

***Cannabis sativa* L. (Kenevir)'de *in vitro* Mikroçoğaltım**

***In vitro* Micropropagation of *Cannabis sativa* L. (Hemp)**

Cennet YAMAN

* Tarla Bitkileri Bölümü, Ziraat Fakültesi, Yozgat Bozok Üniversitesi, Yozgat, TÜRKİYE,

Geliş Tarihi : 15.10.2020

Kabul Tarihi : 20.10.2020

ÖZET

Cannabis sativa (Kenevir) birçok endüstriyel alanda kullanılan bir bitkidir. Dioik (son yıllarda geliştirilen monoik çeşitler) ve yabancı döllenmiş bir bitki olması, ıslah çalışmalarında ve belirli bir amaca yönelik yetiştiricilikte birçok sorun yaşatmaktadır. Bu yüzden ana ve baba birey olarak kullanılacak genotiplerin klonal çoğaltılması büyük öneme sahiptir. Klonal çoğaltım için biyoteknolojik yöntem olan mikroçoğaltım uygulaması başarılı sonuçlar vermektedir. Daha kısa sürede aynı gen dizilimine sahip birçok bitki üretimi sunmaktadır. Bu çalışmada, kenevir üzerinde yapılmış mikroçoğaltım için eksplant kaynağı ve onun sterilizasyonu, kullanılan besin ortamları, büyüme düzenleyicileri ve köklendirme araştırmaları incelenmiş ve en uygun ortamlar tespit edilmiştir. Gelecekte, ıslah çalışmaları ve amaca uygun sera veya açık alandaki yetiştiricilik işlemleri için uygun klonların çoğaltılmasında yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Cannabis sativa*, *in vitro*, mikroçoğaltım

ABSTRACT

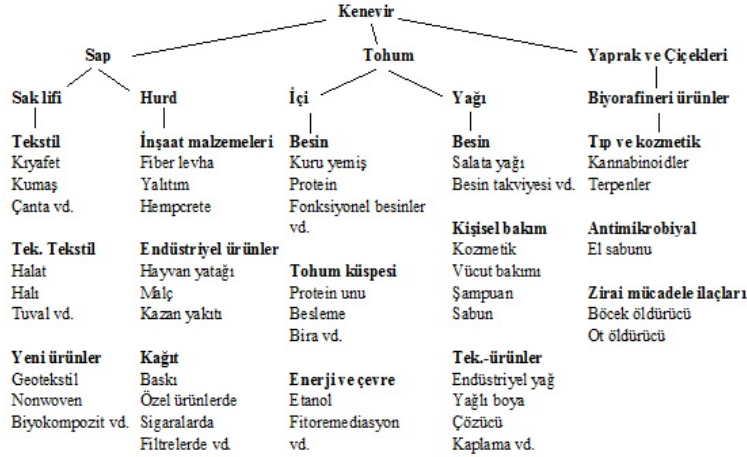
Cannabis sativa (Hemp) is a plant used in many industrial areas. As hemp is a dioecious (and monoic varieties developed in recent years) and allogamy plant, it causes many problems in breeding and cultivation for a specific purpose. For this reason, the clonal reproduction of genotypes to be used as a parent is of great importance. Micropropagation application, which is a biotechnological method for clonal reproduction, gives successful results. Micropropagation offers the production of many plants with the same gene sequence in a shorter time. In this study, previous studies about explant source and its sterilization, nutrient media used, growth regulators and rooting for hemp micropropagation have been examined, and the most suitable micropropagation conditions of hemp were determined. In the future, this study will guide the reproduction of suitable clones for breeding and greenhouse or open field cultivation.

Keywords: *Cannabis sativa*, *in vitro*, micropropagation

1. GİRİŞ

Cannabis sativa L. (kenevir) ana vatanı Orta Asya olup, Avrupa ve daha sonra Amerika'da yayılış göstermiştir (Quimby, 1974). Tek yıllık ve otsu bir bitki olan kenevir, Cannabaceae familyasının **Cannabis** cinsine aittir.

