



***IN VITRO* MİKROÇOĞALTIMLA ELDE EDİLEN *Hibiscus sabdariffa* L.
BİTKİSİNDE KURAKLIK STRESİNİN MORFOLOJİK ETKİLERİ**

ALPER CAN BAŞBUĞOĞLU

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Şeyda SAVALAN

2025

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



IN VITRO MİKROÇOĞALTIMLA ELDE EDİLEN *Hibiscus Sabdariffa* L.
BİTKİSİNDE KURAKLIK STRESİNİN MORFOLOJİK ETKİLERİ

Alper Can BAŞBUĞOĞLU

ORCID: 0009-0008-4398-3891

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Doç. Dr. Şeyda SAVALAN

TEMMUZ-2025

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

IN VITRO MİKROÇOĞALTIMLA ELDE EDİLEN *Hibiscus sabdariffa* L. BİTKİSİNDE KURAKLIK STRESİNİN MORFOLOJİK ETKİLERİ

Alper Can BAŞBUĞOĞLU

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Şeyda SAVALAN

Hibiskus (*Hibiscus sabdariffa* L.), kökeni Afrika olan ve genellikle Sudan, Tayvan, Tayland gibi sıcak iklim bölgelerinde yetişen dikkat çekici bir bitkidir. Çanak yapraklarından elde edilen kırmızı pigmentin yüksek kalitesi nedeniyle doğal gıda renklendiricisi olarak kullanımı artmaktadır. Sıcak ve kurak iklim koşullarına uyum yeteneği, düşük toprak kalitesinde yetişebilmesi gibi avantajları sayesinde tarımsal potansiyeli yüksektir. Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de tarımı henüz yaygın olmayan ve ekonomik değeri yüksek hibiskus bitkisinin in vitro koşullarda mikroçoğaltımını gerçekleştirmek ve PEG kaynaklı kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerde ortaya çıkan fenotipik değişiklikleri inceleyerek stres tolerans sınırlarını belirlemektir. Sterilizasyon işlemleri kapsamında %15, %20, %25 ve %30 oranlarında sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) ile cıva klorür ($HgCl_2$) kullanılmış, %0,1 $HgCl_2$ ile 10 dk süreyle yapılan uygulamanın en başarılı sterilizasyon sağladığı belirlenmiştir. *In vitro* mikroçoğaltım için en iyi sonuç, Murashige and Skoog (MS) besin ortamına 3 mg/L TDZ (thidiazuron), 1,5 mg/L NAA (naftalen asetik asit) ve 1 mg/L GA (giberellik asit) eklenerek elde edilmiştir. Kuraklık stresine karşı tolerans değerlendirilmesi amacıyla köklendirilmiş bitkiler, PEG₆₀₀₀ (polietilen glikol) içeriği sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 g/L olan MS ortamlarına aktarılmıştır. Artan PEG konsantrasyonları ile bitkilerde belirgin fenotipik stres tepkileri gözlenmiştir. Bu tepkiler arasında nekroz oluşumu, kök kısılması, yaprak küçülmesi ve boy uzunluğunda azalma yer almaktadır. Çalışma sonucunda kuraklık stresine karşı dayanıklılık gösteren örnekler seçilmiş ve bu bitkiler iklim odasında aklimatize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Hibiscus sabdariffa* L., *in vitro*, Mikroçoğaltım, Köklendirme, TDZ, PEG₆₀₀₀

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL EFFECTS OF DROUGHT STRESS ON *Hibiscus sabdariffa* L. OBTAINED BY *IN VITRO* MICROPROPAGATION METHOD

Alper Can BAŞBUĞOĞLU

Department of Agricultural Biotechnology

MSc. Thesis

Supervisor: Associate Prof, Dr. Şeyda SAVALAN

Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) is a remarkable plant species native to Africa and commonly cultivated in warm climate regions such as Sudan, Taiwan, and Thailand. Due to the high quality of the red pigment extracted from its calyces, it has gained increasing demand as a natural colorant and food dye. Its adaptability to hot and arid climates and ability to grow in low-quality soils contribute to its high agricultural potential. The aim of this study is to perform *in vitro* micropropagation of the economically valuable but not yet widely cultivated hibiscus plant in Turkey, and to determine its drought stress tolerance limits by analyzing phenotypic changes in plants exposed to polyethylene glycol (PEG)-induced stress. During the sterilization process, sodium hypochlorite (bleach) at concentrations of 15%, 20%, 25%, and 30%, along with mercuric chloride (HgCl₂), were tested. The most successful sterilization was achieved using 0.1% HgCl₂ for 10 minutes. The best *in vitro* micropropagation results were obtained using Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 3 mg/L TDZ (thidiazuron), 1,5 mg/L NAA (naphthaleneacetic acid), and 1 mg/L GA (gibberellic acid). To assess drought tolerance, rooted plantlets were transferred to MS media containing PEG₆₀₀₀ at concentrations of 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 g/L. With increasing PEG concentrations, notable phenotypic stress responses were observed, including necrosis, root shortening, leaf reduction, and a decrease in plant height. As a result of the study, plant specimens showing resilience to drought stress were selected and acclimatized in a climate chamber.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., *in vitro*, Micropropagation, Rooting, TDZ, PEG₆₀₀₀

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TEŞEKKÜR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	7
1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM	14
2.1 Materyal	14
2.1.1 Bitki Materyali	14
2.1.2 Besin Ortamı ve <i>In Vitro</i> Kültür Koşulları	14
2.2 Yöntem.....	15
2.2.1 Eksplant Alımı ve Yüzey Sterilizasyonu	15
2.2.2 Çimlenen Tohumların mikroçoğaltımı için Farklı Besin Ortamlarına Aktarılması	18
2.2.3 Gelişen Sürgünlerde Köklenme Çalışmaları.....	18
2.2.4 Kuraklık Stresi (PEG Uygulaması) Denemesi.....	19
2.2.5 Dış Koşullara Alıştırma (Aklimatizasyon)	19
2.2.6 İstatistiksel Değerlendirme	20
3. BULGULAR	21
3.1 Yüzey Sterilizasyonu Bulguları	21
3.2 <i>In vitro</i> Mikroçoğaltım Denemeleri Sonucu Elde Edilen Bulgular	23

3.2.1 Eksplant Başına Sürgün Sayısı Ortalaması.....	25
3.3 PEG Uygulamalarının Hibiskus Üzerindeki Kuraklık Stresi Etkileri.....	26
3.4 <i>In vitro</i> Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon)	28
4. TARTIŞMA	30
4.1 Yüzey Sterilizasyonu	30
4.2 Mikroçoğaltım.....	31
4.3 Köklendirme	32
4.4 PEG Uygulaması.....	32
4.5 Dış koşullara Alıştırma (Aklimatizasyon)	33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	35
KAYNAKLAR	37
TEZDEN ÜRETİLMİŞ ESERLER	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Hibiskus Meyvesinin Besin İçeriği	5
Çizelge 2.1. Çalışmada Kullanılan Besin Ortamlarının İçerikleri.....	15
Çizelge 2.2. Çamaşır Suyu (NaOCl) Sterilizasyon Uygulaması	17
Çizelge 2.3. Cıva Klorür (HgCl ₂) Sterilizasyon Uygulaması	17
Çizelge 2.4. Hibiskus Bitkisinde Sürgün Oluşumu Çalışmalarında Kullanılan Bitki Büyütme Düzenleyicileri ve Ortam Kombinasyonları.....	18
Çizelge 2.5. Kuraklık Denemesi İçin Kullanılan Ortamların PEG Konsantrasyonları	19
Çizelge 3.1. Farklı BBD Konsantrasyonlarının Hibiskus Boğum Eksplantlarından <i>In Vitro</i> Mikroçoğaltımına Ait Varyans Analiz Sonuçları	25
Çizelge 3.2. Farklı PEG Konsantrasyonlarında Bitki Morfolojik Özelliklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Hibiskus bitkisinin genel görünümü	1
Şekil 1. 2. Hibiskusun Sudan'da yayılış gösterdiği alanlar	3
Şekil 1. 3. Hibiskus taze ve kurutulmuş tohum şekli	4
Şekil 2. 1. Bitki materyalinin (hibiskus tohumu) temin edildiği marka bilgileri.....	14
Şekil 2. 2. Tohum sterilizasyonunda kullanılan çamaşır suyu oranları	16
Şekil 2. 3. Otoklavda steril edilmiş sterilizasyon malzemeleri.....	18
Şekil 3. 1. Cıva klörür çalışması sonucu çimlenen hibiskus tohumları.....	22
Şekil 3. 2. Çamaşır suyu ile sterilizasyon sonuçları	23
Şekil 3. 3. Cıva klörür çalışması sonucu çimlenen hibiskus tohumları.....	23
Şekil 3. 4. L3 ortamında gelişen sağlıklı sürgünler	25
Şekil 3. 5. Sırasıyla farklı PEG oranlarında gelişim süreçleri takip edilen eksplantlar.....	27
Şekil 3. 6. Kuraklık stresine maruz bırakılan eksplantların oran arttıkça gözlenen gelişim kayıpları	28
Şekil 3. 7. Bitkilerin <i>in vitro</i> ortamdan saksılara aktarılması	29

SİMGELER DİZİNİ

°	Derece
μ	Mikro
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
BAP	6-Benzilaminopürin
Cm	Santimetre
Dk	Dk
E. B. S. S. O.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı Ortalaması
Fe-EDDHA	Ethylenediamine di-2-hydroxyphenyl acetate ferric
g	Gram
GA3	Giberellik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HgCl ₂	Cıva II Kolorür
IBA	İndol 3-Butirik Asit
K. O. O.	Kök Oluşum Oranı
K. S. O.	Kök Sayısı Ortalaması
K. S. S.	Köklenen Sürgün Sayısı
K. U. O.	Kök Uzunluğu Ortalaması
ml	Mililitre
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı
NAA	Naftalin Asetik Asit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
S.O.O.	Sürgün Oluşum Oranı
S.U.O.	Sürgün Uzunluğu Ortalaması
Sn.	Saniye
TDZ	Thidiazuron
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

TEŞEKKÜR

Doku kültürü çalıŐmalarına baŐlamamı sağlayan, tezimin her aşamasında değerli fikirleriyle yön veren ve tecrübelerini bana aktaran DanıŐmanım Sayın Doç. Dr. Şeyda SAVALAN'a çok teşekkür ederim.

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı ğretim üyelerine ve yüksek lisans eğitimime baŐladığımda katkılarını unutamayacağım Sayın Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŐ, Doç. Dr. Yusuf SÜRMELİ ve ArŐ. Gör. İbrahim UZ'a teşekkür ederim.

Bu süreçte benden desteklerini esirgemeyen ve bu yolda beni cesaretlendiren aileme teşekkür ederim.

Alper Can BAŞBUĞOĞLU

Ziraat Mühendisi

1. GİRİŞ

H. Sabdariffa, sıcak iklimlere özgü, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak yetiştirilen bir bitki türüdür. Kökeninin Afrika olduğu düşünülmekte olup; Sudan, Tayland ve Tayvan gibi ülkelerde geleneksel olarak ekimi yapılmaktadır. Farklı coğrafyalarda farklı isimlerle anılmaktadır: İngiltere’de Roselle, Fransa’da I’Oiselle, Arap ülkelerinde Kerkedah, Tayland’da Krachiap Doeng, Batı Sudan’da Bissap ve Jamaika’da Spanish olarak bilinmektedir (Olsson, 1973). Hibiskus, *Malvaceae* (ebegümecigiller) familyasına aittir, Malvales takımında yer alır.

Bitki 2-2,5 metreye kadar boylanabilen, yıllık ya da çok yıllık formda gelişebilen otsu ya da odunsu yapıdadır. Yaprakları 3-5 loblu ve alternat dizilimlidir; sap uzunluğu 8-15 cm’ye kadar çıkabilir. Çiçekleri 8-10 cm çapında olup beyazdan soluk sarıya kadar değişen renklere sahiptir ve çanak yapraklarının tabanında kırmızı bir leke bulunur. En dikkat çekici yapısı, etli ve kalınlaşmış çanak yapraklardan oluşan kalikslerdir. Kaliks çapı 1-2 cm olup 3,5 cm’ye kadar büyüebilmektedir (Patel, 2014) (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. Hibiskus bitkisinin genel görünümü

Hibiskus, gün uzunluğundaki değişikliklere hassas bir bitkidir ve bu nedenle ekim zamanı gün uzunluğu dikkate alınarak belirlenmelidir. Derin köklü yapısından dolayı, ekim öncesi toprak işleme derin sürümle yapılmalıdır. Verimli üretim için hektar başına 1-2 ton gübre önerilmektedir. Tohumlar yaklaşık 2,5 cm derinliğe ekilir ve sıra aralığı 60-100 cm, sıra üzeri mesafe ise 45-60 cm olacak şekilde düzenlenmelidir (Singh vd., 2017).

Çiçeklenme genellikle günlerin kısalmaya başladığı Eylül-Ekim aylarında başlar. Çiçekler yalnızca bir gün açık kalır. Bitkilerde meyve gelişimi alt kısımdan başlayarak yukarıya doğru ilerler. Sudan gibi üretici ülkelerde, bazı üreticiler tohumların tamamen olgunlaşmasına ve yaprakların dökülmesine kadar beklemektedir (Singh vd., 2017).

Hibiskus, dünya genelinde tıbbi, gıda ve kozmetik amaçlarla geniş kullanım alanına sahip olan önemli bir kültür bitkisidir. Tropikal ve subtropikal iklimlerde yaygın olarak yetiştirilen bu tür, pek çok ülkede ekonomik değeri yüksek bir tarımsal ürün olarak öne çıkmaktadır (Abeda, Rahman ve Ahmed 2014).

