direkt organogenesis, bir organın (sürgünler veya kökler) kallus fazı oluşmadan doğrudan dokudan geliştirilmesidir. İndirekt organogenesis ise kallus fazından bir organ geliştirilmektedir (Şekil 3) (Babaoğlu vd. 2001). Bu mikroçoğaltım teknikleri kullanılarak, *R. palmatum* (Ishimaru *et al.* 1990; Cui *et al.* 2008), *R. ribes* (Farzami Sepehr and Ghorbanli 2005), *R. rhabarbarum* (Lepse 2007; Rayirath *et al.* 2011; Clapa *et al.* 2020), *R. officinale* (Ji-yong 2010), *R. webbianum* (Rashid *et al.* 2014), *R. moorcroftianum* (Maithani 2015), *R. coreanum* (Mun and Mun 2016), *R. emodi* (Tabin *et al.* 2018; Singh and Chaturvedi 2022) ve *R. spiciforme* (Khan *et al.* 2022) türlerinde daha önce birçok başarılı çalışma yapılmıştır.

Mikroçoğaltım çalışmalarının başarısı temel olarak eksplant, genotip ve besin ortamının içeriği gibi faktörlere bağlıdır. Özellikle eksplantın yaşı, tipi ve konumu hem somatik embriyogenesis hem de organogenesis için oldukça önemlidir (Shahzad *et al.* 2017; Desai *et al.* 2022). Sürgün uçları, nodal tomurcuklar ve kök uçları yaygın olarak kullanılan eksplant kaynaklarıdır. Büyük eksplantlar kontaminasyon şansını artırabilir ve meristemler gibi küçük eksplantlar bazen daha az büyüme gösterebilir (Lemma *et al.* 2020). *Rheum* cinslerinde yapılan doku kültürü çalışmalarında boğum, yaprak, embriyo eksen, hipokotil, kotiledon ve sürgün ucu gibi farklı eksplantları kullanılmıştır (Lassus and Voipio 1994; Farzami Sepehr and Ghorbanli 2002; Malik *et al.* 2010; Tuncer ve Günsan 2017; Clapa *et al.* 2020; Wojtania and Mieszcakowska-Frać 2021; Khan *et al.* 2022; Singh and Chaturvedi 2022) (Tablo 1).

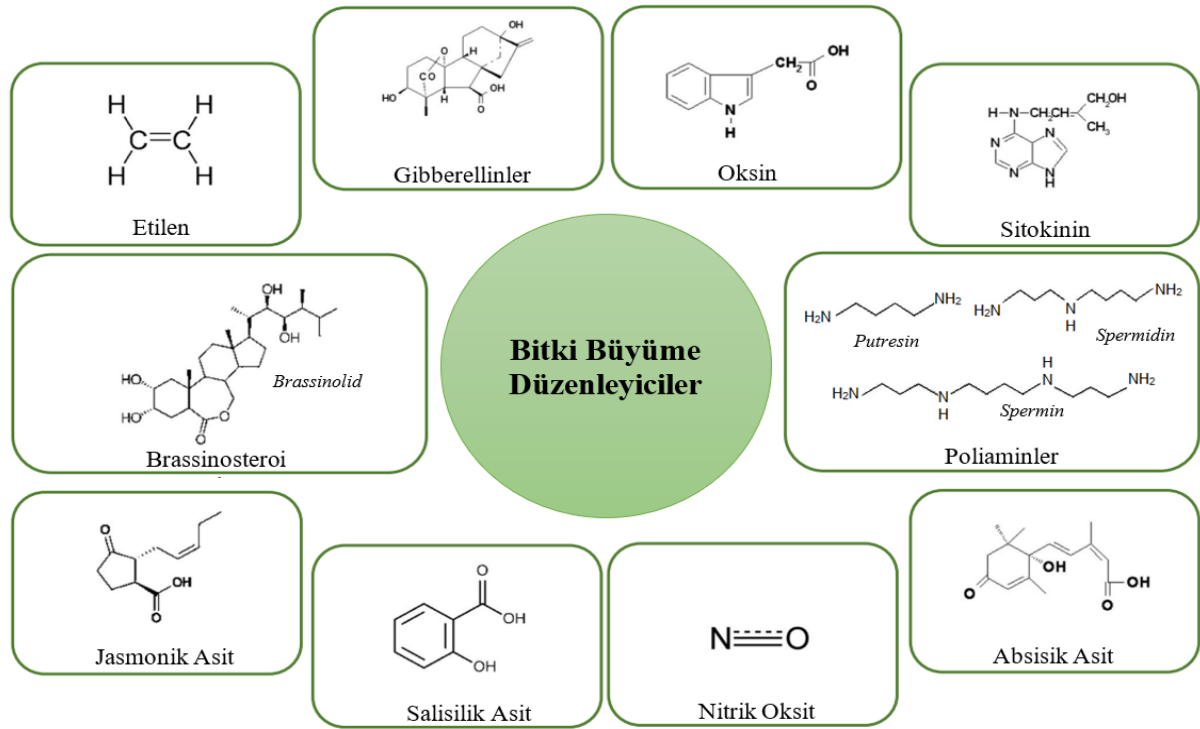


Şekil 3. Bitki rejenerasyon yolu (Anonim 2023)

Eksplantların sterilizasyonu, başarılı in vitro mikroçoğaltım için en önemli adımlardan biridir. Kalsiyum hipoklorit, sodyum hipoklorit, etanol, civa klorür, hidrojen peroksit veya gümüş nitrat gibi maddeler sterilizasyon için *Rheum* cinslerinde bitki doku kültürü çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Matkowski 2008; Mihaljevic *et al.* 2013).

Mikroçoğaltım çalışmalarının başarısını etkileyen bir diğer önemli etken ise kültür ortamının içeriğidir. Kültür ortamı, makro ve mikro elementler, büyüme düzenleyicileri (oksin, sitokinin, giberellin, etilen vb.), vitaminler, organik bileşenler, besi ortamı katılaştırıcı maddeler (agar, fitajel vb.) ve şeker içermektedir (Sudheer *et al.* 2022). *Rheum* türlerinde yapılan in vitro mikroçoğaltım çalışmalarında temel besi ortamı olarak MS ortamı kullanılmıştır (Kozak and Saáata 2011; Wang *et al.* 2011; Tabin *et al.* 2014; Maithani 2015; Mun and Mun 2016; Tuncer ve Günsan 2017; Tabin *et al.* 2018; Clapa *et al.* 2020; Khan *et al.* 2022; Singh and Chaturvedi 2022)

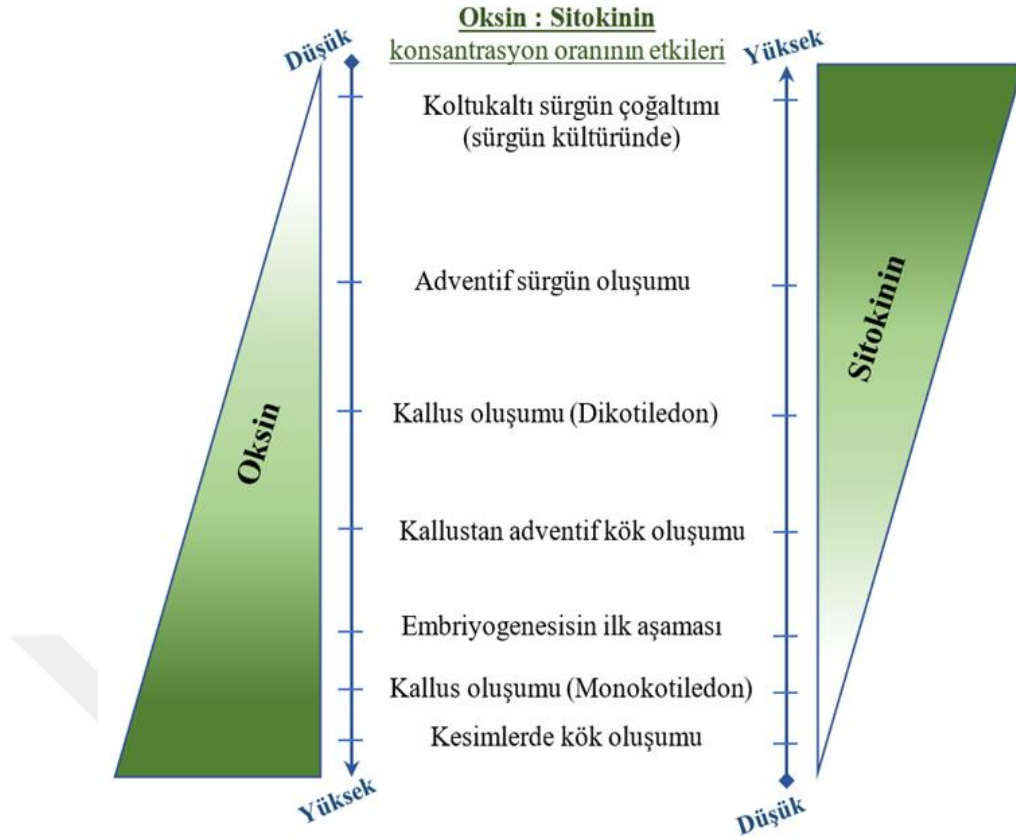
Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD), tüm bu bileşenler arasında önemli rol oynamaktadır. BBD'ler genel olarak oksinler (indol-3-asetik asit (IAA), 2,4-diklorofenoksiasetik (2,4-D), naftalen asetik asit (NAA), indol-3-bütirik asit (IBA)), sitokininler (izopentenil adenin (IPA veya Zi-p), benzil amino purin (BAP), 4-hidroksil-3-metil-trans-2-butenilaminopurin (zeatin), furfurylaminopurin (kinetin)), giberellinler (giberellik asit (GA3)), etilen, absisik asit (ABA), jasmonik asit vb. gruplardan oluşmaktadır (Şekil 4) (Rout *et al.* 2000; Rout and Das, 2004; Ziv and Naor, 2006; Pandey *et al.* 2011; Gana 2011; Keerthiga *et al.* 2012; Victório *et al.* 2012).



Şekil 4. Bitki büyüme düzenleyicilerinin ve brassinositeroidlerin temel yapıları (Asgher *et al.* 2015)

BBD'leri genel olarak, organ oluşumunu, hücre bölünmesini, doku farklılaşmasını, sürgün ve kök oluşumunu teşvik ederler. Aynı zamanda, sekonder metabolitlerin fazla miktarlarda elde edilmesine olanak sağlamaktadırlar (Rout *et al.* 2000; Malik *et al.* 2010; AbouZid, 2014). Oksin ve sitokininler, bitki doku kültüründe hücre büyümesi ve farklılaşması, kallus oluşumu, kallustan adventif sürgün ve kök oluşumu, sürgün ve kök çoğaltımı gibi süreçlerde önemli rollere sahiptirler (Şekil 5).

Bitki büyüme düzenleyicileri, konsantrasyona bağlı olarak bitki doku ve hücre kültürlerini etkilemektedirler (Su *et al.* 2011). Oksin ve sitokinin uygun kombinasyonu ve konsantrasyonu kullanılarak, ilk kez tütün kallus kültürlerinde gösterilen kallus adı verilen farklılaşmamış hücre kitlesinden sürgün, kök ve embriyolar üretilmiştir (Skoog ve Miller, 1957).



Şekil 5. İki bitki büyüme düzenleyicisi olan oksin ve sitokinin farklı oranlarının etkileri (George *et al.* 2008).

Rheum türlerinde yapılan çalışmalarda farklı tipte oksin ve/veya sitokinin kombinasyonları kullanılmıştır. Örneğin, Khan *et al.* (2022), *Rheum spiciforme* türünde yaptığı çalışmalarında kallus oluşumu için BAP ve 2,4-D kombinasyonunu kullanırken, sürgün oluşumu için BAP ve NAA kombinasyonunu kullanılmışlardır. Diğer taraftan, *R. rhabarbarum* ve *R. rhaponticum* türlerinden sürgün oluşumu için sadece BAP, KIN ve meta-Topolin (mT) sitokininleri kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 1) (Kozak and Saáata 2011; Clapa *et al.* 2020). Ayrıca bazı çalışmalarda kallus oluşumu için sadece NAA ve 2,4-D oksinleri kullanılmıştır (Maithani 2015; Mun and Mun 2016).

Rejenere olan bitkilerin doğal çevre koşullarında toprağa transfer edilme işlemi aklimatizasyon (alıştırma) olarak tanımlanmaktadır (Hartmann *et al.* 2002). Bu işlemde ilk olarak, toprak köklü bitkiler nihai ortamlarına transfer edilmeden önce kontrollü bir ortam odasında veya serada iklimlendirilmelidirler (Preece and Sutter 1991; Rohr *et al.* 2003). Rejenere olan bitkiler yavaş yavaş yeni çevrelerinde hayatta kalmaya uyum sağlamaktadırlar (Donnelly and Tisdall 1993).

Tablo 1. Bazı *Rheum* Türlerinde Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmalarında Kullanılan Eksplant ve Ortam İçerikleri

Tür	Eksplant	Ortam ve BBD (mg/l)	Sonuç	Kaynak
<i>Rheum spiciforme</i>	Boğum, yaprak, kök, embriyo eksen	MS+ (1,32) 2,4-D + 1,35 BAP MS+(1,76) 2,4-D+1,76 TDZ	Kallus	Khan <i>et al.</i> (2022)
	Kallus	MS+ (1,35 – 2,25) BAP + (1,29 – 2,15) KIN MS+ 1,8 BAP + 1,72 KIN + 1 GA3	Organogenesis	
	Yaprak	MS+ 5,6 BAP + 0,2 NAA MS+5,6 BAP +0,2 NAA +(0,9) 2,4-D +0,7GA3	Direkt somatik embriyogenesis	
	Somatik embriyo	MS+5,6 BAP +0,2 NAA +0,7 GA3	Sürgün	
	Boğum segmenti	MS+ 2,81 BAP + 0,2 NAA MS+ 2,81 BAP + 0,2 NAA		
<i>Rheum. rhabarbarum</i>	Sürgün uçları, koltuk altı tomurcukları	MS+ 1,5 BAP+ 0,1 GA3 MS+ 1,5 BAP+ 0,02 NAA ¾ MS+ 1,5 BAP+ 0,02 NAA	Sürgün	Wojtania and Mieszcakowska-Fraç (2021)
<i>Rheum emodi</i>	Yaprak (Lamina)	MS+1,6 KIN + (2,2) 2,4-D MS+1,7 BAP +0,4 NAA + (2,6) 2,4-D	Kallus	Singh and Chaturvedi (2022)
	Yaprak orta damarı	MS+ 2,3 BAP + 0,4 NAA + (2,2) 2,4-D MS+1,0 KIN + (2,2) 2,4-D + 1,1 TDZ		
	Boğum	MS+ 5,6 BAP + 0,4 NAA + 2,2 TDZ	Sürgün	
<i>Rheum rhabarbarum</i>	Yaprak	MS+ (4) BAP MS+ (4) KIN MS+ (4) mT	Organogenesis	Clapa <i>et al.</i> (2020)
<i>Rheum emodi</i> , <i>Rheum webbianum</i>	Yaprak, yaprak orta damarı, yaprak sapı	MS+ 2,7 BAP + 2,2 TDZ + 2,4 IBA MS+ 2,3 BAP + 2,2 TDZ + 1,3 NAA	Direkt Organogenesis	Tabin <i>et al.</i> (2016; 2018)
		MS+ 2,3 BAP + (2,2) 2,4-D MS+ 2,25 BAP + 0,9 IAA	Kallus	
<i>Rheum ribes</i>	Kotiledon ve hipokotil	MS+ 2 BAP + 1 IBA	Kallus + organogenesis	Tuncer ve Günsan (2017)
<i>Rheum franzenbachii</i>	Yaprak	MS+ 2,0 BAP + 0,5 NAA	Kallus	Wang <i>et al.</i> (2011)
	Kallus	MS+ (0,5) TDZ + (0,2) NAA MS+ (2) BAP + (0,2) NAA	Kallus Çoğaltması	
<i>Rheum coreanum</i>	Sürgün ucu, genç yaprak, rizom ve kök ucu	MS+ (0,2 – 0,5) 2,4-D MS+ (0,2 – 0,5) NAA MS+ (0,2) BAP+ (0,2) 2,4-D	Kallus	Mun and Mun (2016)
	Kallus	MS+ (2) BAP+ (0,2) NAA	Organogenesis	
<i>Rheum moorcroftianum</i>	Fide	MS+ 1.6 BAP + 2 IBA MS + 1.6 BAP + 2.0 IAA + 2.0 IBA MS + 1.6 BAP + 2 IAA	Kallus ile kök ve sürgün Kallus ile kök	Maithani (2015)
<i>Rheum emodi</i>	Yaprak	MS + 1,12 BAP + (1,11) 2,4-D MS + 1,12 BAP + 1,1 TDZ	Kallus	Tabin <i>et al.</i> (2014)
	Tohum, yaprak, sürgün ve rizom	MS + 1,3 BAP + 1 IBA MS + 2,2 BAP	Organogenesis	
<i>Rheum rhaponticum</i>	Tomurcuklar	MS + 5 BAP MS + 5 KIN	Organogenesis	Kozak and Saáata (2011)
<i>Rheum emodi</i>	Yaprak	MS+ 2,2 BAP + 1 IBA	Sürgün	Malik <i>et al.</i> (2010)
<i>Rheum. rhabarbarum</i>	Tomurcuk	MS + 1,5 BAP + 0,7 IBA	Sürgün	Lepse (2009)
<i>Rheum ribes</i>	Hipokotil	MS+ 1 BAP + 1 IBA	Kallus	Farzami Sepehr and Ghorbanli (2002)
<i>Rheum rhabarbarum</i>	Sürgün uçları	MS+ 1 BAP + 1 IBA	Organogenesis	Lassus and Voipio (1994)
<i>Rheum emodi</i>	Yaprak	MS+ 2 BAP + 1 IBA	Organogenesis	Lal and Ahuja (1989)

Mikroçoğaltım çalışmalarındaki en temel hedef ana bitki ile aynı genetik yapıya sahip bitkiler elde etmektedir. Ancak mikroçoğaltım çalışmalarının rejenerasyon süreçlerinde istenmeyen varyasyonlar meydana gelebilmektedir. Bu varyasyonlar somaklonal varyasyon olarak adlandırılmaktadır. Somaklonal varyasyon, genel anlamda, bitki doku kültürü çalışmalarında meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak ifade edilmektedir. Bu varyasyonlar, bitki büyüme düzenleyicileri, kültürün türü ve süresi, genotip ve kimerik dokular gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilmektedir (Bairu *et al.* 2011). Ortaya çıkabilecek varyasyonların tespiti moleküler, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle yapılabilmektedir. Bununla birlikte moleküler teknikler, genetik instabilite henüz fenotipik olarak ifade edilmediğinde bile daha erken aşamalarda tespit yapılmasını sağlamaktadır (Bairu *et al.* 2011; Govindaraj *et al.* 2015).

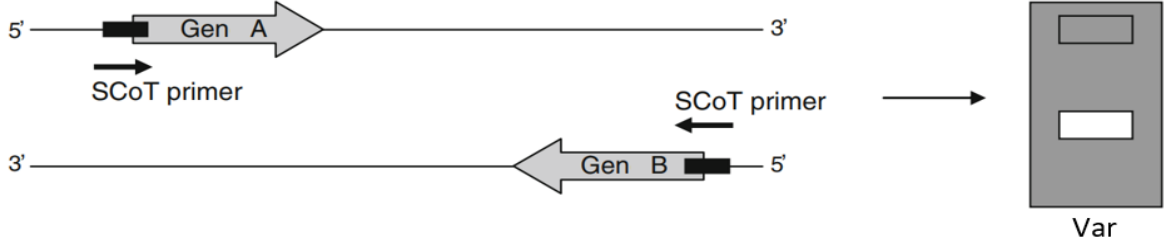
Bu amaç doğrultusunda bitki genetik kararlılığı belirlemek için farklı DNA-bazlı moleküler markörler kullanılmaktadır. Örneğin RFLP (Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi), RAPD (Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi), SCAR (Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler), SSR (Basit Diziler Tekrarları veya Mikrosatelitler), ISSR (Basit Diziler Tekrarları Arası Polimorfizm) ve SCoT (başlangıç kodonu hedefli) yöntemleri birçok çalışmada kullanılmıştır (Elshibli and Korpelainen 2007; Khan *et al.* 2012; Rasheed and Xia 2019).

Rheum cinsi türlerinde kullanılan moleküler markörlerle ilgili çalışmalar sınırlıdır. Wang *et al.* (2012), ISSR markörünü kullanarak *Rheum officinale*'nin 12 popülasyonunda genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Tanhuanpää *et al.* (2018), *Rheum rhabarbarum* ve *Rheum tanguticum* türlerinde SSR markörü kullanılarak genetik çeşitliliklerini belirlemişlerdir.

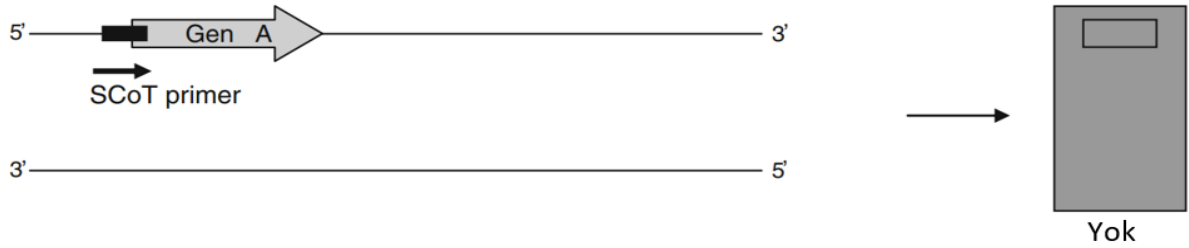
PCR tabanlı markörler olan AFLP, SSR ve SCoT gibi teknikler belirli DNA bölgelerinin çoğaltılmasını sağlar ve bu çoğaltılan ürünler jel elektroforezi yoluyla ayrıştırılır. Bu yöntemler, radyo izotop etiketlerle hibridizasyon gerekli olmadığından zamandan tasarruf sağlar ve daha pratiktir (Garcia *et al.* 2004). Dahası, somaklonal varyasyonlar son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemlerden başlangıç kodonu hedefli (Start Codon Targeted (SCoT)) markör tekniği kullanılarak belirlenebilmektedir. SCoT markör sistemi, Collard and Mackill (2009) tarafından, bitki genomundaki başlangıç kodon çevresindeki korunan bölge esas alınarak geliştirilmiştir. SCoT markörleri, DNA iplikçiklerinin her ikisinde de ATG başlatma kodonunu çevreleyen gen bölgelerine yönelik olarak tasarlanmıştır (Şekil 6). SCoT tekniği basit, tekrarlanabilir ve kolay ulaşılabilir özelliklerinden dolayı üstün avantajlara sahip markör sistemidir. Aynı zamanda bu markör sistemi genetik çeşitlilik çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemde tek primer kullanılmaktadır. Bu açıdan, bu teknik RAPD ve

ISSR veya diğer tek primer amplifikasyon markör sistemleriyle benzerdir. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda RAPD ve ISSR markörlerinden daha tekrarlanabilir olduğu bildirilmiştir (Xiong *et al.* 2011; Amom *et al.* 2020; Gogoi *et al.* 2020; Tikendra *et al.* 2021b).

Genotip # 1



Genotip # 2



Şekil 6. SCOT PCR amplifikasyonunun ilkesi (Collard and Mackill 2009).

SCoT markör tekniği, yer fıstığı (Luo *et al.* 2010), şeker kamışı (Que *et al.* 2014), hurma (Al-qurainy *et al.* 2015), hindistan cevizi (Rajesh *et al.* 2015), buğday (Etminan *et al.* 2016) ve arpa (Güngör *et al.* 2022) gibi bitki türlerinde genetik çeşitlilik analizinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca, popülasyon yapı analizinde ve soy belirlemede bu teknik başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Satya *et al.* 2015).

Son yıllarda, *Rheum ribes* (ışkın)'ın aktif bileşenlerini belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmış ve bitkinin önemli sekonder metabolitleri içerdiği belirlenmiştir. Ancak, yapılan araştırmalar sonucunda bitkinin in vitro mikroçoğaltımına özellikle organogenesis ve somatik embriyogenesis üzerine çalışma bulunmamaktadır. Bitkinin endemik doğası ve tehdit altında olması dikkate alınarak planlanan bu çalışmanın amacı, farklı eksplantlardan somatik embriyogenesis ve/veya organogenesis yoluyla etkili ve tekrarlanabilir bir in vitro çoğaltım sistemini geliştirmektir. Yine araştırmada, in vitro şartlarda oluşması muhtemel somaklonal varyasyonlar dikkate alınarak, in vitro rejenere bitkilerin genetik kararlılıkları SCoT markör tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

KURAMSAL TEMELLER

Türkiye'nin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde doğal olarak yetişen ve tıbbi bir bitki olan ıskın (*Rheum ribes* L.), Polygonaceae familyasına aittir. *Rheum* cinsi, Asya, Avrupa ve Amerika'nın dağlık bölgelerinde yayılış göstermektedir (Maclean and Taylor 2000; Clementi and Misiti 2010; Gardener and Ghronicle 2014). Ravent'in birçok türü geleneksel tıp sistemlerinde geçmişten günümüze yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle geleneksel Çin tıbbında en yaygın kullanılan, bitkisel ilaçlardan biri olarak kabul edilmektedir (Zhuang *et al.* 2020). Bunun yanında, halk tarafından böbrek taşları, sinüs ve akciğer enfeksiyonları ve karaciğer rahatsızlıkları gibi hastalıkların tedavisi için tüketimi oldukça yaygındır (Ashnagar *et al.* 2007). Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalarda *Rheum*'dan izole edilen bileşiklerin antioksidan, sitotoksik, antiülser, antidiyabetik, antimikrobiyal, antifungal, yara iyileştirici, antikanser, antitümör ve antiproliferatif olduğu bildirilmektedir (Rokaya *et al.* 2012; Bilal *et al.* 2013; Pandith *et al.* 2014; Foust 2014; Xiang *et al.* 2020; Pandith and Khan, 2022; Gecibesler *et al.* 2021). Bu bitkinin iyileştirici özellikleri, özellikle antrokinonlar, stilbenoidler ve flavonoidler gibi içerdiği sekonder metabolitlere bağlıdır. Bu metabolitlerin ve/veya türevlerinin farmakolojik etkinliği, birçok hastalığın tedavisi için kullanılmakta ve bitkinin metabolitleri üzerine günümüzde birçok çalışma sürdürülmektedir (Krafczyk *et al.* 2008; Pandith *et al.* 2018).

Noori *et al.* (2022) yaptıkları çalışmada, *Rheum ribes*'in köklerinden farklı ekstraksiyon yöntemleri ile organik bileşikleri elde etmişlerdir. Ardından UV-Vis (Ultraviyole-Görünür), HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), GC (Gaz Kromatografisi) ve GC/Kütle gibi analiz teknikleri kullanarak toplam fenolik, flavonoid ve flavonol içeriklerini ölçmüşlerdir. Aynı zamanda bitkinin antioksidan analizini de gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, metabolit içeriğin yüksek olduğunu ve farmakolojide büyük öneme sahip olan curcumin maddesinin ışığında da yüksek oranda olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer taraftan, Gecibesler *et al.* (2021), aynı bitkide yaptıkları çalışmada, bitkiden resveratrol, 6-O-metilalaternin, emodin, aloe-emodin, β -sitosterol ve rutin gibi iyi bilinen sekonder metabolitleri izole etmişlerdir.

Yüksek rakımlarda yetişen tıbbi öneme sahip olan endemik bitkilerin birçoğunun, normal şartlarda yetiştiriciliği oldukça zordur. Günümüzde tıbbi değeri yüksek olan bitkilerin insan müdahalesi ile toplanıyor olması, bitkilerde ciddi kayıplara sebep olmuştur. Bu

perspektifte tıbbi öneme sahip olan bitkilerin korunmasına yönelik birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri olan in vitro mikroçoğaltım yöntemi bu türlerin korunmasında etkili bir araçtır (Debnath *et al.* 2006, Dhandapani *et al.* 2008; Sidhu 2011, Taşkın *et al.* 2013 Pandith *et al.* 2018). Tabin *et al.* (2016), yok olma tehlikesi altındaki tıbbi endemik bitkilerin doku kültürü teknikleri ile in vitro mikroçoğaltımının yapıldığını bildirmişlerdir. Mikroçoğaltım tekniği ile hızlı ve kısa sürede birçok bitki elde edilebilmektedir (Zhou and Wu 2006). Somatik embriyogenesis (direkt/indirekt) ve organogenesis (direkt/indirekt) mikroçoğaltım tekniğinde sıklıkla kullanılan rejenerasyon sistemleridir (Li *et al.* 2022; Moyo *et al.* 2009).

İn vitro bitki doku kültüründe hücrelerin ve dokuların kültür koşullarına uyum sağlayarak büyüme, çoğalma ve özelleşme sürecinde meydana gelen şekil değişiklikleri de morfogenez olarak adlandırılmaktadır (Elhiti and Stasolla, 2011; Delporte *et al.* 2014). Organogenesis ve somatik embriyogenesis süreçleri, aseptik in vitro koşullar altında hücre farklılaşma olayından bitki rejenerasyonuna yol açmıştır. Bu tür farklılaşma veya morfogenez süreçleri, kallus yoluyla indirekt veya eksplant üzerinden direkt olabilmektedir (Chandra ve Pental 2003).

Somatik embriyogenesis, doku kültürü sisteminin en çok kullanılan rejenerasyon yollarından biri olarak kabul edilmektedir (Aydın vd. 2013; Al Shamari *et al.* 2018; Tomiczak *et al.* 2019; Sánchez-Romero 2021). Ayrıca, somatik embriyogenesis birçok bitki türünün hızlı klonal üretimi için önemli potansiyele sahip olmasının yanında sentetik tohum üretimi ve gen aktarımı alanlarında kullanılan önemli bir teknolojidir (Von Arnold *et al.* 2002; Parimalan *et al.* 2011; Nic-Can *et al.* 2013; Radoeva and Weijers 2014; Behera *et al.* 2022).

İn vitro mikroçoğaltım çalışmalarının başarısı birçok faktöre (besin ortamı içeriği, sıcaklık, pH, ışık ve nem) bağlı olmasının yanında büyük oranda eksplant, genotip ve BBD'lere bağlıdır (Cardoza 2008; Gupta *et al.* 2020). Bitki doku kültüründe kullanılan büyüme düzenleyicileri, bitki gelişimini kontrol etme ve hücre farklılaşmasını yönlendirmede önemli bir role sahiptir (Chugh and Kumar 2022; Dias 2019). Diğer taraftan, aklimatizasyon aşaması, her mikroçoğaltım protokolünün son aşaması olarak bilinmektedir. Başka bir ifadeyle aklimatizasyon rejenere olan bitkilerin doğal çevre koşullarında toprağa transfer işlemidir (Hartmann *et al.* 2002). Bu aşama özel bir bakım gerektirmektedir. Aklimatizasyon aşamasında rejenere olan bitkiler şeker temelli ortamdan ototrofik aşamaya geçirilir ve fotosentez yoluyla besin üretme konusunda kendisine bağımlı hale getirilir. Bu süreç, rejenere bitkilerin in vitro koşullardan normal koşullara kademeli olarak geçişini sağlayıp ortama adaptasyon kabiliyetini arttırmaktır. Bu nedenle, aklimatizasyonun ilk günlerinde çeşitli sulamalar genellikle

seyreltilmiş kültür ortamı tuzları ile yapılmaktadır (Aitken-Christie *et al.* 2013; Cardoso *et al.* 2018).

Diğer bitkiler gibi yabancı ravent tohumlarının çimlenme gücü sıcaklık, ışık, su, toprak besin maddesi, tuzluluk gibi abiyotik çevresel faktörlere bağlıdır (Socolowski *et al.* 2008; Farji-Brener *et al.* 2009). Işkın bitkisi genel olarak kayalık, taşlık ve yüksek bölgelerde yetişmektedir. Bu durum bitkinin çevresel ve antropojenik strese maruz kalmasına yol açmaktadır (Munzuroğlu *et al.* 2000). Genellikle çevresel stresler altında yabancı bitkilerin yaşamı için en önemli unsur tohumlarıdır. Işkın gibi yabancı bitkiler doğaya adaptasyon sağlayıp oldukça fazla tohum oluşturmaktadır. Bu sayede bitkiler olumsuz çevre şartlarının gelişmesini önlemesine karşın hızlı yayılıma sahiptirler. Ayrıca bu bitkilerin tohumları olgunluğa eriştiği zaman diliminde hızlı bir şekilde ana bitkiden ayrılıp, toprağa dökülmekte ve toprakta kolaylıkla çimlenmektedir (Kadıoğlu 2007). Ancak bazı çalışmalar, ravent tohumlarının çimlenme oranının karanlık ve soğuk ortamlarda en düşük seviyede olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle ravent tohumlarının toprakta derin veya kışın kar altında gömülü olması, çimlenmeyi önlemektedir (Escudero *et al.* 2002; Socolowski *et al.* 2008). Bu soruna karşın in vitro şartlar tohumların çimlenmesine olanak sağlayan en uygun çevresel koşulları sağlamaktadır.

Bitki türlerinin büyük çoğunluğunun etkili in vitro rejenerasyonu için evrensel olarak uygulanabilir tek bir yöntem bulunmamaktadır, çünkü bu hassas ve oldukça değişken bir süreçtir. Bu nedenle her tür için kullanılan in vitro rejenerasyon sistemi için uygun protokolün geliştirilmesi gerekmektedir. Bu açıdan geçmişten günümüze kadar *Rheum* türlerinde in vitro mikroçoğaltım çalışmaları mevcuttur.

Farzami Sepehr and Ghorbanli (2002), yaptıkları çalışmada in vitro şartlarda *Rheum ribes*'in 5 günlük gelişmiş fidelerinden aldıkları, hipokotil eksplantlarından 1 mg/l BA ve 1 mg/l IBA içeren MS besi ortamında kallus elde etmişlerdir. Sonrasında, elde ettikleri kallusları farklı sitokinin türevlerini içeren MS ortamlarına almışlardır. Bu ortamlar içerisinde en yüksek sürgün oluşumunu 0,5 mg/l BAP ve 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Çalışmanın devamında, oluşan sürgünleri köklendirmek için 0,5 mg/l IBA içeren ½ MS kullanmışlardır. *Rheum ribes*'de yapılan farklı bir çalışmada (Tuncer ve Günsan 2017), in vitro mikroçoğaltım için hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanılmış ve bu eksplantlar kallus ve sürgün elde etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda BBD içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda, BBD'ler içerisinde en yüksek kallus ve sürgün oluşumu 1 mg/l BAP + 1 mg/l IBA ve 2 mg/l BAP + 1 mg/l IBA içeren MS ortamlarında meydana gelmiştir. Yine bu çalışmada, eksplant bakımından hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarından daha başarılı sonuç verdiği belirtilmiştir. Yine Tuncer (2021), *Rheum ribes*'de

kallus proliferasyon protokolünün iyileştirilmesi üzerine yaptığı başka bir çalışmada, BAP, IBA, TDZ ve NAA'nın farklı kombinasyonları kullanmış ve en yüksek kallus oluşumunun 2 mg/l TDZ ve 0,2 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edildiğini bildirmiştir.

Rheum ribes türündeki sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen *Rheum* cinsinin diğer türlerinde *in vitro* çoğaltmaya yönelik çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Roggemans and Claes (1979), *Rheum rhaponticum*'un sürgün uçlarını 1 mg/l BAP + 1 mg/l IBA içeren MS ortamında, 20 ±1 °C'de 16 saat fotoperyotta kültüre alarak aksiller tomurcuk oluşumunu sağlamışlardır. Zhao *et al.* (2010), *Rheum rhaponticum*'da sürgün ucu kültürü yoluyla etkili *in vitro* çoğaltım protokolü geliştirmek için, BBD'lerin (BA, KİN, NAA ve IBA) farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını kullanmışlardır. Araştırma sonucunda en yüksek sürgün sayısını (9,1) 1,0 mg/l BA + 1,0 mg/l NAA içeren MS ortamından elde etmiş ve bu sürgünleri 0,5 mg/l NAA içeren ½ MS ortamında başarılı bir şekilde köklendirmişlerdir. Yine, *Rheum rhaponticum*'da yapılan başka bir çalışmada (Kozak and Salata 2011), aseptik koşullarda yetiştirilmiş fidelerden sürgün çoğaltımı sağlamak amacıyla BBD'lerin farklı konsantrasyonlarını [BA (4,4, 11,1 ve 22,2 µmol/l), KIN (4,7, 11,6 ve 23,3 µmol/l), 2-isopentil adenin (2iP) (4,9, 12,3 ve 24,6 µmol/l) ve TDZ (4,5, 11,4 ve 22,7 µmol/l)] içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda, sitokininlerin yeni sürgün oluşumunu teşvik ettiği, en yüksek sürgün oluşumunun ise BA (11,1 ve 22,2 µmol/L) içeren ortamdan elde edildiği bildirilmiştir.

Wojtania and Mieszcakowska-Frać (2021) *Rheum rhaponticum*'da dormant tomurcuklardan izole edilen 8 yıllık rizomlardan sürgün kültürleri oluşturmuşlardır. Etkili sürgün çoğaltımını, 6,6 µM BAP veya 12,4 µM meta-topolin varlığında elde etmişlerdir. Aynı zamanda, her iki sitokinin, sükröz konsantrasyonuna bağlı olarak sürgün oluşumunu uyarıcı bir şekilde etkilediğini bildirmişlerdir. Sükröz konsantrasyonunu 59 ila 175 mM arasında artırmanın, sürgün üretimini ve yaprak çıkışını üç kat azalttığını, ancak kallus oluşumu ve sürgün uzunluğunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Lal and Ahuja (1989), *Rheum emodi* üzerine yaptıkları *in vitro* mikroçoğaltım çalışmalarında, sürgün ucu ve yaprak eksplantlarından 2,0 mg/l BAP ve 1,0 mg/l IBA içeren MS ortamından çoklu sürgünler elde etmişlerdir. Ardından, elde ettikleri sürgünlerden 1,0 mg/l IBA içeren ortamda kök indüksiyonunu sağlamışlardır. Yine, Lal and Ahuja (1993) tarafından *Rheum emodi* üzerine yapılan başka bir çalışmada 8,9 µM BA ve 4,9 µM IBA içeren sıvı ve yarı katı MS ortamında çoklu sürgün oluşumu sağlanmış ve sürgünler 4,9 µM IBA içeren ortamda köklendirilmiştir. Bu çalışmada, sıvı ortamda gelişen sürgün ve sürgün çoğaltımının

yarı katı MS ortamından daha zayıf olduğu ve yarı katı MS ortamında sürgün indüksiyonu ve çoğaltımının zaman bakımında hızlı olduğu bildirilmiştir. Yine, Parveen *et al.* (2012) in vitro *Rheum emodi* sürgünlerini, farklı BAP konsantrasyonlarının (2,5-15 µM) ayrı ayrı ve ayrıca bunun farklı oksinlerle, yani NAA/2,4-D/IAA/IBA ile kombinasyonunun etkisini değerlendirmek için MS besin ortamında kültürleşmişlerdir. Araştırma sonucunda, test edilen tüm denemeler arasında sürgün çoğalması için en iyi tepki, 5 µM IBA ile desteklenen 7,5µM BAP'ta gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada, izole edilen her sürgün daha sonra farklı konsantrasyonlarda IAA (2,5-15 µM) etkisi altında köklenme için alt kültüre tabi tutulmuş ve en iyi kök oluşumu 12,5 µM IAA'da tespit edilmiştir. Malik *et al.* (2010), yaptıkları çalışmada ise *Rheum emodi*'nin rizom eksplantlarından en yüksek sürgün rejenerasyonunun 10 µM BAP ve 5 µM IBA içeren hem katı hem de sıvı MS ortamında sağladıklarını bildirmişlerdir.

Rheum emodi türünde yapılan başka bir çalışmada mikroçoğaltım protokolü geliştirilmiştir ve bitki oluşumu için en etkili bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonu ve kombinasyonu olarak 15 µM BAP + 15 µM IBA içeren MS ortamı belirlenmiştir (Tabin *et al.* 2018). Singh and Chaturvedi (2022), *Rheum emodi* türünde, eksplant olarak yaprak ve yaprağın orta damar kısmını kullanmışlar ve kallus oluşumu bakımından yaprağın orta damarından (%100), yaprak eksplantlarından (%97,67) daha yüksek oranda kallus indüksiyonu elde etmişlerdir. Ardından oluşan kalluslardan 7,5 µM BAP, 0,5 µM NAA ve 0,5 µM IAA içeren MS katı ortamından en yüksek sürgün indüksiyonunu (%66,67) sağlamışlardır. Yine bu çalışmada yaprak eksplantlarından 10,0 µM BAP, 0,5 µM IBA ve 1.0 µM IAA içeren MS ortamında direkt sürgün indüksiyonunun oluştuğunu bildirmişlerdir.

