

BAZI FRITILLARIA TÜRLERİNDE *IN VITRO* SOĞANCIK ÜRETİMİ VE DIŞ KOŞULLARA ALIŞTIRMA ÇALIŞMALARI

EBRU AKYÜZ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eēitim-  ēretim ve Sınav Y netmeliēinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin  ng rd ē 

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2018

BAZI FRITILLARIA TÜRRLERİNDE *IN VITRO* SOĞANCİK ÜRETİMİ VE DİŞ KOŞULLARA ALIŞTIRMA ÇALIŞMALARI

***IN VITRO* BULBLET PRODUCTION AND ACCLIMATIZATION STUDIES IN SOME FRITILLARIA SPECIES**

EBRU AKYÜZ

Prof. Dr. RUKİYE TIPIRDAMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2018

EBRU AKYÜZ'ün hazırladığı “**Bazı Fritillaria Türlerinde *In Vitro* Soğancık Üretimi ve Dış Koşullara Ağıştırılma Çalışmaları**” adlı bu çalışma ağığıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU

Başkan



Prof. Dr. Rukiye TIPIRDAMAZ

Danışman



Prof. Dr. Şevket ALP

Üye



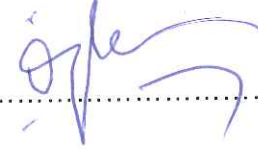
Yrd. Doç. Dr. Cahit DOĞAN

Üye



Yrd. Doç. Dr. Fazilet Özlem ÇEKİÇ

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☒ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

15 / 01 / 2018


EBRU AKKÖZ

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

15 / 01 /2018



EBRU AKKÖZ

ÖZET

BAZI FRITILLARIA TÜRLERİNDE *IN VITRO* SOĞANCIK ÜRETİMİ VE DIŞ KOŞULLARA ALIŞTIRMA ÇALIŞMALARI

EBRU AKYÜZ

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. RUKİYE TIPIRDAMAZ

Ocak 2018, 54 sayfa

Çalışmada ülkemiz için önemli bitki türlerinden olan *Fritillaria imperialis* ve *F. persica*'nın hızlı çoğaltımı amacıyla, olgun tohumlardan ve çiçek saplarından *in vitro* soğancık oluşturma, çoğaltma ve oluşan soğancıkların dış koşullara aktarılma aşamalarında bazı uygulamaların etkileri araştırılmıştır. Soğancık oluşturmak amacıyla; olgun tohumlar +4°C'de 3 ay MS besin ortamında ön üşütmeye tabi tutulup oluşan soğancıklar ikiye ayrılarak 3 ay boyunca 2 mg/l thidiazuron içeren MS besin ortamında çoğaltılmıştır. Gelişimleri üzerinde farklı şeker cinslerinin etkisini gözlemek amacıyla soğancıklar, 4 ay boyunca 60 g/l sukroz veya fruktoz içeren MS besin ortamlarında inkübe edilmiştir. Kök oluşumunu artırmak amacıyla soğancıklar 0.5mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında 4 ay kültüre alınmışlardır. *F. imperialis* tohumlarında çimlenme oranı %73 ve çimlenen tohumların soğancık oluşturma oranı %76 iken *F. persica* tohumlarında çimlenme oranı %82.1 soğancık oluşturma oranı ise %82 olarak hesaplanmıştır. Soğancık gelişiminde sukrozun daha etkili olduğu belirlenmiştir. *F. imperialis* soğancıklarından sukroz ortamında başlangıca göre 5 katı fazla, fruktoz ortamında ise 2.2 katı fazla soğancık oluşmuştur. *F. persica*'da ise sukroz ortamında ise 3.8 katı fazla, fruktoz ortamında ise 1.5 katı fazla soğancık oluşmuştur. Köklendirme ortamında *F. imperialis* soğanlarının %40'ı, *F. persica* soğanlarının ise %35.8'i köklenmiştir. Olgunlaşan ve gelişen soğancıklara bakteri (*Serratia marcescens*), alg (*Spirulina platensis*) veya organik köklendirme tozu uygulanarak toprağa aktarılmıştır. İklim dolabında 23°C'de 16/8 saat aydınlık/karanlık ortamda 4 ay yetiştirilen soğancıklardan bakteri uygulaması yapılanların yaklaşık %30'unun hayatta kaldığı belirlenmiştir. Her iki türe ait çiçek sapları 1 cm olacak şekilde parçalara bölünerek besin

ortamlarına yerleştirilmiş ve 20°C'ye sahip iklim dolabında, sürekli karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Bir ay sonra kültürlerde kallus ve soğancık gelişimi gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dış koşullara alıştırma, Doku kültürü, *Fritillaria*, Hızlı çoğaltım



ABSTRACT

IN VITRO BULBLET PRODUCTION AND ACCLIMATIZATION STUDIES IN SOME FRITILLARIA SPECIES

EBRU AKYÜZ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. RUKİYE TIPIRDAMAZ

January 2018, 54 pages

In order to micropropagate *Fritillaria imperialis* and *F. persica*, the process of *in vitro* bulblet formation and effects of such treatments on acclimatization of these bulbs obtained by using mature seeds and pedicels of the plants were investigated in this study. Mature seeds were vernalized on MS medium for 3 months at +4°C temperature in order to generate bulbs, then the bulbs were cut into halves and transferred to MS mediums including 2 mg/l thidiazuron for 3 months. Bulblets were incubated for 4 months on MS mediums including 60 g/l sucrose or fructose to observe the effects of different sugar types on their growing. For increasing root development bulbs were cultivated on ½ MS mediums including 0.5 mg/l IBA for 4 months. Germination ratio for *F. imperialis* was 73% and 76% of the germinated seeds produced bulblets. As for *F. persica*, 82.1% of the seeds germinated and 82% of them produced bulblets. Sucrose was found more effective on bulblet development. For *F. imperialis*, on the MS medium including sucrose, bulblets were developed 5 times better than beginning of the culture; while on the medium including fructose it was only 2.2 times better. Regarding *F. persica*, on the MS medium including sucrose, bulblets were developed 3.8 times better than beginning of the culture; while on the medium including fructose it was only 1.5 times better. 40% of *F. imperialis* bulblets and 35.8% *F. persica* bulblets rooted on rooting mediums. The bulbs regenerated and developed were transplanted into soil with applying bacteria (*Serratia marcescens*), alga (*Spirulina platensis*) or organic rooting powder. They were kept in acclimatization cabins at 23°C temperature and long day photoperiod (16h light/8h darkness) for 4 months. Approximately 30% of bulblets applied bacteria were survived. Peduncles of both species

were cut into 1 cm long for per pieces and transplanted on mediums following surface sterilization. And all the cultures were kept in growth chamber set up at 20°C temperature and under permanent darkness. End of the first month calli and bulblet developments were observed.

Keywords: Acclimatization, Tissue culture, *Fritillaria*, Micropropagation



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bana araştırma olanağı sağlayan, çalışmanın her aşamasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, maddi ve manevi olarak destekleyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Rukiye TIPIRDAMAZ'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım daima beni yüreklendiren kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Bitki materyallerinin temininde yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Neşet ARSLAN ve Prof. Dr. Şevket ALP'e çok teşekkür ederim.

Deneylerde kullandığım laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonunda her zaman yardımcı olan Teknisyen Vedat MUTLU'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz Yüksek Lisans öğrencisi Oğuzhan YAŞARKAN'a çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen sevgili hocalarım Dr. Gökçen Baysal FURTANA ve Uzm. Fahriye Öcal ÖZDAMAR'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince beni motive eden, hep yanımda olan güleryüzünü ve moral desteğini eksik etmeyen sevgili arkadaşım Görkem ÇAĞDAŞ'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında beni destekleyen işyerim Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi yönetimine teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman maddi ve manevi olarak yanımda olup sevgi ve destekleriyle bana güç veren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmamı proje (Proje No:1445) olarak destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Yetkililerine çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	10
3.1. Gereç.....	10
3.1.1. <i>F. imperialis</i> L. (Şemdinli Lalesi, Ağlayan Gelin, Ters Lale).....	11
3.1.2. <i>F. persica</i> L. (Adıyaman Lalesi, Karagöz Lalesi)	14
3.2. Yöntemler	15
3.2.1. Besin Ortamı ve Doku Kültürü Koşulları.....	15
3.2.1.1. Olgun tohumların kültüründe kullanılan ortamlar.....	16
3.2.1.2. Çiçek sapı kültüründe kullanılan ortamlar	16
3.2.2. Eksplant İzolasyonu.....	17
3.2.3. Eksplant Sterilizasyonu.....	20
a) Olgun tohumların sterilizasyonu	20
b) Çiçek saplarının sterilizasyonu	20
3.2.4. Tohumların <i>In Vitro</i> 'da Çimlendirilmesi	21
3.2.5. Doku Kültürü Tekniğinin Uygulanması	21
3.2.5.1. Olgun tohumların kültürü	21
3.2.5.2. Çiçek saplarının kültürü	23
3.2.6. Köklendirme Çalışmaları.....	24
3.2.7. <i>In Vitro</i> 'da Üretilen Soğancıkların Dış Koşullara Aktarımı	24
4. BULGULAR.....	27
4.1. Olgun Tohumların Kültür Sonuçları.....	27
4.2. Çiçek Sapı Kültür Sonuçları	31
4.4. <i>In Vitro</i> Oluşan Soğancıkların Köklenme ve Dış Koşullara Alışması	33
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	36
6. KAYNAKLAR.....	44

ÖZGEÇMİŞ.....	54
---------------	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Murashige ve Skoog (MS) besin ortamı bileşimi.....	16
Çizelge 3.2. Çiçek sapı kültüründe kullanılan besin ortamları.....	17
Çizelge 4.1. <i>F. imperialis</i> ve <i>F. persica</i> olgun tohumlarının çimlenme ve soğancık oluşturma oranları.....	28
Çizelge 4.2. <i>F. imperialis</i> ve <i>F. persica</i> olgun tohumlarından soğancık oluşumuna sukroz ve fruktozun etkisi.....	31
Çizelge 4.3. <i>Fritillaria</i> türlerinin köklenme sonuçları.....	34
Çizelge 4.4. Bakteri, alg ve köklendirme tozu uygulaması yapılan soğancık sayısı.....	34



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Has Bahçe'de yetişen <i>Fritillaria imperialis</i> bitkileri.....	10
Şekil 3.2. Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Has Bahçe'de yetişen <i>Fritillaria persica</i> bitkileri.....	11
Şekil 3.3. Van ilindeki doğal <i>F. imperialis</i> alanı.....	12
Şekil 3.4. Van'da doğada yetişen <i>F. imperialis</i> bitkileri.....	12
Şekil 3.5. <i>F. imperialis</i> bitkisinde bal özü salgılayan bezler.....	13
Şekil 3.6. <i>F. imperialis</i> çiçeğinin genel yapısı.....	13
Şekil 3.7. <i>F. persica</i> çiçeklerinin görünümleri.....	15
Şekil 3.8. <i>F. imperialis</i> (solda) ve <i>F. persica</i> 'nın (sağda) meyve ve tohumları	18
Şekil 3.9. Beytepe Kampüsü Has Bahçede'ki <i>F. imperialis</i> (solda) ve <i>F. persica</i> (sağda) bitkileri.....	19
Şekil 3.10. <i>F. imperialis</i> (solda) ve <i>F. persica</i> 'nın (sağda) çiçek sapları.....	20
Şekil 3.11. <i>F. imperialis</i> olgun tohumlarının MS besin ortamına alınması.....	21
Şekil 3.12. İklim odasında kavanozların içerisinde kültüre alınmış iki türe ait tohumlar.....	22
Şekil 3.13. <i>F. imperialis</i> (solda) ve <i>F. persica</i> 'nın (sağda) çiçek sapı kültürleri.....	23
Şekil 3.14. Çalışma aşamasından bir görüntü.....	24
Şekil 3.15. Köklendirmede kullanılan köklendirme tozu.....	25
Şekil 3.16. <i>In vitro</i> 'da üretilen soğancıkların toprağa aktarım aşamasından görüntüler.....	26
Şekil 4.1. MS besin ortamındaki <i>Fritillaria</i> 'nın olgun tohumları.....	27
Şekil 4.2. Çimlenen ve 1 hafta sonra oluşmaya başlayan soğancıklar.....	27
Şekil 4.3. Çimlenen ve 1 hafta sonra oluşmaya başlayan soğancıklar.....	28
Şekil 4.4. <i>F. imperialis</i> 'in olgun tohumlarından oluşan soğancıklar (solda) ve TDZ içeren besin ortamında kültüre alınan soğancıklar (sağda).....	29
Şekil 4.5. <i>F. persica</i> 'nın olgun tohumlarından oluşan soğancıklar (solda) TDZ içeren besin ortamında kültüre alınması (sağda).....	29
Şekil 4.6. <i>F. imperialis</i> (solda) ve <i>F. persica</i> (sağda) türlerinde olgun tohum kültür başlangıcından 9 ay sonra sukroz ortamında oluşan soğancıklar.....	30
Şekil 4.7. <i>F. imperialis</i> (solda) ve <i>F. persica</i> (sağda) bitkilerinin çiçek saplarının kültüre alınması sonucu oluşmaya başlayan kallus ve soğancıklar.....	32
Şekil 4.8. Kültürlerde meydana gelen kontaminasyonlar.....	32

Şekil 4.9. <i>F. imperialis</i> 'in olgun tohumlarının kültüre alınmasıyla oluşan soğancıkların olgunlaştırılması ve köklendirilmesi.....	33
Şekil 4.10. <i>F. persica</i> 'nın olgun tohumlarının kültüre alınmasıyla oluşan soğancıkların olgunlaştırılması ve köklendirilmesi.....	33
Şekil 4.11. Canlı ve içi boşalan soğanların genel görüntüsü.....	35



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	Gram
L, l	Litre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
M	Molar
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
°C	Santigrat derece
ppm	mg çözünen/kg veya litre çözelti
cm	Santimetre

Kısaltmalar

GA ₃	Giberellik Asit
KIN	Kinetin
BA, BAP	6-benzilaminopürin
NAA	naftalenasetik asit
IAA	Indol-3-asetik asit
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
MS	Murashige ve Skoog temel besin ortamı
2,4-D	2,4 Diklorofenoksi asetik asit
NaCl	Sodyum klorür
IBA	Indol-3-butirik asit

HCl	Hidroklorikasit
NaOCl	Sodyum hipklorit
TDZ	Thidiazuran (1 Phenil 3- (1,2,3-thidiazol 5yL urea)
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyiciler



1.GİRİŞ

Geofitler, toprak altındaki kökleri soğan, yumru ve rizomlardan oluşan çiçekli bitkilerdir. Geofitlerin çoğu Liliaceae, Iridaceae ve Amarryllidaceae familyasına aittir [1-2]. Geofitler ülkemizin zengin florası içinde 26 cins ve 540 türle temsil edilmekte ayrıca bu türlerin yaklaşık 1/3'ü endemiktir [3]. Liliaceae familyasından *Fritillaria* da bu gruba giren önemli tıbbi bir bitkidir [1-2].

