

**TOHUMDAN ÇİMLENEN AKDENİZ DEFNESİ  
(*Laurus nobilis* L.) BİTKİSİNİN *in vitro*  
KOŞULLARDA FİDAN ÜRETİMİ**

**Hasret PARMAK**

**Yüksek Lisans Tezi  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR  
ROYANDAZAGH**

**2019**

**T.C.**  
**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TOHUMDAN ÇİMLENEN AKDENİZ DEFNESİ (*Laurus nobilis* L.)**  
**BİTKİSİNİN *in vitro* KOŞULLARDA FİDAN ÜRETİMİ**

**HASRET PARMAK**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANAZAGH**

**TEKİRDAĞ – 2019**

**Her hakkı saklıdır®**

Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH danışmanlığında HASRET PARMAK tarafından hazırlanan “Tohumdan Çimlenen Akdeniz Defnesi (*Laurus Nobilis* L.) Bitkisinin *in vitro* Koşullarda Fidan Üretimi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:Doç.Dr. NURŞEN ÇÖRDÜK

*İmza:*

Üye:Dr. Öğr. Üyesi SEVİYE YAVER

*İmza:*

Üye:Dr. Öğr. Üyesi SHEİDA DANESHVAR ROYANDAZAGH

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

**Prof. Dr. Bahar UYMAZ**

**Enstitü Müdür**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOHUMDAN ÇİMLENEN AKDENİZ DEFNESİ (*Laurus nobilis* L.) BİTKİSİNİN *in vitro* KOŞULLARDA FİDAN ÜRETİMİ

**Hasret PARMAK**

Tekirdag Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANAZAGH

Türkiye'nin ihraç ettiği önemli tıbbi ve aromatik bitkilerden olan Akdeniz Defne (*Laurus nobilis* L.)'si ülke ekonomisi açısından önemli bir yere sahiptir. Yapılan bu tez çalışmasında, Akdeniz Defne'sinde *in vitro* mikroçoğaltım yapılmadan *in vitro* koşullarda fidan üretimi amaçlanmıştır. Bu çalışmada kabuğu soyulmuş defne tohumları *in vitro* ortamda çimlendirilmeye alınmıştır. %60 NaOCl konsantrasyonunda yapılan sterilizasyon denemelerinde kontaminasyona rastlanmazken, en iyi çimlenme oranı (%71,6) %80 NaOCl konsantrasyonunda steril edilen tohumlardan elde edilmiştir. Çimlenen tohumlardan çıkan tepe sürgünler (ilk sürgün) kesilerek yan sürgünlerin gelişmesi sağlanmıştır. Tepe ve yan sürgünler ayrılarak köklendirme ortamına alınmıştır. Köklenme yüzdesi bakımından en başarılı sonuç 1 mg/L IBA içeren WPM (66,7) ve MS (53,3) besin ortamlarından elde edilmiştir. Aynı zamanda köklenme süresi (8,7-9) açısından da en iyi sonuçlar 1 mg/L IBA içeren WPM ile 1 mg/L IBA içeren MS ortamlarından elde edilmiştir. Çalışmanın son aşamasında *in vitro*da gelişen köklü defne fidanları başarılı bir şekilde dış koşullara aktarılmıştır. Tepe ve yan sürgünlerde yapılan *in vitro* fidan yetiştirme çalışmasının pratik ve kolay olmasının yanı sıra kısa sürede sonuç alındığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak yapılan bu tez çalışmasıyla *in vitro* fidan yetiştirme çalışmaları Akdeniz Defnesi'nin ticari anaç ve fidan yetiştiriciliğinde *in vitro* mikro çoğaltım ve *in vivo* çelik yetiştirme çalışmalarından daha avantajlı olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Laurus nobilis* L., defne, *in vitro* köklendirme, tohum sterilizasyonu, *in vitro* tohum çimlenmesi

2019, 52 sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### SEED GERMINATION of BAY LAUREL (*Laurus nobilis* L.) *in vitro* CONDITIONS of CLONAL CUTTING PROPAGATION

**Hasret PARMAK**

Tekirdag Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

The Mediterranean which is an important medicinal and aromatic plants exported by Turkey Laurel (*Laurus nobilis* La.) have the country has an important place in the economy. Aim of this thesis to produce *in vitro* seedlings without *in vitro* micropropagation. In this study, without pericarp laurel seeds were germinated to *in vitro* condition. Sterilization experiment results were observed no contamination in at a concentration of 60% NaOCl, while the best germination rate (71,6%) was obtained from sterilized seeds at a concentration of 80% NaOCl. First shoot of seedling in bay laurel was tip and lateral shoots was improved. Tip and lateral shoots was cut and were taken into rooting medium. According to the results of the rooting experiments, the highest percentage of rooting was obtained from medium 1 mg/L IBA WPM (66,7) and MS (53,3), the best results rooting time (8,7-9) was obtained from 1 mg/L IBA WPM and 1 mg/L IBA MS medium. In the last stage, the seedling were successfully acclimatized to external conditions. As a result of this thesis the *in vitro* clonal cutting study performed on the tip and lateral shoots of the bay laurel has been observed to be practical, easy as well as the result in a short time and the *in vitro* clonal cutting study performed on the tip and lateral shoots of the bay laurel is more advantageous in commercial rootstock and seedling cultivation than *in vitro* micropropagation and *in vivo* cutting propagation studies.

**Key words:** *Laurus nobilis* L., laurel, *in vitro* rooting, seed sterilization, *in vitro* seed germination

2019, 52 page

## **TEŞEKKÜR**

Yaptığım bu çalışmada her daim bana destek olan, bilgisiyle bana ışık tutan ve yol gösteren değerli danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH'a**,

Laboratuvar çalışmalarım esnasında benden yardımlarını esirgemeyen ve destek olan sevgili hocam **Araş. Gör. Elif Ceren PEHLİVAN'a**,

Tüm sıkıntılarında yanımda olan bana kardeşten çok arkadaşı, sırdaşı olan, hayatın bana vermediği eksikleri tamamlayan **KAMİLE YILMAZ, ADİLE TÜRKEL, GÜLAY CAN, GÖNÜL BULUT** ve özellikle hayatın her anında yanımda olan canım ablam **MAKBULE BOZABA** ve biricik eniştem **KEMAL BOZABA'ya**, eğitim hayatım boyunca kahrımı çeken, hayatımın bütün sınavlarında yanımda duran canım ablam **SEVGİ PARMAK'a**,

Bana verdikleri emek ve sevgi için annem **ASİYE PARMAK** ve babam **YAŞAR PARMAK'a**,

Desteği, sabrı ve sevgisiyle her zaman yanımda olan sevgili nişanlım **BURAK KIRMIZIGÜL'e**

Beni meslektaş olarak gören, sevgisini ve her türlü desteğini veren bölüm hocalarıma sonsuz **TEŞEKKÜR** EDERİM..

Ziraat Mühendisi

**Hasret PARMAK**

TEMMUZ, 2019

# İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
<b>ÖZET.....</b>	<b>i</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Defne Bitkisinin Mitolojisi.....	3
1.2. Defne Bitkisinin Genel Ve Botanik Özellikleri.....	4
1.3. Defne Bitkisinin Doğal Yayılış Alanları .....	6
1.4. Defne Bitkisinin Ekolojisi .....	7
1.5. Defne Bitkisinin Tıbbi ve Aromatik Özellikleri.....	8
1.6. Defne Bitkisinin Ticari Önemi .....	8
1.7. Defne Bitkisinin Kullanım Alanları .....	10
<b>2. KURAMSAL TEMELLER .....</b>	<b>11</b>
2.1. Odunsu Bitkilerde Yapılan Çimlendirme Çalışmaları.....	11
2.2. Odunsu Bitkilerde Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları.....	13
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>16</b>
3.1. Bitkisel Materyal .....	16
3.1.2. Bitkisel Materyalin Eldesi ve Saklama Koşulları.....	16
3.2. Yöntem .....	16
3.2.1. In vitro Tohum Çimlendirmede Besin Ortamı ve Kültür Koşulları.....	16
3.2.2. Defne Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu .....	17
3.2.3. Defne Tohumlarının in vitro Çimlendirme Ortamına Alınması.....	18
3.2.4. Çimlenen Tohumlardan Gelişen Tepe ve Yan Sürgünlerin Kesilerek Ayrılması.....	18
3.2.5. Tepe ve Yan Sürgünlerin Köklendirilmesi.....	19
3.2.6. Köklü Sürgünlerin Dış Ortama Aktarılması .....	19
3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	19
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>20</b>
4.1. Defne Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu .....	20
4.1.1. Kabuklu Tohumlarda Sterilizasyon.....	20
4.1.2. Kabuğu Soyulmuş Tohumlarda Sterilizasyon .....	22
4.2. Tohumların Çimlendirilmesi .....	23
4.3. Çimlenen Tohumlardan Gelişen Tepe ve Yan Sürgünlerin Kesilerek Ayrılması .....	24
4.4. Tepe ve Yan Sürgünlerin Köklendirilme Ortamına Aktarılması.....	24
4.5. Köklü Sürgünlerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon) .....	27

<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>29</b>
5.1. Defne Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu ve Çimlenmesi .....	29
5.1.1. Defne Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu .....	29
5.2. Defne Tohumlarının Çimlendirilmesi .....	29
5.3. <i>İn Vitro</i> Ortamda Çimlenen Defne Tohumlarından Kesilerek Ayrılan Tepe ve Yan Sürgünlerin Köklendirilmesi .....	30
5.4. <i>İn Vitro</i> da Gelişen Köklü Defne Sürgünlerinin Dış Koşulara Alıştırılması (Aklimatizasyon) .....	32
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>33</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	<b>34</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>39</b>



## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 1.1. Türkiye'ye ait bitki zenginliğinin diğer ve Avrupa kıtası ile karşılaştırılması.....	<b>1</b>
Çizelge 4.1. Farklı NaOCl konsantrasyonlarının kabuklu defne tohumlarının kontaminasyonu ve çimlenmesi üzerine etkisi .....	<b>21</b>
Çizelge4.2.Farklı NaOCl konsantrasyonlarının kabuksuz defne tohumları üzerine kontaminasyon ve çimlenme etkisi .....	<b>22</b>
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda IBA içeren besin ortamlarındaki bitkilerin köklenme verileri .....	<b>25</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Akdeniz defne'sine ait mitolojik görseller .....	3
Şekil 1.2. Dişi çiçeklerin gelişim dönemlerini anlatan görsel .....	5
Şekil 1.3. Erkek çiçeklerin gelişim dönemlerini anlatan görsel (a): Dişi ve erkek çiçeklere ait tomurcuklarının uyanması, (b): Çiçeklenmenin başlangıcı (c): Çiçeklenmenin yarılanma dönemi (d): Tam çiçeklenme dişi çiçeklerde döllenmenin tamamlanması, erkeklerde polenin kalmayıp ve renk değiştirmeye başladığı dönem .....	5
Şekil 1.4. a; defne meyvesinin olgunlaşmamış hali, b; defne meyvesinin olgunlaşmış hali .....	6
Şekil 1.5. Defne bitkisinin Türkiye'deki doğal yayılış alanları .....	7
Şekil 1.6. Türkiye'de 2017 yılı itibarıyla bölge bazında defne yaprağı üretim miktarı .....	9
Şekil 1.7. Yıllara göre defne yaprağı ihracat miktarı (ton) .....	9
Şekil 1.8. Akdeniz defne'sinin kullanım alanları .....	10
Şekil 3.1. Tohum çimlendirme ortamının hazırlanması .....	17
Şekil 3.2. a; kabuklu defne tohumlarının sterilizasyonu, b; kabuksuz defne tohumlarının sterilizasyonu .....	17
Şekil 3.3. a; tohumların (%20, %40, %60, %80, %100) NaOCl çözeltisinde sterilizasyonu, b; tohumların steril saf su içerisinde yıkanması) .....	18
Şekil 3.4. a) Çimlenen defne tohumundan kesilerek ayrılan tepe sürgünler b) Çimlenen defne tohumundan kesilerek ayrılan yan sürgünler .....	19
Şekil 4.1. Kabuklu defne tohumlarında a; çimlenme, b; kontaminasyon durumu .....	22
Şekil 4.2. Kabuğu soyulmuş tohumlarda kontaminasyon ve çimlenme (a; kontaminasyon, b; çimlenme) .....	23
Şekil 4.3. Kabuksuz defne tohumlarının çimlenmesi .....	24
Şekil 4.4. Yan sürgünlerin gelişmesi .....	24
Şekil 4.5. a; Tepe sürgünlerin ayrılıp köklenme ortamına alınması, b; Yan sürgünlerin ayrılıp köklenme ortamına alınması .....	25
Şekil 4.6. Tepe ve yan sürgünlerin köklendirilmesi (a; tepe sürgün, b; yan sürgün) .....	25
Şekil 4.7. Tepe ve yan sürgünlerin kök uzunlukları (a; tepe sürgünün kök uzunluğu, b; yan sürgünün kök uzunluğu) .....	27

Şekil 4.8. Tepe ve yan sürgünlerin besin ortamındaki köklü görüntüsü (a; köklü tepe sürgünü, b; köklü yan sürgünün ) .....	27
Şekil 4.9. Köklenenen bitkilerin dış koşullara aktarılması ve alıştırılması (a; köklü fide, b;köklü fidelerin dışkoşullara aktarılması, c; köklü fidenin sağlıklı bir şekilde hayatta kalması, d; köklü fidelerin büyük saksılara alınması).....	28

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	:Yüzde
°C:	: Santigrad Derece
µl:	: Mikrolitre
µm:	: Mikrometre
µM:	: Mikromolar
BA:	: Benzil Adenin
cm:	: Santimetre
AC	: Aktif Kömür
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
BM	: Beauchesne
Ca	: Kalsiyum
C-DNA	: Komplementer Deoksi Nükleik Asit
CV:	: Varyasyon Katsayısı
Dk	: Dakika
DKW:	: Driver Kuniyuki
HCl	: Hidroklorik Asit
GA <sub>3</sub> :	: Giberellik Asit
H <sub>2</sub> Cl	: Civa Klorür
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Hidrojen Sülfat
IAA:	: İndol Asetik Asit
IBA:	: İndol Bütirik asit
l:	: Litre
m:	: Metre
mg:	: Miligram
ml:	: Mililitre
mM:	: Milimolar
mmhos	:Sulama Sularının Toplam Tuz Miktarı
NAA	:Naftalin Asetik Asit
NaCl	:Sodyum Klorür
NaOCl	:Sodium Hypochlorite
NaOH	:Sodyum Hidroksit
NGE	:Lloyd and Mc Cown medium
NOAA	:National Oceanic and Atmospheric Administration

OGM	:Orman Genel Müdürlüğü
MS	:Murashige and Skoog
Mg	:Magnezyum
MSAP	:Methylation Sensitive Amplified Polymorphism
RAPD	:Random Amplified Polymorphic DNA
PEG	:Polietilen Glikol
pH	:Potential of Hydrogen
ppm	:Milyonda Bir Kısım
WPM	:Woody Plant Medium
QL	:Quoirin ve Lepoivre
SSAP	:Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm
6-BA	:6-Benzilamino
TDZ	:Tidiazuron
TEs	:Transposable Element
2,4-D	:2,4 Diklorofenoksi asit
2,4,5-T	: 2,4,5-Triklorofenoksiasetik Asit
2İp	:İzopentenil Adenin

## 1. GİRİŞ

Türkiye üzerinde bulunduğu coğrafi konumu, dört mevsim yaşanan iklimi, topografik özellikleri, dört tarafının denizlerle çevrili olmasının getirdiği avantajlardan dolayı diğer ülkelere göre daha zengin bir bitki örtüsüne sahiptir (Çizelge 1.1). Türkiye’de 12 binden fazla bitki taksonu ve 10 bine yakın tür zenginliği bulunmaktadır. Türkiye’de bulunan 167 familyaya ait 11,707 bitki taksonu içindeki 3,649 adet bitki endemik tür olarak bilinmektedir. Türkiye’nin sahip olduğu bitki tür varlığı dünyanın yaklaşık %3,6’sına denk gelmektedir. Bu zengin flora içerisinde tıbbi ve aromatik özelliğe sahip birçok tür bulunmaktadır (Arslan ve ark. 2015).