Kenevir yaklaşık 6000 yıllık kültürü yapılan bir bitkidir. Kültür geçmişinin böyle köklü olmasının en önemli nedeni; Şekil 1'de de belirtildiği gibi lifinin, tohumlarının ve bitki bünyesinden elde edilen hammaddelerinin tekstil, yağ, kâğıt yapımı, otomotiv, inşaat, biyoyakıt, fonksiyonel gıda, kozmetik, kişisel bakım ürünü ve ilaç endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmasından kaynaklanmaktadır (Salentijn, Zhang, Amaducci, Yang, & Trindade, 2015).



Şekil 1. Çok amaçlı kenevir kullanımının açık şeması (Salentijn vd. 2015)

Kenevir bitkisinin kültürü dünyadaki çeşitli iklimlere uygundur, ancak uyuşturucu olarak kullanılan ve bağımlılık yapan tetrahidrokannabinol (THC) bileşiğinin hammadde kaynağı olmasından dolayı birçok ülkede üretimi yasaklanmıştır (De Meijer, 1995). Avrupada kenevir yetiştiriciliği yasal olarak sınırlandırılmış ve kullanılacak çeşitlerin THC içeriği %0.2'nin altında olması gerekmektedir (Wróbel, Dreger, Wielgus, & Słomski, 2020). Günümüzde, bilim adamları kenevir bitkisinin sekonder bileşiklerinden olan kannabidiol (CBD) etken maddesi üzerinde yoğunlaşmışlardır. Bu bileşiğin farmakoloji alanında kullanılabilir, bağımlılık yapmayan bir uyuşturucu özelliğine sahip olduğu düşünülmektedir (Fitzcharles, Clauw, & Hauser, 2020).

Son yıllarda, kenevir yetiştiriciliğinin geniş kullanımı, çevre üzerindeki olumlu etkileri, yüksek kalori değeri ve yüksek verimi, düşük çeşit girdisi nedeniyle yetiştiriciliği artış gösteren birçok ülkede, çeşit gelişimini iyileştirmek için izin verilmiştir (Papadopoulou vd., 2015). Avrupa, Kanada ve Çin, çok amaçlı ürünler için en önemli ekim alanlarına sahiptir (Salentijn vd., 2015). Çin'in Yunnan eyaletinde, 2013 yılında lif ve yan ürün olan CBD için yaklaşık 800 ha kenevir kültürü yapılmış ve kenevir üretimi yapan çiftçiler ekonomik olarak büyük fayda sağlamıştır. Bu popüler eğilim ile hem bilim adamları hem de çiftçiler çok amaçlı (iyi miktarda lif veya yüksek CBD içeriği, kaliteli tohumluk veya tek evcikli çeşitler gibi) özelliklere sahip yeni endüstriyel kenevir çeşitlerine ihtiyaç duymuşlardır (Salentijn vd. 2015).

Dünya genelinde endüstriyel kenevir liflik, tohumluk ve diğer endüstri alanları (farmakoloji gibi) veya çoklu amaç için üretilmektedir. FAO (2018) verilerine göre kenevir tarımı tohumluk ve liflik olarak ayrı ayrı istatistiksel değerlendirilmesi yapılmıştır. Dünya'da liflik kenevir üretimi toplamda 41587 ha alanda tarımı yapılmış ve en yüksek ekim alanı sırasıyla Kuzey Kore, Çin ve Rusya'da gözlenmiştir. Türkiye'de kenevirin liflik üretimi için 10 ha ekim alanı bulunmaktadır. Tohumluk kenevir tarımı için dünyadaki ekim alanı 32140 ha olup, en yüksek ekim alanına 12333 ha ile Fransa sahiptir. Türkiye ise tohumluk kenevir tarımında 2 ha ekim alanına sahiptir. Türkiye'nin birçok ilinde 2019 yılında yasal izin çerçevesinde kenevir tarımına izin verilmiştir. Bu yüzden, ilerleyen yıllarda tarım alanının artacağı düşünülmektedir. Günümüze kadar yerli çeşit için birçok çalışma yapılmış olup (Aytaç vd., 2017), henüz yerli çeşidimiz bulunmamaktadır. Bu çalışmada liflik, tohumluk veya çok amaçlı kenevir yetiştiriciliğinde, ayrıca yerli çeşit geliştirilmesi için ıslah çalışmalarında kullanılabilir aynı genomik dizilime sahip elit klonların biyoteknolojik uygulama olan mikroçoğaltım ile çoğaltılabilirliği hakkında detaylı bilgi sunmaktadır.