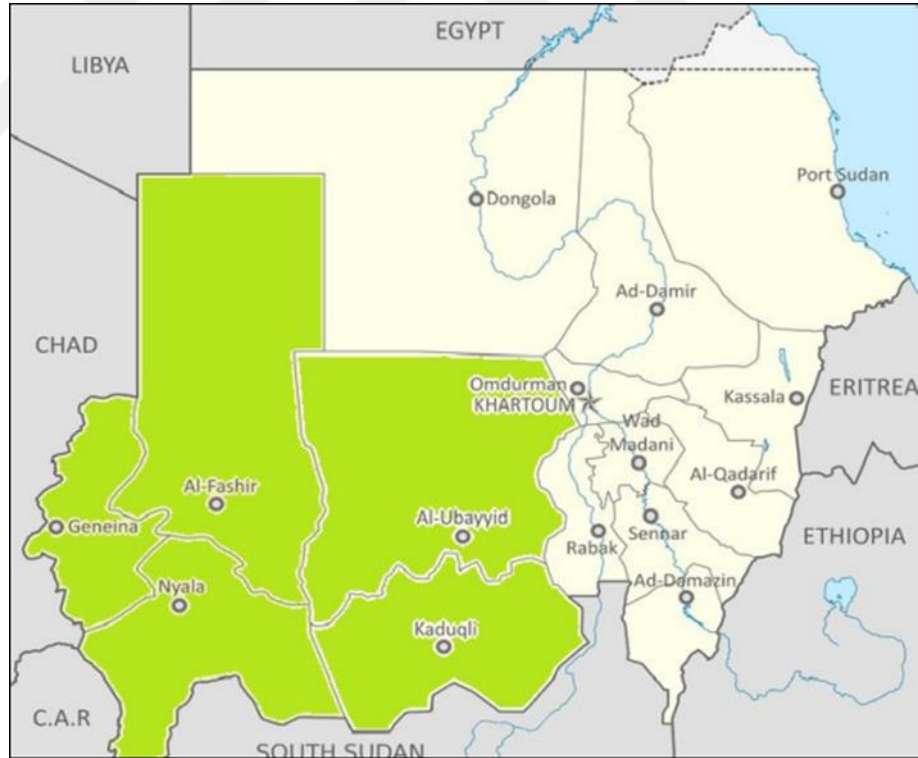
Meksika, yıllık yaklaşık 20.000 tonluk üretimiyle dünya hibiskus üretiminde ilk sıralarda yer almakta ve ihracat açısından da önemli bir paya sahiptir (CIRAD, 2018). Afrika kıtasında ise Nijerya yılda 10.000 tonun üzerinde üretimle dikkat çekmekte, Sudan ise yıllık yaklaşık 8.000 ton üretim gerçekleştirmektedir (Şekil 1.2) (Ahmed vd., 2019; Ojo, Musa ve Adewale, 2019). Tanzanya ve Kenya'da sırasıyla 4.000 ton ve 2.500 ton üretim rapor edilmiştir (Mbonile vd., 2018; Odhiambo vd., 2017).

Asya kıtasında Hindistan, yılda ortalama 5.000 tonluk üretimiyle öne çıkarken; Çin'de bu rakam yaklaşık 3.000 ton olarak bildirilmektedir (Bhuiyan vd., 2020; Zhang vd., 2021). Amerika kıtasında ise Amerika Birleşik Devletleri'nin Hawaii ve Kaliforniya eyaletlerinde yaklaşık 1.000 ton hibiskus üretimi gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Murray vd., 2020).

Bu ülkelerin üretim kapasiteleri, dünya genelindeki hibiskus talebinin giderek arttığını göstermektedir. Özellikle Meksika, Tayland ve Sudan gibi tropikal iklim kuşaklarında yetiştirilen hibiskus bitkileri, yüksek antosiyanin içeriği ve renk kaliteleriyle kalite açısından öne çıkmaktadır. Tayland, yoğun antosiyanin içeriği ile bilinirken; Sudan'da üretilen hibiskus, yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle tercih edilmektedir. Bu bağlamda, hibiskusun bu ülkelerde stratejik bir tarımsal ürün olarak değerlendirildiği söylenebilir (Bux vd., 2020).

2023 yılı itibarıyla yenilebilir hibiskus pazarının küresel ekonomik büyüklüğü yaklaşık 5,24 milyar ABD doları olarak hesaplanmıştır. Pazarın 2030 yılına kadar 7,77 milyar dolara ulaşması öngörülmektedir. Bu büyümenin temel nedenleri arasında hibiskusun antioksidan kapasitesi, doğal renklendirici özelliği ve sağlığa katkı sağlayan fonksiyonel bileşenleri yer almaktadır (IMARC Group, 2024). Ticari açıdan en değerli bitki kısmı olan etli kalikslerin 2024 yılı itibarıyla piyasa değeri yaklaşık 129,7 milyon ABD doları olarak rapor edilmiştir. Meksika'nın hibiskus ihracatından elde ettiği yıllık gelir yaklaşık 35 milyon dolara ulaşmakta ve ihracatın büyük bölümü Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa pazarlarına yönelmektedir (CIRAD, 2018).

Sudan'da hibiskus ihracatı ülke ekonomisine yıllık ortalama 21 milyon dolar katkı sağlarken; Nijerya'da özellikle Kano ve Jigawa eyaletlerinde üretim yapılan hibiskus, kırsal kesim için önemli bir geçim kaynağıdır. Nijerya'nın 2018 yılı itibarıyla hibiskus ihracat geliri 12 milyon doları aşmıştır (Ojo vd., 2019). Hindistan'da hibiskus temelli ürünlerin toplam ticari değeri ise yaklaşık 10 milyon dolar olarak bildirilmektedir (Bhuiyan vd., 2020).



Şekil 1. 2. Hibiskusun Sudan'da yayılış gösterdiği alanlar yeşil renkle gösterilmiştir (Mohamed, Sulaiman ve Dahab, 2012).

Hibiskus, aralık sonlarından itibaren hasat edilir. Hasat, tohumların olgunluğuna göre zamanlanır; etli çanaklar, çiçek düştükten sonra ancak tohum kapsülü kuruyup açılmadan önce

toplanır. Kapsülün bitkide kalma süresi uzadıkça çanak yaralar, güneş çatlaması ve kalite kaybına daha yatkın hale gelir. Tüm hasat işlemi elle yapılır ve toplam verim hektar başına yaklaşık yarım ton civarındadır (Olaniyi ve Adebayo, 2018).

Hibiskus, sıcak iklim bitkisi olup özellikle kalınlaşan sepalleriyle elde edilen kırmızı meyve kapsülleri ile bilinir (Şen, 2011). Ayrıca, hibiskus bitkisinin tohumları böbrek şeklinde, obovoid (yumurtamsı), tüylü ya da tüysüz olabilmekte ve bol miktarda endosperm içermektedir. Tohum yapısındaki bu özellikler hem bitkinin taksonomik tanımlamasında hem de çoğaltılmasında önemli rol oynamaktadır (Xu ve Deng, 2017) (Şekil 1.3). Roselle olarak da bilinen Hibiskus, geleneksel tıbbi kullanımlarının yanı sıra ferahlatıcı içeceklerin, tatlıların gıdaların ve dondurmaların renklendirilmesinde de kullanılan doğal bir üründür (Oduro ve Ellis, 2022).



Şekil 1. 3. Hibiskus taze ve kurutulmuş tohum şekli

Hibiskusun farklı organları protein, karbonhidrat, yağ, vitamin ve mineral bakımından çeşitli oranlarda besin değerleri içerir. Özellikle tohumlar protein ve yağ bakımından zengin olup, kaliksler ise yüksek kalsiyum içeriğiyle dikkat çeker. Bu besin değerleri, gıda ve endüstri alanlarında geniş kullanım potansiyelini desteklemektedir (Çizelge 1.1; Singh vd., 2017).

Çizelge 1.1. Hibiskus Meyvesinin Besin İçeriği (100 gr) (Singh vd., 2017)

Besin Ögesi	Kaliksler	Tohumlar	Yapraklar
Protein (g)	2	28.9	3.5
Karbonhidrat (g)	10.2	25.5	8.7
Yağ (g)	0.1	21.4	0.3
A Vitamini	-	-	1000
Tiamin (g)	0.05	0.1	0.2
Riboflavin (g)	0.07	0.15	0.4
C Vitamini (mg)	17	9	2.3
Kalsiyum (mg)	150	350	240
Demir (g)	3	9	5

Hibiskus bitkisi, özellikle kalikslerinde yüksek miktarda antosiyanin pigmentleri içerir. Bu bitkiden elde edilen özler, geleneksel tıpta karaciğer hastalıkları, yüksek tansiyon ve ateş gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Hibiskus türleri üzerine yapılan bilimsel araştırmalar, bu bitkilerin kan basıncını düşürme, idrar söktürme, antitümör, kan şekeri düşürücü, nöbet önleyici, parazit karşıtı, antioksidan ve genetik hasarı önleyici gibi birçok faydalı biyolojik etkisi olduğunu göstermiştir (Da-Costa-Rocha vd., 2014). Bu bitki gıda endüstrisinde de yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. Reçel, jöle, dondurma gibi gıdalarda lezzet ve renk vermek için kullanılır. Ayrıca, tekstil ve boya endüstrisinde doğal boyaların üretiminde de kullanılır. Bu, doğal kaynaklardan elde edilen ve çevre dostu renklendirme maddelerine olan talebin arttığı bir dönemde bitki üzerine yapılan bilimsel çalışmaların önemini artırmıştır (Adeyemo ve Ojo, 2017).

Hibiskus bitkisi, özellikle çanak yapraklarında yoğun olarak bulunan antosiyanin bileşikleri sayesinde doğal gıda renklendirici üretiminde önemli bir kaynak olarak değerlendirilmektedir. Antosiyaninler, bitkiye kırmızıdan mora değişen tonlarda renk veren flavonoid sınıfı pigmentlerdir ve su bazlı ekstraksiyonla kolayca elde edilebilmektedir (Tsai vd., 2002). Bu doğal pigmentler, özellikle gıda, kozmetik ve tekstil endüstrisinde sentetik boyalara alternatif olarak tercih edilmektedir. Sentetik boyaların çevresel ve sağlık açısından oluşturduğu riskler, tüketici talebinin de doğal alternatiflere yönelmesine neden olmuştur (Zhao vd., 2020).

Tekstil endüstrisinde yapılan çalışmalar, hibiskus ekstralarının pamuklu kumaşlar üzerinde başarılı bir şekilde renklendirme sağladığını göstermektedir. Özellikle asidik ortamda yapılan uygulamalarda renk canlılığı ve tutunma düzeyi daha yüksek bulunmuştur (Kumar ve Bhowmik, 2010). Antosiyanin esaslı boyaların dezavantajlarından biri olan ışık ve ısı stabilitesi, uygun fiksatif maddeler ve çapraz bağlayıcı kimyasallar kullanılarak geliştirilebilmektedir. Ayrıca bu doğal boya, toksik olmayan yapısıyla sürdürülebilir üretim modellerine katkı sağlamaktadır (Rodriguez-Saona ve Wrolstad, 2001).

Yapılan bir başka çalışmada, hibiskus çanak yapraklarından elde edilen boyaların, pH değişimine bağlı olarak renk değiştirme özellikleri nedeniyle akıllı ambalaj sistemlerinde kullanılabileceği de bildirilmiştir (Patel, 2021). Bu yönüyle bitki, yalnızca dekoratif değil; aynı zamanda işlevsel ve çevresel izleme kapasitesine sahip boyar madde kaynağı olarak öne çıkmaktadır. Hem geleneksel kullanımlar hem de güncel teknolojik yaklaşımlar göz önünde bulundurulduğunda, hibiskusun boya endüstrisindeki potansiyeli oldukça geniş bir uygulama alanını kapsamaktadır.

Bitki doku kültürü, geleneksel yöntemlerle çoğaltılması güç olan bitkilerin hızlı ve etkili bir şekilde çoğaltılmasında, bitki hastalıklarına karşı somaklonal varyasyonlar yoluyla dirençli bireylerin elde edilmesinde, ıslah programlarının desteklenmesinde, genetik kaynakların korunmasında ve hastalıklardan arındırılmış sağlıklı bitki materyali üretiminde yaygın olarak kullanılan bir biyoteknolojik yöntemdir (Rugini ve Verma, 1982). Aynı zamanda, sekonder metabolitler gibi biyokimyasal bileşiklerin üretimi açısından da önemli bir araçtır. Bahçe bitkileri için klonal çoğaltma amacıyla sıkça tercih edilen doku kültürü teknikleri, çok sayıda üreme materyali üretmenin yanı sıra, genetik materyalin *in vitro* koşullarda korunması ve sağlıklı aşıllı bitkilerin elde edilmesi amacıyla klonal temizleme uygulamalarında kullanılmaktadır (Gürel ve Gülşen, 1998). Hibiskus bitkisine yönelik yapılan *in vitro* doku kültürü çalışmaları ise, özellikle hızlı çoğaltım, hastalıklardan arındırma ve stres koşullarına dayanıklı bireylerin seçimi açısından büyük önem taşımaktadır. Literatürde, hibiskus bitkisinin farklı hormon kombinasyonlarıyla başarılı bir şekilde mikroçoğaltımı yapılabildiği ve bu sayede yüksek verimli, sağlıklı bitkilerin elde edilebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca, *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen bu çalışmalar, hibiskusun kuraklık gibi çevresel stres faktörlerine karşı verdiği fizyolojik yanıtların anlaşılmasında da değerli bilgiler sunmaktadır.

Kuraklık stresi, bitkilerin su kaynaklarının azalması sonucu karşılaştığı en önemli çevresel stres faktörlerinden biridir. Bu stres, bitkilerin büyüme, gelişme ve verimlilik gibi

temel fizyolojik süreçlerini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Özellikle tarımsal üretimin sürdürülebilirliği açısından, bitkilerin kuraklık stresine karşı gösterdiği tolerans mekanizmalarının anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda, polietilen glikol (PEG), *in vitro* koşullarda kuraklık stresini taklit etmek amacıyla sıklıkla kullanılan etkili bir ajandır. PEG, bitkilerin su alımını azaltarak osmotik basıncı artırır ve böylece kuraklık stresine benzer koşullar oluşturur. Bu sayede, bitkilerin stres altında verdikleri fizyolojik ve biyokimyasal tepkiler detaylı şekilde incelenebilir (Farooq vd., 2009; Kumar vd., 2018).

PEG uygulamaları, bitkilerin osmotik stres koşullarına karşı verdiği yanıtları değerlendirmede önemli bir deneysel araç olarak öne çıkmaktadır. Bu yaklaşım, özellikle bitki ıslahı ve stres fizyolojisi alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Nitekim hibiskus bitkisi üzerinde yapılan çalışmalarda da PEG ile oluşturulan yapay kuraklık stresinin sürgün uzunluğu, köklenme verimi ve antioksidan enzim aktiviteleri gibi morfolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak araştırılmıştır (Kumar vd., 2020; El Sayed vd., 2021; Sanayei vd., 2021).

1.1 Literatür Özeti

Bu bölümde hibiskus türleri ve hibiskus bitkisi ile ilgili literatürde yer alan mikroçoğaltım çalışmaları, kuraklık ve stres koşulları ile fitokimyasal ve farmakolojik özelliklere ilişkin araştırmalara yer verilmiştir.

Metwally, Ahmed ve Hassan, (2016), 0,2 mg/L BA ile desteklenen üçte dört oranında MS ortamının hibiskus türlerinde en yüksek sürgün sayısı (3.33 sürgün/eksplant) ve yaprak sayısı (7.67 yaprak/sürgün) sağladığını bildirmişlerdir.

Yang, Hidaka, Masaki ve Uozumi, (1995) ise *Hibiscus syriacus* L.'nin yaprak ve yaprak eksplantlarından %95 oranında köklenme elde etmiş, 0,5 mg/l IBA içeren MS ortamını en uygun ortam olarak raporlamıştır.