Liliaceae familyasına ait türler kimyasal içerikleri ve çiçeklerinin gösterişli olması sebebiyle yüzyıllardan beri yetiştikleri doğal ortamlarından sökülerek iç ve dış piyasaya sunulmaktadır. Artan talebi karşılamak için yapılan kontrolsüz aşırı sökümler, bu türlerin doğadaki stoklarını azaltmış ve nesillerinin geleceğini tehlikeye sokmuştur. Bu nedenlerle doğal çiçek soğanlarının doğadan sökümlü yasalarla kontrol altına alınmış, birçok türde ihracatı yasaklanmış veya sınırlandırılmıştır [4]. *Fritillaria* türlerinin tamamının ihracatı yönetmeliğin çıktığı ilk yıldan itibaren yasaklanmıştır. Daha önce doğadan toplanarak ihraç edilen *F. imperialis* ve *F. persica* türlerinin üretilmeleri dışında ihracatı ise 1993 yılından itibaren yasaklanmıştır.

Türkiye Florası'na göre geofitler içinde *Allium* L., *Iris* L. ve *Crocus* L. cinslerinden sonra en fazla türle temsil edilen *Fritillaria* L. cinsine ait çok sayıda tür, ülkenin değişik yörelerine yayılmış durumdadır. Bunlar arasında tam endemik olanlar bulunmakla birlikte çiçeklerinin süs bitkisi olarak kullanılabilmesi potansiyeline sahip olan yarı endemik iki tür *F. imperialis* L. ve *F. persica* L.'nin ticari önemi yüksektir.

Geofit bitkileri içinde en gösterişli ve güzel türlerden birisi olan *F. imperialis*, *Fritillaria* cinsinin en çok tanınan, en gösterişli çiçeğe sahip olan bitkisidir. Çiçekleri ilkbaharda açan bitki Şemdinli Lalesi, Ters Lale, Ağlayan Gelin, Hakkari Lalesi, Şahtuğu, Tuğu şahı, Kral Tacı olarak da bilinmektedir. *F. persica* ise Adıyaman ili ve çevresinde doğada sıkça bulunduğundan bu bitkiye de Adıyaman Lalesi veya Karagöz Lalesi adı verilmektedir. Bazen her iki türe birden Ağlayan Gelin olarak genel bir isim verildiğine de rastlanabilmektedir. Avrupa ülkelerinde park ve bahçelerde, tarihi mekanların bahçelerinde kullanılan türler olmasına karşılık, *Fritillaria* türleri ülkemizde henüz süs bitkisi olarak yeterince tanınmamakta ve kullanılmamaktadır. Buna karşılık ihraç potansiyeli yüksek türlerdir [5].

Soğanlı bitkiler arasında oldukça geniş bir grubu kapsayan Liliaceae familyasına ait olan *Fritillaria* cinsi, dünyada 139 tür, 17 alttür ve 9 varyete olmak üzere 165 taksonla temsil edilmekle birlikte, Avrupa, Ortadoğu ve Merkezi Asya ile Kuzey Amerika'nın batısında yayılış göstermektedir [6]. Ülkemizde ise farklı bölgelerde özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde doğal olarak yetişen türleri bulunmaktadır [7-8].

Fritillaria cinsinin tür sayısı Türkiye'de 36 iken, Yunanistan'da 25, Rusya'da 22, Çin'de 24, İran'da 18 ve Kaliforniya'da 20'dir. Ayrıca Bulgaristan'da 6, İtalya'da 4, İspanya'da 3, Lübnan, Suriye, Portekiz, Afganistan'da 2'şer tür, İsrail ve Pakistan'da 1'er tür ve Afrika kıtasında 1 tür bulunmaktadır. Ülkelerin içerdiği tür sayılarına bakıldığında *Fritillaria* cinsinin en fazla türle Türkiye'de temsil edildiği görülmektedir. Bu cinste üç gen merkezinden söz edilebilmektedir: 1. gen merkezi Kaliforniya, 2. gen merkezi Yunanistan ve Türkiye, 3. gen merkezi Çin'dir [5].

Fritillaria türü sayısı Türkiye'de en fazla Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde, en az Karadeniz, Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu bölgelerinde bulunur. Tür sayısı açısından en zengin iller; Muğla, Antalya, Mersin, Kahramanmaraş, Hatay, Erzurum, Van ve Hakkari'dir [8-9].

Fritillaria türleri arasında süs bitkisi olarak ticari değeri olanlar olduğu gibi, küçük çiçekli ve fazla gösterişli olmayan türlerindeki steroid yapısındaki kimyasal bileşiklerin bulunması, bu cinse ait bitkilerin tıbbi açıdan da önemli olmasını sağlamaktadır. Özellikle önümüzdeki yıllarda alternatif tıbbi tedavilerin geliştirilmesi ve bitkisel kaynaklara yönelinmesi, bu bitkiyi çok yakın bir gelecekte fazlaca talep gören bir duruma getirecektir [7-8].

Fritillaria türlerinin ihracatı ve yurt içinde süs bitkisi olarak yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması esas alındığında bu bitkilerde üretimin artırılması gerekliliği önem kazanmaktadır.

Üretim olanakları oldukça sınırlı olan soğanlı bitkiler ya yavru soğanların (elekalı küçük soğanlar) söküm sonrası yeniden dikilmesiyle vejetatif olarak ya da tohum kullanılarak generatif olarak çoğaltılabilmektedir.

Geofitlerin tohumdan üretiminde tohumun ekiminden çiçek açacak büyüklükte bitkiye ulaşabilmesi 5-6 yıl sürmektedir. Ancak buna benzer bitkilerin tohumlarındaki

çimlendirme güçlüğü ve çiçek aşamasında söküm nedeniyle tohum elde edilememesi, bitkinin generatif yolla üretilmesi olanağını sınırlandırmaktadır. Soğanla üretimde ise her bir soğanın 1-3 yavru soğan üretebilmesi 3 yılda gerçekleşebilmektedir. Kontrolsüz sökümler de yavru soğancıkların tahrip edilmesine neden olmakta ve bitkinin çoğalması sınırlandırılmaktadır. Ayrıca tohumla çoğaltımda genetik varyasyon oldukça fazla olduğundan çiçek rengi, yapısı, çiçeklenme zamanı bakımından bir örnek bitki elde edilmesi zorlaştığı gibi, vejetatif yolla yumrulardan üretilmesinde de çoğalma katsayısı ve hızı yavaş olmaktadır. Üretim hızının düşük olması bu bitkilerin kültüre alınarak üretilmelerini kısıtlamaktadır [7-10].

Doğadan sökülerek ihraç edilmesi yasaklanmış olmasına rağmen günümüzde özellikle *F. imperialis* (Ağlayan Gelin) ve *F. persica* (Adıyaman lalesi) doğadan sökülerek yurtdışına satılmaktadır [4-5]. *Fritillaria* türleri arasında *F. imperialis* (Ters Lale, Ağlayan Gelin, Şemdinli Lalesi) ve *F. persica* (Kırk Lâle, Adıyaman Lalesi), farmasötik endüstrisinde ve süs bitkisi olarak önemli bir yere sahip olan ihracat potansiyeli yüksek tıbbi bitkilerdir. CITES Ek II listesine göre doğadan toplanarak ihracatı yasaklanan bu bitkilerin tohumla çoğaltımında ve vejetatif yolla soğanlarından üretilmesinde karşılaşılan problemler bitkinin üretimini kısıtlamaktadır. Hem süs bitkisi olarak önemli olan hem de tıbbi değer taşıyan bu türlerin çoğaltma yöntemlerine hız kazandırılması gerekmektedir. Bu nedenle bu bitkilerin üretimi için, son yıllarda birçok bitkinin mikro üretiminde yaygın olarak kullanılan *in vitro* teknikler gibi alternatif hızlı çoğaltım tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanması önem kazanmaktadır [11-12].

Bazı *Fritillaria* türlerinin de içinde bulunduğu soğanlı bitkilerin doku kültürü ile çoğaltılmasına yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte, bu çalışmalarda *in vitro* üretilen soğancıkların dış koşullara aktarma aşaması gerçekleştirilememiş ve tam bir optimizasyon sağlanamamıştır. Ülkemizde başlangıç adımları atılan bu konudaki araştırmaların özellikle endemik ve nesli tükenme tehlikesi altında olan ve ayrıca tıbbi ve ekonomik değer taşıyan türlerde de yapılması öncelik taşımaktadır.

Bu çalışmada, *F. imperialis* ve *F. persica*'nın çeşitli eksplantlarından *in vitro* koşullarda soğancık oluşturma ve oluşan soğancıkların dış koşullara aktarılma aşamasının tamamlanarak doku kültürü yoluyla çoğaltılabilmesi için bir protokol

geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; *in vitro* koşullarda olgun tohumlardan ve çiçek saplarından soğancık üretimi, üretilen *F. imperialis* ve *F. persica* soğancıklarının gelişimi, köklenmesi ve dış koşullara aktarımı üzerine çeşitli uygulamaların etkileri araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

Çakırlar vd. [13], *G. elwesii* ve *G. ikariae*'nin doku kültürü yöntemleriyle çoğaltılması ile ilgili olarak yürüttükleri araştırmada eksplantlardan soğan parçası ile tek veya çift yapraklı soğan pul yapraklarının en iyi soğancık oluşturma yeteneğinde olduklarını, MS ve Gamborg ortamının soğancık oluşumunu önemli düzeyde artırdığını belirlemişlerdir. Ayrıca en fazla soğancık üretimi %6 oranında sakkaroz içeren ortamlarda gerçekleşmiştir

Kukulczanka et al. [14], *F. meleagris* L.'in doku kültürü yolu ile çoğaltılması amacıyla pul yaprağı parçalarından veya tüm soğancıklardan *in vitro* koşullarda adventif soğancıklar oluşturmaya amaçlamışlardır. En fazla soğancık, 1.0 mg/l NAA ve 2.0 mg/l BA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Tang and Wu [15], *F. ussuriensis*'in soğan pul yapraklarından oluşturdukları doku parçalarını makro elementleri MS, mikro elementleri N6 ortamına uyacak şekilde hazırladıkları besin ortamlarına dikmişlerdir. Bu eksplantların %95'inde kallus gelişimi elde edilirken, sadece %1'lik bir bölümünden yeşil bitkiler geliştirilebilmiştir.

Tang et al. [16], *F. ussuriensis*'in genç yapraklarından hazırladıkları eksplantları MS besin ortamında kültüre almışlardır. 2,4-D tek başına kullanıldığında kallus gelişimi üzerine etkisi düşük bulunurken, kinetin ve BA'nin birlikte kullanılması kallus gelişimi artmıştır. Kinetin dozunun artırılması kallus oluşumunu daha fazla teşvik etmiştir. Kallus oluşumunun en yüksek oranda elde edildiği ortam içerisinde 2,4-D, kinetin, BA ve kazeinhidrolizat bulunan araştırmada elde edilen kalluslar, BA, kinetin ve NAA içeren N6 ortamlarına aktarıldıktan sonra sekiz hafta içerisinde adventif soğancıklar meydana gelmiştir. Soğancıklar NAA içeren ortama alındığında ise iki hafta sonra köklenme meydana gelmiştir. Somatik embriyogenezis aşamasında 2,4-D'nin tek başına kullanılmasının engelleyici etkisinin bulunduğu belirlenmiştir.

Hannweg et al. [17], Güney Afrika'da önemli bir ticari çiçek soğanı olan *Bowiea volubilis* (Liliaceae)'nin 10 mm uzunluğundaki çiçek saplarını 30 g/l sukroz, 10 g/l agar, 1 mg/l 2,4-D ve BAP içeren MS besin ortamında 6-8 hafta süreyle karanlıkta kültüre almışlardır. Daha sonra eksplantlar büyüme düzenleyiciler içermeyen ortama aktarıldığında sürgün ve soğan oluşumu ve bunun ardından 4-5 hafta

içerisinde köklenme gerçekleşmiştir. Ayrıca eksplant başına 4.6 adet bitki elde edilmiştir.