2. ISLAH ÇALIŞMALARI

Kenevir bitkisinde ıslah amaçları lif kalitesi, lif verimi, CBD profili, çiçeklenme şekli, cinsiyet kontrolü (erkek çiçek kontrolü), belirli bir çevre için kenevir çeşidi geliştirilmesi olarak sıralanabilir (Salentijn vd. 2015). Mevcut çeşitler, seleksiyon, melezleme, hibrit ıslahı ve marker destekli seleksiyon gibi geleneksel yöntemlerle yetiştirilmektedir. Bununla birlikte, nispeten yeni ama etkili bir ıslah yöntemi olan genetik transformasyon, diğer birçok endüstriyel üründe kullanılmasına rağmen, kenevirde başarılı bir şekilde kullanılamamıştır (Ye, 2015). Wahby, Caba, ve Ligerio (2013) *Agrobacterium tumefaciens* ve *Agrobacterium rhizogenes* ile gen transformasyon için eksplant olarak fidelerin hipokotil kısımlarını kullanmışlardır. Schachtsiek, Warzecha, Kayser, ve Stehle (2018) çalışmalarında heterolog kannabinoid üretimi için *C. sativa* türüne *A. tumefaciens* ile gen transformasyonu yapmış ve transgenik hücrelerden bitki rejenerasyon protokolünü oluşturmak için biraz çaba sarf edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca ıslah çalışmaları için önemli olan kenevir bitkisi üzerinde anter ve ovul kültürleri hakkında da yeterli araştırma bulunmamaktadır. Anter ve ovul kültürü ile haploid bitki üretimi ıslah çalışmaları için önemli adımlardandır. Luwanska ve Wielgus (2009) anter kültürü çalışmalarında, bazı kenevir çeşitlerinde kallus üretimi gerçekleşirken, bazılarında gözlenmediğini bildirmişlerdir. Etkin bir *in vitro* sürgün rejenerasyonu protokolü genetik transformasyon, anter ve ovul kültürü çalışmaları için temel adım olmakla birlikte ıslah çalışmaları için de büyük öneme sahiptir. Çünkü kenevir genellikle dioik ve nadiren de monoik olup, rüzgar ile tozlaşan bir bitkidir. Dioik bir bitki olması sebebiyle tohumlardan ya erkek ya da dişi bitki meydana gelmektedir. Bu yüzden dioik bitkiler klasik ıslah yöntemleri ile ıslah çalışmalarında büyük sorunlar oluşturduğu gibi iş yükünü ve ıslah süresini arttırmaktadır.

Günümüzde, bilim adamları ıslah çalışmalarında klasik ıslahtan daha çok modern ıslah yöntemlerine (biyoteknolojik uygulamalara) yönelmiştir. Bunun sebebinin modern ıslah yöntemlerinin hem ekonomik hem de ıslah süresinin kısaltılmasında etkili olmasından kaynaklanmaktadır. Doku kültürü uygulamaları da en önemli modern ıslah yöntemlerinden biridir.

Islah çalışmalarında kullanılacak (ana/baba) anaçların kendi aralarında fazla varyasyon göstermesi istenmez. Örneğin seçilmiş ana anaç olarak kullanılacak bireylerin gen dizilimleri birbirine ne kadar yakın olursa, ıslah amacına uygun özellikleri içeren genotiplere daha kısa sürede ulaşılmada etkili olmaktadır. Doku kültürü uygulamalarından mikro çoğaltım tekniği ile bitki *in vitro* şartlarda kültüre alınıp, genetik olarak donör bitkinin birebir aynısı üretilebilmektedir. Bu şekilde arazi şartlarına gerek duymadan hızlı çoğaltım yöntemi ile aynı gen dizilime sahip ana ve baba klonlar hızlı bir şekilde *in vitro* şartlarda üretilebilmektedir. Bu şekilde ıslah çalışmalarında kullanılacak klonal koleksiyon elde edilmektedir.