Diğer bir çalışmada Govinden-Soulange vd. (2009), hibiskusun nodal eksplantların kullanıldığı MS ortamında BAP ve kinetin ile çoklu sürgünlerin oluşturulduğunu, ardından oksinle köklendirme sağlandığını belirtmiştir.

Bhalla, Abdullah, Sreeramanan ve Karuthan, (2009), farklı BAP konsantrasyonlarının sürgün canlılığı üzerindeki etkisini incelemiş ve BAP konsantrasyonu arttıkça sürgün canlılığının azaldığını tespit etmiştir. Optimum büyüme koşullarında BAP'ın 0–5 μ M

aralığında tutulması önerilmiştir. Kumar vd. (2016) ise *Hibiscus sabdariffa* tohumlarından elde edilen eksplantlarda BAP ve IAA kombinasyonlarıyla %60 oranında sürgün çoğalması sağlanırken, GA3 ilavesiyle en iyi sürgün uzaması ve köklenmenin elde edildiğini raporlamıştır.

Jeon vd. (2009), *Hibiscus syriacus* aksiller tomurcuklarında 0,01 mg/L TDZ içeren MS ortamında doğrudan sürgün oluşturduğunu, kallus oluşumunun ise yaşlı tomurcuklarda gözlendiğini belirtmiştir. Kallus dokusu 0,01 mg/L NAA ve 0,5 mg/L BA ile çoklu sürgünlere dönüştürülmüştür.

Dar, Abdullah, Namasivayam ve Roowi, (2012), *Hibiscus rosa-sinensis* L. bitkisinde nodal eksplantlardan modifiye MS ortamında %30 *in vitro* sürgün hayatta kalma oranı ve ortalama 2,68 yaprak sayısı elde etmiş, farklı eksplantların sterilizasyon koşullarını karşılaştırmıştır.

Christensen, Sriskandarajah, Serek ve Müller, (2008), yaptıkları araştırmada *Hibiscus rosa-sinensis* L. bitkisinde Modifiye edilmiş MS ortamı kullanılarak, kloroz, sürgün ucu nekrozu (STN) ve yaprak dökümü gibi sorunlar araştırmışlardır. *H. rosa-sinensis* L. için en uygun çoğaltma ortamı, 2.2 µM BAP içeren, kalsiyum seviyesinin 9 mM ve demirin 295 µM olduğu, Fe-EDDHA ile sağlanan modifiye edilmiş MS ortamı olarak belirlenmiştir. Sürgünler, 2.7 µM NAA içeren yarı güçlendirilmiş modifiye MS ortamında köklendirilmiştir. Aklimatizasyon, kökleri olan ve olmayan tüm sürgünlerde başarılı olmuştur.

Ayadi vd., (2011), kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) bitkisinin hormon içermeyen MS temel besin ortamı kullanılarak *in vitro* olarak verimli şekilde çoğaltılabileceğini göstermişlerdir. Çalışmada, sürgün ucu ve nodal eksplantlarla gerçekleştirilen kültürlerde 4–6 hafta içinde kallus oluşumu olmadan sürgün uzaması ve köklenme sağlanmış, en yüksek sürgün rejenerasyonu (%90,5) bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında elde etmiş ve bitkileri sera koşullarında %70 hayatta kalma oranıyla başarıyla aklimatize etmişlerdir.

Airò, Rossi ve Bianchi, (2007), yapılan bu çalışmada, *in vitro* ortamda *Hibiscus rosa-sinensis* bitkilerinin kütle üretimini incelemiş, benziladenin (BA) ile en yüksek çoğalma oranına ulaşmış ve indol-3-asetik asit (IAA) ile en iyi köklendirme sonucu elde edilmiştir.

Hashish, Taha ve Ibrahim, (2015), *Hibiscus rosa-sinensis*'in *in vitro* çoğaltılması için MS ortamında mikro kesitlerde sürgün çoğaltımını sağlamışlardır. Cobalt 60 gama ışınları (5Gy) uygulaması, en yüksek sürgün oluşumu ve yaprak sayısı ile %100 hayatta kalma oranı

sağlamıştır. Ayrıca, 10Gy ışınlama, klorofil ve karotenoid içeriğinde en yüksek değerleri elde etmiştir.

Sakhanokho ve Kelley (2009) tarafından yapılan çalışmada, Salisilik asit (SA) ve tuz (NaCl) farklı konsantrasyonlarının *Hibiscus moscheutos* ve *Hibiscus acetosella* türleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada 0,5 mM SA uygulamasının her iki türde de sürgün büyümesi, köklenme ve bitki hayatta kalma oranlarını artırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca *Hibiscus moscheutos*, *Hibiscus acetosella*'ya kıyasla daha yüksek tuz toleransı göstermiştir. Araştırmacılar, SA uygulamasının *in vitro* rejenerasyonu ve tuz toleransını artırmak için kullanılabileceğini ve bu sistemin tuz toleranslı hibiskus bitkilerinin geliştirilmesinde hızlandırılmış tarama amaçlı faydalı olduğunu vurgulamışlardır.

Mizukami, Tomita, Ohashi ve Hiraoka, (1988), bu çalışmada, *Hibiscus sabdariffa* (roselle) bitkisinden elde edilen kallus dokularında antosiyanin üretiminin indüklenmesi ve optimize edilmesini amaçlamışlardır. Araştırmacılar, antosiyanin pigmentlerinin *in vitro* koşullarda üretilmesi için uygun besin ortamlarını ve büyüme düzenleyici kombinasyonlarını belirlemeyi hedeflemiştir.

Sereda vd. (2023), çalışmalarında *Hibiscus moscheutos* L. 'Berry Awesome' bitkisinin mikropropagasyonu için *in vitro* ortamda başarılı bir protokol geliştirmişlerdir. Nodal eksplantlarının sterilizasyonu için en uygun yöntem, 70 dk boyunca suyla yıkama ve alkol-hidrojen peroksit çözeltisiyle 5 dk bekletme olarak belirlenmiştir. En iyi verimi sağlayan ortam, 0,1 mg/L CPPU içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamıdır. Sıvı ortamda mikropropagasyon, rocker tipi biyoreaktör kullanılarak katı ortama göre daha yüksek verimle sonuçlanmıştır.

Lobodina vd. (2020), bu çalışmada, *Hibiscus moscheutos* L. çeşitleri olan Cranberry Crush, Fantasia, Fireball ve Jazzberry Jam üzerinde farklı 6-BAP konsantrasyonunun (0,5, 1,0, 1,5 mg/L) sürgün oluşumu üzerindeki etkisini incelemiştir. Sonuçlar, 0,5 mg/L 6-BAP konsantrasyonunun mikro-sürgün proliferasyonu için optimal olduğunu, daha yüksek konsantrasyonların ise oluşan mikro-sürgün sayısında azalmaya yol açtığını göstermiştir.

Zainuddin, Pauzi ve Bahari, (2021), *Hibiscus cannabinus* (kenaf) bitkisinin *in vitro* çoğaltım sistemini geliştirmişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda benzilaminopurin (BAP) içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında kallus kültürü başarıyla gerçekleştirilmiş ve en sağlıklı kallus, 3,0 mg/L BAP konsantrasyonunda elde edilmiştir. Kalluslardan sürgün ve kök oluşumu farklı IBA, BA ve GA3 kombinasyonlarıyla sağlanmıştır.

Kumar, Singh ve Gupta, (2016), *Hibiscus sabdariffa* tohumlarından elde edilen eksplantların *in vitro* mikroçoğaltımı için uygun bir protokol geliştirmişlerdir. Çalışmada, farklı konsantrasyonlarda BAP ve IAA kombinasyonları ile gümüş nitrat, triakontanol, 2-iP ve GA3 kullanılmıştır. En iyi sürgün çoğalması %60 ile 0,5 mg/L IAA ve 2 mg/L BAP içeren ortamda gerçekleşirken, en yüksek sürgün uzaması ve köklenme ise 0,1 ve 0,5 mg/L GA3 ilavesiyle sağlanmıştır.

Abeda, Rahman ve Ahmed, (2014), *Hibiscus sabdariffa*'da kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanarak en iyi kallus büyümesinin 1,0 mg/L 2,4-D ile 1,0 mg/L BAP kombinasyonunda gerçekleştiğini göstermiştir. Kallus büyümesi arttıkça antosiyanin üretiminin azaldığı, en yüksek antosiyanin veriminin ise 1,0 mg/L 2,4-D ve 2,0 mg/L kinetin kombinasyonu ile elde edildiği belirlenmiştir. HPLC analizleriyle altı farklı antosiyanin tanımlanmış, bunların bir kısmının hibiskus çiçeklerinde yaygın olduğu saptanmıştır. Çalışma, hibiskus kallus kültüründe antosiyanin üretiminin optimize edilmesi için etkili bir protokol sunmaktadır.

Arbaoui, Campanella, Paul ve Bettaieb (2013), kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) "Tainung 2" çeşidinin *in vitro* çoğaltılması üzerine yürüttükleri çalışmada, hormon içermeyen MS ortamının eksplant büyümesi için en uygun ortam olduğunu göstermiştir. Köklenme aşamasında ise, MS ortamına 0,25 mg/L IBA ve 25 mg/L β -siklodextrin eklenmesiyle başarılı sonuçlar alınmış ve köklenen sürgünlerin %100 oranında sera koşullarına adapte olduğu bildirilmiştir.

Plessis, Nikolova, Egan ve Kleynhans (2020), tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii* türünün *in vitro* tohum çimlendirme ve bitki gelişimi üzerine odaklanılmıştır. Araştırmada farklı besin ortamlarının tohum çimlenmesi ve bitki performansı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, yüksek çimlenme oranlarının (%85–98) sağlandığını göstermiştir. Özellikle filtre kâğıdı üzerinde ve düşük yoğunlukta MS (Murashige ve Skoog) ortamlarında çimlenme süresinin daha kısa olduğu belirtilmiştir. Ancak, bitki gelişimi açısından en iyi sonuçlar tam kuvvetli MS ortamında elde edilmiştir. Buna karşın, yarım kuvvetli MS ortamları ile gelrit içeren kültür ortamlarının bitki büyümesi üzerinde olumsuz etkiler yarattığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, hibiskus türlerinin doku kültürü yoluyla çoğaltılması ve bitki gelişim protokollerinin optimize edilmesi açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Özellikle tohumdan bitki elde etme sürecinin hızlandırılması ve sağlıklı bitki gelişimi için uygun ortam seçiminin kritik olduğu vurgulanmıştır.

Raaman, Negi ve Ravishankar (2013), *Hibiscus sabdariffa* bitkisinin yaprak, boğum ve düğüm arası eksplantları kullanarak *in vitro* çoğaltım için etkili bir protokol geliştirmiştir. Oksin ve sitokinlerin farklı kombinasyonları ve konsantrasyonlarıyla morfolojik olarak iki farklı kallus türü elde edilmiştir. MS ortamına eklenen 2,4-D, NAA ve BAP bileşenleri ile kremamsı, sarımsı ve ufalanabilir kalluslar oluşmuştur. Ayrıca, MS ortamı çeşitli NAA ve BAP konsantrasyonlarıyla desteklendiğinde kompakt, yeşil ve organojenik kalluslar meydana gelmiştir. Sürgün oluşumu ise nodal eksplantlardan MS ortamına farklı NAA konsantrasyonlarının eklenmesiyle doğrudan sağlanmıştır. Yaprak, boğum ve düğüm arası gibi farklı eksplantlardan elde edilen kalluslar, antosiyanin pigmentlerinin indüksiyonunu göstermiştir. Özellikle, 2,4-D + BAP (0,5 + 2,0 mg/L) ve %6 sukroz ilaveli MS ortamında yoğun pembe renkli antosiyanin pigmentasyonu üretilmiştir.

Meşe ve Tangolar (2019), çalışmalarında *Hibiscus Sabdariffa* bitkisinde PEG kaynaklı osmotik stresin *in vitro* ortamda bitki gelişimine etkisi araştırılmıştır. Farklı PEG konsantrasyonlarının bitki hücrelerinin su potansiyeline etkisi ve buna bağlı morfolojik değişiklikler incelenmiştir. Sonuçlar, %10 PEG uygulamasının bitkinin su alımını önemli derecede azalttığını, buna karşılık %5 PEG uygulamasının bitkide tolerans mekanizmalarını aktive ettiğini göstermiştir.

Kumar, Singh ve Sharma (2020), PEG₆₀₀₀ ile oluşturulan kuraklık stresine karşı hibiskus bitkisi *in vitro* kültürlerinin morfolojik ve biyokimyasal yanıtlarını analiz etmiştir. %0, %5, %10 ve %15 PEG içeren ortamların kullanıldığı deneyde; sürgün uzunluğu, köklenme oranı, toplam çözümlü protein miktarı, antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT) ve MDA birikimi gibi parametreler değerlendirilmiştir. Özellikle %15 PEG uygulamasında en yüksek stres tepkileri gözlemlenirken; %5 PEG seviyesinde bitkilerin hafif düzeyde stres toleransı geliştirdiği rapor edilmiştir. Bulgular, PEG₆₀₀₀'in *in vitro* koşullarda kuraklık stresini taklit etmede etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Ali ve Khan (2019), bu çalışmada *Hibiscus sabdariffa* bitkisinde PEG ile indüklenen kuraklık stresine karşı biyokimyasal ve morfolojik tepkiler analiz edilmiştir. Bitkiler %0, %5, %10 PEG içeren besin ortamlarında büyütülmüş, stresin artmasıyla antioksidan enzim aktivitelerinin ve prolin içeriğinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca kuraklık stresinin bitki gelişimi ve klorofil içeriği üzerinde baskılayıcı etkileri olduğu rapor edilmiştir.

Kylyshbayeva, Nurzhanova, Myrzakhmetov ve Doszhanov (2025), PEG₆₀₀₀ kullanarak bitkilerde oluşturulan in vitro kuraklık stresinin fizyolojik parametreler üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çalışmada %0, %5, %10 ve %15 PEG konsantrasyonları uygulanmış, sürgün boyu, yaprak sayısı, prolin birikimi ve klorofil düzeyleri gibi kriterler değerlendirilmiştir. %10 PEG uygulamasında prolin içeriğinde anlamlı artış gözlemlenirken, sürgün büyümesinde belirgin azalma kaydedilmiştir. Bu bulgular, PEG ile simüle edilen kuraklık koşullarının bitkilerde osmotik stres tepkilerini tetiklediğini göstermektedir.

Oduro ve Ellis, (2022) ise hibiskus türlerinin tarımsal üretim yöntemleri üzerine yoğunlaşarak, *Hibiscus sabdariffa* L.'nin yetiştirilmesinde iklim koşulları, toprak yapısı, sulama düzeyi ve gübreleme gibi çevresel ve kültürel faktörlerin kritik rol oynadığını ortaya koymuştur.

Ruban ve Gajalakshmi (2012), *Hibiscus rosa-sinensis* çiçek özütünün insan patojenlerine karşı in vitro antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Antibakteriyel etkinlik, disk difüzyon ve agar difüzyon yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiş; ayrıca protein profili, poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilmiştir.