**Çizelge 1.1.** Türkiye’ye ait bitki zenginliğinin diğer ve Avrupa kıtası ile karşılaştırılması (Tümen 2010)

Ülkeler	Bitki tür Sayısı	Endemik Bitki Sayısı	Endemik Bitki Oranı (%)
İran	7500	1500	20
Irak	3000	200	7
Suriye-Lübnan	3000	330	11
Yunanistan	5500	1100	20
Bulgaristan	3650	53	2
Almanya	2700	54	2
Avrupa (kıta)	12000	2500	21
<b>Türkiye</b>	<b>11148</b>	<b>3616</b>	<b>33</b>

Tıbbi ve aromatik bitkiler eski dönemlerden bu yana dini ayinlerde, hastalıkların iyileştirilmesinde, vücut bakımı ve sağlığında, beslenme ve kozmetik gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Bayram ve ark. 2010). Tıbbi ve aromatik bitkileri Çin, Hindistan, İran ve Mısır ilk kullanan ülkeler olurken, Avrupa kıtasının bu ürünlerle tanışması daha geç olmuştur (Anonim 2016). Tıbbi ve aromatik bitki kategorisi içerisinde 422,000 bin bitki türünün 52,885’i tıbbi bitki iken, Türkiye’de 9,222 bitki türü içerisinde 500 tanesi (%5) tıbbi bitki sınıfı içinde yer almaktadır (Gül ve Çelik 2016). Türkiye florasının 1/3’ini oluşturan aromatik bitkilerin 3,000 kadarı endemik bitki olarak sınıflanmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin 300 kadarı aktarlarda satışı yapılırken, 70-100 adet bitkinin ihracatı yapılmaktadır (Baytöre 2014).

Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitki tarımı sınırlı düzeyde yapıp, çoğunlukla doğadan toplanarak elde edilmektedir. Türkiye’nin de aralarında bulunduğu Avrupa kıtasındaki birçok

ülkede 2,000 adet bitki türünün %90'ı doğadan toplanmaktadır. Doğadan toplama çoğunlukla Macaristan, Arnavutluk, Türkiye ve İspanya'da daha yoğun olarak gerçekleştirilmektedir. Avrupa genelinde yaklaşık 700,000 dekarlık alanda tarımı yapılan tıbbi ve aromatik bitki yetiştiriciliğine Fransa, Macaristan ve İspanya önderlik etmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkilerden kimyon, anason, kekik, çemen, haşhaş, rezene, nane ve kişnişin tarımı yapılırken; defne, ıhlamur, adaçayı, biberiye ve kuşburnu özellikle Ege, Marmara, Akdeniz, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinden doğadan toplanmaktadır. Doğadan toplanan ya da tarımı yapılan kekik, defne, kimyon, anason, rezene tohumu, ardıç kabuğu, mahlep, çemen, biberiye, meyan kökü, nane, sumak, adaçayı ve ıhlamur çiçeği gibi tıbbi ve aromatik bitkiler dış ticarete önemli bir yer almaktadır. Bu bitkiler başlıca ABD, Almanya, Vietnam, Hollanda, Polonya, Brezilya, Kanada, İtalya, Belçika, Yunanistan, İspanya, Ukrayna, Afganistan, Hindistan ve Çin gibi ülkelere ithal edilmektedir (Gül ve Çelik 2016).

Dünya genelinde 2016 senesinde zencefil, safran, zerdeçal, kekik, defne yaprağı, köri ve diğer birçok baharat grubunda ihracat 700 milyon dolardan fazla olmuştur. Sayılan ürünler arasında en güçlü ihracatçılar Türkiye ve Hindistan olurken, yapılan ihracatın 92 bin tonu (%18) Hindistan'a, 34 bin tonu da (%16) Türkiye aittir. Tıbbi ve aromatik bitki satışı Hindistan'da ortalama 1,400 dolar/tondan yapılırken, Türkiye'de bu ürünlerin satışı ortalama 3,245 dolar/ton'dan yapılmaktadır (Başer ve ark. 2018). Tıbbi ve aromatik bitkiler içinde önemli bir yere sahip olan Akdeniz Defne'si önemli ihracat kaynaklarından biridir. Türkiye yıllık tıbbi ve aromatik bitki ihracatından 140 milyon dolar gelir elde ederken bunun 32 milyon dolarlık payı defne bitkisine aittir (Kırıcı 2015). Akdeniz defne'si yapraklarından elde edilen uçucu yağ, meyvesinden elde edilen sabit yağ, baharat ve koku gibi önemli özellikleriyle Türkiye için önemli bir ihracat kaynağıdır.

Bitki doku kültürü yöntemi bilinen klasik yöntemler dışında bitkinin farklı kısımlarını hatta küçük bir doku parçasını (eksplant) besin maddelerine ve uygun çevre koşullarına sahip bir ortamda (ışık, rutubet ve sıcaklık) kültüre alma işlemidir. Özellikle bitki üretiminde zorluklar yaşanan türler için etkili bir teknik olan bitki doku kültürü uygulaması ile üretimin daha yaygın hale geleceği, daha kısa sürede gerçekleşeceği ve aynı genetik özelliklerle kaliteye sahip binlerce bitkinin üretilebileceği bilinmektedir. Diğer çoğaltma yöntemleriyle karşılaştırıldığında *in vitro* yöntemlerin daha etkili olduğu görülmektedir. Çimlendirilmesi zor olan bitkilerde çimlendirilme sağlanması için, bitki doku kültürü tekniklerini kullanılarak bitki çıkışı daha kısa sürede gerçekleştirilmektedir. Bu bitkilere ait tohumlar uygun çevresel faktörlerin bulunmamasından ya da tohumda bulunan engelleyici etmenlerden dolayı *in vivo* koşullarda çimlenme gösteremezken, doku kültürü teknikleri kullanılarak kolay bir şekilde

çimlenme sağlamaktadır (Dinçer ve ark. 2016). Aynı zamanda nesli tükenme tehlikesi altında olan birçok bitki türünde de doku teknikleri önemlidir. Günümüzde birçok ticari çeşit ve türde üretim süresinin daha kısa olması ve daha fazla verim almak amacıyla *in vitro* koşullarda bitki üretimi tercih edilmektedir. Yapılan bu tez çalışması Akdeniz Defnesi (*Laurus nobilis* L.)'nin *in vitro* koşullarda çimlendirilerek gelişen tepe sürgünü (ilk sürgün) kesilerek, yan sürgünler geliştirilip ayrılmıştır. Tepe ve yan sürgünler köklendirilerek *in vivo* ortamda dış koşullara alıştırılmıştır. Bu çalışmada, diğer *in vitro* tekniklere karşı daha kısa sürede ve çok sayıda köklü fidan üretimini amaçlamaktadır.

### 1.1. Defne Bitkisinin Mitolojisi

Defne ağacı tarihsel süreç içerisinde incelendiğinde kökeni binlerce yıl öncesine dayanan ve Anadolu çevresinde binlerce efsaneye konu olmuş, her daim yeşil kalan hoş kokulu ve birçok hastalığa şifa kaynağı olan bir ağaçtır. Defne ağacının her daim yeşil kalması insanların onu Antik Yunan'da ölümsüzlük sembolü olarak görülmesine neden olmuştur (Uyar 2014).



**Şekil 1.1.** Akdeniz defne'sine ait mitolojik görseller

Defne ağacı tarihsel dönem içerisinde hem kendi toplumumuzda hemde birçok millet için önemli olmuştur. Roma ile Yunan toplumlarında savaş ve spor galibiyetlerinde yapraklardan yapılan tacın başarılı kişilere takdim edilmesi onun bir başarı simgesi olarak görülmesini sağlamıştır (Şekil 1.1).

MÖ 342 yılları Romalılar döneminde altın paralar üzerinde defne ağacını simgeleyen çelenk figürü bulunur ve fırtınalı günlerde yanlarına aldıkları defne yaprağının onları yıldırım çarpmasından koruduklarına inanırlardı (Baytöre 2014).

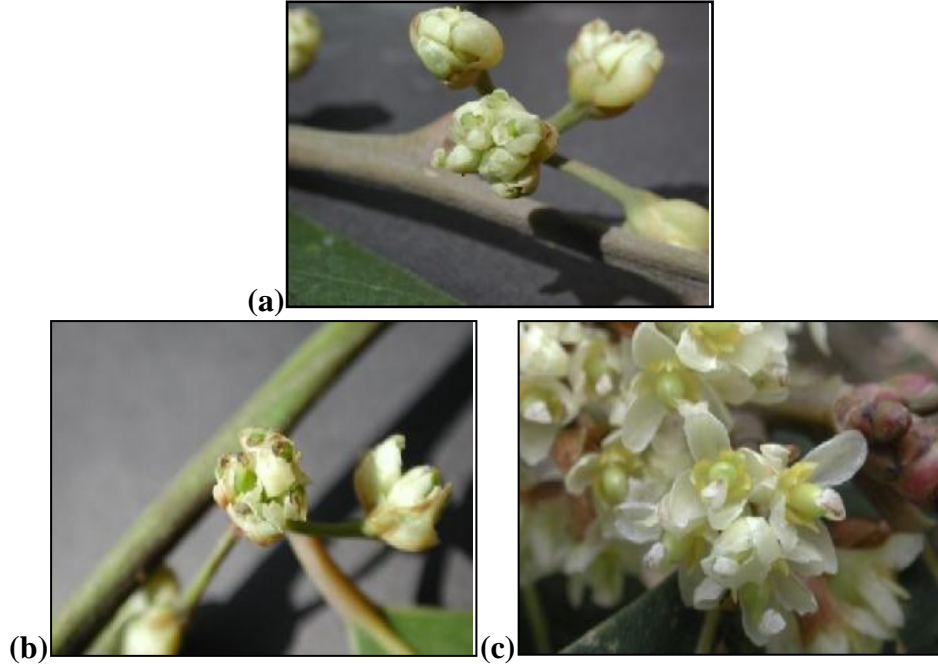


Ülkemizde Akdeniz defne'si ya da defne isimleriyle bilinen bu bitki halk arasında tehnel, tefr n, teynel olarak adlandırılırken; dünyada İngilizce Bay Laurel, Sweet Bay, Laurel, Almanca Lorbeer, Lorbeerbaum, Fransızca Laurier, Laurier Sauce, İtalyanca Alloro, Lauro olarak bilinmektedir (Kavaklı 2012).

## 1.2. Defne Bitkisinin Genel Ve Botanik  zellikleri

*Lauraceae* familyası içerisinde 45 cins ve 1000 kadar tür bulunmaktadır. *Laurus* cinsi ise *Laurus nobilis* L. ve *L. canariensis* Willd. türlerine sahiptir. *Laurus nobilis* L. türünün dar yapraklı '*angustifolia*' ve dalgalı kenarlı '*crispa*', *aurea* ve *undula* gibi 4 alt tür içerdiği bildirilmiştir. Defne bitkisinin Türkiye'de tek türü bulunmaktadır (Karık ve ark. 2016). Akdeniz defne (*Laurus nobilis* L.)'si yuvarlak uçlu, sık dallanma gösteren dioik bir ağaçtır. Genellikle ağaçıck forma sahip olup 10-15 m'ye kadar boylanabilmektedir. Taze sürgünleri ilk olarak yeşil renkte olurken, daha sonra siyahımsı kırmızı renkli ve tüysüz bir görünüm alır. Gövdesi koyu gri ya da siyaha yakın bir kabuk rengine sahiptir. Kök ve kütük sürgünü verme kabiliyeti yüksektir (Karık ve ark 2015).

Yaprakları genellikle 5-10 cm uzunlukta ve 2-5 cm genişlikte olup üst kısmı parlak koyu yeşil, alt kısmı açık yeşil renkte ve hoş kokuludur.  i ek yapısı dioik olan Akdeniz defnesi'nin erkek bitkilerindeki çiçeklerde androkeum    daire üzerinde dörder stamenlidir. Stamenlerde iki polen kesesi ile birlikteiki nektarium, erkek çiçeğin orta kısmında ise körelmiş sap görünümlü ovaryum bulunmaktadır. Dişi bitkilerde sadece dişi çiçekler gelişir (Şekil 1.2a,b,c) ve erkek  i eklerde (Şekil 1.3a,b,c,d) 'te görüldüğü gibi daire üzerine dizilmiş açık sarı renkte dört petal yaprak, verimsiz stamenler ve irileşmiş nektariumlar vardır. Çiçekler Mart-Nisan aylarında a maya başlar. Tohumlarda endosperm yeterince gelişemediği için yedek besin maddesi embriyonun kotiledonlarında depo edilir (Boza 2013).



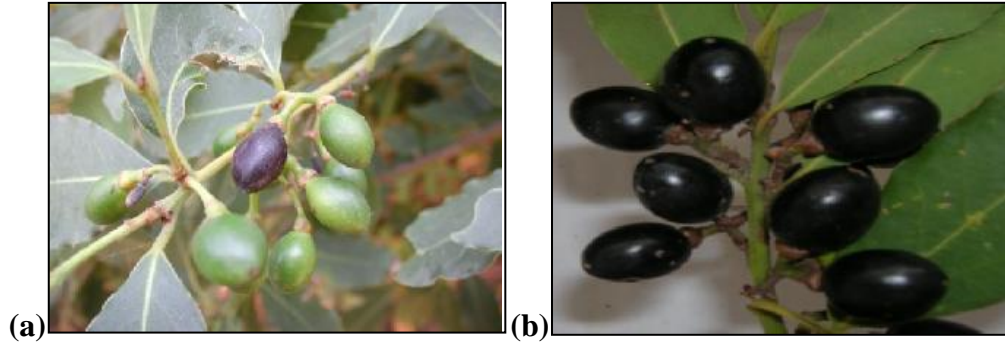
**Şekil 1.2.** Dişi çiçeklerin gelişim dönemlerini anlatan görsel (Boza 2013)



**Şekil 1.3.** Erkek çiçeklerin gelişim dönemlerini anlatan görsel (a): Dişi ve erkek çiçeklere ait tomurcuklarının uyanması, (b): Çiçeklenmenin başlangıcı (c): Çiçeklenmenin yarılanma dönemi (d): Tam çiçeklenme dişi çiçeklerde döllenmenin tamamlanması, erkeklerde polenin kalmayıp ve renk değiştirmeye başladığı dönem (Boza 2013)

Meyveler yeni oluştuğlarında yeşil renkte iken, (Şekil 1.4a,b)' te görüldüğü gibi olgunlaştıklarında siyah rengini alarak zeytin tanesine benzer bir görünüm alırlar. Meyvelerin tam olarak olgunlaşması Eylül sonu ve Ekim ayı içerisinde gerçekleşmektedir. Meyveler 2-3 cm uzunluğunda olup, 1-1,5 cm genişliğinde oval şekilli ve tek tohumludur.

Meyveler sabit yağ içeriği bakımından oldukça zengindir ve bu oran %25-30'ları bulmaktadır. Tohumların Bin dane ağırlığı bölgelere ve yıllara göre 700-1100 gr arasında değişmektedir (Boza 2013).



**Şekil 1.4.** a; defne meyvesinin olgunlaşmamış hali, b; defne meyvesinin olgunlaşmış hali (Boza 2013)

### 1.3. Defne Bitkisinin Doğal Yayılış Alanları

Akdeniz ikliminin göstergesi olan defnenin anavatanı Akdeniz Havzası, Anadolu ve Balkanlar'dır. Başta Türkiye olmak üzere Yunanistan, Yugoslavya, Romanya, İtalya, Fas, İspanya, Portekiz, Fransa, Libya'nın doğu sahili, Suriye, Cezayir, Kaliforniya, Akdeniz Adaları, Meksika, Kırım ve Kanarya adalarında yayılış gösterirken, Rusya'nın Karadeniz kıyıları, Gürcistan ve İsrail'de ise kültüre alınarak yetiştirilmektedir (Kavaklı 2012).