Herhangi bir kenevir ıslah programlarının genetik ilerlemesi, türlerin allogami (çapraz döllenme) doğası nedeniyle seçilen ıslah amacına uygun elit genotiplerin tarla veya sera koşullarında korunmasındaki zorluk nedeniyle sınırlıdır. Bu nedenle elit klonların tohumla korunması imkansızdır. Bu gibi tıbbi türler için klonal koleksiyon daha avantajlıdır. Çünkü temsili numunelerden büyük miktarlarda ilgili ıslah özellikleri (örneğin yüksek fitokimyasal içeriği) için hedeflenen hatların korunmasını kolaylaştırabilir.

Fitokannabinoidlerin üretimi için dişi bitkiler, çeşitli nedenlerle erkek bitkilerin yerine tercih edilir. Birincisi, erkek bitkilerle karşılaştırıldığında, dişi bitkiler daha yüksek miktarda (erkeğine kıyasla 4-5 kat daha fazla) kannabinoid üretir. İkincisi, erkeklerin varlığında yüksek rüzgarla tozlaşan dişi bitkiler olgunlukta çok sayıda tohum üretirken, tohumuz bitkiler daha yüksek verimde sekonder metabolit üretmek için tercih edilir. Üçüncü, fitokimyasal açılarından birkaç kenevir çeşidi birlikte yetiştiriliyorsa, çeşitler arasında çapraz tozlaşma nihai ürünün kalitesini (kimyasal profilini) etkiler. Bu durumlardan kaçınmak için, erkek bitkilerin görüldükleri gibi uzaklaştırılması; daha yüksek metabolit içeriği için erkek klonlarının taranması ve biyoteknolojik araçlar kullanılarak korunması ve çoğaltılması; bir kenevir mahsulünün kimyasal profilinde farmasötik ilgi için tutarlılığı sağlamanın uygun bir yoludur. Bu yüzden, kenevir ıslahında *in vitro* sürgün rejenerasyonu önem arz etmektedir.

3. MİKROÇOĞALTIM UYGULAMALARI

Önceki çalışmalardan yararlanılarak bir kenevir bitkisinin *in vitro* çalışma aşamaları aşağıdaki gibi tespit edilmiştir.

3.1. Yüzey Sterilizasyonu

In vitro kültüre başlayabilmek için sera, tarla veya doğal ortamında yetişmiş bitki materyallerinin yüzey sterilizasyonu gereklidir. Genellikle tohumlar akan musluk suyu ve isteğe bağlı olarak %70-75 etanol ve ardından bir dezenfeksiyon reaktifi ile iyice yıkanmaktadır (Wang vd., 2009, Chaohua vd., 2016). Tohum sterilizasyonu için yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar %1-3 sodyum hipoklorittir (Wielgus, Luwanska, Lassocinski, & Kaczmarek, 2008, Chaohua vd., 2016). Ayrıca, %5 kalsiyum hipoklorit (Slusarkiewicz-Jarzina vd. 2005) ve %0.1 civa klorür (Wang vd., 2009) de kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda, *in vitro* kültürleri oluşturmak için bitkilerin nodal kısımları ve genç yaprakları doğrudan yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Bu eksplantların yüzeyleri tohumdan daha hassas oldukları için dezenfektan konsantrasyonu daha düşük olarak kullanılmıştır. Yani %0.1 Tween 20 ile %0.5 sodyum hipoklorit dezenfektanları kullanılmıştır (Wielgus vd., 2008, Lata, Chandra, Khan, & ElSohly, 2009a, Lata, Chandra, Khan, & ElSohly, 2010).