Akinmoladun ve Akinmoladun (2019), hibiskus bitkisinin besin içeriği ve sağlık üzerindeki olumlu etkilerini ele almış; yüksek antioksidan kapasitesi ve C vitamini içeriği sayesinde kan basıncını düşürme, kolesterolü azaltma ve anti-inflamatuar etkiler gibi çeşitli sağlık yararlarına sahip olduğunu vurgulamışlardır.

Kaur ve Kaur (2021), hibiskus türlerinin özellikle *Hibiscus sabdariffa* ve *Hibiscus rosa-sinensis*'in antimikrobiyal aktivitelerini incelemiş ve bu türlerin bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili olabileceğini göstermiştir.

El Snafi (2018), tarafından yapılan bir incelemede, *Hibiscus cannabinus* bitkisinin antioksidan ve antidiyabetik özelliklere sahip olduğu, dolayısıyla kan şekeri düzeylerinin düzenlenmesinde olumlu etkiler gösterebileceği belirtilmiştir.

Ghosh vd. (2015), *Hibiscus rosa-sinensis*'in fitokimyasal ve farmakolojik özellikleri üzerine yapılan bu çalışmada, bitkinin antimikrobiyal ve antifungal etkileri incelenmiştir. Cilt hastalıkları ve enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Bu literatür çalışmalarından da anlaşılacağı üzere, hibiskus bitkisi hem morfolojik hem de fizyolojik özellikleri bakımından farklı stres koşullarına karşı çeşitli tepkiler verebilmekte;

özellikle *in vitro* koşullarda uygulanan farklı fitohormon kombinasyonları ve PEG kaynaklı kuraklık stresi gibi faktörlerle bu tepkiler daha belirgin hâle gelmektedir. Literatürde yer alan çalışmalar, bitkinin biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltılabilirliğini ve çevresel stres koşullarına adaptasyon yeteneğini ortaya koymakla birlikte, bu alanda halen daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Bu tez çalışmasının temel amacı, hibiskus bitkisinin doku kültürü ile *in vitro* çoğaltım yöntemlerini geliştirerek optimize etmektir. Özellikle, hastaliksız, sağlıklı ve kuraklık stresine karşı dayanıklı bitkiler elde etmek için etkili bir protokol oluşturulması hedeflenmektedir. Bu doğrultuda, farklı besi ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin hibiskus bitkisinden alınan eksplantların gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Ayrıca, *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkicikler farklı polietilen glikol (PEG₆₀₀₀) konsantrasyonlarına maruz bırakılarak yapay kuraklık stresi oluşturulacak ve bu stres koşullarına karşı bitkilerin morfolojik tepkileri değerlendirilecektir. PEG₆₀₀₀ uygulaması, su alımını sınırlayarak bitkide kuraklık stresine benzer etkiler yaratmakta ve böylece gerçek kuraklık koşullarında bitkilerin vereceği tepkiler laboratuvar ortamında incelenebilmektedir. Bu sayede, kuraklık stresiyle başa çıkabilen, dayanıklı hibiskus bitkiciklerinin belirlenmesi mümkün olmaktadır.

Bu çalışma hem bitki üretimi hem de tarım ve biyoteknoloji alanlarında pratik uygulamalar için önemli bir kaynak olacaktır. Hibiskus bitkisinin verimli ve dayanıklı şekilde çoğaltılması, özellikle kuraklık koşullarının yaygın olduğu bölgelerde tarımsal üretimin sürdürülebilirliğine katkı sağlayacaktır. Ayrıca, *in vitro* çoğaltım yöntemiyle elde edilen sağlıklı ve dayanıklı bitkiler sayesinde, hibiskusun gıda ve sağlık sektöründeki potansiyel kullanımını artacağı ve böylece ekonomik değeri yükseleceği düşünülmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.2 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında kullanılan başlangıç bitki tohumları mısır menşeli özel bir firmadan Tez çalışmasında çimlendirmek için gerekli hibiskus tohumları, tohum satışı yapan mısır menşeli özel bir firmadan temin edilmiştir (şekil 2.1). Yapılacak olan çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. 1. Bitki materyalinin (hibiskus tohumu) temin edildiği marka bilgileri

2.2.1 Besin Ortamı ve *In Vitro* Kültür Koşulları

Yapılan çalışmada besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel besin ortamı (çizelge 2.1) kullanılmıştır. Besin ortamlarının pH'ı 1 N NaOH ya da HCl kullanılarak 5,6-5,8'e ayarlandıktan sonra karbon kaynağı olarak 30 g/L sükröz, katılaştırıcı olarak 6,5 g/L plant agar, 4,4 g/L MS kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Denemelerde kullanılacak olan bitki büyüme düzenleyicileri (TDZ, BAP GA3, NAA, IBA) uygun çözücülerde çözdürülmüş ve saf su ilavesi ile stokları hazırlanmıştır. Hazırlanan ortam ve ortamın döküleceği kaplar otoklava atılmıştır. Hazırlıkları tamamlanan besin ortamları 121°C, 1.2 kg/ cm2 (MİR-MED) basınç altında 15 dk süreyle steril edilmiştir. Kültüre alınan bitkilerin hepsi 24±2°C sıcaklık ve

yaklaşık 120 ± 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ s ışık şiddetine ayarlı iklim odasında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot ile kırmızı beyaz led ışık altında kültüre alınmıştır. Sonraki aşamada sağlıklı sürgünler çoğalma aşaması için hazırlanan besin ortamlarına aktarılarak çoğaltımı gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan besin ortamlarının içerikleri

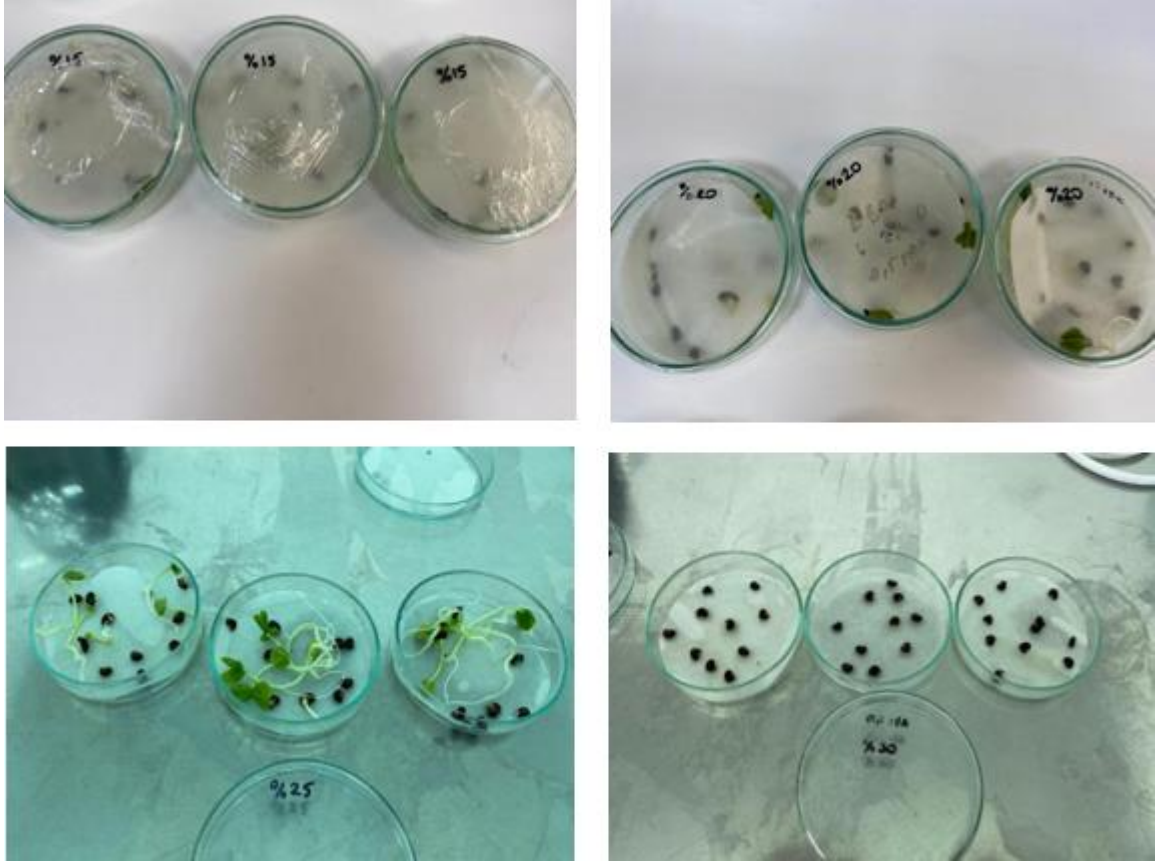
Makro Elementler	MS (mg/L)
CaCl ₂	332,02
KH ₂ PO ₄	170,00
KNO ₃	1900,00
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	1650,00
NH ₄ 2SO ₄	-
Mikro Elementler	MS (mg/L)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	6,20
KI	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Vitaminler	MS (mg/L)
Glisin	2,00
Myo-Inositol	100
Nikotinik asit	0,50
Pyridoksine HCl	0,50
Tiamin HCl	0,10

2.3 Yöntem

2.3.1 Eksplant Alımı ve Yüzey Sterilizasyonu

Bu çalışmada kullanılan Hibiskus tohumlarının temini özel bir firmadan gerçekleştirilmiş olup, ilk sterilizasyon denemelerinde tohumlar ilk aşamada %100 bakteri önleyici sabunla 10 dk fırça yardımıyla akan suda yıkanmış ardından akan su altında 45 dk steril edilmiştir. Ardından laminar akış kabineine alınan tohumlar 3 dk %70 lik etil alkol ile çalkalanmış ikinci aşamada tohumlar %15, %20, %25 ve %30 olmak üzere 4 farklı oranda 10 dk çamaşır suyuyla ayrı ayrı çalkalanmıştır. Son aşamada tohumlar 3 tekerrürlü 5'er dk otoklavlanmış distile suda yıkanarak çamaşır suyundan arındırılmıştır (Çizelge 2.2) (Şekil 2.2).

Sterilizasyon aşamasından sonra tohumlar, çimlendirme aşaması için 0 MS içeren besin ortamlarına 5'er adet ve 3 tekerrürlü olacak şekilde aktarılmıştır. Tohumların çimlendirme aşamasında sterilizasyonu çamaşır suyu oranı arttıkça daha etkili olduğu gözlemlenmiş ve çimlenmeyi baskıladığı ve oranını oldukça düşürdüğü sonucuna varılmıştır.



Şekil 2. 2. Tohum sterilizasyonunda kullanılan çamaşır suyu oranları

2. sterilizasyon protokolünde çamaşır suyu yerine cıva klorür ($HgCl_2$) kullanılmıştır. Tohumlar ilk aşamada 10 dk %100 bakteri önleyici sabunla fırça yardımıyla yıkandıktan sonra 40 dk akan suda bekletilmiş, ardından steril kabinde önce %70 oranında etil alkol ile 3 dk çalkalanmıştır. Daha sonra, iki farklı konsantrasyonda cıva klorür çözeltisinde sterilizasyon uygulanmıştır: %0,1 mg/L $HgCl_2$ içerisinde manyetik karıştırıcıda 10 dk ve %0,05 mg/L $HgCl_2$ içerisinde aynı koşullarda 10 dk steril edilmiştir. Son aşamada tohumlar, her iki uygulama için de 3 tekerrürlü 5'er dk otoklavlanmış distile suda cıva klorürden arındırılmıştır (Daneshvar, 2019) (Çizelge 2.3). Steril edilen tohumlar steril kurutma kâğıdı yardımıyla nemi alındıktan sonra çimlendirme aşaması için 0 MS besin ortamlarına aktarılmıştır. Sterilizasyona tabi tutulan tohumlar besin ortamlarına aktarıldıktan sonra 7–14 gün boyunca kontaminasyon takibi yapılmış ve cıva klorürün iki farklı konsantrasyonu çamaşır suyu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.2. Çamaşır suyu (NaOCl) sterilizasyon uygulaması

Deneme 1	Kullanılan Kimyasal	%	Süre
S1	NaOCl	%15	10 dk
S2	NaOCl	%20	10 dk
S3	NaOCl	%25	10 dk
S4	NaOCl	%30	10 dk

Çizelge 2.3. Cıva klorür (HgCl₂) sterilizasyon uygulaması

Deneme 2	Kullanılan Kimyasal	%	Süre
S5	HgCl ₂	%0,05 mg/L	10 dk
S6	HgCl ₂	%0,1 mg/L	10 dk

Bu çalışmada, sterilize edilmiş bitki tohumları öncelikle 0 MS ortamında çimlendirilmiş ve ardından hipokotil, boğum ve kotiledon yaprak eksplantları ile denemeler gerçekleştirilmiştir. En hızlı gelişim ve sürgün oluşumu boğum eksplantında gözlemlenmiş ve bu nedenle çalışmalara boğum eksplantı ile devam edilmiştir.



Şekil 2. 3. Otoklavda steril edilmiş sterilizasyon malzemeleri

2.3.2 Çimlenen Tohumların Mikroçoğaltımı İçin Farklı Besin Ortamlarına Aktarılması

0 MS ortamında çimlenen eksplantların sürgün gelişimini teşvik etmek amacıyla, farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları (TDZ, GA3, NAA) içeren MS besi ortamlarına aktarılmıştır (Çizelge 2.4). Kontrol grubu olarak, bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamı kullanılmıştır. Üç tekerrürlü yürütülen deneyde, en uygun sürgün gelişimini sağlayan besin ortamının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çizelge 2.4 Hibiskus bitkisinde sürgün oluşumu çalışmalarında kullanılan bitki büyütme düzenleyicileri ve ortam kombinasyonları

Ortamlar	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)
Kontrol	-	-	-
L1	1,0	0,5	1,0
L2	2,0	1,0	1,0
L3	3,0	1,5	1,0
L4	4,0	2,0	1,0

2.3.3 Gelişen Sürgünlerde Köklenme Çalışmaları

Farklı besin ortamlarında gelişen sürgünler, köklenme aşaması için 0 MS (kontrol), 1,0 mg/L IBA ve 2,0 mg/L IBA içeren ortamlara aktarılmıştır. Bu deneme ile sürgünlerin köklenme yetenekleri karşılaştırılarak, gelişimi açısından en uygun ortamın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen güçlü kök sistemleri, bitkilerin dış koşullara başarılı bir şekilde uyum sağlayabilmesi açısından temel öneme sahiptir.