Defne bitkisi yurdumuzun Doğu Karadeniz bölümünden İskenderun kıyılarına kadar uzanmaktadır (Şekil 1.5). Ege ve Akdeniz bölgelerinde subtropik iklimin etkinlik gösterdiği iç kesimlere kadar uzanış göstermektedir. Birçok bölgede 600-800 m yükseklikte bile yetiştirme imkanı bulunmaktadır. Akdeniz defne'si Karadeniz Bölgesi'nde; Trabzon'dan Karadeniz Ereğlisi'ne uzanan ormanlarda görülürken, Marmara Bölgesi'nde İstanbul, Bursa ve Balıkesir şehirlerinde bulunan ormanlık alanlarda etkinliğini göstermektedir. Ege Bölgesi'nde İzmir, Manisa, Muğla ve Aydın yörelerinde, Akdeniz Bölgesi'nde Antalya, Adana, Mersin, Tarsus, Silifke, Kahramanmaraş, Antakya ve İskenderun gibi önemli birçok noktalarda kendisine yetiştirme alanı bulmuştur (Erden 2005).



Şekil 1.5. Defne bitkisinin Türkiye’deki doğal yayılış alanları (Anonim 2016)

#### 1.4. Defne Bitkisinin Ekolojisi

Bütün bitkilerin olduğu gibi defne bitkisinin de doğal yayılışında etkili olan önemli etmenler toprak, hava ve nemdir (Baytöre 2014). Akdeniz Defne’si tipik Akdeniz ikliminin etki gösterdiği kışları ılıman, yazları sıcak olan yerleri sevmektedir (Anonim 2016). Nem bakımından yeterli akarsu kenarlarını, taban suyu seviyesini yüksek ve denizden gelen nemli rüzgarları alan yerleri tercih etmektedir. Kireçli, humuslu ve serin topraklarda daha iyi yetişme imkanı bulurken, besin elementlerini topraktan alabilmesi için gerekli olan pH isteği 6,70– 7,96 arasındadır. Defne’nin yetişme alanlarındaki toprakların hepsi tuzsuzdur. Toprakta tuzluluk bulunması halinde ise, bu oran ortalama 0,21 mmhos/cm geçmemelidir (Baytöre 2014).

Yetiştirme bölgelerinde ortalama sıcaklığın sıfırın altına düştüğü pek görülmez ve bu alanlarda yıllık yağış miktarı 600–2000 mm. arasında düşmektedir. Yaralanma ve rejenerasyon özelliklerinin yanı sıra, hava kirliliğine göstermiş olduğu olumlu tepkiler de oldukça yüksektir (Anonim 2016).

### **1.5. Defne Bitkisinin Tıbbi ve Aromatik Özellikleri**

Defne yaprağı başta genetik faktör olmak üzere sürgünlerin olgunlaşma süresi, hasat zamanı ve yetiştirildiği bölge gibi etmenlerle beraber %0,20 ile %2,51 oranında uçucu yağ içermektedir. Uçucu yağ içeriğinde bulunan 1,8-sineol (okaliptol), sabinen,  $\alpha$ -terpinil asetat, eigenol,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen gibi kimyasal maddeler kalitesini belirleyen en önemli etmenlerdir. Yaprığın bileşiminde %1-4 arasında uçucu yağ, tanen ve acı maddeler bulunmaktadır (Gölükçü ve ark. 2015).

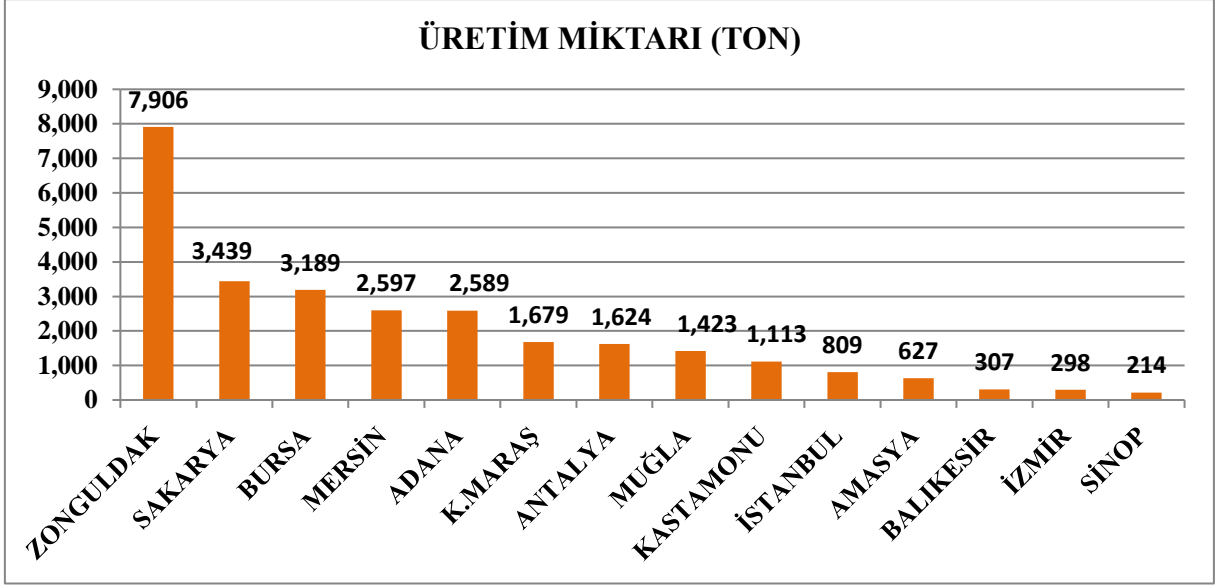
Defne ağacının yaprakları kadar meyveleri de önemli bileşenler içermektedir. Meyvelerin içeriğinde bulunan bu bileşenlerden en önemlisi de sabit yağdır. Sabit yağ olarak ifade edilen bu yağ, defne meyvelerinden klasik yöntemlerle çıkarılan %95 yağ asitlerinden ve %5 esansiyel yağlardan oluşan 30 °C 'de eriyen bir yağdır (Uyar 2014).

### **1.6. Defne Bitkisinin Ticari Önemi**

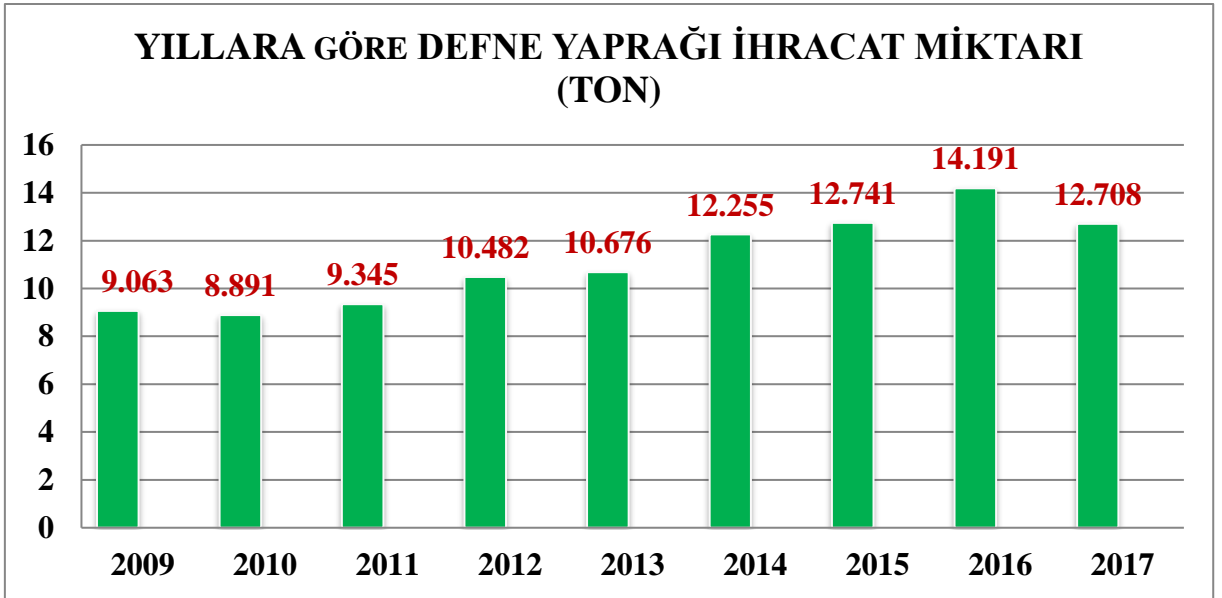
Türkiye defne pazar hacminin %85'ine hakim olup; kalite, fiyat ve miktar yönünden dünyada önemli bir konuma sahiptir. Gerçekleştirilen bir araştırmada 132,000 ha alandan yıllık 12,201,326 ton defne üretiminin yapıldığı bildirilmiştir (Bilgin ve ark. 2006).

Akdeniz defne'si orman bitkisi olduğu için kesim alanları ve kesim miktarları ile ilgili düzenlemeler her sene Orman Genel Müdürlüğü (OGM) tarafından belirlenerek aynı lokasyonlarda 3 yılda bir kesim yapılmasına izin verilmektedir. İç ve dış pazarda satılan defne yaprağının tamamı kesimi yapılan bu bölgelerden sağlanmaktadır (Karık ve ark. 2016). Şekil 1.6 'da görüldüğü gibi 2017 yılında belli bölgelerde doğadan toplanan defne yaprağının üretim miktarı verilmiştir. En fazla defne yaprağı üretimi 7,906 bin tonla Zonguldak'tan elde edilerek 632,552,0 TL gelir elde edilmiştir. En az üretim 214 kg defne yaprağı ile Sinop'tan toplanmış ve 21,146,0 TL gelir sağlanmıştır (Başer ve ark. 2018).

Gıda sektörü, kozmetik ve parfüm sanayisi için önemli olan Akdeniz defne'si birçok ülkeye Türkiye'den gönderilmektedir. Türkiye'nin önde gelen defne yaprağı ihracat pazarı Vietnam olup bunu ABD, Polonya, Japonya ve Brezilya takip etmektedir. 2017 yılı baharat grubu ihracatında 12,700 ton defne yaprağı satışıyla 36 milyon dolar üstünde gelir elde edilmiştir (Şekil 1.7). Gerçekleşen ihracatın 6,711 tonu Vietnam'a, 753 tonu ise ABD'ye yapılmıştır (Başer ve ark. 2018).



Şekil 1.6. Türkiye'de 2017 yılı itibariyle bölge bazında defne yaprağı üretim miktarı (Başer ve ark. 2018).



Şekil 1.7. Yıllara göre defne yaprağı ihracat miktarı (ton) (Anonim 2016), (Başer ve ark. 2018).

### 1.7. Defne Bitkisinin Kullanım Alanları

Akdeniz Defne'sinin yaprağından ve meyvesinden farklı şekillerde yararlanılmaktadır. Defne yaprağının ağrı kesici, halsizlik, hazımsızlık ve uykusuzluğu giderici, terletici, bakteri öldürücü, regl döngüsünü düzenleyici ve antiromatizmal özellikleri bulunmaktadır. Yapraklar sucuk ve etlerin tatlandırılmasında, pasta, şekerleme, çorbalar ve uçucu yağın yapısında bulunan okaliptol ve ojenolün maddelerinin konservan özelliği sayesinde konservecilik alanında kullanılmaktadır. Yapraklardan elde edilen uçucu yağ kozmetik ve ilaç sektöründe kullanılırken, meyvelerden elde edilen sabit yağ ise başta sabun üretimi olmak üzere kimya, kozmetik, içki, ilaç ve gıda sanayisinde yüksek oranda talep edilmektedir (Şekil 1.8). Bunların yanı sıra dekoratif özellikleri nedeniyle park ve bahçelerde peyzaj bitkisi ve çit materyali olarak da kullanılmaktadır (Güler ve Başaran 2013).



Şekil1.8. Akdeniz defne'sinin kullanım alanları (Anonim 2016) (Başer ve ark. 2018)

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Odunsu Bitkilerde Yapılan Çimlendirme Çalışmaları

Pırlak (1997) Kızılcık ağacı (*Cornus mas*) tohumlarında yapmış olduğu çalışmada çimlenmede bazı ön uygulamaların etkilerini araştırmıştır. Tohumlara +4 °C 'de soğuk uygulama, 80-100 °C 'de 30 dk sıcak su uygulama ve sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ile aşındırma işlemleri uygulamıştır. Uygulamalar sonucunda elde edilen bulgulara göre, çimlenme oranı %25,61 iken, sıcak su uygulamasında %22,08 olmuştur.

Tilki (2005) çalışmasında Dişbudak (*Fraxinus ornus*) tohumlarında bulunan çimlenme engelinin kaldırılması amacıyla tohumlara farklı sürelerde +4 °C 'de soğuk uygulaması ve +20 °C 'de ise sıcak uygulaması yapmıştır. Yapılan uygulama sonucunda en iyi çimlenme %55 oranında sıcak uygulaması yapılan tohumlarda görülmüştür. Soğuk uygulaması yapılan tohumlarda ise çimlenme gözlenmemiştir.

Çetinbaş ve Koyuncu (2005) tarafından Kuş Kirazı (*Prunus avium* L.) tohumlarında yapılan bu çalışmada tohumlara farklı sürelerde sıcak uygulaması yapılmış ve tohumlar kabuklu ve kabuksuz olarak çimlendirme ortamına alınmıştır. Yapılan uygulama sonucunda kabuksuz tohumların daha iyi bir çimlenme gösterdiği ve sıcaklık süresi ile tohum çimlenmesinin birbiriyle ilişkili olduğu ortaya konulmuştur.

Chaturani ve ark. (2006) tarafından Kırmızı Sandal (*Santalum album*) ağacında yapılan çalışmada depolama süresinin tohum çimlenmesi üzerindeki etkisini araştırmak için tohumlar farklı sürelerde 28 °C 'ye bırakılmıştır. Depolama süresi sonunda tohumlar MS ve WPM ortamlarında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda depolama süresinin tohum çimlenmesi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Hasattan bir hafta sonra çimlenmeye alınan tohumlarda %96 oranında bir çimlenme görülmüş ve çimlenme süresi ise 6 gün sürmüştür.

Germana ve ark. (2006)'nın farklı zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinde yaptıkları çalışmada endokarp olmadan zeytin tohumlarının *in vitro* ortamda çimlendirilmesini hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda iki yıl içerisinde 4 uygulama yapılmıştır. Bir kısım endokarpı olmayan tohumlar 1 hafta 4°C 'de, diğer kısım tohumlar ise 1 yıl boyunca 4 °C 'de saklanmıştır. Yapılan uygulama sonunda 1 hafta 4 °C 'de saklanan endokarpı çıkarılmış tohumlarda yüksek miktarda çimlenme gözlenmiştir. Biancolilla zeytin çeşidi her iki yılda olmak üzere birincisinde %54,6 ve ikincisinde ise %48,2 yüksek çimlenme oranı göstermiştir.



Erkmen (2009) Tatar Akçağaç (*Acer tataricum* L.) tohumlarında yaptığı çalışmada soğuk uygulamasının bin dane ağırlığı ve çimlenme süresine olan etkisini araştırmıştır. Tohumlara 120 gün boyunca uygulanan soğuk uygulaması sonucunda tohumların yüksek çimlenme gösterdiği ortaya konmuştur. Tohumlarda görülen en yüksek çimlenme oranı %73 olmuştur.

Ribeiro ve ark. (2009) tarafında Brezilya kökenli *Annona crassiflora* bitki tohumlarında yapılan çalışmada GA<sub>3</sub> (Giberlik Asit) ve NAA (Naftalin Asetik Asit) uygulamasının *in vitro* tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Tohumlar GA<sub>3</sub> ve NAA içeren MS ortamında çimlenmeye alınmıştır. 30 gün kültür ortamında kalan tohumlardan üstün nitelikli fideler elde edilmiştir. Ortamda çimlendirilen tohumlardan elde edilen fideler WPM (Woody Plant Medium) ortamına aktarılmıştır.

Warakagoda ve Subasinghe (2014)'nin çalışmasındaki amaç nesli tükenmekte olan *Coscinium fenestratum* bitkisine ait tohumların *in vitro* çimlendirilmesidir. Bitki tohumları çimlenme öncesinde HgCl ile steril edildikten sonra tohumda bulunan durgunluğu gidermek için GA<sub>3</sub> solüsyonunda 24 saat bekletilmiştir. Ön işleme tabi tutulan tohumlar MS ortamına alınmıştır. Tohumlarda %80 oranında yüksek bir çimlenme başarısı sağlanmıştır.