Witomska et al. [18], *F. imperialis* L.'in soğanlarına çeşitli sterilizasyon yöntemleri uygulanarak bunların hayatta kalma ve rejenerasyon oranları üzerine etkilerini araştırmışlardır. Soğanlar tek aşamalı olarak kloramin çözeltisi (%2, %4 veya %6) içinde bekletilerek ya da iki aşamalı olarak öncesinde %0.2 benomil (Benlate) çözeltisine ardından kloramin çözeltisine daldırılıp sterilizasyona tabi tutulmuştur. Benomil uygulaması, enfeksiyon oranını azaltmış ancak rejenerasyon oranını ve köklenme miktarını azaltıcı etki yapmıştır. En yüksek steril eksplant oranı, %0.2'lik benomil'e daldırıldıktan sonra %2 oranındaki kloramin çözeltisinde sterilizasyona tabi tutulan soğancık parçalarından elde edilmiştir.

Tan and Gao [19], *F. unibracteata* türünün yavru soğanlarının ribavirin, jasmonik asitin metil esteri, brassinolide veya sodyum humat ilave edilmiş besin ortamlarında kültüre alındığını bildirmektedirler. Çalışmada, özellikle 10 mg/l dozda kullanılan Ribavirin maddesinin soğancık oluşumunu önemli oranda artırdığı belirlenmiştir.

Slabbert and Niederwieser [20], *Lachenalia* cinsine ait üç varyetede *in vitro* soğan oluşumu ve oluşan soğanların toprağa aktarılması üzerinde yürüttükleri çalışmalarında yaprak eksplantlarından elde edilen sürgünlerin düşük ısıda (4-15°C) tutulmasından 2 hafta sonra soğan oluşumunun başladığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, adventif sürgünlerin yaşının soğan oluşumu için çok önemli olduğunu, 4 mm'den küçük sürgünlerin soğan oluşturmada olmadığını ve soğan oluşumu için %3 ile %6 sukroz içeren ortamlar karşılaştırıldığında %6'nın daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir. Çalışmada soğanların toprakta yaşama şanslarının onların boyutları ile doğrudan bağlantılı olduğuna vurgu yapılmıştır.

Zaidi et al. [21], soğanlı ve yumrulu bitkilerde yapılan *in vitro* çalışmaları derlemişlerdir. Sonuçlara göre; besin ortamı olarak en fazla MS besin ortamının kullanıldığı, istenilen gelişim sürecine göre (somatik embriyogenesis, organogenesis ve direkt organogenesis) BAP, Kinetin, 2,4-D gibi büyüme düzenleyicilerin farklı kombinasyonlarının kullanıldığı, 2,4-D'nin en fazla kallus oluşturmada, düşük oksin yüksek sitokinin kombinasyonunun sürgün oluşturmada, yüksek oksin düşük sitokinin veya sadece oksinin ise köklendirmede kullanıldığını bildirmiştir.

Chang et al. [22], *Lilium speciosum* var. *gloriosoides*'in çiçek sapı eksplantlarından 3 mg/l 2,4-D ve 0.25 mg/l BA içeren MS ortamında totipotent kalluslar elde etmişlerdir. Kalluslar önce soğancığa, sonra da 0.1 mg/l NAA, 1g/l Aktif karbon, 170 mg/l NaH₂PO₄ içeren MS besin ortamında bitkiciğe dönüşmüşlerdir. 9 ay içinde 6000 bitkicik üretilmiş, 200 bitki seraya aktarılmış, bunların da %98'i hayatta kalmıştır. Bu bitkiler 2 yıl içerisinde normal gelişimlerini sürdürüp çiçeklenmişlerdir.

Wawrosch et al. [23], *Lilium nepalense* D. Don (Nepal zambağı) de yürüttükleri çoğaltım çalışmalarında, olgunlaşmamış soğanlardan alınan çift soğan pul yaprak eksplantlarından 20 µM Zeatin içeren MS besin ortamında 4 hafta sonra eksplant başına 7 sürgünden fazla sürgün elde etmişlerdir. Ayrıca, köklendirmenin ½ MS ortamında MS ortamına göre daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir.

Gürlek [8], Siverek ve Mersin kökenli *Fritillaria imperialis* ve *F. persica* türlerinde *in vitro* soğancık üretimi ve dış koşullara adaptasyonla ilgili çalışmalarında olgunlaşmamış embriyoların, *in vitro*'dan elde edilen yaprak, yaprak sapları ve *in vitro*'da çimlendirilen tohumlardan gelişen soğancıkların farklı oranlarda oksin ve sitokinin içeren MS ve N6 besin ortamlarındaki kültürlerinde 14 ay sonra soğancıklar elde edilmiştir. *In vitro*'da üretilen soğancıkların dış koşullara aktarılması aşamasında yapılan değişik uygulamalardan 10 g/l NaCl içeren MS besin ortamında 15 günlük muamele sonucunda dış koşullara aktarımda daha iyi sonuçlar alınmıştır. Toprağa aktarılan soğancıklar 2 yıl canlılıklarını devam ettirseler de daha sonra gelişmemişlerdir.

Arslan vd. [24], *Sternbergia candida* ve *S. fischeriana*'da *in vitro* hızlı çoğaltılmasında soğan pul yaprak eksplantlarını farklı oranlarda büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre almışlardır. *S. candida* türünde en yüksek soğancık oluşumunu 4 mg/l BAP ve 0.50 mg/l KNA içeren besin ortamında, *S. fischeriana*'da ise 2 mg/l BAP ve 0.50 mg/l KNA içeren besin ortamda 2 pul yapraklı soğan eksplantlardan elde edilmiştir. Ayrıca *S. candida*'nın olgunlaşmamış zigotik embriyolarını 6 mg/l picloram ve 2 mg/l 2,4-D içeren besin ortamında kültüre alındıktan 1.5 yıl sonra soğancık üretimini sağlamışlardır. Üretilen soğancıklar büyüklüklerine göre sınıflandırarak 5 °C'de 5 hafta tuttuktan sonra toprağa aktarmışlardır.

Karaoğlu [25], göl soğanı (*Leucojum aestivum* L.) bitkisinde *in vitro* hızlı çoğaltım için farklı oranlarda BAP ve NAA içeren ortamlarda kültüre aldıkları soğan pul yaprakları ve olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından en fazla soğancık oluşumu soğan pul yaprağı eksplantında, 1 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında elde etmiştir. Soğancıklar 1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında köklendirilmiş ve dış koşullara başarılı bir şekilde aktarmıştır.

Dilik [9], *Fritillaria imperialis* ve *F. persica*'da çiçek saplarından *in vitro* soğancık üretimi ile ilgili çalışmalarında besin ortamı olarak MS temel besin ortam bileşimi olumlu sonuçlar vermiştir. 1.0 mg/l BA ile birlikte 0.5 mg/l KNA veya NAA kullanımı, farklı oranlarda soğancık ve kallus oluşumunu sağlamıştır. Besin ortamına Augmentin ilavesinin enfeksiyonu önleme bakımından azda olsa etkili olduğu fakat gelişmeyi engelleyici bir etki yaptığı görülmüştür. Uygulamalarda %6 sukroz yerine, %6 fruktoz veya %6 glukoz kullanımı, soğancık oluşum oranını ve oluşan soğancık sayısını artırıcı yönde etki yapmıştır.

Parmaksız ve Khawar [26], *Stenbergia candida*'nın olgunlaşmamış tohumlarından *in vitro* koşullarda somatik embriyogenesis için bir protokol geliştirmişlerdir. 2 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA (Potasyum tuzu) içeren MS besin ortamında elde edilen soğancıklar 5 g/l aktif kömür içeren MS besin ortamında köklendirilmiştir. Köklendirilen soğanlar sera ortamına aktarılmış daha sonra tarlaya şaşırtılmıştır. Araştırmacılar ortama aktif kömür ilavesinin bitki gelişmesini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

Nasırcılar ve Karagüzel [27], çalışmalarında *Galanthus elwesii*'nin olgunlaşmamış embriyolarından en yüksek soğancık oluşumunu (7,7 adet/eksplant) 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde etmişlerdir.

Dimech et al. [28], bir soğanlı bitki olan *Doryanthes excelsa* bitkisinde IBA, NAA, 2,4-D, TDZ ve BAP'ın fizyolojik gelişmeye etkisini incelemişlerdir. Dikey kesilmiş olgunlaşmamış çiçek sapının eksplant olarak kullanıldığı çalışmada en yüksek kallus oluşum oranı 50 µM NAA ve 0,5 µM TDZ içeren MS besin ortamında, en yüksek soğancık oluşumu ise 0,5 µM NAA ve 50 µM TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Gelişen sürgünler 6 hafta sonra 50 µM NAA ile muamele edilerek köklendirilmiş ve gelişen bitkiciklerin iklim odasında adaptasyonu sağlanmıştır.

Tang et al. [29], *Chirita heterotricha* bitkisinin yaprak eksplantlarını kullanarak 0,1 mg/l NAA ve 0,1 mg/l BAP içeren MS ortamında yüksek oranda (39,5 adet) sürgün elde etmişlerdir. Oluşan bitkiler 5 mg/l aktif kömür ve 30 g/l sukroz içeren ½ MS ortamında köklendirilmiş ve köklenen bitkilerin %95'i dış koşullara adapte edilmiştir.

Nikolić et al. [30], *in vitro* *F. meleagris* soğancıklarında kültür sıcaklığının dormansinin kırılmasında ve çözünebilir şekerin (sukroz, fruktoz ve glikoz) birikimine ve poliol üzerine etkisini araştırmışlardır. Kontrol grubundaki soğancıklarla karşılaştırıldığında köklenme oranı soğuk uygulamasından 6 hafta sonra önemli artış göstermiştir. Sürgün ve kök uzunluğu da soğuk işlem görmüş soğanlarda daha uzun olmuştur. Köklenen bitkiler sera koşullarında aklimatize edilmiştir. Araştırmacılar, *F. meleagris* soğancıklarında soğuk uygulamasının çözünebilir şekerlerin birikimini ve poliol içeriğini artırdığını ve soğuk uygulamasının bitkilerin aklimatizasyon başarısı için önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Muraseva et al. [31], nadir bir tür olan *F. meleagris*'in floral organlarından *in vitro* çoğaltımı amacıyla petalleri eksplant olarak kullanmışlardır. Çoğaltma aşamasında NAA, BAP ve IAA ile desteklenmiş B5 ve BDS (Dunstan and Short) ortamları kullanılmıştır. Büyüme düzenleyicilerine bakılmaksızın, rejenerasyonun B5 ortamında daha aktif bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir. *In vitro* kültür oluşturulduktan sonra çoğaltma aşamasında, 0.44 uM BAP, 3.22 uM NAA ve 2.28 uM IAA ile desteklenmiş B5 besin ortamının en etkili ortam olduğu görülmüştür. Sıcaklığın (+7°C) soğancık gelişimi ve *ex vitro* koşullara adaptasyon üzerinde uyarıcı etkisinin olduğu belirlenmiştir. Öğütülmüş hindistan cevizi lifi ve kum karışımını kullanmak (3:1), *ex vitro* koşullara aktarma adaptasyonunu %70 oranında mümkün kılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç

F. imperialis L. (Ağlayangelin) ve *F. persica* L. (Kırklâle)'nin doku kültürü ile çoğaltılması amacıyla yürütülen deneysel çalışmalar, 2013-2016 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Denemede Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü içinde bulunan “Has Bahçe” de yetiştirilen *F. imperialis* ve *F. persica* bitkileri kullanılmıştır. Bu amaçla doğal olarak yetiştikleri ortamdan temin edilen iki türe ait bitki soğanları “Has Bahçe” de hazırlanan parsellerde yetiştirilmiştir. Şekil 3.1 ve 3.2’de Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü içinde bulunan “Has Bahçe” de yetiştirilen *F. imperialis* ve *F. persica* bitkileri görüntülenmiştir.



Şekil 3.1. Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Has Bahçe’de yetişen *Fritillaria imperialis* bitkileri.



Şekil 3.2. Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Has Bahçe’de yetişen *Fritillaria persica* bitkileri.

3.1.1. *F. imperialis* L. (Şemdinli Lalesi, Ağlayan Gelin, Ters Lale)

Çiçeklerinin dip kısımlarındaki gözyaşına benzeyen nektar damlacıklarının oluşması ve bunların çiçeğinin aşağı doğru sarkık olması sonucu yere damlamasından dolayı bu bitkiye “Ağlayan Gelin”, bazı bölgelerde ise Şerefeli Lâle de denilmektedir. Ayrıca Hz. İsa’nın çarmıha gerildiği zaman Meryem Ananın yere akan gözyaşlarıyla özleştirilmesi sebebiyle Hristiyan aleminin kutsal çiçeği olarak da kabul edilmektedir [1].

Fritillaria imperialis Anadolu, İran, Afganistan ve Himalayalar’da yetişmekte, Türkiye’de Doğuda, Hakkari, Şemdinli, Bitlis, Siirt, Adıyaman, Elazığ, Malatya ve Van olmak üzere Güneydoğu Bölgesine kadar uzanmaktadır. Ayrıca Kuzey Irak, Rusya, Pakistan ve Keşmir’de de bulunmaktadır [32].

Şekil 3.3-4’te Van ilindeki doğal *F. imperialis* alanı ve bitkileri gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Van ilindeki doğal *F. imperialis* alanı.