Lassus and Voipio (1994), iki farklı *Rheum rhabarbarum* genotipinin (Victoria ve klon AF) mikroçoğaltımı için sürgün uçlarını 1 mg/l BAP, 1 mg/l IBA, 20 g/l sükröz ve 8 g/l agar içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Yine aynı bitkide in vitro çoğaltım amacıyla yapılan bir başka çalışmada (Lepse 2009), en yüksek çoğalma oranını elde etmek için üç farklı ortam kullanılmıştır. 1. ortamda 1 mg/l BAP, 2 mg/l IBA, 0,5 mg/l GA3, 2. ortamda 1 mg/l BAP ve 1,5 mg/l IBA, 3. ortamda ise 1,5 mg/l BAP ve 0,7 mg/l IBA bulunmaktadır. Çalışmada bu üç ortamdan en iyi in vitro çoğaltımın 3. ortamda olduğu bildirilmiştir.

Clapa *et al.* (2020), *Rheum rhabarbarum*'da yaptıkları çalışmada BAP'ın aksiller sürgünlerin çoğalmasını uyardığı ancak sap büyümesini sınırladığını tespit etmişlerdir. Araştırmada, en yüksek ortalama çoğalma oranın 0,5 mg/l BAP içeren ortamda elde edildiği bildirilmiştir. Yine bu çalışmada 4 mg/l KIN içeren MS ortamında hem sürgün oluştuğunu hem de sürgünlerin yine bu ortamda yüksek oranda (%60) köklendiğini bildirilmiştir.

Rheum franzenbachii üzerine yapılan bir çalışmada (Wang *et al.* 2011), yaprak eksplantlarında en yüksek kallus oluşumu yönünden 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA, 4,0 mg/l TDZ + 0, 0,2 mg/l NAA ve 4,0 mg/l TDZ + 0,2 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l IAA içeren MS ortamları karşılaştırılmıştır. Bu ortamlar içerisinde en yüksek kallus oluşum oranı 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Diğer taraftan, 4,0 mg/l TDZ + 0, 2 mg/l NAA ve 4,0 mg/l TDZ + 0,2 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l IAA içeren MS ortamları arasında ise 4,0 mg/l TDZ + 0,2 mg/l NAA içeren ortamının daha yüksek kallus oluşturduğu bildirilmiştir.

Khan *et al.* (2022), *Rheum spiciforme* türünde yaptıkları çalışmada, etkili bir in vitro rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Eksplant olarak bitkinin yaprak ve boğum segmentlerini kullanmışlardır. Yaprak ve boğum-segment eksplantlarından 2 µM 2,4-D ve 6 µM BA içeren MS ortamlarından yüksek oranda (%87,3) kallus elde etmişlerdir. Araştırmada, boğum segment eksplantlarından kahverengi kallus oluştuğu tespit edilmiş olup, bu kahverengi kallusların her birinin 4,0 µM GA3 ile 8,0 µM BA ve 1,0 µM KIN içeren ortamlarda önemli ölçüde yüksek bitki rejenerasyonu (%96,3) meydana getirdiği bildirilmiştir. Diğer taraftan, yine yaprak eksplantlarından 25 µM BA, 1,0 µM NAA ve 2,0 µM GA3 içeren ortamlardan direkt somatik embriyogenesinin oluştuğu rapor edilmiştir.

Rashid *et al.* (2014), *Rheum webbianum*'da rizom eksplantlarından 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamından, yaklaşık kültürün 30. gününde en yüksek kallus oluşumunu (%100) elde etmişlerdir. Ardından, kalluslardan meydana gelen en yüksek sürgün rejenerasyonunun ise kültürün 16. gününde 5,0 mg/l BAP ve 2,0 mg/l IAA içeren katı MS ortamından sağlandığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan, Maithani (2015) tarafından *Rheum moorcroftianum*'da yapılan in vitro çoğaltım çalışmasında, fide eksplantlarından en iyi kallus oluşumunun IBA içeren MS ortamlarında meydana geldiği belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada, en iyi köklenmenin ise 1,6 mg/l BAP + 2,0 mg/l IAA içeren MS ortamında meydana geldiği kaydedilmiştir.

Mun and Mun (2016), *Rheum coreanum*'da tüm bitkiden elde edilen dört organdan (sürgün ucu, genç yaprak, rizom ve kök ucu) kallus oluşumu için farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin (2,4-D, NAA ve Kinetin) etkilerini incelemişlerdir. En iyi kallus oluşumu 2,4-D (0,2-0,3 mg/l) içeren MS ortamı üzerinde rizom eksplantından elde edilmiştir. Bu kalluslardan en yüksek sürgün, kök ve bitkicik oluşumu ise 2 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA kombinasyonunu, tek başına 0,5 mg/l NAA veya 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Yine aynı çalışmada, serada başarıyla iklimlendirilen (%100) bitkiciklerin dağlık bölgede hayatta kalma oranının %95'e ulaştığı, ham ilaç verimleri ve etken madde içerikleri eşeyli ve vejetatif çoğaltma ile elde edilenlerden daha yüksek olduğu kaydedilmiştir.

İn vitro mikroçoğaltım yöntemi birçok bitki türünde geçmişten günümüze kadar başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak in vitro rejenerasyon sistemleri (somatik embriyogenesis, organogenesis) ile elde edilen bitkilerde istenmeyen genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bitki doku kültüründe meydana gelen ve kalıtsal olan bu genetik değişiklikler somaklonal varyasyon olarak bilinmektedir (Larkin and Scowcroft 1981; Bairu *et al.* 2011). Somaklonal varyasyonlar çalışma amacına göre doğal varyasyon kaynağı sunmaktadır (Hammerschlag *et al.* 2006). İn vitro mikroçoğaltım çalışmalarında ana bitki ile aynı genetik materyale sahip yeni bitkilerin üretilmesi araştırmacıların en temel amacıdır. Bu nedenle somaklonal varyasyon in vitro mikroçoğaltım çalışmalarında istenmeyen bir durumdur. Ancak, bitki doku kültüründeki birçok faktör (BBD'leri, ışık, sıcaklık, pH, eksplant kaynağı, alt kültür sayısı vb.) strese neden olup rejenere bitkilerde genetik ve epigenetik farklılıklar meydana getirebilmektedir (Matthes *et al.* 2001; Bairu *et al.* 2011). İn vitro mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda elde edilen rejenere bitkilerde somaklonal varyasyonların tespiti, biyokimyasal, fizyolojik, DNA, RNA ve protein bazlı moleküler markörler ile yapılmaktadır (Khan *et al.* 2012; Alizadeh *et al.* 2015).

Biyoteknolojik ve moleküler yöntemlerin rolü, bitki doku kültüründe somaklonal varyasyonun tahmini ve korunması için oldukça önemlidir. İn vitro mikroçoğaltım çalışmalarında somaklonal varyasyon, hibridizasyona dayalı [RFLP (Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi)) ve PCR'a dayalı (RAPD (Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi), SCAR (Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler), SSR (Basit Dizi Tekrarları veya Mikrosatelitler), ISSR (Basit Dizi Tekrarları Arası Polimorfizm) ve SCoT (Başlangıç Kodonu Hedefli)] moleküler markör yöntemleri kullanılarak bir çok çalışmada tespit edilmiştir (Elshibli and Korpelainen 2007; Collard and Mackill 2009; Rasheed and Xia 2019).

PCR temelli markör sistemleri, daha hızlı sonuç vermesi ve izotop etiketlerle hibridizasyon işleminin gerekli olmaması ile zamandan ve paradan tasarruf sağlamaktadır (Garcia *et al.* 2004). Bu avantajı ile yapılan çalışmalarda genellikle PCR temelli moleküler markörler tercih edilmektedir. Aydın *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki üç farklı oksin (2,4-D, dikamba ve pikloram) tipinin *Hordeum vulgare*'de olgun embriyo destekli bitki rejenerasyonu üzerinde etkilerini ve rejenere olan bitkilerden oluşması muhtemel somaklonal varyasyonları RAPD ve CRED-RA teknikleri kullanarak genetik ve epigenetik yönden araştırmışlardır. Oksin tipi ve artan oksin konsantrasyonuna bağlı olarak GTS (Genomik Şablon Kararlılığı) değerinin azaldığını bildirmişlerdir. Yine, Aydın *et al.* (2016) yaptıkları farklı bir çalışmada, *Secale cereale*'de endosperm destekli olgun

embriyosundan farklı oksin (2,4-D, dikamba ve pikloram) konsatrasyonlarını içeren MS ortamında elde edilen kallusları kullanılarak somaklonal varyasyon durumunu RAPD ve CRED-RA markörleri ile incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, yüksek konsatrasyona sahip oksinlerin genomik şablon stabilitesi (GTS)'nde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Son yıllarda, genetik polimorfizmin tespiti için SCoT Polimorfizm markör sistemi Collard and Mackill (2009) tarafından geliştirilmiştir. SCoT markörleri, DNA iplikçiklerinin her ikisinde de ATG başlatma kodonunu çevreleyen gen bölgelerine yönelik olarak tasarlanmıştır. Bu tekniğin RAPD ve ISSR markörlerinden daha tekrarlanabilir olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Amom *et al.* 2020; Gogoi *et al.* 2020; Tikendra *et al.* 2021a). SCoT primerleri, basit, tekrarlanabilir, gen hedefli markör gibi bir dizi değerli özellik sayesinde, genetik çeşitliliğin analizi gibi çeşitli uygulamalarda başarıyla kullanılmaktadır. Bu genleri çevreleyen fonksiyonel genler veya bölgeler, bunlara karşılık gelen özellikler ile ilişkilidir ve dizi bilgisi gerektirmemektedir (Pakseresht *et al.* 2013; Mahjbi *et al.* 2015). Genel olarak, SCoT tekniği RAPD'in kullanımındaki zorlukları aşmak için geliştirilmiştir. Ayrıca, SCoT markörlerinin yüksek çözünürlük gücüne sahip olduğu ve bu nedenle RAPD gibi diğer yaygın markörlere göre daha yüksek polimorfizmler gösterdiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Aynı zamanda basit, kolay uygulanabilir, ucuz ve dominant/kodominant bir markör sistemi olması nedeniyle SCoT markör yöntemi birçok çalışmada yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Xia *et al.* 2016). SCoT markör tekniği, hedeflenen gen bölgelerinin PCR aracılığıyla çoğaltılması ve standart agaroz jel elektroforeziyle elde edilen PCR fragmentlerin görüntülenmesine dayanmaktadır (Collard and Mackill, 2009; Luo *et al.* 2010; Nair *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2015). Dahası, SCoT markörleri, genetik çeşitlilik ve polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Que *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015; Etminan *et al.* 2018).

SCoT markör tekniği, ilk olarak çeltikte (*Oryza sativa*) kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Collard and Mackill 2009). Bu çalışmadan sonra, bu markör çeşitli bitki türlerinde kullanılmaya başlamıştır. Luo *et al.* (2010) yer fıstığı ve mango türlerinde; Al-qurainy *et al.* (2015) hurmada; Rajesh *et al.* (2015) hindistan cevizinde; Etminan *et al.* (2016) buğdayda; genetik çeşitlilik analizi için SCoT markörlerini kullanmışlardır. SCoT markörleri ayrıca, popülasyon analizinde, soy belirlemede (Satya *et al.* 2015) ve polimorfizm analizinde de (Que *et al.* 2014) kullanılmıştır. Aynı zamanda, fasulyede SCoT markörü, dirençli bitki karakterizasyon analizi için de kullanılmıştır (Makunja 2020).

Güneş (2021), Gümüşhane ilinden toplanan yerel fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinde genetik çeşitliliği belirlemek için SCoT ve SSR markör sistemlerinden faydalanmıştır. Her iki markör analizi sonuçlarına göre fasulye genotipleri arasında yüksek

genetik çeşitliliğin belirlendiğini rapor etmiştir. Yine Muz (*Musa spp.*)’da genetik çeşitlilik üzerine yapılan farklı bir çalışmada (Igwe *et al.* 2022), ISSR ve SCoT markörleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, türe özgü genetik çeşitlilik, türler arası genetik çeşitlilik, gen farklılaşma katsayısı tespit edilmiştir.

SCoT markör tekniği yine bazı bitkilerde somaklonal varyasyonun belirlenmesinde başarıyla kullanılmıştır. Antony *et al.* (2015) *Dendrobium Bobby Messina*’da kriyoprezervasyon yöntemi ile muhafaza edilen protokormlarda somaklonal varyasyonun tanımlanması için TRAP ve SCoT markörlerini kullanmışlardır. Dört adet SCoT primerinin (S26, S32, S33 ve S36), hem kriyoprezervasyon hem de kriyoprezervasyon ile muhafaza edilmeyen protokormlarda polimorfizm göstermiştir. Araştırma sonucunda, TRAP ve SCoT DNA markörlerinin, kriyoprezervasyonun ardından rejenere protokormların somaklonal varyasyonlarının potansiyel oranını değerlendirmek için etkili bir araç olduğu bildirilmiştir.

Bhattacharyya *et al.* (2017a) yaptıkları bir çalışmada, *Ansellia africana*’da in vitro mikroçoğaltım yoluyla elde edilen rejenere bitkilerdeki oluşması muhtemel somaklonal varyasyonu tespit etmek için SCoT tekniğini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen bitkilerde somaklonal varyasyonun meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Bhattacharyya *et al.* (2017b) *Rumex nepalensis*’te hem direkt hem de indirekt somatik embriyogenesis yoluyla elde edilen bitkilerin genetik kararlılığını SCoT ve RAPD teknikleri ile belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda RAPD tekniğinin, daha düşük derecede genetik varyasyon tespit etmesine rağmen, SCoT markörünün nispeten daha yüksek derecede genetik değişkenliği tespit edebildiği ve böylece geleneksel moleküler markörlere göre etkinliği kanıtlanmıştır. Diğer taraftan, Singh and Agrawal (2023), *Rumex hastatus* in vitro şartlarda elde ettikleri rejenere bitkilerin genetik kararlıklarını SRAP ve SCoT markörleri ile analiz etmişlerdir. Mevcut çalışmada kullanılan SCoT ve SRAP moleküler markörlerinin in vitro yetiştirilen bitkilerde genetik varyasyonu tespit etmede oldukça tekrarlanabilir, güvenilir ve verimli olduğunu bildirmişlerdir.

Muthukumar *et al.* (2016), *Helicteres isora*’da in vitro çoğaltımda organogenesis yoluyla elde edilen bitkilerde SCoT yöntemi kullanarak somaklonal varyasyonu incelemişlerdir. Çalışma sonucunda rejenere bitkilerden herhangi bir varyasyonun gözlemlenemediğini bildirmişlerdir.

Sathish *et al.* (2018), şeker kamışının olgunlaşmamış yaprak eksplantlarından in vitro mikroçoğaltım yoluyla bitki rejenerasyonu üzerine poliamin uygulayarak, rejenere bitkilerden SCoT markörleri ile somaklonal varyasyon analizi üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda, rejenere bitkilerde herhangi bir genetik varyasyon olmadığını bildirmişlerdir.

Kudikala *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, tıbbi öneme sahip olan *Annona reticulata* bitkisinde etkili ve tekrarlanabilir bir in vitro bitki rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Araştırmada, rejenerasyon protokolün somaklonal varyasyon bakımından değerlendirilmesi için SCoT ve ISSR olmak üzere iki farklı teknik kullanılmıştır. On adet SCoT ve ISSR primerinin kullanıldığı araştırmada, SCoT-9 ve ISSR-4 primerlerinde belirgin DNA bantları elde edilmiştir.

Tikendra *et al.* (2021b), *Dendrobium fimbriatum* bitkisinde BBD'lerin in vitro rejenerasyonuna olan etkilerini değerlendirmiş ve etkili çoğaltım tekniği geliştirmişlerdir. Araştırmada, rejenere bitkilerin genetik kararlılığını belirlemek için RAPD, ISSR ve SCoT markör sistemlerinden faydalanılmıştır. BBD içeren ortamda üretilen rejenere bitkilerin, herhangi bir BBD içermeyen bazal ortamda yetiştirilenlere göre %100 monomorfizm gösterdiği bildirilmiştir. Araştırma sonucunda, rejenere bitkilerde en yüksek polimorfizm oranının SCoT marköründe tespit edildiği kaydedilmiştir.

Attia *et al.* (2022) yaptıkları bir çalışmada mikroçoğaltılan incir fidelerinde, SCoT, DNA barkodlama-kloroplast geni RNA polimeraz 1 (rpoC1 dizileme) ve toplam protein profil analiz (SDS-PAGE) tekniklerini kullanarak somaklonal varyasyonu belirlemek için kullanmışlardır. Kullanılan 10 SCoT primerinde toplam 135 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı %18,4 olarak belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, SCoT, DNA barkodlama ve protein profil analizinin mikroçoğaltılan incir fidelerinde genetik homojenliği tespit etmede etkili olduğu bildirilmiştir.

Mamgain *et al.* (2022), *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill., bitkisinde in vitro direkt ve indirekt somatik embriyogenesis ile meydana gelen rejenere bitkilerin genetik kararlılığını SCoT moleküler kullanılarak değerlendirmişlerdir. SCoT markör analizi sonuçlarına göre, ana bitkiyle benzerlik gösteren yüksek oranda monomorfik bantların (%94) meydana geldiği ve somaklonal varyasyon belirlemede SCoT markörünün kullanılabileceği bildirilmiştir.

Gawroński and Dyduch-Siemińska (2022), indirekt organogenesis yoluyla *Scutellaria baicalensis*'te rejenere bitkilerin elde edilmesi için bir protokol geliştirmişler ve SCoT markörü kullanarak rejenere bitkilerin somaklonal varyasyonu değerlendirilmiştir. İndirekt organogenesis yoluyla elde edilen bitkiciklerin analizi sonucunda 11 adet SCoT primerinin toplamda 130 bant ürettiği ve bunların 45'inin polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Ismail *et al.* (2022), *Withania somnifera* bitkisinde in vitro rejenere bitki fidelerinin genetik kararlılığının belirlenmek için SCoT, SRAP ve DNA barkodlama tekniklerini kullanmışlardır. SCoT primerlerinin her biri için ortalama 11 bant olmak üzere toplam 132

bant ürettiği ve SCoT verileri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçla incelenen bitki örnekleri arasında genetik çeşitliliği ortaya koyulmuştur.

Shalan *et al.* (2023), *Hemerocallis fulva* bitkilerinin in vitro çoğaltılmasıyla elde edilen somaklonal varyasyonun belirlenmesinin ticari ölçekte çoğaltma için uygun mikroçoğaltma protokolü ve büyüme düzenleyicilerini belirlemek açısından önemli olduğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar, rejenere bitkilerde genetik kararlılığı SCoT markörleri kullanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, rejenere bitkilerin ana bitkiden kaynaklı genetik bütünlüğünü büyük ölçüde koruduğu ve SCoT markörünün somaklonal varyasyonu belirlemede kullanabileceği bildirilmiştir.



MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Bitki materyali

Bu çalışma kapsamında bitki materyali olarak kullanılan ışkın (*Rheum ribes* L.) bitkisine ait tohumlar Erzurum ili Karayazı ilçesinde bulunan Değirmenkaya köyü (39°26'26.6"N 42°09'55.7"E) (rakım 2450 m) mevkinden doğadan toplanmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Işkın tohumların toplanması

Kullanılan cihaz ve aletler

Araştırmada kullanılan cihazlar ve aletler ile markaları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Araştırmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Malzeme	Markası
Otoklav	WiseClave WAC-47
pH Metre	Ohaus Starter 3000
Hassas Terazî	Electronic Balance BL-320 H
Steril Kabin	Hedlab X-Pro EN 14175
İklimlendirme Dolabı	Sanyo CFC Free Versatile
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR-Hei Standart
Destile Su Cihazı	Milipore
Derin Dondurucu (-80 °C)	Arçelik 2395 CNMY
Buzdolabı (2-8°C)	NUAIRE
Derin Dondurucu (-20 °C)	Uğur
Elektroforez Tankı (Yatay)	Thermo
Elektroforez Akım Sağlayıcı	Thermo
Kar Üretme Makinesi	Scotsman, AF-80
Jel Görüntüleme Sistemi	PopBio Vü-F Floresans
Mikrodalga Fırın	Arçelik, MD 891 I
PCR	Thermo Scientific 5020
Santrifüj	Beckman Coulter Allegra X-30R
Su Banyosu	Memmert WB-14
NanoDrop Spektrofotometre	Thermo Multiskan Go
Mini Santrifüj	Labnet C1301
Mikroskop Leica	Leica ICC50 W
Kuru Hava Sterilizatörü	Memmert UN55
Tezgâh Üstü Blok Isıtıcı	Thermo-Shaker TS-100C

İn vitro Kültür ortamlarında kullanılan kimyasallar

Temel besi ortamı

Mikroçoğaltım uygulamalarında temel besi ortamı olarak Murashige and Skoog (1962) (MS) ortamı kullanılmıştır. Doku kültürü çalışmalarında ticari olarak satın alınan hazır MS ortamı (Sigma M5524) (4,4 g/l) kullanılmıştır. Bu ortamın kimyasal içeriği ve miktarları Tablo 3’te listelenmiştir.

Tablo 3. MS Temel Besi Ortamının Kimyasal İçeriği ve Miktarları

Kimyasal Bileşenler	Miktarı (mg/l)
MS makro elementleri	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂	332,20
MgSO ₄	180,7
MS mikro elementleri	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
MnSO ₄	16,90
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
Na ₂ NoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,26
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MS vitaminler	
Myo-inositol	100
Nikotinik asit	0,5
Pridoksin-HCl	0,5
Tiamin-HCl	0,1
Glisin	2

MS ortamına ek olarak kullanılan kimyasallar

İn vitro kültür ortamlarında MS temel besisi ortamına ilave olarak kullanılan kimyasallar ve miktarları aşağıda verilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. MS Ortamına İlave Olarak Kullanılan Kimyasal ve Miktarları

Kullanılan kimyasal	Miktar
Agar	7 g/l
MES Hidrat (2-(N-Morfolino) etan sülfonik asit hidrat)	1,95 g/l
Sükroz	30 g/l
PVP (Polivinilpirolidon)	0,7 mg/l
IAA (İndol-3-Asetik Asit)	0,0 – 2,0 mg/l
2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit)	0,0 – 4,0 mg/l
IBA (İndol-3-Bütirik Asit)	0,0 – 2,0 mg/l
NAA (1-Naftaleneasetik asit)	0,0 – 2,0 mg/l
BAP (6-Benzilaminopurin)	0,0 – 6,0 mg/l
KIN (Kinetin)	0,0 – 6,0 mg/l
TDZ (Tidiazuron)	0,0 – 2,0 mg/l
GA3 (Giberellik asit)	0,0 – 2,0 mg/l

Sterilizasyon işlemlerinde kullanılan kimyasallar

Araştırmada sterilizasyonda %5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl), %70'lik etil alkol (EtOH) ve TWEEN® 20 kullanılmıştır.

Somaklonal varyasyon belirlemede kullanılan materyaller

DNA izolasyonu, PCR ve elektroforez işlemlerinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler

Araştırmada DNA izolasyonu, PCR ve elektroforez işlemlerinde kullanılan kimyasallar aşağıda verilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. DNA İzolasyonu, PCR ve Elektroforez İşlemlerinde Kullanılan Kimyasallar

DNA İzolasyonu
1M Tris-HCl
0.5 M EDTA PH=0,8
5 M NaCl
3 M Sodyum Asetat (PH= 5,2)
1X TE Buffer
10X TE Buffer
DNA ekstraksiyon tamponu (CTAB)
10 M Amonyum Asetat
Kloroform: İzooamil alkol (Fluka, 25666)
%70'lik Etil Alkol
2-propanol (izopropanol) (Sigma, I9516)
Ribonükleaz (RNaz) (Sigma R6513)
Proteinaz K (Sigma, P2308)
PCR ve elektroforez işlemleri
Primer (10 µM/µL)
Taq DNA Master Mix (2X) (APQ-A0402)
Kalıp DNA (10 ng/µL)
Ultra Saf Su
0,5X TBE tamponu
10X TBE tamponu
6x Loading buffer
Agaroz

Somaklonal varyasyon belirlenmesinde kullanılan SCoT primer dizileri

Araştırmada rejenere bitkilerin genetik kararlılıkları SCoT markör tekniği ile belirlenmiş olup, bu amaçla kullanılan primerlerin dizileri ve Tm (°C) sıcaklıkları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Somaklonal Varyasyon Belirlenmede Kullanılan SCoT Primerleri

Primer Adı	Primer dizileri (5'-3')	Tm (°C)
SCoT-1	CAACAATGGCTACCACCA	59.5
SCoT-2	CAACAATGGCTACCACCC	59.5
SCoT-4	CAACAATGGCTACCACCT	57.6
SCoT-5	CAACAATGGCTACCACGA	57.6
SCoT-6	CAACAATGGCTACCACGC	59
SCoT-8	CAACAATGGCTACCACGT	54.8
SCoT-10	CAACAATGGCTACCAGCC	56
SCoT-12	ACGACATGGCGACCAACG	59.5
SCoT-13	ACGACATGGCGACCATCG	59.5
SCoT-17	ACCATGGCTACCACCGAG	60
SCoT-18	ACCATGGCTACCACCGCC	60
SCoT-21	ACGACATGGCGACCCACA	61
SCoT-22	AACCATGGCTACCACCAC	56
SCoT-23	CACCATGGCTACCACCAG	61
SCoT-24	CACCATGGCTACCACCAT	58
SCoT-25	ACCATGGCTACCACCGGG	58.9
SCoT-26	ACCATGGCTACCACCGTC	60.6
SCoT-27	ACCATGGCTACCACCGTG	57.3
SCoT-28	CCATGGCTACCACCGCCA	61.6
SCoT-29	CCATGGCTACCACCGGCC	62.1
SCoT-30	CCATGGCTACCACCGGCG	63
SCoT-32	CCATGGCTACCACCGCAC	61.2
SCoT-33	CCATGGCTACCACCGCAG	60.7
SCoT-34	ACCATGGCTACCACCGCA	58
SCoT-35	CATGGCTACCACCGGCC	63
SCoT-36	GCAACAATGGCTACCACC	56
SCoT-37	CAATGGCTACCACTAGCC	56
SCoT-38	CAATGGCTACCACTAACG	54
SCoT-39	CAATGGCTACCACTAGCG	56
SCoT-40	CAATGGCTACCACTACAG	54

Yöntem

Mikroçoğaltım Çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Sterilizasyon işlemleri için kullanılan çözeltiler

%70'lik Etil alkol: 700 ml %100'lük etil alkol alınarak toplam hacim saf su kullanılarak 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

%1'lik Sodyum hipoklorit: %5 oranında NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari Ace® marka çamaşır suyundan 200 ml alınmış ve toplam hacim saf su kullanılarak 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanışı

Kültür ortamlarının hazırlanması için ilk olarak BBD stok solüsyonları hazırlanmıştır. BBD hazırlamada kullanılan çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasalların yanı sıra ve bu stok solüsyonların saklama sıcaklıkları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. BBD’lerin (1 mg/ml) Solüsyonlarının Hazırlanmasında Çözücü ve Seyreltici Olarak Kullanılan Kimyasallar ile Saklama Sıcaklıkları

BBD	Çözücü	Seyreltici	Saklama
2,4-D	Etil alkol	Su	+4°C
IAA	Etil alkol	Su	-0°C
NAA	1N NaOH	Su	+4°C
BAP	1N NaOH	Su	+4°C
KIN	1N NaOH	Su	-0°C
TDZ	Dimetil	Su	+4°C
IBA	Etil alkol	Su	-0°C
GA3	Etil alkol	Su	+4°C

Araştırmada kullanılan BBD’ler 1mg/1 ml stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Bu kimyasalların hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

2,4-D: 10 mg 2,4-D’ye 0,5 ml EtOH damlatılarak çözdürülerek toplam hacim saf su kullanılarak 10 ml’ye tamamlanmıştır. Bu BBD her kullanımda taze olarak hazırlanmıştır.

IAA: 50 mg IAA’ya 1 ml EtOH damlatılarak çözdürülerek toplam hacim saf su kullanılarak 50 ml’ye tamamlanmıştır. -20°C’de muhafaza edilmiştir.

NAA: 50 mg NAA’ya 1 ml 1N NaOH damlatılarak çözdürülerek toplam hacim saf su kullanılarak 50 ml’ye tamamlanmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

BAP: 50 mg BAP’a 1 ml 1N NaOH eklenerek çözdürülerek toplam hacim saf su kullanılarak 50 ml’ye tamamlanmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

KIN: 50 mg KIN’a 1 ml 1N NaOH damlatılarak çözdürülerek toplam hacim saf su kullanılarak 50 ml’ye tamamlanmıştır. -20°C’de muhafaza edilmiştir.

TDZ: 50 mg TDZ’ye 1 ml Dimetil sülfoksit damlatılarak çözdürülerek toplam hacim saf su kullanılarak 50 ml’ye tamamlanmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

IBA: 50 mg IBA’ya 1 ml EtOH damlatılarak çözdürülerek toplam hacim saf su kullanılarak 50 ml’ye tamamlanmıştır. -20°C’de muhafaza edilmiştir.

GA3: 50 mg GA3’e 1 ml EtOH damlatılarak çözdürülerek toplam hacim saf su kullanılarak 50 ml’ye tamamlanmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Mikroçoğaltım ortamlarının hazırlanışı

Mikroçoğaltım ortamının hazırlanması için aşağıdaki adımlar sırasıyla uygulanmıştır:

1. İlk olarak, 1 litrelik bir beherin içine 350 ml saf su eklenmiştir.
2. Ardından, sükroz (30 g/l) ve MES hidrat (1,95 g/l) ilave edilmiştir.
3. Eklenen kimyasallar manyetik karıştırıcı tamamen çözündüğünde, 1N NaOH solüsyonu ile pH=5,8'e ayarlanmıştır.
4. Hazırlanan çözelti, dereceli silindire aktarılmış ve hacim saf su kullanılarak 950 ml'ye tamamlanmıştır.
5. Jel yapıcı madde olarak 7 g/l agar içeren erlene dökülmüş ve otoklavda 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.
6. Otoklavdan sonra, ısıya duyarlı maddeler ilave edilmiştir. Bu amaçla, 100 ml'lik bir beherde MS temel besi ortamı (4,4 g/l) ve deneme planına göre uygun kimyasal Tablo 7'de belirtilen miktarlarda eklenmiş saf su kullanılarak hacim 50 ml'ye tamamlanarak ve karıştırılmıştır. Bu solüsyon, 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtrelerden geçirilerek steril edilmiş ve 50°C'ye kadar soğutulan otoklavlanmış ortama ilave edilmiştir.

Somaklonal varyasyon belirlemede kullanılan çözeltiler

DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

Araştırmada DNA izolasyonu için kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

1M Tris-HCl (1000 ml, pH = 8,0)

121,1 g Tris-base 700 ml saf suda çözündürülmüş ardından 42,0 ml konsantre HCl (%37,2-12,1 M) eklenmiş ve son hacim 1000 ml'ye saf su ile tamamlanarak otoklavlanmıştır.

0.5 M EDTA (1000 ml, PH=8,0)

136,1 g EDTA 800 ml saf su içinde çözündürülmüş ve devamında 20,0 g NaOH ilave edilerek, pH:8,0'a ayarlanmıştır. Ardından son hacim saf su kullanılarak 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavlanmıştır.

5 M NaCl (500 ml)

146,1 g NaCl, 450 ml saf su içinde çözündürülmüş ve toplam hacim 500 ml'ye saf su ile tamamlanmış ve otoklavlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

10X TE Buffer (1000 ml)

880 ml saf su içerisine 20,0 ml 0,5 M EDTA eklenmiş ve ardından 100 ml 1 M Tris-HCl eklenerek pH=8,0'a ayarlanmış ve 1000 ml'ye saf su kullanılarak tamamlanmıştır.

1X TE Buffer (1000 ml)

1X TE Buffer hazırlamak için 10X TE Buffer'dan 100 ml alınmış ve toplam hacim 1000 ml'ye saf su kullanılarak tamamlamıştır. (DNA rnekleri 1X TE Buffer ile çözdürülmüştür)

3 M Sodyum Asetat (100 ml, pH = 5,2)

40,8 g sodyum Asetat 80 ml saf suya çözdürülmüş ve pH = 5,2 oluncaya kadar glasiyel asetik asit (GAA) eklenerek karıştırılmıştır. Ardından, toplam hacim 100 ml'ye saf su kullanılarak tamamlanmıştır.

10 M Amonyum Asetat

77,0 g amonyum asetat 800 ml saf su içinde çözdürülmüş ve son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyon +4°C'de muhafaza edilmiştir.

DNA ekstraksiyon tamponu (50 ml)

1,0 g toz CTAB (setil trimetil amonyum bromür) 20,0 ml saf su içinde ısıtılarak çözdürülmüş ve üzerine 0,5 g (%0,1) sodyum bisülfit ilave edilerek çözdürülmüştür. znen solüsyon üzerine 14 ml NaCl (5 M), 5,0 ml Tris-HCl (1 M), 2,0 ml EDTA (0.5 M) ve 0,1 ml (%0,2) -merkaptetanol eklenmiş son hacim 50 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Ribonükleaz (RNaz) (10 mg/ml)

100 mg ribonükleaz 10,0 ml saf suda çözdürülmüştür.

Proteinaz K (10 mg/ml)

100 mg proteinaz K 10,0 ml saf su yardımıyla çözdürülmüştür.

PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan zeltiler

10X TBE tamponu:

108,0 g Tris-base ve 55,0 g Borik asit 700 ml saf su içinde çözdürülmüş ve çözeltiye 40,0 ml 0,5 M EDTA eklenip son hacim 1000 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

0,5X TBE tamponu:

50,0 ml 10X TBE'den alınarak 950 ml saf su kullanılarak 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Mikroçoğaltım Aşaması

Çalışmada kullanılan alet ve ortam sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan aletler (pens, bistüri, makas vb.) otoklav yardımıyla steril edilmiştir. Yine çalışmada kullanılan steril kabin içi %70'lik etil alkol ile silinmiş canlı bitki materyali hariç kullanılan tüm aletler %70'lik etil alkolden geçirilip steril kabin içine yerleştirilmiştir. Ardından çalışmaya başlamadan en az 20 dakika boyunca UV lambası çalıştırılmıştır. Aynı zamanda çalışma anında bisturi, pens gibi aletler her seferinde etil alkole (%99,5) daldırılıp alevden geçirilerek steril edilmiştir.

Tohumların hazırlanması

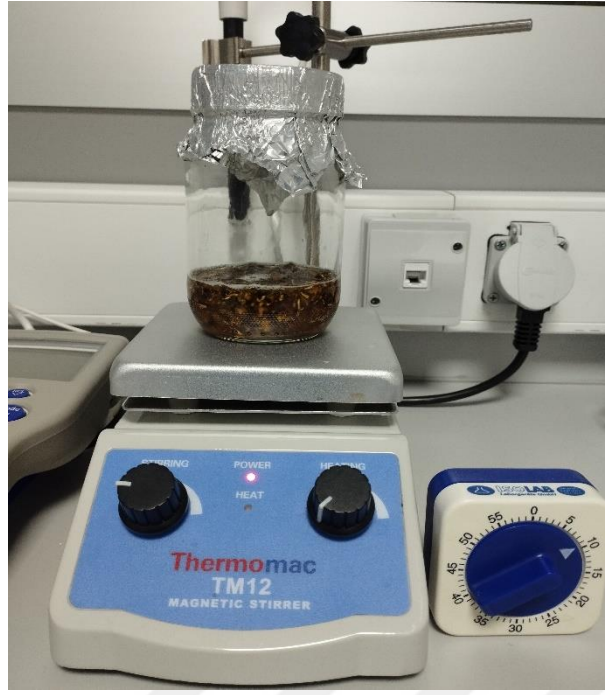
Işkın tohumları sterilizasyon işleminde kullanılan kimyasalların tohuma nüfuzunu engelleyebilecek geniş kanatlı bir yapıya sahiptir. Bu nedenle sterilizasyon işlemi öncesinde tohum kanatları embriyoya zarar vermeden elle çıkarılmıştır (Şekil 8) (Akin *et al.* 2019).



Şekil 8.Tohumların hazırlanması

Tohumların yüzey sterilizasyonu

İlk olarak ışkın tohumları 10 dakika boyunca musluk suyu altında yıkanmıştır. Ardından steril kabin içine alınarak %70'lik etil alkolde 1 dakika süreyle karıştırılmış ve 3 kere otoklavlanmış steril saf su kullanılarak durulanmıştır. Daha sonra içine tohumlar 2-3 damla Tween-20 damlatılmış %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmış (Şekil 9) ve durulanıncaya kadar saf sudan geçirilmiştir. Sterilizasyondan sonra tohumlar distile saf su içinde +4°C'de 24 saat bekletilmiştir.



Şekil 9. Tohumların sterilizasyonu

Besin ortamı ve diğer bileşenlerin sterilizasyonu

MS besi ortamları, 121°C'de 105 kPa basınçta 15 dk süreyle otoklavlanarak, yüksek sıcaklıkta bozulabilen diğer bileşenler (BBD, vitamin vb.) ise 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

İn vitro tohum ve embriyo çimlendirme

Sterilizasyonu yapılmış tohumların olgunlaşmış embriyoları, steril kabin içinde pens ve bistüri yardımıyla embriyoya zarar vermeden çıkartılmıştır. Daha sonra tam tohum ve embriyo eksplantları (Şekil 10) ½ Murashige ve Skoog (MS), (1962) temel besi ortamı, 30 g/l süktroz, 1,95 mg/l MES hidrat, 7 g/l agar, GA3 ve IBA içeren 8 farklı ortamda çimlendirilmek (Tablo 8) amacıyla 25±1C°'de 16:8 saat fotoperiyotta 14 gün boyunca kültüre alınmıştır. Çimlendirmede kullanılan ortamlar ışkın (*Rheum ribes*) ve *Rheum* türlerinde yapılan literatür taramaları sonucunda belirlenmiş ve modifiye edilmiştir (Tuncer ve Günsan, 2017; Khan *et al.* 2022; Singh and Chaturvedi 2022; Tuncer 2021).



Şekil 10. İn vitro çimlendirmede kullanılan tohum ve embriyo eksplantları

Tablo 8. Çimlendirme Denemelerinde Kullanılan Besi Ortamları

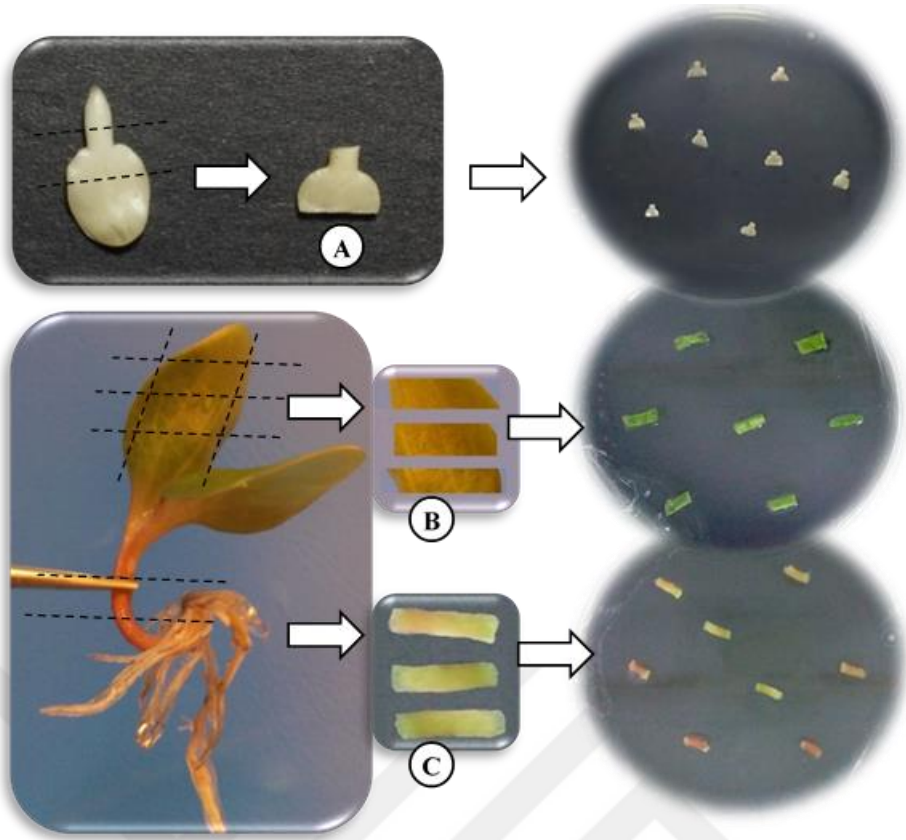
MS	GA3 (mg/l)	IBA (mg/l)
MS	0,0	0,0
MS	0,0	1,0
MS	1,75	0,0
MS	1,75	1,0
½ MS	0,0	0,0
½ MS	0,0	1,0
½ MS	1,75	0,0
½ MS	1,75	1,0

Mikroçoğaltım aşamalarının uygulanışı

Çalışmada mikroçoğaltım iki aşamada yürütülmüştür. Bu aşamalar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

Birinci aşama

Birinci aşamada olgun tohumdan temin edilen embriyo ekseni eksplantı ile in vitro şartlarda çimlendirilen embriyo eksplantından elde edilen 7 günlük fidelerden alınan kotiledon ve hipokotil eksplantları farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarlarını içeren ortam ile kültür şartlarından oluşan 36 farklı yöntemde kültüre alınmıştır (Şekil 11 ve 12).



Şekil 11. Birinci aşamada kullanılan eksplantlar (A) Embriyo ekseni, (B) Kotiledon, (C) Hipokotil.