Jaafar ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada *in vitro* kültür ortamlarına ananas (*Ananas comosus*), papaya (*Carica papaya*) ve muz (*Musa paradisiaca*) gibi organik katkı maddeleri ilavesinin *Lycium barbarum* (Kurt üzümü) ve *Aquilaria maloccensis lamk.* tohumlarında çimlenme ve rejenerasyon başarısı incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda ortamlara eklenen fermente meyve atığı çözeltilerinin *in vitro* ortamda tohum çimlenmesi üzerine göstermiş olduğu etki önemli bulunmuştur.

Prudente ve ark. (2016) çalışmasında bozulmuş ekosistemlerin iyileştirilmesinde önem taşıyan *Paineira rosa* bitkisine ait tohumların *in vitro* ortamda çimlendirilmesi için, MS ve WPM kültür ortamlarında sukrozun (0 gr/l, 15gr/l, 30gr/l) ve PH (4,8, 5,8, 6,8)'ın 3 farklı konsantrasyonu test etmiştir. Bitkiye ait tohumlar WPM ortamında %84 oranında bir çimlenme oranı göstermiştir. En iyi çimlenme 15 gr/l sukroz konsantrasyonunda %79 ile sağlanırken, %82 çimlenme oranıyla pH'ın 5,8 olduğu aralıkta görülmüştür.

## 2.2. Odunsu Bitkilerde Yapılan Mikroçoğaltım Çalışmaları

Panda ve Hazra (2010) *Semecarpus anacardium* (Anacardiaceae) bitkisinde sürgün çoğaltımı için sürgün meristemini eksplant olarak kullanmış ve eksplantlar 4,44 µM BAP (6-benzil amino purin) ve 4,64 µM kinetin (KN) içeren ½ WPM besin ortamına alınmıştır. Çoğaltım ortamından elde edilen sürgünler 2,46 µM IBA (indol bütirik asit) içeren sıvı ½ WPM besin ortamında köklendirilmiştir. Köklenen sürgünlerin dış ortama aktarılmasında %91 oranında hayatta kalma başarısı elde edilmiştir.

Boudabous ve ark. (2010) tarafından yapılan bu çalışmada 1 mg/L BAP ve 0,1 mg/L IBA içeren MS besin ortamı kullanılarak *Malus domestica* L. çeşidine ait boğum eksplantlarının *in vitro* çoğaltımı yapılmıştır. Alınan eksplantlardan yüksek sürgün oluşumu (%85) ve sürgün farklılaşması gözlenmiştir. En iyi sürgün çoğaltımı 1 mg/L ile 2 mg/L BAP konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamında gerçekleşmiştir. Sürgünler 2 mg/L ile 3 mg/L IBA ve aktif kömürle zenginleştirilmiş ½ MS besin ortamında (%66,7) köklendirilmiştir. Köklendirilen sürgünler toprağa aktarılmış ve %60 oranında hayatta kalma başarısı gözlenmiştir.

Toosi ve Dilmagani (2010) İran cevizi (*Juglans regia* L.)'nde yaptıkları embriyo kültürü çalışmasının ilk aşamasında bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) içermeyen MS, DKW (Driver Kuniyuki Medium), NGE (Lloyd and Mccown Medium) ve WPM besin ortamlarını denemişlerdir. Embriyo gelişiminde en iyi besin ortamı belirlemesi yapıldıktan sonra, sürgün çoğaltımı için BAP (0, 0,1, 0,5, 1, 2 mg/ L) ve IBA (0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5 mg/ L)'nin beş farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. En fazla kök ve sürgün oluşumu 0,5 mg/L BAP ve 0 mg/L IBA konsantrasyonlarını içeren NGE (% 61,1) besin ortamından sağlanmıştır.

Bu çalışmada Khan ve BıBı (2012) Hurma (cv. Dhakki) bitkisinde yaptıkları sürgün çoğaltım çalışmasında sürgün eksplantlarını 1 mg/L NAA (naftalin asetik asit), 3 mg /L 2-iP (2-izopenteniladenin) ve 3 mg/L BAP içeren besin ortamında kültüre almıştır. Optimum uzunlukta ve sayıda sürgün elde etmek için 0,5 mg/L BAP, 0,5 mg/L kinetin ve 1 mg/L NAA içeren besin ortamlarının en iyi olduğu belirlenmiştir. 6-8 cm uzunluktaki sürgünler 0,1 mg/L ve 0,5 mg/L NAA içeren ortamlarda köklendirilmeye alınmıştır. Köklenen bitki sayısı (11,82) en fazla 1,5 mg/L NAA içeren ortamından elde edilirken, dış ortama alıştırma başarısında %82 oranıyla en iyi sonuç 0,5 mg/L NAA içeren besin ortamından alınmıştır.

Kılınç (2013) Sakız ağacı (*P. lentiscus* L.)'nda yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında dört genotipine ait sürgün uçlarını eksplant olarak kullanmıştır. En fazla sürgün sayısı 1 mg/L BA (6-Benzilamino) içeren ½ ve ¼ oranındaki MS besin ortamında elde edilirken, en düşük sürgün sayısı ise WPM besin ortamında görülmüştür. Mikro sürgünlerin köklendirilmesinde IBA'nın yüksek konsantrasyonlarında %94 oranında başarı sağlanmıştır. Sürgünlerin dış koşullara aktarılmasında ise, %95 oranında başarı elde edilmiştir.

Mazri ve Meziani (2013) Hurma (*Phoenix dactylifera* L.) bitkisinde yaptıkları çalışmada sürgün ucu eksplantlarını kullanarak sürgün çoğaltımı için farklı konsantrasyonlarda 0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L NOAA (naftoksi asetik asit) ve Kinetin içeren tam, ½ ve ⅓ oranında BM (Beauchesne) ve MS besin ortamı kullanmıştır. Sürgün çoğaltımında en iyi ortam 0,5 mg/L NOAA ve 0,5 mg/L Kinetin içeren yarım MS ortamından sağlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi bulunmayan kültürlerde sürgünler kısa iken; yapraklar daha geniş ve yeşil, köklenme ise çok az görülmüştür. Bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ortamdaki sürgünler %90 oranında dış koşullara aktarılmada başarılı olurken, bitki büyüme düzenleyici bulunan ortamdaki bitkilerin hayatta kalma oranı düşük olmuştur.

Yaprak eksplantından stabil ve verimli bir *in vitro* rejenerasyon sisteminin kurulmasında şeftalinin genetik başarısının temel olduğunu söyleyen San ve ark. (2015) bu çalışmada, "Guardian" şeftali çeşidinin yaprak eksplantlarını TDZ (thidiazuron) ve STS (gümüş tiyosülfat)' nin farklı konsantrasyonlarını içeren ½ MS besin ortamına almıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu 6,81uM TDZ+ 10 uM STS ve 9,08 uM TDZ + 10 uM STS içeren ½ MS besin ortamından alınmıştır. Sürgün köklenmesi %85-%100 arasında kullanılan bitki büyüme düzenleyicilere göre farklılık göstermiştir. 1 mg/L IBA içeren ½ MS besin ortamında sürgün başına 7 kök elde edilmiş ve aklimatizasyonda %92 oranında başarılı olunmuştur.

Rathwell ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada olgun ağaçlardan ve seradan topladıkları taze ve dormant haldeki tomurcukları sürgün çoğaltımında eksplant olarak kullanmıştır. Sürgün çoğaltımında MS ve DKW ortamından benzer sonuç alınırken, WPM ortamından düşük sonuçlar alınmıştır. Sürgünler 20 µM IBA içeren ½ DKW besin ortamında %80 oranında başarılı bir köklenme göstermiştir. Köklenen sürgünler %37 başarı oranıyla dış koşullara aktarılmıştır.

Sezgin ve Dumanoglu (2016) yaptığı çalışmada Avrupa kestanesi (*Castanea sativa* Mill.)'nin Hacıbiş ve Karamehmet çeşitlerinin erken olgunlaşan ve olgunlaşmamış kotiledonlarını eksplant olarak kullanılarak somatik embriyo üretimi ve rejenerasyonunu hedeflemiştir. Denemeler sonucunda Hacıbiş çeşidinde somatik embriyogenez oranı %9,9 (BA+TDZ+IBA) iken, Karamehmet çeşidinde %11,1 (BA+KIN+IBA) olarak bulunmuştur. En yüksek köklenme (%22) 0,1 mg/L BA+ 0,1 mg/L NAA konsantrasyonundan elde edilmiştir.

Thakur (2018) yaptığı araştırmayla eriklerin (*Prunus salicina* L.) *in vitro* ortamda çoğaltılması için tomurcuk eksplantlarını kullanmıştır. En yüksek sürgün çoğaltımı 0,5 mg/L BA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. En iyi köklenme dokuzuncu alt kültürden sonra gerçekleşirken (%70), en yüksek köklenme tek adımlı 0,5 mg/L IBA içeren ½ MS besin ortamında ve iki adımlı köklendirme prosedürü kapsamında 48 saatlik karanlıktan sonra 0,5 mg/L IBA içeren MS besin ortamında görülmüştür.

Rohela ve ark. (2018) tarafından ılıman ortamda yetişen bir dut çeşidi olan PPR-1'in *in vitro* çoğaltımında eksplant olarak boğumların kullanıldığı bir protokol geliştirilmiştir. Boğum eksplantları sitokin eklenen ortamlarda standart kültür ortamlarına göre daha fazla aksiller tomurcuk sağlanmıştır. En iyi sürgün uzunluğu ( $7,2 \pm 0,61$  cm) ve eksplant başına maksimum yaprak sayısı ( $8,1 \pm 0,85$ ) 1,5 mg/L BAP ve 2 mg/L Kinetin içeren besin ortamından elde edilmiştir. Çoğaltılmış sürgünler 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamına aktarılmış ve %100 oranında iyi bir köklenme sağlanmıştır. Dış ortama aktarılan bitkilerin hayatta kalma oranı %70 ile başarılı olmuştur.

Kaur (2018) çalışmasında Yabani limon (*Citrus jambhiri* Lush.) çeşidinde embriyojenik kallus indüksiyonu ve rejenerasyonu sağlamak için *in vitro* ortamda geliştirilen fidelerden aldığı epikotil eksplantlarını kullanmıştır. 1 mg/L 2,4-D (diklorofenoksi asit) + 1 mg/L BAP içeren MS besin ortamında somatik embriyodan yüksek kallus oluşumu sağlanmıştır. Rejenerasyon ortamları arasından, geçen gün sayısı, yüksek sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından 0,5 mg/L NAA, 3 mg/L BAP ve 1mg/L Kinetin içeren MS besin ortamı daha etkili olmuştur. Sürgünler 1 mg/L NAA ve 1 mg/L IBA içeren MS besin ortamında köklendirilmiştir. Aklimatizasyonda %96,45 oranında başarı sağlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada kullanılan  $2n=48$  kromozom sayısına sahip Akdeniz Defnesi'nin (*Laurus nobilis* L.) tohumları Çanakkale ve Tekirdağ illerinde doğal yayılış gösteren defne ağaçlarından toplanmıştır.

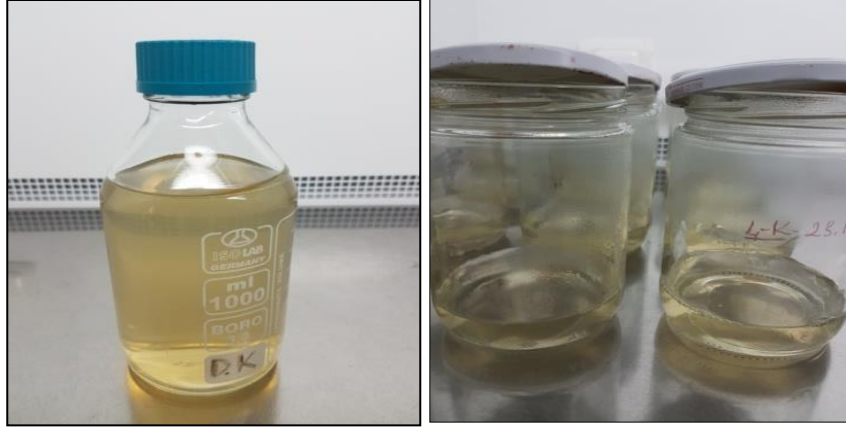
#### 3.1.2. Bitkisel Materyalin Eldesi ve Saklama Koşulları

Çanakkale ve Tekirdağ'dan toplanan tohumlar tohum sterilizasyonu öncesinde oda sıcaklığında filtre kağıdı üzerinde bekletilerek kurutulmuştur. Nemini çeken ve kuruyan tohumlar defne tohumuna ait dormansiyi ortadan kaldırmak ve tohum çimlenmesindeki başarıyı artırmak amacıyla 4 hafta süresince  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. *In vitro* Tohum Çimlendirmede Besin Ortamı ve Kültür Koşulları

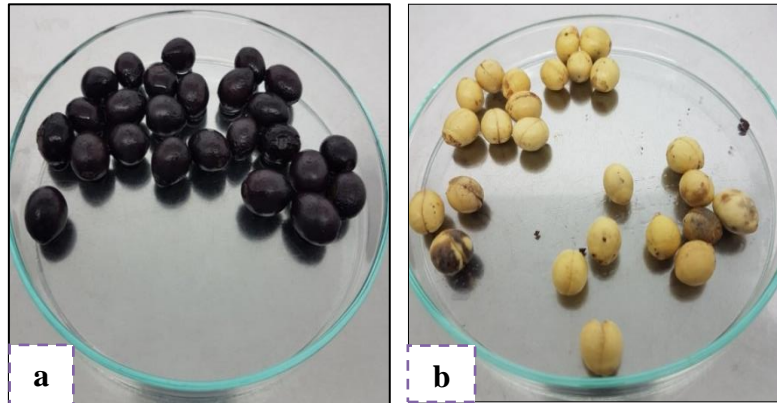
Yapılan çalışmada, *in vitro* tohum çimlendirme çalışmalarında mineral tuzları ve vitaminlerini içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamının hazırlanmasında 1 lt saf su içerisine hassas terazide tartılmış 30 gr/L sukroz eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra içerisine 4,4 gr/L MS eklenmiştir. Hazırlanan besin ortamının pH'ı 1N NaOH veya HCl kullanılarak 5,6-5,8'e ayarlandıktan sonra cam şişelere dolduruldukları üzerine 6,5 gr/L Plant Agar eklenerek  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1,2 atm basınçta 20 dk boyunca otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuştur. Otoklavdan çıkarılan ortamlar cam kavanozlara ve tüplere dökülerek, donma işlemi gerçekleştirildikten sonra etiketleme işlemi yapılmıştır (Şekil 3.1).