Şekil 3.4. Van ilinde doğada yetişen *F. imperialis* bitkileri.

Tepaller 4-4,5 cm uzunluğunda, rengi turuncu-kırmızı arasında değişen tonlarda ayrıca sarı da olabilmektedir. Tepallerin tabanında bal özü salgılayan beyaz yuvarlak bezler bulunmaktadır. Kapsüller 1,5-2 cm boyutlarında ve kanatlı yapıdadır. Mart-Mayıs aylarında çiçeklenen *F. imperialis* bitkileri kötü koku yayan soğanlı bitki türlerinden birisidir [9]. Şekil 3.5-6'da *F. imperialis*'in bitki ve çiçek özelliklerini gösteren bazı fotoğraflara yer verilmiştir.



Şekil 3.5. *F. imperialis* bitkisinde bal özü salgılayan bezler.



Şekil 3.6. *F. imperialis* çiçeğinin genel yapısı.

3.1.2. *F. persica* L. (Adıyaman Lalesi, Karagöz Lalesi)

Adıyaman ili ve çevresinde sıkça rastlanan mavi-mor renkli küçük çan şeklindeki çiçekleri ve uzun süren çiçek açma dönemi ile süs bitkisi olarak değer taşıyan bir *Fritillaria* türüdür. Ayrıca Koyuncu [32] *F. persica*'da bulunan steroidal saponozitlerin, ilaç sanayiinde ham madde kaynağı olarak değer taşıyabileceğinden söz etmektedir.

F. persica Türkiye'de Güneydoğu Anadolu'da (Hatay ve Mersin), Adıyaman ilinde, yurdumuzun dışında Suriye, Lübnan, İsrail, Ürdün, Irak ve İran'da yetişmektedir. Çiçek açma dönemi Nisan-Mayıs ayları arasındadır. Çiçeklenme aşağıdan yukarıya doğru devam ettiğinden arazide veya vazodaki ömrü *F. imperialis*'e göre daha fazladır. *F. persica* da *F. imperialis* gibi Avrupa'da park ve bahçelerde kullanılan süs bitkileri arasında önemli bir yere sahiptir.

Soğanları iğ şeklinde olup, 3-5 cm çap ve 6 cm kadar yükseklikte olabilmektedirler. Yumuşak ve düzgün gövdesi 20 cm'den başlayarak 100 cm'ye kadar boylanabilmektedir. Yapraklar 10-25 adet arasında değişimli dizilmiş olup 15x3 cm boyutlarında ve mızrağımsıdır. Renkleri *F. imperialis* L. türüne göre daha grimsi yeşil olup puslu bir görünüm taşır. Brakte yapraklar her çiçek için bir tane olacak şekildedir veya yoktur. Çiçekler çan şeklinde olup 7-20 adet arasındadır. Çiçek rengi, mavi-eflatundan başlayarak yeşilimtrak griye kadar değişebilmektedir. Segmentleri 10-20x6-7 mm olup nektarları üçgen şeklinde ve 1.5 mm genişliktedir. Filamentler 5-6 mm uzunlukta, düzgün ve yumuşaktır. Dişicik borusu (stilus) 6-8 mm uzunlukta olup, tohum kapsülü 1-3 cm'dir [1]. Şekil 3.7'de *F. persica* çiçeklerinin görünüşleri verilmiştir.



Şekil 3.7. *F. persica* çiçeklerinin görünüşleri

3.2. Yöntemler

3.2.1. Besin Ortamı ve Doku Kültürü Koşulları

Denemelerde temel besin ortamı olarak MS [33] besin ortamı, mineral tuzları ve vitaminleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Besin ortamlarının hazırlanmasında çift distile saf su kullanılmıştır. Besin ortamlarında kullanılan eksplant tipine ve amaca göre farklı oranlarda bitki büyüme düzenleyicileri, şekerler ve vitaminler eklenmiştir.

Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak pH 5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyon sağlanmıştır.

Denemelerde farklı eksplant tipleri (olgunlaşmamış embriyolar, olgun tohumlar ve çiçek sapları) farklı besin ortamlarında kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.1. Murashige ve Skoog [33] (MS) besin ortamı bileşimi.

Bileşenler	Miktar (mg/l)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ .4H ₂ O	223
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Nikotinik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1
Glisin	2.0
Myo-inositol	100
Sakkaroz	30000

3.2.1.1. Olgun tohumların kültüründe kullanılan ortamlar

Olgun tohumların çimlendirilmesinde normal MS ortamı kullanılmıştır. Çimlenip soğancık oluşturan tohumlardan elde edilen yaklaşık 1 cm çapındaki soğancıklar ikiye ayrılarak 0,2 mg/l TDZ içeren MS besi ortamına aktarılmışlardır.

3.2.1.2. Çiçek sapı kültüründe kullanılan ortamlar

Çiçek saplarından soğancık elde etme ortamlarında NAA+BAP, NAA+TDZ, 2,4-D+KIN kombinasyonlarının farklı konsantrasyonu ve iki farklı şeker cinsi (sukroz ve fruktoz) seçilip kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Çiçek sapı kültüründe kullanılan besin ortamları.

Besin ortamı	BBD Kombinasyonu	Şeker Cinsi	Kullanılan konsantrasyonlar (mg/l+mg/l)
A1S	NAA+BAP	Sukroz	0,5+1,0
A2S	NAA+BAP		1,0+1,0
B1S	NAA+TDZ		0,5+0,5
B2S	NAA+TDZ		0,5+1,0
C1S	2,4-D+KIN		1,0+0,5
C2S	2,4-D+KIN		2,0+0,5
C3S	2,4-D+KIN		4,0+0,5
A1F	NAA+BAP	Fruktoz	0,5+1,0
A2F	NAA+BAP		1,0+1,0
B1F	NAA+TDZ		0,5+0,5
B2F	NAA+TDZ		0,5+1,0
C1F	2,4-D+KIN		1,0+0,5
C2F	2,4-D+KIN		2,0+0,5
C3F	2,4-D+KIN		4,0+0,5

3.2.2. Eksplant izolasyonu

Denemelerde her iki bitki türüne ait olgun tohumlar ve çiçek sapları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar doğal olarak yetiştikleri ortamdan temin edilen iki türe ait bitki soğanlarının Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü içinde bulunan “Has Bahçe” de hazırlanan parsellerde yetiştirilen *F. imperialis* ve *F. persica* bitkilerinden temin edilmiştir.

Ayrıca *F. imperialis* L. çiçek sapı kültür denemeleri için Yüzüncüyıl Üniversitesi’nden Prof. Dr. Şevket Alp öncülüğünde Nisan 2015’te Van iline arazi düzenlenmiştir. Araziden toplanan çiçek sapları kültüre alınmıştır.

Bitki materyalinin alınması sırasında, denemelerde kullanılacak olan eksplantın fizyolojik döneminin *in vitro* kültüre uygunluğuna dikkat edilmiştir.

Şekil 3.8’de *F. imperialis* (solda) ve *F. persica*’nın (sağda) meyve ve tohumları görüntülenmiştir.



Şekil 3.8. *F. imperialis* (solda) ve *F. persica*'nın (sağda) meyve ve tohumları.

Temmuz 2014 döneminde olgun tohumlar bitkilerden alınıp laboratuvar ortamına getirilip eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

Mart-Nisan 2015 döneminde çiçek saplarının dip kısımları, çiçeklenme başlangıcındaki bitkilerden kesilerek laboratuvar ortamına getirilmiştir. Alınan çiçek saplarının aynı fizyoloji gelişme dönemine sahip olması amacıyla, çiçeklenmenin başlangıcındaki ve henüz tam olarak açılmamış çiçeklerin bulunduğu çiçek sapları kullanılmıştır. Şekil 3.9'da tanımlanan aşamadaki çiçeklerin bulunduğu *F. imperialis* ve *F. persica* bitkileri Beytepe Kampüsü Has Bahçe'den görüntülenmiştir.



Şekil 3.9. Beytepe Kampüsü Has Bahçede’ki *F. imperialis* (solda) ve *F. persica* (sağda) bitkileri.

F. imperialis türünde çiçek sapları, çiçeklerin başladığı tepe noktasından aşağıya doğru, yaprakların başladığı noktaya kadar kesilerek ayrılmış ve sterilizasyon için hazırlanmıştır. *F. persica* türünde ise çiçekler, çiçek sapının tepe noktasından başlayarak geriye doğru dizilmiş olup bunun gerisinde çok az uzunlukta yapraksız bir bölüme sahiptir. Bunun altında ise yapraklı bölüm bulunmaktadır. Çiçek sapında bulunan yapraklar dip kısımlarından temizlenerek, bu çiçek sapları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Şekil 3.10’da *F. imperialis* ve *F. persica* türlerinde eksplant olarak parçalara ayrılmadan önce temizlenerek sterilizasyon aşamasına geçmek üzere hazırlanmış çiçek sapları görüntülenmektedir.



Şekil 3.10. *F. imperialis* L. (solda) ve *F. persica* L.'nın (sağda) çiçek sapları.

3.2.3. Eksplant Sterilizasyonu

a) Olgun tohumların sterilizasyonu

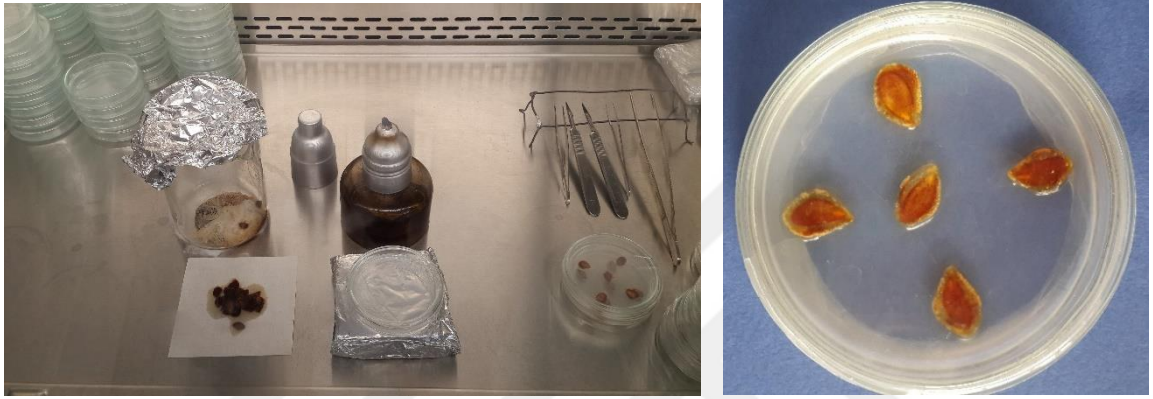
Her iki türe ait tohumlar önce steril distile su ile hazırlanan %70'lik etanolde 1 dakika ardından birkaç damla Tween-20 içeren %50'lik ticari çamaşır suyu ile 20 dakika çalkalanıp yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra steril kabin içerisine alınarak 3 kez 5'er dakika steril saf su ile durulanmıştır.

b) Çiçek saplarının sterilizasyonu

Her iki türe ait çiçek sapları önce %96'lık etil alkole 15 saniye süreyle daldırılmış ardından steril distile su ile hazırlanan %30'luk ticari çamaşır suyu ile 15 dakika çalkalanıp yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra steril kabin içerisine alınarak 3 kez 5'er dakika steril saf su ile durulanmıştır. Dokulara dezenfektan maddenin yapışmasını sağlamak amacıyla ticari çamaşır suyu ile hazırlanan ana sterilant çözeltisinin içerisine birkaç damla Tween-20 damlatılmıştır. Steril edilen çiçek sapları 1'er cm kalınlığında olacak şekilde bistüri ile parçalara ayrılıp steril petripler içerisindeki besin ortamlarına alınmışlardır.

3.2.4.Tohumların *In Vitro*'da Çimlendirilmesi

Her iki türe ait yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan olgun tohumlar çimlendirilmek amacıyla MS besin ortamı içeren petrilerde ve kavanozlarda +4 °C'de kültüre alınmıştır. Her bir petri ve kavanoza 5'er adet tohum konularak 3 ay ön üşütmeye tabi tutulmuşlardır. Şekil 3.11'de *F. imperialis* olgun tohumların MS besin ortamına alınması görüntülenmiştir.



Şekil 3.11. *F. imperialis* L.'in olgun tohumlarının MS besin ortamına alınması.

3.2.5. Doku Kültürü Tekniğinin Uygulanması

3.2.5.1. Olgun tohumların kültürü

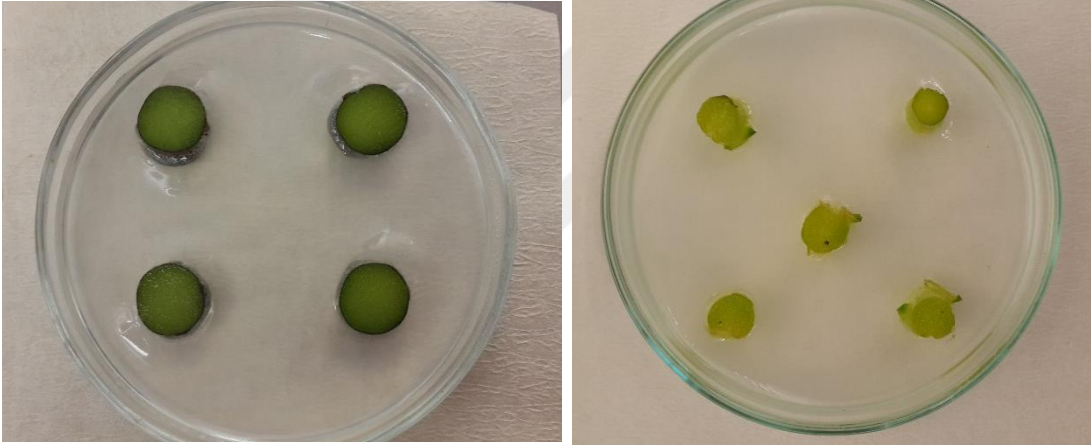
Her iki türe ait yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan olgun tohumlar çimlendirilmek amacıyla MS besin ortamı içeren petrilerde ve kavanozlarda +4°C'de kültüre alınmıştır. Her bir petri ve kavanoza 5'er adet tohum konulmuştur. Tohumlar 3 ay ön üşütmeye tabi tutulup ardından 16°C'de 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyota ayarlı iklim odasına alınmıştır. Şekil 3.12'de iklim odasında kavanozların içerisinde kültüre alınmış iki türe ait tohumlar görüntülenmektedir.