2.3.4 Kuraklık Stresi (PEG Uygulaması) Denemesi

Kuraklık stresi üzerine yürütülen denemede, *in vitro* mikroçoğaltım sonucu elde edilen köklü sürgünlerimizi 0 MS ortamına eklenen aynı 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 g/L PEG₆₀₀₀ konsantrasyonlarına aktarılmıştır (Çizelge 2.5). Bu çalışmada kuraklık stresinin etkileri açıkça gözlenmiştir. Özellikle artan PEG konsantrasyonları ile bitki boy gelişiminde azalma, yaprak sararması ve nekroz gibi belirtiler belirginleşmiştir.

Çizelge 2.5 Kuraklık denemesi için kullanılan ortamların PEG konsantrasyonları

Uygulamalar	Ortam	PEG ₆₀₀₀ (mg/L)
Kontrol	MS	0 mg/L -
1)	MS	10,0 mg/L
2)	MS	20,0 mg/L
3)	MS	30,0 mg/L
4)	MS	40,0 mg/L
5)	MS	50,0 mg/L
6)	MS	60,0 mg/L

6 farklı konsantrasyonda hazırlanacak olan PEG içeren MS ortamları için 250 ml'lik tüpler kullanılmıştır. Buna göre yukarıdaki çizelgede belirtilmiş olan PEG oranları 1/4 oranı esas alınarak hazırlanmıştır.

2.3.5 Dış Koşullara Alıştırma (Aklimatizasyon)

In vitro koşullarda köklendirilmiş, PEG₆₀₀₀ içeren ortamlarda canlılığını koruyan ve sağlıklı bitkiciklerin dış ortama adaptasyonu amacıyla gerçekleştirilen aklimatizasyon süreci sık kontrollerle yürütülmüştür. Bu süreçte bitkicikler dikkatli bir şekilde kültür kaplarından çıkarılmış, kök ve gövde dokularına zarar vermeyecek biçimde steril distile su altında yıkanarak agar kalıntılarında arındırılmıştır.

Temizlenen bitkiler, önceden 121 °C'de, 1.2 kg/cm² basınç altında 20 dk süreyle otoklavlanmış steril torf-toprak karışımı içeren saksılara tek tek dikilmiştir. Dikim sonrası

bitkiler doğrudan sulanmış, ardından yaprak yüzeyleri spreylenmesiyle nemlendirilmiştir. Saksılar, iç ortam nemini sabit tutmak amacıyla streç filmle hava almayacak şekilde kapatılmış plastik kaplar içerisine yerleştirilmiş ve bu şekilde kontrollü bitki büyüme odasına alınmıştır.

2.3.6 İstatistiksel Değerlendirme

Sterilizasyon denemeleri, *in vitro* sürgün denemeleri 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS ver. 22 istatistik programında One -Way Anova post hoc. testlerinden Duncan testi ile yapılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1967).



3. BULGULAR

3.1 Yüzey Sterilizasyonu Bulguları

Bu çalışmada kullanılan hibiskus tohumlarının temini yabancı özel bir firmadan gerçekleştirilmiş olup, ilk sterilizasyon denemelerinde hibiskus tohumları %100 bakteri önleyici sabun ile 10 dk fırça yardımıyla yıkanmış ve ardından akan su altında 45 dk süreyle temizlenmiştir. Tohumlar daha sonra laminar akış kabine alınarak %70 etanol ile 3 dk çalkalanmış; ikinci aşamada ise %15, %20, %25 ve %30 konsantrasyonlarında 10 dk süreyle çamaşır suyu ile sterilize edilmiştir. Son aşamada tohumlar üç kez, beşer dk otoklavlanmış distile su ile yıkanarak çamaşır suyundan arındırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, çamaşır suyu konsantrasyonu arttıkça kontaminasyon oranı azalmış, ancak yüksek konsantrasyonların çimlenme oranlarını olumsuz etkilediği tespit edilmiştir.

2. sterilizasyon protokolünde çamaşır suyu yerine cıva klorür ($HgCl_2$) kullanılmıştır. Tohumlar ilk aşamada 10 dk %100 bakteri önleyici sabunla fırça yardımıyla yıkandıktan sonra 40 dk akan suda bekletilip steril kabinde önce %70 oranında etil alkol ile 3 dk çalkalanmış ardından %0,1 mg/L $HgCl_2$ içerisinde manyetik karıştırıcıda 10 dk steril edilmiştir. Son aşamada tohumlar 3 tekerrürlü 5'er dk otoklavlanmış distile suda cıva klorürden arındırılmıştır (Daneshvar, 2019). Steril edilen tohumlar steril kurutma kâğıdı yardımıyla nemi alındıktan sonra çimlendirme aşaması için 0 MS besin ortamlarına aktarılmıştır. Sterilizasyona tabi tutulan tohumlar besin ortamlarına aktarıldıktan sonra 7–14 gün boyunca kontaminasyon takibi yapılarak çamaşır suyu ile karşılaştırmalı değerlendirmeye tabi tutulmuştur (Şekil 3.1).

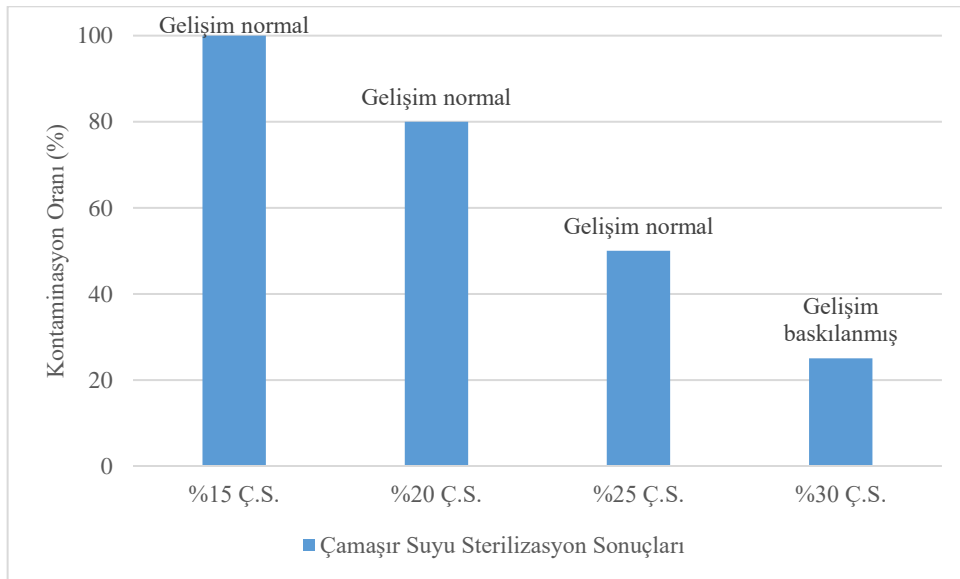
Elde edilen bulgular, çamaşır suyu ile gerçekleştirilen yüzey sterilizasyon işlemlerinde kontaminasyon oranlarının, kullanılan konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. %15'lik çamaşır suyu çözeltisiyle yapılan sterilizasyonda %100 oranında kontaminasyon gözlenmiş, bu durum düşük konsantrasyonun istenen dezenfeksiyonu sağlamadığını göstermiştir (Şekil 3.2). %20'lik konsantrasyonda kontaminasyon oranı %73'e düşmüş, ancak bu oran hâlâ yüksek bulunmuştur. %25'lik çamaşır suyu ile yapılan uygulamada kontaminasyon oranı %33'e gerilemiş ve bu da çimlenme ile bitki gelişimi açısından olumlu sonuçlar vermiştir. %30'luk çamaşır suyu çözeltisinde ise kontaminasyon oranı %20'ye kadar düşmesine rağmen, bu yüksek konsantrasyonun çimlenme oranlarını azalttığı ve bitki gelişimini olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir. Tüm değerlendirmeler sonucunda, kontaminasyonu azaltırken aynı zamanda bitki gelişimini de olumsuz etkilemeyen en uygun sterilizasyon

koşulunun %25 çamaşır suyu konsantrasyonunda 10 dk süreyle uygulanan işlem olduğu belirlenmiştir.

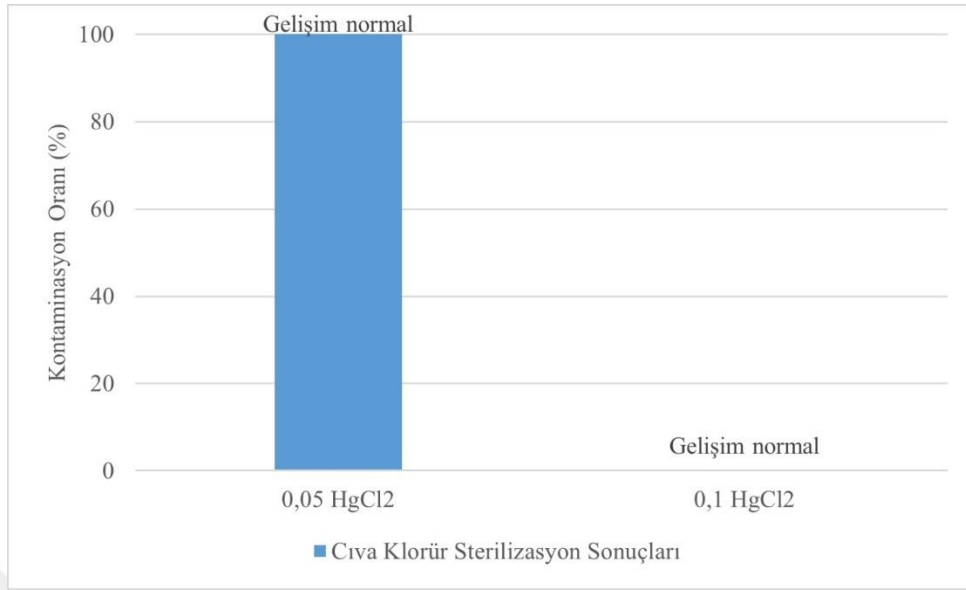
Cıva klorür ($HgCl_2$) ile yapılan sterilizasyon denemeleri, kontaminasyon ve bitki gelişimi üzerindeki etkilerin konsantrasyona bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Buna karşı, %0,1 oranında hazırlanan çözelti ile yapılan sterilizasyonda herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır (Şekil 3.3). Yapılan değerlendirmeler sonucunda hem kontaminasyonu tamamen önleyen hem de bitki gelişimini baskılamayan %0,1'lik cıva klorür konsantrasyonu en uygun koşul olarak belirlenmiş ve sonraki tüm denemelerde bu konsantrasyon kullanılmıştır.



Şekil 3. 1. Cıva klörür çalışması sonucu çimlenen hibiskus tohumları



Şekil 3. 2. Çamaşır suyu ile sterilizasyon sonuçları



Şekil 3. 3. Cıva klörür çalışması sonucu çimlenen hibiskus tohumları

3.2 *In vitro* mikroçoğaltım denemeleri sonucu elde edilen bulgular

Steril edilen eksplantların mikroçoğaltım aşamalarında temel besin ortamı MS kullanılmıştır. Sürgünlerin mikroçoğaltımı için besin ortamlarına %3 sükröz ve 6,5 g/L agar eklenmiştir. Hazırlanan besin ortamlarının pH'ı 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra otoklav ile 121°C, 1,2 kg/cm² (MİR-MED) basınç altında 20 dk süreyle steril edilmiştir. Tüm kültürler, 24 ± 2 °C sıcaklıkta ve 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot uygulanarak, mavi-kırmızı LED ışık altında kültüre alınmıştır (Daneshvar, 2019).

Çimlenen tohumlardan elde edilen boğum, hipokotil ve kotiledon yaprakları eksplant olarak kullanılmış; bu eksplantlar farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarını içeren L1, L2, L3 ve L4 ortamlarına transfer edilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, kullanılan eksplant tipleri arasında boğum eksplantlarının diğerlerine kıyasla daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Boğum eksplantları hem kallus oluşumu hem de sürgün gelişimi açısından daha hızlı ve verimli sonuçlar vermiştir. Hipokotil eksplantlarında kallus oluşumu daha sınırlı düzeyde gerçekleşmiş, kotiledon yapraklarında ise bazı ortamlarda kallus oluşmuş olsa da sürgün oluşumu yetersiz kalmıştır.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda eksplantların L3 ortamında daha başarılı sürgün gelişimi gösterdiği tespit edilmiş ve kültürler bu ortamda sürdürülmüştür. Ardından, gelişimi

devam eden bitkicikler yaklaşık üç alt kültür dönemi boyunca aynı ortamda muhafaza edilmiştir. Bu sürecin sonunda, fizyolojik olarak yeterli boyuta ulaşan ve canlılığını sürdüren sürgünler, köklenme ve sonraki uygulamalara hazırlanmak amacıyla 0,2 g/L aktif kömür (AC) içeren besiyerlerine aktarılmıştır. Aktif kömür, fenolik bileşiklerin olumsuz etkilerini azaltmak, bitkilerde sararma ve kararmaları önlemek ve ortamı dengelemek amacıyla tercih edilmiştir.

Ortamların içerdiği bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları gelişim üzerinde belirgin etkiye sahip olmuş, özellikle L3 ortamı (TDZ 3,0 mg/L, NAA 1,5 mg/L, GA 1,0 mg/L) tüm denemeler içerisinde en iyi kallus ve sürgün gelişimini sağlayan ortam olarak öne çıkmıştır. Bu ortamda gelişen dokular canlı, kompakt ve yeşil renkli olurken, çoklu sürgün oluşumu da yoğun bir şekilde gözlenmiştir. L2 ve L4 ortamlarında da olumlu gelişimler kaydedilmiş ancak L3 ortamındaki kadar yüksek rejenerasyon elde edilememiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, boğum eksplantlarının rejeneratif kapasitesinin yüksek olduğu, L3 ortamının ise en etkili kombinasyonu sunduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 3.4) (Çizelge 3.1).



Şekil 3. 4. L3 ortamında gelişen sağlıklı sürgünler

Çizelge 3.1. Farklı BBD konsantrasyonlarının hibiskus boğum eksplantlarından in vitro mikroçoğaltımına ait varyans analiz sonuçları

Ortam	Tekerrür	Ortalama Eksplant Başına Sürgün Sayısı*	Bitkicik Boyu*	Kök Boyu*	Yaprak Genişliği*	Yaprak Boyu*
L1	3	0,93±0,13c	1,10±0,10b	0,00±0,00c	0,30±0,60b	0,80±0,14b
L2	3	1,33±0,90c	1,00±0,10b	0,00±0,00c	0,50±0,33b	0,83±0,03b
L3	3	3,30±0,20a	6,70±1,02a	5,30±0,00a	2,40±0,20a	3,03±0,10a
L4	3	2,30±0,20b	2,40±0,30b	1,60±0,00b	0,80±0,14b	0,70±0,12b

*Aynı sütunda harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark Duncan testi sonuçlarına göre 0,05 düzeyinde önemlidir

3.2.1 Eksplant Başına Sürgün Sayısı Ortalaması

Duncan testi sonuçlarına göre ortalama eksplant başına sürgün oluşum sayısı, kullanılan MS temel besin ortamlarında 1,0 ile 2,70 arasında değişiklik göstermiştir. Eksplant başına en

düşük sürgün oluşumu L1 ve L2 besin ortamında $1,0 \pm 0,00$ ile gözlenirken, bunu L4 ortamı ($2,00 \pm 1,00$) takip etmiştir. En yüksek sürgün oluşumu ise L3 besin ortamında $2,30 \pm 0,20$ ile elde edilmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, L3 ortamı “a” harfiyle gösterilen grup içerisinde yer alarak diğer ortamlardan anlamlı şekilde ayrılmıştır. L1 ve L2 ortamları “b” grubunda sınıflandırılmış ve eşit düzeyde düşük sürgün oluşumu göstermiştir. L4 ortamı ise “b” grubu olarak ayrı bir sınıfta değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının sürgün oluşumu üzerindeki etkisinin belirgin olduğunu ve en etkili kombinasyonun L3 ortamında sağlandığını ortaya koymaktadır.