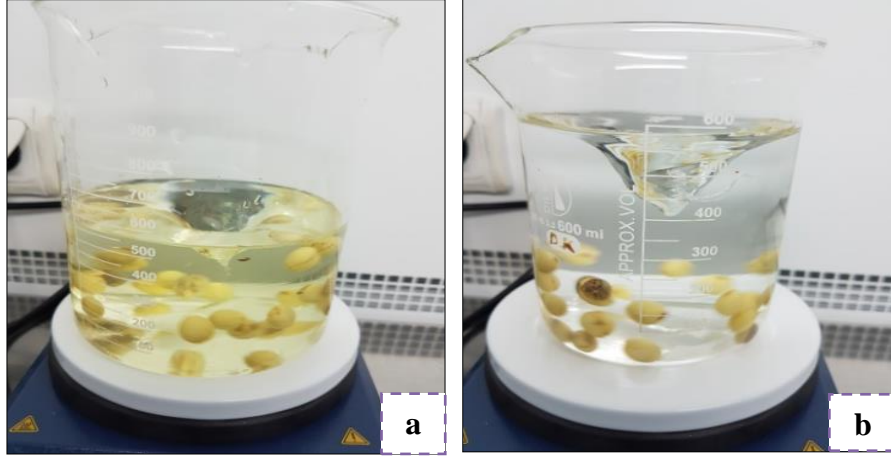
**Şekil 3.1.** Tohum çimlendirme ortamının hazırlanması

### 3.2.2. Defne Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu

Toplanan defne tohumları buzdolabında +4 °C 'de 4 hafta boyunca bekletildikten sonra sterilizasyon denemelerine başlanmıştır. Tohumlar sterilizasyon aşamasında ilk olarak 2 gün önceden su içerisinde konularak yüzeyinde bulunan yabancı maddelerin yıkanması sağlanmıştır. 2 gün sonra su içerisinde alınan tohumlar 2-3 damla tween 20 ile yıkandıktan sonra %50 Actijen (Aktif Klor 0,015 su bazlı, bakteri, virüs içeren yüzeyleri temizlemede kullanılan özel temizlik solüsyonu) (püskürtme şeklinde) solüsyonuyla yıkanmış ve 60 dakika boyunca akan musluk suyu altında bekletilerek durulanmıştır. Yıkanan tohumlar kabuklu ve kabuksuz (Şekil 3.2a,b) olmak üzere steril kabin içerisinde (%20, %40, %60, %80, %100) Sodyum Hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 5, 10 ve 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Daha sonra 3 x 5 dakika süreyle saf suda yıkanmış (Daneshvar vd. 2014) ve tohumlar *in vitro* koşullarda çimlendirme için hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.3a,b). Denemeler cam kavanozlarda 3 tekrürlü olarak yapılmış ve her tekrürde 1 tohum kullanılmıştır.



**Şekil 3.2.** a; kabuklu defne tohumlarının sterilizasyonu, b; kabuksuz defne tohumlarının sterilizasyonu



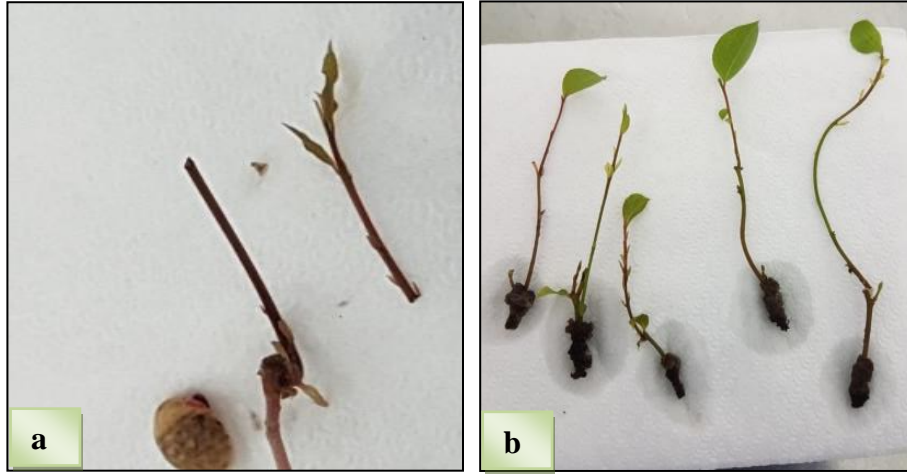
**Şekil 3.3.** a; tohumların (%20, %40, %60, %80, %100) NaOCl çözeltisinde sterilizasyonu, b; tohumların steril saf su içerisinde yıkanması)

### 3.2.3. Defne Tohumlarının *in vitro* Çimlendirme Ortamına Alınması

Sterilizasyon işleminden sonra 100 adet tohum çimlendirilmek üzere steril kabin içerisinde kabuklu (endokarplı) ve kabukları tamamen çıkartılmış (endokarpsız) olarak 0 MS (4,4 gr/L MS + 30 gr/L Sukroz + 7 gr/L Plant Agar) besin ortamına alınmıştır. Çimlendirme çalışmaları cam kavanozlarda 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 1 tohum kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çimlenme ortamına alınan tohumlar  $24\pm 1$  °C 'de ve 16 / 8 saat ışık fotoperiyodunda iklim dolabında bırakılmış ve çalışmalar başlatılmıştır.

### 3.2.4. Çimlenen Tohumlardan Gelişen Tepe ve Yan Sürgünlerin Kesilerek Ayrılması

İlk aşamada kabuksuz defne tohumları 0 MS ortamında çimlendirilmiştir. Gelişen tepe sürgünler (ilk sürgün) kesilerek ayrılmış ve köklenme ortamına alınmıştır (Şekil 3.4a,b). Tepe sürgünü kesilmiş çimlenen tohumlar 0 MS besin ortamında alt kültüre alınarak yan sürgünlerin gelişmesi sağlanmıştır. İkinci aşamada gelişen yan sürgünler ayrılarak köklendirme ortamına alınmıştır.



**Şekil 3.4.** a) Çimlenen defne tohumundan kesilerek ayrılan tepe sürgünler b) Çimlenen defne tohumundan kesilerek ayrılan yan sürgünler

### 3.2.5. Tepe ve Yan Sürgünlerin Köklendirilmesi

Defne tohumlarından gelişen tepe ve yan sürgünler kesilerek farklı dönemlerde IBA'nın farklı konsantrasyonlarını (0 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L) içeren MS ve WPM besin ortamlarına aktarılmıştır.

### 3.2.6. Köklü Sürgünlerin Dış Ortama Aktarılması

Çimlenen defne tohumlarından gelişen sürgünlerin kesilen tepe ve yan sürgünleri IBA'nın farklı konsantrasyonlarını (0 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L) içeren MS ve WPM besin ortamlarında köklendirilmiştir. 5-10 cm uzunluğunda gelişen köklü sürgünler, musluk suyu ile yaprak ve köklere zarar gelmeyecek şekilde yıkanarakkağıt bardaklarda bulunan steril edilmiş torf-perlit (1:1) karışımınaaktarılmış ve bitkilerin üzeri beyaz şeffaf poşetle sarılarak  $+24\pm 1$  °C sıcaklık ve %50 nem içeren iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. İkinci hafta poşet üzerinde delikler açılarak kademeli olarak nem oranı düşürülmüştür. Poşetler çıkarıldıktan sonra bitkileriklim odasında büyümeye bırakılmış ve bitkiler dış koşullara alıştırmıştır. İklim odasında büyümeye bırakılan bitkilere ayda bir kez sıvı gübre takviyesi yapılmıştır.

### 3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Çimlendirme ve köklendirme denemeleri 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiki değerlendirilme bilgisayarda SPSS ver. 22 istatistik programında One-Way Anova post hoc.testlerinden Duncan testi ile yapılmıştır (Snedecor ve Cochran 1967).



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Defne Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu

*In vitro* bitki doku kültürü çalışmalarında yüzey sterilizasyon çalışmalarındaki amaç eksplantlara en az zararı veren, kontaminasyonu önleyici etki gösteren ve minimum seviyede kullanımı hedeflenen dezenfektanların miktarının belirlenmesidir. Defne tohumlarının sterilizasyon çalışmalarında sterilizasyon sürecinde tohumlar ilk olarak olarak 2 gün önceden su içerisine konularak yüzeyinde bulunan yabancı maddelerin yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra su içerisinden alınan tohumlar 2-3 damla tween 20 ile yıkanarak yüzeyleri temizlenmiştir. Sonraki aşamada tohumlara 1 veya 2 defa püskürtme şeklinde %50 actijen uygulanmış ve tohumlar yaklaşık 60 dakika boyunca akan musluk suyu altında yıkanmıştır. Tamamen yıkanan tohumlar steril kabin içinde kabuklu ve kabuksuz olmak üzere (%20, %40, %60, %80 ve %100) NaOCl konsantrasyonlarında 5, 10 ve 15 dakika gibi farklı sürelerde steril edilerek 3 x 5 dakika süre ile steril saf suda durulanmıştır (Daneshvar vd. 2014). Tohumların sterilizasyon çalışmalarından yapılan denemelere göre, 5 ve 10 dakikalık sterilizasyon süreleri tohumların sterilizasyonu için yeterli olmamıştır. Sterilizasyon çalışması sonrası besin ortamında çimlenmeye alınan tohumlarda 3 günlük süre içinde tohum etrafında özellikle bakteri ve fungus gelişimi görülmüştür. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda uygulanan NaOCl çözeltisinde sterilizasyon süresi 15 dakikaya çıkarılarak kontamine tohum sayısı düşürülmüştür. Defne tohumları için uygun sterilizasyon süresi belirlemesi yapıldıktan sonra tohumların 0 MS ortamında çimlenme yüzdesine bakılmıştır. Steril edilen tohumlar kabuklu ve kabuksuz olarak her kavanozda 1 tohum olacak şekilde ve her uygulama toplam 20 tohum *in vitro* çimlendirme için kullanılmıştır.

#### 4.1.1. Kabuklu Tohumlarda Sterilizasyon

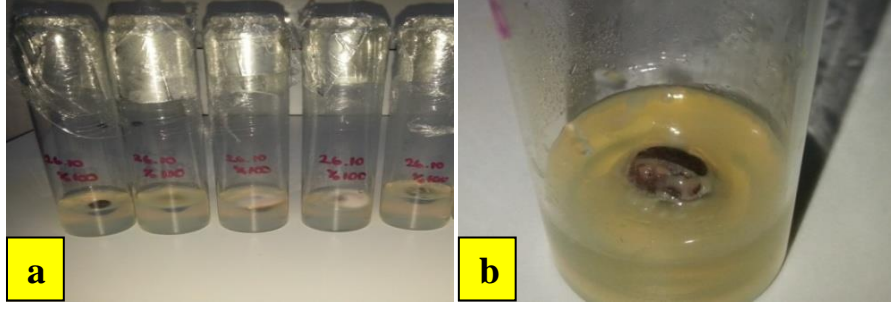
Kabuklu defne tohumlarının sterilizasyonu için öncelikle tohumların yüzeyine %50 actijen uygulaması (püskürtme şeklinde) yapıldıktan sonra 60 dakika boyunca saf suda bekletilmiştir. Tohumlar saf suda bekletildikten sonra kabin içinde farklı konsantrasyonlarda (%20, %40, %60, %80 ve %100) NaOCl çözeltisinde 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla sterilizasyona tabii tutulmuştur. Ardından 3x5 dk boyunca otoklavlanmış steril saf suda durulanmış ve *in vitro* çimlendirme için 0 MS ortamına alınmıştır. Deneme sonunda elde edilen verilere göre NaOCl konsantrasyonları kontaminasyon üzerinde 0,01 düzeyinde farklılık göstermiştir. Farklı NaOCl konsantrasyonlarında kabuklu defne tohumlarının

kontaminasyon ve çimlenme üzerindeki etkilerini belirlemek için Duncan testi sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Farklı NaOCl konsantrasyonlarının kabuklu defne tohumlarının kontaminasyonu ve çimlenmesi üzerine etkisi

Uygulama no.	NaOCl konsantrasyon (%)	Kontamine Tohum Sayısı ve Yüzdesi (%)		Çimlenen Tohum Sayısı ve Yüzdesi (%)	
		Sayı	%	Sayı	%
1	%100	6 a	33.4	0	0
2	%80	9 ba	39.2	0	0
3	%60	10 ba	45.0	0	0
4	%40	12 b	50.8	0	0
5	%20	20 c	90.0	0	0

Farklı harflerle yazılan ortalamalar arasında Duncan testine göre 0,01 düzeyinde fark vardır. Deneme sonuçları kontaminasyon ve çimlenme oranı olarak Çizelge 4.1'de verilmiştir. Kabuklu defne tohumları sterilizasyon işleminden sonra kavanozlarda bulunan 0 MS besin ortamına ekilerek 21°C 'de 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyotta iklim kabiniinde çimlenmeye bırakılmıştır. Kabuklu tohumlarda yapılan sterilizasyon çalışması sonucunda kontaminasyon oranı %34,4-%90 arasında belirlenmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En düşük kontaminasyon %34,4 oranında %100 NaOCl konsantrasyonunda yapılan denemelerden elde edilmiştir. En yüksek kontaminasyon ise, %90 oranında %20 NaOCl konsantrasyonunda yapılan denemelerden elde edilmiştir. Kabuklu tohumlara uygulanan NaOCl konsantrasyonlarının hiç birinde çimlenme görülmemiştir (Çizelge 4.1) (Şekil 4.1a,b).



**Şekil 4.1.** Kabuklu defne tohumlarında a; çimlenme, b; kontaminasyon durumu

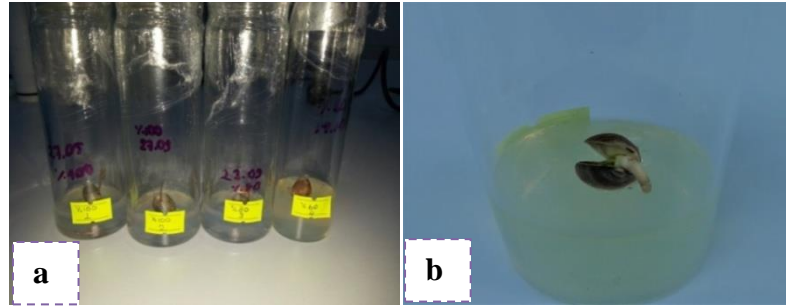
#### 4.1.2. Kabuğu Soyulmuş Tohumlarda Sterilizasyon

Sterilizasyon için defne tohumları öncelikle 2-3 damla tween 20 ile yıkanmış ve 1 ve ya 2 defa püskürtme şeklinde yapılan %50 actijen uygulamasından sonra 60 dakika boyunca akan musluk suyu altında durulanmıştır. Tamamen yıkanan tohumlar steril kabin içerisine alınmış ve dış kabuklar tohumdan tamamen uzaklaştırılmıştır. Kabukları soyulan tohumlar (%20, %40, %60, %80 ve %100) NaOCl çözeltisinde 15 dakika süreyle manyetik karıştırıcı yardımıyla sterilizasyonu yapılmıştır. Ardından tohumlar 3x5 dk steril saf suda durulanmış ve çimlendirme için 0 MS ortamına alınarak 21°C 'de 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyotta iklim kabininde *in vitro* çimlenmeye bırakılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda NaOCl konsantrasyonları kontaminasyon ve çimlenme üzerinde 0,01 düzeyinde farklılık göstermiştir. Farklı NaOCl konsantrasyonlarında kabuksuz defne tohumlarının kontaminasyon ve çimlenme üzerindeki etkilerini belirlemek için Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Farklı NaOCl konsantrasyonlarının kabuksuz defne tohumları üzerine kontaminasyon ve çimlenme etkisi

Uygulama No.	NaOCl Konsantrasyon Yüzdesi (%)	Kontamine Tohum Sayısı ve Yüzdesi (%)		Çimlenen Tohum Sayısı ve Yüzdesi (%)	
		Sayı	%	Sayı	%
1	%100	5 b	30.0	3 c	22.8
2	%80	2 ba	18.4	18 a	71.6
3	%60	0 a	0	16 a	63.4
4	%40	5 b	30.0	10 b	45.0
5	%20	19 c	77.1	1 c	12.9

Farklı harflerle yazılan ortalamalar arasında fark Duncan testine göre 0,01 düzeyinde fark bulunmaktadır. Kabuğu soyulmuş tohumlarda kontaminasyon oranı %0-%77,1 arasında farklılık göstermiştir. %60 NaOCl konsantrasyonunda yapılan sterilizasyon denemelerinde kontaminasyona rastlanmazken, en yüksek kontaminasyon %90' lık bir oranla %20 NaOCl konsantrasyonunda görülmüştür. %80 NaOCl konsantrasyonu 18,4 kontaminasyon oranıyla en iyi ikinci ortam olmuştur. %100 ve %40 NaOCl konsantrasyonları kontamine tohum sayısı (5) ve kontaminasyon yüzdesi (%30) bakımından benzer sonuçlar vermiştir. Sterilizasyon denemelerden alınan sonuçlara göre sterilizasyon çalışmalarında tohum kabuğu soyulmuş 15 dakika süre ile %60 NaOCl konsantrasyonu kullanılmıştır (Şekil4.2 a,b) (Çizelge 4.2).