3.2. Eksplant Kaynağı

Bir *in vitro* kültür oluşturmak için eksplantların başlangıç materyalleri olarak seçilmesi mikroçoğaltma için çok önemli bir adımdır. Genel olarak, doğrudan rejenerasyon için meristematik dokular kullanılmaktadır. Eksplant olarak kotiledon, aksiller tomurcuk ve sürgün uçları kullanılarak, doğrudan organogenez ile *C. sativa* mikroçoğaltımı için protokoller oluşturulmuştur (Tablo 1) (Lata vd., 2009a, Wang vd., 2009, Chaohua vd., 2016). *C. sativa* türünde nodal segmentler ve apikal sürgün uçları, mikroçoğaltım/klonal çoğaltım ve germplazmın korunması için uygun eksplantlar olarak rapor edilmiştir (Bing, Ning, Jinfeng, & Nan, 2007, Lata vd., 2009a, Wang vd., 2009). İndirek sürgün rejenerasyonu için sürgün çoğaltımı ve köklendirmeden önce kallus oluşumu gerçekleştirilmiştir. Slusarkiewicz-Jarzina, Ponitka, ve Kaczmarek (2005) genç yapraklar, yaprak sapları, internodlar ve aksiller tomurcuklar arasında en yüksek kallus frekansı yaprak sapı ve genç yapraklardan elde edildiğini bildirmişlerdir. Lata vd. (2010) çalışmalarında yaprak eksplantlarından veya daha fazla haftada kallus ve *in vitro* sürgün oluşumu elde ettikleri bildirmişlerdir. Wielgus vd. (2008) eksplantlar arasında en yüksek rejenerasyonunun kotilen eksplantların sahip olduğu rapor etmiştir.

Tablo 1. *C. sativa* (kenevir) üzerinde *in vitro* çalışmalar ve mikro çoğaltım protokolleri

Eksplant	Sterilizasyon	Besin Ortamı	Bitki Büyüme Düzenleyici (PGR)		Rejenerasyon		Köklendirme		Referans
			Kullanılan	En Etkili	Türü	Eks. Oluşturan Sürgün %/Sayısı	En Etkili PGR/ Besin Ortamı	%	
Nodal segment	%0.5 NaOCl (%15 çamaşır suyu)	MS	BAP, Kinetin, TDZ	0.5 µM TDZ 2.5 µM TDZ 0.5 µM TDZ + 7.0 µM GA3 2.5 µM TDZ + 7.0 µM GA3	Direk sürgün	%100 %94 %93 %94	2.5 µM IBA	94	Lata vd., 2009a
Nodal segment	(Tohumlar)75% (v/v) etanol ve % 0.1 civa klorür	MS	BA, Kinetin, TDZ	0.1 mg/L TDZ 0.2 mg/LTDZ	Direk sürgün 3,2 adet	2,8 adet MS	1/2 MS 85	75	Wang vd., 2009
Kotiledon yapraklar	(Tohumlar) 75% (v/v) etanol ve % 3 NaOCl	MS	BA, TDZ, Zeatin, NAA	TDZ+NAA 0.4 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA	Kallus İndirek sürgün	sıkı, yeşil %51/3 adet	0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L IBA	80	Chaohua vd., 2016
Nodal segment	%0.5 NaOCl (%15 çamaşır suyu) + %0.1 tween 20	MS	BA, Kinetin, TDZ, GA3	0.5 µM TDZ 2.0 µM meta-topolin	Direk sürgün	%100/11.8 adet %100/13.4 adet	1/2 MS+2.0 µM IBA	92	Lata vd., 2016
Genç yaprak petiyol internod Aksileri sürgün	(Tohum) 5% Ca(ClO) ₂	MS	Kinetin, NAA, dikamba, 2,4 D	2.0 µM 2,4 D ve 2.0 µM Dikamba 2.0 µM Dikamba 1.0 µM Kinetin+0.5 µM NAA 2.0 µM 2,4 D ve 2.0 µM Dikamba	Kallus	%63 ve %65 83% 50% 24%			Slusarkiewicz-Jarzina vd., 2005
Yaprak		MS+B5		1mg/L 2,4-D + 1mg/L kinetin	Süspan-siyon kültürü				Flores-Sanchez vd., 2009
Kotiledon Gövde kök	(Tohumlar)75% (v/v) etanol ve % 0.1 civa klorür	Daria pro+ besin ortamı		1 mg/L Kinetin+ 0.05 mg/L NAA 0.2 mg/L BAP + 0.03 mg/L NAA	Kallus İndirek sürgün	%100 %14	2.0 mg/L IAA		Wielgus vd., 2008