Şekil 3.12. İklim odasında kavanozların içerisinde kültüre alınmış iki türe ait tohumlar.

3.2.5.2. Çiçek saplarının kültürü

Her iki türe ait yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan çiçek sapları uç kısımlarında sterilantların dokunun içine nüfuz etmesi sebebiyle meydana gelen beyaz kısımlar kesilerek ana eksplanttan uzaklaştırılmış ve ana eksplant her parça 1 cm olacak şekilde parçalara bölünmüştür. Kesme işlemi yapılırken her parçanın eşit uzunlukta olmasına dikkat edilmiştir. Parçalar kesildikten sonra bitkinin doğadaki duruş şekli göz önünde bulundurularak petri kaplarındaki besin ortamlarına yerleştirilmiştir. Her bir petri kabında 4-6 adet eksplant kültüre alınmış olup, tüm kültürler 20°C' ye sahip iklimlendirme kabininde, sürekli karanlık koşullarda bekletilmişlerdir. Şekil 3.13'de *F. imperialis* (solda) ve *F. persica*'nın (sağda) çiçek sapı kültürleri görüntülenmiştir. Şekil 3.14'te çalışma aşamasından bir görüntü verilmiştir.



Şekil 3.13. *F. imperialis* (solda) ve *F. persica*'nın (sağda) çiçek sapı kültürleri.



Şekil 3.14. Çalışma aşamasından bir görüntü.

3.2.6. Köklendirme Çalışmaları

Olgun tohumların kültüründen elde edilen iki türe ait soğancıklar köklendirilmek amacıyla 0,5 IBA içeren $\frac{1}{2}$ MS besin ortamında 4 ay boyunca 23°C'de karanlık ortamda kültüre alınmışlardır.

3.2.7. *In Vitro*'da Üretilen Soğancıkların Dış Koşullara Aktarımı

In vitro'da olgun tohumlardan üretilen *Fritillaria* soğancıklarının küçük ve bitki dokularının sıkı olmaması sebebiyle soğancıkların dış ortama aktarma başarısını artırmak ve toprağa uyum sağlayabilmeleri amacıyla soğancıklara; Bakteri (*Serratia marcescens*) alg (*Spirulina platensis*) ve organic rooting powder (organik köklendirme tozu) uygulamaları yapılarak hazır saksı toprağı içeren 10.5x7 cm'lik saksılara aktararak 23°C'de 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyod ve %80 neme ayarlanmış iklim dolabına yerleştirilmişlerdir.

Bakteri ve alg uygulamaları soğancıklar besin ortamından arındırılıp saksılara dikimleri yapıp ardından bu bakteri ve algi içeren çözeltiler ile sulanarak gerçekleştirilmiştir. Organik köklendirme tozu uygulaması ise soğancıkların organik köklendirme tozuna batırılarak yapıldıktan sonra saksılara dikilmişlerdir. Soğancıkları içeren saksılar iklim dolabına alındıktan sonra toprağının sürekli nemli kalmasına dikkat edilmiştir. Şekil

3.15'te organik köklendirme tozu görüntülenmiştir. Şekil 3.16'da soğancıkların toprağa aktarım aşamasına ait görüntüler verilmiştir.



Şekil 3.15. Köklendirmede kullanılan köklendirme tozu.



Şekil 3.16. *In vitro*'da üretilen soğancıkların toprağa aktarım aşamasından görüntüler.

4. BULGULAR

4.1. Olgun Tohumların Kültür Sonuçları

Tohumlar 3 ay süreyle +4°C'de ön üşütmeye tabi tutulup taze MS besin ortamına aktarılmasının ardından 16°C'de 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyota ayarlı iklim odasına alınmıştır. Tohumlar 1 hafta içerisinde çimlenmiş, yeşil sürgünler oluşmuştur. Bundan 1 hafta sonra da çimlenen tohumlar soğancık oluşturmaya başlamıştır. Şekil 4.1-3'te MS besin ortamındaki *Fritillaria*'nın olgun tohumları ve çimlenmeden 1 hafta sonra oluşmaya başlayan soğancıklar görüntülenmiştir.



Şekil 4.1. MS besin ortamındaki *Fritillaria*'nın olgun tohumları.



Şekil 4.2. Çimlenen ve 1 hafta sonra oluşmaya başlayan soğancıklar.



Şekil 4.3. Çimlenen ve 1 hafta sonra oluşmaya başlayan soğancıklar.

Tohumların çimlenme yüzdeleri ve eksplant başına oluşan soğancık sayısı belirlenmiştir. İki türe ait çimlenme ve soğancık oluşturma oranları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

F. imperialis tohumlarında çimlenme oranı %73 ve çimlenen tohumların soğancık oluşturma oranı %76 iken *F. persica* tohumlarında çimlenme oranı %82.1 soğancık oluşturma oranı ise %82 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. *F. imperialis* ve *F. persica* olgun tohumlarının çimlenme ve soğancık oluşturma oranları.

	Çimlenme oranı (%)	Soğancık oluşturma oranı (%)
<i>F. imperialis</i>	%73	%76
<i>F. persica</i>	%82.1	%82

Tohumların çimlendirilmesiyle oluşan ve 4 hafta süreyle gelişen yaklaşık 0,5-1 cm çapındaki soğancıklar 2'ye kesilerek 2 mg/l TDZ içeren MS besin ortamında 18°C'de 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyotta kültüre alınmıştır. Şekil 4.4-5'te *F. imperialis* L. ve *F. persica* L. olgun tohumlarından oluşan soğancıkların TDZ içeren besin ortamında kültüre alınması görüntülenmiştir.



Şekil 4.4. *F. imperialis*'in olgun tohumlarından oluşan soğancıklar (solda) ve TDZ içeren besin ortamında kültüre alınan soğancıklar (sağda).



Şekil 4.5. *F. persica*'nın olgun tohumlarından oluşan soğancıklar (solda) TDZ içeren besin ortamında kültüre alınması (sağda).

Olgun tohumların kültüründen oluşan soğancıkların 3 ay boyunca ayda bir alt kültürleri yapılarak daha sonra eksplantlar üzerinde soğancık oluşumu ve gelişimleri üzerinde farklı şeker cinslerinin etkisini gözlemek amacıyla 60g/l sukroz veya fruktoz içeren MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. 4 ay boyunca ayda bir taze besin ortamına aktarılan eksplantlar, 4. ay sonunda soğancık gelişimi üzerine sukrozun

daha etkili olduğu anlaşılarak şeker cinsi olarak sadece sukroz kullanılmaya devam edilmiştir.

F. imperialis ve *F. persica* türlerinde olgun tohumların kültüre alınmasıyla soğancık oluşumu sağlanmıştır. Şekil 4.6'da olgun tohum kültür başlangıcından 9 ay sonra sukroz ortamında oluşan soğancıklar görüntülenmiştir.



Şekil 4.6. *F. imperialis* L. (solda) ve *F. persica* L. (sağda) türlerinde olgun tohum kültür başlangıcından 9 ay sonra sukroz ortamında oluşan soğancıklar.

Her iki türde de olgun tohumlardan soğancık gelişimi üzerinde sukrozun, fruktoza göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). 3. ay başlangıcındaki soğancık sayısı ile 4. ay sonunda oluşan soğancık sayıları karşılaştırılmış, bölüm hesabı yapıldığında *F. imperialis* soğancıklarından sukroz ortamında başlangıcın 5 katı fazla, fruktoz ortamında ise 2.2 katı fazla soğancık oluşmuştur. *F. persica*'da ise sukroz ortamında başlangıcın 3.8 katı fazla, fruktoz ortamında ise 1.5 katı fazla soğancık oluşmuştur. Yani *F. imperialis* soğancıklarından sukroz ortamında eksplant başına 5 soğancık, fruktoz ortamında ise 2.2 soğancık oluşmuştur. Aynı şekilde *F. persica*'da ise sukroz ortamında eksplant başına 3.8 soğancık, fruktoz ortamında ise 1.5 soğancık oluşmuştur.

Çizelge 4.2. *F. imperialis* L. ve *F. persica* L.'nin olgun tohumlarından soğancık oluşumuna sukroz ve fruktozun etkisi.

<i>F. imperialis</i>	3. ay soğancık sayısı	4. ay soğancık sayısı
Sukroz	41	210
Fruktoz	27	60

<i>F. persica</i>	3. ay soğancık sayısı	4. ay soğancık sayısı
Sukroz	56	213
Fruktoz	53	80

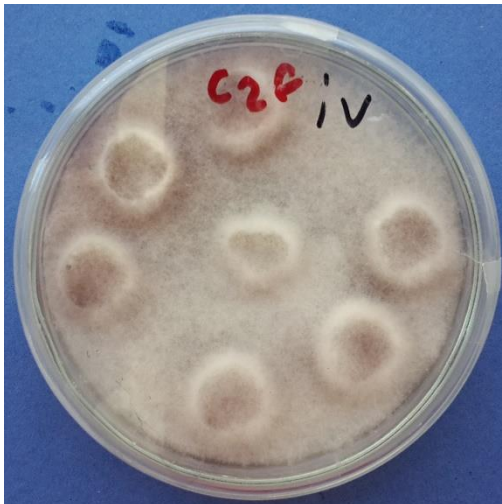
4.2. Çiçek Sapı Kültür Sonuçları

F. imperialis ve *F. persica* türlerine ait çiçek sapları kültüre alındıktan yaklaşık 1 ay sonra kallus oluşumları, ilerleyen aylarda ise soğancık gelişimi gözlenmeye başlamıştır. Şekil 4.7’de *F. imperialis* (solda) ve *F. persica* (sağda) bitkilerinin çiçek saplarından oluşan kallus ve soğancıklar görüntülenmiştir. Kültürler ayda bir taze besin ortamına alınmışlardır.



Şekil 4.7. *F. imperialis* (solda) ve *F. persica* (sağda) bitkilerinin çiçek saplarının kültüre alınması sonucu oluşmaya başlayan kallus ve soğancıklar.

3 ay sonunda çiçek sapı eksplantlarından kallus ve soğancık oluşumu için en iyi ortamın 1mg/l 2,4-D + 0.5mg/l KIN ve %6 sukroz içeren MS ortamı olduğu gözlenmiş ve bu kültür ortamıyla denemelere devam edilmiştir. Diğer kültürlerde ya kontaminasyonlar olmuş ya da eksplantlar kararmıştır. Fakat kültürlerde oluşan kontaminasyonlardan dolayı kültür başlangıcının 6. ay sonunda bütün eksplantlar tamamen yitirilmiş, çiçek saplarından oluşan kallus ve soğancıklar kaybedilmiştir. Şekil 4.8'de kültürlerde meydana gelen kontaminasyonlar görüntülenmiştir.



Şekil 4.8. Kültürlerde meydana gelen kontaminasyonlar.

4.4. *In Vitro* Oluşan Soğancıkların Köklenme ve Dış Koşullara Alışması

İki türe ait olgun tohumlardan *in vitro* elde edilen soğancıklar, köklenme oranını arttırmak üzere 0,5 IBA içeren içeren ½ MS besin ortamında 4 ay boyunca 23°C kültüre alınmışlardır. Şekil 4.9-10'da *F. imperialis* ve *F. persica* olgun tohumlarının kültüre alınmasıyla oluşan soğancıkların olgunlaştırılması ve köklendirilmesi görüntülenmiştir.



Şekil 4.9. *F. imperialis*'in olgun tohumlarının kültüre alınmasıyla oluşan soğancıkların olgunlaştırılması ve köklendirilmesi.



Şekil 4.10. *F. persica* L.'nin olgun tohumlarının kültüre alınmasıyla oluşan soğancıkların olgunlaştırılması ve köklendirilmesi.

Köklendirme ortamında *F. imperialis* soğanlarının %40'ı, *F. persica* soğanlarının ise %35.8'i köklenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Fritillaria* türlerinin köklenme sonuçları.

	1.ay soğancık sayısı	4.ay soğancık sayısı	Ölen soğancık sayısı	Köklenen soğancık sayısı	Köklenmeyen soğancık sayısı
<i>F. imperialis</i>	75	54	21	30	24
<i>F. persica</i>	151	98	53	54	44

In vitro'da olgun tohumlardan üretilen *Fritillaria* soğancıklarının küçük ve bitki dokularının sıkı olmaması sebebiyle soğancıkların dış ortama aktarma başarısını artırmak amacıyla soğancıklara; bakteri (*Serretia marcescens*), alg (*Spirulina platensis*), organic rooting powder (organik köklendirme tozu) uygulamaları yapılmıştır.