**Şekil 4.2.** Kabuğu soyulmuş tohumlarda kontaminasyon ve çimlenme (a; kontaminasyon, b;çimlenme)

#### 4.2. Tohumların Çimlendirilmesi

Kabuklu ve kabuksuz olarak sterilizasyonu yapılan defne tohumları 0 MS besin ortamı içeren cam kavanozlara alınarak 21°C 'de 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyotta iklim kabininde *in vitro* çimlenmeye bırakılmıştır. Tohumlarda ilk çimlenme 14 gün sonra kabuğu soyulmuş tohumlarda görülmüş ve çimlenme oranı %12,9–%71,6 arasında farklılık göstermiştir. Tohum kabuğu soyulmuş tohumlarda en iyi çimlenme oranı (%71,6) %80 NaOCl konsantrasyonunda steril edilen tohumlardan elde edilirken, en düşük çimlenme yüzdesi (%12,9) %20 NaOCl konsantrasyonunda steril edilen tohumlarda görülmüştür (Şekil 4.3). %60 NaOCl konsantrasyonunu kontaminasyon bakımından en iyi ortamı vermiştir fakat %80 NaOCl konsantrasyonunu çimlenmede daha iyi sonucu verdiği için çimlendirme çalışmalarına %80 NaOCl ile devam edilmiştir. Bu durumun yapılan çalışma sonucunda tohum başarısına bağlanmıştır. Kabuklu tohumların çimlenmesinde ise, farklı NaOCl konsantrasyonlarının hiç birinde çimlenme görülmemiştir.



**Şekil 4.3.** Kabuksuz defne tohumlarının çimlenmesi

#### **4.3. Çimlenen Tohumlardan Gelişen Tepe ve Yan Sürgünlerin Kesilerek Ayrılması**

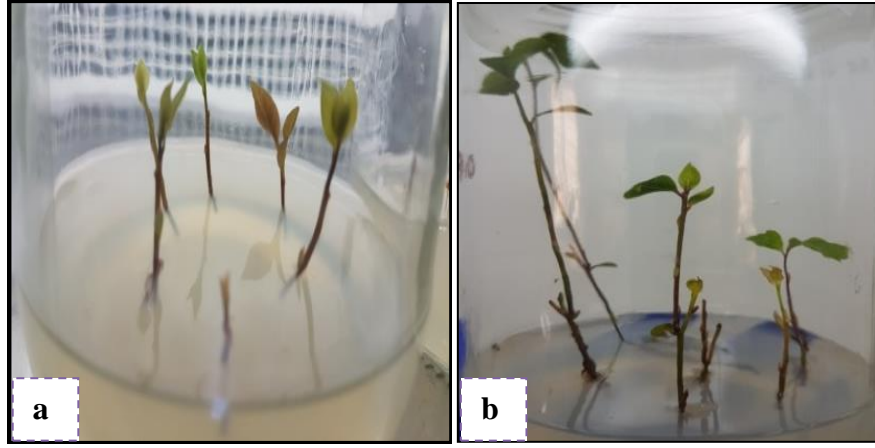
Yapılan çalışmada 15 gün sonra tohumlar çimlenmeye başlamış ve çimlenen 48 adet tohumun tepe sürgünü kesilerek IBA'nın farklı konsantrasyonlarını (0 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L) içeren MS ve WPM besin ortamlarına aktarılmıştır. Yaklaşık 30 gün sonra tepe sürgünü kesilmiş çimlenen defne tohumlarından yan sürgünler gelişmiştir. Sonuç olarak tepe sürgünü kesilmiş çimlenen her tohumdan ortalama 5 yan sürgün gelişmiştir. Gelişen yan sürgünler kesilerek köklendirilmek amacıyla IBA'nın farklı konsantrasyonlarını (0 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L) içeren MS ve WPM besin ortamlarına alınmıştır.



**Şekil 4.4.** Yan sürgünlerin gelişmesi

#### **4.4. Tepe ve Yan Sürgünlerin Köklendirilme Ortamına Aktarılması**

Tepe sürgünü kesilmiş çimlenen tohumlardan ortalama 30 gün sonra yan sürgünler gelişmiştir. (Şekil 4.4). Tepe ve yan sürgünler köklendirilmek amacıyla IBA'nın farklı konsantrasyonlarını (0 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L) içeren MS ve WPM besin ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 4.5a,b). Tepe ve yan sürgünlerin köklendirme sonuçlarında herhangi bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.6 a,b).



Şekil 4.5. a; Tepe sürgünlerin ayrılıp köklenme ortamına alınması, b; Yan sürgünlerin ayrılıp köklenme ortamına alınması



Şekil 4.6. Tepe ve yan sürgünlerin köklendirilmesi (a; tepe sürgün, b; yan sürgün)

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda IBA içeren besin ortamlarındaki bitkilerin köklenme verileri

No	Ortam (mg/L)	Köklenme Süresi (gün)	Köklenen Bitki Sayı ortalama	Her Sürgündeki Kök Sayısı	Kök Uzunluğu	Köklenme Yüzdesi
1	0MS	19.7b	1,00±0,00cd	1,00±0,00ab	0,76±0,26	% 20 cd
2	0,5 mg/L IBA MS	18.7b	1,33±0,33cd	1,33±0,33ab	1,11±0,13	% 26.7cd
3	1 mg/L IBA MS	9a	2,67±0,66ab	2,00±0,00a	0,13±0,18	<b>% 53.3ab</b>
4	0WPM	29c	0,33±0,33d	0,33±0,33b	0,50±0,50	% 6.7d
5	0,5 mg/L IBA WPM	19b	1,67±0,33bc	1,67±0,33ab	0,93±0,32	%33.3bc
6	1 mg/L IBA WPM	8.7a	3,33±0,33a	2,00±0,58a	8,91±7,54	<b>%66.7a</b>
	(F)	<b>P:0.00</b>	<b>P: 0.01</b>	<b>P:0.02</b>	<b>P: 0.3</b>	<b>P:0.01</b>

Farklı konsantrasyonlarda IBA içeren MS ve WPM besin ortamına alınan tepe ve yan sürgünlerin köklendirilmesinde hem besin ortamı açısından hem de köklenme süresi açısından farklılıklar gözlenmiştir. Köklendirme ortamlarına alınan tepe ve yan sürgünler; köklenme süresi, ortalama köklenen bitki sayısı, her sürgündeki kök sayısı, kök uzunluğu, köklenme yüzdesi bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3).

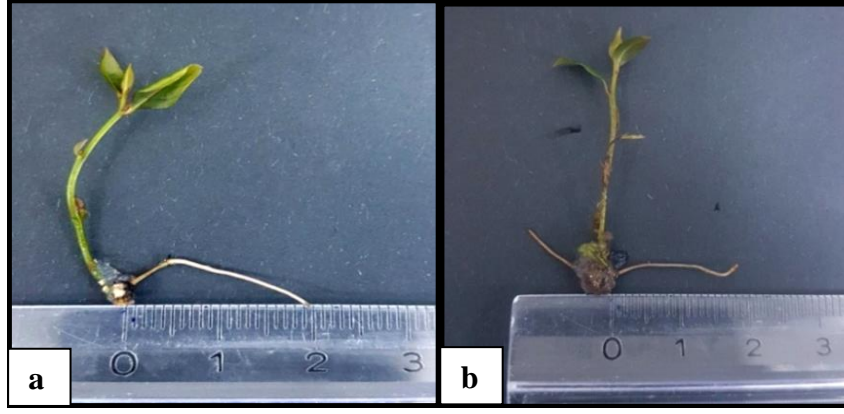
Tepe ve yan sürgünlerin köklendirilmesinde Çizelge 4.3 'te görüldüğü gibi hem köklenme süresi hem de köklenme yüzdesi bakımından en iyi sonuç yaklaşık 8,7 günlük süre ve %66,7 köklenme oranıyla 1 mg/L IBA içeren WPM besin ortamı ile 9 günlük köklenme süresi ve %53,3 köklenme oranıyla 1 mg/L IBA içeren MS besin ortamında görülmüştür. En başarısız sonuç ise, 29 günlük köklenme süresiyle %6,7 oranında köklenme gösteren 0 WPM besin ortamından elde edilmiştir.

**Köklenme Süresi:** Varyans analiz sonucuna göre tepe ve yan sürgünlerin köklenme süresi 0,01 düzeyinde önemli görülmüştür. Tepe ve yan sürgün köklenmesinde süre açısından en başarılı sonuç 8,7 ve 9 günlük süre bakımından 6 (1 mg/L IBA WPM ) ve 3 (1 mg/L IBA MS ) nolu ortamlarda gözlenmiştir. Tepe ve yan sürgün köklenmesinde en uzun süre ise, 29 günlük süre ile 4 nolu (0 WPM ) ortamda görülmüştür.

**Köklenen Bitki Sayısı:** Köklendirme ortamına alınan tepe ve yan sürgünlerin köklenmesayı ortalaması 3,33 ile 0,33 arasında bir değer göstermiştir. Köklenen bitki sayısı bakımından en yüksek sonuç 3,33 ortalamayla 6 (1 mg/L IBA WPM ) nolu ortamdan elde edilirken, en az köklenme 0,33 ile 4 (0 WPM ) nolu ortamda gözlenmiştir.

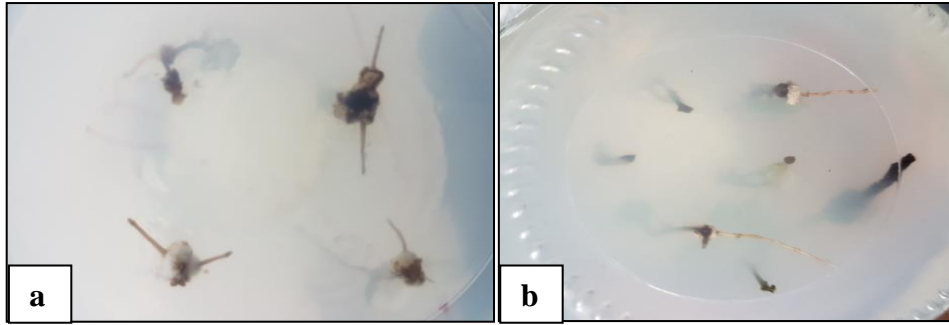
**Her Sürgündeki Kök Sayısı:** Tepe ve yan sürgünlerde oluşan kök sayısı 2,00 ile 0,33 arasında değişiklik göstermiştir. Her bir sürgünde oluşan kök sayısı bakımından yapılan değerlendirmede sürgün başına en fazla köklenme 2 adet olarak 3 (1 mg/L IBA MS )ve 6 (1 mg/L IBA WPM ) nolu ortamdan elde edilmiştir. Sürgünlerdeki en az kök sayısı 0,33 olarak 4 (0 WPM) nolu ortamda görülmüştür.

**Kök Uzunluğu:** Tepe ve yan sürgünlerin kök uzunluğu 8,91cm ile 0,13cm arasında farklılık göstermiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu köklendirme ortamına alınan sürgünler kök uzunluğu bakımından önemsiz görülmüştür (Şekil 4.7a,b).



Şekil 4.7. Tepe ve yan sürgünlerin kök uzunlukları (a; tepe sürgünün kök uzunluğu, b; yan sürgünün kök uzunluğu)

**Köklenme Yüzdesi:** Tepe ve yan sürgün köklenmesi %66,7 ile %6,7 arasında farklılık göstererek Duncun testi sonucuna göre 0,01 düzeyinde önemli görülmüştür. Köklenme yüzdesi bakımından en başarılı sonuç 6 nolu (1 mg/L IBA WPM) besin ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.8a,b). En düşük köklenme ise, 4 nolu (0 mg/L WPM) besin ortamında görülmüştür.



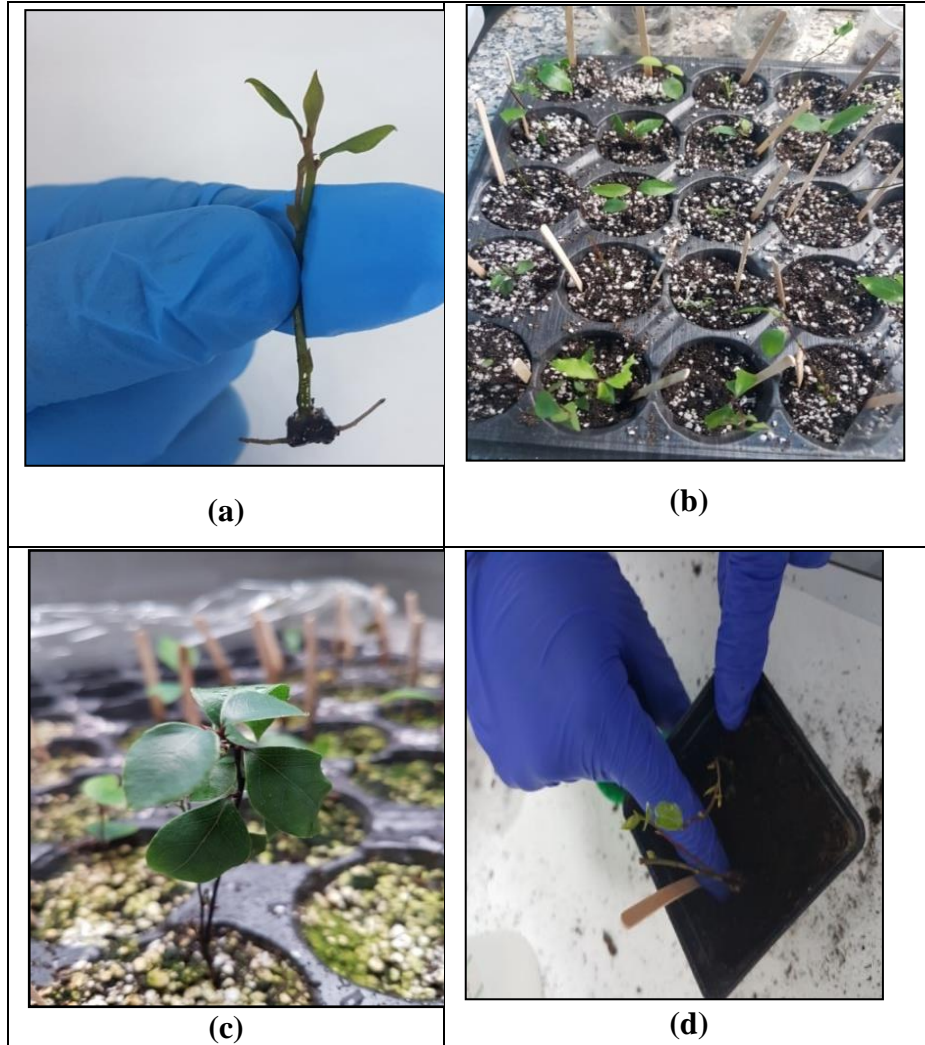
Şekil 4.8. Tepe ve yan sürgünlerin besin ortamındaki köklü görüntüsü (a; köklü tepe sürgünü, b; köklü yan sürgünün )

#### 4.5. Köklü Sürgünlerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon)

Farklı konsantrasyonlarda IBA içeren MS ve WPM besin ortamlarında köklendirilen 5-10 cm uzunluğundakiköklü sürgünler musluk suyu ile yaprak ve köklere zarar gelmeyecek şekilde yıkanıp kağıt bardaklarda bulunan steril edilmiş torf-perlit (1:1) karışımına aktarılmıştır. Bitkilerin üzerine beyaz şeffaf poşet geçirilerek  $+24\pm 1$  °C 'de %50 nem içeren iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. İkinci hafta sonunda poşet üzerinde delikler açılarak kademeli olarak nem oranı düşürülmüştür. Bitkiler üzerindeki streç tamamen 35 gün sonunda açılmıştır. Bitkilere su püskürtülerek verilmiştir. İklim odasında büyümeye bırakılan bitkilere ayda bir kez sıvı gübre takviyesi yapılmıştır.