3.3 PEG Uygulamalarının Hibiskus Üzerindeki Kuraklık Stresi Etkileri

Kuraklık stresi üzerine yürütülen denemede, *in vitro* mikroçoğaltım sonucu elde edilen köklü sürgünler (Çizelge 3.2), 0 MS ortamına eklenen 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 g/L PEG konsantrasyonlarına aktarılmıştır. Bu çalışma kapsamında, PEG₆₀₀₀ uygulamalarının kuraklık stresi simülasyonu amacıyla kullanıldığı ve farklı konsantrasyonların bitki gelişimi üzerindeki etkilerinin incelendiği görülmüştür.

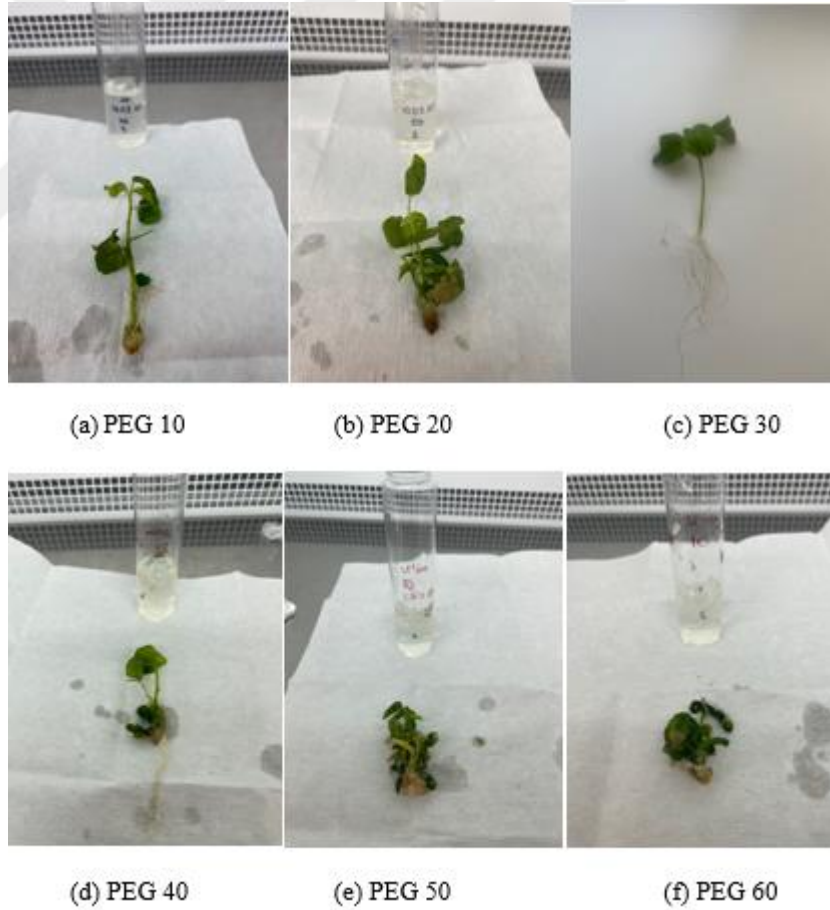
Elde edilen veriler ışığında, PEG₆₀₀₀ konsantrasyonlarının artmasıyla birlikte bitkiciklerde belirgin bir gelişim gerilemesi gözlenmiştir. Özellikle 1. ay ve 2. ay boyunca ölçülen gövde uzunluğu değerleri, düşük PEG konsantrasyonlarında (10 g/L ve 20 g/L) nispeten yüksek seyretmekle birlikte, daha yüksek PEG seviyelerinde (30 g/L ve üzeri) anlamlı bir düşüş kaydedilmiştir. Örneğin, 10 g/L PEG uygulamasında 1. ayda ortalama gövde uzunluğu $5,33 \pm 1,40$ cm iken, 60 g/L PEG uygulamasında bu değer $1,60 \pm 0,30$ cm'ye kadar azalmıştır. Bu durum, kuraklık stresinin bitki büyümesi üzerindeki engelleyici etkisini açıkça ortaya koymaktadır.

Yaprak sayısına bakıldığında da benzer bir azalma trendi tespit edilmiştir. Düşük PEG konsantrasyonlarında (10 ve 20 g/L) yaprak sayısı nispeten yüksek kalırken, PEG konsantrasyonu arttıkça yaprak sayısında belirgin bir azalma ve hatta nekrotik belirtiler ile birlikte yaprak sararması gözlenmiştir. Bu bulgu, bitkinin su stresine bağlı fizyolojik bozulmalar yaşadığını ve fotosentetik kapasitenin azaldığını desteklemektedir.

Kök uzunluğu ölçümleri de kuraklık stresinin etkilerini yansıtmaktadır. Kontrollere kıyasla, yüksek PEG konsantrasyonlarında kök gelişimi yavaşlamış ve kök uzunluğu azalmıştır. 10 g/L PEG'de kök uzunluğu $1,50 \pm 0,80$ cm iken, 60 g/L PEG₆₀₀₀ uygulamasında $1,00 \pm 0,90$

cm'ye kadar düşmüştür. Bu durum, kök sisteminin su alımındaki kısıtlamaları ve dolayısıyla genel bitki gelişimini olumsuz etkilediğini göstermektedir.

Ayrıca, PEG₆₀₀₀ konsantrasyonlarının artışıyla birlikte yapraklarda gözlenen sararma ve nekroz gibi stres belirtileri (Şekil 3.5) bitkiciklerin kuraklık stresine verdikleri fizyolojik yanıtların somut göstergeleridir. Bu morfolojik değişimler ve gelişim farklılıkları, Şekil 3.6'da farklı PEG konsantrasyonlarında tüp içerisinde yetiştirilen bitkiciklerin karşılaştırmalı fotoğraflarında açıkça gözlemlenmektedir. Bu gözlemler, *in vitro* ortamda kuraklık stresinin başarılı bir şekilde simüle edildiğini ve bu modelin hibiskus bitkisinin stres cevabının incelenmesi açısından önemli bir araç olduğunu doğrulamaktadır. Sonuç olarak, bu deneme, farklı PEG konsantrasyonlarının bitki gelişimi üzerindeki engelleyici etkilerini detaylı şekilde ortaya koymuş; özellikle yüksek konsantrasyonlarda (30 g/L ve üzeri) bitki gelişiminin önemli ölçüde engellendiğini göstermiştir. Bu bulgular, kuraklık stresi araştırmalarında PEG kullanımının etkinliğini destekler niteliktedir.

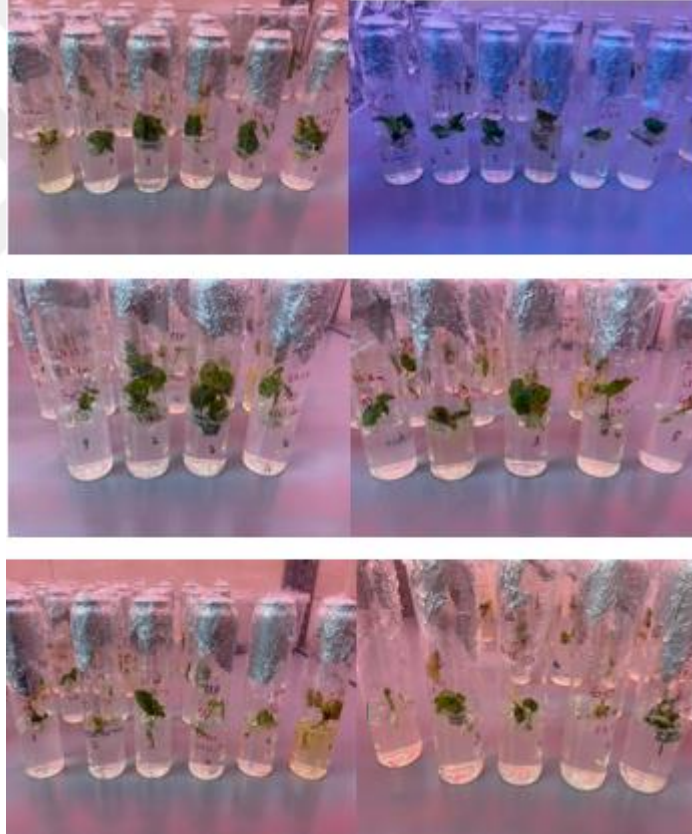


Şekil 3. 5. Sırasıyla farklı PEG oranlarında gelişim süreçleri takip edilen eksplantlar

Çizelge 3.2 Farklı PEG Konsantrasyonlarında Bitki Morfolojik Özelliklerine ait varyans analiz sonuçları

Ortam (PEG)	Tekerrür (n)	Gövde Uzunluğu (cm)1. Ay*	Gövde Uzunluğu (cm)2. Ay*	Yaprak Sayısı (adet)1. Ay*	Yaprak Sayısı (adet)2. Ay*	Kök Uzunluğu (cm)1. Ay*	Kök Uzunluğu (cm)2. Ay*
Kontrol	3	12.33±2.00a	13.44±2.00a	2.00±2.00b	4.00±2.00a	12.50±1.12a	14.50±1.00a
10	3	5.33 ± 1.40a	6.00 ± 1.60a	2.70 ± 0.60ab	5.00 ± 0.00a	1.50 ± 0.80c	1.70 ± 0.90c
20	3	4.00 ± 2.00ab	4.50 ± 2.00ab	3.00 ± 1.00a	2.00 ± 0.70bc	3.00 ± 0.90b	3.00 ± 1.00b
30	3	2.70 ± 0.33b	3.33 ± 0.33ab	1.00 ± 0.00c	3.60 ± 0.90ab	3.70 ± 2.01b	3.70 ± 2.10b
40	3	2.33 ± 0.33ab	2.00 ± 0.00b	2.00 ± 1.00b	2.33 ± 0.90bc	1.13 ± 0.80c	1.33 ± 0.90c
50	3	2.33 ± 0.33ab	2.33 ± 0.33ab	2.00 ± 1.00b	1.33 ± 0.33c	1.50 ± 1.25c	1.70 ± 1.20c
60	3	1.60 ± 0.30b	2.10 ± 0.60b	2.00 ± 0.60b	2.00 ± 0.60c	1.00 ± 0.90c	1.00 ± 1.00c

*Aynı sütunda harflerle gösterilen ortamlar arasındaki fark Duncan testi sonuçlarına göre 0,05 düzeyinde önemlidir



Şekil 3. 6. Kuraklık stresine maruz bırakılan eksplantların oran arttıkça gözlenen gelişim kayıpları

3.4 *In vitro* bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması (Aklimatizasyon)

Yapılan ön çalışmalarda, hibiskus bitkisinin aklimatizasyon aşamasında çok fazla bitki kaybı yaşanmıştır. Bu durum göz önünde bulundurularak, süreç daha sık kontroller yapılarak

yürütülmüştür. Köklenen bitkiler, temiz su ile bitkiye ve köklerine zarar vermeyecek şekilde, besin ortamından arındırılana kadar yıkanmıştır. Ardından, bitkiler daha önceden otoklavda 121°C sıcaklıkta, 1,2 kg/cm² basınçta 20 dk süreyle steril edilmiş torf-toprak karışımı dolu saksılara alınarak, hibiskusların dikimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7. Bitkilerin *in vitro* ortamdan saksılara aktarılması

Dikilen bitkiler, sulandıktan sonra sprej ile nemlendirilmiş ve üzerleri streç film ile kapatılabilecek bir kaba yerleştirilmiştir. Bu kap, hava almayacak şekilde streçlenmiştir. Bitkiler daha sonra bitki büyüme odasına alınmıştır. İlk haftanın sonunda, streç filmin üzerinde birkaç delik açılarak ortamın nemi azaltılmıştır. İkinci haftada delik sayısı artırılrsa da üçüncü haftaya geçilmeden bitkilerin tamamında yaşamsal faaliyetlerin sona ermesi, aklimatizasyon protokolüne geçiş aşamasında bitkiciklerin kök gelişiminin yetersizliği nedeniyle gerçekleşmiştir.

4. TARTIŞMA

Hibiskus bitkisinin vejetatif ve generatif yollarla çoğaltılmasının sınırlı olması, bu tür için mikroçoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Mikroçoğaltım, uygun eksplant seçimi, besin ortamının doğru şekilde düzenlenmesi ve hormon dengesinin sağlanması yoluyla yüksek verimli bitki üretimi için etkili bir yöntem sunmaktadır. Bu çalışmada, hibiskus bitkisinin mikroçoğaltımı sonrasında, *in vitro* koşullarda polietilen glikol (PEG) uygulamaları ile yapay kuraklık stresi oluşturularak bitkilerin kuraklık stresine karşı morfolojik tepkileri incelenmiştir. Literatürde PEG ile yapılan uygulamaların, kuraklık koşullarını taklit ederek bitkilerin stres yanıtlarını değerlendirmek açısından etkili olduğu belirtilse de bu çalışmada elde edilen bitkiler *ex vitro* ortama uyum sağlayamamış ve bitkilerin tamamı dış ortama aktarım sürecinde canlılıklarını yitirmiştir. Bu sonuç, PEG uygulamaları sonrasında aklimatizasyonun kritik öneme sahip olduğunu ve özellikle kuraklık stresine maruz kalmış bitkilerde dış ortama geçişin daha dikkatli bir şekilde planlanması gerektiğini göstermektedir. Dolayısıyla, bu çalışma kuraklık stresine dayanıklı bireylerin elde edilmesinde PEG uygulamalarının tek başına yeterli olmadığını, aklimatizasyon sürecinin başarısız olmasının tüm süreci olumsuz etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, sürdürülebilir tarım uygulamaları ve stres tolerans araştırmalarında daha bütüncül bir yaklaşımın benimsenmesi gerektiğini düşündürmektedir.