Şekil 12. Eksplantların kültür edilmesi

Bu çalışmada uygulanan yöntemler, ıskın (*Rheum ribes*) ve *Rheum* cinsine ait diğer *Rheum* türlerinde çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılan yöntemler esas alınarak belirlenmiş ve modifiye edilmiştir (Farzami Sepehr and Ghorbanli 2005; Malik *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011; Kozak and Salata 2011; Rashid *et al.* 2014; Mun and Mun 2016; Tuncer and Günsan 2017; Tabin *et al.* 2018; Wojtania and Mieszcakowska-Fraç 2021; Tuncer 2021; Khan *et al.* 2022; Singh and Chaturvedi 2022). Bu yöntemlerde MS temel besi ortamı, 30 g/l sükröz, 7 g/l

agar+ 1,95 g/l MES hidrat ve 0,7 mg/l PVP'ye ilave olarak kullanılan BBD'leri Tablo 9'da verilmiştir. 1- 29 nolu yöntemlerde eksplantlar, karanlıkta ve $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 14 gün boyunca kültüre alınmıştır. 14. günün sonunda ise 16 saat fotoperiyotta ($32\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de aynı ortamda 21 gün süreyle alt kültüre alınmıştır. 30-36 nolu yöntemler ise 35 gün süreyle karanlıkta ve $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 14 gün boyunca kültüre alınmıştır. Bu yöntemlerde eksplantlar 15. Günde aynı ortamda alt kültüre alınmıştır. Bu aşamada her petri kabı bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve her petri kabına 10 adet eksplant ekilmiştir. Ayrıca bu aşama tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 9. 1. Aşamada Kullanılan Yöntemlerin Ortam İçeriği

Yöntem	BDD Kombinasyonu (mg/l)
1	1.0 NAA
2	2.0 NAA
3	1.0 BAP
4	2.0 BAP
5	3.0 BAP
6	1.0 KIN
7	2.0 KIN
8	3.0 KIN
9	2.0 BAP + 1.0 KIN + 0.5 TDZ + 1.0 GA3
10	2.0 BAP + 0.5 NAA
11	3.0 BAP + 2.0 NAA
12	3.0 BAP + 1.0 NAA
13	3.0 BAP + 0.2 NAA + 1.0 GA3
14	4.0 BAP + 0.2 NAA+1.0 GA3
15	5.0 BAP+0.2 NAA+1.0 GA3
16	6.0 BAP+0.2 NAA+1.0 GA3
17	3.0 KIN + 1.0 NAA
18	3.0 KIN + 0.2 NAA + 1.0 GA3
19	4.0 KIN + 2.0 NAA
20	4.0 KIN + 0.2 NAA + 1.0 GA3
21	5.0 KIN + 0.2 NAA + 1.0 GA3
22	6.0 KIN + 0.2 NAA + 1.0 GA3
23	4.0 BAP + 1.0 2,4-D
24	5.0 BAP + 2.0 2,4-D
25	2.0 BAP + 1.0 IBA
26	3.0 BAP + 2.0 IBA
27	3.0 BAP + 1.0 IBA
28	3.0 BAP + 0.5 IBA
29	2.0 KIN + 1.0 IBA
30	0.5 BAP + 0.5 KIN + 1.0 2,4-D
31	1.0 BAP + 1.0 2,4-D
32	1.0 BAP + 2.0 2,4-D
33	2.0 BAP + 1.0 2,4-D
34	2.0 BAP + 2.0 2,4-D
35	2.0 KIN + 2.0 2,4-D
36	1.0 BAP + 1.0 KIN+1.0 2,4-D

İkinci aşama

Birinci aşamada embriyo ekseni, hipokotil ve kotiledon eksplantlarından 30 nolu yöntemde 14. günde elde edilen kalluslar [embriyo ekseni kaynaklı kallus (E-kallus), hipokotil kaynaklı kallus (H-kallus) ve kotiledon kaynaklı kallus (K-kallus)] bu aşamada eksplant olarak kullanılmıştır. Bu aşamada uygulanan ortamlar (Tablo 10), ıskın (*Rheum ribes*) ve *Rheum* cinsine ait diğer *Rheum* türlerinde çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılan yöntemler esas alınarak belirlenmiş ve modifiye edilmiştir (Rashid *et al.* 2014; Mun and Mun 2016; Tuncer ve Günsan, 2017; Tabin *et al.* 2018; Tuncer 2021; Wojtania and Mieszczaowska-Fraç, 2021; Khan *et al.* 2022; Singh and Chaturvedi 2022).

Bu ortamlarda MS temel besi ortamı, 30 g/l süzkroz, 7 g/l agar+ 1,95 g/l MES hidrat ve 0,7 mg/l PVP'ye ilave olarak kullanılan BBD'ler Tablo 10'da verilmiştir. Eksplantlar, karanlıkta ve 25±1°C sıcaklıkta 14 gün boyunca kültüre alınmıştır. 14. günün sonunda ise 16 saat fotoperiyotta (32 µmol/m²s) 25±1°C'de aynı ortamda 21 gün süreyle alt kültüre alınmıştır.

Tablo 10. Mikroçoğaltımın 2.Aşamasında Kullanılan Ortamlardaki BBD Kombinasyonu

Ortam	BBD kombinasyonu mg/l
1	2,0 BAP + 0,5 TDZ
2	2,0 BAP + 0,2 NAA + 1,0 GA3
3	2,0 BAP + 0,1 IAA + 1,0 GA3
4	2,0 BAP + 0,1 NAA+ 0,1 IAA
5	2,0 BAP + 2,0 KIN + 0,2 NAA + 1,0 GA3
6	2,0 BAP + 2,0 KIN + 1,0 GA3
7	3,0 BA P + 0,1 KIN+ 0,1 IAA
8	2,0 BAP + 1,0 IBA

Sürgünlerin köklendirilmesi

Yaklaşık 2-2,5 cm uzunluğuna ulaşan sürgünler 1 mg/l IBA içeren ½ MS temel besi ortamı, 30 g/l süzkroz, 7 g/l agar+ 1,95 g/l MES hidrat ortamında magenta kutularında köklendirilmiştir (Farzami Sepehr and Ghorbanli 2005).

Rejenere bitkilerin dış ortama alıştırılması

Elde edilen bitkilerin in vitro kültür ortamından alınarak dış ortama adaptasyonu gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin kök kısımlarından besi ortamı kalıntılarını uzaklaştırmak için musluk suyu altında kök kısmına zarar vermeyecek şekilde yıkanmıştır. Kök kısımları yıkanan bitkiler 1:1 torf ve toprak içeren küçük saksılara dikilerek üzerleri naylon torba ile örtülmüş ve saksı altında ¼ Hoagland solüsyonuyla (Hoagland and Arnon 1950) sulanmıştır. Saksılardaki bitkiler, iklim odasında 25±1°C'de 16 saatlik fotoperiyotta büyütölmeye devam edilmiştir. 1 hafta sonunda naylon torbalar, kademeli olarak delinmiştir. 10 günün sonunda, ilk günlerde

günde 1-2 saat, daha sonra 4-5 saat ve 4 hafta sonra tamamen kaldırılarak genç bitkiler ortam şartlarına alıştırılmıştır. Daha sonra aklimize edilen bitkiler saksıları değiştirilerek dış ortama aktarılmıştır.

Araştırmada incelenen doku kültürü parametreleri

Araştırmada aşağıda formülleri verilen parametrelere ait veriler incelenmiştir (Tüncer ve Gürsan 2017; Farzami Seper and Ghorbanli, 2005; Malik *et al.* 2010; Kazak and Salata 2011; Tabin *et al* 2016, 2018).

- a. Kallus oluşum oranı (KOO) (%) = (Toplam kallus sayısı / Toplam eksplant sayısı) x 100,
- b. Direkt organogenesis oranı (DOO) (%) = (Direkt sürgün veya kök oluşturan eksplant sayısı / Toplam eksplant sayısı) x 100,
- c. İndirekt organogenesis oranı (İOO) (%) = (İndirekt sürgün veya kök oluşturan eksplant sayısı / Toplam eksplant sayısı) x 100,
- d. Direkt Somatik embriyogenesis oranı (DSEO) (%) = (Direkt somatik embriyogenesis oluşturan eksplant sayısı / Toplam eksplant sayısı) x 100,
- e. İndirekt Somatik embriyogenesis oranı (İSEO) (%) = (İndirekt somatik embriyogenesis oluşturan eksplant sayısı / Toplam eksplant sayısı) x 100,
- f. Direkt organogenesis kaynaklı eksplant başına bitki sayısı (DOBS) (adet/eksplant) = (Direkt organogenesis kaynaklı bitki sayısı / Toplam eksplant sayısı)
- g. İndirekt organogenesis kaynaklı eksplant başına bitki sayısı (İOBS) (eksplant/adet) = (İndirekt organogenesis kaynaklı bitki sayısı / Toplam eksplant sayısı)
- h. Direkt somatik embriyogenesis kaynaklı eksplant başına bitki sayısı (DSEBS) (eksplant/adet) DSEBS = (Direkt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki sayısı / Toplam eksplant sayısı)
- i. İndirekt somatik embriyogenesis kaynaklı eksplant başına bitki sayısı (İSEBS) (eksplant/adet) İSEBS = (indirekt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki sayısı/Toplam eksplant sayısı)
- j. Eksplant başına bitki sayısı (EBBS) (eksplant/adet) EBBS = (Toplam rejenere bitki sayısı / Toplam eksplant sayısı)

Somaklonal varyasyonun belirlenmesi

Araştırmada, 1. ve 2. aşamada EBBS bakımından en yüksek rejenere bitki sayısının meydana geldiği sistemlerden elde edilen bitkilerin genetik kararlılıkları SCoT moleküler markör tekniği ile belirlenmiştir. Araştırmada bulk DNA örnekleme stratejisi uygulanmıştır (Reyes-Valde's *et al.* 2013). Bunun için her rejenerasyon sistemi için her tekerrürden şansa bağlı olarak seçilen 3 toplamda 12 bitkinin yaprağı alınmış ve karıştırılmıştır. Sıvı azot içerisinde dondurulan yaprak örnekleri DNA izalasyonu edilinceye kadar -80°C'de depolanmıştır.

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu aşağıda verilen protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir;

1. 0,3 g bitki örneği tartılarak sıvı azot yardımıyla havan içinde öğütülmüş ve 2 ml'lik ependorf tüpler içine alınmıştır.
2. Daha sonra örnekler çalışmadan önce hazırlanmış ve 65°C'de su banyosunda bekletilmiş 1 ml DNA ekstraksiyon tamponu eklenerek 1 saat boyunca su banyosunda 65°C'de inkübe edilmiştir. (Her 10 dakikada bir alt üst edilmiştir)
3. 1 saatin sonunda tüpler su banyosundan alınarak 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra her bir tüpe 750 µl kloroform:izoamil alkol eklenerek 15 dakika boyunca yavaşça alt üst edilerek karıştırılmış ve 14000 rpm'de ve 24°C'de 20 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
4. Santrifüj işleminden sonra ve üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 750 µl kloroform izoamil alkol eklenmiş ve 14000 rpm'de ve 4°C'de 20 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır.
5. Ardından üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 2,5 µl RNaz (10 mg/ml) ve 8 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek 45 dakika boyunca 37°C'de bekletilmiştir.
6. DNA çökeltisi elde etmek için her tüpe 100 µl amonyum asetat, 100 µl sodyum asetat (3M) ve hacmin iki buçuk katı kadar -20°C'de muhafaza edilen izopropanol eklenmiş ve 14000 rpm'de ve 4°C'de 20 dakika boyunca santrifüj yapılmış ve üst faz atılmıştır.
7. Ardından, 37°C'de 15 dakika boyunca kurutulduktan 100 µl 1×TE tamponu eklenerek çözdürülmüştür.
8. Elde edilen DNA örnekleri kullanıma kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

SCoT analizi

Çalışmada Kullanılan SCoT Primerlerin Hazırlanışı:

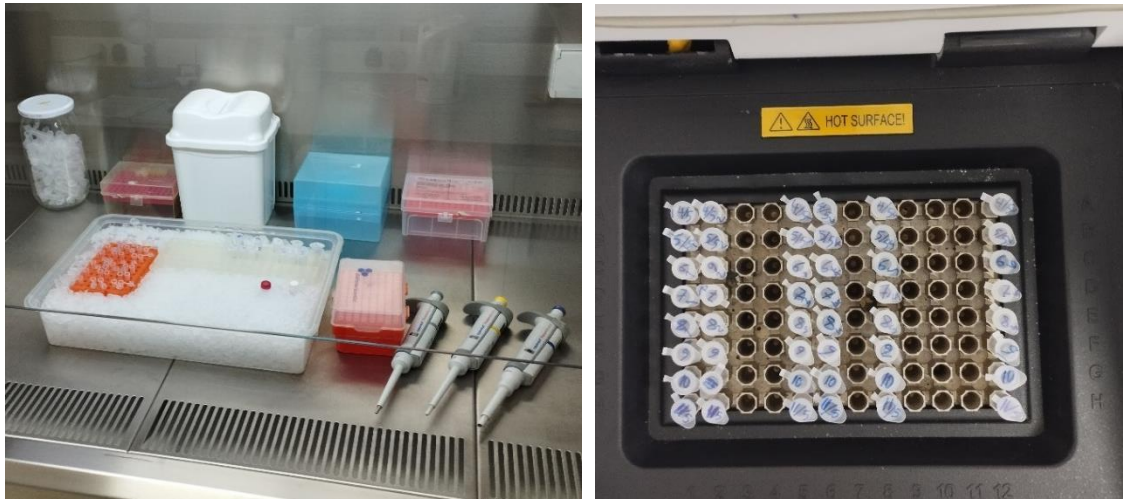
Çalışmada 30 adet SCoT primeri kullanılmıştır (Xia *et al.* 2014). SCoT primerleri yapılan literatür araştırmaları ile belirlenmiştir (Collard and Mackill 2009). SCoT primer dizilimleri Tablo 6'da gösterilmiştir. Kullanılan primerler üretici firmanın talimatları esas alınarak 100 μM olacak şekilde sulandırılmış ve stok primer hazırlanmıştır. Ardından, uygun hesaplamalar yapılarak 1 μM konsantrasyonda çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

SCoT-PCR işleminin uygulanması

SCoT analizi Tablo 11'de verilen PCR işlemi ve PCR şartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 13).

Tablo 11. SCoT PCR Bileşenleri, Miktarları ve PCR Şartları

PCR bileşeni		Miktar
Taq DNA Master Mix (2X)	:	8,0 μl
Primer (10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$)	:	1,0 μl
Ultra saf su	:	5,0 μl
Kalıp DNA (10 ng/ μL)	:	1,0 μl
Toplam	:	15 μl
PCR Şartları		
Ön ayrışma	:	95°C 5 dk.
Ayrışma	:	94°C 1 dk
Bağlanma	:	54-63°C 1 dk
Uzama	:	72°C 1,5 dk.
Final uzama	:	72°C 10 dk.
Bekletme	:	+4°C ∞

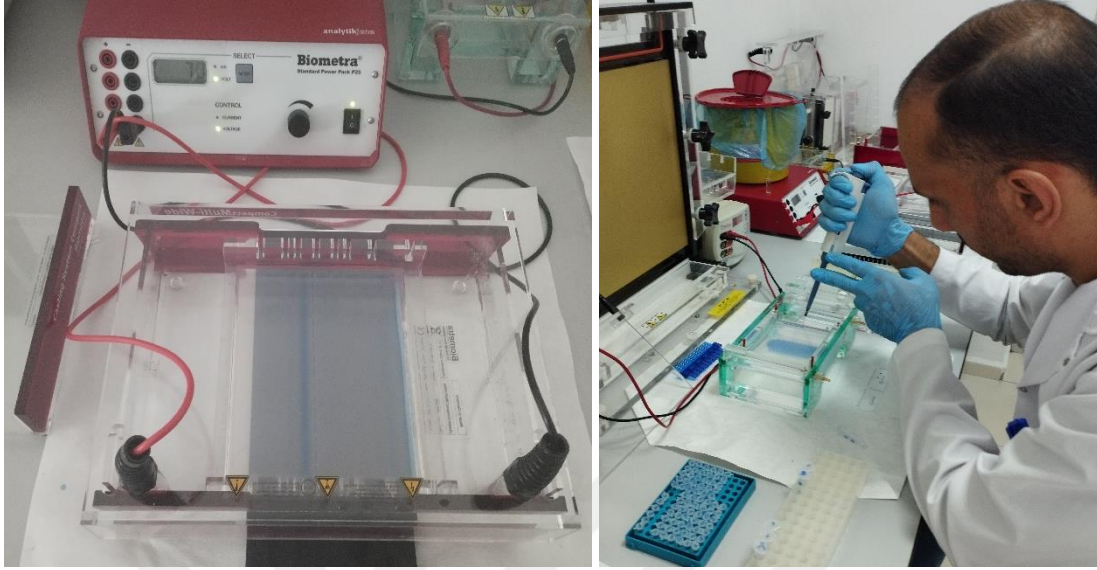


Şekil 13. PCR işleminin hazırlanışı ve uygulanması.

Elektroforez işlemi

150 ml 1X TBE içeren erlene 1,5 g agaroz eklenmiş mikrodalgada 4 dakika boyunca çözdürülmüştür. Ardından 5 μl etidyum bromür (EtBr) eklenerek karıştırılmış ve önceden

hazırlanan jel tankına dökülmüştür. Jelin donmasının ardından elde edilen SCoT PCR ürünlerinden 10 μ L alınarak 3 μ L 6x loadin buffer karıştırılıp kuyucuklara yüklenmiştir. İlk kuyucuğa DNA ladder yüklenmiştir. Jel 70 voltta 1,5 saat yürütülmüştür (Şekil 14).



Şekil 14. Jel Elektroforez işleminin uygulanması.

İstatistiksel Analizler

Araştırmanın 1. aşamada incelenen parametrelere ait veriler 3 (eksplant tipi) x 36 (yöntem) faktöriyel düzende, ikinci aşamada incelenen parametrelere ait veriler ise 3 (eksplant tipi) x 8 (ortam) faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. İstatistik analizler Minitab 19 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır.

SCoT amplifikasyon bantlarında Total Lab TL120 bilgisayar programı yardımıyla var (1) veya yok (0) olacak şekilde ikili matris oluşturulmuştur. Elde edilen veriler NTSYSpc 2.11 paket programıyla analiz işlemine tabi tutulmuştur. İkili matrislerden SIMQUAL modülü kullanılarak Jaccard benzerlik katsayısı hesaplanmıştır. Benzerlik katsayılarından SAHN modülü kullanılarak UPGMA (aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu) yöntemiyle dendrogram oluşturulmuştur. Her primer için Polimorfizm bilgi içeriği (PIC), ayırt etme gücü (D) ve çözme gücü (R) online iMEC yazılımı ile belirlenmiştir (Amiryousefi *et al.* 2018).

ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu araştırmada, *Rheum ribes* (ışkın)'te farklı eksplantlardan somatik embriyogenesis ve/veya organogenesis yoluyla etkili ve tekrarlanabilir bir in vitro mikroçoğaltım sistemi belirlenmiştir. Yine araştırmada, in vitro şartlarda oluşması muhtemel somaklonal varyasyonlar dikkate alınarak, in vitro rejenere bitkilerin genetik kararlılıkları SCoT markör tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Mikroçoğaltım çalışmaları iki aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada olgun tohumdan temin edilen embriyo eksenli eksplantı ile in vitro şartlarda çimlendirilen embriyo eksplantından elde edilen 7 günlük fidelerden alınan kotiledon ve hipokotil eksplantları farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarlarını içeren ortam ile kültür şartlarından oluşan 36 farklı yöntemde kültüre alınmıştır. İkinci aşamada ise, birinci aşamada tüm eksplantlarda en iyi kallus oluşumunun meydana geldiği ortam ve kültür şartından elde edilen (30 nolu yöntem) embriyo eksenli, kotiledon ve hipokotil kaynaklı kalluslar eksplant olarak kullanılmış ve bu eksplantlar 8 farklı ortamda kültüre alınmıştır. Her iki aşama sonunda rejenerasyon etkinliği bakımından en iyi olan sistemler belirlenmiş (15 adet) ve bu sistemlerde meydana gelen rejenere bitkilerin genetik kararlılığı 20 adet SCoT primeri kullanılarak tespit edilmiştir. Bu araştırmada elde edilen bulgular aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Mikroçoğaltım

Birinci aşama

In vitro çimlendirme

Çimlenme oranı ve çimlenme süresi üzerine farklı güçteki temel besi ortamı (MS veya ½ MS) ile GA3 (0 ve 1,75 mg/l) ve IBA (0,0 ve 1,0 mg/l)'nin farklı konsantrasyonlarından oluşan ortamın ve çimlendirme için kullanılan eksplantın (tohum ve embriyo) ana etkileri ile bunların interaksiyonunun etkisi önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Tablo 12). Çimlenme oranı bakımından embriyolar (%69,38) tohuma göre (%54,38) daha yüksek bir çimlenme oranına sahip olmuştur. Ortamın ana etkisi bakımından, en yüksek çimlenme %88,75 ile ½ MS + 1,75 mg/l GA3 + 1,0 mg/l IBA içeren ortamda meydana gelmiştir. Eksplantların çimlenme oranının ortamlara göre değişmesi eksplant $\times$ ortam interaksiyon etkisinin önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur. Embryo eksplantının çimlenme oranı %47,50 ile %100,0 arasında değişirken, tohum eksplantının çimlenme oranı %27,50 ile %77,50 arasında değişim göstermiştir (Tablo 12, Şekil 15). Her iki eksplantta da (tohum için %77,5 ve embriyo için %100) en yüksek

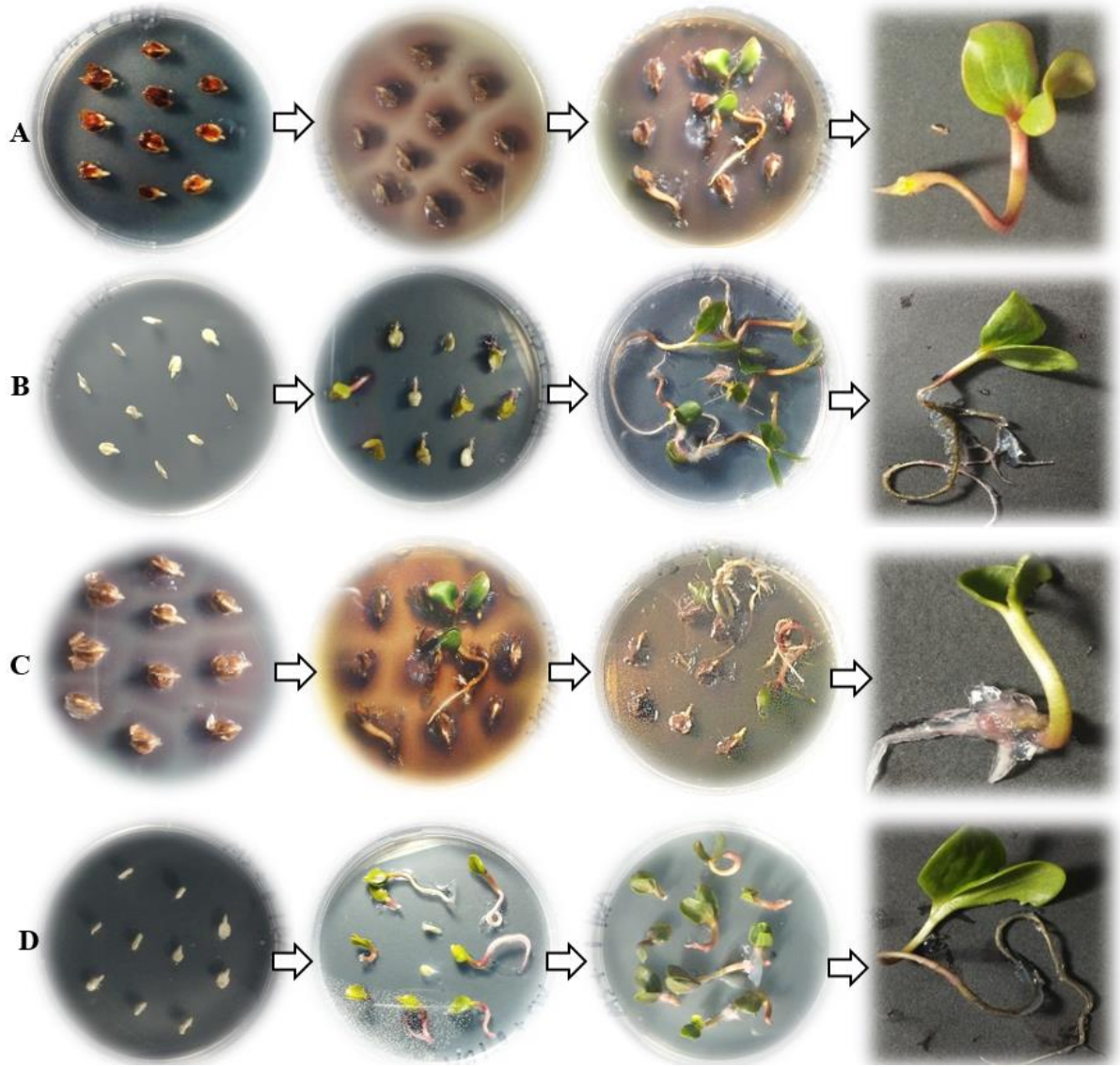
çimlenme oranı ½ MS + 1,75 mg/l GA3 + 1,0 mg/l IBA ortamında tespit edilmiştir. Diğer taraftan, her iki eksplanta da en düşük çimlenme BBD içirmeyen MS ortamında meydana gelmiştir (Tablo 12).

Ortalama çimlenme süresi bakımından embriyolar (7,47 gün) tohuma göre (10,16 gün) daha kısa sürede çimlenmiştir. Eksplantın ortalamasına göre en kısa sürede çimlenme 6,75 gün ile ½ MS + 1,75 mg/l GA3 + 1,0 mg/l IBA ortamında gerçekleşmiştir. Eksplantların ortalama çimlenme süresi ortam içeriğine göre değişmiş ve ExO interaksyonu önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Tablo 12). Ortalamalara göre, tohum eksplantının ortalama çimlenme süresi 7,25-13,75 gün arasında değişirken, embriyo eksplantında bu süresinin 6,25-8,75 gün arasında olduğu belirlenmiştir. Her iki eksplantta da (tohum için 7,25 gün ve embriyo için 6,5 gün) en kısa çimlenme süresi yine ½ MS + 1,75 mg/l GA3 + 1,0 mg/l IBA ortamında tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre ½ MS + 1,75 mg/l GA3 + 1,0 mg/l IBA ortamında embriyodan oluşan bitkilerin kotiledon ve hipokotil eksplantları mikroçoğaltımın 1. aşamasında eksplant olarak kullanılmıştır (Şekil 15).

Tablo 12. Tohum ve Embriyo Eksplantlarının Farklı Ortamlara Göre Çimlenme Oranı (%) ve Ortalama Çimlenme Süreleri (gün)¹.

	Ortam		Çimlenme oranı (%)			Ortalama çimlenme süresi (gün)		
MS	GA3 (mg/l)	IBA (mg/l)	Tohum	Embriyo	Ortalama	Tohum	Embriyo	Ortalama
MS	0,0	0,0	27,50 ^e	47,50 ^e	37,50^d	13,75 ^a	8,75 ^a	11,25^a
MS	0,0	1,0	40,00 ^d	60,00 ^d	50,00^c	12,25 ^b	8,00 ^{abc}	10,13^b
MS	1,75	0,0	52,50 ^c	52,50 ^{de}	52,50^c	11,00 ^c	7,25 ^{cde}	9,13^c
MS	1,75	1,0	67,50 ^{ab}	70,00 ^c	68,75^b	10,25 ^{cd}	7,00 ^{cde}	8,63^{cd}
½ MS	0,0	0,0	57,50	52,50 ^{de}	55,00^c	9,75 ^d	8,50 ^{ab}	9,13^c
½ MS	0,0	1,0	60,00 ^{bc}	80,00 ^b	70,00^b	9,25 ^d	7,50 ^{bcd}	8,38^d
½ MS	1,75	0,0	52,50 ^c	92,50 ^a	72,50^b	7,75 ^e	6,50 ^{de}	7,13^e
½ MS	1,75	1,0	77,50 ^a	100,00 ^a	88,75^a	7,25 ^e	6,25 ^e	6,75^e
Ortalama			54,38^B	69,38^A		10,16^A	7,47^B	
F değeri (Eksplant -E)			-	-	230,40**	-	-	528,29**
F değeri (Ortam-O)			51,33**	124,43**	133,03**	86,84**	14,84**	79,35**
F değeri (E×O)			-	-	15,63**	-	-	22,33**
VK (%)			7,96	5,09		4,61	6,26	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir. ($p>0,05$)



Şekil 15. Tohum ve embriyo eksplantlarında in vitro çimlenme A: Tohum ile MS + 0 mg/l GA3 + 0 mg/l IBA, B: Embriyo ile ½ MS + 1,75 mg/l GA3 + 1 mg/l IBA, C: Tohum ile MS + 0 mg/l GA3 + 1 mg/l IBA, D: Embriyo ile ½ MS + 1,75 mg/l GA3 + 0 mg/l IBA.

Kallus oluşum oranı (KOO%)

Eksplantlar ve yöntemlere bağlı olarak farklı yapıda ve renkte kallus oluşumları gözlenmiştir. Genel olarak yeşil ve açık yeşil kalluslarda somatik embriyogenesis ve organogenesisin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Öte yandan, sarı, beyaz renkli ve sulu yapılı kalluslar gevşek ve yumuşak görünümünde olduğu; kırmızı renkli kallusların ise canlı olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 13, Şekil 16).

Araştırmada, üç farklı eksplant tipi (embriyo ekseni, hipokotil ve kotiledon) ile 36 farklı yöntemin kallus oluşumu üzerindeki etkileri karşılaştırılmış ve KOO üzerine eksplant tipinin, yöntemin ve bunların interaksiyonunun etkisinin önemli ($p < 0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13).

Eksplantın ana etkisi değerlendirildiğinde, ortalama KOO oranı, kotiledon için %73,3, hipokotil için %72,9 ve embriyo eksenini için %67,2 olarak bulunmuştur. KOO bakımından kotiledon ile hipokotil arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olurken, bu eksplantlarla embriyo eksenini arasındaki fark önemli ($p<0,01$) olmuştur. Eksplantların ortalamasına göre en yüksek ortalama kallus oluşumu oranı %100,0 ile 30 nolu yöntemde ve en düşük ortalama kallus oluşumu oranı %35,0 ile 12 nolu yöntemde gözlenmiştir. Eksplantların kallus oluşum oranlarının yönetime göre değişim göstermesi E×Y interaksiyonun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur. Yöntemlere göre embriyo eksplantının kallus oluşum oranı %17,5 ile %100 arasında, hipokotil eksplantının %25,0 ile %100,0 arasında ve kotiledon eksplantının ise %42,5 ile %100 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 13). Tüm eksplantlarda en yüksek kallus oluşumu %100 ile 30 nolu yöntemde belirlenirken, en düşük kallus oluşum oranı ise embriyo ekseninde 12 nolu yöntem’de %17,5 olarak tespit edilmiştir (Tablo 13).

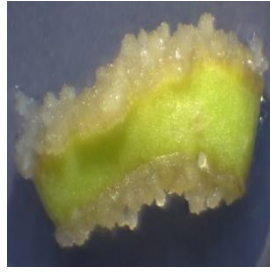
Tablo 13. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre KOO (%) ve Renkleri¹

Yöntem	KOO %				Kallus rengi		
	Embriyo eksenini	Hipokotil	Kotiledon	Ortalama	Embriyo eksenini	Hipokotil	Kotiledon
1	45,0 ^{ijk}	57,5 ^{f-e}	55,0 ^{j-m}	52,5 ^{kl}	AS	B	AS
2	35,0 ^k	45,0 ^{ij}	67,5 ^{g-j}	49,2 ^{lm}	AS	S	S
3	32,5 ^k	42,5 ^{ij}	47,5 ^{lm}	40,8 ^{mn}	AK	S	AK
4	65,0 ^{e-h}	55,0 ^{ghi}	57,5 ^{i-l}	59,2 ^{ijk}	S	AS	AS
5	52,5 ^{hij}	67,5 ^{d-g}	70,0 ^{f-i}	63,3 ^{hij}	B	Y	AY
6	62,5 ^{fgh}	25,0 ^k	42,5 ^m	43,3 ^{mn}	KR	KR	Y
7	57,5 ^{ghi}	35,0 ^{jk}	52,5 ^{klm}	48,3 ^{lm}	B	AS	AS
8	52,5 ^{hij}	55,0 ^{ghi}	57,5 ^{i-l}	55,0 ^{ikl}	B	S	B
9	87,5 ^{abc}	85,0 ^{abc}	77,5 ^{d-g}	83,3 ^{c-f}	S	S	S
10	65,0 ^{e-h}	85,0 ^{abc}	82,5 ^{c-f}	77,5 ^{fg}	AS	B	AS
11	57,5 ^{ghi}	62,5 ^{e-h}	62,5 ^{h-k}	60,8 ^{ijk}	K	AKR	KR
12	17,5 ^l	45,0 ^{ij}	42,5 ^m	35,0 ⁿ	AY	B	AY
13	92,5 ^{ab}	92,5 ^{ab}	87,5 ^{a-d}	90,8 ^{bcd}	AK	AY	Y
14	87,5 ^{abc}	85,0 ^{abc}	95,0 ^{ab}	89,2 ^{b-e}	AS	AS	B
15	92,5 ^{ab}	87,5 ^{abc}	92,5 ^{abc}	90,8 ^{bcd}	B	B	AS
16	75,0 ^{c-f}	95,0 ^{ab}	87,5 ^{a-d}	85,8 ^{b-f}	K	K	Y
17	72,5 ^{def}	75,0 ^{cde}	67,5 ^{g-j}	71,7 ^{gh}	AS	AS	AS
18	65,0 ^{e-h}	85,0 ^{abc}	62,5 ^{h-k}	70,8 ^{gh}	S	S	S
19	55,0 ^{g-j}	67,5 ^{d-g}	67,5 ^{g-j}	63,3 ^{hij}	B	B	B
20	77,5 ^{cde}	82,5 ^{bcd}	85,0 ^{b-e}	81,7 ^{ef}	AK	B	AS
21	85,0 ^{bcd}	92,5 ^{ab}	67,5 ^{g-j}	81,7 ^{ef}	S	AS	S
22	72,5 ^{def}	95,0 ^{ab}	87,5 ^{a-d}	85,0 ^{b-f}	Y	AY	AY

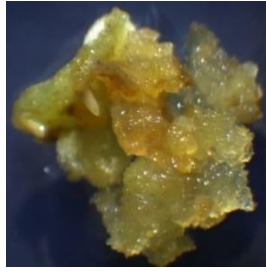
Tablo 13. (Devamı)

23	75,0 ^{c-f}	85,0 ^{abc}	72,5 ^{e-h}	77,5^{fg}	AS	AS	B
24	65,0 ^{e-h}	57,5 ^{f-e}	62,5 ^{h-k}	61,7^{ij}	B	B	AS
25	75,0 ^{c-f}	95,0 ^{ab}	85,0 ^{b-e}	85,0^{b-f}	S	S	B
26	42,5 ^{jk}	47,5 ^{hij}	57,5 ^{i-l}	49,2^{lm}	AS	B	B
27	45,0 ^{ijk}	75,0 ^{cde}	65,0 ^{g-k}	61,7^{ij}	B	AS	AS
28	67,5 ^{efg}	87,5 ^{abc}	92,5 ^{abc}	82,5^{def}	AS	AY	AY
29	65,0 ^{e-h}	75,0 ^{cde}	72,5 ^{e-h}	70,8^{gh}	S	K	S
30	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0^a	AY	Y	AY
31	75,0 ^{c-f}	72,5 ^{c-f}	85,0 ^{b-e}	77,5^{fg}	B	KR	B
32	55,0 ^{g-j}	82,5 ^{bcd}	65,0 ^{g-k}	67,5^{hi}	KR	S	KR
33	72,5 ^{def}	62,5 ^{e-h}	95,0 ^{ab}	77,5^{fg}	AS	AS	AS
34	95,0 ^{ab}	97,5 ^{ab}	92,5 ^{abc}	95,0^{ab}	B	S	S
35	95,0 ^{ab}	87,5 ^{abc}	92,5 ^{abc}	91,7^{abc}	Y	AY	Y
36	85,0 ^{bcd}	82,5 ^{bcd}	87,5 ^{a-d}	85,0^{b-f}	AS	B	B
Ortalama	67,2^B	72,9^A	73,3^A				
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	60,35^{**}			
F değeri (Yöntem-Y)	52,44 ^{**}	48,23 ^{**}	42,17 ^{**}	120,27^{**}			
F değeri (E×Y)	-	-	-	11,66^{**}			
VK (%)	7,73	7,69	6,63				

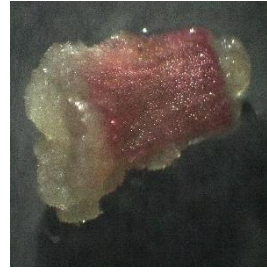
¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05). **B**: Beyaz, **Y**: Yeşil, **AY**: Açık Yeşil, **S**: Sarı, **AS**: Açık Sarı, **K**: kırmızı, **AK**: Açık Kırmızı, **K**: Kırmızı, **KR**: Kahverengi, **AKR**: Açık Kahverengi



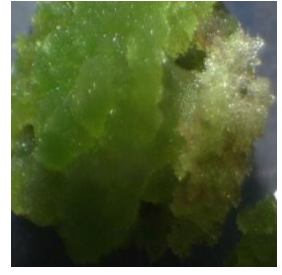
K-1.Yöntem



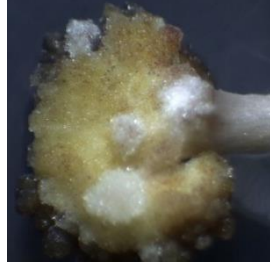
E-2.Yöntem



H-3.Yöntem



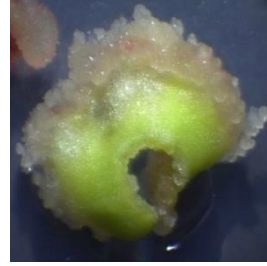
H-4.Yöntem



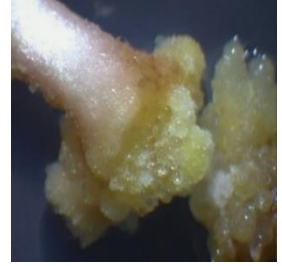
H-5.Yöntem



E-6.Yöntem



K-7.Yöntem



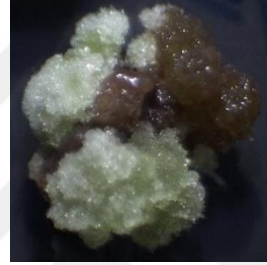
H-8.Yöntem



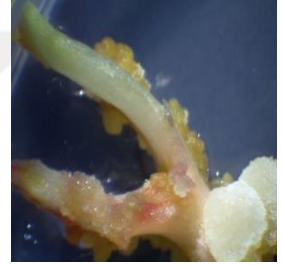
H-9.Yöntem



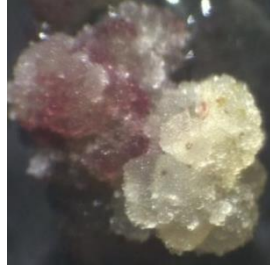
H-10.Yöntem



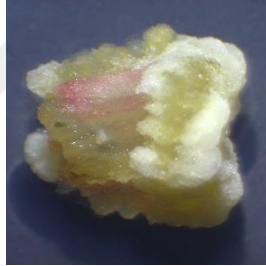
K-11.Yöntem



E-12.Yöntem



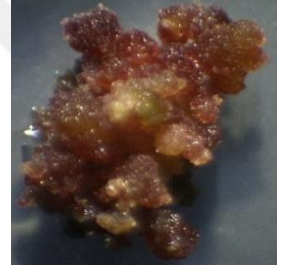
H-13.Yöntem



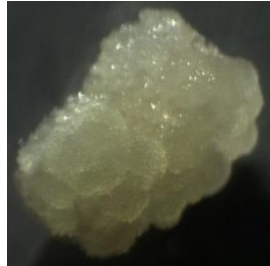
H-14.Yöntem



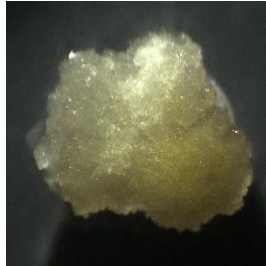
H-15.Yöntem



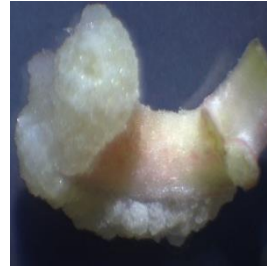
K-16.Yöntem



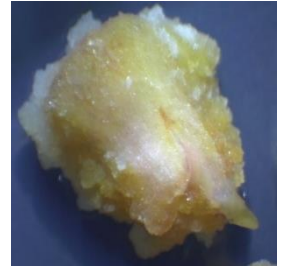
H-17.Yöntem



K-18.Yöntem



E-19.Yöntem



H-20.Yöntem

Şekil 16. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen kallusların görünümü (Eksplant-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo eksen. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9'da verilmiştir.