Eksplant	Sterilizasyon	Besin Ortamı	Bitki Büyüme Düzenleyici (PGR)		Rejenerasyon		Köklendirme		Referans
			Kullanılan	En Etkili	Türü	Eks. Oluşturan Sürgün %/Sayısı	En Etkili PGR/ Besin Ortamı	%	
Hipokotil Kotiledon Yaprak	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>				Kök kültürü			67	Wahby vd., 2013
Callus	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>			4.0 mg/L NAA	Kök kültürü			83	Farag ve Kayser, 2015
Genç internod		MS	6-BA, kinetin, NAA	1 mg/L	Callus kültürü				Jiang vd., 2015
				6-BA + 0.5 mg/L NAA					
				1 mg/L					
				6-BA + 1.0 mg/L NAA					
				1 mg/L	İndirek sürgün			%65.0	
				Kinetin+ 0.5 mg/L NAA					
Yaprak Gövde	(Tohumlar)75% (v/v) etanol ve %2 NaOCl	MS ½ MS	Agrobacterium rhizogenes		Kök kültürü			63	Berahmand vd., 2016
								68	
								50	
								63	
Nodal segment Sürgün	Tohumlar)75% (v/v) etanol ve %5 NaOCl	½ MS, %20 sukroz	1.0 mg/L BAP	Direk sürgün kültürü	%23.8 %69.7	1/2 MS+0.5 mg/l IAA 1/2 MS+0.5 mg/l IBA		74	Wróbel, Dreger, Wielgus, & Słomski, 2020
			0.25 mg/L TDZ					66	

Kısaltmalar: PGR bitki büyüme düzenleyicileri, MS Murashige ve Skoog ortamı, B5 gamborg besin ortamı, BA benziladenin, TDZ thidiazuron, GA3 giberellik asit, IAA indol asetik asit, IBA indol butirik asit, TDZ thidiazuron, NAA naftalin asetik asit, 2,4 D 2,4 Diklorofenoksi asetik, BAP benzil amino pürin.

3.3. Besin Ortamı

In vitro kültürler için yapay ortamlar genellikle makro besinler, mikro besinler, karbon kaynakları ve vitaminlerden oluşur. İsteğe bağlı katılaştırıcı ve bazı katkı maddeleri ile bitki büyüme düzenleyicileri (PGR) ilave edilmektedir. *C. sativa* ekimi için en sık kullanılan bazal ortam, Murashige ve Skoog (MS) ortamı (Murashige ve Skoog 1962) olup, karbon kaynağı olarak %3 (a/h) sükrözdür. Sadece bir çalışmada PGR ile destelenmiş Daria pro+ ortamı, kallustan bitki rejenerasyonu için kullanılmıştır (Wielgus vd., 2008). *In vitro* kültür şartları olarak, genellikle 22-26 °C ile 16 saat fotoperiyot kullanılmıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda karanlıkta tohum çimlenmesi ve kallus oluşumu gerçekleşmiştir (Slusarkiewicz-Jarzina vd., 2005, Wielgus vd., 2008).

Kültür koşulları ve ışık kaynaklarının *C. sativa* bitki rejenerasyonu üzerindeki etkileri hakkında yeterince detaylı bilgi bulunmamaktadır. Çelik aracılığıyla tarla kültürleri için klonal çoğaltımlarda kırmızı-mavi ve kırmızı-yeşil-mavi ışık ile ışıklandırıldığında tomurcuk biyokütlesi ve fitokimyasal profillerin iyileştiği bildirilmiştir (Hawley, Graham, Stasiak, & Dixon 2018).

3.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri (PGR)

Bitki büyüme düzenleyicileri, özellikle oksinler ve sitokininler, bitki doku kültürlerinin *in vitro* gelişimi, morfogenez ve büyümesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (George, Hall, & Klerk, 2008).