4.1 Yüzey Sterilizasyonu

Bu çalışmada, hibiskus tohumlarının yüzey sterilizasyonunda çamaşır suyu (sodyum hipoklorit) ve cıva klorür ($HgCl_2$) kullanılarak gerçekleştirilen uygulamaların, kontaminasyon oranları ve bitki gelişimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, dezenfektanların etkinliğinin kullanılan konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Çamaşır suyu ile yapılan sterilizasyon işleminde, %25'lik konsantrasyonun kontaminasyon oranını en düşük seviyeye indirdiği ve tohum gelişimini olumsuz etkilemediği belirlenmiştir. Benzer şekilde, Javed vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada da %20-25 aralığında sodyum hipoklorit kullanımının etkili olduğu ve tohum çimlenmesini desteklediği bildirilmiştir. Öte yandan, %30'luk çamaşır suyu çözeltisinin yüksek konsantrasyonu, bu çalışmada olduğu gibi, bitki gelişimini baskılamıştır. Bu durum, Singh vd. (2018) tarafından rapor edilen yüksek doz hipoklorit uygulamalarının toksik etki yaratabileceğine dair bulgularla da örtüşmektedir.

Cıva klorür ile yapılan sterilizasyon işlemlerinde, %0,1'lik konsantrasyonun kontaminasyonu büyük ölçüde engellediği ve bitki gelişimini olumsuz etkilemediği gözlemlenmiştir. Bu bulgu, Thakur ve Kanwar (2019) tarafından bildirilen, düşük doz cıva klorür uygulamalarının yüksek sterilizasyon başarısı sağladığı ancak konsantrasyon arttıkça toksisite riskinin yükseldiği yönündeki sonuçlarla uyumludur. Nitekim bu çalışmada da %0,2'lik HgCl₂ uygulamasının çimlenme oranlarını düşürdüğü tespit edilmiştir.

Hibiskus üzerine yapılan başka çalışmalarda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Örneğin, Adebola vd. (2021), hibiskus tohumlarının %1 sodyum hipoklorit ve %95 etil alkol kombinasyonu ile sterilize edilmesinin aseptik koşullarda yüksek çimlenme oranları sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca, Tahmasebi vd. (2023) gibi araştırmacılar, geleneksel kimyasal dezenfektanlara alternatif olarak kullanılan ultrasonik sterilizasyon yöntemlerinin hem çevre dostu olmaları hem de yüksek sterilizasyon başarılarıyla dikkat çektiğini bildirmiştir.

Sonuç olarak hem çamaşır suyu hem de cıva klorür, hibiskus tohumlarının yüzey sterilizasyonunda etkili dezenfektanlar olarak öne çıkmaktadır. Ancak her iki maddenin de yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiler oluşturabileceği göz önünde bulundurulmalı, uygun oranlar titizlikle belirlenmelidir. Ayrıca, çevreye daha az zararlı ve güvenli alternatif yöntemlerin araştırılması, ileride sürdürülebilir mikroçoğaltım uygulamaları açısından büyük önem taşımaktadır.

4.2 Mikroçoğaltım

Bu çalışmada hibiskus tohumlarının çimlenmesinden elde edilen farklı eksplant türleri (boğum, hipokotil ve kotiledon yaprakları) kullanılarak, çeşitli bitki büyüme düzenleyici (BBD) kombinasyonlarının kallus ve sürgün gelişimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre; eksplant türleri arasında belirgin farklılıklar gözlenmiş, özellikle boğum eksplantları hem kallus oluşumu hem de çoklu sürgün gelişimi açısından en yüksek başarıyı göstermiştir. Bu durum, boğum eksplantlarının yüksek meristematik aktivitesine bağlanabilir. (Ali vd., 2019; Gupta, ve Kumar, 2017).

Kullanılan farklı BBD kombinasyonları içerisinde TDZ 3,0 mg/L, NAA 1,5 mg/L ve GA 1,0 mg/L içeren L3 ortamı, tüm denemeler arasında en yüksek rejenerasyon kapasitesini sağlamıştır. Bu ortamda gelişen dokuların canlı, kompakt ve yeşil renkli olması, TDZ'nin sitokinin benzeri etkisinin NAA ile birlikte kallus indüksiyonunu ve sürgün teşvik ettiğini göstermektedir. TDZ'nin bu güçlü etkisi, bitki dokularında gen ekspresyonunu sitokinin

benzeri uyarıcılarla artırmasıyla açıklanabilir (Murthy vd., 1998). Ayrıca, GA'nın bu kombinasyonda kullanılması, hücre uzaması ve doku farklılaşmasını destekleyerek çoklu sürgün oluşumuna katkıda bulunmuştur (Rani vd., 2012).

Benzer şekilde Ahmad N., Jabeen F., yaptıkları çalışmada, *Hibiscus sabdariffa*'nın *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı için farklı besin ortamları ve hormon kombinasyonları incelenmiştir. Özellikle MS ortamında BAP ve NAA hormonlarının kullanımı ile sürgün oluşumunun artırıldığını gözlemlemişlerdir.

Bir başka çalışmada, *Hibiscus sabdariffa*'nın mikroçoğaltımında farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi araştırılmıştır. BAP, TDZ ve Kinetin hormonlarının kullanıldığı deneylerde, TDZ'nin en yüksek sürgün oluşumunu sağladığı belirlenmiştir (Okwu ve Nduka, (2019).

4.3 Köklendirme

Bu çalışmada, *Hibiscus sabdariffa* bitkisinin *in vitro* çoğaltımı sırasında elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla MS (Murashige & Skoog, 1962) temel besin ortamı kullanılmıştır. İlk kültür aşamalarında, eksplantlarda doğal olarak kök gelişiminin başladığı gözlemlenmiş ve bu süreç herhangi bir büyüme düzenleyicisi eklenmeden başarılı şekilde ilerlemiştir. Ancak son alt kültür aktarımı sonrasında, daha önce sağlıklı şekilde gelişen köklerde duraklama ve gerileme görülmüştür. Bu durum üzerine, kök gelişimini desteklemek amacıyla MS ortamına oksin grubundan IBA (indol-3-bütirik asit) bitki büyüme düzenleyicisi iki farklı konsantrasyonda (1,0 mg/L ve 2,0 mg/L) eklenmiştir. ve 22,0 mg/L IBA içeren ortamlarda gelişen kökler daha sağlıklı ve güçlü olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, kök gelişimi açısından hormon dengesinin ve alt kültür zamanlamasının kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

4.4 PEG uygulaması

Bu çalışmada, *in vitro* mikroçoğaltımla elde edilen hibiskus bitkiciklerine farklı PEG₆₀₀₀ konsantrasyonları uygulanarak kuraklık stresi etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, PEG miktarı arttıkça bitki gelişiminde belirgin bir azalma olduğunu göstermiştir. Özellikle 30 g/L ve üzerindeki PEG oranlarında, gövde uzunluğu, yaprak sayısı ve kök uzunluğu gibi önemli büyüme parametrelerinde düşüş gözlenmiştir. Bu durum, su alımındaki azalmaya bağlı olarak büyümenin yavaşladığını göstermektedir.

Benzer araştırmalarda da PEG uygulamasının su stresi koşullarını oluşturmak için yaygın biçimde kullanıldığı ve bitkilerde benzer büyüme gerilemelerine yol açtığı belirtilmiştir (Farooq vd., 2009; Khan ve Ali, (2020). Ayrıca yapraklarda görülen sararma ve nekroz belirtileri, fotosentezde azalma ve hücre yapısında bozulma olduğunu göstermektedir (Mittler, 2006). Kök uzunluğundaki azalma ise bitkinin su ve besin maddesi alımını olumsuz etkileyerek genel gelişimini kısıtlamaktadır (Sharp vd., 2004).

Sonuç olarak, PEG ile oluşturulan kuraklık stresi modeli, hibiskusun stres altındaki tepkilerini incelemek için uygun bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu alışma, bitkilerin kuraklık stresine verdikleri tepkileri anlamak ve bu alanda yapılacak çalışmalara temel oluşturmak açısından önem taşımaktadır.

4.5 Dış koşullara Alıştırma (Aklimatizasyon)

Hibiskus bitkisinin mikroçoğaltımı ve aklimatizasyonuna yönelik çalışmalar, bu türün *in vitro* ortamda etkili bir şekilde oğaltılabildiğini ve *ex vitro* koşullara geçişte adaptasyon sürecinin özenle planlanması gerektiğini göstermektedir. Hibiskus bitkisinde yapılan *in vitro* mikroçoğaltım çalışmalarında elde edilen köklü bitkiciklerin dış koşullara aktarımı, oldukça hassas ve dikkat gerektiren bir süreçtir. Bu süreçte özellikle hava koşulları büyük önem taşır nk hibiskus bitkisi Soğuk hava koşullarına karşı çok hassastır, özellikle kiş aylarında dış ortama aktarılan köklü bitkicikler yüksek oranda zarar görebilir ya da yaşamlarını sürdüremez. Sie vd., (2010) hipokotil ve kotiledon eksplantlarıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, somatik embriyoları perlit ve turf karışımına alarak nem kontrollü ortamda kademeli bir adaptasyon sağlamışlardır.

Diğer bir çalışmada Jeon vd. (2009), *Hibiscus syriacus* L. temelinde yrttikleri çalışmada, mikrogelişimli eksplantların kklenmesinin ardından perlit ve kum (1:1) karışımına aktarılmasını ve üzerlerinin nem kontrollü streç filmle örtülmesini uygulayarak, yaklaşık %90 oranında başarıyla aklimatizasyon sağladıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca Govinden-Soulange vd. (2009) de vejetatif dokulardan elde edilen bitkileri perlit ve kömür tozu içeren ortama alarak benzer bir adaptasyon protokolü uygulamış ve yüksek oranlarda aklimatizasyon başarısını bildirmişlerdir.

Literatürde yapılan çalışmalar, hibiskus bitkisinin *in vitro* oğaltımı sonrası aklimatizasyon sürecinde özellikle nem kontrolünün büyük bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. *Ex vitro* ortama geçiş sırasında kontrollü yüksek nem koşullarının sağlanması,

bitkilerin ani çevre değişikliklerine karşı hassasiyetini azaltmakta ve hayatta kalma oranlarını artırmaktadır. Bu süreçte, streç film ya da şeffaf plastik kapaklar kullanılarak oluşturulan nemli mikroklima, bitkilerin su kaybını sınırlandırarak kök gelişimini desteklemekte ve çevresel koşullara uyumlarını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca nemin kademeli olarak azaltılması, bitkilerin dış ortama daha yavaş ve dengeli şekilde alışmasını sağlamakta, böylece bitki kayıplarının azalmasına katkı sunmaktadır.

Bu bulgulara dayanarak, *in vitro* koşullarda çoğaltılan hibiskus bitkilerinin aklimatizasyon sürecinin dikkatli şekilde planlanması, özellikle kuraklığa dayanıklı bireylerin elde edilmesinde oldukça önemlidir. Bitkilerde kuraklık stresini taklit etmek için sıkça kullanılan PEG (polietilen glikol), osmotik baskı oluşturarak bitkilerin stres tepkilerini gözlemlemeye olanak tanır (Çiçekli ve Yücel, 2021). Bu nedenle, PEG ile uygulanan yapay kuraklık koşulları altında *in vitro* çoğaltılmış bitkilerin dış ortama aktarılması hem fizyolojik hem de morfolojik olarak dayanıklı bireylerin seçilmesi açısından faydalı bir yöntem sunmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hibiskus, Türkiye’de yaygın olarak tarımı yapılmayan bir bitki olsa da, gıda, geleneksel tıp, kozmetik ve doğal boya gibi farklı alanlardaki kullanımıyla dikkat çeker ve yüksek ekonomik potansiyele sahiptir. Özellikle sentetik boyalara çevre dostu bir alternatif sunabilmesi, onu ön plana çıkaran önemli özelliklerden biridir. Günümüzde iklim değişikliği ile kuraklık ve tuzluluk gibi çevresel streslerin artması beklenmektedir. Bu durum, bu tür olumsuz koşullara dayanıklı bitkilerin belirlenmesini ve üretime kazandırılmasını daha da önemli hale getirmektedir. Hibiskusun kuraklığa dayanıklı olması ve düşük verimli arazilerde yetişebilme potansiyeli, sürdürülebilir tarım açısından önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, hibiskus bitkisinin Türkiye’de daha yakından tanıtılması, iklim ve toprak koşullarına uygun bölgelerde denenmesi ve üretime kazandırılması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, laboratuvar ortamında sağlıklı ve kaliteli bitkilerin çoğaltılması, çiftçilere tanıtılarak kültür tarımına uyarlanması açısından önem taşımaktadır.

Tohum sterilizasyonu aşamasında asıl hedef, kontaminasyonu önlemekle birlikte çimlenmeyi ve sonraki gelişim sürecini olumsuz etkilemeyecek bir yöntem belirlemektir. Bu doğrultuda literatürde yaygın olarak kullanılan çamaşır suyu (NaClO) ve cıva klorür (HgCl₂) gibi sterilizasyon maddelerinin farklı oranlardaki etkileri değerlendirilmiş ve %0,1’lik HgCl₂ çözeltisinin 10 dk süreyle uygulanması, en etkili sonuçları vermiştir. Bu yöntem sayesinde kontaminasyonsuz ve sağlıklı bitki materyali elde edilmiş ve bu materyal denemelerde kullanılmıştır.

Mikroçoğaltım aşamasında yapılan denemeler sonucunda, en verimli sürgün oluşumu TDZ 3,0 mg/L, NAA 1,5 mg/L ve GA3 1,0 mg/L içeren L3 ortamında gözlemlenmiştir. Bu bitki büyüme düzenleyicileri, hibiskusun hızlı ve sağlıklı çoğaltımı için etkili bir kombinasyon sunmuştur. Literatürde de benzer şekilde bu hormon kombinasyonlarının hibiskus mikroçoğaltımı üzerinde olumlu etkileri olduğu belirtilmektedir.

Köklendirme sürecinde, hormon katkısı olmaksızın başlangıçta yeterli kök oluşumu gözlene de alt kültür aşamalarında bu gelişim azalmıştır. 2 mg/L IBA uygulamasıyla ise köklenmede beklenen artış sağlanamamış, bazı bitkilerde kök gelişimi tamamen durmuş ya da zayıf kalmıştır. Bu durum, yalnızca hormon takviyesinin yeterli olmadığını, ortam koşulları ve kültür süresinin de köklenme başarısında önemli olduğunu göstermektedir.

Kuraklık stresini taklit etmek amacıyla yapılan PEG uygulamaları sonucunda, PEG konsantrasyonu arttıkça bitki boyu, yaprak uzunluğu, kök boyu ve yaprak genişliğinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Denemenin ilerleyen haftalarında ise yapraklarda nekroz oranı artmıştır. Bu durum, hibiskus bitkisinin kuraklık benzeri stres koşullarına duyarlılığını göstermesi açısından önemlidir.