Farklı IBA konsantrasyonlarında köklendirilen köklü defne fidelerinin iyi bir alıştırmaya süreci yapıldığı takdirde besin ortamı ve konsantrasyon farkı gözetmeksizin sağlıklı bir şekilde dış koşullara aktarılacağı görülmüştür. İlk aşamada köklenen 40 adet bitkiden 26 tanesi (%65 ) sağlıklı bir şekilde dış koşullara alıştırılmış ve gelişimine devam etmiştir. Dış koşullara alıştırılan köklü defne fideleri büyük saksılara alınmıştır. Köklendirme çalışmaları 12 ay boyunca devam etmiş ancak dış koşullara alıştırmaya çalışmaları sadece ilk aşamada (8 gün ile 20 gün arası) köklenen sürgünlerde yapılmıştır (Şekil 4.9 a,b,c,d).



**Şekil 4.9.** Köklenen bitkilerin dış koşullara aktarılması ve alıştırmaya (a; köklü fide, b; köklü fidelerin dış koşullara aktarılması, c; köklü fidenin sağlıklı bir şekilde hayatta kalması, d; köklü fidelerin büyük saksılara alınması)

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Defne Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu ve Çimlenmesi

#### 5.1.1. Defne Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu

Yapılan tez çalışmasında defne tohumlarına kabuklu ve kabuksuz olmak üzere iki farklı şekilde 15 dakika süreyle %20, %40, %60, %80 ve %100 NaOCl konsantrasyonlarında sterilizasyon uygulanmıştır. Kabuklu tohumlarda yapılan sterilizasyon çalışması sonucunda kontaminasyon oranı %34,4-%90 arasında iken, kabuksuz tohumlarda kontaminasyon oranı %0-%77,1 arasında farklılık göstermiştir. Kabuklu tohumların sterilizasyonunda en düşük kontaminasyon %34,4 ile %100 NaOCl konsantrasyonundan elde edilirken, kabuksuz tohumlarda %60 NaOCl konsantrasyonunda kontaminasyona rastlanmamıştır. Kabuklu (%90) ve kabuksuz tohumlarda (%7,1) en yüksek kontaminasyon %20 NaOCl konsantrasyonunda yapılan denemelerde görülmüştür. Yapılan çalışmaya benzer olarak, Şenyay (2008) çalışmasında sakız ağacı tohumlarının sterilizasyonu için tohumlar 7 dakika süre ile %1'lik NaOCl çözeltisinde bekletilmiş ve başarılı sonuç alınmıştır. Diğer bir çalışmada ise, Chaari Rkhis ve ark. (2011) zeytin bitkisinden aldıkları eksplantların sterilizasyonunda 8 dakika süre ile %12 NaOCl konsantrasyonu denemişlerdir. Odunsu bitkiler dışında otsu bitkilerin tohumlarında yapılan sterilizasyon çalışmalarında Aasim ve ark. (2008) ise, börülce tohumlarına 5 ve 10 dakika sürelerinde %70 NaOCl konsantrasyonu kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Fasülye tohumlarının sterilizasyon çalışmalarında Sağlam (2005) yaptığı çalışmada %20 NaOCl konsantrasyonunda 5 dakika süre bekleterek 3 kez saf su ile durulama işlemi yapmıştır.

### 5.2. Defne Tohumlarının Çimlendirilmesi

Tez çalışmasının tohum çimlendirme çalışmalarında; tohumlar öncelikle 4 hafta boyunca +4 °C 'de bekletilerek çimlendirme başarısının artırılması hedeflenmiştir. Tohumlar uygun sterilizasyon uygulamaları sonrasında kabuğu soyulmuş ve soyulmamış olarak 0 MS besin ortamında 21°C 'de 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyotta iklim kabininde çimlendirmeye alınmıştır. Kabuklu tohumların bütün NaOCl konsantrasyonunda çimlenmeye rastlanmazken, kabuksuz tohumlarda çimlenme oranı %12,9-%71,6 arasında farklılık göstermiştir. En iyi çimlenme %71,6 oranıyla %80 NaOCl konsantrasyonunda steril edilen tohumlardan elde edilirken, en düşük çimlenme %12,9 oranıyla %20 NaOCl konsantrasyonunda steril edilen tohumlarda görülmüştür.

Bu tez çalışmasında yapılan çimlendirme çalışmalarına benzer olarak Çavuşoğlu ve ark. (2014)'nin yaptıkları çalışmada defne tohumları kabuklu ve kabuksuz olmak üzere laboratuvar şartlarındaki çimlenme oranları, çimlenme hızları ve yetişen bitkiciklerin şaşırtma sonrası dış koşullardaki adaptasyonu test edilmiştir. Deneme sonucunda tohum kabuğu uzaklaştırılmış taze tohumların çimlenme oranlarının her iki tipte de %100'e ulaştığı görülmüştür. Bunun dışında Sari ve ark. (2006) tarafından yapılan yine başka bir çalışmada defne bitkisinin kabukları ayrılmış ve tohumlarda %85 oranında çimlenme gerçekleştiği belirtilmiştir. Takos (2001) tarafından yapılan araştırmada defne tohumlarına 60 günlük boyunca soğuk uygulamış ve sonucunda %100 çimlenme görüldüğü açıklanmıştır. Farklı odunsu bitki tohumlarında yapılan çimlendirme çalışmaları da örnek alınarak kabuğu soyulan tohumlarda *in vitro* çimlendirme oranının bu tez çalışmasında olduğu gibi daha yüksek seviyede gerçekleştiği görülmüştür.

### **5.3. İn Vitro Ortamda Çimlenen Defne Tohumlarından Kesilerek Ayrılan Tepe ve Yan Sürgünlerin Köklendirilmesi**

Odunsu bitkilerde yapılan *in vitro* köklendirme çalışmalarında en büyük problem köklendirmenin zor olmasıdır. Yapılan bu tez çalışmasında *in vitro*da çimlenen defne tohumlarından kesilerek ayrılan tepe ve yan sürgünlerin köklendirme çalışmalarında en iyi sonuç 8,7 günlük süre sonunda %66,7 köklenme oranıyla 1 mg/L IBA içeren WPM besin ortamı ile 9 günlük süreyle %53,3 köklenme oranı gösteren 1 mg/L IBA içeren MS ortamında görülmüştür. En düşük köklenme ise, 29 günlük köklenme süresi ve %6,7 köklenme oranıyla 0 mg/L IBA içeren WPM besin ortamından elde edilmiştir. Yapılan köklendirme çalışmasına benzer olarak Türközü ve ark. (2014) tarhun bitkisinde yaptıkları *in vitro* köklendirme çalışmasında en uzun köklerin 0,5 mg/l IBA içeren tam MS ve ½ MS besin ortamlarından sağlandığını BBD içermeyen besin ortamlarındaki kök uzunluklarının daha kısa kaldığını belirtmiştir. Fidancı (2005) yılında cevizde yaptığı benzer bir çalışmayla en yüksek köklenme, kök sayısı, kök uzunluğu ve kök kalınlığının Şebin ve KR-2 çeşitlerinin her ikisinde de 4 mg/L IBA dozunda gerçekleştiği ifade etmiştir. Boza ve Altun (2013b). tarafından defne bitkisinde yapılan çalışmada ise *in vitro* köklenme sağlanamayarak başarısız sonuç elde edilmiştir. Pelegrini ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada kök indüksiyonu için IBA (0; 1,25; 2,5; 5 veya 10 µM) ve (0; 2,5; 5 veya 10 mM) 'nın farklı konsantrasyonlarını uygulamıştır. En yüksek köklenme oranı dördüncü alt kültürden sonra 5 uM BAP içeren ortamdan gözlenmiştir. Bitkilerin hayatta kalma oranı %56,7 ile başarılı sonuç vermiştir.

Öncel (2011) jajoba bitkisine ait sürgünlerde yaptığı köklendirme çalışmasında NAA, IAA ve IBA'nın farklı dozlarını içeren MS besin ortamını kullanmıştır. En iyi köklenme yüzdesini %40 oranıyla 3 mg/L NAA ile %30 oranıyla 1 mg/ IBA içeren MS ortamından sağlamıştır. Köklenme yüzdesini artırmak amacıyla sukroz, ½ MS ve aktif karbon ilavesi yapıldığı ve sonucunun başarılı olduğu bildirilmiştir. Farklı bir diğer çalışmada Kepenek ve Kolağası (2016) cevizde yaptıkları köklendirme çalışmasında en yüksek sonucu %62,71 ile 5 mg/L IBA içeren ortamdan elde etmişlerdir. Farklı bir diğer çalışmada Koç ve ark. (2014) sakız ağacının köklendirilmesinde farklı konsantrasyonlarda 1 mg/L, 2 mg/L ve 4 mg/L) IBA içeren MS besin ortamını kullanmışlardır. Sülüsoğlu ve Çavuşoğlu (2013) karayemiş bitkisinde mikroçoğaltım sonucu elde ettikleri 1-2 cm uzunluğundaki mikro sürgünlerin köklenmesinde 0,5 mg/L IBA kullanmış ve başarılı olmuşlardır. Akram ve Aftab (2012) dut bitkisinde yaptıkları çalışmada 25 günlük kültür süresi sonunda %0,1aktif kömür ile desteklenmiş 4 µM IBA içeren ½ MS besin ortamında %85,6 oranda başarılı bir köklenme sonucuna ulaşmışlardır. Demiral ve Ülger (2008) kiraz ağacının Gisela-5 çeşidinde yaptıkları çalışmada en iyi köklenmeyi %92,88 ile 6 mg/L NAA denemesiyle elde etmişlerdir. Sürgün köklendirilmesinde karanlık koşulları tercih eden Emam ve Ghamarizare (2013) *Sorbus aucuparia* L. bitkisinde 1,5 mg/L IBA içeren modifiye besin ortamında başarı sağlamışlardır. Yadav ve Singh (2011) elma ağacında yapıkları çalışmada mikroçoğaltımla elde ettikleri sürgünlerin köklenmesinde 1 mg/L IAA kullanmışlardır. Soni ve ark. (2010) elma bitkisinde yaptığı benzer bir çalışmada köklenmeyi IBA ve IAA' nın yüksek konsantrasyonundan sağlamışlardır. Çalışmadaki köklenme başarısı %72 olarak bildirilmiştir. Köklendirme üzerinde makro elementlerin (N, P, K ve Mg) önemli rolü olduğu bildiren Amiri ve Gharati (2012) cevizde yaptıkları çalışmada mineral madde varlığında köklendirmeyi %75 oranında yüksek bulurken, mineral madde yokluğunda ise %13 ile düşük kaldığını ortaya koymuşlardır. Güler (2017) nektaride yaptığı farklı bir çalışmayla *in vitro* koşullarda çoğaltılan mikro sürgünlerin köklenmesi amacıyla BBAR ırklarıyla (*Bacillus subtilis* 13, *Bacillus lentus* 13, *Bacillus megaterium* 14 ve *Rhodotorula* spp. 15) inoküle ettiği bitkilerde köklenme elde edemezken, IBA içeren besin ortamında %100 ve %88,8 oranında yüksek köklenme sağlanmıştır. Tilkat ve ark. (2009) antepfıstığında yaptıkları *in vitro* köklendirme çalışmasında 2 mg/L IBA ile desteklenmiş besiyerinde yüksek bir köklenme oranı (%84) kaydetmişlerdir. *In vitro* ortamda köklenen bitkiler; toprak, kum ve turba (1: 1: 1) karışımıyla doldurulmuş saksılara aktarılmıştır.

#### **5.4. İn Vitroda Gelişen Köklü Defne Sürgünlerinin Dış Koşulara Alıştırılması (Aklimatizasyon)**

Farklı konsantrasyonlarda IBA içeren MS ve WPM besin ortamlarında köklendirilen 5-10 cm uzunluğundaki köklü sürgünlerkağıt bardaklarda bulunan steril edilmiş torf-perlit (1:1) karışımına aktarılmış ve bitkilerin üzeri beyaz şeffaf poşetle örtülerek +24±1 °C 'de %50 nem içeren iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. İkinci hafta sonunda poşet üzerine delikler açılmış ve böylece nem oranı kademeli olarak düşürülmüştür. Bitkilerin dış ortama alışması tamamlandıktan 35 gün sonra poşet kaldırılmıştır. İklim odasında büyümeye bırakılan bitkilere ayda bir kez sıvı gübre takviyesi yapılmıştır. Köklü 40 adet sürgünden 26 tanesi (%65 ) başarılı bir şekilde gelişimine devam etmiş ve büyük saksılara aktarılmıştır. Yapılan tez çalışmasına benzer çalışmalardan Akram ve Aftab (2012) tarafından dut bitkisinde yapılan çalışmada 0,5 mg/L IBA ortamında köklenen bitkiler başarıyla toprağa transfer edilmiştir. Bu ortamda köklenen bitkilerde yüksek bir hayatta kalma sağlanmıştır. Kılınç ve ark. (2015b) sakız ağacında yaptıkları çalışmada %94,15 oranında yüksek oranda köklenen bitkilerini iklimlendirilmesi için geliştirilen yöntemi uygun olduğu ortaya konulmuştur. Sağ kalımyüzdesi (%95) yüksek olan bitkiler 4 ay sonra dahi büyümeye devam etmişlerdir. Aynı araştırmacının Kılınç (2013a) farklı bir çalışmada IBA' nın farklı konsantrasyonlarında %94 oranında başarılı bir şekilde köklendirdiği Sakız ağacına ait sürgünlerin aklimatizasyon protokolünde de başarılı olduğunu bildirmiştir. Canlı bitki oranı aklimatizasyondan işleminden iki ay sonra %95 olarak raporlandırılmıştır. Şan ve ark. (2014) Mersin bitkisinde 1 mg /L IBA + 2 g /L AC (aktif kömür) içeren ½ MS besin ortamından yüksek köklenme elde etmiş ve bitkilerin %86'sını dış koşullara başarılı bir şekilde alıştırmışlardır. Eroğlu ve ark. (2013) şeftalinin embriyo rejenerasyonundan elde ettikleri bitkileri serada iki ay süreyle izlenmişlerdir. Bitkilerin hayatta kalma başarıları ortamlara göre farklılık göstermekle beraber %8,6-38,4 arasında değişim göstermiştir. Özden ve ark. (2008) Öküzgözü ve Boğazkere üzüm çeşitlerinde yaptıkları organogenesis çalışması sonucu köklendirdikleri bitkileri torf-perlit karışımına transfer etmiş ve iklim odasında başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırmışlardır. Ivanicka (1987) dut bitkisinde köklenmeyi 0,2 mg/L IBA ve 0,2 mg/L NAA varlığında gerçekleştirmiştir. Sürgünlerin dış ortama alıştırılmasında %90 başarılı olunmuştur. Fidancı ve ark. (2005b) kirazda yaptıkları köklendirme çalışmasında 1 mg/L IBA kullanarak üç hafta içerisinde % 95 ile % 100 oranında köklendirilme sağlamış ve köklenen bitkiler turba yosunu ve perlit (1:1) karışımı içeren plastik kaplara aktarmışlardır. Aklimatizasyon aşamasında hayatta kalma oranının yüksek olduğu bildirilmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülke ekonomisinde önemli bir yere sahip olan Akdeniz defne'sinde yapılan bu tez çalışmasında çimlendirilen 48 kabuksuz defne tohumlarından gelişen tepe sürgünler (ilk sürgün) kesilerek ortalama her tohumdan 5 yan sürgün gelişmiştir. Tepe ve yan sürgünlerin köklendirilmesinde en başarılı sonuçlar 8,7 günlük süre ve %66,7 köklenme oranıyla 1 mg/L IBA içeren WPM besin ortamı ile 9 günlük süre sonunda %53,3 köklenme oranı veren 1 mg/L IBA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Köklü fidelerin *in vitro* ortamda köklendirilmesinde WPM ve MS besin ortamından yakın sonuçlar alınmasından dolayı MS besin ortamının WPM besin ortamına göre daha düşük maliyetli ve kolay tedarik edilebilme gibi imkânları göz önüne alındığında defne bitkisinin *in vitro* fidan geliştirme çalışmalarında MS ortamının kullanılmasının daha avantajlı olacağı ön görülmüştür. Yapılan çalışmaya göre, *in vitro* koşullarda defnefidan geliştirme çalışmalarının kısa süre içinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilebileceği ortaya konmuştur. Köklenen defne fidanlarının dış ortama alıştırılması da en az köklendirilme kadar önemli olmuştur. *In vitro* ortamda gelişen defne fidanlarının dış koşullara aktarılmasında nem kontrolünün iyi bir şekilde yapıldığı takdirde alıştırma işleminin başarılı olacağı belirlenmiştir. Sonuç olarak; yapılan bu çalışmada Akdeniz Defnesi'nin ticari anaç ve fidan yetiştiriciliğinde, *in vitro* mikroçoğaltım ve *in vivo* çelik yetiştirme çalışmalarından daha avantajlı olduğu gözlenmiştir. Defne bitkisinde yapılan bu çalışmanın *in vitro* mikroçoğaltım ve *in vivo* çelik yetiştirme çalışmalarına göre; daha pratik, kolay ve daha kısa sürede fidan eldesi sağlanacağı ortaya konmuştur. Akdeniz Defne'sinin dışarıdan toplanmasıyla doğadan tahrip edilmesine karşı *in vitro* koşullarda hızlı bir şekilde çoğaltılıp köklü defne fidanları elde edilerek doğaya daha erken kazandırılması sağlanabilecektir.