Sürgünler doğrudan eksplantlardan (direkt organogenez) veya genellikle uygun oksin ve sitokinin kombinasyonunu içeren kallus (dolaylı organogenez) yoluyla indüklenebilir. Sürgün uzaması ve çoğalmasından sonra, adventif kök oluşumu uyarılır. Sürgün gelişimi için en etkili bitki büyüme düzenleyicisinin TDZ olduğu birçok araştırmada rapor edilmiştir (Tablo 1) (George vd., 2008, Wang vd., 2009, Lata vd., 2009a). Hatta TDZ yanında kinetin, BA, BAP, GA3 veya NAA kombinasyonlarında etkili olduğu bildirilmiştir (Lata vd., 2009a, Wang vd., 2009, Chaohua vd., 2016). Ayrıca önceki birçok çalışmada kallustan indirek sürgün rejenerasyonu elde edildiği tespit edilmiştir (Jiang, Xia, Tang, Han, & Han, 2015, Chaohua vd., 2016). Chaohua vd. (2016) çalışmalarında lif kalitesi açısından önemli *C. sativa* genotiplerinin *in vitro* kotiledon yapraklarında indirek sürgün gelişiminin TDZ ve NAA içeren MS besin ortamında olduğunu ve erken yaşta (2-3 günlük) bitkiciklerden kullanılan kotiledon yapraklarının daha iyi rejenerasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Galán-Ávila, García-Forteza, Prohens, ve Herraiz (2020) çalışmalarında en yüksek sürgün rejenerasyonunu, kotiledon eksplantları için 0.4 mg/l TDZ + 0.2 mg/l NAA hormonların kombinasyonundan, hipokotil eksplantlarında ise 2 mg/l zeatin riboside ve 1 mg/l zeatin riboside + 0.02 mg/l NAA ortamlarından elde ettikleri bildirmişlerdir.

In vitro sürgünlerin köklenmeleri için en etkili ortamın IBA içeren MS besin ortamının olduğu tespit edilmiştir (Lata vd., 2009a, Wang vd., 2009, Chaohua vd., 2016, Lata, Chandra, Techen, Khan, & ElSohly, 2016).

In vitro fidelerin dış ortama başarılı bir şekilde alıştırılması birçok araştırmacı tarafından kaydedilmiştir (Wang vd., 2009, Lata, Chandra, Khan, & Elsohly, 2009b).

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, kenevir bitkisinin farklı eksplant, besin ortamı ve PGR kaynaklarından elde edilen mikroçoğaltım protokolleri açıklanmıştır. Elde edilen verilere göre kenevir bitkinin *in vitro* şartlarda çoğaltımı için ½ MS besin ortamının, TDZ bitki büyüme düzenleyicinin etkili olduğu gözlenmiştir. TDZ düşük dozlarda daha etkili olmuştur. Ayrıca zeatin riboside büyüme düzenleyicisinde sürgün oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Bu besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri kenevirin yetiştirme amaçları ve germplazmin korunması için başarıyla uygulanabilir.