4 ay süreyle yetiştirilen soğancıklardan bakteri uygulaması yapılanların yaklaşık %30'unun hayatta kaldığı, diğer uygulamalarda ise soğancıkların iinin boşaldığı görölmüştür (Çizelge 4.4). Şekil 4.11'de içi canlı ve içi boşalan soğanlar görüntölenmiştir.

Çizelge 4.4. Bakteri, alg ve köklendirme tozu uygulaması yapılan soğancık sayısı.

	Kontrol	Bakteri	Alg	Toz	Toplam
<i>F. imperialis</i>	12	6	18	6	42
<i>F. persica</i>	6	9	9	6	30



Şekil 4.11. Canlı ve içi boşalan soğanların genel görüntüsü.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmada ülkemiz için önemli bitki türlerinden olan *Fritillaria imperialis* ve *F. persica*'nın hızlı çoğaltımı amacıyla, olgun tohumlardan ve çiçek saplarından *in vitro* soğancık oluşturma, çoğaltma ve oluşan soğancıkların dış koşullara aktarılma aşamalarında bazı uygulamaların etkileri araştırılmıştır.

İlk aşamada, eksplant olarak kullanılan olgun tohumlar ve çiçek saplarından *in vitro* soğancık oluşturma çalışmaları yapılmıştır.

Olgun tohumlardan soğancık oluşturmak amacıyla, iki türe ait olgun tohumlar +4°C'de 3 ay MS besin ortamında ön üşütmeye tabi tutulmuşlardır. *F. imperialis* tohumlarında çimlenme oranı %73 ve çimlenen tohumların soğancık oluşturma oranı %76, *F. persica* tohumlarında çimlenme oranı %82.1, soğancık oluşturma oranı ise %82 olarak hesaplanmıştır.

Oluşan soğancıklar ikiye ayrılarak 3 ay boyunca 2 mg/l thidiazuron içeren MS besin ortamında çoğaltılmıştır. Sonrasında çoğaltılan soğancıklar 4 ay boyunca 60 g/l sukroz veya fruktoz içeren MS besin ortamlarında olgunlaştırılarak, soğancık gelişimi ve olgunlaşması üzerinde farklı şeker cinslerinin (sukroz ve fruktoz %6) etkisi araştırılmıştır. Soğancık gelişiminde sukrozun daha etkili olduğu belirlenmiştir. *F. imperialis* soğancıklarından sukroz ortamında başlangıca göre 5 kat fazla, fruktoz ortamında ise 2.2 kat fazla soğancık oluşmuştur. *F. persica*'da ise sukroz ortamında ise 3.8 kat fazla, fruktoz ortamında ise 1.5 kat fazla soğancık oluşmuştur.

Çiçek saplarından soğancık oluşturmak amacıyla iki türe ait çiçek sapları 1 cm olacak şekilde parçalara bölünerek; farklı dozlarda ve kombinasyonda büyüme düzenleyicileri (0.5mg/l NAA + 1.0mg/l BAP, 1.0mg/l NAA + 1.0mg/l BAP, 0.5mg/l NAA + 0.5mg/l TDZ, 0.5mg/l NAA + 1.0mg/l TDZ, 1.0mg/l 2,4-D + 0.5mg/l KIN, 2.0mg/l 2,4-D + 0.5mg/l KIN, 4.0mg/l 2,4-D + 0.5mg/l KIN) ile %6 sukroz veya %6 fruktoz içeren MS besin ortamlarına yerleştirilmiş ve iklim dolabında 20°C ve sürekli karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Bir ay sonra kültürlerde kallus ve soğancık gelişimi başlamıştır. Kültür başlangıcından 3 ay sonunda çiçek sapı eksplantlarından kallus ve soğancık oluşumu için en iyi ortamın 1.0mg/l 2,4-D + 0.5mg/l KIN ve %6 sukroz içeren MS ortamı olduğu gözlenmiş ve bu kültür ortamıyla denemelere devam edilmiştir. Diğer kültürlerde ya kontaminasyonlar olmuş ya da

eksplantlar kararmış, kültür başlangıcının 6. ay sonunda da çiçek saplarından oluşan kallus ve soğancıklar kaybedilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında ise, oluşturulan sürgün ve soğancıkların köklendirilerek tam bir bitkiye dönüşümünün sağlanması, toprağa transfer edilme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Olgun tohum kültürlerinden elde edilen soğancıkların kök oluşumunu artırmak amacıyla soğancıklar 0.5 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında 4 ay kültüre alınmışlardır. Köklendirme ortamında *F. imperialis* soğanlarının %40'ı, *F. persica* soğanlarının ise %35.8'i köklenmiştir.

Aklimatizasyon aşamasında ise olgunlaşan ve gelişen soğancıklara bakteri (*Serratia marcescens*), alg (*Spirulina platensis*) veya organik köklendirme tozu uygulanarak hazır saksı toprağı içeren saksılara aktarılmıştır. İklim dolabında 23°C'de 16/8 saat aydınlık/karanlık, %80 nem ortamında 4 ay yetiştirilen soğancıklardan bakteri uygulaması yapılanların yaklaşık %30'unun hayatta kaldığı belirlenmiştir.

In vitro bitki rejenerasyonu, çok sayıdaki faktör tarafından etkilenmektedir. Bunlardan bazıları; eksplant tipi [34-35], sıcaklık ve *in vitro* koşullardaki kültürde kalma süresi [36], besin ortamındaki bitki büyüme düzenleyicileri [37-38] ile şeker cinsi ve konsantrasyonu [39-42] olarak sayılabilir.

In vitro bitki rejenerasyonu özellikle monokotiledonlarda çoğu kez zordur. Bu altşube'ye ait yüksek bitkilerin somatik hücrelerinin çok erken farklılaşarak mitotik aktivitesini ve morfogenetik potansiyelini kaybettiği ve bu nedenle bu bitkilerin *in vitro* çoğaltımda çoğunlukla meristemetik zona sahip embriyo ve organların kullanıldığı bildirilmektedir [43-44].

Mikroçoğaltım aşamalarının başarıyla tamamlanması için uygun eksplant seçimi önemli ve temel faktörlerden biridir. *In vitro* sürgün oluşumu kullanılan eksplant tipine bağlı olarak değişmektedir [45-47]. Çalışmamızda kullanılan eksplant tiplerine benzer olarak değişik soğanlı bitki türlerinin mikroçoğaltımında farklı eksplant tiplerinin kullanıldığı ve sürgün oluşum oranının kullanılan eksplant tipine göre değiştiği bir çok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir. Soğan pul yaprağı, soğan

taban yaprağı, soğanlar ve petaller *Fritillaria* türlerinde *in vitro* kültür başlangıcında en sık kullanılan eksplant tipleridir [48-54].

Literatürde *Fritillaria* cinsi türlerine ait tohumlar derin morfofizyolojik dormansiye sahip olduğu için onları başlangıç materyali olarak kullanmanın güç olduğu belirtilmektedir [45-47].

Floral organların primer eksplant olarak kullanmasının ana bitkinin korunmasını sağlaması açısından nadir türler ile çalışırken önemli bir özellik olduğu ayrıca, toprak altındaki organların eksplant olarak kullanıldığında yüksek oranda ortaya çıkan kontaminasyon riskinden de uzaklaşılmasını sağladığı belirtilmektedir [53, 55].

Dilik [9], farklı *Fritillaria* türlerinde *in vitro* soğancık üretiminde gövde segmenti (çiçek sapı) eksplantlarının kullanıldığı denemelerde 1.0mg/l BA ile birlikte 0.5mg/l KNA veya NAA kullanımının, soğancık ve kallus oluşumu üzerinde olumlu etki yaptığını belirlemiştir. Besin ortamına %6 sukroz yerine, uygulamalara %6 fruktoz veya %6 glukoz ilave edilmesi, soğancık oluşum oranını ve oluşan soğancık sayısını artırmıştır.

Bizim çalışmamızda ise çiçek saplarından en iyi soğancık oluşum ve gelişiminin 1.0mg/l 2,4-D + 0.5mg/l KIN ve %6 sukroz içeren MS ortamında olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda karbon kaynağı olarak %6 oranında sukroz kullanılması, soğancık oluşumunu her iki türde de sağlamıştır. Witomska and Lukaszewska [56], *F. imperialis* L.'inde içinde bulunduğu farklı türlerin doku kültürüyle çoğaltılmasında sukroz dozlarının etkisini araştırdıkları çalışmalarında %3, %6 ve %9 oranında sukroz kullanımı arasında en uygun dozun %6 olduğunu belirtmişlerdir. Memon [57], *Gladiolus hybridus* kültürlerinde yüksek sukroz konsantrasyonunun (%8, %10 ve %12) sürgün oluşumunu önemli ölçüde artırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca Dilik [9] ve Gürlek [8], *F. imperialis* L. ve *F. persica* L.'da %6 sukroz konsantrasyonunun soğancık oluşumunda en etkili konsantrasyon olduğunu belirlemişlerdir.

Tıpırdamaz [58], *Galanthus elwesii* ve *G. ikariae* türlerinde yaptığı çalışmalarında, şeker cins ve dozunun *in vitro* soğancık oluşumu üzerinde çok etkin bir parametre olduğunu ve sukrozun, fruktozdan daha etkili olduğunu belirtmiştir.

Sukrozun *in vitro* soğancık oluşumu üzerinde olumlu etkileri Bach and Pawlowska [40], Gerrits and Klerk [42], Witomska and Lukaszewska [56], Zhang and Jia [59] tarafından da vurgulanmaktadır.

Kukulczanka et al. [14], *F. meleagris* türünde, Zhang and Jia [59], *Lilium* cinsinde %3 sukroz kullanımının yeterli olduğunu, Witomska and Lukaszewska [56] ise %6'lık dozun daha etkili olduğunu belirtmiştir. Bonnier and Van [60] ve Nhut et al. [61], ortamdaki sukroz artışı ile birlikte sürgün gelişim ve çoğaltım oranının azaldığını belirlemişlerdir. Zhang and Jia [59], %9'luk sukroz kullanımının sürgünlerde şekil bozukluklarına yol açtığını gözlemlemesi üzerine yüksek konsantrasyonun adventif sürgün oluşumunu baskıladığı sonucuna varmıştır. Bizim çalışmamızda da *F. imperialis* L. ve *F. persica* L.'da *in vitro* çoğaltımı ve oluşan soğancıkların olgunlaştırılması için %6 sukroz veya %6 fruktoz kullanılmış, sukrozun, fruktoza göre daha olumlu etki yaptığı görülmüştür.

Doku kültürü ile çoğaltma amaçlandığında, en önemli aşamalarından birisi, oluşturulan sürgün, soğancık gibi çoğaltma materyalinin köklendirilerek tam bir bitkiye dönüşümünün sağlanması ve toprağa transfer edilmesidir.

In vitro kültürlerin aklimatizasyonunda iyi bir kök gelişimi önemli rol oynamaktadır. Düşük yaşam oranı genelde kökleri zayıf gelişmiş olan bitkiciklerde gözlenmektedir [62]. Birçok faktör örneğin; besin ortamına düşük dozda sitokinin ilavesi veya sitokinin eklenmemesi, yüksek konsantrasyonda oksin [63-65], düşük konsantrasyonlarda inorganik tuzlar [66] ve sukroz eklenmesi [67], aktif kömür ilavesi [64], agar yerine MS ortamına vermikülit ilavesi [63], *in vitro* kültürlerde köklenme başarısını arttırmaktadır. Ayrıca bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS besin ortamında da köklenme gözlemlendiği bilinmektedir [68].

Çalışmamızda aklimatizasyon aşamasından önce *in vitro* çoğaltılan soğancıkların gelişimini artırmak için soğancıklar %6 sukroz içeren MS ortamında ardından, kök gelişimini artırmak için 0.5mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında kültüre alınarak olgunlaştırılmıştır. Aklimatizasyon aşamasında ise olgunlaşan ve gelişen soğancıklara bakteri (*Serratia marcescens*), alg (*Spirulina platensis*) veya organik köklendirme tozu uygulanarak hazır saksı toprağı içeren saksılara aktarılmış, bakteri uygulaması yapılan soğancıkların %30 unun hayatta kaldığı görülmüştür.

In vitro üretilen sürgün ve soğancık gibi çoğaltma materyalinin köklendirilmesi ve toprağa transferi aşamaları için yapılan çalışmalarda, besin ortamının hormon içeriği ve sakkaroz düzeyinin, ortama aktif kömür katılmasının, ortamdaki mineral madde konsantrasyonunun azaltılmasının, kültürlere düşük sıcaklık, GA₃ ve tuz uygulanmasının başarıyı artırdığı belirtilmektedir [10, 13-14, 21, 23, 68].

Paek and Murthy [50] tarafından, *Fritillaria thunbergii*'nin soğan pul yaprakları ile yapılan rejenerasyon çalışmasında 1.62 µM NAA ve 4.65 µM Kinetin içeren MS ortamından elde edilen soğanların kültür sonunda 5°C'de beş hafta bekletilmesinin ardından kompost, vermikulit ve perlit (1:1:1) içeren ortama aktarıldığında 10 mm çapındaki soğanların %100'ünün sürgün verdiği belirlenmiştir. Ayrıca, rejenerasyon çalışmasına başlamadan önce soğanları 10°C' de 6 hafta bekletmenin rejenerasyonu olumlu yönde etkilediği bildirilmişlerdir [69].

Şeker metabolizmasının dormansi ve sürgün oluşumuyla yakından ilgili olduğu, soğanlara soğuk uygulaması boyunca en önemli biyokimyasal değişikliğin karabonhidrat içeriklerinde meydana gelen kantitatif değişimler olduğu farklı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir [70-71].