K-21.Yöntem



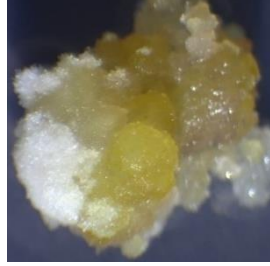
K-22.Yöntem



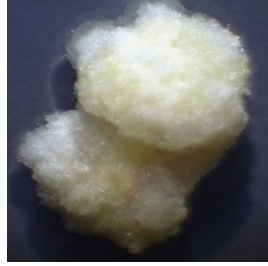
E-23.Yöntem



E-24.Yöntem



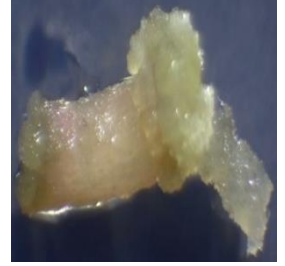
H-25.Yöntem



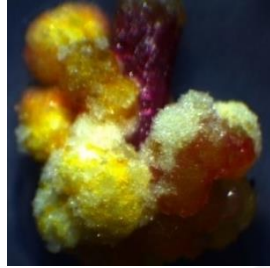
H-26.Yöntem



H-27.Yöntem



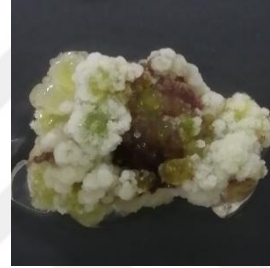
H-28.Yöntem



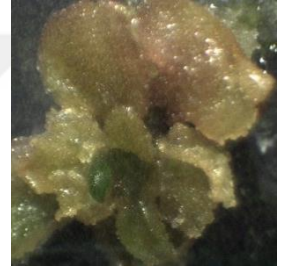
H-29.Yöntem



H-30.Yöntem



K-31.Yöntem



E-32.Yöntem



H-33.Yöntem



K-34.Yöntem



H-35.Yöntem



K-36.Yöntem



E-30.Yöntem



H-30.Yöntem



K-30.Yöntem

Şekil 16. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen kallusların görünümü (Eksplant-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo ekseni. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9'da verilmiştir. (Devamı)

Organogenesis oranı (%)

Direkt organogenesis oranı (DOO) (%), kullanılan eksplantların kallus oluşturmada direkt sürgün veya kök oluşturma yeteneğinin bir ölçüsüdür. Araştırmada, eksplant tipinin ana etkisi önemli ($p<0,01$) bulunmuştur. Yöntemlerin ortalamasına göre eksplantların DOO değerlendirildiğinde, en yüksek DOO %12,6 ile embriyo ekseninde elde edilirken bunu sırasıyla %8,8 ile hipokotil ve %8,2 ile kotiledon eksplantları izlemiştir (Tablo 14). DOO bakımından yöntemler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 14). Yöntemlerin 23 tanesinde (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 36 nolu yöntemler) direkt organogenesis meydana gelmemiş, meydana gelen yöntemlerin DOO ise %10,0 (14 nolu yöntem) ile %59,2 (13 nolu yöntem) arasında değişmiştir (Tablo 14, Şekil 17).

Eksplantların DOO yönteme göre değişim göstermesi E×Y interaksiyonun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Tablo 14). Her üç eksplant tipinde de 23 yöntemde (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 36 nolu yöntemler) direkt organogenesis meydana gelmemiştir. Direkt organogenesis meydana gelen yöntemlere göre embriyo eksenini için DOO %10,0 (29 nolu yöntem) ile %97,5 (12 nolu yöntem) arasında, hipokotil için %10,0 (4, 15 ve 27 nolu yöntemler) ile %50,0 (13 ve 25 nolu yöntemler) ve kotiledon için %10,0 (4, 10, 15, 27, 28 ve 29 nolu yöntemler) ile %47,5 (13 nolu yöntem) arasında değişim göstermiştir (Tablo 14, Şekil 17).

Tablo 14. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre DOO (%)¹

Yöntem	DOO (%)			
	Embriyo ekseni	Hipokotil	Kotiledon	Ortalama
1	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
2	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
3	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
4	20,0 ^f	10,0 ^e	10,0 ^e	13,3 ^f
5	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
6	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
7	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
8	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
9	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
10	30,0 ^e	27,5 ^c	10,0 ^e	22,5 ^e
11	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
12	97,5 ^a	30,0 ^{bc}	20,0 ^d	49,2 ^b
13	80,0 ^b	50,0 ^a	47,5 ^a	59,2 ^a
14	0,0 ^h	0,0 ^f	30,0 ^c	10,0 ^g
15	20,0 ^f	10,0 ^e	10,0 ^e	13,3 ^f
16	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
17	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
18	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
19	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
20	40,0 ^d	30,0 ^{bc}	40,0 ^b	36,7 ^c
21	30,0 ^e	20,0 ^d	20,0 ^d	23,3 ^e
22	17,5 ^f	30,0 ^{bc}	37,5 ^b	28,3 ^d
23	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
24	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
25	60,0 ^c	50,0 ^a	40,0 ^b	49,2 ^b
26	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
27	20,0 ^f	10,0 ^e	10,0 ^e	13,3 ^f
28	30,0 ^e	32,5 ^b	10,0 ^e	24,2 ^e
29	10,0 ^g	20,0 ^d	10,0 ^e	13,3 ^f
30	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
31	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
32	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
33	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
34	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
35	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
36	0,0 ^h	0,0 ^f	0,0 ^f	0,0 ^h
Ortalama	12,6^A	8,8^B	8,2^C	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	514,43**
F değeri (Yöntem-Y)	1617,89**	415,19**	555,03**	1991,36**
F değeri (E×Y)	-	-	-	202,48**
VK (%)	9,37	13,19	14,16	-

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).



K-10.Yöntem



E-12.Yöntem



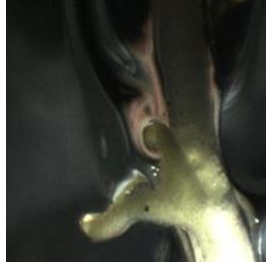
E-13.Yöntem



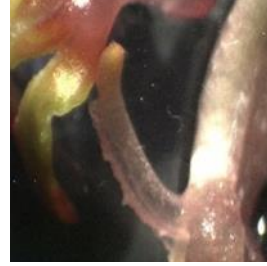
H-20.Yöntem



E-13.Yöntem



H-25.Yöntem



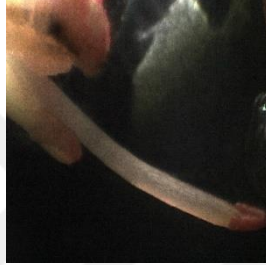
H-29.Yöntem



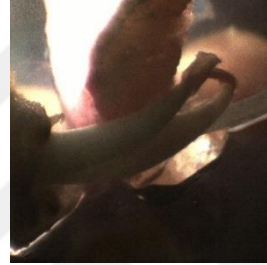
E-25.Yöntem



E-13.Yöntem



H-12.Yöntem



K-25.Yöntem



H-12.Yöntem



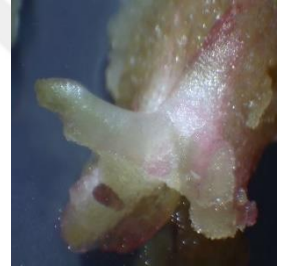
K-25.Yöntem



K-20.Yöntem



E-13.Yöntem



H-13.Yöntem



H-27.Yöntem



E-13.Yöntem

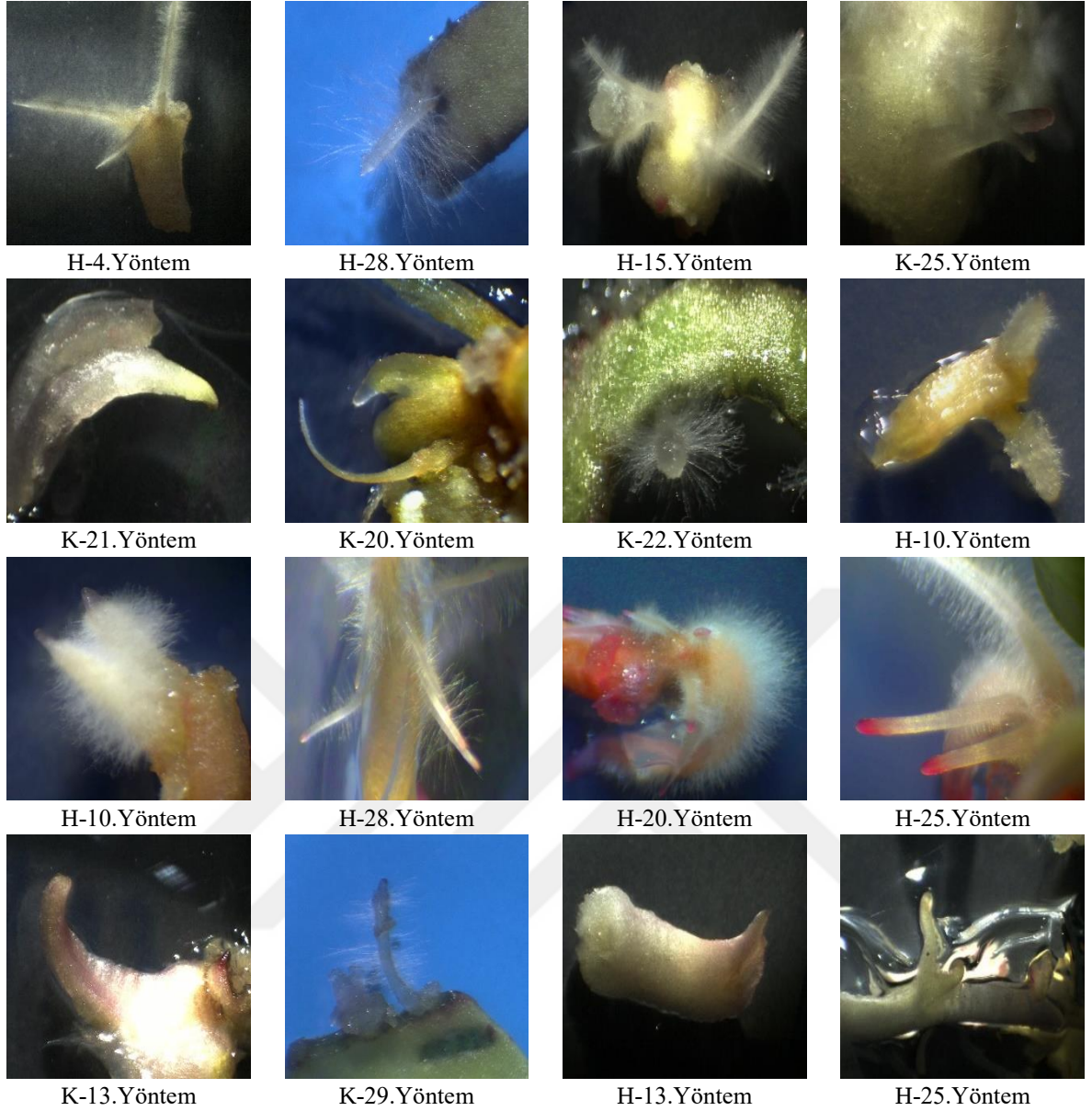


H-29.Yöntem



K-10.Yöntem

Şekil 17. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen direkt organogenesis oluşumu (Eksplant-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo eksen. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9'da verilmiştir.



Şekil 17. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen direkt organogenesis oluşumu (Eksplant-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo eksen. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9’da verilmiştir (Devamı)

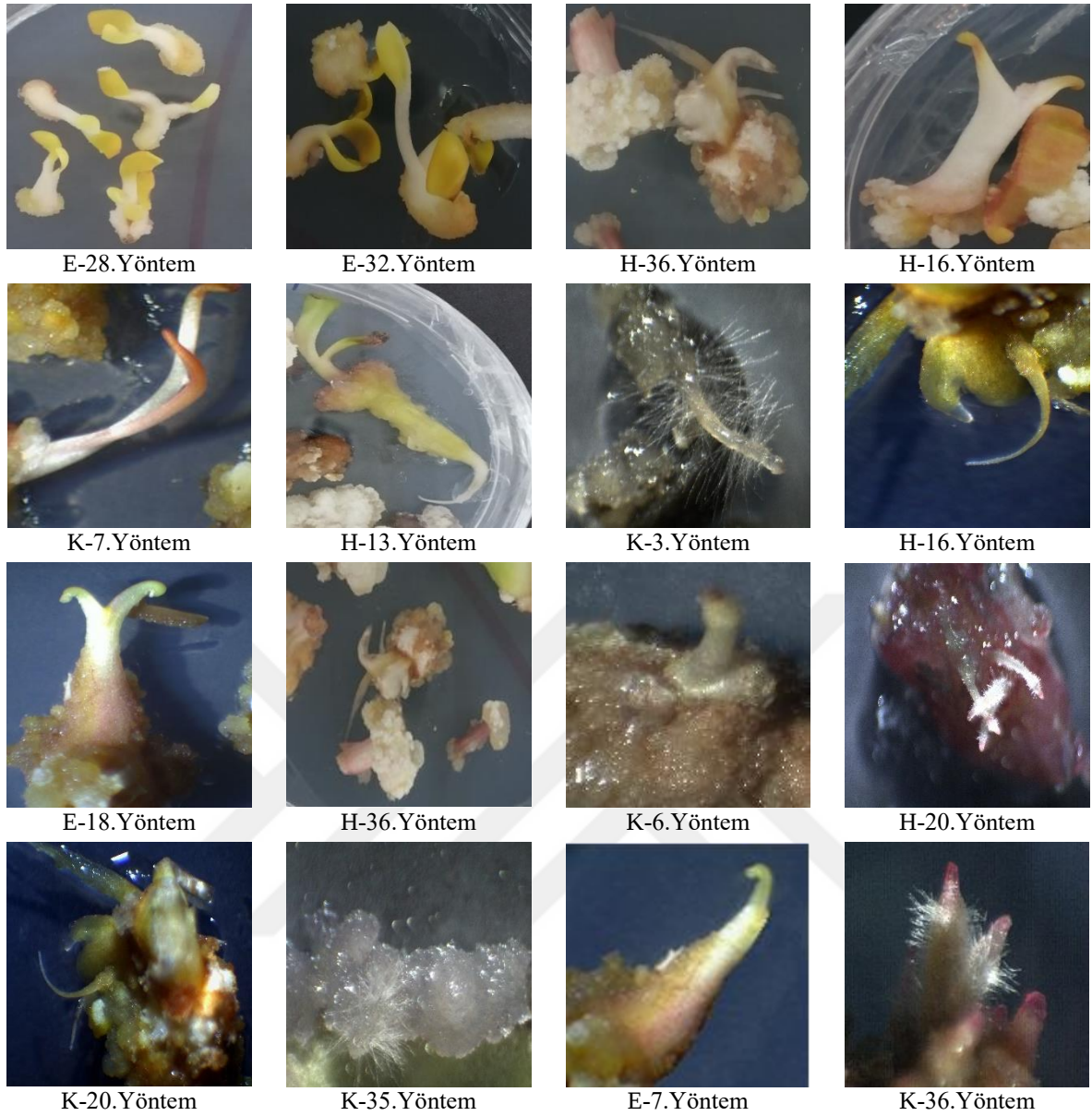
İndirekt organogenesis oranı (İOO%), eksplant kaynaklı kallustan sürgün veya kök oluşturma yeteneğinin bir ölçüsüdür. Araştırmada, eksplant tipinin ana etkisi önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Tablo 15). Kotiledonda elde edilen İOO’nun (%7,4) diğer iki eksplanttan (%6,6) daha yüksek ve aralarındaki farkın önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 15). Araştırmada, 14 yöntemde (1, 4, 8, 10, 11, 12, 14, 17, 23, 24, 26, 29, 31 ve 34 nolu yöntemler) indirekt organogenesis meydana gelmemiş, meydana gelen yöntemlerin İOO ise %3,3 (13, 19 ve 33 nolu yöntemler) ile %26,7 (36 nolu yöntem) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 15, Şekil 18). Embriyo ekseninde 22 yöntemde (1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 31 ve 34 nolu yöntemler), hipokotil eksplantında 21 yöntemde (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 17, 20, 21, 23, 24, 26, 29, 31, 32, 33 ve 34 nolu yöntemler) ve kotiledon

eksplantında ise 20 yöntemde (1, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 23, 24, 26, 29, 31, 32, 33 ve 34 nolu yöntemler) indirekt organogenesis meydana gelmemiştir (Tablo 15). Embriyo ekseninde indirekt organogenesisin meydana geldiği yöntemlerin İOO %10,0 (5, 9, 20, 30, 33 ve 35 nolu yöntemler) ile %30,0 (32 ve 36 nolu yöntemler) arasındadır. Bu oran, hipokotilde %10,0 (7, 9, 13, 15, 18, 19, 25, 28 ve 35 nolu yöntemler) ile %30,0 (16 nolu yöntem) ve kotiledonda %10,0 (9, 16, 21, 22, 25, 27, 30 ve 35 nolu yöntemler) ile %30,0 (2, 7 ve 36 nolu yöntemler) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 15, Şekil 18).

Tablo 15. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İOO (%)¹

Yöntem	İOO (%)			
	Embriyo eksen	Hipokotil	Kotiledon	Ortalama
1	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
2	0,0 ^e	0,0 ^e	30,0 ^a	10,0 ^f
3	20,0 ^b	0,0 ^e	0,0 ^e	6,7 ^g
4	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
5	10,0 ^d	20,0 ^b	0,0 ^e	10,0 ^f
6	0,0 ^e	0,0 ^e	20,0 ^b	6,7 ^g
7	20,0 ^b	10,0 ^d	30,0 ^a	20,0 ^b
8	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
9	10,0 ^d	10,0 ^d	10,0 ^d	10,0 ^f
10	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
11	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
12	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
13	0,0 ^e	10,0 ^d	0,0 ^e	3,3 ^h
14	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
15	17,5 ^c	10,0 ^d	20,0 ^b	15,8 ^{cd}
16	20,0 ^b	30,0 ^a	10,0 ^d	20,0 ^b
17	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
18	20,0 ^b	10,0 ^d	20,0 ^b	16,7 ^c
19	0,0 ^e	10,0 ^d	0,0 ^e	3,3 ^h
20	10,0 ^d	17,5 ^c	17,5 ^c	15,0 ^d
21	0,0 ^e	0,0 ^e	10,0 ^d	3,3 ^h
22	0,0 ^e	20,0 ^b	10,0 ^d	10,0 ^f
23	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
24	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
25	0,0 ^e	10,0 ^d	10,0 ^d	6,7 ^g
26	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
27	0,0 ^e	20,0 ^b	10,0 ^d	10,0 ^f
28	20,0 ^b	10,0 ^d	20,0 ^b	16,7 ^c
29	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
30	10,0 ^d	20,0 ^b	10,0 ^d	13,3 ^e
31	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
32	30,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e	10,0 ^f
33	10,0 ^d	0,0 ^e	0,0 ^e	3,3 ^h
34	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ⁱ
35	10,0 ^d	10,0 ^d	10,0 ^d	10,0 ^f
36	30,0 ^a	20,0 ^b	30,0 ^a	26,7 ^a
Ortalama	6,6^B	6,6^B	7,4^A	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	48,00**
F değeri (Yöntem-Y)	516,66**	417,91**	562,60**	936,26**
F değeri (E×Y)	-	-	-	280,46**
VK (%)	12,63	12,63	11,21	-

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).



Şekil 18. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen indirekt organogenesis oluşumu (Eksplant-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo ekseni. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9’da verilmiştir.

Somatik embriyogenesis oranı (%)

Direkt somatik embriyogenesis oranı (DSEO%), kullanılan eksplantların kallus oluşturmada direkt somatik embriyolar oluşturma yeteneğinin bir ölçüsüdür. Araştırmada, direkt somatik embriyogenesis üzerine eksplant tipinin ana etkisi önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Tablo 16). Yöntemlerin ortalamasına göre eksplantların DSEO değerlendirildiğinde, en yüksek DSEO %40,0 ile hipokotilde elde edilmiş, bunu sırasıyla %39,4 ile kotiledon ve %34,0 ile embriyo ekseni eksplantları izlemiştir (Tablo 16, Şekil 19). DSEO bakımından kotiledon ile hipokotil arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olurken, bu eksplantlarla embriyo ekseni arasındaki farkın önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 16). Diğer taraftan DSEO bakımından yöntemler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğu

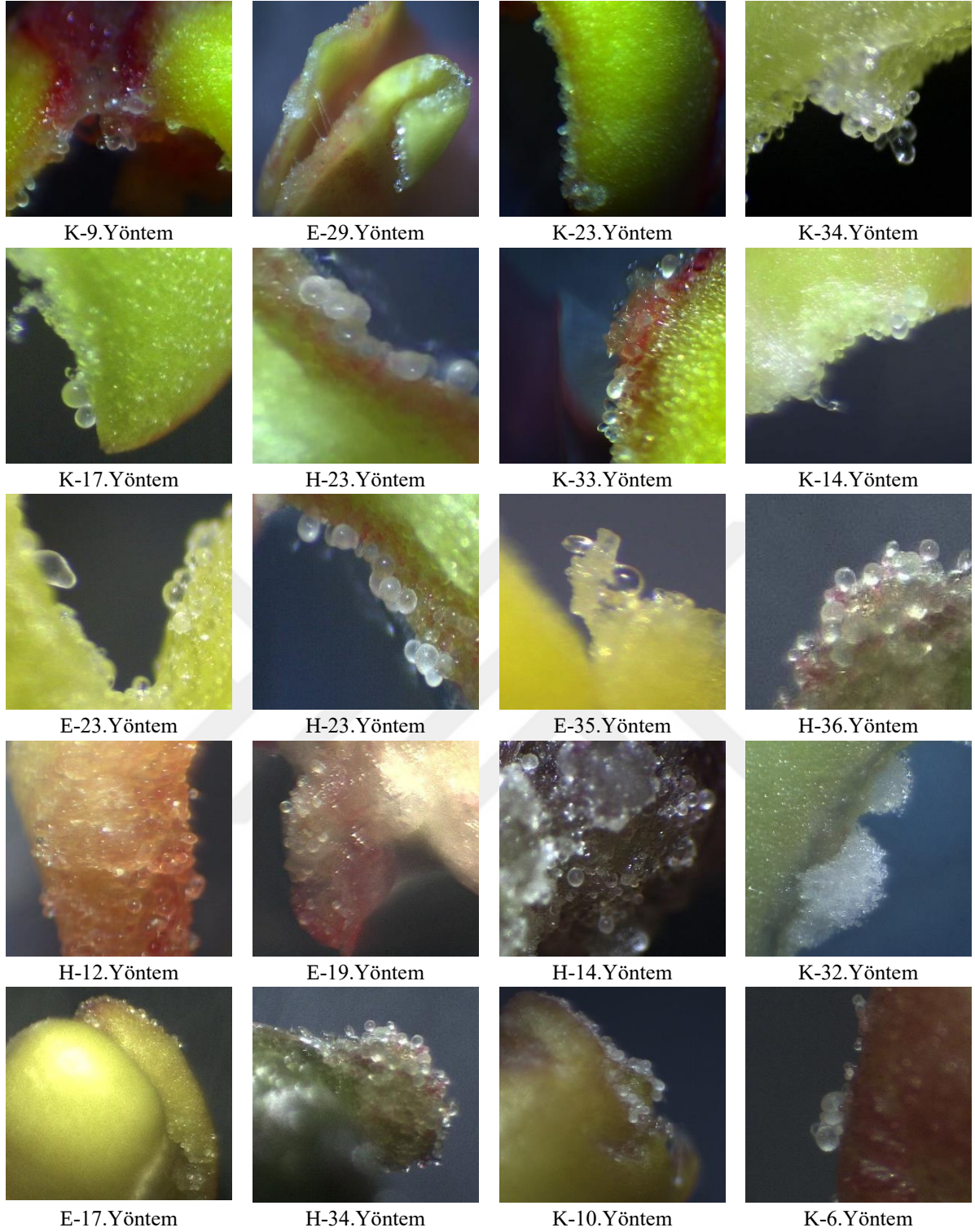
tespit edilmiştir (Tablo 16). Yöntemlerin 3 tanesinde (1, 2, ve 36 nolu yöntemler) direkt somatik embriyogenesis meydana gelmemiş, meydana gelen yöntemlerin DSEO ise %8,3 (3 nolu yöntem) ile %64,2 (23, 33 ve 34 nolu yöntemler) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 16, Şekil 19).

Eksplantların DSEO yönteme göre değişim göstermesi E×Y interaksiyonun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Tablo 16). Embriyo ekseninde 6 yöntemde (1, 2, 12, 17, 30 ve 36 nolu yöntemler), hipokotil ve kotiledon eksplantlarından ise 3 yöntemde (1, 2 ve 36 nolu yöntemler) direkt somatik embriyogenesis meydana gelmemiştir (Tablo 16). Embriyo ekseninde direkt somatik embriyogenesisin meydana geldiği yöntemlerin DSEO %10,0 (3 ve 28 nolu yöntemler) ile %75,0 (23 nolu yöntem) arasındadır. Bu oran, hipokotilde %5,0 (3 nolu yöntem) ile %67,5 (17 ve 33 nolu yöntemler) ve kotiledonda %10,0 (3 ve 30 nolu yöntemler) ile %85,0 (34 nolu yöntem) arasında değişim göstermiştir (Tablo 16, Şekil 19).

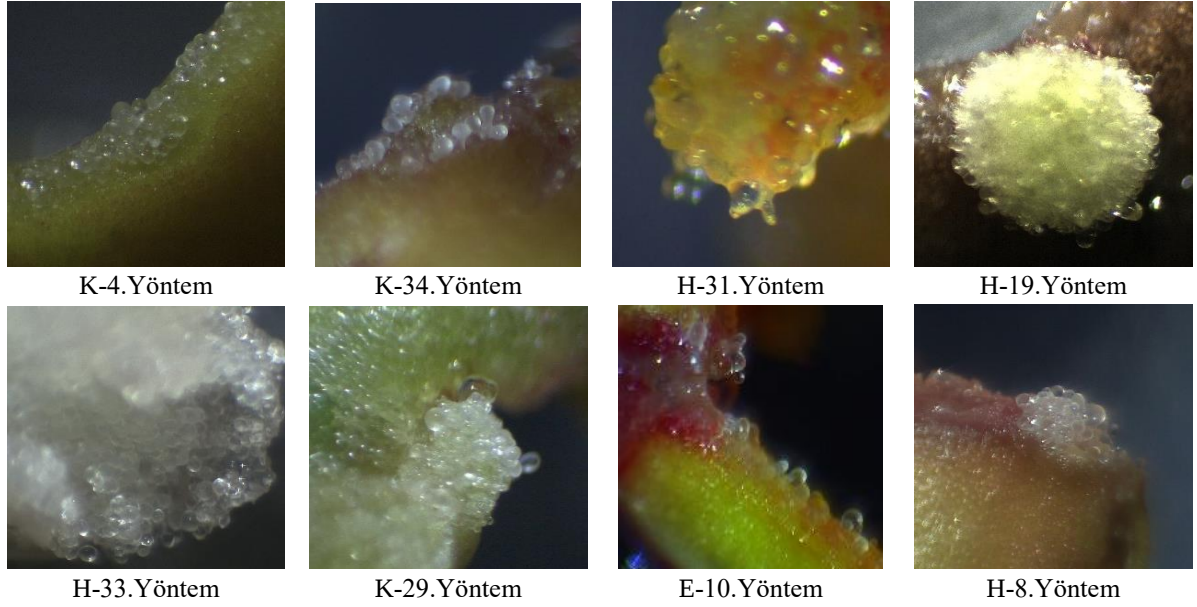
Tablo 16. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre DSEO (%)¹

Yöntem	DSEO (%)			
	Embriyo eksen	Hipokotil	Kotiledon	Ortalama
1	0,0 ^j	0,0 ^l	0,0 ⁿ	0,0 ^q
2	0,0 ^j	0,0 ^l	0,0 ⁿ	0,0 ^q
3	10,0 ^{hi}	5,0 ^l	10,0 ^{mn}	8,3 ^p
4	37,5 ^{efg}	45,0 ^{e-h}	52,5 ^{c-f}	45,0 ^{e-h}
5	47,5 ^{cde}	52,5 ^{b-f}	47,5 ^{d-g}	49,2 ^{c-f}
6	20,0 ^{hi}	20,0 ^k	17,5 ^{lm}	19,2 ^o
7	52,5 ^{cd}	55,0 ^{a-f}	37,5 ^{g-j}	48,3 ^{d-g}
8	37,5 ^{efg}	42,5 ^{f-i}	45,0 ^{d-h}	41,7 ^{g-j}
9	52,5 ^{cd}	55,0 ^{a-f}	57,5 ^{bcd}	55,0 ^{bcd}
10	35,0 ^{fg}	47,5 ^{d-g}	55,0 ^{b-e}	45,8 ^{e-h}
11	20,0 ^{hi}	20,0 ^k	17,5 ^{lm}	19,2 ^o
12	0,0 ^j	60,0 ^{a-d}	47,5 ^{d-g}	35,8 ^{ikl}
13	20,0 ^{hi}	22,5 ^k	40,0 ^{fi}	27,5 ^{mn}
14	57,5 ^{bc}	65,0 ^{ab}	42,5 ^{e-h}	55,0 ^{bcd}
15	37,5 ^{efg}	55,0 ^{a-f}	32,5 ^{h-k}	41,7 ^{g-j}
16	45,0 ^{def}	37,5 ^{g-j}	52,5 ^{c-f}	45,0 ^{e-h}
17	0,0 ^j	67,5 ^a	52,5 ^{c-f}	40,0 ^{h-k}
18	57,5 ^{bc}	55,0 ^{a-f}	55,0 ^{b-e}	55,8 ^{bc}
19	67,5 ^b	62,5 ^{abc}	45,0 ^{d-h}	58,3 ^{ab}
20	30,0 ^{gh}	32,5 ^{h-k}	22,5 ^{klm}	28,3 ^{mn}
21	35,0 ^{fg}	30,0 ^{ijk}	32,5 ^{h-k}	32,5 ^{lm}
22	57,5 ^{bc}	27,5 ^{jk}	27,5 ^{i-l}	37,5 ^{i-l}
23	75,0 ^a	55,0 ^{a-f}	62,5 ^{bc}	64,2 ^a
24	47,5 ^{cde}	45,0 ^{e-h}	47,5 ^{d-g}	46,7 ^{e-h}
25	37,5 ^{efg}	30,0 ^{ijk}	25,0 ^{ikl}	30,8 ^{lm}
26	35,0 ^{fg}	42,5 ^{f-i}	47,5 ^{d-g}	41,7 ^{g-j}
27	20,0 ^{hi}	37,5 ^{g-j}	42,5 ^{e-h}	33,3 ^{klm}
28	10,0 ^{ij}	22,5 ^k	32,5 ^{h-k}	21,7 ^{no}
29	52,5 ^{cd}	55,0 ^{a-f}	65,0 ^{bc}	57,5 ^{ab}
30	0,0 ^j	22,5 ^k	10,0 ^{mn}	10,8 ^p
31	37,5 ^{efg}	50,0 ^{c-g}	45,0 ^{d-h}	44,2 ^{f-i}
32	35,0 ^{fg}	42,5 ^{f-i}	47,5 ^{d-g}	41,7 ^{g-j}
33	57,5 ^{bc}	67,5 ^a	67,5 ^b	64,2 ^a
34	52,5 ^{cd}	55,0 ^{a-f}	85,0 ^a	64,2 ^a
35	45,0 ^{def}	57,5 ^{a-e}	52,5 ^{c-f}	51,7 ^{b-e}
36	0,0 ^j	0,0 ^l	0,0 ⁿ	0,0 ^q
Ortalama	34,0^B	40,0^A	39,4^A	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	72,04**
F değeri (Yöntem-Y)	103,56**	66,53**	65,80**	184,82**
F değeri (E×Y)	-	-	-	21,94**
VK (%)	11,74	12,18	12,39	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).



Şekil 19. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen direkt somatik embriyogenesis oluşumu (Eksplant-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo eksen. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9’da verilmiştir.



Şekil 19. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen direkt somatik embriyogenesis oluşumu (Eksplant-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo eksen. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9’da verilmiştir (Devamı)

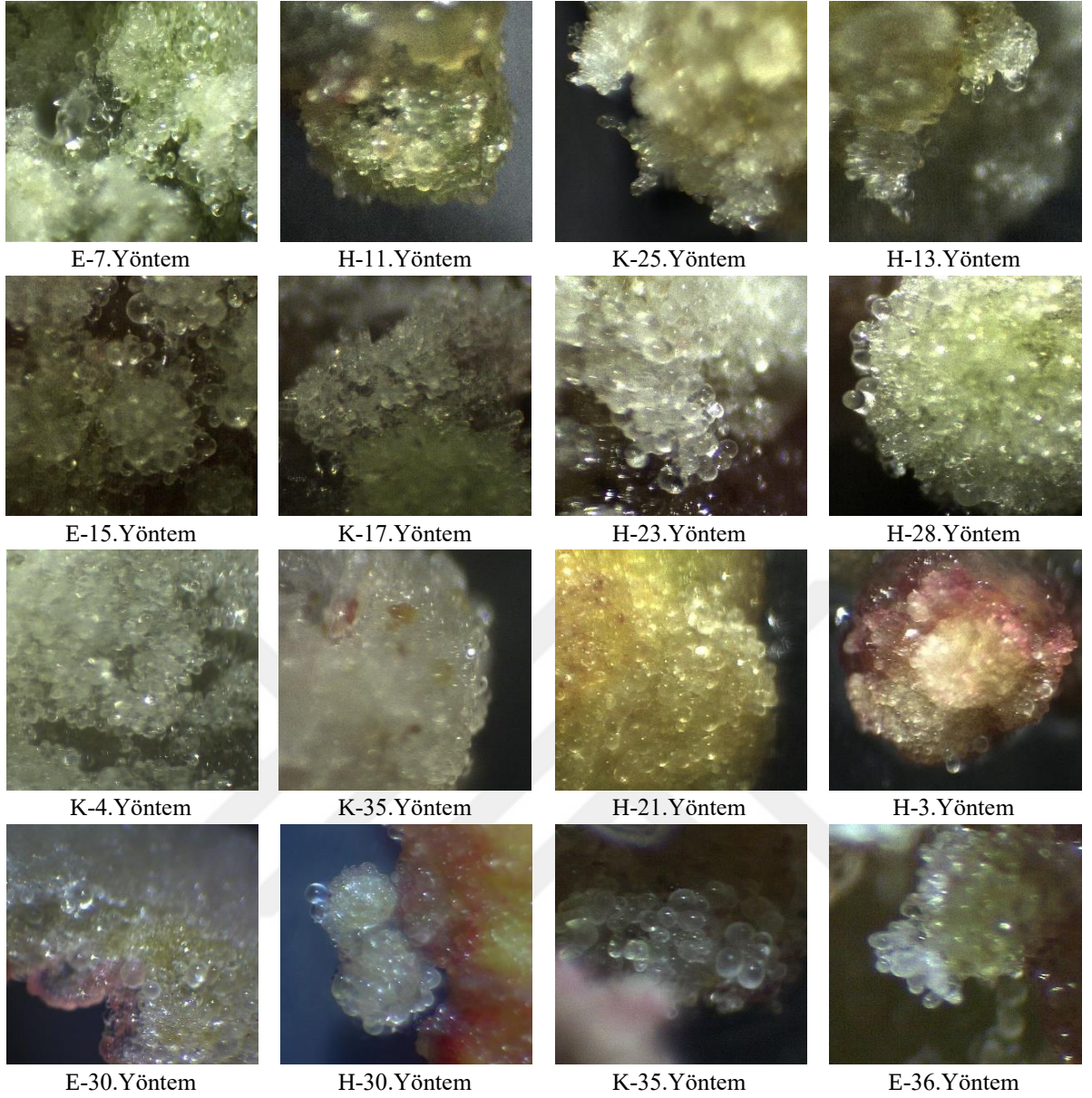
İndirekt somatik embriyogenesis oranı (İSEO%), eksplant kaynaklı kallustan somatik embriyolar oluşturma yeteneğinin bir ölçüsüdür. Araştırmada, İSEO bakımından eksplant tipleri arasındaki farkın önemli ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur. En yüksek İSEO %15,3 ile hipokotilde elde edilirken bunu sırasıyla %14,7 ile kotiledon ve %12,2 ile embriyo eksen eksplantları izlemiştir (Tablo 17). İSEO bakımından yöntemler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 17, Şekil 20). Yöntemlerin 2 tanesinde (32 ve 34 nolu yöntemler) indirekt somatik embriyogenesis meydana gelmemiş, meydana gelen yöntemlerin İSEO ise %3,3 (8 ve 12 nolu yöntemler) ile %47,5 (30 nolu yöntem) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 17).

Eksplantların indirekt somatik embriyogenesis oluşumları yöntemle göre değişim göstermesi E×Y interaksiyonun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Tablo 17). Embriyo ekseninde 16 yöntemde (6, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 32 ve 34 nolu yöntemler), hipokotil eksplantında 7 yöntemde (1, 6, 8, 24, 25, 32 ve 34 nolu yöntemler) ve kotiledon eksplantında ise 12 yöntemde (3, 5, 8, 12, 13, 14, 18, 29, 31, 32, 33 ve 34 nolu yöntemler) indirekt somatik embriyogenesis meydana gelmemiştir. Dahası, her üç eksplant tipinde 32 ve 24 nolu yöntemlerde indirekt somatik embriyogenesis meydana gelmemiştir (Tablo 17). Embriyo ekseninde indirekt somatik embriyogenesisin meydana geldiği yöntemlerin İSEO %10,0 (1, 5, 8 ve 15 nolu yöntemler) ile %50,0 (30 nolu yöntem) arasında, hipokotilde %10,0 (5, 12, 15, 17, 26, 29, 31, 33 ve 36 nolu yöntemler) ile %42,5 (30 nolu yöntem) ve kotiledonda %10,0 (7, 19, 22 ve 26 nolu yöntemler) ile %50 (30 nolu yöntem) arasında gerçekleşmiştir (Tablo 17, Şekil 20).

Tablo 17. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İSEO (%)¹

Yöntem	İSEO (%)			Ortalama
	Embriyo ekseni	Hipokotil	Kotiledon	
1	10,0 ^e	0,0 ^e	20,0 ^{cd}	10,0 ^h
2	20,0 ^d	20,0 ^c	20,0 ^{cd}	20,0 ^d
3	20,0 ^d	30,0 ^b	0,0 ^f	16,7 ^{ef}
4	20,0 ^d	20,0 ^c	30,0 ^b	23,3 ^c
5	10,0 ^e	10,0 ^d	0,0 ^f	6,7 ^{ij}
6	0,0 ^f	0,0 ^e	20,0 ^{cd}	6,7 ^{ij}
7	20,0 ^d	20,0 ^c	10,0 ^e	16,7 ^{ef}
8	10,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^f	3,3 ^k
9	20,0 ^d	22,5 ^c	17,5 ^d	20,0 ^d
10	0,0 ^f	20,0 ^c	20,0 ^{cd}	13,3 ^g
11	0,0 ^f	37,5 ^a	20,0 ^{cd}	19,2 ^{df}
12	0,0 ^f	10,0 ^d	0,0 ^f	3,3 ^k
13	0,0 ^f	17,5 ^c	0,0 ^f	5,8 ^{ik}
14	0,0 ^f	20,0 ^c	0,0 ^f	6,7 ^{ij}
15	10,0 ^e	10,0 ^d	20,0 ^{cd}	13,3 ^g
16	20,0 ^d	20,0 ^c	22,5 ^c	20,8 ^{cd}
17	0,0 ^f	10,0 ^d	20,0 ^{cd}	10,0 ^h
18	20,0 ^d	22,5 ^c	0,0 ^f	14,2 ^{fg}
19	0,0 ^f	20,0 ^c	10,0 ^e	10,0 ^h
20	17,5 ^d	20,0 ^c	20,0 ^{cd}	19,2 ^{df}
21	20,0 ^d	30,0 ^b	30,0 ^b	26,7 ^b
22	0,0 ^f	17,5 ^c	10,0 ^e	9,2 ^{hi}
23	0,0 ^f	22,5 ^c	20,0 ^{cd}	14,2 ^{fg}
24	0,0 ^f	0,0 ^e	30,0 ^b	10,0 ^h
25	0,0 ^f	0,0 ^e	20,0 ^{cd}	6,7 ^{ij}
26	0,0 ^f	10,0 ^d	10,0 ^e	6,7 ^{ij}
27	0,0 ^f	20,0 ^c	30,0 ^b	16,7 ^{ef}
28	20,0 ^d	20,0 ^c	30,0 ^b	23,3 ^c
29	30,0 ^c	10,0 ^d	0,0 ^f	13,3 ^g
30	50,0 ^a	42,5 ^a	50,0 ^a	47,5 ^a
31	32,5 ^c	10,0 ^d	0,0 ^f	14,2 ^{fg}
32	0,0 ^f	0,0 ^e	0,0 ^f	0,0 ^l
33	30,0 ^c	10,0 ^d	0,0 ^f	13,3 ^g
34	0,0 ^f	0,0 ^e	0,0 ^f	0,0 ^l
35	20,0 ^d	20,0 ^c	30,0 ^b	23,3 ^c
36	40,0 ^b	10,0 ^d	20,0 ^{cd}	23,3 ^c
Ortalama	12,2^C	15,3^A	14,7^B	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	154,64**
F değeri (Yöntem-Y)	517,14**	93,20**	469,83**	386,25**
F değeri (E×Y)	-	-	-	165,02**
VK (%)	9,60	14,38	8,12	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).