Türkiye'nin birçok ilinde yasal izin çerçevesinde kenevir tarımına izin verilmiştir. Bu yüzden Türkiye koşullarına ve amaca uygun kenevir çeşitlerin geliştirebilmesi için ıslah çalışmaları önem arz etmektedir. Islah süresinin kısaltılabilmesi için *in vitro* klonal bitki çoğaltım protokolünün tespit edilmesi gerekmektedir. Önceki mikroçoğaltım çalışmalarında göz önüne alınarak mikroçoğaltım protokolü geliştirilmelidir. Bu amaçla bu çalışma yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aytaç, S., Ayan, A.K., Arslanoğlu, Ş.F., Gizlenci, Ş., Çelik, A.E. (2017). Kenevir populasyonlarından THC oranı düşük genotiplerin geliştirilmesi. ARGE projesi TÜBİTAK. Basılmamış, Samsun.
- Berahmand, F., Beizaee, N., Dehghan Nayyeri, M., Sharafi, A., Kheiri Manjili, H., Danafar, H., et al. (2016). Cannabis sativa L. genetically transformed root based culture via Agrobacterium rhizogenes. *Pharm Biomed Res.*, 2(3),13-18.
- Bing, X., Ning, L., Jinfeng, T., & Nan, G. (2007). Rapid tissue culture method of Cannabis sativa for industrial uses. CN, 1887043, 9.
- Chaohua, C., Gonggu, Z., Lining, Z., Chunsheng, G., Qing, T., Jianhua, C., et al. (2016). A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (Cannabis sativa L.). *Ind Crops Prod.*, 83, 61-65.
- De Meijer, E. (1995). Fibre hemp cultivars: a survey of origin, ancestry, availability and brief agronomic characteristics. *J. Int. Hemp Assoc.*, 2, 66-73.
- Farag, S., & Kayser, O. (2015). Cannabinoids production by hairy root cultures of Cannabis sativa L. *American Journal of Plant Sciences*, 6,1874-1884.
- FAO (2018). Kenevir ekim alanları veritabanı.<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.20.10.2020>.
- Fitzcharles, M., Clauw, D.J., & Hauser, W. (2020). A cautious hope for cannabidiol (CBD) in rheumatology care. *Arthritis Care & Research*.
- Flores-Sancheza, I.J., Peřc, J., Fei, J., Choia, Y.H., Duřsek, J., & Verpoorte, R. (2009). Elicitation studies in cell suspension cultures of Cannabis sativa L. *Journal of Biotechnology*, 143, 157-168.
- Galán-Ávila, A., García-Forte, E., Prohens, J., & Herraiz, F.J. (2020). Development of a direct in vitro plant regeneration protocol from Cannabis sativa L. Seedling explants: developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00645>.
- George, E.F., Hall, M.A., & Klerk, G.J.D. (2008). *Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors*. In: George EF, Hall MA, Klerk GJD, editors. *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht: Springer, p.175-204.
- Hawley, D., Graham, T., Stasiak, M., & Dixon, M. (2018). Improving Cannabis bud quality and yield with subcanopy lighting. *Hortscience*, 53(11), 1593-9.
- Jiang, Y., Xia, Z., Tang, Y., Han, Q., & Han, C. (2015). Preliminary studies on the tissue culture of Cannabis sativa L. (Industrial hemp). *Agricultural science&Technology*, 16(5), 923-925.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I., & ElSohly, M.A. (2009a). Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of Cannabis sativa L. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 45, 12-19.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I., & ElSohly, M.A. (2010). High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ^9 -tetrahydrocannabinol yielding Cannabis sativa L. *Planta Med.*, 76, 1629-1633.
- Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A., & Elsohly, M.A. (2009b). Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of Cannabis sativa L. - an important medicinal plant. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15, 79-86.
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I.A., & ElSohly, M.A. (2016). In vitro mass propagation of Cannabis sativa L.: a protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *J Appl Res Med Aromat Plants*, 3, 18-26.

- Luwanska, A., & Wielgus, K. (2009). Anther culture and callus induction in *Cannabis sativa*. *New Biotechnology*, 255, 302.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Papadopoulou, E., Bikiaris, D., Chrysafis, K., Wladyka-Przybylak, M., Wesolek, D., Mankowski, J., et al. (2015). Value added industrial products from bast fiber crops. *Ind. Crops Prod.*, 68, 116-125.
- Quimby, M. (1974). *Botany of Cannabis sativa*. In: Mateos-Gomez JL (ed) Archivos de investigacion medica. El Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Salentijn, E.M.J., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., & Trindade, L.M. (2015). New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Ind Crops Prod.*, 68, 32-41.
- Schachtsiek, J., Warzecha, H., Kayser, O., & Stehle, F. (2018). Current perspectives on biotechnological cannabinoid production in plants. *Planta Med.*, 84(04), 214-220.
- Slusarkiewicz-Jarzina, A., Ponitka, A., & Kaczmarek, Z. (2005). Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biol Cracov Ser Bot.*, 47, 145-51.
- Wahby, I., Caba, J.M., & Ligeró, F. (2013). Agrobacterium infection of hemp (*Cannabis sativa* L.): establishment of hairy root cultures. *J Plant Interact.*, 8, 312-320.
- Wang, R., He, L.S., Xia, B., Tong, J.F., Li, N., & Peng, F.A. (2009). A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture. *Pak. J. Bot.*, 41, 603-608.
- Wielgus, K., Luwanska, A., Lassocinski, W., & Kaczmarek, Z. (2008). Estimation of *Cannabis sativa* L. tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration. *J Nat Fibers.*, 5, 199-207.
- Wróbel, T., Dreger, M., Wielgus, K., & Słomski, R. (2020). Modified Nodal Cuttings and Shoot Tips Protocol for Rapid Regeneration of *Cannabis sativa* L. *Journal of Natural Fibers*, DOI: 10.1080/15440478.2020.1748160.
- Ye, X. (2015). Development and application of plant transformation techniques. *J.Integr. Agric.*, 14, 411-413.