Bilindiği üzere soğanlı bitkiler çimlenme ve soğancık oluşumu için mutlaka soğuk uygulamasına ihtiyaç duyarlar. Borochoy et al. [72], geofitlerin yaşam döngüsünün çok önemli bir parçasını dormansinin oluşturduğunu belirtmektedir. Geofitlerde soğuk uygulaması dormansinin kırılmasında büyük rol oynamaktadır.

Gürlek [8], bazı *Fritillaria* türlerinde *in vitro* koşullarda en yüksek tohum çimlenme oranını 4°C'de MS besin ortamında 3 ay bekletilen tohumlarda belirlemiştir. Bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda da olgun tohumlardan soğancık elde etme aşamasında da 4°C'de MS besin ortamında 3 ay ön üşütmeye tabi tutulan *F. imperialis* tohumlarında çimlenme oranı %73 ve çimlenen tohumların soğancık oluşturma oranı %76, *F. persica* tohumlarında çimlenme oranı %82.1 soğancık oluşturma oranı ise %82 olarak belirlenmiştir.

Standart koşullar altında monosakkaritler (glikoz ve fruktoz) sukrozdan önemli derecede düşük oranda bulunurlar. Soğuk uygulamasının ardından soğancıklarda glikoz ve fruktozun depo edilmesi önemli oranda artmaktadır.

Benkeblia [73], sukrozun bitkilerde büyüme ve gelişmede merkezi bir rol oynadığını ayrıca sukrozun yıkılmasından oluşan ürünlerin içsel filizlenmenin başlatılmasında ve dormansinin kırılmasında önemli olduğunu bildirmiştir.

Guy [74] ve Morgan [75], soğuk uygulamasının dış ortamın potansiyel su miktarını azalttığını, ozmoregülasyon veya hücresel membranı koruma ile ilgili olan çözünebilir karbonhidrat içeriğinin önemli derecede artışına sebep olduğunu bildirmektedirler.

Nikolić et al. [30], köklenmenin ve soğanların filizlenmesinin artışı ile sonuçlanan düşük sıcaklık uygulamasının *F. meleagris* soğancıklarının dormansisinin kırılmasında önemli bir faktör olduğunu ve soğancıkların soğuk uygulamasına cevap olarak çözünebilir şekerlerin birikimini ve polioller içeriğini de artırdığını belirtmişlerdir.

Bütün bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda soğuk uygulaması ile karbonhidrat içeriği arasında pozitif bir ilişkinin olduğu, toprağa aktarım aşamasından önce soğancıklara soğuk uygulamasının, soğancıkları yüksek konsantrasyonlarda şeker içeren ortamlarda kültüre almanın aklimatizasyon başarısını olumlu yönde artırdığı anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda aklimatizasyon aşamasında, olgunlaşan ve gelişen soğancıklara bakteri (*Serratia marcescens*), alg (*Spirulina platensis*) veya organik köklendirme tozu uygulanarak hazır saksı toprağı içeren saksılara aktarılmış, bakteri uygulaması yapılan soğancıkların %30'unun hayatta kaldığı görülmüştür.

Topraktaki mikroorganizmalardan bitki kökleri ile ilişkili olan bakterilere kök bakterileri denilmektedir. Bu bakteriler tarımda biyolojik savaş ajanı ve biyogübre olarak kullanılmakta ve 'bitki gelişimini teşvik eden/uyaran bakteriler' (plant growth promoting rhizobacteria=PGPR) olarak da adlandırılmaktadır. Bu gruptaki mikroorganizmaların bitkilere sağladığı yararları, bitkilerin besin alımını iyileştirmek, hormonal aktiviteyi uyarak köklerdeki zararlı mikroflorayı engellemek ve böylece bitkinin gelişimini ve verimini artırmak olarak özetleyebiliriz.

Bu gruptan olan *Serratia marcescens* kısa çubuk şekilli, gram negatif ve hareketli bir bakteri türüdür [76].

Topraktaki yararlı mikroorganizmalardan biri olan *Spirulina platensis* iplikli (filamentli) yapıda prokaryotik bir mavi-yeşil alg türüdür. Alkali sularda serbest

yıgınlar halinde bulunurlar. İçerdiği zengin biyokimyasal maddeler nedeniyle başlıca destek gıda olarak üretilmekle birlikte, sahip olduğu pigmentleri nedeniyle hayvan yemi olarak da önem taşımaktadırlar. Toprak yapısını zenginleştirmek amacıyla, çimlenme zorluğu olan nadide bitkilerin kültüründe gübre olarak ve hatta yenilenebilir yakıt kaynağı olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır [77].

Spirulina, gıda desteği olarak sütü gıdalar, şekerlemeler ve bazı yemeklere eklenerek tüketilmekte, içerdiği mavi renkli C-fikosiyanin doğal gıda boyası ve kozmetik alanında renklendirici olarak ve ayrıca eczacılıkta kullanılmaktadır. Su ürünlerinde ve tavukta beyaz etin renklendirilmesi de diğer bir kullanım alanıdır. Algler aynı zamanda gübre olarak da kullanılmaktadır. Literatürde toprak yapısını iyileştirici özelliklerinin yanında, besin maddelerinin alımını kolaylaştırdıkları ve bitkilerin hastalıklara dayanıklılığını, besin elementlerinin topraktan alınımını sağlayarak verimi artırdıkları bildirilmektedir [78].

Alglerin gübre olarak kullanımı, pek çok araştırmaya konu olmuştur. Süs bitkilerinden Begonya (*Begonia semperflorens*), *Spirulina platensis* ile gübrelendiğinde yaprak büyüklüğünde artış olduğu saptanmıştır [79]. Benzer şekilde, kavunda *Spirulina* ile organik gübrenin birlikte uygulandığı parsellerde bitki büyümesinde (gövde çapı, boğum sayısı, yaprak sayısı, bitki kuru ağırlığı) artış olduğu belirlenmiştir [80].

Yiğenoğlu [81], Domateste bakteriyel solgunluk hastalığına neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in biyolojik mücadelesinde *Spirulina platensis*'in etkisini araştırmıştır. Toprağa *Spirulina platensis* gübrelemesinin yapılması hem hastalığı baskılamış hem de kuru madde miktarı ile yapraktaki klorofil miktarında artışa sebep olmuştur.

Büyüme ve gelişmeyi destekleyen rizobakterleri de içine alan bazı yararlı mikroorganizmaların bazı bitki hormonlarını sentezleyerek kök sağlığını iyileştirdikleri, besin alımını kolaylaştırdıkları ve olumsuz koşullara karşı kök sistemini koruyarak gelişmeyi teşvik ettiği bilinmektedir [82-85].

Azotobacter, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* [86] gibi bakterilerin ve *Spirulina* gibi alg yapısındaki organizmaların köklenme ve bitkinin aklimatizasyonunda olumlu etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir [87].

Bu tez çalışmasında *Fritillaria* türlerinde *in vitro* soğancık üretimine ve aklimatizasyon başarısını artırmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Farklı eksplant ve kültür uygulamaları sonucunda *in vitro* koşullarda *F. imperialis* ve *F. persica*'ya ait soğancıklar elde edilmiştir. *In vitro*'da üretilen soğancıkların dış koşullara alıştırılması için soğancıklara değişik uygulamalar yapıldıktan sonra toprağa aktarılmıştır. Bu uygulamalardan en önemlisi *Fritillaria* türlerinde ilk uygulama niteliğinde olan toprağa aktarım sırasında soğancıklara bakteri ve alg uygulamasıdır. Nitekim bakteri uygulaması yapılan soğancıkların %30'unun hayatta kaldığı görülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalar ve bu araştırmanın sonuçları soğanlı bitkilerde *in vitro* şartlarda elde edilen soğancıkların dış ortama aktarma aşamasında soğuk uygulamasının, soğancık boyutunun, şeker cinsi ve dozunun, iyi bir köklenmenin önemli olduğunu göstermektedir.

Bu araştırma ile *Fritillaria* türlerinde aklimatizasyon başarısını yükseltmek amacıyla yeni bir yaklaşım niteliğinde olan bakteri ve alg uygulaması ümitvar sonuçlar doğurmuştur. Bundan sonraki aklimatizasyon çalışmalarında da bakteri uygulamasının üzerine gidilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Çalışmanın sonuçlarının başta *Fritillaria* türleri olmak üzere diğer geofitlerin *in vitro* çoğaltılması ve elde edilen soğancıkların dış koşullara aktarılmasına yönelik araştırmaların geliştirilmesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburg University Press, Edinburgh, 8: 284-287, **1984**.
- [2] Vaziri, A.P., *Endemik Muscari aucheri'nin in vitro Klonal oğaltımı Üzerine Araştırmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, **2009**.
- [3] Güner, A., Özhatay, H., Ekim, T., Başer, K.H.C., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh, 11: 243, 246-247. **2000**.
- [4] Uluę, B.V., *Adıyaman Lalesi (Fritillaria persica L.) Soğanlarının Değişik Vejetatif Yöntemlerle Üretilmeleri ve Farklı Ekolojilerin Yavru Soğan Gelişmesine Etkileri Üzerine Araştırmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdaę Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahęe Bilimleri Anabilim Dalı, Tekirdaę, **1997**.
- [5] Tekşen, M., *Akdeniz Bölge'sindeki (Türkiye) Fritillaria L. (Liliaceae) Cinsinin Revizyonu*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2004**.
- [6] Rix, E.M., "Fritillaria: A revised classification", *The Fritillaria Group of the Alpine Garden Society*, Edinburg, **2001**.
- [7] Arslan, N., Sarıhan, E.O., Türkiye'nin *Fritillaria* türleri ve bunlarla ilgili yapılan alışmalar, *II. Süs Bitkileri Kongresi (Poster)*, Antalya, **2002**.
- [8] Gürlek, D., *Fritillaria imperialis L. ve Fritillaria persica L. Türlerinde in vitro Soğancık Üretimi Üzerine Araştırmalar*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, **2011**.

- [9] Dilik, M., *Şemdinli lalesi (Fritillaria imperialis) ve Adıyaman lalesi (F. persica)'nin Doku Kültürüyle Çoğaltılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, **2006**.
- [10] Kalyoncu, D.D., *Bazı Yabani Tulipa Türlerinde In Vitro Soğancık Üretimi*, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, **2007**.
- [11] Hartman, H.T., Kester, D.E., *Plant Propagation: Principles and Practices*, Prentice-Hall, New Jersey, **1975**.
- [12] Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M. A., Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri, *Bitki Biyoteknolojisi I*, (çev: Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M.), Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, **2001**.
- [13] Çakırlar, H., Tıpırdamaz, R., Ellialtıoğlu, S., *Türkiye’de ticari değeri olan Galanthus (G. elwesii Hooker Fil. ve G. ikariae Baker.) türlerinin doku kültürü yoluyla üretimi*, TÜBİTAK projesi, Proje no: TBGAG–19/A, Ankara, **1994**.
- [14] Kukulczanka, K., Kromer, K., Czastka, B., Propagation of *Fritillaria melaegris* L. through tissue culture, *Acta Horticulturae*, No. 251, 147-153, **1989**.
- [15] Tang, W., Wu, J.Y., Studies on somatic embryogenesis in *Fritillaria ussuriensis*, *Acta Agronomica Sinica*, 19: 2, 188-189, **1993**.
- [16] Tang, W., Gui, Y.L., Guo, Z.C., A study of morphogenesis in *Fritillaria ussuriensis* Maxim, *Research of Agricultural Modernization*, 16:4, 267-269, **1995**.
- [17] Hannweg, K., Watt, M.P., Berjak, P., A simple method for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 37: 213-218, **1996**.
- [18] Witomska, M., Wilk, T., Lukaszewska, A., Effect of sterilization method on infection level and regeneration *in vitro* of explants from bulbs of *Fritillaria imperialis* L., *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa Kwiaciarnictwa Skierniewicach*, 5: 121-130, **1998**.

- [19] Tan, F.P., Gao, S.L., The effect of growth regulators on growth of cultured bulblets of *Fritillaria unibracteata* Hisao et K. C. Hsia., *Journal of Plant Resources Environment*, 8(1): 52-55. **1999**.
- [20] Slabbert M.M., Niederwieser J. G., In vitro bulblet production of *Lachenalia*, *Plant Cell Reports*, 18: 7-8, **1999**.
- [21] Zaidi, N., Khan, N.H., Zafar, F., Zafar, S.I., Bulbous and Cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro, *Science Vision*, 6(1): 58-73, **2000**.
- [22] Chang, C., Chen, C-T., Tsai, Y-C., Chang, W.C., A tissue culture protocol of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker., *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41: 139-142, **2000**.
- [23] Wawroshch, C., Malla, P.R., Koop, B., Clonal propagation of *Lilium nepalense* D. Don, a threatened medicinal plant of Nepal, *Plant Cell Reports*, 20: 285-288, **2001**.
- [24] Arslan, N., Gürbüz, B., Özcan, S., Koyuncu, M., Gümüşcü, A., Mirici, S., Parmaksız, İ., *Stenbergia candida* ve *Stenbergia fischeriana* Türlerinin Kültüre Alınması ve Çoğaltılması Üzerine Araştırmalar, TÜBİTAK TARP Proje no: 1843, **2003**.
- [25] Karaoğlu, C., *Göl Soğanı (Leucojum aestivum L.)'nin In Vitro Koşullarında Hızlı Çoğaltımı*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2004**.
- [26] Parmaksız, İ., Khawar, K.M., Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis from Immature Seeds of *Stenbergia candida* Mathew et T. Baytop. An Endangerred Endemic Plant of Turkey, *Propagation of Ornamental Plants*, 3: 128-133, **2006**.
- [27] Nasırcılar, A.G., Karagüzel, Ö., *Galanthus elwesii* Hook. F. bitkisinin olgunlaşmamış embriolarından in vitro soğan üretimi, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19: 159-164, **2006**.