Şekil 20. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen indirekt somatik embriyogenesis oluşumu (Eksplant-Yöntem) K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo eksen. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9’da verilmiştir.

Bitki rejenerasyonu

Direkt organogenesis kaynaklı eksplant başına bitki sayısı (DOBS) (adet/eksplant), direkt organogenesisden meydana gelen bitkiler arasından rejenerasyon sürecini başarıyla tamamlayan bitkilerin sayısının, toplam kullanılan eksplant sayısına bölünmesinden elde edilmiştir. Araştırmada, DOBS üzerine eksplant tipinin ana etkisinin istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğu belirlenmiştir (Tablo 18). Yöntemlerin ortalamasına göre, en yüksek DOBS 0,133 ile embriyo ekseninden elde edilirken bunu sırasıyla 0,092 ile hipokotil ve 0,082 ile kotiledon eksplantları izlemiştir (Tablo 18, Şekil 21). Diğer taraftan, yöntemler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Tablo 18). Yöntemlerin 23 tanesinde (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 36 nolu yöntemler) direkt organogenesis meydana gelmediği için bitki oluşumu gözlenmemiş, bitki oluşumunun gözlemlendiği yöntemlerin DOBS ise 0,10 (14 nolu yöntem) ile 0,65 (13 nolu yöntem) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 18).

Eksplantların DOBS yönteme göre farklılık göstermesi E×Y interaksiyonun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Tablo 18). Her üç eksplant tipinde de 23 yöntemde (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 36 nolu yöntemler) direkt organogenesis kaynaklı bitki oluşumu meydana gelmemiştir. Direkt organogenesis kaynaklı bitki oluşumunun gözlemlendiği yöntemlere göre embriyo ekseni için DOBS 0,10 (29 nolu yöntem) ile 1,08 (12 nolu yöntem) arasında, hipokotil için 0,10 (4, 15 ve 27 nolu yöntemler) ile 0,60 (25 nolu yöntem) ve kotiledon için 0,10 (4, 10, 15, 27, 28 ve 29 nolu yöntemler) ile 0,50 (13 nolu yöntem) arasında değişim göstermiştir (Tablo 18).

Tablo 18. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre DOBS (adet/eksplant)¹

Yöntem	DOBS (adet/eksplant)			
	Embriyo ekseni	Hipokotil	Kotiledon	Ortalama
1	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
2	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
3	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
4	0,20 ^f	0,10 ^f	0,10 ^f	0,13 ^f
5	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
6	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
7	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
8	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
9	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
10	0,30 ^e	0,28 ^d	0,10 ^f	0,23 ^e
11	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
12	1,08 ^a	0,30 ^{cd}	0,20 ^e	0,53 ^b
13	0,95 ^b	0,50 ^b	0,50 ^a	0,65 ^a
14	0,00 ^h	0,00 ^g	0,30 ^d	0,10 ^g
15	0,20 ^f	0,10 ^f	0,10 ^f	0,13 ^f
16	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
17	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
18	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
19	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
20	0,40 ^d	0,30 ^{cd}	0,40 ^b	0,37 ^c
21	0,30 ^e	0,20 ^e	0,20 ^e	0,23 ^e
22	0,20 ^f	0,30 ^{cd}	0,38 ^c	0,28 ^d
23	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
24	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
25	0,60 ^c	0,60 ^a	0,40 ^b	0,53 ^b
26	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
27	0,20 ^f	0,10 ^f	0,10 ^f	0,13 ^f
28	0,30 ^e	0,33 ^c	0,10 ^f	0,24 ^e
29	0,10 ^g	0,20 ^e	0,10 ^f	0,13 ^f
30	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
31	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
32	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
33	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
34	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
35	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
36	0,00 ^h	0,00 ^g	0,00 ^g	0,00 ^h
Ortalama	0,133^A	0,092^B	0,082^C	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	505,44**
F değeri (Yöntem-Y)	649,71**	714,86**	1143,4**	1749,9**
F değeri (E×Y)	-	-	-	203,62**
VK (%)	13,90	12,86	10,08	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).

İndirekt organogenesis kaynaklı eksplant başına bitki sayısı (İOBS) (adet/eksplant), indirekt organogenesisden meydana gelen bitkiler arasından rejenerasyon sürecini başarıyla tamamlayan bitkilerin sayısının, toplam kullanılan eksplant sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Araştırmada, İOBS üzerine eksplant tipinin ana etkisi önemli ($p<0,01$) olmuştur (Tablo 19). Yöntemlerin ortalamasına göre eksplantların İOBS değerlendirildiğinde, en yüksek İOBS 0,074 ile kotiledonda elde edilirken bunu sırasıyla 0,070 ile hipokotil ve 0,068 ile embriyo eksen eksplantları izlemiştir (Tablo 19). İOBS bakımından embriyo eksen ile hipokotil arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olurken, bu eksplantlarla kotiledon arasındaki farkın önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 19). Araştırmada, 14 yöntemde (1, 4, 8, 10, 11, 12, 14, 17, 23, 24, 26, 29, 31 ve 34 nolu yöntemler) İOBS meydana gelmemiş, meydana gelen yöntemlerin İOBS ise 0,03 (19, 21 ve 33 nolu yöntemler) ile 0,27 (36 nolu yöntem) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 19). Embriyo ekseninde 22 yöntemde (1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 31 ve 34 nolu yöntemler), hipokotil eksplantında 20 yöntemde (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 17, 21, 23, 24, 26, 29, 31, 32, 33 ve 34 nolu yöntemler) ve kotiledon eksplantında ise 20 yöntemde (1, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 23, 24, 26, 29, 31, 32, 33 ve 34 nolu yöntemler) indirekt organogenesis kaynaklı bitki meydana gelmemiştir (Tablo 19). Embriyo ekseninde indirekt organogenesisden bitki meydana gelen yöntemlerin İOBS 0,10 (5, 9, 30, 33 ve 35 nolu yöntemler) ile 0,30 (32 ve 36 nolu yöntemler) arasında değişirken, hipokotilde 0,10 (7, 9, 13, 15, 18, 19, 25, 28 ve 35 nolu yöntemler) ile 0,30 (16 nolu yöntem) ve kotiledonda 0,10 (9, 16, 21, 22, 25, 27, 30 ve 35 nolu yöntemler) ile 0,30 (2, 7 ve 36 nolu yöntemler) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 19).

Tablo 19. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İOBS (adet/eksplant)¹

Yöntem	İOBS (adet/eksplant)			Ortalama
	Embriyo ekseni	Hipokotil	Kotiledon	
1	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
2	0,00 ^e	0,00 ^e	0,30 ^a	0,10 ^j
3	0,20 ^b	0,00 ^e	0,00 ^e	0,07 ^h
4	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
5	0,10 ^d	0,20 ^b	0,00 ^e	0,10 ^f
6	0,00 ^e	0,00 ^e	0,20 ^b	0,07 ^h
7	0,20 ^b	0,10 ^d	0,30 ^a	0,20 ^b
8	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
9	0,10 ^d	0,10 ^d	0,10 ^d	0,10 ^f
10	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
11	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
12	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
13	0,00 ^e	0,20 ^b	0,00 ^e	0,07 ^h
14	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
15	0,18 ^c	0,10 ^d	0,20 ^b	0,16 ^d
16	0,20 ^b	0,30 ^a	0,10 ^d	0,20 ^b
17	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
18	0,20 ^b	0,10 ^d	0,20 ^b	0,17 ^d
19	0,00 ^e	0,10 ^d	0,00 ^e	0,03 ⁱ
20	0,10 ^d	0,23 ^b	0,20 ^b	0,18 ^c
21	0,00 ^e	0,00 ^e	0,10 ^d	0,03 ⁱ
22	0,00 ^e	0,20 ^b	0,10 ^d	0,10 ^f
23	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
24	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
25	0,00 ^e	0,15 ^c	0,10 ^d	0,08 ^g
26	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
27	0,00 ^e	0,20 ^b	0,10 ^d	0,10 ^f
28	0,20 ^b	0,10 ^d	0,20 ^b	0,17 ^d
29	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
30	0,10 ^d	0,20 ^b	0,10 ^d	0,13 ^e
31	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
32	0,30 ^a	0,00 ^e	0,00 ^e	0,10 ^f
33	0,10 ^d	0,00 ^e	0,00 ^e	0,03 ⁱ
34	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^j
35	0,10 ^d	0,10 ^d	0,10 ^d	0,10 ^f
36	0,30 ^a	0,20 ^b	0,30 ^a	0,27 ^a
Ortalama	0,068^B	0,070^B	0,074^A	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	12,00**
F değeri (Yöntem-Y)	543,86**	194,68**	562,60**	666,27**
F değeri (E×Y)	-	-	-	207,11**
VK (%)	12,12	13,59	11,21	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).

Direkt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki sayısı (DSEBS) (adet/eksplant), direkt somatik embriyogenesisistey meydana gelen bitkiler arasından rejenerasyon sürecini başarıyla tamamlayan bitkilerin sayısının, toplam kullanılan eksplant sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Araştırmada, DSEBS üzerine eksplant tipinin ana etkisi önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Tablo 20). Yöntemlerin ortalamasına göre eksplantların DSEBS'leri değerlendirildiğinde, en yüksek DSEBS 0,404 ile hipokotilde elde edilmiş, bunu sırasıyla 0,401 ile kotiledon ve 0,342 ile embriyo eksenine eksplantları izlemiştir (Tablo 20). DSEBS bakımından hipokotil ile kotiledon arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olurken, bu eksplantlarla embriyo eksenine arasındaki fark önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 15). Diğer taraftan DSEBS bakımından yöntemler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 20). Yöntemlerin 3 tanesinde (1, 2 ve 36 nolu yöntemler) direkt somatik embriyogenesis meydana gelmediği için bitki oluşumu gözlenmemiş, bitki oluşumunun gözlemlendiği yöntemlerin DSEBS ise 0,08 (3 nolu yöntem) ile 0,64 (23, 33 ve 34 nolu yöntemler) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 20). Diğer taraftan, eksplantların DSEBS yöntemine göre değişim göstermesi E×Y interaksiyonun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Tablo 20). Embriyo ekseninde 6 yöntemde (1, 2, 12, 17, 30 ve 36 nolu yöntemler), hipokotil ve kotiledon eksplantlarından ise 3 yöntemde (1, 2 ve 36 nolu yöntemler) direkt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki meydana gelmemiştir (Tablo 20). Embriyo ekseninde 12, 17 ve 30 nolu yöntemlerde somatik embriyo oluşumu gözlenmediği için bitki oluşumu meydana gelmemiştir. Yine 1, 2 ve 36 nolu yöntemlerde araştırmada kullanılan eksplantların tamamında somatik embriyo oluşumu meydana gelmediği için bitki rejenerasyonu gözlenmemiştir. Embriyo ekseninde direkt somatik embriyogenesisistey bitkinin meydana geldiği yöntemlerin DSEBS 0,10 (3 ve 28 nolu yöntemler) ile 0,75 (23 nolu yöntem) arasında, hipokotilde 0,05 (3 nolu yöntem) ile 0,68 (17 ve 33 nolu yöntemler) ve kotiledonda 0,10 (3 ve 30 nolu yöntemler) ile 0,85 (34 nolu yöntem) arasında değişim göstermiştir (Tablo 20).

Tablo 20. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre DSEBS (adet/eksplant)¹

Yöntem	DSEBS (adet/eksplant)			
	Embriyo ekseni	Hipokotil	Kotiledon	Ortalama
1	0,00 ^j	0,00 ^l	0,00 ^l	0,00^p
2	0,00 ^j	0,00 ^l	0,00 ^l	0,00^p
3	0,10 ^{ij}	0,05 ^l	0,10 ^{kl}	0,08^o
4	0,38 ^{efg}	0,45 ^{e-h}	0,53 ^{cde}	0,45^{e-h}
5	0,48 ^{cde}	0,53 ^{b-f}	0,48 ^{def}	0,49^{c-f}
6	0,20 ^{hj}	0,20 ^k	0,18 ^{jk}	0,19ⁿ
7	0,53 ^{cd}	0,55 ^{a-f}	0,38 ^{f-i}	0,48^{d-g}
8	0,38 ^{efg}	0,43 ^{f-i}	0,45 ^{d-g}	0,42^{ghi}
9	0,53 ^{cd}	0,55 ^{a-f}	0,58 ^{bcd}	0,55^{bcd}
10	0,35 ^{fg}	0,48 ^{d-g}	0,55 ^{b-e}	0,46^{e-h}
11	0,20 ^{hj}	0,20 ^k	0,18 ^{jk}	0,19ⁿ
12	0,00 ^j	0,60 ^{a-d}	0,68 ^b	0,43^{fi}
13	0,20 ^{hj}	0,22 ^k	0,43 ^{e-h}	0,28^{lm}
14	0,58 ^{bc}	0,65 ^{ab}	0,43 ^{e-h}	0,55^{bcd}
15	0,38 ^{efg}	0,55 ^{a-f}	0,33 ^{e-h}	0,42^{ghi}
16	0,45 ^{def}	0,38 ^{g-j}	0,53 ^{cde}	0,45^{e-h}
17	0,00 ^j	0,68 ^a	0,53 ^{cde}	0,40^{hij}
18	0,58 ^{bc}	0,55 ^{a-f}	0,55 ^{b-e}	0,56^{bc}
19	0,68 ^b	0,63 ^{abc}	0,45 ^{d-g}	0,58^{ab}
20	0,30 ^{gh}	0,40 ^{h-k}	0,25 ^{ij}	0,32^{kl}
21	0,35 ^{fg}	0,30 ^{i-k}	0,30 ^{hij}	0,32^{kl}
22	0,58 ^{bc}	0,28 ^{jk}	0,28 ^{ij}	0,38^{ijk}
23	0,75 ^a	0,55 ^{a-f}	0,63 ^{bc}	0,64^a
24	0,48 ^{cde}	0,45 ^{e-h}	0,48 ^{def}	0,47^{e-h}
25	0,45 ^{def}	0,30 ^{i-k}	0,28 ^{ij}	0,34^{ikl}
26	0,35 ^{fg}	0,43 ^{f-i}	0,48 ^{def}	0,42^{ghi}
27	0,20 ^{hj}	0,38 ^{g-j}	0,43 ^{e-h}	0,33^{ikl}
28	0,10 ^{ij}	0,23 ^k	0,33 ^{ghi}	0,22^{mn}
29	0,53 ^{cd}	0,55 ^{a-f}	0,65 ^{bc}	0,58^{ab}
30	0,00 ^j	0,23 ^k	0,10 ^{kl}	0,11^o
31	0,38 ^{efg}	0,50 ^{c-g}	0,45 ^{d-g}	0,44^{fi}
32	0,35 ^{fg}	0,43 ^{f-i}	0,48 ^{def}	0,42^{ghi}
33	0,58 ^{bc}	0,68 ^a	0,68 ^b	0,64^a
34	0,53 ^{cd}	0,55 ^{a-f}	0,85 ^a	0,64^a
35	0,45 ^{def}	0,58 ^{b-e}	0,53 ^{cde}	0,52^{b-e}
36	0,00 ^j	0,00 ^l	0,00 ^l	0,00^p
Ortalama	0,342^B	0,404^A	0,401^A	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	77,01^{**}
F değeri (Yöntem-Y)	102,9 ^{**}	66,53 ^{**}	74,24 ^{**}	188,83^{**}
F değeri (E×Y)	-	-	-	24,77^{**}
VK (%)	12,33	12,03	11,87	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).

İndirekt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki sayısı (İSEBS) (adet/eksplant), indirekt somatik embriyogenesisden meydana gelen bitkiler arasından rejenerasyon sürecini başarıyla tamamlayan bitkilerin sayısının, toplam kullanılan eksplant sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Araştırmada, İSEBS bakımından eksplant tipleri arasındaki farkın önemli ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur. En yüksek İSEBS 0,155 ile hipokotilde elde edilirken bunu sırasıyla 0,147 ile kotiledon ve 0,117 ile embriyo ekseni eksplantları izlemiştir (Tablo 21). İSEBS bakımından yöntemler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 21). Yöntemlerin 2 tanesinde (32 ve 34 nolu yöntemler) indirekt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki meydana gelmemiş, meydana gelen yöntemlerin İSEBS ise 0,03 (8 nolu yöntem) ile 0,43 (30 nolu yöntem) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 21).

Eksplantların indirekt somatik embriyogenesisden bitki oluşumları yönüne göre değişim göstermesi E×Y interaksiyonun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Tablo 21). Embriyo ekseninde 17 yöntemde (1, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 32 ve 34 nolu yöntemler), hipokotil eksplantında 7 yöntemde (1, 6, 8, 24, 25, 32 ve 34 nolu yöntemler) ve kotiledon eksplantında ise 12 yöntemde (3, 5, 8, 12, 13, 14, 18, 29, 31, 32, 33 ve 34 nolu yöntemler) indirekt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki meydana gelmemiştir. İndirekt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki rejenerasyonun görülmediği yöntemlerden sadece embriyo ekseninde 1 nolu yöntemde somatik embriyo oluşmasına rağmen bitki oluşumu görülmemiştir (Tablo 21). Embriyo ekseninde indirekt somatik embriyogenesisden bitkinin meydana geldiği yöntemlerin İSEBS 0,10 (5, 8 ve 15 nolu yöntemler) ile 0,40 (30 nolu yöntem) arasında, hipokotilde 0,10 (5, 15, 17, 26, 29, 31, 33 ve 36 nolu yöntemler) ile 0,40 (30 nolu yöntem) ve kotiledonda 0,10 (7, 19, 22 ve 26 nolu yöntemler) ile 0,50 (30 nolu yöntem) arasında gerçekleşmiştir (Tablo 21).

Tablo 21. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İSEBS (adet/eksplant)¹

Yöntem	İSEBS (adet/eksplant)			
	Embriyo ekseni	Hipokotil	Kotiledon	Ortalama
1	0,00 ^e	0,00 ^e	0,20 ^{cd}	0,07^{ij}
2	0,20 ^c	0,20 ^c	0,20 ^{cd}	0,20^d
3	0,20 ^c	0,30 ^b	0,00 ^f	0,17^{ef}
4	0,20 ^c	0,20 ^c	0,30 ^b	0,23^c
5	0,10 ^d	0,10 ^d	0,00 ^f	0,07^{ij}
6	0,00 ^e	0,00 ^e	0,20 ^{cd}	0,07^{ij}
7	0,20 ^c	0,20 ^c	0,10 ^e	0,17^{ef}
8	0,10 ^d	0,00 ^e	0,00 ^f	0,03^k
9	0,20 ^c	0,23 ^c	0,18 ^d	0,20^d
10	0,00 ^e	0,20 ^c	0,20 ^{cd}	0,13^g
11	0,00 ^e	0,38 ^a	0,20 ^{cd}	0,19^{de}
12	0,00 ^e	0,18 ^c	0,00 ^f	0,06^{jk}
13	0,00 ^e	0,18 ^c	0,00 ^f	0,06^{jk}
14	0,00 ^e	0,20 ^c	0,00 ^f	0,07^{ij}
15	0,10 ^d	0,10 ^d	0,20 ^{cd}	0,13^g
16	0,20 ^c	0,20 ^c	0,23 ^c	0,21^{cd}
17	0,00 ^e	0,10 ^d	0,20 ^{cd}	0,10^h
18	0,20 ^c	0,23 ^c	0,00 ^f	0,14^{fg}
19	0,00 ^e	0,20 ^c	0,10 ^e	0,10^h
20	0,18 ^c	0,20 ^c	0,20 ^{cd}	0,19^{de}
21	0,20 ^c	0,30 ^b	0,30 ^b	0,27^b
22	0,00 ^e	0,18 ^c	0,10 ^e	0,09^{hi}
23	0,00 ^e	0,23 ^c	0,20 ^{cd}	0,14^{fg}
24	0,00 ^e	0,00 ^e	0,30 ^b	0,10^h
25	0,00 ^e	0,00 ^e	0,20 ^{cd}	0,07^{ij}
26	0,00 ^e	0,10 ^d	0,10 ^e	0,07^{ij}
27	0,00 ^e	0,20 ^c	0,30 ^b	0,17^{ef}
28	0,20 ^c	0,20 ^c	0,30 ^b	0,23^c
29	0,30 ^b	0,10 ^d	0,00 ^f	0,13^g
30	0,40 ^a	0,40 ^a	0,50 ^a	0,43^a
31	0,33 ^b	0,10 ^d	0,00 ^f	0,14^{fg}
32	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^f	0,00^l
33	0,30 ^b	0,10 ^d	0,00 ^f	0,13^g
34	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^f	0,00^l
35	0,20 ^c	0,20 ^c	0,30 ^b	0,23^c
36	0,40 ^a	0,10 ^d	0,20 ^{cd}	0,23^c
Ortalama	0,117^C	0,155^A	0,147^B	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	231,00**
F değeri (Yöntem-Y)	474,17**	89,58**	469,83**	349,78**
F değeri (E×Y)	-	-	-	168,07**
VK (%)	10,10	14,23	8,00	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).

Tüm rejenrasyon sitemlerinden meydana gelen bitkilerin toplamının eksplant sayısına bölünmesiyle elde edilen eksplant başına bitki sayısı (EBBS) (adet/eksplant), üzerine eksplant tipinin ana etkisi önemli ($p<0,01$) olmuştur (Tablo 22, Şekil 21). Yöntemlerin ortalamasına göre eksplantların EBBS değerlendirildiğinde, en yüksek EBBS 0,717 ile hipokotilde elde edilmiş, bunu sırasıyla 0,706 ile kotiledon ve 0,661 ile embriyo eksen eksplantları izlemiştir (Tablo 22). EBBS bakımından hipokotil ile kotiledon arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olurken, bu eksplantlarla embriyo eksen arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir (Tablo 22).

Araştırmada, yöntemlere göre eksplant başına bitki sayısı EBBS 0,07 (1 nolu yöntem) ile 1,07 (20 nolu yöntem) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 22). Embriyo ekseninde 2 yöntemde (1 ve 17 nolu yöntemler), hipokotilde 1 yöntemde (1 nolu yöntem) bitki meydana gelmemiş, kotiledonda ise tüm yöntemlerde bitki meydana geldiği gözlenmiştir (Tablo 22). Bitki oluşumunu meydana geldiği yöntemlere göre, embriyo ekseninde EBBS 0,20 (2, 6 ve 11 nolu yöntemler) ile 1,15 (13 nolu yöntem) arasında değişirken, hipokotilde 0,20 (2 ve 6 nolu yöntemler) ile 1,10 (13 ve 20 nolu yöntemler) ve kotiledonda 0,10 (3 nolu yöntem) ile 1,03 (20 nolu yöntem) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 22).

Tablo 22. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre EBBS (adet/eksplant)¹

Yöntem	EBBS (adet/eksplant)			Ortalama
	Embriyo eksemi	Hipokotil	Kotiledon	
1	0,00 ^p	0,00 ⁿ	0,20 ^m	0,07^p
2	0,20 ^o	0,20 ^m	0,50 ^{kl}	0,30^o
3	0,50 ^{lm}	0,35 ^{kl}	0,10 ^m	0,32^{no}
4	0,78 ^{f-i}	0,75 ^g	0,93 ^{abc}	0,82^{bc}
5	0,68 ^{hij}	0,83 ^{efg}	0,48 ^{kl}	0,66^{fgh}
6	0,20 ^o	0,20 ^m	0,58 ^{ijk}	0,33^{no}
7	0,93 ^{cde}	0,85 ^{efg}	0,78 ^{d-h}	0,85^{bc}
8	0,48 ^{lmn}	0,43 ^{kl}	0,45 ^{kl}	0,45^{lm}
9	0,83 ^{efg}	0,88 ^{d-g}	0,85 ^{b-f}	0,85^{bc}
10	0,65 ^{ijk}	0,95 ^{b-e}	0,85 ^{b-f}	0,82^{bc}
11	0,20 ^o	0,58 ^{hi}	0,38 ^l	0,38^{mn}
12	1,08 ^{ab}	1,08 ^{ab}	0,88 ^{b-e}	1,01^a
13	1,15 ^a	1,10 ^a	0,93 ^{abc}	1,06^a
14	0,58 ^{def}	0,85 ^{efg}	0,73 ^{fgh}	0,72^{efg}
15	0,85 ^{def}	0,85 ^{efg}	0,83 ^{c-g}	0,84^{bc}
16	0,85 ^{def}	0,88 ^{d-g}	0,85 ^{b-f}	0,86^{bc}
17	0,00 ^p	0,78 ^g	0,73 ^{fgh}	0,50^{kl}
18	0,98 ^{bcd}	0,88 ^{d-g}	0,75 ^{e-h}	0,87^b
19	0,68 ^{hij}	0,93 ^{c-f}	0,55 ^{jk}	0,72^{efg}
20	1,08 ^{ab}	1,10 ^a	1,03 ^a	1,07^a
21	0,85 ^{def}	0,80 ^{fg}	0,90 ^{a-d}	0,85^{bc}
22	0,75 ^{f-i}	0,95 ^{b-e}	0,85 ^{b-f}	0,85^{bc}
23	0,75 ^{f-i}	0,78 ^g	0,83 ^{c-g}	0,78^{cde}
24	0,48 ^{lmn}	0,45 ^{ijk}	0,78 ^{d-h}	0,57^{ijk}
25	1,05 ^{abc}	1,05 ^{abc}	0,98 ^{ab}	1,03^a
26	0,35 ⁿ	0,53 ^{hij}	0,58 ^{ijk}	0,48^l
27	0,40 ^{mn}	0,88 ^{d-g}	0,93 ^{abc}	0,73^{def}
28	0,80 ^{e-h}	0,85 ^{efg}	0,93 ^{abc}	0,86^{bc}
29	0,93 ^{cde}	0,85 ^{efg}	0,75 ^{e-h}	0,84^{bc}
30	0,50 ^{lm}	0,83 ^{efg}	0,70 ^{ghi}	0,68^{fg}
31	0,70 ^{g-j}	0,60 ^h	0,45 ^{kl}	0,58^{hij}
32	0,65 ^{ijk}	0,43 ^{kl}	0,48 ^{kl}	0,52^{jkl}
33	0,98 ^{bcd}	0,78 ^g	0,68 ^{hij}	0,81^{bcd}
34	0,53 ^{klm}	0,55 ^{hij}	0,85 ^{b-f}	0,64^{ghi}
35	0,75 ^{f-i}	0,88 ^{d-g}	0,93 ^{abc}	0,85^{bc}
36	0,70 ^{g-j}	0,30 ^{lm}	0,50 ^{kl}	0,50^{kl}
Ortalama	0,661^C	0,717^A	0,706^A	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	48,87**
F değeri (Yöntem-Y)	149,41**	105,74**	79,61**	259,39**
F değeri (E×Y)	-	-	-	36,33**
VK (%)	7,35	7,44	7,09	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).



H-DO-12.Yöntem



H-İO-36.Yöntem



K-DO-25.Yöntem



E-DO-12.Yöntem



K-DO-13.Yöntem



K-DO-20.Yöntem



H-DSE-25.Yöntem



E-DO-25.Yöntem



K-İSE-21.Yöntem

Şekil 21. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen bitkilerin görünümü (Esplant-Rejenerasyon sistemi-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo eksen, DO: Direkt organogenesis, İDO: İndirekt organogenesis, DSE: Direkt somatik embriyogenesis, İSE: İndirekt somatik embriyogenesis. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9'da verilmiştir.



E-DO-12.Yöntem



H-İSE-12.Yöntem



E-DO-12.Yöntem



E-DO-18.Yöntem



E-DO-33.Yöntem



H-DO-25.Yöntem



Şekil 21. Farklı eksplant ve yöntemlerde meydana gelen bitkilerin görünümü (Esplant-Rejenerasyon sistemi-Yöntem). K: Kotiledon; H: Hipokotil, E: Embriyo eksen, DO: Direkt organogenesis, İDO: İndirekt organogenesis, DSE: Direkt somatik embriyogenesis, İSE: İndirekt somatik embriyogenesis. Yöntem numaralarının açıklamaları Tablo 9'da verilmiştir.

İkinci aşama

Kallus eksplantının elde edilmesi

Birinci aşamada kullanılan tüm eksplantlarda en yüksek kallus oluşumu %100 ile 30 nolu yöntemden elde edilmiştir. Bu yöntemin ortam ve kültür şartlarında 14 gün süreyle kültürlü alınan embriyo eksen, hipokotil ve kotiledon eksplantlarından elde edilen kalluslar [embriyo

ekseni kaynaklı kallus (E-kallus), hipokotil kaynaklı kallus (H-kallus) ve kotiledon kaynaklı kallus (K-kallus)] 8 farklı ortamda kültüre alınmıştır. Bu aşamada elde edilen bulgular aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

İndirekt organogenesis (İOO) ve somatik embriyogenesis oranı (İSEO) (%)

Araştırmada, İOO bakımından eksplant tipleri arasındaki fark önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Tablo 23). Yöntemlerin ortalamasına göre, en yüksek İOO %28,1 ile E-kallustan elde edilmiş, bunu sırasıyla %26,6 ile H-kallus ve %25,9 ile K-kallus eksplantları izlemiştir (Tablo 23, Şekil 22). E-kallus ve H-kallus arasındaki fark önemsiz olurken, bu eksplantlarla K-kallus arasındaki fark önemli ($p<0,05$) bulunmuştur (Tablo 23). Diğer taraftan, Ortamların İOO %0,0 (4 ve 6 nolu ortamlar) ile %47,5 (5 nolu ortam) arasında değişmiş ve ortamın ana etkisi %1 önem seviyesinde önemli olmuştur (Tablo 23).

Eksplantların indirekt organogenesis oluşum oranları ortama göre farklılık göstermiş ve E×O interaksiyonun etkisi önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Tablo 23). Diğer taraftan, her üç eksplant tipinde de 2 ortamda (4 ve 6 nolu ortamlar) indirekt organogenesis meydana gelmemiştir (Tablo 23). E-kallusta indirekt organogenesisin meydana geldiği ortamların İOO %20,0 (8 nolu ortam ile %52,5 (5 nolu yöntem) arasında değişim göstermiştir. Bu oran, H-kallusta %20,0 (7 nolu ortam) ile %60,0 (5 nolu ortam) ve K-kallusta %20,0 (3 nolu ortam) ile %50,0 (8 nolu ortam) arasında olmuştur (Tablo 23).

Tablo 23. Eksplant Tiplerinin Ortamlara Göre İOO (%)¹

Ortam	E-kallus	H-kallus	K-kallus	Ortalama
1	40,0 ^b	37,5 ^b	40,0 ^b	39,2 ^b
2	27,5 ^c	27,5 ^c	27,5 ^c	27,5 ^d
3	57,5 ^a	37,5 ^b	20,0 ^d	38,3 ^b
4	0,0 ^d	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e
5	52,5 ^a	60,0 ^a	30,0 ^c	47,5 ^a
6	0,0 ^d	0,0 ^e	0,0 ^e	0,0 ^e
7	27,5 ^c	20,0 ^d	40,0 ^b	29,2 ^d
8	20,0 ^c	30,0 ^c	50,0 ^a	33,3 ^c
Ortalama	28,1^A	26,6^A	25,9^B	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	4,87**
F değeri (Ortam-O)	148,43**	172,14**	434,14**	452,50**
F değeri (E×O)	-	-	-	63,30**
VK (%)	12,57	11,53	6,82	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir ($p>0,05$).



Şekil 22. Farklı eksplant ve ortamlarda indirekt organogenesis oluşumu (Eksplant-Ortam). EK: Embriyo eksen-kallus; HK: Hipokotil-kallus, KK: Kotiledon-kallus. Ortam numaralarının açıklamaları Tablo 10’da verilmiştir.

İndirekt somatik embriyogenesis oranı (İSEO) (%) bakımından eksplant tipleri arasında farklılık görülmüş ve bu farklılık istatistiksel olarak önemli ($p < 0,01$) bulunmuştur (Tablo 24). Ortamların ortalamasına göre en yüksek İSEO %55,6 ile K-kallusta elde edilmiş, bunu sırasıyla %46,3 ile E-kallus ve %42,8 ile H-kallus eksplantları izlemiştir (Tablo 24, Şekil 23). Diğer taraftan, İSEO bakımından ortamlar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli ($p < 0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 24). Eksplantların ortalamasına göre en yüksek ortalama indirekt somatik embriyogenesis oluşumu oranı %79,2 ile 6 nolu ortamda ve en düşük ise %35,8 ile 1 nolu ortamda gözlenmiştir (Tablo 24).

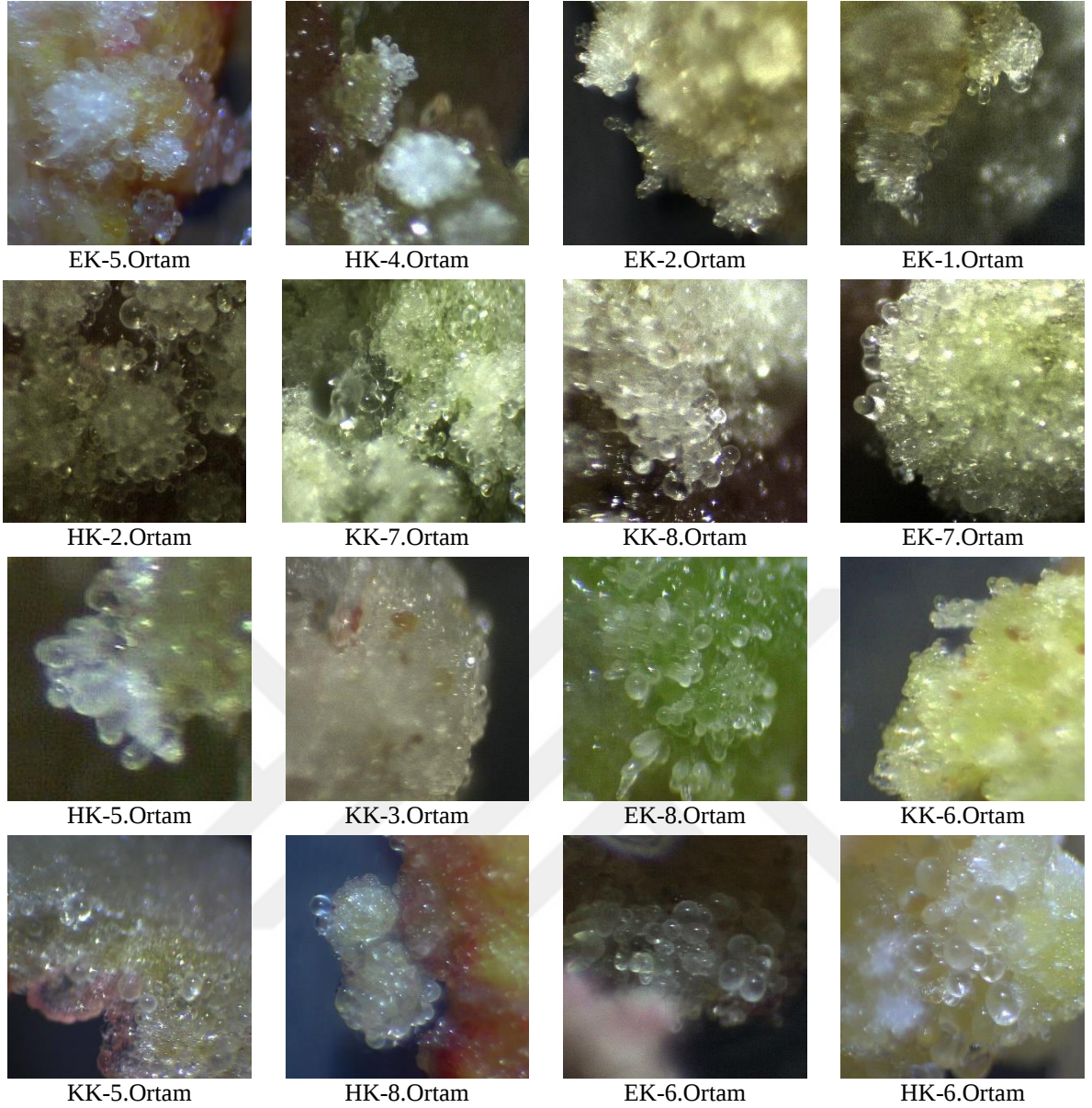
Eksplantların indirekt somatik embriyogenesis oluşum oranlarının ortama göre değişim göstermesi E×O interaksiyonun önemli ($p < 0,01$) çıkmasına neden olmuştur (Tablo 24).

Eksplantların kültüre alındığı tüm ortamlarda somatik embriyo oluşumu gözlenmiştir. Kallus eksplantlarının ortamlara göre İSEO bakıldığında, E-kallus eksplantının İSEO %20,0 (3 nolu ortam) ile %85 (6 nolu ortam) arasında, H-kallus eksplantının %20,0 (1 nolu ortam) ile %75,0 (6 nolu ortam) arasında ve K-kallus eksplantının ise %30,0 (8 nolu ortam) ile %77,5 (6 nolu nolu) arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 24).

Tablo 24. Eksplant Tiplerinin Ortamlara Göre İSEO (%)¹

Ortam	E-kallus	H-kallus	K-kallus	Ortalama
1	32,5 ^c	20,0 ^e	55,0 ^c	35,8 ^d
2	45,0 ^b	52,5 ^b	52,5 ^c	50,0 ^b
3	20,0 ^d	45,0 ^{bc}	62,5 ^{bc}	42,5 ^c
4	52,5 ^b	32,5 ^d	62,5 ^{bc}	49,2 ^b
5	45,0 ^b	40,0 ^{cd}	67,5 ^{ab}	50,8 ^b
6	85,0 ^a	75,0 ^a	77,5 ^a	79,2 ^a
7	47,5 ^b	32,5 ^d	37,5 ^d	39,2 ^{cd}
8	42,5 ^{bc}	45,0 ^{bc}	30,0 ^d	39,2 ^{cd}
Ortalama	46,3^B	42,8^C	55,6^A	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	60,49**
F değeri (Ortam-O)	55,71**	49,12**	42,62**	97,17**
F değeri (E×O)	-	-	-	25,44**
VK (%)	10,81	10,92	8,60	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).



Şekil 23. Farklı eksplant ve ortamlarda indirekt somatik embriyogenesis oluşumu (Eksplant-Ortam). EK: Embriyo eksen-kallus; HK: Hipokotil-kallus, KK: Kotiledon-kallus. Ortam numaralarının açıklamaları Tablo 10'da verilmiştir.

Bitki sayısı

Araştırmada, indirekt organogenesis kaynaklı bitki sayısı (İOBS) (adet/eksplant) üzerine eksplant tipinin ana etkisi önemli ($p<0,01$) olmuştur (Tablo 25). Ortamların ortalamasına göre eksplantların İOBS değerlendirildiğinde, en yüksek İOBS 0,29 ile E-kallusta elde edilirken bunu sırasıyla 0,28 ile H-kallus ve 0,27 ile H-kallus eksplantları izlemiştir (Tablo 25). Araştırmada, 2 ortamda (4 ve 6 nolu ortamlar) indirekt organogenesis kaynaklı bitki meydana gelmemiş, meydana gelen ortamların İOBS ise 0,28 (2 nolu ortam) ile 0,55 (5 nolu ortam) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 25). Eksplantların indirekt organogenesis kaynaklı bitkilerin ortama göre değişim göstermesi E×O interaksyonun önemli ($p<0,01$) çıkmasına neden olmuştur. E-kallus eksplantında indirekt organogenesisinden bitki meydana

gelen yöntemlerin İOBS 0,20 (8 nolu ortam) ile 0,58 (3 nolu ortam) arasında değişirken, H-kallusta 0,20 (7 nolu ortam) ile 0,68 (5 nolu ortam) ve K-kallus 0,20 (3 nolu ortamlar) ile 0,50 (8 nolu ortam) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 25).

Tablo 25. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre İOBS (adet/eksplant)¹

Ortam	E-kallus	H-kallus	K-kallus	Ortalama
1	0,40 ^b	0,38 ^b	0,40 ^b	0,39^b
2	0,28 ^c	0,28 ^{cd}	0,28 ^c	0,28^d
3	0,58 ^a	0,38 ^b	0,20 ^d	0,38^b
4	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00^e
5	0,60 ^a	0,68 ^a	0,38 ^b	0,55^a
6	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00^e
7	0,28 ^c	0,20 ^d	0,40 ^b	0,29^d
8	0,20 ^d	0,30 ^{bc}	0,50 ^a	0,33^c
Ortalama	0,29^A	0,28^{AB}	0,27^B	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	4,33*
F değeri (Ortam-O)	223,19**	154,29**	227,14**	467,79**
F değeri (E×O)	-	-	-	56,27**
VK (%)	10,54	12,86	9,30	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).

İndirekt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki sayısı (İSEBS) (adet/eksplant) bakımından eksplant tipleri arasındaki farkın önemli (p<0,01) olduğu bulunmuştur. En yüksek İSEBS 0,55 ile K-kallusta elde edilirken bunu sırasıyla 0,47 ile E-kallus ve 0,43 ile H-kallus eksplantları izlemiştir (Tablo 26). İSEBS bakımından ortamlar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli (p<0,01) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 26). İndirekt somatik embriyogenesis kaynaklı bitki meydana gelen ortamların İSEBS 0,33 (1 nolu ortam) ile 0,53 (5 nolu ortam) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 26).