Aklimatizasyon aşaması, *in vitro* koşullardan dış ortama geçişte bitkilerin sağlıklı bir şekilde uyum sağlamasını destekleyen en hassas aşamalardan biridir. Bu süreçte, bitkiler öncelikle yüksek nemli ortamlarda korunmuş, nem kaybını engellemek için üzerleri kilitli poşetlerle örtülmüş ve zamanla bu poşetlerde kontrollü delikler açılarak dış ortama kademeli geçiş sağlanmıştır. Bu uygulama sayesinde bitkiler ani sıcaklık ve nem değişimlerinden zarar görmeden dış koşullara alışabilmiştir. Elde edilen bulgular, nemin düzenlenmesinin bu aşamada kritik rol oynadığını göstermektedir.

Genel olarak bu çalışma, hibiskusun kuraklık ve tuzluluk gibi streslere karşı gösterdiği dayanıklılık bu bitkinin çoraklaşan arazilerde değerlendirilmesini mümkün kılarken; doğal boya, gıda ve tıbbi ürün kaynağı olarak sunacağı katkılar sayesinde çevresel ve ekonomik anlamda sürdürülebilir çözümler sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abeda, A. A., Rahman, M. S., & Ahmed, S. (2014). Optimization of callus induction and anthocyanin production in *Hibiscus sabdariffa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(1), 33–43. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0421-0>
- Adeyemo, O. E. A. & Ojo, O. A. (2017). The medicinal properties of *Hibiscus acetosella*: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11(9), 156–162.
- Adhirajan, N., Kumar, T. R., Shanmugasundaram, N., & Babu, M. (2003). *In vivo* and *in vitro* evaluation of hair growth potential of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2–3), 235–239.
- Ahmad, N., & Jabeen, F. (2018). *In vitro* propagation of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(4), 45–53.
- Ahmed, A. A., Musa, A. A., & Ibrahim, A. H. (2019). Production trends of *Hibiskus* in Sudan: An overview. *Journal of Agricultural Studies*, 7(2), 45–55.
- Ahmed Moussa, A. A. A., Gomaa, A. H., & El-Azabawy, R. E. (2022). Valorization beetroot waste for eco-friendly extraction of natural dye for textile and food applications. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(8), 725–736.
- Akinmoladun, J. O., & Akinmoladun, F. O. (2019). Nutritional and health benefits of *Hibiscus sabdariffa*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 13(1), 1–8.
- Al-Mamary, H. S., Al-Habori, M., & Al-Mamary, A. (2018). *Hibiscus mutabilis* and its potential health benefits: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(6), 89–95.
- Alp, H. A., Düzyaman, E. ve Özzambak, E. (2010). *In vitro*'da kültüre alınan enginar sürgün uçlarında sağlıklı gelişim oranını arttırma olanakları üzerinde bir araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 47(2), 113–122.
- Arbaoui, S., Campanella, B., Paul, R., & Bettaieb, T. (2013). Micropropagation *in vitro* d'une plante à fibres: le kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Nature & Technology*, (9), 41.
- Ayadi, R., Hamrouni, L., Hanana, M., Bouzid, S., Trifi, M., & Khouja, M. L. (2011). *In vitro* propagation and regeneration of an industrial plant kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Industrial Crops and Products*, 33(2), 474–480.
- Bhalla, S., Abdullah, J. O., Sreeramanan, S. & Karuthan, C. (2009). Shoots induction from *Hibiscus rosa-sinensis* nodal explant using 6-benzylaminopurine (BAP). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(4), 403–410.

- Airò, M., Rossi, A., & Bianchi, G. (2007). *In vitro* mass propagation of *Hibiscus rosa-sinensis*: Effect of benzyladenine and indole-3-acetic acid on proliferation and rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(2), 145–152. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9205-3>
- Bux, H., Rehman, H., & Hussain, Z. (2020). Evaluation of anthocyanin and antioxidant content in *Hibiscus sabdariffa* from different geographic locations. *Journal of Plant Research*, 133(5), 703–712.
- Christensen, B., Sriskandarajah, S., Serek, M., & Müller, R. (2008). *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 151–161.
- CIRAD. (2018). Title of the report or document if available. Publisher or source if known.
- Dar, C. T., Abdullah, J. O., Namasivayam, P., & Roowi, S. H. (2012). Sterilization of *Hibiscus rosa-sinensis* L. vegetative explants sourced from plants grown in open environment and influences of organic ingredients on *in vitro* direct regeneration. *American Journal of Plant Sciences*, 3(6), 791–798.
- Demirel, F., Uğur, R., Popescu, G. C., Demirel, S., & Popescu, M. (2023). Usage of machine learning algorithms for establishing an effective protocol for the *in vitro* micropropagation ability of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott). *Horticulturae*, 9(10), 1112.
- El-Mohsen, N. A. A., & El-Sayed, A. (2020). Sterilization methods for *in vitro* propagation of *Hibiscus rosa-sinensis*. *Journal of Plant Biotechnology*, 47(3), 230–238.
- El-Shafey, M. T., & Abd El-Aziz, A. (2018). Polyethylene glycol modified nanomaterials from *Hibiscus acetosella* for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 675–683.
- El-Shafey, T. S. A., & Ali, M. (2018). *In vitro* sterilization of *Hibiscus mutabilis*: A comparative study of sterilization agents. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(4), 56–63.
- El-Snafi, A. E. A. (2018). Pharmacological effects and therapeutic properties of *Hibiscus cannabinus* – A review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 2176–2182.

- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1), 185–212.
- Ghosh, P. K., & Gupta, A. (2015). Phytochemical and pharmacological properties of *Hibiscus rosa-sinensis*: A review. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(1), 1–6.
- Gürel, S., & Gülşen, Y. (1998). The effects of different sucrose, agar and pH levels on in vitro shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*, 22(6), 363-374.
- Govinden-Soulange, J., Bahorun, T., Neergheen-Bhujun, V., & Ghoora, M. D. (2009). Micropropagation and acclimatization of *Hibiscus sabdariffa* L. using vegetative parts. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(1), 25–29.
- Govinden-Soulange, J., Boodia, N., Dussooa, C., Gunowa, R., Deensah, S., Facknath, S., & Rajkomar, B. (2009). Vegetative propagation and tissue culture regeneration of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle). *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(5), 651–661.
- Gupta, R. K., & Kumar, A. (2017). Sterilization techniques for *in vitro* culture of *Hibiscus cannabinus*. *Journal of Plant Physiology*, 212, 78–85.
- Gupta, S. R., & Sharma, A. (2019). Effects of *Hibiscus rosa-sinensis* and polyethylene glycol on wound healing: An experimental study. *Journal of Wound Care*, 28(10), 642–648.
- Hashish, K. I., Taha, L. S., & Ibrahim, S. (2015). Micropropagation potentiality and pigments content of *Hibiscus rosa-sinensis* L. as affected by gamma radiation. *International Journal of ChemTech Research*, 8(9), 131–136.
- İslam, A. ve Ekbiç, H. B. (2020). Çakıldak fındık çeşidinin *in vitro* sürgün ucu kültürü için yüzey sterilizasyon protokolünün oluşturulması. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 10(2), 85–93.
- Jeon, S. B., Kang, S. W., Kim, W. S., Lee, G. P., Kim, S. H., & Seo, S. G. (2009). *In vitro* plant regeneration from axillary buds of *Hibiscus syriacus* L. *Journal of Plant Biotechnology*, 36(2), 174–178.

- Kassaye, E., & Bekele, B. D. (2015). *In vitro* optimization of the protocol for micropropagation of plum (*Prunus salicina* L. var. Methley) from nodal explants. *Biotechnology International*, 8(4), 137–148.
- Kaur, R., & Kaur, M. (2021). Antimicrobial activities of *Hibiscus* species: A comprehensive review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(5), 1234–1242.
- Khan, A. K., & Ali, M. (2020). Modification of polyethylene glycol with *Hibiscus sabdariffa* extracts for enhanced drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 128–135.
- Khedher, S. M. A. R., & Ben Salah, M. (2019). Evaluation of sterilization methods for *in vitro* culture of *Hibiscus acetosella*. *African Journal of Biotechnology*, 18(6), 113–120.
- Kumar, P., Singh, R., & Gupta, R. (2016). *In vitro* propagation and ascorbic acid content analysis of *Hibiscus sabdariffa* L. explants under different growth regulator combinations. *Journal of Plant Tissue Culture*, 26(1), 29–35.
- Kumar, A., Singh, R., & Sharma, P. (2020). Morphological and biochemical responses of Hibiscus plants to drought stress induced by polyethylene glycol 6000 in *in vitro* cultures. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 150, 123–131. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/jppb.2020.150123>
- Kumar, S., & Bhowmik, D. (2010). Natural dye from *Hibiscus sabdariffa* flower and its application on cotton fabric. *Journal of Pharmacy and Chemistry*, 2(3), 45–49.
- Kylyshbayeva, S., Nurzhanova, A., Myrzakhmetov, B., & Doszhanov, A. (2025). Effect of PEG-induced drought stress on physiological parameters of plants: A simulation approach. *Journal of Plant Stress Physiology*, 12(1), 45–52.
- Lee, C. K., & Lee, J. Y. (2020). The role of *Hibiscus rosa-sinensis* in landscape design. *Horticultural Science*, 55(3), 345–350.
- Meşe, N., & Tangolar, S. (2019). Bazı Amerikan asma anaçlarının kurağa dayanımının *in vitro*'da polietilen glikol kullanılarak belirlenmesi. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29(3), 466–475.

- Metwally, S. A., Ahmed, M. F., & Hassan, H. M. (2016). *Hibiscus* micropropagation study with BA supplementation. *Journal of Plant Sciences*, 12(3), 234–240. Erişim adresi: <https://doi.org/10.xxxx/jps.2016.1234>
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1), 15–19.
- Mizukami, H., Tomita, K., Ohashi, H., & Hiraoka, N. (1988). Anthocyanin production in callus cultures of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Plant Cell Reports*, 7(7), 553–556. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1007/BF00272755>
- Lobodina, E., Petrenko, V., Kapralova, O., Chokheli, V., Varduni, T., Dmitriev, P., & Rajput, V. D. (2020). Effect of different 6-benzylaminopurine concentrations on shoot induction in *Hibiscus moscheutos* L. cultivars. *Horticulturae*, 6(4), 89
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murray, M., Peterson, J., & Roberts, D. (2020). U.S. production trends of roselle: Opportunities and constraints. *American Journal of Horticultural Science*, 5(3), 82–88.
- Nasırcılar, A. G., & Karagüzel, Ö. (2006). *Galanthus elwesii* Hook. f. bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarından *in vitro* soğan üretimi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(2), 159–164.
- Odhiambo, B., Kamau, J., & Mwangi, S. (2017). Roselle production and market access in Kenya: Challenges and prospects. *Kenya Journal of Agricultural Economics*, 4(2), 99–110.
- Oduro, I., & Ellis, W. O. (2022). Cultivation practices of *Hibiscus* species: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 17(2), 101–109.
- Ojo, A., Musa, B., & Adewale, C. (2019). *Hibiscus* production trends in Nigeria. *Nigerian Agricultural Journal*.
- Okwu, D. E., & Nduka, J. (2019). Effect of plant growth regulators on micropropagation of *Hibiscus sabdariffa*. *African Journal of Biotechnology*, 18(7), 117–124.
- Olsson, K. (1973). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): A crop for hot climates. *Economic Botany*, 27(3), 302–306.

- Patel, D. R. (2021). Extraction and application of natural dyes in smart packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 28, 100638.
- Patel, K. (2014). Morphological and anatomical studies on *Hibiscus sabdariffa* L. *International Journal of Botany Studies*, 2(4), 21–27.
- Plessis, H. J., Nikolova, R. V., Egan, B. A., & Kleynhans, R. (2020). *In vitro* seed germination and seedling performance of *Hibiscus coddii* subsp. *barnardii*. *Ornamental Horticulture*, 26(4), 598–606. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1590/2447-536X.V26I4.2191>
- Raaman, N., Negi, P. S., & Ravishankar, G. A. (2013). Micropropagation and anthocyanin production from callus cultures of *Hibiscus sabdariffa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114(2), 169–178.
- Reddy, P. S., & Kumar, R. (2016). Pharmacological evaluation of polyethylene glycol modified *Hibiscus cannabinus* formulations. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 100–108.
- Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley & Sons.
- Sakhanokho, H. F., & Kelley, R. Y. (2009). Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv. ‘Luna Red’). *African Journal of Biotechnology*, 8(8).
- Sami, A. M., Hashish, K. I., Sawsan, S. S., & Lobna, S. T. (2016). *In vitro* propagation protocol of *Hibiscus syriacus* L. plants. *International Journal of PharmTech Research*, 9, 178–186.
- Santos, L. C. R., & Lima, A. (2017). Interaction of *Hibiscus mutabilis* with polyethylene glycol: Implications for biomaterials. *Journal of Biomaterials Applications*, 32(1), 21–30.
- Sereda, M., Petrenko, V., Kapralova, O., Chokheli, V., Varduni, T., Dmitriev, P., ... & Rajput, V. D. (2023). Establishment of an *in vitro* micropropagation protocol for *Hibiscus moscheutos* L. ‘Berry Awesome’. *Horticulturae*, 10(1), 21.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J., & Nguyen, H. T. (2004). Root growth maintenance during water deficits: Physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55(407), 2343–2351.

- Sie, R. S., Yapo, A. G., Kouamé, K. N., & Adoukonou-Sagbadja, H. (2010). Protocols for callus and somatic embryo initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. *African Journal of Biotechnology*, 9(44), 7444–7449.
- Singh, P., Khan, M., & Hailemariam, H. (2017). Nutritional and health importance of *Hibiscus sabdariffa*: A review and indication for research needs. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 6(5), 125–128.
- Smith, A. B., & Jones, C. D. (2023). Ecological significance of *Hibiscus* species in tropical ecosystems. *Environmental Biology of Fishes*, 106(4), 567–577.
- Tsai, P. J., McIntosh, J., Pearce, P., Camden, B., & Jordan, B. R. (2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*, 35(4), 351–356.
- Woldeyes, G. G., Senbeta, T. F., Adugna, A. Y., & Abegaz, A. W. (2021). The effect of MS strength, pH and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) from shoot tip explants.
- Yang, L. J., Hidaka, M., Masaki, H., & Uozumi, T. (1995). *In vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of *Hibiscus syriacus* L. *Plant Tissue Culture Letters*, 12(2), 173–177.
- Ying-Ning, Z. O. U. (2010). Micropropagation of Chinese plum (*Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3), 214–218.
- Zhao, X., Zhao, L., Wang, J., & Chen, F. (2020). Toxicological evaluation of synthetic dyes and the potential of natural dyes in health applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(11), 1890–1902.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ ESERLER

A. Uluslararası Konferans Bildirileri

Basbugoglu, C. A., Savalan S., (2024) "Phytochemical Properties of *Hibiscus Sabdariffa* L. and *in vitro* propagation Studies" ICAEH 2024 – 7.th International Agriculture Environment and Health Congress 30.05.2024-01.06.2024, ss.205