- [28] Dimech, A.M., Cross, R., Ford, R., Taylor, P.W., Micropropagation of gylmea lily (*Doryanthes excelsa* Correa) from new South Wales, Australia, *Plant cell, tissue and organ culture*, 88: 157-165, **2007**.
- [29] Tang, Z.H., Shi, L., Chen, W.L., Lin, H.H., In vitro propagation of Chirita heterotricha Merr, *Propagation of Ornamental Plants*, 7: 43-48, **2007**.
- [30] Nikolić, M., Mišić, D., Maksimović, V., Jevremović, S., Trifunović, M., & Subotić, A., Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture in vitro, *Archives of Biological Sciences*, 60(1): 5-6, **2008**.
- [31] Muraseva, D.S., Novikova, T.I., Erst, A.A., In vitro propagation and conservation of rare species *Fritillaria meleagris* L. from floral explants, *Contemporary Problems of Ecology*, 8(6): 754-763, **2015**.
- [32] Koyuncu, M., Geofitler, *Bilim ve Teknik*, 27(321): 72-82, **1994**.
- [33] Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15: 473-497, 1962.
- [34] Witomska, M., Lukaszewska, A., Bulblet regeneration in vitro from different explants of *Fritillaria imperialis*, *Acta Horticulturae*, 430: 331-338, **1997**.
- [35] Witomska, M., Lukaszewska, A., Rozmnazanie *Fritillaria imperialis* L. in vitro Materialy z konferencji, Rozmnazanie roslin ogrodniczych SGGW, Warszawa, 41-45, **1997**.
- [36] Witomska, M., Wplyw temperatury na rozmnazanie *Fritillaria imperialis* L. in vitro, Zeszyty Naukowe IS i K, tom 6 (w druku) , **1999**.
- [37] Takayama, S., Misawa, M., Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scales grown in vitro, *Plant and Cell Physiology*, 23(1): 67-74, **1982**.
- [38] Lukaszewska, A., Witomska M., Bianco, J., Borthé, P., ABA contents and the regeneration ability of *Fritillaria imperialis* L. cultured in vitro, *Acta physiologiae plantarum*, 3: 241-244, **1998**.

- [39] Bach, A., Shoot multiplication and bulblet production of hyacinth (*Hyacinthus orientalis* L.) in vitro, *Zeszyty Naukowe AR w Krakowie*, 150: 82, **1990**.
- [40] Bach, A., Pawlowska, B., Effect of type of carbohydrates in regeneration of *Hyacinthus orientalis* L. in long-term cultures, *Folia Horticulturae*, 5: 3-11, **1993**.
- [41] Niimi, Y., Onozama, T., *In vitro* bulblet formation from leaf segments of *Lilies*, especially *Lilium rubellum* Baker, *Scientia Horticulturae*, 11(4): 379-389, **1979**.
- [42] Gerrits, M.M., De Klerk, G.J., Dry-matter partitioning between bulbs and leaves in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated *in vitro*, *Plant Biology*, 41(4): 461-468, **1992**.
- [43] Nikolaeva, M.G., Lyanguzova, I.V., Pozdova, L.M., *Biologiya semyan* (Biology of Seeds), St. Petersburg: Nauchno-Issled. Inst. Khim., S.-Peterb. Gos. Univ., **1999**.
- [44] Vetchinkina, E.M., Shirnina, I.V., Shirnin, S.Yu., Molkanova, O.I., Preservation of rare plant species in genetic collections in vitro, *Vestn. Balt. Fed. Univ. im. I. Kanta*, 7: 109-118, **2012**.
- [45] Gupta, S.D., Conger, B.V., Differentiation of multiple shoot clumps from intact seedling of switchgrass, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(3): 196-202, **1998**,
- [46] Zobayed, S.M.A., Saxena, P.K., In vitro-grown roots: a superior explant for perlic shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv "New Stem") in a temporary immersion bioreactor, *Plant Science*, 165(3): 463-470, **2003**.
- [47] Ayan, A.K., Çırak, C., Kevseroğlu, K., Sökmen, A., Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforata* L., *Turkish journal of agriculture and forestry*, 29(3): 197-204, **2005**.

- [48] Vechernina, N.A., *Metody biotekhnologii v selektsii, razmnozhении i sokhranении genofonda rastenii: monografiya* (The Methods of Biotechnology in Selection, Reproduction, and Preservation of the Gene Pool of the Plants: Monograph), Barnaul: Altaisk. Gos. Univ., **2004**.
- [49] Laslo, V., Zăpârâan, M., & Agud, E., In vitro conservation of certain endangered and rare species of Romanian spontaneous flora, *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului*, 16, 252-261, **2011**.
- [50] Paek, K.Y., Murthy, H.N., High Frequency of Bulblet Regeneration from Bulb Scale Sections of *Fritillaria thunbergii*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(3): 247-252, **2002**.
- [51] Subotić, A., Trifunović, M., Jevremović, S., & Petrić, M. Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Fritillaria meleagris*, *Biologia plantarum*, 54(3): 592-596, **2010**.
- [52] Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Ebrahimie, E., Sardari, M., Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(11): 1875-1879, **2007**.
- [53] Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Sardari, M., Ebrahimie, E., Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L., *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(3): 395-399, **2008**.
- [54] Gao, S.L., Zhu, D.N., Cai, Z.H., Jiang, Y., Xu, D.R., Organ culture of a precious Chinese medicinal plant-*Fritillaria unibracteata*, *Plant cell, tissue organ culture*, 59(3): 197-201, **1999**.
- [55] Ziv, M., Lilien-Kipnis, H., Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes in vitro, *Plant Cell Reports*, 19(9): 845-850, **2000**.
- [56] Witomska, M., Lukaszewska, A., Effect of sucrose concentration on regeneration in vitro from different explants of *Fritillaria imperialis* L., *Annals of Warsaw Agricultural University, Horticulture (Landscape Architecture)*, 21: 21-28, **2000**.

- [57] Memon, N., In vitro propagation of gladiolus plantlets and cormels, *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 4(3): 280-291, **2012**.
- [58] Tıprıdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ş., Çakırlar, H., Kardelenin (*Galantus ikariae* Baker.) doku kültürü yoluyla çoğaltımı: Eksplant tipi, ortam pH'sı ve karbonhidrat kaynağının soğancık oluşumuna etkisi, *DOĞA-TU Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 23(4): 823-830, **1999**.
- [59] Zhang M., Jia G., The effects of sucrose concentration and light condition on lily's bulblet-in-tube production and inclusion content, *Pakistan Journal of Botany*, 46(1): 307-315, **2014**.
- [60] Bonnier, F.J.M., Van., T.J.M., Long term In vitro storage of lily: effect of temperature and concentration of nutrient and sucrose, *Plant cell, Tissue and organ culture*, 49(2): 81-87, **1997**.
- [61] Nhut, D.T., Le, B.V., Fukai, S., Tanaka, M., Van, K.T.T., Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture, *Plant Growth Regulation*, 33(1): 59-65, **2001**.
- [62] Ziv, M., Halevy, A.H., Shilo, R., Organs and plantlet regeneration of *Gladiolus* through tissue culture, *Annals of Botany*, 34(3): 671-676, **1970**.
- [63] Logan, A.E., Zettler, F.W., Rapid in vitro propagation of virus-indexed gladioli, *Acta Horticulturae*, 164: 169-175, **1985**.
- [64] Lilien-Kipnis, H., Kochba M., Mass propagation of *Gladiolus* hybrids, *Acta Horticulturae*, 212: 631-638, **1987**.
- [65] Ziv, M., Transplanting gladiolus plants propagated in vitro, *Scientia Horticulturae*, 11(3): 257-260, **1979**.
- [66] Sriskandarajal, C., Mullins, M.G., Micropropagation of granny smith apple: Factors affecting root formation in vitro, *Journal of Horticulture Sciences*, 56: 71-76, **1981**.
- [67] Kumar, A., Sood, A., Palni, L.M.S., Gupta, A.K., In vitro propagation of *gladiolus hybridus* hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 57(2): 105-112, **1999**.

- [68] Goo, D.H., Joung, H.Y., Kim, K.W., Differentiation of gladiolus plantlets from callus and subsequent flowering, *Acta Horticulturae*, 620: 339-342, **2003**.
- [69] Karaoğlu, C., Bazı Sternbergia Türlerinde Doku Kültürleriyle Soğancık Üretimi ve Dış Koşullara Ağıştırılması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, 2008.
- [70] Oquist, G., Hurry, V.M., Huner, N.P., Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye, *Plant Physiology*, 101(1): 245-250, **1993**.
- [71] Galiba, G., Kerepesi, I., Snape, J.W., Sutka, J., Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat, *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 95(1): 265-270, **1997**.
- [72] Borochoy, A., Spiegelstein, H., Weiss, D., Dormancy and Storage of Geophytes, *VII International Symposium On Flowerbulbs*, 405-410, **1997**.
- [73] Benkeblia, N., Postharvest technology of onions. In: Crop Management and Postharvest Handling of Horticultural Products. Fruits and Vegetables (Ed. R. Dris), 2: 107-137, **2003**.
- [74] Guy, C.L., Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism, *Annual review of plant biology*, 41(1): 187-223, **1990**.
- [75] Morgan, J.M., Osmotic components and properties associated with genotypic differences in osmoregulation in wheat, *Functional Plant Biology*, 19(1): 67-76, **1992**.
- [76] Anonim, http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Serratia_marcescens, (03.01.2018).
- [77] Kendirli, K., *Spirulina Kültürlerinde Besin Elementlerinin Farklı Oranlarda Kullanımının Kuru Madde, Protein Ve Klorofil-A Düzeyine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana, **2010**.

- [78] Blunden, G., Whapham, C., Jenkins, T., Seaweed Extracts in Agriculture and Horticulture: Their Origins, Uses and Modes of Action. School of Pharmacy and Biomedical Science and "School of Biological Sciences, University of Portsmouth, King Henry John Street, Portsmouth, Hampshire P01 202, U.K, **1992**.
- [79] Mendi, Y.Y., Eldogan, S., Unek, C., Uslu, L., Torun, A., Curuk, P., Isık, O., The Usage of Spirulina on Acclimatization of In vitro Begonia (B. semperflorens) Plantlets, Proocedings of the 23rd International Eucarpia Symposium Section Ornamentals, Colorful Breeding and Genetics, ActaHorticulturae, No. 836, (Ed. J.M.vanTuyl), Netherlands, **2009**.
- [80] Bayram, C.A., *Adıyaman koşullarında bazı bitki aktivatörlerinin Galia C8 ve Kırkağaç 637 kavun çeşitlerinde verim, kalite, bitki büyümesi ve beslenme durumuna etkileri*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, **2014**.
- [81] Yiğenoğlu, C.Y., *Spirulina platensis'in Domateste Bakteriyel Solgunluk Hastalığının Biyolojik Mücadelesinde Kullanım Olanakları*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana, **2015**.
- [82] Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A., Growth and yield response of wheat to inoculation with auxin producing plant growth promoting rhizobacteria, *Pakistan Journal of Botany*, 35(4): 483-49, **2004**.
- [83] Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talon, M., The plantgrowth-promoting rhizobacteria Bacillus pumilus and Bacillus licheniformis produce high amounts of physiologically active gibberellins, *Physiol Plantarum*, 111: 206-211, **2001**.

- [84] García de Salamone, I.E., Hynes, R.K. Nelson, L.M., Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants, *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 404-411, **2001**.
- [85] Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 86: 1-25, **2004**.
- [86] Vessey, J.K., Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and Soil*, 255(2): 571-586, **2003**.
- [87] Gümüő, C., *Batı Karadeniz Bölgesi'nde Salep Elde Edilmesinde Kullanılan Bazı Orkide Türlerinin (Orchidaceae) Çoğaltım Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 205, Ankara, **2009**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : EBRU AKYÜZ
Doğum Yeri : HATAY
Medeni Hali : BEKAR
E-Posta : ebruakyuz@hacettepe.edu.tr
Adresi :

Eğitim

Lise : Nuran Yılmaz Çok Programlı Lisesi
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi:

İngilizce-İyi

İş Deneyimi

Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Hacettepe Üniversitesi BAP projesi-13199.55TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu

Akyüz, E., Yaşarkan, O., Ellialtıoğlu, Ş.Ş., Tıpırdamaz, R., *Fritillaria imperialis* L. (Ağlayangelin) ve *F. persica* L. (Kırk Lâle)'nın olgun tohumlarından in vitro soğancık üretimi ve dış koşullara alıştırılması, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, 5-9 Eylül, Gaziantep, 2016.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 15/01/2018

Tez Başlığı / Konusu: Bazı *Fritillaria* Türlerinde *In Vitro* Soğancık Üretimi ve Dış Koşullara Ağıştırma Çalışmaları

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin, 03/01/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

15.01.2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Ebru AKYÜZ
Öğrenci No: N12229183
Anabilim Dalı: BİYOLOJİ
Programı: Yüksek lisans
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Rukiye TIPIRDAMAZ

(Unvan, Ad Soyad, İmza)