## 7. KAYNAKLAR

- Aasim M, Khawar K M, Özcan S (2008). *In vitro* micropropagation from shoot meristems of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cv. Akkiz. Bangladesh J. Bot. 37(2):149-154pp.
- Akram M, Aftab F (2012). Efficient Micropropagation and Rooting of King White Mulberry (*Morus Macroura* Miq.) var. Laevigata From Nodal Explants of Mature Tree. Pak. J. Bot, 44:285-289pp.
- Amiri M E, Gharati S (2012). Influence of medium composition on multiplication of walnut (*Juglans regia* L.) growth. Journal of Medicinal Plants Research, 6(8):1482-1485pp.
- Anonim (2016). T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, Defne Eylem Planı, 2016-2020.
- Anonim(2018a).<https://www.google.com/search?tbm=isch&sa=1&ei=LTYXN-gAdS71fAPtZqsqAw&q=eros+defne&oq=eros+defne&gs>(daphnenin ağaca dönüşmesi resmi) (erişim tarihi, 12.05.2019).
- Anonim(2018b).<https://www.google.com/search?tbm=isch&sa=1&ei=LTYXN-gAdS71fAPtZqsqAw&q=eros+defne&oq=eros+defne&gs> (eros heykeli). (erişim tarihi, 12.05.2019).
- Arslan N, Baydar H, Kızıl S, Karık Ü, Şekeroğlu N ve Gümüşçü A (2015). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi, 483-507s.
- Başer B C, Yılmaz A, Mutlu O A, (2018). Defne İşleme ve Paketleme Tesisi Ön Fizibilitesi Raporu. Batı Karadeniz Kalkınma Ajansı BAKKA.
- Bayram E, Kırıcı S, Tansı S, Yılmaz G, Kızıl O A S, Telci İ (2010). Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretiminde Arttırılması Olanakları. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Ziraat Mühendisliği Vıı. Teknik Kongresi, 11-5s.
- Baytöre F (2014). Yalova İlinde Farklı Yüksekliklerde Doğal Olarak Yetişen Defne (*Laurus Nobilis* L.) Populasyonlarında Bazı Morfolojik ve Kalite Özellikleri ile Ontogenetik Varyabilitenin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Bilgin F, Şafak İ, Kiracıoğlu Ö, (2006). Ege bölgesinde defne üreticilerinin profili. 1. Uluslararası Odun Dışı Orman Ürünleri Sempozyumu, 1-4, Türkiye.
- Boudabous M, Mars M, Marzougui N, Ferchichi A (2010). Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through *in vitro* culture of axillary buds. Acta Botanica Gallica, 157(3): 513-524pp.
- Boza A (2013a). Karaburun, Urla (Çeşme Yarımadası) ve Dilek Yarımadasında Bulunan Doğal Defne (*Laurus Nobilis* L.) Populasyonlarında Fenolojik Gözlemler ve Yağ Analizleri. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir, 83s.
- Boza A, Z G Altun (2013b). Defnenin (*Laurus Nobilis* L.) Doku Kültürü Yöntemiyle Üretilme Olanakları Raporu. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü (71): 232.328.9S, İzmir/Türkiye.
- Chaari Rkhis A, Maalej M, Drira N, Alvaro S (2011). Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. Turk J Agric For (35):403-412, TÜBİTAK.

- Chaturani G D, Subasinghe G, Jayatilleke S M P, Mapalana K (2006). *In Vitro* Establishment, Germination and Growth Performance of Red Sandal Wood (*Pterocarpus Santalinus* L.). Tropical Agricultural Research and Extension, (9):116-130s.
- Çavuşoğlu A, Sülüoğlu M, Erkal S (2014). Defne (*Laurus nobilis* L.)’de Bitki Tipi, Tohum Yaşı ve Tohum Kabuğunun Çimlenme Üzerine Etkileri. II. Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu 23–25, Yalova.
- Çetinbaş M, Koyuncu F (2006). Improving germination of (*Prunus avium* L.) seeds by gibberellic acid, potassium nitrate and thiourea. Horticultural Science, 33(3):119-123s.
- Demiral S, Ülger S (2008). Gisela 5 kiraz anacının doku kültürü ile çoğaltılması üzerine bir araştırma. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 21(1):117-121s.
- Dinçer D, Bekçi B, Yazıcı BF (2016). Türkiye’deki Doğal Bitki Türlerinin Üretiminde Doku Kültürü Tekniklerinin Kullanımı. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, (5):295-302s.
- Emam M, Ghamarizare A (2013). Influence of Plant Growth Regulators and Media on *in vitro* Propagation of *Sorbus aucuparia* L. Journal of Medicinal Plants and By-Products, 2(1):53-56pp.
- Erden Ü (2005). Akdeniz Defnesi (*Laurus Nobilis* L.)’nde Mevsimsel Varyabilite ve Optimal Kurutma Yöntemlerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Erkmen S (2009) Soğuk Katlama Ön İşlemlerinin Tatar Akçağacı (*Acer Tataricum* L.) Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Eroğlu Z Ö, Fidancı A, Mısırlı A (2013). Erkenci Şeftali Embriyolarının Farklı Kültür Ortamlarında Gelişimi. Tarım Bilimleri Dergisi, 18(2):93-99s.
- Fidancı A (2005a). Şebin ve Kr-2 Ceviz Çeşitlerinin *İn Vitro*’da Hızlı Çoğaltılma Tekniklerinin Belirlenmesi. Bahçe Ceviz Dergisi, 34(1):239-246pp.
- Fidancı A, Burak M, Erenoglu B, Akçay M E (2005b). Determination of *in vitro* propagation techniques for some clonal cherry rootstocks. *In vitro* International Cherry Symposium (795): 409-412pp.
- Germanà M A, Patricolo G, Chiancone B (2008). *In Vitro* Germination of Stoneless Seeds and Isolated Embryos of 14 Sicilian Cultivars of (*Olea Europaea* L.). In International Symposium on Biotechnology of Fruit Species B1otechfruit, (39):173-180pp.
- Gölükçü M, Tokgoz H, Turgut D Y (2015). Defne (*Laurus Nobilis* L.) Uçucu Yağ Bileşimi Üzerine Distilasyon Süresinin Etkisi. Food and Health, 4(1):37-42s.
- Gül A, Çelik A D, (2016). Tıbbi ve Aromatik Bitki Yetiştiriciliği ve Dış Ticareti Hatay İli Örneği. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 21(2):227-235s.
- Güler S, Başaran S (2013). Bozuk Defne (*Laurus Nobilis* L.)’likler için Rehabilitasyon Yönteminin Belirlenmesi (Manavgat-Yaylaalan Örneği) Raporu. Orman Genel Müdürlüğü Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü, Antalya /Türkiye.
- Güler S (2017). *In vitro* şartlarında BBAR uygulamalarının GF-677 ile MaxMa-14’ün köklenmesi üzerine etkisi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya/Türkiye.



- Ivanička J (1987). *In vitro* micropropagation of mulberry (*Morus nigra* L.) *Scientia horticulturae*, 32(1-2):33-39pp.
- Jaafar F, Awal A, Abdullah S, Ismail F, Sidik N J, Yusuf N A (2015). Bio-Potential of Fermented Fruit Waste Solutions on *in vitro* Seed Germination and Regeneration of (*Lycium barbarum*) and (*Aquilaria malaccensis* Lamk.). *Malaysian Applied Biology*, 44(3):127-134pp.
- Karık Ü, Çiçek F, Erdiñç O, Tutar M, Ayas F (2016). Türkiye’de Yayılış Gösteren Defne (*Laurus Nobilis* L.) Populasyonlarının Meyve Özellikleri. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 26(1):1-16s.
- Kaur S (2018). *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration from epicotyl segments of Rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) *IJCS*, 6(1):2082-2091pp.
- Kavaklı Ş (2012). Ege Bölgesi Doğal Defne Popülasyonunda Genetik Farklılıkların Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kepenek K, Kolağasi Z (2016). Micropropagation of Walnut (*Juglans regia* L.). Special issue of the 2nd International Conference on Computational and Experimental Science and Engineering (ICCESEN), 1:130pp.
- Khan S, Bi Bi T (2012). Direct shoot regeneration system for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Dhakki as a means of micropropagation. *Pak. J. Bot*, 44(6):1965-1971pp.
- Kılınç F M (2013a). Sakız Ağacı (*Pistacia Lentiscus* L.)’nın *in vitro* Klonal Mikroçoğaltılması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı 79s, Diyarbakır.
- Kılınç F M, Süzerer V, Çiftçi Y Ö, Onay A, Yıldırım H, Uncuoğlu A A, Metin Ö K (2015b). Clonal micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and assessment of genetic stability using IRAP markers. *Plant growth regulation*, 75(1):75-88s.
- Kırıncı S (2015). Türkiye’de Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Genel Durumu. Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi, (15):4-11s.
- Koc I, Onay A, Çiftçi Y Ö (2014). *In vitro* regeneration and conservation of the Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.). *Turkish Journal of Biology*, 38(5):653-663.
- Mazri M A, Meziani R (2013). An improved method for micropropagation and regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 22(2):176-184pp.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3):473-497pp.
- Öncel Z (2011). Jojobanın (*Simmondsia chinensis*) *in vitro* hızlı çoğaltımı ve moleküler işaretleyicilerle erkek ve dişi bitkilerin belirlenmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Konya/Türkiye.
- Özden M, Demirel U, Gürsöz S (2008). Öküzgözü ve Boğazkere (*Vitis Vinifera* L.) Üzüm Çeşitlerinin Yaprak Eksplantlarından Organogenesis Yoluyla Bitki Regenerasyonu. *H R.Ü.Z.F.Dergisi*, 12(4):41-49s.
- Panda B M, Hazra S (2010). *In vitro* regeneration of (*Semecarpus anacardium* L.) from axenic seedling-derived nodal explants. *Trees*, 24(4):733-742pp.

- Pelegriani L L, Ribas L L F, Zanette F, Koehler H S (2011). Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. African Journal of Biotechnology, 10(9):1527-1523pp.
- Pırlak L (1997). Bazı Uygulamaların Kizilcik (*Cornus Mas L.*) Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(2):212-221s.
- Prudente D D O, Nery F C, Da Silva L S, Paiva R, Dos Reis M V, Nery M C (2016). *In vitro* germination and seed cryopreservation of *Paineira Rosa*. Scientia Agraria Paranaensis, 15(3), 272-276pp.
- Rathwell R, Shukla M R, Jones A M P, Saxena P K. (2016). *In vitro* propagation of cherry birch (*Betula lenta L.*). Canadian Journal of Plant Science, 96(4):571-578pp.
- Ribeiro M D N O, Pasqual M, Villa F, Pio L A S, Hilhorst H W M (2009). *In vitro* seed germination and seedling development of (*Annona crassiflora* Mart.). Scientia Agricola, 66(3):410-413pp.
- Rohela G K, Shabnam A A, Shukla P, Aurade R, Gani M, Yelugu S, Sharma S P (2018). *In vitro* clonal propagation of PPR-1 a superior temperate mulberry variety. Indian Journal of Biotechnology, (17):619-625.
- Sağlam S (2005). Fasulye (*Phaseolus vulgaris L.*)’de doku kültürü ve *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- San B, Li Z, Hu Q, Reighard G L, Luo H (2015). Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaf explants of peach rootstock Guardian is significantly enhanced by silver thiosulfate. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 120(2):757-765pp.
- Sari A, Oğuz B, Bilgiç A (2006). Breaking seed dormancy of Laurel (*Laurus nobilis L.*). New Forests, 31(3): 403-408pp.
- Sezgin M, Dumanoğlu H (2016). *In Vitro* Propagation Potential via Somatic Embryogenesis of the Two Maturing Early Cultivars of European Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). American Journal of Plant Sciences, 7(07):1001pp.
- Snedecor G W, Cochran W G (1967). Statistical methods. 246-248pp.
- Soni M, Thakur M, Modgil M (2010). *In vitro* multiplication of Merton I. 793–An apple rootstock suitable for replantation. Indian Journal of Biotechnology, (10):362-368pp.
- Şan B, Karakurt Y, Dönmez F (2014). Effects of thidiazuron and activated charcoal on *in vitro* shoot proliferation and rooting of Myrtle (*Myrtus communis L.*). Journal of Agricultural Sciences, 21(2):177-183.
- Şenyay D (2008). Sakız Ağacının (*Pistacia lentiscus L.*) *in vitro* Koşullarda Rejenerasyonu Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Takos I A (2001). Seed dormancy in bay laurel (*Laurus nobilis L.*). Kluwer Academic Publishers, (21):105- 114pp.
- Thakur M (2018). Studies on *in vitro* Propagation of Plum (*Prunus Salicina L.*) cv. Santa Rosa. Doctoral Dissertation, Uhf Naunı.
- Tilki F (2005). Katlama İşlemi, Saklama ve Sıcaklığın (*Fraxinus Ornus L.*) Tohumunun Çimlenmesi Üzerine Etkisi. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi,2: 191-195s.

- Toosi S, Dilmagani K (2010). Proliferation of *Juglans regia* L. by *in vitro* embryo culture. Journal of Cell Biology and Genetics, 1(1):12-19pp.
- Tümen İ (2010). Tıbbi Bitkilerin Ekonomik Değerleri Ardıç Örneği. Tıbbi Bitkilerin Korunması, Üretimi ve Ticareti. 11. Merkezefendi Geleneksel Tıp Festivali Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, Zeytinburnu/ İstanbul.
- Türközü D, Yaşa F, Ellialtıoğlu, Yıldırım B (2014). Tarhun (*Artemisia Dracunculus* L.) Bitkisinin Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltılması Üzerinde Çalışmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 24(3):300-308s.
- Uyar B (2014). Hatay Yöresinde Seçilmiş Defne (*Laurus Nobilis* L.) Genotiplerinde Uçucu Yağ Oranı ve Bileşenlerinde Ontogenetik Varyabilitenin Belirlenmesi ve Baharat Kalitesi Açısından Yaprak Özelliklerinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- Warakagoda, P S, Subasinghe S (2014). *In vitro* seed germination of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. Annual Research and Review in Biology, 3549-3565pp.
- Yadav K and Singh N (2011). *In vitro* propagation and biochemical analysis of field established wood apple (*Aegle marmelos* L.). Analele Universitatii din Oradea Fascicula Biologie, 18(1):23-28pp.

## ÖZGEÇMİŞ

Hasret Parmak 1988 yılında Bingöl'ün Kiğı ilçesinde doğdu. İlk ve ortaokulu İstanbul'un Beyoğlu ilçesinde Kaptanpaşa İlköğretim Okulunda, lise öğrenimini ise Kasımpaşa Çok Programlı Lisesinde tamamladı. Eğitim hayatına 5 yıl ara sonra verdikten sonra, lise öğrenimi sırasında Biyoloji dersinde görmüş olduğu genetik ve biyoteknoloji eğitimden duyduğu merak ve istek üzerine lisans eğitimine 2011 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde başladı. 2016 yılında lisans öğrenimini fakülte ikinciliği derecesiyle tamamlayarak mezun oldu. Aynı yıl 2016 Eylül ayında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünde Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda, Bitki Doku Kültürü alanında yüksek lisans eğitimine başladı.