Eksplantların indirekt somatik embriyogenesisden bitki oluşumları ortama göre değişim göstermesi E×O interaksyonun önemli (p<0,01) çıkmasına neden olmuştur (Tablo 26). E-kallusta indirekt somatik embriyogenesisden bitkinin meydana geldiği ortamların İSEBS 0,20 (3 nolu ortam) ile 0,85 (6 nolu ortam) arasında, H-kallusta 0,20 (1 nolu ortam) ile 0,75 (6 nolu ortam) ve K-kallusta 0,30 (8 nolu ortam) ile 0,78 (6 nolu ortam) arasında değişmiştir (Tablo 26).

Tablo 26. Eksplant Tiplerinin Ortamlara Göre İSEBS (adet/eksplant)¹

Ortam	E-kallus	H-kallus	K-kallus	Ortalama
1	0,30 ^d	0,20 ^e	0,50 ^d	0,33^d
2	0,45 ^{bc}	0,53 ^b	0,53 ^{cd}	0,50^{bc}
3	0,20 ^e	0,45 ^{bc}	0,63 ^{bc}	0,43^{bc}
4	0,53 ^b	0,33 ^d	0,63 ^{bc}	0,49^{bc}
5	0,50 ^{bc}	0,40 ^{cd}	0,68 ^{ab}	0,53^b
6	0,85 ^a	0,75 ^a	0,78 ^a	0,79^a
7	0,48 ^{bc}	0,33 ^d	0,38 ^e	0,39^{cd}
8	0,43 ^c	0,45 ^{bc}	0,30 ^e	0,39^{cd}
Ortalama	0,47^B	0,43^C	0,55^A	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	64,13**
F değeri (Ortam-O)	81,45**	49,12**	52,95**	123,28**
F değeri (E×O)	-	-	-	28,61**
VK (%)	9,04	10,92	7,87	

¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).

Her iki rejenrasyon siteminden meydana gelen bitkilerin toplamının eksplant sayısına bölünmesiyle elde edilen eksplant başına bitki sayısı (EBBS) (adet/eksplant) üzerine eksplant tipinin ana etkisi önemli (p<0,01) olmuştur (Tablo 27). Ortamların ortalamasına göre eksplantların EBBS değerlendirildiğinde, en yüksek EBBS 0,82 ile K-kallusta elde edilirken bunu sırasıyla 0,76 ile E-kallus ve 0,70 ile H-kallus eksplantları izlemiştir (Tablo 27, Şekil 24). EBBS bakımından ortamlar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli (p<0,01) olduğu bulunmuştur. Araştırmada, ortamlara göre EBBS 0,49 (40 nolu yöntem) ile 1,08 (5 nolu ortam) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 27). E-kallus eksplantta EBBS 0,53 (4 nolu ortam) ile 1,10 (5 nolu ortam) arasında değişirken, H-kallusta 0,33 (4 nolu ortam) ile 1,08 (5 nolu ortam) ve K-kallusta 0,63 (4 nolu ortam) ile 1,05 (5 nolu ortam) arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 27).

Tablo 27. Eksplant Tiplerinin Yöntemlere Göre EBBS (adet/eksplant)¹

Ortam	E-kallus	H-kallus	K-kallus	Ortalama
1	0,70 ^{cd}	0,58 ^c	0,90 ^b	0,73^{cd}
2	0,73 ^{cd}	0,80 ^b	0,80 ^{bc}	0,78^{bc}
3	0,78 ^{bc}	0,83 ^b	0,83 ^{bc}	0,81^b
4	0,53 ^e	0,33 ^d	0,63 ^d	0,49^e
5	1,10 ^a	1,08 ^a	1,06 ^a	1,08^a
6	0,85 ^b	0,75 ^b	0,78 ^c	0,79^b
7	0,75 ^{bc}	0,53 ^c	0,78 ^c	0,68^d
8	0,63 ^{de}	0,75 ^b	0,80 ^{bc}	0,73^{cd}
Ortalama	0,76^B	0,70^C	0,82^A	
F değeri (Eksplant-E)	-	-	-	41,16**
F değeri (Yöntem-Y)	55,46**	63,36**	23,36**	120,54**
F değeri (E×Y)	-	-	-	12,41**
VK (%)	6,04	8,08	6,11	

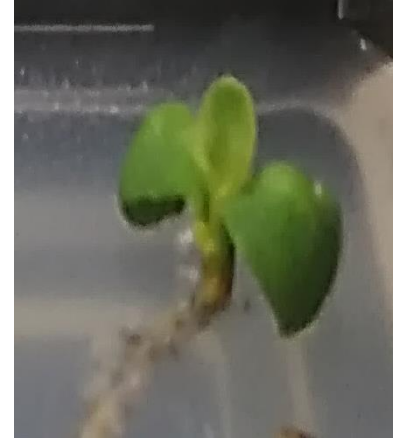
¹: Aynı sütunda aynı küçük harfle ve aynı satırda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir (p>0,05).



HK-İÖ-5.Ortam



EK-İSE-6.Ortam



KK-İÖ-8.Ortam



EK-İSE-5.Yöntem



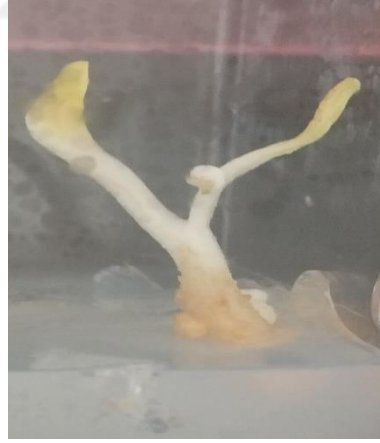
KK-İÖ-5.Ortam



HK-İÖ-3.Ortam



HK-İSE-5.Ortam



EK-İSE-2.Ortam



EK-İSE-5.Ortam

Şekil 24. Farklı eksplant ve ortamlarda meydana gelen bitkilerin görünümü (Eksplant-Ortam). EK: Embriyo eksen-kallus; HK: Hipokotil-kallus, KK: Kotiledon-kallus, İÖ: indirekt organogenesis, İSE: indirekt somatik embriyogenesis. Ortam numaralarının açıklamaları Tablo 10'da verilmiştir.

Somaklonal Varyasyon

Mikroçoğaltmanın amacı, küçük bir bitki dokusu parçasından çok sayıda genetik olarak özdeş bitkiyi hızla üretmektir. Bu nedenle bu araştırmada, EBBS bakımından birinci aşamadaki ExY ile ikinci aşamada ExO interaksiyonlarının önemliliği dikkate alınarak en yüksek rejenere bitki sayısının meydana geldiği sistemlerden (Tablo 28) elde edilen bitkilerin genetik kararlılıkları SCoT moleküler markör tekniği ile belirlenmiştir.

Tablo 28. Somaklonal Varyasyon Kullanılan Yöntem

Rejenerasyon sistem no	Eksplant	Yöntem/Or tam	EBBS	DOBS	İOBS	DSEBS	İSEBS
2	Embriyo ekseni	13	1,15	0,95	0,00	0,20	0,00
3	Hipokotil	13	1,10	0,50	0,20	0,22	0,18
4	Hipokotil	20	1,10	0,30	0,20	0,40	0,20
5	Embriyo ekseni	12	1,08	1,08	0,00	0,00	0,00
6	Hipokotil	12	1,08	0,30	0,00	0,60	0,18
7	Embriyo ekseni	20	1,08	0,40	0,10	0,40	0,18
8	Embriyo ekseni	25	1,05	0,60	0,00	0,45	0,00
9	Hipokotil	25	1,05	0,60	0,15	0,30	0,00
10	Kotiledon	20	1,03	0,40	0,18	0,25	0,20
11	Embriyo ekseni	33	0,98	0,00	0,10	0,58	0,30
12	Kotiledon	25	0,98	0,40	0,10	0,28	0,20
13	Embriyo ekseni	18	0,98	0,00	0,20	0,58	0,20
14	E-kallus	5. ortam	1,10	-	0,60	-	0,50
15	H-kallus	5. ortam	1,08	-	0,68	-	0,40
16	K-kallus	5. ortam	1,06	-	0,38	-	0,68

Araştırmada 30 SCoT primeri, ana bitkide test edilmiş ve bu primerlerden en iyi amplifikasyonu sağlayan 20 adet SCoT primeri (Tablo 29) toplamda 15 farklı rejenerasyon sisteminden elde edilen rejenere bitkilerin genetik kararlılığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Bazı SCoT primerlerine ait jel görüntüleri Şekil 26’de verilmiştir. Primer başına ortalama 16,65 adet bant, toplamda ise 333 adet DNA bantı elde edilmiştir. En fazla bant sayısı 20 adet ile SCoT-1 primerinden elde edilirken, en az ise 13 adet ile SCoT-22 primerinde gözlenmiştir. Primerlerin polimorfizm oranı (%PO) karşılaştırıldığında en yüksek %PO, %58,82 ile SCoT-35 primerde bulunurken en düşük ise %5,56 ile SCoT-29 primerinde kaydedilmiştir. Araştırmada kullanılan primerlerin ortalama %PO ise %28,37 olarak belirlenmiştir (Tablo 29).

Primerlerin polimorfik bilgi içeriklerinin (PIC), 0,077 (SCoT-21 primeri) ile 0,110 (SCoT-2 ve SCoT-29) arasında değiştiği, primerlerin PIC değeri bakımından benzer değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 29). Diğer taraftan, 4,125 ile SCoT-1 primeri en yüksek çözme gücüne (R) sahipken, 0,250 ile SCoT-26 ve SCoT-29 primerleri en düşük çözme gücüne sahip olmuştur. Araştırmada kullanılan primerlerin ortalama çözme gücü 1,825 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ayırt etme gücü (D), 0,282 (SCoT-21 primeri) ile 0,034 (SCoT-2 primeri)

arasında değiştiği belirlenmiş ve primerlerin ortalaması olarak 0,112 olarak bulunmuştur (Tablo 29).

Tablo 29. Çalışmada Kullanılan SCoT Primerlerinin Bant Bilgileri ve Polimorfizm Oranı.

Primer	PIC ^a	D ^b	R ^c	TB ^d	MB ^e	PB ^f	PO (%) ^g
SCoT-1	0,091	0,207	4,125	20	9	11	55,00
SCoT-2	0,110	0,034	0,625	18	16	2	11,11
SCoT-4	0,108	0,065	1,250	19	15	4	21,05
SCoT-5	0,109	0,051	0,875	17	16	1	5,88
SCoT-6	0,109	0,058	0,875	15	11	4	26,67
SCoT-8	0,106	0,098	1,500	15	12	3	20,00
SCoT-10	0,106	0,092	1,500	16	13	3	18,75
SCoT-12	0,095	0,185	3,500	18	12	6	33,33
SCoT-18	0,086	0,235	3,750	15	8	7	46,67
SCoT-21	0,077	0,282	2,625	16	9	7	43,75
SCoT-22	0,099	0,157	2,125	13	9	4	30,77
SCoT-25	0,108	0,062	0,875	14	10	4	28,57
SCoT-26	0,110	0,017	0,250	15	13	2	13,33
SCoT-28	0,104	0,115	2,125	18	12	6	33,33
SCoT-29	0,110	0,014	0,250	18	17	1	5,56
SCoT-30	0,109	0,048	0,875	18	16	2	11,11
SCoT-34	0,107	0,077	1,250	16	13	3	18,75
SCoT-35	0,098	0,162	2,875	17	7	10	58,82
SCoT-36	0,098	0,164	3,250	19	10	9	47,37
SCoT-40	0,103	0,121	2,000	16	10	6	37,50
Ortalama	0,102	0,112	1,825	16,65	11,90	4,75	28,37
Toplam	-	-	-	333	238	95	

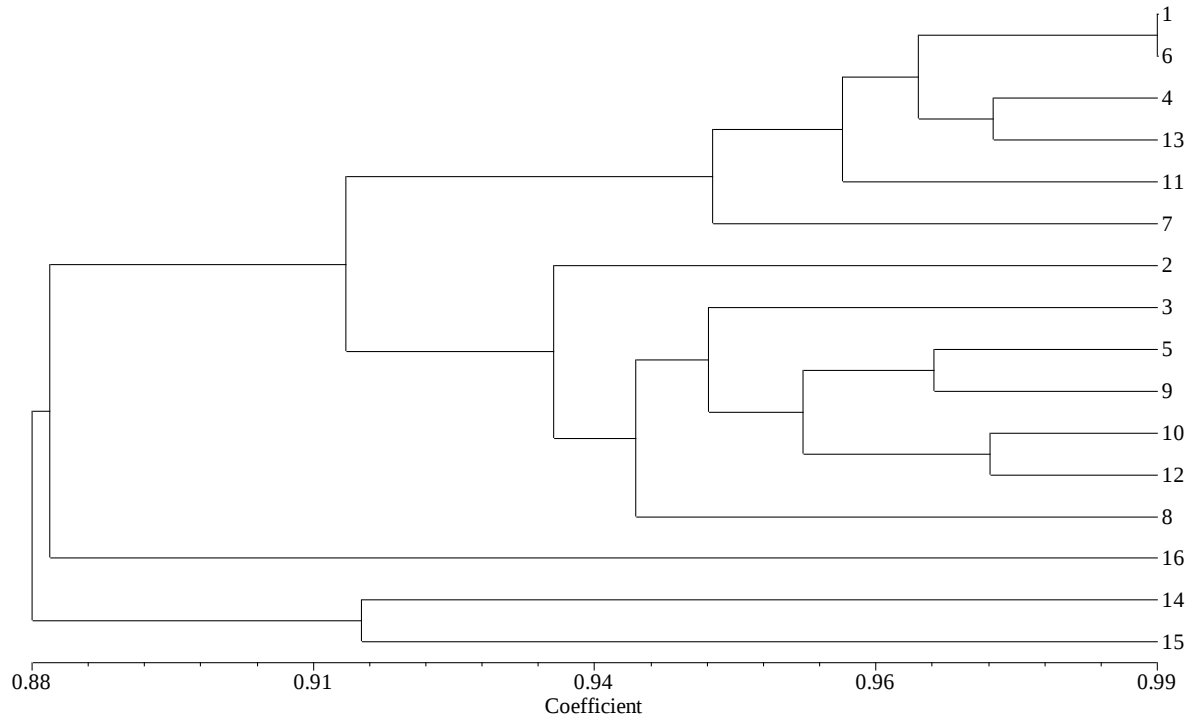
^a: Polimorfik bilgi içeriği (Liu 1998), ^b: Ayırt etme gücü (Tessier *et al.* 1999), ^c: Çözme gücü (Prevost and Wilkinson 1999), ^d: Toplam bant sayısı, ^e: Monomorfik bant sayısı, ^f: polimorfik bant sayısı, ^g: Polimorfizm oranı (%)

SCoT bant desenleri genellikle kabul edilebilir düzeyde polimorfizm göstermiştir. Jaccard benzerlik katsayısı ve UPGMA algoritması temel alınarak NTSYS pc 2.1 yazılımı ile elde edilen bir dendrogramla, sistemler arasındaki genetik ilişki ortaya konulmuştur (Şekil 25). Araştırma sonuçlarına göre, mikroçoğaltım sistemleri arasındaki benzerlik katsayıları 0,845-0,991 arasında değişim göstermiştir. Dahası, farklı sistemlerden meydana gelen rejenere bitkilerin ana bitki ile arasındaki benzerlik katsayıları 0,904 ile 0,991 arasında değişim göstermiştir (Tablo 30). Ana bitkiyle en yüksek benzerlik 0,991 ile hipokotil eksplantının 12. yöntemde kültür edilmesi sonucu elde edilen sistemde (6 nolu sistem) belirlenmiştir. Bunu 0,972 ile 13 nolu, 0,960 ile 4 nolu ve diğer sistemler izlemiştir (Tablo 30). Ana bitkiyle en düşük benzerlik 0,904 ile 15 nolu rejenerasyon sisteminde tespit edilmiştir. Dahası, ana bitkiyle elde edilen bu benzerliklerin mikroçoğaltım açısından kabul edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

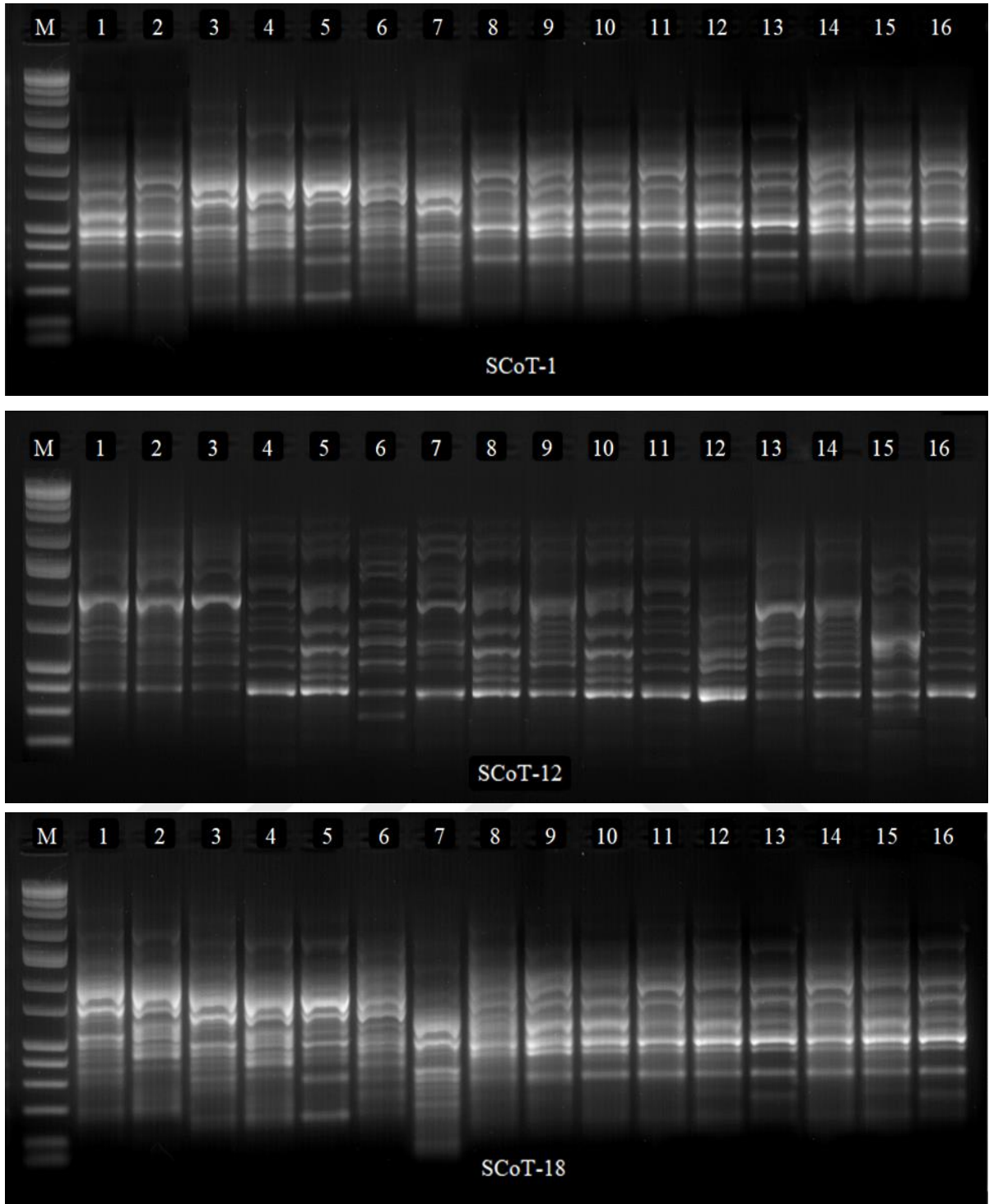
Tablo 30. Jaccard Benzerlik Katsayısı Kullanılarak 20 SCoT Primeri ile Belirlenen 15 Yöntem/Ortam ve Kontrol Arasındaki Genetik Benzerlik Değerleri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1,000															
2	0,940	1,000														
3	0,934	0,939	1,000													
4	0,960	0,901	0,895	1,000												
5	0,958	0,945	0,939	0,919	1,000											
6	0,991	0,931	0,925	0,969	0,949	1,000										
7	0,954	0,906	0,900	0,944	0,924	0,951	1,000									
8	0,927	0,926	0,932	0,888	0,945	0,918	0,894	1,000								
9	0,946	0,933	0,945	0,912	0,969	0,937	0,912	0,944	1,000							
10	0,928	0,927	0,950	0,889	0,957	0,919	0,900	0,950	0,969	1,000						
11	0,951	0,909	0,891	0,965	0,927	0,960	0,941	0,896	0,903	0,891	1,000					
12	0,922	0,926	0,956	0,888	0,945	0,913	0,894	0,932	0,957	0,975	0,885	1,000				
13	0,972	0,913	0,907	0,975	0,937	0,969	0,950	0,900	0,919	0,901	0,966	0,895	1,000			
14	0,911	0,858	0,846	0,889	0,876	0,914	0,871	0,868	0,864	0,852	0,885	0,845	0,890	1,000		
15	0,904	0,879	0,896	0,864	0,915	0,895	0,870	0,907	0,902	0,907	0,867	0,901	0,877	0,914	1,000	
16	0,911	0,858	0,863	0,889	0,888	0,914	0,894	0,868	0,881	0,869	0,891	0,868	0,901	0,886	0,873	1,000

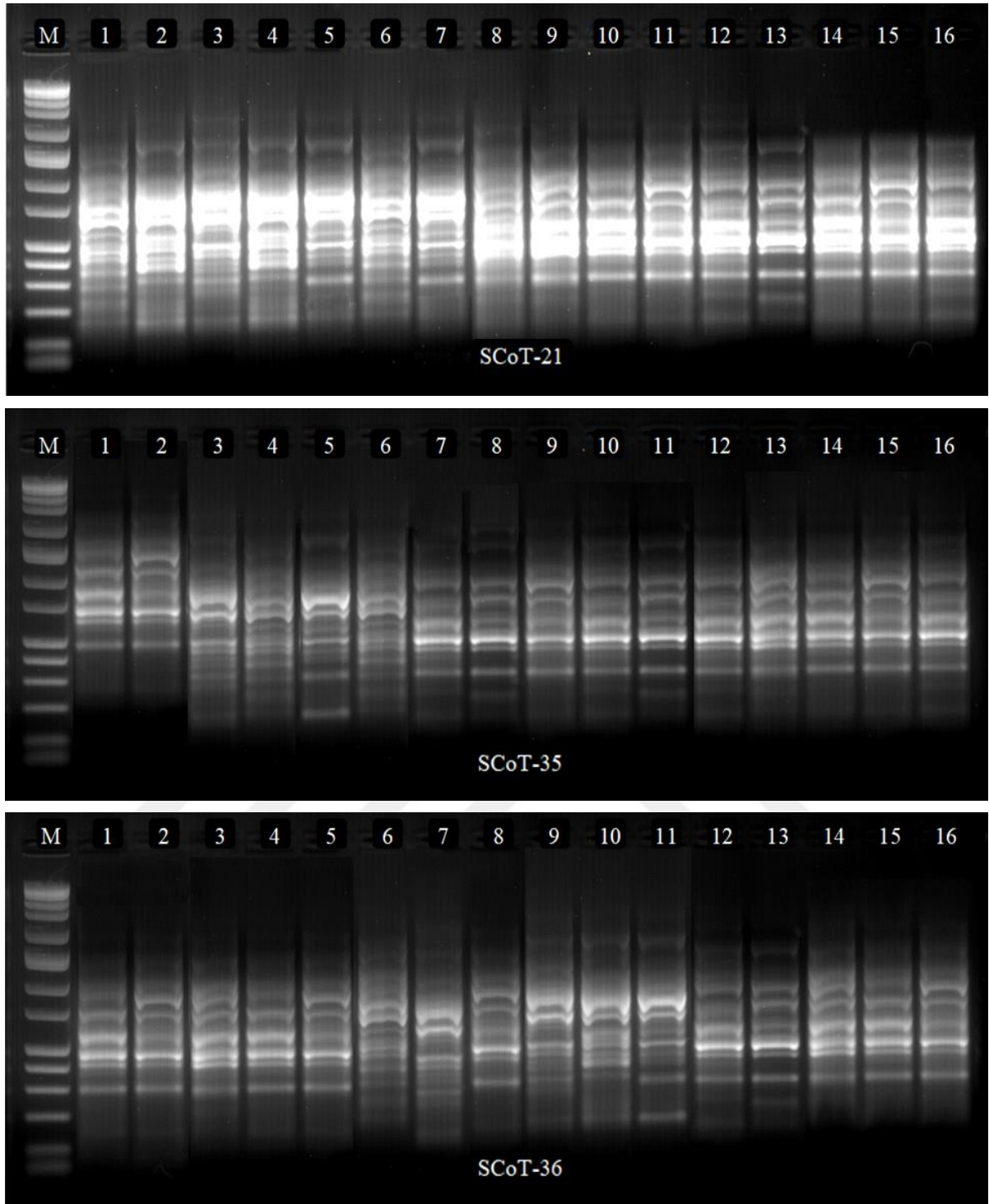
1: Ana bitki, 2 -16 nolu sistemlerin açıklamaları Tablo 28’de verilmiştir



Şekil 25. Ana bitki (1) ile rejenerasyon sistemleri arasındaki genetik ilişki dendrogramı.



Şekil 26. Bazı SCoT primerlerinden elde edilen jel elektroforez görüntüleri, M: Markör; 1: Ana bitki, 2 -16 nolu sistemlerin açıklamaları Tablo 28’de verilmiştir.



Şekil 26. Bazı SCoT primerlerinden elde edilen jel elektroforez görüntüleri, M: Markör; 1: Ana bitki, 2 -16 nolu sistemlerin açıklamaları Tablo 28’de verilmiştir. (Devamı)

TARTIŞMA

Geçmişten günümüze kadar, tıbbi ve aromatik bitkiler birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda bitkisel kökenli ilaçlara yönelik yapılan araştırmalar ile tıbbi bitkilerin içerdiği biyoaktif bileşiklerin farmakoloji üzerinde önemli etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Pandith and khan 2022; Bernela *et al.* 2023). Gerek sağlık alanında gerekse alternatif tıpta tıbbi bitkilerin aşırı kullanımı sonucunda habitat bozulmasını önlemek, bitkilerin doğal popülasyonlarını ve tükenmekte olan bitkilerin devamlılığını sağlayarak tıbbi bitkilere olan artan talebi karşılamak için alternatif üretim teknikleri geliştirmek zorunlu hale gelmiştir (Mehalaine and Chenchouni 2021). Doku kültürü, in vitro çoğaltma, rejenerasyon, farmasötik olarak önemli biyoaktif bileşiklerin üretimi ve de nadir ve tehlike altındaki tıbbi bitkilerin germplazm muhafazasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Das and Rout, 2002). Niazian (2019), biyoaktif bileşiklerin aşırı üretimi, tıbbi bitkilerin in vitro muhafazası ve mikroçoğaltımı için bitki doku kültürü yöntemlerinin başarılı bir şekilde kullanıldığını bildirmiştir. Özellikle, bitki doku kültürünün önemli uygulama alanlarından biri olan in vitro mikroçoğaltım tekniği tıbbi bitkilerin hızlı çoğaltımında etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Mehalaine and Chenchouni 2021). Dahası, in vitro mikroçoğaltım tekniği, düzenli, kaliteli ve yüksek verimli bir üretim sistemi sağlama potansiyeline sahiptir. Belirli bir benzer genotipteki bireylerin kolay ve hızlı üretimi için faydalı bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Pandith *et al.* 2018).

Tohum, bitki germplazmını korumak ve bitkiyi istenilen bölgeye taşımak için bitkinin en temel unsurudur. Yabani bitkilerde tohumla çoğaltmanın en önemli aşaması etkili bir çimlenme yönteminin belirlenmesidir. Tohum çimlenmesi sırasındaki uygun olmayan çevre koşulları ve tohum dormansisi gibi nedenler çimlenme oranını düşürmekte ve bunun sonucunda bitkilerin ex situ olarak korunmasını önlemektedir (Yamaner and Erdağ 2021). Bu soruna karşın geleneksel yöntemlerle çimlendirilmesi zor olan yabani bitkilerde in vitro çimlendirme bir alternatif sunmuştur. Dahası ana bitkiden alınan steril koşullar altında in vitro olarak elde edilen eksplantlar, ex vitro olarak elde edilen eksplantlardan in vitro çalışmalarda daha uygun olduğu yapılan çalışmalar (Hussain *et al.* 2012) sonucunda bildirilmiştir. Bu araştırmada çimlenme oranı bakımından embriyolar tohuma göre daha yüksek bir çimlenme oranına sahip olmuştur. Tohumdaki çimlenme oranının düşüklüğünün muhtemel sebebi embriyoyu çevreleyen dokularda bulunan inhibitörlerden kaynaklanmış olabilir. Dahası embriyonun izolasyonu ve in vitro kültürü bu bitkide tohum dormansi halinin üstesinden gelmek için uygun bir yaklaşım olduğu sonucuna varılmıştır. Song (2013), *Rheum*'un tohumlarının embriyo ve bazı içsel inhibitörlerin neden olduğu orta düzeyde bir tohum dormansisi olduğunu ve *Rheum*'da tohum çimlenmesinin

türe ve habitata özgü olduğu ve hatta toprak nemindeki değişikliklere duyarlı olduğunu bildirmiştir. Yine araştırmamızda, her iki eksplantta da en yüksek çimlenme oranı ve en az ortalama çimlenme zamanı 1,75 mg/l GA3 ve 1 mg/l IBA içeren ½ MS ortamında elde edilmiştir. GA3, tohum çimlenmesini uyarmak için hidrolitik enzimleri indükleyerek koruyucu dokuları olan endosperm veya tohum kabuğunu zayıflatıp tohum depo rezervlerinin hareketliliğini sağlayarak embriyonun büyümesini teşvik etmektedir (Bewley and Black 1994; Kucera *et al.* 2005). Diğer taraftan tohum dormansisinin kırılması için, soğukta nemli katlama, GA3 uygulama, tohum kabuğunu mekanik olarak aşındırma ve tohum ucunu kesme yöntemleri kullanılmaktadır (Hassan and Fardous 2003; Rahmanpour *et al.* 2007; Keskiner and Tuncer 2019). Yapılan araştırmalarda IBA'nın embriyo çimlenmesini, kök ve sürgün oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir (Samuel *et al.* 2009). Dhoran and Gudadhe (2012) çalışmalarında *Asparagus sprengeri*'de GA3 ve IBA uygulamasının, tohum dormansisinin kırılmasında etkili olduğunu ve en yüksek çimlenme ve canlılık indeksinin GA3 uygulamasında elde edildiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, ½ MS ortamında *Rheum* türlerinde (*R. khorasanicum* (Darrudi *et al.* 2015) ve *R. spiciforme* (Khan *et al.* 2022)) GA3 uygulamalarının çimlenme parametreleri üzerine olumlu etkilerinin olduğu kaydedilmiştir.

Bitki doku kültüründe kararma, eksplantların, farklılaşma ve/veya yeniden farklılaşma sürecinde kendi dokularından ortama kahverengi maddeler veya fenolikler saldıgı bir olguyu ifade eder (Shen 2005; Amente and Chimdessa 2021). Fenoller, ortak olarak bir veya daha fazla hidroksil bileşeni taşıyan aromatik bir halkaya sahip çok çeşitli bitki maddelerini kapsayan kimyasal bileşiklerdir (Onuoha *et al.* 2011). Fenolik bileşikler genellikle sağlıklı bitki dokularında bulunur ve özelleşmiş hücre tiplerinde birikebilirken (Beckman 2000), özellikle doku yaralanması veya stresi takiben daha bol miktarda üretilir ve/veya bir savunma tepkisi olarak salınır (Dixon and Paiva 1995; Beckman 2000). Dahası, fenolik içerikleri yüksek olan bitkilerin in vitro kültür şartlarında kullanılan eksplantların kesik uçlarından kültürün ileri zamanlarında salınan polifenolik bileşiklerin oksidasyonu sonucunda kullanılan eksplantlarda (hipokotil, kotiledon, kallus vb.) kararma meydana gelebilmekte ve bu durum bitki rejenerasyon sürecinde önemli sorun teşkil etmektedir (Murkute and Patil 2003). Bu sorunu aşmak için askorbik asit, Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Patil *et al.* 2011; Satheesh and Sridharan 2014; Singh and Chaturved 2022) ve aktif karbon (Kumar *et al.* 2019b) gibi antioksidan kimyasalların kullanılmasının yanı sıra eksplantların düzenli aralıklarla alt kültüre edilmesi (Murkute and Patil 2003; Desai *et al.* 2018) gibi kültür uygulamalarına başvurulmaktadır. Ancak bu yöntemlerin etkinliği türden türe ve bitkinin fizyolojik koşullarına göre değişmektedir. Araştırmamızda, eksplantların kültürü sırasında fenolik bileşik kaynaklı

kararma sorunuyla karşılaşılmış ve meydana gelen kararmayı önlemek için farklı ışıklandırma koşullarında eksplantlar 200 mg/l aktif karbon, 100 mg/l askorbik asit ve 0,7 mg/l PVP MS ortamlarında kültüre alınarak ön deneme yapılmıştır. Ön deneme sonucunda kültür ortamlarında 0,7 mg/l PVP kullanılmasının ve eksplantların 2 hafta boyunca karanlık bir ortamda kültüre alındıktan sonra ışık koşullarında 3 hafta süreyle alt kültüre alınmasının kararmayı kontrol etmek için en etkili yöntem olduğu bulunmuştur (veri sunulmamıştır). Ön denemelerimiz sonucunda belirlenen bu yöntem daha önce fenolik içeriği yüksek olan *Punica granatum* L.'de (Verma *et al.* 2021) kararmayı önlemek amacıyla başarıyla kullanılmıştır.

Oksin ve sitokininler, bitki doku kültüründe hücre büyümesi ve farklılaşması, kallus oluşumu, kallustan adventif sürgün ve kök oluşumu gibi süreçlerde önemli rollere sahiptirler (Duangporn and Siripong 2009). Kallus indüksiyonu bitkilerin içsel oksin ve sitokinin seviyelerine bağlı olarak eksojen olarak uygulanan yüksek oksin/sitokinin uygulamasıyla ilişkilidir. Dahası içsel oksin ve sitokinin seviyeleri türe ve genotipe özgüdür (Centeno *et al.* 1996; Su *et al.* 2011; Gutiérrez *et al.* 2011). Oksinler arasında, 2,4-D kallus oluşumu için en iyi ve etkili sentetik oksin tiplerinden biri olup tek ve çift çenekli bitkilerin kallus kültürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ho and Vasil 1983; Chee 1990; Mamun *et al.* 1996). Ayrıca, bitki türü ve çeşidine bağlı olarak BAP ve KIN sitokininleri, 2,4-D ile birlikte kallus indüksiyonu için kullanılmaktadır (Chai and Sticklen 1998). Genellikle, birçok bitki türünde eşit sitokinin/oksin oranı kallus indüksiyonunu uyarmaktadır (Skoog and Miller 1957; Rahman *et al.* 2019). Benzer şekilde araştırmamızda da en yüksek kallus oluşum oranı (%100) tüm eksplant tiplerinde eşit miktarda oksin (1 mg/l 2,4-D) ve sitokininin (0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l KIN) (30 nolu yöntem) uygulamalarında belirlenmiştir. Tuncer ve Günsan (2017) *Rheum ribes*'te eşit oranda oksin ve sitokinin (1 mg/l BAP+1 mg/l IBA) uygulamasında en yüksek kallus oluşum oranı gözlemlemişlerdir. Yine diğer *Rheum* cinslerinde (*R. franzenbachii* Munt., *R. spiciforme* Royle ve *R. emodi*) eşit konsantrasyonlarda oksin ve sitokinin ile desteklenen MS ortamlarında en yüksek kallus oluşum oranı elde edilmiştir (Paveen *et al.* 2012; Tabin *et al.* 2016, Tabin *et al.* 2018; Khan *et al.* 2022).

Araştırmamızda kallus oluşum oranları, yöntemlere ve eksplant tiplerine göre değişim göstermiştir. Ortalama kallus oluşum oranı bakımından, hipokotil ve kotiledon eksplantlarının embriyo eksenine göre daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Wang *et al.* (2011), *Rheum franzenbachii* Munt.'da en yüksek kallus oluşumunun yaprak eksplantlarından (%58,3), 2 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edildiğini bildirmişlerdir. Yine, *Rheum*'da yapılan birçok çalışmada kallus oluşumu için hipokotil eksplantlarının daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır (Farzami Sepehr and Ghorbanli 2002; Tabin *et al.* 2016; Tuncer

ve Günsan 2017). Diğer taraftan, *Rheum*'da yapılan çalışmalarda tek başına oksin tiplerinin kullanılması kallus oluşumunu önemli ölçüde arttırmıştır. *R. coreanum* Nakai'de üzerine yapılan bir çalışmada (Mun and Mun 2016), 0,3 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında en yüksek kallus oluşum oranı kaydedilmiştir. Benzer şekilde, *Rheum webbianum* Royle'de en yüksek kallus oluşum oranı (%100), 0,5 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamlarında elde edilmiştir (Rashid *et al.* 2014).

İn vitro ortamda gelişen kalluslar bitki türüne, eksplant tipine ve besin içeriğine bağlı olarak renk bakımından değişiklik göstermektedir (Winarto *et al.* 2011; Jia *et al.* 2014). Bu araştırmada farklı yöntemlerden ve eksplantlardan elde edilen kalluslarda farklı renkler gözlemlenmiş ve bu kallusların her birinin farklı rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Bulgularımızda 30 nolu yöntemde gelişen kallusların açık yeşil ve yeşil renkli olduğu ve bu kallusların yüksek rejenerasyon etkinliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Winarto *et al.* (2011), çalışmalarında kallus renklerinin yeşilden açık yeşile doğru değiştiğini ve her bir farklı renkteki kallusların ışık altında farklı rejenerasyon kapasitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Yine bu çalışmada, yeşilden açık yeşile kadar değişen kallus renklerinin yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu, kıvrıl-sarı kallusların ise en düşük rejenerasyon etkinliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Yine araştırmamızdaki bulgularımıza benzer şekilde, Jia *et al.* (2014) kallustan kök ve sürgün farklılaşmasında kallus renginin önemli bir kriter olduğunu vurgulamışlardır.

Bitki rejenerasyonu, totipotensiyi temel alan bitki doku kültürünün ana unsurunu oluşturmaktadır. Bitki rejenerasyonu organogenesis ve somatik embriyogenesis olmak üzere iki temel sisteme bağlıdır (Bhatia and Bera 2015). Somatik embriyogenesis ve organogenesis yoluyla sürgün ve kök rejenerasyonu kapasitesi, kültür ortamı bileşenleri, bitki türü ve eksplant tipine göre değişmektedir. Özellikle oksin ve sitokinin tipi bitki büyüme düzenleyicileri doku kültüründe bitki rejenerasyonu için büyük bir öneme sahiptir (Hill and Schaller 2013). Genel olarak sitokinin tipi BBD'lerin sürgün ve kök oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bitki türünün içsel oksin seviyesine bağlı olarak oksin ve sitokininlerin birlikte kullanımının sürgün ve kök rejenerasyonunu büyük oranda arttırdığını bildirmiştir (Gutiérrez *et al.* 2011). Bu durumun temel nedeninin eksojen olarak uygulanan oksinin, sitokinin sinyal yolunun aktivasyonu sağlayıp ve bunun sonucunda içsel sitokinin üretimini sağlayarak organogenik yanıtların artmasına yol açan bir mekanizmaya yönelik olduğu düşünülmektedir (Pernisová *et al.* 2009; Verma *et al.* 2021). Bununla birlikte Khan *et al.* (2022), *R. spiciforme*'de yüksek sitokinin (BAP ve KIN) konsantrasyonlarının kallustan

doğrudan köklenme sağladığı, buna karşın yüksek sitokinin ile birlikte GA3 uygulamasının sürgün oluşumunu sağlayarak bitki rejenerasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Araştırmamızda aynı ortamda farklı eksplantlarda ve hatta aynı eksplant üzerinde farklı rejenerasyon sistemleri (organogenesis ve somatik embriyogenesis) gözlemlenmiştir. Nitekim, Ouyang *et al.* (2016), *Metabriggsia ovalifolia* bitkisinde aynı ortamda hem organogenesis hem de somatik embriyogenesis sistemlerini gözlemlemişlerdir. Araştırmada, 1. aşamadaki en yüksek direkt organogenesis oranı 3,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l NAA (12 nolu yöntem) ve 3,0 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 1,0 mg/l GA3 (13 nolu yöntem) içeren MS ortamında ve ışıklı koşullarda, en yüksek indirekt organogenesis oranı ise 1,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l KIN + 1,0 mg/l 2,4-D (36 nolu yöntem) içeren MS ortamında ve karanlık koşullarda meydana gelmiştir. Bu sonuçlar yüksek miktarda sitokinin içeren ortamların ve ışıklı koşulların direkt organogenesisi, eşit miktarda oksin ve sitokinin içeren ortamların ve karanlık koşulların ise kallus oluşumu aracılığıyla organogenesisi teşvik ettiğini göstermiştir. Yapılan bazı araştırmalarda sitokinin ve oksinin eşit konsantrasyonlarda kullanılması durumunda sürgün rejenerasyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir. *Rheum emodi* Wall.'de yapılan bir çalışmada (Tabin *et al.* 2018) en yüksek sürgün oluşumunun 15 µM BAP ile 15 µM IBA içeren MS ortamında, yine benzer şekilde *Rheum spiciforme*'de yaprak eksplantlarından elde edilen en yüksek sürgün rejenerasyonun 15 µM BAP ve 15 µM 2,4-D içeren MS ortamında elde edildiği bildirilmiştir (Tabin *et al.* 2016). Ayrıca araştırmamızda, eksplantların direkt ve indirekt organogenesis oranları ortam içeriğine göre değişim göstermiştir. Bu durum araştırmada kullanılan eksplantların içsel hormon düzeyiyle açıklanabilir. Diğer taraftan sitokinin tipi bitki büyüme düzenleyicileri sürgün oluşumu üzerine yüksek etki göstermesine rağmen bazı bitki türlerinde yetersiz kalmaktadır. Bu bakımdan yapılan birden fazla çalışmada (Xiao *et al.* 2016; Hesami *et al.* 2018; Thakur *et al.* 2018), sitokinin türevleriyle birlikte GA3'ün kullanılmasıyla sürgün oluşumu ve çoğaltımını arttırdığı bildirilmiştir.

Araştırmada somatik embriyogenesis değerlendirmelerine göre, en yüksek direkt somatik embriyogenesis oranı 4,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l 2,4-D (23 nolu yöntem) içeren ışıklı MS ortamında ve 2,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l 2,4-D (33 nolu yöntem) ve 2,0 mg/l BAP + 2,0 mg/l 2,4-D (34 nolu yöntem) içeren MS ortamında karanlık koşullarda, en yüksek indirekt somatik embriyogenesis oranı ise 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l KIN + 1,0 mg/l 2,4-D (30 nolu yöntem) içeren MS ortamında karanlık koşullarda meydana gelmiştir. Lal and Ahuja (1989), *R. emodi*'de 10,0 µM BAP + 5,0 µM IBA içeren MS ortamında direkt somatik embriyogenesis elde etmişlerdir. Benzer şekilde, Khan *et al.* (2022), *R. spiciforme*'de 1,0 µM NAA + 25 µM BAP ile desteklenen MS ortamında direkt somatik embriyo oluşumunu gözlemlemişlerdir. Bu

sonuçlar ile yüksek sitokin konsantrasyonlarının direkt somatik embriyogenesis indüksiyonunda etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca somatik embriyogenesis süreci, *Gymnema sylvestre* (Kumar *et al.* 2002), *Psoralea corylifolia* (Chand and Sahrawat 2002) ve *Holostemma ada-kodien* (Martin 2003) gibi tıbbi bitkilerde kullanılmıştır.

Araştırmamızda ikinci aşamada indirekt organogenesis ve indirekt somatik embriyogenesis oluşumu için birinci aşamada embriyo ekseni (E-kallus), hipkotil (H-kallus) ve kotiledon (K-kallus) eksplantlarından 30 nolu yöntemden elde edilen 14 günlük kalluslar kullanılmıştır. Yine bu araştırmada en yüksek indirekt organogenesis 2,0 mg/l BAP + 2,0 mg/l KIN + 0,2 mg/l NAA + 1,0 mg/l GA3 (5 nolu ortam) içeren MS ortamında meydana gelirken, en yüksek indirekt somatik embriyogenesis 2,0 mg/l BAP + 2,0 mg/l KIN + 1,0 mg/l GA3 (6 nolu ortam) içeren MS ortamında meydana gelmiştir. Araştırmamızda olduğu gibi birçok tıbbi bitkide in vitro rejenerasyon sistemleri araştırılmış, etkili indirekt organogenesis ve somatik embriyogenesis yöntemleri geliştirilmiştir. *Coccinia cardifolia*'da yapılan çalışmada 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında yüksek oranda indirekt organogenesis elde edildiğini bildirilmiştir (Sarkar and Alam 2022). Yine Raju *et al.* (2022) araştırmalarında, *Alocasia amazonica*'da en yüksek indirekt organogenesis oranının 1,5 mg/BAP + 0,5 mg/l NAA içeren MS ortamında olduğunu rapor etmişlerdir. *Coffea arabica* L.'de en yüksek somatik embriyogenesis oranı ise 1,1 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında olduğunu tespit edilmiştir (Avila-Victor *et al.* 2023). Yine Chib *et al.* (2020) araştırmalarında *Crocus sativus*'da en yüksek somatik embriyogenesis oranının 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında olduğunu bildirmişlerdir. Dahası, eksplantların karanlık şartlarda kültüre alınması, birçok bitki türünde adventif sürgün rejenerasyonunu olumlu yönde etkilemiş ve uzamasını sağlamıştır (Bassan *et al.* 2011; Marín *et al.* 2016; Verma *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2018). Araştırmamızda BBD'lerin yanı sıra, araştırmada kullanılan tüm eksplantlarının başlangıçta karanlık inkübasyonunun direkt organogenesis ve somatik embriyogenesis için önemli olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni, ışığın, BBD'lerin biyosentezi ile ilişkili genlerin ifadesi üzerinde negatif bir düzenleyici etkisi olmasından kaynaklanmış olabilir (Morelli and Ruberti 2000; Luccioni *et al.* 2002; Devlin *et al.* 2003; Pierik *et al.* 2004).

Araştırmamızda eksplant başına bitki sayısının, eksplant tipi ve rejenerasyon sistemine göre değişiklik gösterdiği belirlenmiş olup bu faktörlerin bitki rejenerasyonunda önemli etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırmamızda birinci ve ikinci aşamadaki verilere göre eksplant başına bitki sayısı bakımından dört farklı rejenerasyon sistemlerinden (DOBS, İOBS, DSEBS ve İSEBS) elde edilen en yüksek bitki sayısına sahip 15 yöntem/ortam belirlenmiştir. Bulgularımızda eksplant başına en yüksek bitki sayısının (EBBS) 1,15 adet/eksplant ile

embriyo ekseninin 13 nolu yöntemde (3 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 1,0 mg/l GA3) kültüre alınması sonucu elde edilmiştir. Bu bitkilerin tamamına yakınının direkt organogenesis kaynaklı bitki olduğu belirlenmiştir. Bu rejenerasyon sistemini hipokotil eksplantının 13 (3 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 1,0 mg/l GA3) ve 20 nolu (4 mg/l KIN + 0,2 mg/l NAA + 1,0 mg/l GA3) yöntemlerde kültüre alındığı sistemler izlemiştir. Aynı bitkide çalışan, Tuncer ve Günsan (2017), eksplant başına en yüksek bitki sayısını hipokotil eksplantlarının 2,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l IBA içeren MS ortamında kültüre alınmasından elde etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları araştırmamızın 25 nolu yöntemiyle paralellik göstermektedir. Benzer şekilde, *Rheum* 'un diğer türlerinde farklı BAP ve IBA'nın farklı konsantrasyonları ile desteklenen MS ortamlarında sürgün oluşumunun yüksek olduğu ve en yüksek sürgün oluşumunun 2 mg/l BAP ile 1 mg/l IBA içeren MS ortamında meydana geldiğini bildirilmiştir (Roggemans and Claes 1979; Lal and Ahuja 1989; Lassus and Voipio 1994; Tuncer and Günsan 2017; Malik *et al.* 2010). Yine *Rheum coreanum* Nakai üzerinde yapılan başka bir çalışmada, in vitro koşullarda elde edilen kalluslardan en yüksek sürgün rejenerasyon oranı 2,0 mg/l BAP ile 0,2 mg/l NAA içeren MS ortamında belirlenmiştir (Mun and Mun 2016). Diğer taraftan *Rheum emodi* Wall.'de en yüksek sürgün rejenerasyonu, 10 µM BAP ve 5 µM IBA ile desteklenmiş sıvı ve katı MS ortamlarından elde edilmiştir (Malik *et al.* 2010). Singh and Chaturvedi (2022) *Rheum emodi*'de en yüksek indirekt sürgün oluşum oranının 7,5 µM BAP + 0,5 µM NAA + 0,5 µM IAA içeren MS ortamında, en yüksek direkt sürgün oluşum oranını ise 10,0 µM BAP + 0,5 µM IBA + 1,0 µM IBA içeren MS ortamında olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan, farklı doku kaynaklı kallusların eksplant olarak kullanıldığı 2. aşamada ise en yüksek eksplant başına bitki sayısı 5 nolu (2,0 BAP + 2,0 KIN + 0,2 NAA + 1,0 GA3) ortamda belirlenmiştir. 2. Aşamada kullanılan kallus eksplantlarından organogenesis ve somatik embriyogenesis kaynaklı bitki sayılarının birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımız, sürgün indüksiyon ortamındaki daha yüksek sitokinin konsantrasyonlarının daha düşük oksin konsantrasyonlarıyla birlikte sürgün oluşumunu tercih ettiği kavramıyla uyumlu olmuştur (Sugimoto *et al.* 2011).

Çok sayıda bitki türünde somatik embriyogenesis yoluyla bitki rejenerasyonu başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak kültür şartları, bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları, kullanılan bitki genotipi somatik embriyo indüksiyonu için belirleyicidir. Somatik embriyogenesisteki en önemli sorunlardan biri somatik embriyoların bitkiciklere dönüşüm oranının düşük olmasıdır. Araştırmamızda meydana gelen somatik embriyoların tamamında bitki rejenerasyonunun gerçekleşmediği belirlenmiştir. Etienne *et al.* (1993), düşük dönüşüm oranlarının, düşük somatik embriyo kalitesinden ve çeşitli türlerde olgunlaşma ve kuruma toleransı eksikliğinden kaynaklandığını göstermiştir. Bununla birlikte etilen, absisik

asit, aktif karbon ve besin ortamında kullanılan bileşenler stres faktörü olarak algılanıp, embriyo oluşumunu globüler ya da torpidodan kotiledon aşamasına geçiş döneminde durdurabilir. Bu süreç somatik embriyogenesinin totipotensi etkinliğinin yitirilmesine sebep olup, bitkiye dönüşebile kapasitesini azaltmaktadır (Ochatt and Revilla 2016). Diğer taraftan, Garcia *et al.* (2019), somatik embriyolardaki bu sorunların bir diğer nedeninin stres faktörleri altında meydana gelebilecek genetik veya epigenetik değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir.

Mikroçoğaltım süreçlerinde istenmeyen varyasyonlar meydana gelebilmektedir. Bu varyasyonlar somaklonal varyasyon olarak adlandırılmaktadır. Mikroçoğaltım çalışmalarındaki en temel hedef ana bitki ile aynı genetik yapıya sahip bitkileri elde etmektedir. Bu nedenle, rejenerasyon sistemlerinin genetik uygunluk açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Daha önceki birçok çalışmada, farklı rejenere bitkilerin genetik kararlılığını ve somaklonal varyasyonunu belirlemek için farklı PCR tabanlı moleküler markör teknikleri kullanılmıştır (Tippani *et al.* 2019; Natarajan *et al.* 2020; Uma *et al.* 2021). SCoT tekniği basit, tekrarlanabilir ve kolay ulaşılabilir özelliklerinden dolayı üstün avantajlara sahip markör sistemidir. Bu açıdan, bu teknik RAPD ve ISSR veya diğer tek primer amplifikasyon markör sistemleriyle benzerdir. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda RAPD ve ISSR markörlerinden daha tekrarlanabilir olduğu bildirilmiştir (Collard and Mackill 2009; Xiong *et al.* 2011; Mahjbi *et al.* 2015; Amom *et al.* 2020; Gogoi *et al.* 2020; Tikendra *et al.* 2021b; Al-Khayri *et al.* 2022). Bu nedenle gerek yukarıdaki nedenlerden ve gerekse *Rheum ribes*'e ait dizi bilgisi olmaması nedeniyle bu araştırmada bitki sayısı bakımından en yüksek olan rejenerasyon sistemlerinin somaklonal varyasyon bakımından değerlendirilmesi SCoT markörü aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Araştırmamızda SCoT markörünün somaklonal varyasyonu belirlemede kullanılabileceği gösterilmiştir. Benzer şekilde birçok bitki türünde [şeker kamışı (Sathish *et al.* 2018), *Annona reticulata* L. (Kudikala *et al.* 2020), Orkide (*Dendrobium fimbriatum*) (Tikendra *et al.* 2021b), *Scutellaria baicalensis* (Gawroński and Dyduch-Siemńska 2022), *Tylophora indica* (Mamgain *et al.* 2022), *Withania somnifera* (Ismail *et al.* 2022) ve *Hemerocallis fulva* (Shalan *et al.* 2023)] yapılan in vitro çalışmalarda elde edilen rejenere bitkilerde SCoT markörü kullanılarak somaklonal varyasyon başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Bu araştırmada, SCoT analizi için 20 primer kullanılmış ve SCoT primerlerinin ortalamasına göre monomorfik bant sayısı 11,9 iken ortalama polimorfik bant sayısı ise 4,75 olarak belirlenmiştir. Ismail *et al.* (2022), in vitro *Withania somnifera* rejenere bitki fidelerinin genetik kararlılığının belirlenmek için SCoT, SRAP ve DNA barkodlama tekniklerini kullanmışlardır. Araştırmacılar, SCoT primerlerinin her biri için ortalama 11 bant olmak üzere toplam 132 bant ürettiğini ve SCoT verileri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçla incelenen bitki örnekleri arasında genetik çeşitliliği

ortaya koymuşlardır. Diğer taraftan, araştırmamızda primerlerin polimorfik bilgi içeriklerinin (PIC), 0,077 (SCoT-21 primeri) ile 0,110 (SCoT-2 ve SCoT-29) arasında değiştiği, primerlerin PIC değeri bakımından benzer değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun muhtemel nedeni, kullanılan primerden ziyade meydana gelen bitkiler arasındaki yüksek genetik karalıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, Araştırma sonuçlarına göre, mikroçoğaltım sistemleri arasındaki benzerlik katsayıları 0,845-0,991 arasında değişim göstermiştir. Dahası, farklı sistemlerden meydana gelen rejenere bitkilerin ana bitki ile arasındaki benzerlik katsayıları 0.904 ile 0.991 arasında değişim göstermiştir. Ana bitkiyle en yüksek benzerlik 0,991 ile hipokotil eksplantının 6 nolu rejenerasyon sisteminde (3,0 mg/l BAP + 1,0 mg/l NAA içeren MS ortamı) kültür edilmesi sonucu direkt somatik embriyogenesis kaynaklı bitkilerde belirlenmiştir. Dahası, gerek bu değer ve diğer rejenerasyon sistemleriyle ana bitkiyle elde edilen benzerlik değerlerinin mikroçoğaltım açısından kabul edilebilir düzeyde olmasına rağmen bu bulgularımız farklılaşma durumu olmadan kültürlen meristemlerin normal veya normale yakın bitki üretme potansiyeline sahip olduğu gerçeğini doğrulamaktadır (Peschke and Phillips 1992).

Araştırmamızda kallus aşamasının aracılık ettiği indirekt organogenesis ve somatik embriyogenesisden gelen rejenere bitkilerdeki genetik kararlılığın direkt rejenerasyon sistemlerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda elde edilen bu bulgulara benzer olarak yapılan diğer çalışmalarda da kallus yoluyla elde edilen rejenere bitkilerin daha yüksek polimorfizime sahip olduğu bildirilmiştir (Sadhu *et al.* 2020; Khor *et al.* 2020; Dilkhalal *et al.* 2021; Manokari *et al.* 2021; Rai 2023). Gerek bizim araştırmamız ve gerekse daha önceki araştırma sonuçları kallus veya protoplast gibi hücrelerin aracılığıyla elde edilen bitkilerin somaklonal varyasyona daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Rani and Raina 2000; Rai *et al.* 2012). Dahası, direkt rejenerasyon sistemleri, indirekt yolla karşılaştırıldığında, kallus indüksiyon süreci nedeniyle bitki rejenerasyonunu için daha uzun bir süreye sahip olması sıklıkla somaklonal varyasyonla ilişkilendirilmektedir (Miguel and Marum, 2011; Bahmankar *et al.* 2017). Sonuç olarak, bulgularımız doğrudan eksplanttan gerçekleştirilen de novo çoğaltma sistemlerinin, kallus fazı yoluyla rejenerasyonun meydana geldiği sistemlerden genetik olarak daha kararlı olduğu gerçeğini desteklemektedir (Grzegorzcyk-Karolak *et al.* 2021).

Somaklonal varyasyonu etkileyen faktörlerden biri de rejenerasyon sistemidir. Rejenerasyon sistemleri genetik stabilite açısından yüksekte düşüğe doğru sürgün uçları veya boğum eksplantları gibi önceden oluşmuş yapılarla mikroçoğaltma; adventif olarak üretilen sürgünler, somatik embriyogenesis ve kallus, hücre ve protoplast kültürlerinden organogenesis olarak sıralanır (Swartz *et al.* 1991; Sarmah *et al.* 2017). Araştırmamızda somatik

embriyogenesis kaynaklı bitkilerin genetik kararlılıklarının organogenesis kaynaklı bitkilere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Somatik embriyolar, tek hücrelerden ortaya çıkar ve bu nedenle somatik embriyogenesis yoluyla meydana gelen rejenerasyon kimera oluşumunu azaltmaktadır. Bununla birlikte, somatik embriyogenesis, organogenesis ile karşılaştırıldığında daha az oranda somaklonal varyasyona neden olmaktadır (Giri *et al.* 2004). Dahası, yapılan genetik analizler, somatik embriyogenesis yoluyla rejenere edilen bitkilerin, somatik embriyo oluşumu tarafından dayatılan daha katı genetik gereksinimler nedeniyle organogenesis yoluyla rejenere edilenlere göre daha az mutasyon içerdiğini göstermiştir (Hao and Deng 2002).



SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu araştırma, *Rheum ribes* bitkisinin in vitro mikroçoğaltımı ve somaklonal varyasyonunun belirlenmesi üzerine yapılmıştır. Araştırmanın sonuçları ve önerileri aşağıda özetlenmiştir.

1. Bu çalışmada çimlenme oranı bakımından embriyoların tohumla göre daha yüksek bir çimlenme oranına sahip olduğu, tohumdaki çimlenme oranında düşüklüğün sebebinin ise embriyoyu çevreleyen dokularda bulunan inhibitörlerden kaynaklanmış olabileceği sonucuna varılmıştır. Yine çalışmada, *Rheum ribes* tohumlarının in vitro çimlendirilmesinde 1,75 mg/l GA3 ve 1 mg/l IBA içeren ½ MS ortamının kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.
2. Ön deneylerde kültür ortamlarında 0,7 mg/l PVP kullanılması ve eksplantların 2 hafta boyunca karanlık bir ortamda kültüre alındıktan sonra ışık koşullarında 3 hafta süreyle alt kültüre alınmasının dokularda kararmayı kontrol etmek için etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur.
3. *Rheum ribes*'te farklı eksplantlar (embriyo eksen, hipokotil, kotiledon ve bu eksplantlardan kaynaklı kallus eksplantları) kullanarak somatik embriyogenesis ve/veya organogenesis yoluyla etkili ve tekrarlanabilir bir in vitro mikroçoğaltım sistemi geliştirilmesi için yürütülen bu çalışmada, doku parametreleri üzerine eksplant tipinin, bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarlarını içeren ortam ile kültür şartlarından oluşan yöntemin etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir.
4. Çalışma sonucunda eksplant başına bitki sayısı (1,15 adet) bakımından en iyi rejenerasyon sistemi embriyo eksen ve hipokotil eksplantlarının 3,0 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 1,0 mg/l GA3 içeren MS ortamında (13 nolu yöntem) kültüre alındığı yöntemde elde edilmiştir. Ancak, bu değerin daha yukarıları çıkarılması için yeni çalışmaların yapılması önerilmektedir.
5. Çalışmada kullanılan eksplantlara ve ortamlara bağlı olarak aynı ortamda ve hatta aynı eksplant üzerinde farklı rejenerasyon sistemleri (organogenesis veya somatik embriyogenesis) kaynaklı rejenerasyon bitki oluşumları görülmüştür.
6. Çalışmada SCOT analizi verilerine göre, kallus aşamasının aracılık ettiği indirekt organogenesis ve somatik embriyogenesisden gelen rejenerasyon bitkilerdeki genetik kararlılığın direkt rejenerasyon sistemlerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Yine çalışmada, somatik embriyogenesis kaynaklı bitkilerin genetik

kararlıklarının organogenesis kaynaklı bitkilere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

7. Meydana gelen rejenere bitkilerin ana bitki ile arasındaki benzerlik katsayıları 0,904 ile 0,991 arasında değişim göstermiştir. Ana bitkiyle en yüksek benzerlik 0,991 ile yine en yüksek ekspalnt başına bitki sayısının meydana geldiği (1,08) hipokotil eksplantının 6 nolu rejenerasyon sisteminde (3,0 BAP + 1,0 NAA içeren MS ortamı) belirlenmiştir. Bu rejenerasyon sistemi, bu önemli tıbbi bitkinin büyük ölçekli yayılımı, germplazm korunması ve genetik transformasyon için kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.
8. SCoT markör analiz sonuçlarına göre, elde edilen benzerlik değerlerinin mikroçoğaltım açısından kabul edilebilir düzeyde olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, bulgularımız farklılaşma durumu olmadan kültürlenen meristemlerin normal veya normale yakın bitki üretme potansiyeline sahip olduğu olgusunu doğrulamıştır.

KAYNAKLAR

- Abdulla, K. K., Taha, E. M. and Rahim, S. M., 2014. Phenolic profile, antioxidant and antibacterial effects of ethanol and aqueous extracts of *Rheum ribes* L. roots. *Der Pharmacia Lettre*, 6(5), 201-205.
- AbdulWahed, A. M. H., Al-obaidei, S. M. R. and Al-samarrai, A. M. H., 2018. Effect of hot aqueous extract of *Rheum ribes* roots on some hormonal and biochemical parameters in induced Polycystic Ovary Syndrome in local female rabbits. *EurAsian Journal of BioSciences*, 12(2), 419-423.
- AbouZid, S., 2014. Yield improvement strategies for the production of secondary metabolites in plant tissue culture: silymarin from *Silybum marianum* tissue culture. *Natural product research*, 28(23), 2102-2110.
- Abu-Irmaileh and Afifi, F. U., Barakat, E., 2003. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *Journal of Ethnopharmacology* 89;193–197 pp.
- Agarwal, S. K., Singh, S. S., Lakshmi, V., Verma, S. and Kumar, S., 2001. Chemistry and pharmacology of rhubarb (*Rheum* species)-a review.
- Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M. A. L. (Eds.), 2013. Automation and environmental control in plant tissue culture. Springer Science and Business Media.
- Al Shamari, M., Rihan, H. Z. and Fuller, M. P., 2018. An Effective Protocol for the Production of Primary and Secondary Somatic Embryos in Cauliflower (*Brassica oleraceae* Var Botrytis). *Agri Res and Tech: Open Access J*, 14.
- Alaadin, A. M., Al-Khateeb, E. H. and Jäger, A. K., 2007. Antibacterial activity of the Iraqi *Rheum ribes*. Root. *Pharmaceutical biology*, 45(9), 688-690.
- Alizadeh, M., Krishna, H., Eftekhari, M., Modareskia, M. and Modareskia, M., 2015. Assessment of clonal fidelity in micropropagated horticultural plants.
- Al-Khayri, J. M., Mahdy, E. M., Taha, H. S., Eldomiaty, A. S., Abd-Elfattah, M. A., Abdel Latef, A. A. H., ... and Hassanin, A. A., 2022. Genetic and morphological diversity assessment of five kalanchoe genotypes by SCoT, ISSR and RAPD-PCR markers. *Plants*, 11(13), 1722.
- Al-Qurainy, F., Khan, S., Nadeem, M. and Tarroum, M., 2015. SCoT marker for the assessment of genetic diversity in Saudi Arabian date palm cultivars. *Pakistan Journal of Botany*, 47(2), 637-643.
- Amente, G., and Chimdessa, E., 2021. Control of browning in plant tissue culture: A review. *Journal of Scientific Agriculture*, 5, 67-71.
- Amiryousefi, A., Hyvönen, J., and Poczar, P., 2018. iMEC: Online marker efficiency calculator. *Applications in plant sciences*, 6(6), e01159.
- Amom T, Tikendra L, Apana N, Goutam M, Sonia P, Koijam AS, Potshangbam AM, Rahaman H, Nongdam P., 2020 Efficiency of RAPD, ISSR, iPBS, SCoT and phytochemical markers in the genetic relationship study of five native and economical important bamboos of north-East India. *Phytochemistry* 174:112330
- Andiç, S., Tunçtürk, Y., Ocak, E. ve Köse, S., 2009. Some chemical characteristics of edible wild rhubarb species (*Rheum ribes* L.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(6): 973- 977.

- Anonim, 2023. Plant Regeneration Pathway, https://www.brainkart.com/article/Plant-Regeneration-Pathway_38253/ (08.03.2023)
- Antony, J. J. J., Shamshir, R. A., Poobathy, R., Chew, B. L. and Subramaniam, S., 2015. Somaclonal variations were not induced by the cryopreservation: levels of somaclonal variations of in vitro and thawed protocorms of *Dendrobium Bobby Messina* analysed by SCoT and TRAP DNA markers. *South African Journal of Botany*, 100, 148-157.
- Arvas, Y. E., 2017. Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler ve Tanısı. Lambert Yayınevi, Düsseldorf, Germany.
- Asghar, S., Ghorri, N., Hyat, F., Li, Y. and Chen, C., 2023. Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plant: a story from competence towards completion. *Plant Growth Regulation*, 99(3), 413-428.
- Asgher, M., Khan, M. I. R., Anjum, N. A. and Khan, N. A., 2015. Minimising toxicity of cadmium in plants—role of plant growth regulators. *Protoplasma*, 252, 399-413.
- Ashnagar, A., Naseri, N. G. and Nasab, H. H., 2007. Isolation and identification of anthralin from the roots of rhubarb plant (*Rheum palmatum*). *E-Journal of Chemistry*, 4(4), 546-549.
- Attia O. A., A Ismail I, S Dessoky ED, S Aljuaid B., 2022, Using of DNA-Barcoding, SCoT and SDS-PAGE Protein to Assess Soma-Clonal Variation in Micro-Propagated Fig (*Ficus carica* L.) *Plant. Pak J Biol Sci. Jan*;25(5):415-425.
- Avcı M., 2005. Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü, *Coğrafya Dergisi*, 13: 27-55.
- Avila-Victor, C. M., Ordaz-Chaparro, V. M., Arjona-Suárez, E. D. J., Iracheta-Donjuan, L., Gómez-Merino, F. C. and Robledo-Paz, A., 2023. In Vitro Mass Propagation of Coffee Plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through Indirect Somatic Embryogenesis. *Plants*, 12(6), 1237.
- Aydın, M., Haliloğlu, K. and Tosun, M., 2009. Alternative explants source in wheat tissue culture: mature embryo. *Ziraat Fakültesi Dergisi-Süleyman Demirel Üniversitesi*, 4(2), 34-45.
- Aydın, M., Sağsöz, S., Haliloğlu, K. and Tosun, M., 2013. Buğdayda Olgun Embriyo Kültürünü Etkileyen Faktörler/Factors Affecting Wheat Mature Embryo Culture. *Journal of the Faculty of Agriculture; Cilt 42, Sayı 1* 2011.
- Aydın, M., Arslan, E., Taspınar, M. S., Karadayi, G. and Agar, G., 2016. Analyses of somaclonal variation in endosperm-supported mature embryo culture of rye (*Secale cereale* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(6), 1082-1089.
- Aydın, M., Taspınar, M. S., Arslan, E., Sigmaz, B. and Agar, G., 2015. Auxin effects on somaclonal variation and plant regeneration from mature embryo of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 47(5), 1749-1757.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. and Bitki, B. I., 2001. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Birinci Baskı, Konya, Türkiye: Selcuk Üniversitesi Basımevi. Plant biotechnology I. Tissue culture and applications. first edition. Konya: Selcuk University Printing House.
- Babos M., 2011. Revas <https://web.archive.org/web/20161022194349/http://www.panoramio.com/photo/51891339> (28.02.2023)

- Bahmankar, M., Mortazavian, S. M. M., Tohidfar, M., Sadat Noori, S. A., Izadi Darbandi, A., Corrado, G. and Rao, R., 2017. Chemical compositions, somatic embryogenesis, and somaclonal variation in cumin. *BioMed Research International*, 2017.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O. and Van Staden, J., 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63, 147-173.
- Bassan, M. M., Mourão Filho, F. D. A. A., Miyata, L. Y., and Mendes, B. M. J., 2011. In vitro organogenesis from internodal segments of adult sweet orange plants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 672-674.
- Bayramoğlu, M. M., Toksoy, D. and Şen, G., 2009. Türkiye’de Tıbbi Bitki Ticareti, II. Ormancılıkta Sosyo Ekonomik Sorunları Kongresi, Isparta. 89-98.
- Baytop T., 1997, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, TDK yayınları: 578, Ankara.
- Baytop, T., 1984. Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün) (Vol. 40). İstanbul Üniversitesi.
- Baytop, T., 1999. Therapy with Medical Plants in Turkey. *Rheum ribes* L. in T.Baytop (Ed), Vol. 1 (pp. 319-320). Istanbul (Turkey): Nobel Tıp Publication Press.
- Bazzaz BS, Khajenkaramadin M, Shokoheizadeh HR., 2005. In vitro antibacterial activity of *Rheum ribes* extract obtained from various plant parts against clinical isolates of gram negative pathogens. *Iran J Pharm Res.* 2: 87-91.
- Beckman, C. H., 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. *Physiological and molecular plant pathology*, 57(3), 101-110.
- Behera, P. P., Sivasankarreddy, K. and Prasanna, V. S. S. V., 2022. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Horticultural Crops. In *Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops* (pp. 197-217). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Bernela, M., Seth, M., Kaur, N., Sharma, S., and Pati, P. K., 2023. Harnessing the potential of nanobiotechnology in medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 194, 116266.
- Bewley J.D. and Black M., 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*, Plenum, New York.
- Bhatia, S. and Bera, T., 2015. Somatic embryogenesis and organogenesis. *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*, 6, 209-230.
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Bose, B., Paul, P. and Tandon, P., 2017b. Evaluation of genetic stability and analysis of phytomedicinal potential in micropropagated plants of *Rumex nepalensis*—A medicinally important source of pharmaceutical biomolecules. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 6, 80-91.
- Bhattacharyya, P., Vijay K. and Johannes V. S., 2017a "Assessment of genetic stability amongst micropropagated *Ansellia africana*, a vulnerable medicinal orchid species of Africa using SCoT markers." *South African Journal of Botany* 108: 294-302.
- Bilal, S., Mir, M. R., Parrah, J. D., Tiwari, B. K., Tripathi, V., Singh, P., and Abidi, A. B., 2013. Rhubarb: the wondrous drug. A review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 3(3), 228-233.
- Bonjar, S. (2004). Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2-3), 301-305.
- Bulut, G., Biçer, M. and Tuzlacı, E., 2016. The folk medicinal plants of Yüksekova (Hakkari-Turkey). *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 46(2), 115-124.

- Cadar, R. L., Amuza, A., Dumitras, D. E., Mihai, M. and Pocol, C. B., 2021. Analysing clusters of consumers who use medicinal and aromatic plant products. *Sustainability*, 13(15), 8648.
- Cakilcioglu, U. and Turkoglu, I., 2010. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 165-175.
- Canter, P. H., Thomas, H. and Ernst, E., 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*, 23(4), 180-185.
- Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T. and Teixeira da Silva, J. A., 2018. Micropropagation in the twenty-first century. *Plant cell culture protocols*, 17-46.
- Cardoza, V., 2008. Tissue culture: The manipulation of plant development. *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques and applications*, 113-134.
- Centeno, M. L., Rodríguez, A., Feito, I. and Fernández, B., 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. *Plant Cell Reports*, 16, 58-62.
- Chai, B. and Sticklen, M. B., 1998. Applications of biotechnology in turfgrass genetic improvement. *Crop Science*, 38(5), 1320-1338.
- Chand, S. and Sahrawat, A.K., 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration from root segments of *Psoralea corylifolia* L., an endangered medicinally important plant. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 38:33–38.
- Chandra, A. and Pental, D. 2003. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview. *Current Science*, 84(3), 381-387.
- Chee, P.P., 1990. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *Hort. Sci.*, 25: 792-793.
- Chengzhong, Z., Long, S., Chong, L., Yuhui, W. and Baoquan, T., 2005. Isolation and structure identification of chemical constituents in *Rheum univerve* Maxim. *Zhongcaoyao*, 36(5), 660-662.
- Chib, S., Thangaraj, A., Kaul, S., Dhar, M. K. and Kaul, T., 2020. Development of a system for efficient callus production, somatic embryogenesis and gene editing using CRISPR/Cas9 in Saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant methods*, 16(1), 1-10.
- Choi, S. Z., Lee, S. O., Jang, K. U., Chung, S. H., Park, S. H., Kang, H. C., ... and Lee, K. R., 2005. Antidiabetic stilbene and anthraquinone derivatives from *Rheum undulatum*. *Archives of pharmacal research*, 28, 1027-1030.
- Christenhusz, M. J. M., Byng J. W., 2016 The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261:201-217
- Chugh, P. and Kumar, A., 2022. Novel Plant Growth Regulators in In Vitro Establishment of Horticulture and Plantation Crops. In *Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops* (pp. 65-84). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Clapa, D., Borsai, O., Hârta, M., Bonta, V., Szabo, K., Coman, V. and Bobiş, O., 2020. Micropropagation, genetic fidelity and phenolic compound production of *Rheum rhabarbarum* L. *Plants*, 9(5), 656.
- Clementi, E. M. and Misiti, F. 2010. Potential health benefits of rhubarb. In *Bioactive foods in promoting health* (pp. 407-423). Academic Press.

- Clifford M., 1992. *Rhubarb: The Wondrous Drug*. Princeton, NJ, USA: Princeton University Press.
- Coelho, N., Gonçalves, S. and Romano, A., 2020. Endemic plant species conservation: Biotechnological approaches. *Plants*, 9(3), 345.
- Collard, Bertrand CY and David J. Mackill. 2009 "Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants." *Plant molecular biology reporter* 27.1: 86.
- Cui, Y. J., Liu, X. F., Han, J., Wang, B. R. and Guo, D. A., 2008. Biotransformation of podophyllotoxin by cell suspension culture and root culture of *Rheum palmatum*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 989-991.
- Cullen, J., 1967. *Rheum* L. In: Davis, P.H. (Eds.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 2. Edinburg University Press, Edinburgh, pp. 268-269.
- Dagla, H. R., 2012. Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, 17(8), 759-767.
- Darlington, C. D. and Wylie, A. P., 1956. *Chromosome atlas of flowering plants*. Chromosome atlas of flowering plants., (2nd Ed).
- Darrudi, R., Hassandokht, M. R. and Nazeri, V., 2015. Effects of moist stratification, GA3 and seed age on seed germination of *Rheum khorasanicum* B. Baradaran and A. Jafari. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 168-173.
- Das, G. and Rout, G. R., 2002. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago* species. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 68, 311-314.
- De Klerk, G. J., 2007. Stress in plants cultured in vitro. *Propagation of Ornamental Plants*, 7(3), 129-137.
- Debnath, M., Malik, C. P. and Bisen, P. S. 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7(1), 33-49.
- Delporte, F., Pretova, A., Du Jardin, P. and Watillon, B., 2014. Morpho-histology and genotype dependence of in vitro morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*, 251, 1455-1470.
- Desai, P., Desai, S., Rafaliya, R. and Patil, G., 2022. Plant tissue culture: Somatic embryogenesis and organogenesis. In *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 109-130). Academic Press.
- Desai, P., Patil, G., Dholiya, B., Desai, S., Patel, F., Narayanan, S., 2018. Development of an efficient micropropagation protocol through axillary shoot proliferation for pomegranate variety 'Bhagwa'. *Ann Agrar Sci* 16:444–450
- Devlin, P. F., Yanovsky, M. J. and Kay, S. A., 2003. A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 133(4), 1617-1629.
- Dhandapani, M., Kim, D.H., Hong, S.B., 2008. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. *In vitro Cellular and Developmental BiologyPlant*, 44(1): 18-25.
- Dhoran, V. S. and Gudadhe, S. P., 2012 Effect of plant growth regulators on seed germination and seedling vigour in *Asparagus sprengeri* Regel. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1.7: 6-10.

- Dias, J. P. T., 2019. Plant growth regulators in horticulture: practices and perspectives. *Biotecnología Vegetal*, 19(1), 3-14.
- Dilkalal, A., AS, A. and TG, U., 2021. In vitro regeneration, antioxidant potential, and genetic fidelity analysis of *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 57, 447-459.
- Dixit, J., Saini, R., Mishra, A. K., Verma, P., Kumar, P. and Tiwari, K. N., 2022. Somatic embryogenesis in medicinal plants. In *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 223-258). Academic Press.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.
- Donnelly, D. J. and Tisdall, L., 1993. Acclimatization strategies for micropropagated plants. *Micropropagation of woody plants*, 153-166.
- Duangporn, P., and Siripong, P., 2009. Effect of auxin and cytokinin on phyllanthusol A production by callus cultures of *Phyllanthus acidus* skeels. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*, 5, 258-263.
- Elhiti, M. and Stasolla, C., 2011. The use of zygotic embryos as explants for in vitro propagation: an overview. *Plant embryo culture: methods and protocols*, 229-255.
- Elhiti, M., Stasolla, C. and Wang, A., 2013. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49, 631-642.
- Elshibli, S., Korpelainen, H., 2007 Microsallite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genetica*. 134, 251- 260.
- Erbay, M. Ş. and Sarı, A., 2018. Plants used in traditional treatment against hemorrhoids in Turkey. *Marmara Pharm. J*, 22(2), 110-132.
- Escudero A, Pérez-García F, Luzuriaga AL., 2002 Effects of light, temperature and population variability on the germination of seven Spanish pines. *Seed Sci. Res.* 12:261-271.
- Etienne, H., Montoro, P., Michaux-Ferrière, N. and Carron, M. P., 1993. Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos. *Journal of Experimental Botany*, 44(10), 1613-1619.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Nooric A., 2018. Genetic relationships and diversity among wild *Salvia* accessions revealed by ISSR and SCoT markers. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 32: 610-617.
- Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Ahmadi-Rad, A., Noori, A., Mahdavian, Z. and Moradi, Z., 2016. Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(6), 1075-1081.
- Farji-Brener AG, Chinchilla FA, Magrach A, Romero V, Rios M, Velilla M, Serrano JM, Amador-Vargas S., 2009. Slope orientation enhances the nurse effect of a paramo shrub, *Hypericum irazuense* Hypericaceae in Costa Rica. *J. Trop. Ecol.* 25:331-335.
- Farzami Sepehr, M., Ghorbanli, M., 2002. Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones in callus cultures of *Rheum ribes* L.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(2): 171-175.
- Farzami Sepehr, M., Ghorbanli, M., 2005. Formation of catechin in callus cultures and micropropagation of *Rheum ribes* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(10): 1346-1350.

- Faydaoğlu, E. and Sürücüoğlu, M. S., 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 11(1):52- 67
- Fedorov, A. A., 1969. Chromosome numbers of flowering plants. VL Komarov Botanical Institute, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad. Russian. Fedorov Chromosome numbers of flowering plants 1969.
- Foust CM., 2014. Rhubarb: The Wondrous Drug, Volume 191. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A. and Vasil, I. K., 1976. Plant tissue culture media. In vitro, 12(7), 473-478.
- Gana, A. S., 2011. The role of synthetic growth hormones in crop multiplication and improvement. African Journal of Biotechnology, 10(50), 10330-10334.
- Garcia, A. A., Benchimol, L. L., Barbosa, A. M., Geraldi, I. O., Souza Jr, C. L. and Souza, A. P. D., 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. Genetics and Molecular Biology, 27, 579-588.
- Garcia, C., Furtado de Almeida, A. A., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S. and Marelli, J. P., 2019. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 137, 193-212.
- Gardener, C. and Ghronicle, G., 2014. Gardener's magazine. Rhubarb: The Wondrous Drug, 191, 321.
- Gawroński, J. and Dyduch-Siemińska, M., 2022. Potential of In Vitro Culture of *Scutellaria baicalensis* in the Formation of Genetic Variation Confirmed by ScoT Markers. Genes, 13(11), 2114.
- Gecibesler, I. H., Disli, F., Bayindir, S., Toprak, M., Tufekci, A. R., Yaglioglu, A. S., ... and Adem, S. 2021. The isolation of secondary metabolites from *Rheum ribes* L. and the synthesis of new semi-synthetic anthraquinones: Isolation, synthesis and biological activity. Food Chemistry, 342, 128378.
- George, E. F., Hall, M. A. and Klerk, G. J. D., 2008. Plant tissue culture procedure-background. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background, 1-28.
- Giri, C. C., Shyamkumar, B. and Anjaneyulu, C., 2004. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. Trees, 18, 115-135.
- Gogoi B, Wann SB, Saikia SP 2020 Comparative assessment of ISSR, RAPD and SCoT markers for genetic diversity in *Clerodendrum* species of north East India. Mol Biol Rep 47:7365–7377
- Gohil R, Rather G 1986 Cytogenetic studies of some members of Polygonaceae of Kashmir. III *Rheum* L. Cytologia 51(4):693–700.
- Gokhale, M. and Bansal, Y., 2009. Direct in vitro regeneration of a medicinal tree *Oroxylum indicum* (L.) Vent. through tissue culture. Afr J Biotechnol 8:3777–3781
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M. and Srinivasan, M., 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. Genetics research international, 2015.
- Grzegorzczak-Karolak, I., Hnatuszko-Konka, K., Krzemińska, M., Olszewska, M. A., and Owczarek, A., 2021. Cytokinin-based tissue cultures for stable medicinal plant

- production: Regeneration and phytochemical profiling of *salvia bulleyana* shoots. *Biomolecules*, 11(10), 1513.
- Gupta, N., Jain, V., Joseph, M. R. and Devi, S., 2020. A review on micropropagation culture method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1), 86-93.
- Gutiérrez, I. E. M., Nepomuceno, C. F., Ledo, C. D. S. and Santana, J. R. F., 2011. Micropropagation and acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (an important medicinal plant). *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1353-1358.
- Güneş, E., 2021. Gümüşhane ilinden toplanan fasulye genotiplerinde SCoT ve SSR markörleri kullanılarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum Teknik Üniversitesi.
- Güngör, H., İlhan, E., Kasapoğlu, A. G., Filiz, E., POUR, A. H., Valchev, D., ... and Dumlupınar, Z., 2022. Genetic Diversity and Population Structure of Barley Cultivars Released in Turkey and Bulgaria using iPBS-retrotransposon and SCoT markers. *Journal of Agricultural Sciences*, 14-14.
- Güvenç, İ. and Kaya, Y., 1996. Erzurum’da sebze olarak değerlendirilen yöresel bazı bitkiler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(3), 369-374.
- Hammerschlag, F. A., Garces, S., Koch-Dean, M., Ray, S., Lewers, K., Maas, J., Smith, B. J., 2006 In vitro response of strawberry cultivars and regenerants to *Colletorichum acutatum*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 84, 255-261.
- Han, J., Ye, M., Xu, M. *et al.* 2008. Comparison of phenolic compounds of rhubarbs in the section deserticola with *Rheum palmatum* by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Planta Medica*, 74, 873–879.
- Hao, Y.J. and Deng, X.X., 2002. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38, pp.472-476.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. and Geneve, R. L. 2002. *Plant propagation: Principles and practices* 7th ed Prentice Hall Englewood Cliffs.
- Hassan, M. A. and Fardous, Z., 2003. Seed germination, pollination and phenology of *Gloriosa superba* L. (Liliaceae). *Bangladesh Journal of Plant taxonomy*, 10(1):95-97.
- Hesami, M., Daneshvar, M. H., Yoosefzadeh-Najafabadi, M. and Alizadeh, M., 2018. Effect of plant growth regulators on indirect shoot organogenesis of *Ficus religiosa* through seedling derived petiole segments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 175-180
- Hill, K. and Schaller, G. E., 2013. Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. *Plant signaling & behavior*, 8(10), 212-24.
- Ho, W. and Vasil, I. K., 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Growth and regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Annu. Bot.*, 51: 719-726.
- Hoagland, D.R. and Arnon D.I., 1950. The water culture methods for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circular Number 347* (Revised January 1950), College of Agriculture University of California, Berkeley, CA.
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H. and Ullah, I., 2012. Plant tissue culture: current status and opportunities. *Recent advances in plant in vitro culture*, 6(10), 1-28.

- Igwe, D. O., Ihearahu, O. C., Osano, A. A., Acquaaah, G. and Ude, G. N. 2022. Assessment of genetic diversity of Musa species accessions with variable genomes using ISSR and SCoT markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(1), 49-70.
- Ismail, I. A., Aljuaid, B. S., El Dessoky, S. D. and Attia, A. O., 2022. DNA-barcoding, SCoT and SRAP based somaclonal variation in micropropagated *Withania somnifera* plantlets. *Journal of Agriculture and Crops*, 8(2), 75-86.
- İlçim, A. H. M. E. T. and Karahan, F., 2020. *Rheum telianum* (Polygonaceae), a new species from Southeastern Anatolia (Turkey). *Phytotaxa*, 477(1), 81-89.
- Jia, Y., Zhang, Q. X., Pan, H. T., Wang, S. Q., Liu, Q. L., and Sun, L. X., 2014. Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture. *Scientia Horticulturae*, 176, 273-281.
- Kadioğlu, A., 2007. Bitki Fizyolojisi. Karadeniz Teknik Ün., Fen Fakültesi, Biyoloji Böl., Esen Ofset Matbaacılık, Trabzon, 432s.
- Keerthiga, M., Anand, S. P., Nandagopalan, V., Doss, A. and Senthilkumar, S. R., 2012. In vitro propagation of *Wedelia trilobata* (L.) using Phormidium subincrustedum extracts: A novel approach. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol*, 20(4), 147-52.
- Keser, S., Keser, F., Karatepe, M., Kaygili, O., Tekin, S., Turkoglu, I., ... and Sandal, S., 2019. Bioactive contents, In vitro antiradical, antimicrobial and cytotoxic properties of rhubarb (*Rheum ribes* L.) extracts. *Natural product research*, 1-5.
- Keskiner, K., Tuncer, B., 2019. Dormancy breaking treatments for wild *Eremurus spectabilis* M.Bieb. seeds. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(2A): 1167-1173.
- Khan, M. I., Shahzad, A., Ganie, I. B. and Pandith, S. A., 2022. Organogenesis, direct somatic embryogenesis and shoot proliferation of *Rheum spiciforme* Royle: an endemic and vulnerable medicinal herb from Indian Trans Himalayas. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 58(1), 35-50.
- Khan, S., Al-Qurainy, F., Mohammad, N., 2012 Biotechnological approaches for conservation and improvement of rare and endangered plants of Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 19, 1-11.
- Khiveh, A., Hashempur, M. H., Shakiba, M., Lotfi, M. H., Shakeri, A., Kazemeini, S., ... and Emtiazy, M., 2017. Effects of rhubarb (*Rheum ribes* L.) syrup on dysenteric diarrhea in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of integrative medicine*, 15(5), 365-372.
- Khor, S. P., Yeow, L. C., Poobathy, R., Zakaria, R., Chew, B. L., and Subramaniam, S., 2020. Droplet-vitrification of Aranda Broga Blue orchid: Role of ascorbic acid on the antioxidant system and genetic fidelity assessments via RAPD and SCoT markers. *Biotechnology reports*, 26, e00448.
- Kızıl, S. and Tonçer, Ö., 2014. Diyarbakır ve çevresinden doğadan toplanarak tüketilen bitkiler, Güneydoğu Anadolu bölgesinde doğadan toplanarak tüketilen bitkiler, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Yalova.
- Korkmaz, M. and Karakuş, S., 2015. Traditional uses of medicinal plants of Üzümlü district, Erzincan, Turkey. *Pak J Bot*, 47(1), 125-134.
- Koyuncu, N., 2008. The Effects of Different MS Doses on Tissue Culture Parameters in Wheat (*Triticum* sp.). *Journal Of Agricultural Sciences-Tarım Bilimleri Dergisi*, 14(1).

- Kozak, D., Salata, A., 2011. Effect of cytokinins on in vitro multiplication of rhubarb (*Rheum rhabarbarum* L.) karpow lipskiego' shoots and ex vitro acclimatization and growth. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 10(4): 75-87.
- Krafczyk, N., Kötke, M., Lehnert, N. and Glomb, M. A., 2008. Phenolic composition of rhubarb. *European Food Research and Technology*, 228, 187-196.
- Krenn, L., Presser, A., Pradhan, R., Bahr, B., Paper, D. H. and Mayer, K. K., 2003. Sulfemodin 8-O-b-D-glucoside, a new sulfated anthraquinone glycoside and antioxidant phenolic compounds from *Rheum emodi*. *Journal of Natural Products*, 66, 1107–1109.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M. and Sath, R. K., 2016 Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*. 6, 54
- Kucera, B., Cohn, M. A., and Leubner-Metzger, G., 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed science research*, 15(4), 281-307.
- Kudikala, H., Jogam, P., Sirikonda, A., Mood, K. and Allini, V. R., 2020. In vitro micropropagation and genetic fidelity studies using SCoT and ISSR primers in *Annona reticulata* L.: an important medicinal plant. *Vegetos*, 33, 446-457.
- Kumar, H. A., Murthy, H., Paek, K., 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gymnema sylvestre*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71:85– 88.
- Kumar, M., Muthusamy, A., Kumar, V. and Bhalla-Sarin, N. (Eds.), 2019a. *In Vitro Plant Breeding Towards Novel Agronomic Traits: Biotic and Abiotic Stress Tolerance*. Springer.
- Kumar, R., Najar, R. A., Gupta, K. B. and Saini, R. G., 2019b. Micropropagation protocol for *Salvadora oleoides*. *Journal of Forestry Research*, 30, 87-93.
- Kuo, P. L., Lin, T. C. and Lin, C. C., 2002. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life sciences*, 71(16), 1879-1892.
- Lal, N. and Ahuja, P. S., 1989. Propagation of Indian Rhubarb (*Rheum emodi* Wall.) using shoot-tip and leaf explant culture. *Plant cell reports*, 8, 493-496.
- Lal, N. and Ahuja, P. S., 1993. Assessment of liquid culture procedures for in vitro propagation of *Rheum emodi*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 34, 223-226.
- Larkin P, Scowcroft W., 1981. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197–214
- Lassus, C. and Voipio, I., 1994. Micropropagation of rhubarb with special reference to weaning stage and subsequent growth. *Agricultural and Food Science*, 3(2), 189-194.
- Lemma, D. T., Banjaw, D. T. and Megersa, H. G., 2020. Micropropagation of medicinal plants. *International Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 7(2), 796-802.
- Lepse, L., 2007. Comparison of in vitro and traditional propagation methods of rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) according to morphological features and yield. In *III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants* 812 (pp. 265-270).
- Li A (1998) *Flora reipublicae popularis Sinicae: Tomus 25 (1). Angiospermae, Dicotyledoneae, Polygonaceae*. Beijing: Science Press:237.-illus. ISBN 703006450X Ch Icones, Keys. Geog.

- Li, H., Liu, F., Song, S., Wang, C. and Sun, H., 2022. Highly effective organogenesis and somatic embryogenesis of *Clivia*. *Scientia Horticulturae*, 306, 111443.
- Libert B, Englund R., 1989 Present distribution and ecology of *Rheum rhaponticum* (Polygonaceae). *Willdenowia* 19:91–98.
- Liu, B. H., 1998. Statistical genomics: Linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Luccioni, L. G., Oliverio, K. A., Yanovsky, M. J., Boccalandro, H. E. and Casal, J. J., 2002. Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant physiology*, 128(1), 173-181.
- Luo, C., He, X. H., Chen, H., Ou, S. J. and Gao, M. P. 2010. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(6), 1176-1184.
- Maclean, W. and Taylor, K., 2000. Clinical Manual of Chinese Herbal Patent Medicines. Pangolin Press.
- Mahjbi, A., Baraket, G., Oueslati, A. and Salhi-Hannachi, A., 2015. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian *Citrus* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 390-398.
- Mahroozade, S., Mohammadi Kenari, H., Eghbalian, F., Ghobadi, A. and Yousefsani, B. S., 2021. Avicenna's Points of View in Epidemics: Some Advice on Coronavirus 2 (COVID-19). *Complementary Medicine Research*, 28(2), 175-176.
- Maithani, U. C. 2015. In-vitro propagation studies of *Rheum moorcroftianum* royle: a threatened medicinal plant from Garhwal Himalaya. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(6), 596-599.
- Makunja, R. N. 2020. Characterization Of Kenyan Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Accessions For Resistance To Common Bacterial Blight Using Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism Markers (Doctoral dissertation, University of Nairobi).
- Malik, S., Sharma, N., Sharma, U.K., Singh, N.P., Bhushan, S., Sharma, M., Sinha, A.K., Ahuja, P.S., 2010. Qualitative and quantitative analysis of anthraquinone derivatives in rhizomes of tissue culture-raised *Rheum emodi* Wall. plants. *Journal of Plant Physiology*, 167(9): 749-756.
- Mamgain, J., Mujib, A., Ejaz, B., Gulzar, B., Malik, M. Q. and Syeed, R., 2022. Flow cytometry and start codon targeted (SCoT) genetic fidelity assessment of regenerated plantlets in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(1), 129-140.
- Mamun ,A.N.K., Islam, R., Reza, M.A. and Joadar, O.I., 1996. In vitro differentiation of plantlet of tissue culture of *Samanea saman*. *Plant Tissue Cult.*, 6: 1-5.
- Manokari, M., Mehta, S. R., Priyadharshini, S., Badhepuri, M. K., Dulam, S., Jayaprakash, K., ... and Shekhawat, M. S., 2021. Meta-Topolin mediated improved micropropagation, foliar micro-morphological traits, biochemical profiling, and assessment of genetic fidelity in *Santalum album* L. *Industrial Crops and Products*, 171, 113931.
- Marín, J. A., García, E., Lorente, P., Andreu, P., and Arbeloa, A., 2016. A novel approach for propagation of recalcitrant pistachio cultivars that sidesteps rooting by ex vitro grafting of tissue cultured shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124, 191-200.

- Martin, K., 2003. Plant regeneration through somatic embryogenesis on *Holostemma adakodien*, a rare medicinal plant. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72:79–82
- Matkowski A., 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants a review. *Biotechnology advances*, 26(6):548-560.
- Matthes, M., Singh, R., Cheah, S.C., Karp, A., 2001 Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture derived regenerants revealed by AFLPs with methylationsensitive enzymes. *Theor. Appl. Genet.* 102, 971–979.
- Mehalaine, S. and Chenchouni, H., 2021. New insights for the production of medicinal plant materials: Ex vitro and in vitro propagation of valuable Lamiaceae species from northern Africa. *Current Plant Biology*, 27, p.100216.
- MGM., 2023. Meteoroloji Genel Müdürlüğü yıllık yağış verileri, <https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?k=undefined&dm=ERZURUM>; <https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/yagis-degerlendirme.aspx> (10.01.2023)
- Miguel, C. and Marum, L., 2011. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of experimental botany*, 62(11), 3713-3725.
- Mihaljevic I, Dugalic K, Tomas V, Viljevac M, Pranjic A, Cmelik Z, Puskar B, Jurkovic Z. 2013. In vitro sterilization procedures for micropropagation of ‘Oblačinska’ sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences*. 58: 117-126
- Mohammed, B. M. and Karim, K. J., 2010. Antitumor activity of *Rheum ribes* and *Thymus syriacus* in male albino mice. *Journal of Thi-Qar Science*, 2(3).
- Mohammed, I. H., Kakey, E. S. and Farimani, M. M., 2018. In vitro evaluation of antioxidant activates for parts of rhubarb (*Rheum ribes*) and syrian mesquite (*Prosopis farcta*). In International Conference on Pure and Applied Sciences (ICPAS 2018), Paper ID: ICPAS2018. MIM (Vol. 41, No. 5).
- Mohtashami, L., Amiri, M. S., Ayati, Z., Ramezani, M., Jamialahmadi, T., Emami, S. A. and Sahebkar, A., 2021. Ethnobotanical uses, phytochemistry and pharmacology of different *Rheum* species (Polygonaceae): a review. *Pharmacological Properties of Plant-Derived Natural Products and Implications for Human Health*, 309-352.
- Morelli, G., and Ruberti, I., 2000. Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant physiology*, 122(3), 621-626.
- Moyo, M., Finnie, J. F. and Van Staden, J., 2009. In vitro morphogenesis of organogenic nodules derived from *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98, 273-280.
- Mun, S. and Mun G., 2016. Development of an efficient callus proliferation system for *Rheum coreanum* Nakai, a rare medicinal plant growing in Democratic People’s Republic of Korea. *Saudi journal of biological sciences* 23.4: 488-494.
- Munzuroğlu, Ö., Karataş, F., Gür, N., 2000. A study of the levels of vitamins A, E and C and selenium in rhubarb (*Rheum ribes* L.). *Turkish Journal of Biology*, 24(3): 397-404.
- Murashige, T., Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia. Plantarum*, 15(43): 473-497.
- Murkute, A. A. and Patil, S., 2003. Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest*, 23(1), 29-31.

- Muthukumar, M., Kumar, T. S. and Rao, M. V., 2016. Organogenesis and evaluation of genetic homogeneity through SCoT and ISSR markers in *Helicteres isora* L., a medicinally important tree. *South African Journal of Botany*, 106, 204-210.
- Naemi, F., Asghari, G., Yousofi, H. and Yousefi, H. A., 2014. Chemical composition of essential oil and anti trichomonas activity of leaf, stem and flower of *Rheum ribes* L. extracts. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(3), 191.
- Nair, A. G., Vidya, P. and Mohan, C., 2016. Analysis of genetic variability in sweet potato accessions using Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 12(2), 111-121.
- Natarajan N, Sundararajan S, Ramalingam S, Chellakan PS., 2020. Efcient and rapid in-vitro plantlet regeneration via somatic embryogenesis in ornamental bananas (*Musa* spp.). *Biologia* 75:317–326.
- Niazian, M., 2019. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249, 953-973.
- Nic-Can, G. I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V. M., Rojas-Herrera, R. and De-la-Pena, C., 2013. New insights into somatic embryogenesis: Leafy Cotyledon1, Baby Boom1 And Wuschel-Related Homeobox4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS One*, 8(8), e72160.
- Noori, S., Kiasat, A. R., Kolahi, M., Mirzajani, R. and Nejad, S. M. S., 2022. Determination of secondary metabolites including curcumin in *Rheum ribes* L. and surveying of its antioxidant and anticancer activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 26(3), 101479.
- Ochatt, S. J. and Revilla, M. A., 2016. From stress to embryos: some of the problems for induction and maturation of somatic embryos. *In vitro embryogenesis in higher plants*, 523-536.
- Onuoha, I. C., Eze, C. J. and Unamba, C. I., 2011. In vitro prevention of browning in plantain culture. *Online J. Biol. Sci*, 11(1), 13-17.
- Ouyang, Y., Chen, Y., Lü, J., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, X. and Ma, G., 2016. Somatic embryogenesis and enhanced shoot organogenesis in *Metabriggsia ovalifolia* WT Wang. *Scientific Reports*, 6(1), 1-9.
- Önal, M., Babür, A. B. E. and Dindaroğlu, T., 2019. III. International Mediterranean Forest and Environment Symposium.
- Özbek H, Ceylan E, Kara M, Özgökçe F, Koyuncu M., 2002. *Rheum ribes* (Uşkun) kökü ekstresinin sağlıklı ve diyabetli faralerdeki hipoglisemik etkisi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs, Eskişehir.
- Özkan, O. and Deniz, T., 2023. An assessment of consumer demand for medicinal plants: A case of Istanbul. *Eurasian Journal of Forest Science*, 11(1), 1-13.
- Özyurt, M., Kopar, H., Özyurt, S., Demirhan, İ. and Kurutas, E. B., 2021. Menengiç, Işgın ve Çiriş Otu'nda Antioksidan Aktivitenin Araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(4), 733-737.
- Pakseresht, F., Talebi, R. and Karami, E. 2013. Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of landrace chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes collected from north-west of Iran. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19, 563-574.
- Pandey, A., Tripathi, V. K., Pandey, M., Mishra, A. N. and Kumar, D., 2011. Influence of NAA, GA3 and zinc sulphate on fruit drop, growth, yield and quality of ber cv. *Banarasi*

- Karaka*. In Proceedings of the International Symposium on Minor Fruits and Medicinal Plants for Health and Ecological Security (ISMF and MP), West Bengal, India (pp. 184-187).
- Pandith, S. A., Hussain, A., Bhat, W.W., Dhar, N., Qazi, A. K., Rana, S., Razdan, S., Wani, T. A., Shah, M. A., Bedi, Y., Hamid A. and Lattoo, S. K., 2014. Evaluation of anthraquinones from Himalayan rhubarb (*Rheum emodi* Wall. ex Meissn.) as antiproliferative agents. South African Journal of Botany 95:1–8.
- Pandith, S. A. and Khan, M. I., 2022. Genus *Rheum* (Polygonaceae): a global perspective. CRC Press.
- Pandith, S. A., Dar, R. A., Lattoo, S. K., Shah, M. A. and Reshi, Z. A., 2018. *Rheum australe*, an endangered high-value medicinal herb of North Western Himalayas: a review of its botany, ethnomedical uses, phytochemistry and pharmacology. Phytochemistry Reviews, 17, 573-609.
- Parimalan, R., Venugopalan, A., Giridhar, P. and Ravishankar, G. A., 2011. Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation in *Bixa orellana* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 105, 317-328.
- Parveen, S., Kamili, A. N. and Shah, A. M., 2012. Impact of BAP and different auxins on in vitro shoot proliferation of *Rheum emodi* Wall. J Pharm Biol Sci, 4, 47-52.
- Patil VM, Dhande G, Thigale DM, Rajput J., 2011. Micropropagation of pomegranate (*Punica granatum* L.) ‘Bhagava’ cultivar from nodal explant. Afr J Biotechnol 10:18130–18136.
- Pernisová, M., Klíma, P., Horák, J., Válková, M., Malbeck, J., Souček, P., ... and Hejátko, J., 2009. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(9), 3609-3614.
- Peschke, V. M. and Phillips, R. L., 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. Advances in genetics, 30, 41-75.
- Peschke, V. M. and Phillips, R. L., 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. Advances in genetics, 30, 41-75.
- Pierik, R., Cuppens, M. L., Voesenek, L. A. and Visser, E. J., 2004. Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. Plant Physiology, 136(2), 2928-2936.
- Pimm SL, Joppa LN 2015 How many plant species are there, where are they and at what rate are they going extinct? Annals of the Missouri Botanical Garden 100(3):170–176.
- Polanco C, Ruiz ML., 2002 AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. Plant Science, 162: 817-824.
- POWO., 2023. Kew Science Photographs. *Rheum ribes* L. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:696789-1/images> (28.02.2023).
- Preece, J. E. and Sutter, E. G., 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds.), Micropropagation: Technology and applications. Kluwer Academic Publishers p.71-93.
- Prevost, A., and Wilkinson, M. J., 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and applied Genetics, 98, 107-112.

- Que, Y., Pan, Y., Lu, Y., Yang, C., Yang, Y., Huang, N. and Xu, L., 2014. Genetic analysis of diversity within a Chinese local sugarcane germplasm based on start codon targeted polymorphism. *BioMed research international*.
- Radoeva, T. and Weijers, D., 2014. A roadmap to embryo identity in plants. *Trends in Plant Science*, 19(11), 709-716.
- Rahman, N. N. A., Rosli, R., Kadzimin, S., and Hakiman, M., 2019. Effects of auxin and cytokinin on callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Fundamental and Applied Agriculture*, 4(3), 928-932.
- Rahmanpour, A., Majd, A., Chalabian, F., 2005. Effects of gibberellic and citric acid on germination percentage, speed of germination and seed vigor of (*Eremurus spectabilis* M.B). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 13(1/19): 53-65.
- Rai MK, Phulwaria M, Harish, Gupta AK, Shekhawat NS, Jaiswal U., 2012. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 111:259–264
- Rai, M. K., 2023. Start codon targeted (SCoT) polymorphism marker in plant genome analysis: current status and prospects. *Planta*, 257(2), 34.
- Rajesh, M. K., Sabana, A. A., Rachana, K. E., Rahman, S., Jerard, B. A. and Karun, A., 2015. Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions revealed through SCoT analysis. *3 Biotech*, 5, 999-1006.
- Rajkumar V, Guha G, Kumar RA., 2010. Antioxidant and anti-cancer potentials of *Rheum emodi* rhizome extracts. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*.
- Raju, R. I., Hashi, A. K., Jazib, A. and Hossain, M. T., 2022. Micropropagation of *Alocasia amazonica* through Indirect Shoot Organogenesis. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 32(1), 13-20.
- Rani V, Raina SN., 2000. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:319–330
- Rasheed, A. and Xia, X., 2019 From markers to genome-based breeding in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 132(3), 767-784.
- Rashid, S., Kaloo, Z.A., Singh, S., Bashir, I., 2014. Callus induction and shoot regeneration from rhizome explants of *Rheum webbianum* Royle- a threatened medicinal plant growing in Kashmir Himalaya. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3(5): 515-518.
- Razdan, M. K., 2002. Introduction to plant tissue culture, 2/E. Oxford and IBH publishing.
- Roggemans, J. and Claes, M. C., 1979. Rapid clonal propagation of rhubarb by in vitro culture of shoot-tips. *Scientia Horticulturae*, 11(3), 241-246.
- Roghani-Shahraki, H., Karimian, M., Valipour, S., Behjati, M., Arefnezhad, R. and Mousavi, A. 2021. Herbal therapy as a promising approach for regulation on lipid profiles: A review of molecular aspects. *Journal of Cellular Physiology*, 236(8), 5533-5546.
- Rohr, R., Iliev, I., Scaltsoyiannes, A. and Tsoulpha, P., 2003. Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Hort.* 616:59-67.
- Rokaya, M. B., Münzbergová, Z., Timsina, B. and Bhattarai, K. R., 2012. *Rheum australe* D. Don: a review of its botany, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 761-774.

- Rout, G. R. and Das, P. (2004). Role of growth regulators on micropropagation of medicinal plants: a review. Recent progress in medicinal plants—Biotechnology and Genetic Engineering, 4, 327-356.
- Rout, G. R., Samantaray, S. and Das, P., 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology advances, 18(2), 91-120.
- Ruirui, L., Wang, A., Tian, X., Wang, D. and Liu, J., 2010. Uniformity of karyotypes in *Rheum* (Polygonaceae), a species-rich genus in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent regions. Caryologia, 63(1), 82-90.
- Sadhu, S., Jogam, P., Thampu, R. K., Abbagani, S., Penna, S. and Peddaboina, V., 2020. High efficiency plant regeneration and genetic fidelity of regenerants by SCoT and ISSR markers in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 141, 465-477.
- Saggoo, M. I. S. and Farooq, U., 2011. Cytology of *Rheum*, a vulnerable medicinal plant from Kashmir Himalaya. Chromosome Botany, 6(2), 41-44.
- Samuel, K., Debashish, D., Madhumita, B., Padmaja, G., Prasad, S. R., Ramana Murthy, V. B., and Rao, P. S., 2009. In vitro germination and micropropagation of *Givotia rottleriformis* Griff. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 45, 466-473.
- Sanchez, A. and Kron, K. A., 2009. Phylogenetic relationships of *Afrobrunnichia* Hutch. and *Dalziel* (Polygonaceae) based on three chloroplast genes and ITS. Taxon, 58(3), 781-792.
- Sánchez-Romero, C., 2021. Somatic embryogenesis in olive. Plants, 10(3), 433.
- Sandhu, M., Wani, S. H. and Jiménez, V. M., 2018. In vitro propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 132(1), 27-53.
- Sarkar, M. T. R. and Alam, M. F., 2022. Indirect Organogenesis from in vitro Derived Leaf and Internodes of *Coccinia cordifolia* (L.) Cogn.-An Important Medicinal Climber. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 32(2), 127-136.
- Sarmah, D., Sutradhar, M. and Singh, B. K., 2017. Somaclonal variation and its' application in ornamentals plants. Int J Pure App Biosci, 5, 396-406.
- Satheesh, M, Sridharan, T., 2014. Standardization of *Punica granatum* explant and callus induction through micropropagation-indirect organogenesis. Int J Renew Energy Technol 3:19–27
- Sathish, D., Vasudevan, V., Theboral, J., Elayaraja, D., Appunu, C., Siva, R. and Manickavasagam, M., 2018. Efficient direct plant regeneration from immature leaf roll explants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) using polyamines and assessment of genetic fidelity by SCoT markers. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 54(4), 399-412.
- Satya, P., Karan, M., Jana, S., Mitra, S., Sharma, A., Karmakar, P. G. and Ray, D. P., 2015. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. Meta gene, 3, 62-70.
- Sayyah, M., Boostani, H., Pakseresht, S. and Malayeri, A., 2009. Efficacy of hydroalcoholic extract of *Rheum ribes* L. in treatment of major depressive disorder. J Med Plants Res, 3(8), 573-575.

- Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., ... and Ahmad, Z., 2017. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. *Plant biotechnology: principles and applications*, 1-36.
- Shalan, E. E., Soliman, S. S., Mahmoud, A. A., Al-Khayri, J. M., ALshamrani, S. M., Safhi, F. A. and Hassanin, A. A., 2023. Micropropagation of Daylily (*Hemerocallis fulva*) from Crown-Tip Explants and Assessment of Somaclonal Variation of in Vitro-Propagated Plants Using SCoT Markers. *Phyton-International Journal Of Experimental Botany*.
- Shen, J. Y., Huang, J. Y. and Li, X. L., 2005. Advances in research on mechanism of enzymatic browning and inhibition methods for fruits and vegetables. *Food Research and Development*, 6, 150-156.
- Sidhu, Y., 2011. In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture.
- Singh, R. and Chaturvedi, P., 2022. In vitro propagation and establishment of adventitious root cultures of *Rheum emodi* Wall. ex Meisn for quantification of emodin production. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 1-13.
- Singh, T. and Agrawal, V., 2023. Optimization of micropropagation protocol and elicitation of luteolin and rutin biomolecules using phenylalanine and chitosan in root callus of *Rumex hastatus* D. Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 152(1), 183-200.
- Skoog F, Miller CO., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118– 131.
- Smith, R. H., 2012. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. academic press.
- Socolowski F, Vieira DCM, Takaki M., 2008 Interaction of temperature and light on seed germination in *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth (Bignoniaceae). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51:723-730.
- Song, B., Stöcklin, J., Gao, Y.Q., Zhang, Z.Q., Yang, Y., Li, Z.M. and Sun, H., 2013. Habitat-specific responses of seed germination and seedling establishment to soil water condition in two *Rheum* species in the high Sino-Himalayas. *Ecological research*, 28, pp.643-651.
- Srivastava R., 2014 Family Polygonaceae in India. *Indian Journal of Plant Sciences* 3(2):112–150.
- Su, Y. H., Liu, Y. B. and Zhang, X. S., 2011. Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant*, 4(4), 616-625.
- Sudheer, W. N., Praveen, N., Al-Khayri, J. M., and Jain, S. M., 2022. Role of plant tissue culture medium components. In *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 51-83). Academic Press.
- Sugimoto, K., Gordon, S. P. and Meyerowitz, E. M., 2011. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation?. *Trends in cell biology*, 21(4), 212-218.
- Sun, Y. S., Wang, A. L., Wan, D. S., Wang, Q., Liu, J. Q., 2012 Rapid radiation of *Rheum* (Polygonaceae) and parallel evolution of morphological traits. *Mol Phylogenet Evol* 63:150–158
- Swartz, H. J., 1991. Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. *Micropropagation: technology and application*, 95-121.
- Tabin, S., Gupta, R. C. and Kamili, A. N., 2014. In vitro micro propagation of *Rheum* explants supplemented with various types of growth hormones. *J Agric Vet Sci (IOSR-JAVS)*, 7(3), 97-100.

- Tabin, S., Kamili, A. N. and Gupta, R. C., 2016. Novel study on in vitro culture of *Rheum spiciforme* Royle: An endangered medicinal plant of Figurez valley. *International Journal of Current Research*, 8(4), 28971-28979.
- Tabin, S., Kamili, A. N., Gupta, R. C., Parray, J. A. and Bansal, A., 2018. In Vitro Culture of *Rheum emodi* Wall: An Endangered Medicinal Plant of Northwestern Himalaya. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(3), 995-1006.
- Tanhuanpää, P., Suojala-Ahlfors, T. and Hartikainen, M., 2018. Genetic diversity of Finnish home garden rhubarbs (*Rheum* spp.) assessed by simple sequence repeat markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66, 17-25.
- Taşkın, H., Baktemur, G., Kurul, M. and Büyükalaca, S., 2013. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Taşkın, T. and Bulut, G., 2019. Qualitative and quantitative phytochemical analysis and in-vitro biological activity of *Rheum ribes* L. different parts. *İstanbul Journal of Pharmacy*, 49(1), 7-13.
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J. M. and Charrier, A., 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 171– 177.
- Thakur, M., Soni, M., Sharma, D. P., Vivek, M., and Sharma, V., 2018. In vitro propagation of Plum (*Prunus salicina*) cv. ‘Santa Rosa’ and assessment of genetic stability using RAPD markers. *Indian Journal of Plant Physiology*, 23, 161-168.
- Theplantlist, Royal Botanic Gardens Kew., 2023. The Plant List V1. 1, Reino Unido." The Plant List, Missouri Botanical Garden, <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Polygonaceae/Rheum/> (03.03.2023)
- Tikendra, L., Choudhary, R., Sanayaima Devi, R., Dey, A., Potshangbam, A. M. and Nongdam, P. 2021a. Micropropagation of bamboos and clonal fidelity assessment using molecular markers. *Biotechnological Advances in Bamboo: The “Green Gold” on the Earth*, 145-185.
- Tikendra, L., Potshangbam, A. M., Dey, A., Devi, T. R., Sahoo, M. R. and Nongdam, P., 2021b. RAPD, ISSR and SCoT markers based genetic stability assessment of micropropagated *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f.-an important endangered orchid. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 341-357.
- Tippani, R., Nanna, R. S., Mamidala, P. and Thammidala, C., 2019. Assessment of genetic stability in somatic embryo derived plantlets of *Pterocarpus marsupium* Roxb. using inter-simple sequence repeat analysis. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(2), 569-579.
- Tomiczak, K., Miśka, A., Niedziela, A., Wójcik-Lewandowska, A., Domżańska, L. and Rybczyński, J. J., 2019. Somatic embryogenesis in the family Gentianaceae and its biotechnological application. *Frontiers in Plant Science*, 10, 762.
- Tosun, F. and Kizilay, C. A., 2003. Anthraquinones and flavonoids from *Rheum ribes*. *J Fac Pharm Ankara*, 32(1), 31-35.
- Tripathi, L. and Tripathi, J. N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 2(2), 243-253.

- Tuncer, B., 2021. Development of an efficient in vitro callus proliferation protocol for edible wild rhubarb (*Rheum ribes* L.). *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 20(5).
- Tuncer, B., ve Günsan B., 2017. Yabani Ravent (*Rheum ribes* L.)'in Doku Kültürü ile Çoğaltım Olanakları Üzerine Araştırma. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi* 4.3: 296-301.
- Uma, S., Kumaravel, M., Backiyarani, S., Saraswathi, M. S., Durai, P. and Karthic, R., 2021. Somatic embryogenesis as a tool for reproduction of genetically stable plants in banana and confirmatory field trials. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 147(1), 181-188.
- UN Comtrade., 2017. UN Comtrade Database, <https://comtrade.un.org/> (10.01.2023).
- Uyar, P., N. Coruh and M. Iscan., 2014. Evaluation of in vitro antioxidative, cytotoxic and apoptotic activities of *Rheum ribes* ethyl acetate extracts. *J. Plant Sci.*, 2: 339-346.
- Üstün, N. Ş., Pekşen, A., Bulam, S. and Duran, H., 2018. Edible wild herbaceous plants consumed in Giresun province. *Acta Biologica Turcica*, 32(2), 84-89.
- Verma, V., Zinta, G., and Kanwar, K., 2021. Optimization of efficient direct organogenesis protocol for *Punica granatum* L. cv. Kandhari Kabuli from mature leaf explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 57, 48-59.
- Victório, C. P., Lage, C. L. S. and Sato, A., 2012. Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*. *Revista Ciência Agronômica*, 43, 539-545.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L., 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 69, 233-249.
- Wan D, Wang A, Zhang X, Wang Z, Li Z., 2011 Gene duplication and adaptive evolution of the CHS-like genes within the genus *Rheum* (Polygonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 39(4–6):651–659.
- Wang A, Yang M, Liu J., 2005 Molecular phylogeny, recent radiation and evolution of gross morphology of the rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) inferred from chloroplast DNA trn LF sequences. *Annals of Botany* 96(3):489–498.
- Wang, J., Lu, Y., Wang, Q., Liu, K., Song, Y., Bi., K., 2011. An efficient callus proliferation protocol and rhaponticin accumulation of *Rheum franzenbachii* Munt., a medicinal plant. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20(2): 252-257.
- Wang, X. M., Hou, X. Q., Zhang, Y. Q., Yang, R., Feng, S. F., Li, Y. and Ren, Y., 2012. Genetic diversity of the endemic and medicinally important plant *Rheum officinale* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3900-3915.
- Wani BA, Ramamoorthy D, Rather MA, Arumugam N, Qazi AK, Majeed R, Hamid A, Ganie SA, Ganai BA, Anand R, Gupta AP., 2013 Induction of apoptosis in human pancreatic MiaPaCa-2 cells through the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) by *Gentiana kurroo* root extract and LC-ESI-MS analysis of its principal constituents. *Phytomedicine* 20(8–9):723–733
- Winarto, B., Rachmawati, F., Pramanik, D. and Teixeira da Silva, J. A., 2011. Morphological and cytological diversity of regenerants derived from half-anther cultures of anthurium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105, 363-374.
- Wojtania, A. and Mieszczakowska-Frąć, M., 2021. In vitro propagation method for production of phenolic-rich planting material of culinary rhubarb 'Malinowy'. *Plants*, 10(9), 1768.

- Wu Z, Raven, P.H., Hong, D., 2003 Flora of China. Volume 5 Ulmaceae through Basellaceae. Beijing, China: Science Press.
- Xia, P., Guo, H., Zhang, Y., Deyholos, M. K., Peng, L., Jia, Y., ... and Liang, Z., 2016. Wild *Panax vietnamensis* and *Panax stipuleanatus* markedly increase the genetic diversity of *Panax notoginseng* (Araliaceae) revealed by start codon targeted (SCoT) markers and ITS DNA barcode. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66, 37-42.
- Xiang, H., Zuo, J., Guo, F. and Dong, D., 2020. What we already know about rhubarb: a comprehensive review. *Chinese medicine*, 15, 1-22.
- Xiang, L., Liu, X. H. and Fan, G. Q., 2005. Chemical constituents from *Rheum nanum* Siev. ex Pall.(II). *Chin Tradit Herb Drugs*, 36, 1306-9.
- Xiao, Z., Fu, R., Li, J., Fan, Z., and Yin, H., 2016. Overexpression of the gibberellin 2-oxidase gene from *Camellia lipoensis* induces dwarfism and smaller flowers in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34, 182-191.
- Xiong, F., Zhong, R., Han, Z., Jiang, J., He, L., Zhuang, W. and Tang, R., 2011. Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. *Molecular biology reports*, 38, 3487-3494.
- Yamaner, Ö. and Erdağ, B., 2021. In Vitro Germination and Seedling Development of An Endemic Medicinal Plant *Hypericum adenotrichum* Spach. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (23), 440-447.
- Ye, M., Han, J., Chen, H., Zheng, J. and Guo, D., 2007. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18, 82-91.
- Yuan, S., Jian, T., Li, W. and Huang, Y., 2020. Extraction process optimization and activity assays of antioxidative substances from *Rheum officinale*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 176-184.
- Zahedi, M., Hojjati, M. R., Fathpour, H., Rabiei, Z., Alibabaei, Z. and Basim, A., 2015. Effect of *Rheum ribes* hydro-alcoholic extract on memory impairments in rat model of Alzheimer's disease. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 14(4), 1197.
- Zeidali, E., Korrani, H. M., Alizadeh, Y. and Kamari, F., 2021). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in semi-arid rangeland in western Iran. *Central Asian Journal of Plant Science Innovation*, 1(1), 46-55.
- Zhang, J., Xie, W., Wang, Y. and Zhao, X., 2015. Potential of start codon targeted (SCoT) markers to estimate genetic diversity and relationships among Chinese *Elymus sibiricus* accessions. *Molecules*, 20(4), 5987-6001.
- Zhang, Y., Wang, B., Guo, L., Xu, W., Wang, Z., Li, B. and Zhang, J., 2018. Factors influencing direct shoot regeneration from leaves, petioles, and plantlet roots of triploid hybrid *Populus* sect. *Tacamahaca*. *Journal of Forestry Research*, 29, 1533-1545.
- Zhou L.G. and Wu J.Y., 2006. Development and application of medicinal plants tissue cultures for production of Drugs and herbal medicines in China. *Natural Product Reports*, 23: 789-810.
- Zhou, Y., Chen, S., Zhao, Y. and Cai, Z., 2010. Rapid propagation from in vitro cultured seedling shoot-tips of culinary rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.). In XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Micro 923 (pp. 91-96).

- Zhuang, T., Gu, X., Zhou, N., Ding, L., Yang, L. and Zhou, M., 2020. Hepatoprotection and hepatotoxicity of Chinese herb Rhubarb (Dahuang): How to properly control the “General (Jiang Jun)” in Chinese medical herb. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 127, 110224.
- Ziv, M. and Naor, V., 2006. Flowering of geophytes in vitro. *Propagation of Ornamental Plants*, 6(1), 3-16.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı: Doğum tarihi: Doğum Yeri: Uyruğu: Adres: Tel: E-mail:	Muhammed ALDAİF
Eğitim	
Lise: Lisans: Yüksek lisans: Doktora:	AL-BAATH ÜNİVERSİTESİ 2008 AL-BAATH ÜNİVERSİTESİ 2013 ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ 2023
Yabancı Dil Bilgisi	
Türkçe: İngilizce: Arapça:	- İyi C ₁ - İyi - Anadil
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	