

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TERS LALE (*Fritillaria imperialis* L.) BİTKİSİNDE
IN VITRO KOŞULLARDA ORGAN
REJENERASYONLARININ SAĞLANMASI**

Esra İLHAN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 07.08.2015

Bornova-İZMİR

2015

Esra İLHAN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Ters Lale (*Fritillaria imperialis* L.) Bitkisinde *In Vitro* Koşullarda Organ Rejenerasyonlarının Sağlanması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.08.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üveleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Aynur Günel

Raportör Üye

: Prof. Dr. Bahattin İanyokta

Üye

: Yrd. Doç. Dr. Meltem Bayraktar

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Ters Lale (*Fritillaria imperialis* L.) Bitkisinde *In Vitro* Koşullarda Organ Rejenerasyonlarının Sağlanması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

07 / 08 /2015

İmzası



Adı-Soyadı

Esra İLHAN

ÖZET**TERS LALE (*Fritillaria imperialis* L.) BİTKİSİNDE *IN VITRO*
KOŞULLARDA ORGAN REJENERASYONLARININ
SAĞLANMASI**

İLHAN, Esra

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Ağustos 2015, 61 sayfa

Liliaceae familyasından *Fritillaria* cinsine bağlı olan ters lale (*Fritillaria imperialis* L.), ülkemizde yarı endemik olarak yetişen bir türdür. *F. imperialis*, çok uzun zamandır bahçe süs bitkisi olarak kullanıldığından başta Hollanda olmak üzere Avrupa'ya ihraç edilmektedir ve doğadan sökümlü yasaktır.

Bu tez çalışmasında, vejetatif ve generatif çoğaltım işlemlerinde pek çok kısıt barındıran *F. imperialis* türünün, çeşitli *in vitro* besin ortamlarında ve farklı kültür koşullarında doku kültürü teknikleri ile çoğaltımı hedeflenmiştir. Bu amaçla, *F. imperialis* L. bitkisinden alınan çeşitli eksplantlardan (soğan, yaprak, gövde, kök), *in vitro* koşullarda organ rejenerasyonlarının gerçekleştirilmesine çalışılmıştır. Sürgünler üzerindeki yeşil yaprak ekplantları için en yüksek kallus gelişim oranı (%59.26) 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA ile 60 g/l süktroz içeren B5 besin ortamında, petal yaprak eksplantlarında ise (%33.33) aynı içeriğe sahip MS besin ortamında tespit edilmiştir. Yeşil yaprak eksplantları ile yapılan çalışmalarda; MS temelli besin ortamlarında rejenere olan kallusların, B5 temelli besin ortamında rejenere olanlara göre hem somatik embriyo (sırasıyla en yüksek embriyogenik kallus oranları %92.31 ve %56.25), hem de sürgün rejenerasyonuna yönelme bakımından (sırasıyla en yüksek sürgün oluşturan kallus oranları %88.89 ve 37.50) daha uygun oldukları kaydedilmiştir. Bu ortamlar arasında ise oksinlerin

(0.5 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA), yüksek dozda BAP (1.0 mg/l) ile kombine edildikleri MS ve B5 besin ortamlarında sürgün oluşturan kallus oranları (sırasıyla %88.89 ve %37.50), daha düşük BAP (0.1 mg/l) konsantrasyonunda gelişenlere (sırasıyla %53.85 ve %16.67) göre daha başarılı bulunmuşlardır.

Başlangıç materyali olarak yeşil yaprak eksplantlarının kullanıldığı çalışmalarda, dolaylı organogenez bakımından oksinlerle birlikte besin ortamına eklenen BAP sitokinini sürgün rejenerasyonunda, Kin veya TDZ sitokinleri ise genellikle kallus uyarımında daha etkili bulunmuşlardır. *F. imperialis* türünde, depolama süresince soğanlar üzerinde kendiliğinden gelişen köklerin ilk defa başlangıç materyali olarak kullanıldığı ve 1.0 mg/l NAA + 2.0 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamının ele alındığı denemelerde ise kallus rejenerasyonu bakımından 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot koşullarının (%33.33), karanlık koşullara göre daha elverişli olduğu ortaya konulmuştur. Yeşil yaprak eksplantları altkültüre alındıktan 6 hafta sonra toplamda 146 adet olmak üzere yeşil yaprak eksplantı başına 1.35 adet sürgün rejenere olmuştur. Kültürde 36 hafta boyunca altkültüre alınmadan inkübe edilen yeşil yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar üzerinde toplamda 62 adet soğancık rejenerasyonu gerçekleşirken, petal yapraklarının eksplant kaynağı olduğu denemeler sonucunda ise soğancık gelişimi gözlenmemiştir. 36 haftalık kültür periyodu sonunda yeşil yaprak eksplantı başına 1.89 adet soğancık (FS7: B5 + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA besin ortamında) elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ters Lale, *Fritillaria imperialis*, *in vitro*, Soğancık, Rejenerasyon,

ABSTRACT**PROVIDING ORGAN REGENERATIONS UNDER *IN VITRO*
CONDITIONS IN CROWN IMPERIAL
(*Fritillaria imperialis* L.)**

İLHAN, Esra

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

August 2015, 61 pages

Crown imperial (*Fritillaria imperialis* L.) which belongs to *Fritillaria* genus of Liliaceae family, is grown as semi-endemic in our country. Since crown imperial (*F. imperialis* L.) is used as ornamental plant for a long time because of its splendid flowers, it is exported to Europe especially Holland and it is forbidden to remove from nature.

Aim of this study is to propagate using various *in vitro* nutrient mediums and different tissue culture techniques in *F. imperialis* species, which includes lots of restrictions in both vegetative and generative production. For this purpose, organ regeneration under *in vitro* conditions was performed by using various explants (bulb, leave, shoot, root) of *F. imperialis* L. For the green leaf explants, the maximum callus formation ratio (59.26%) was obtained on B5 medium containing 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA and 60 g/l sucrose, while for the petal explants, the maximum callus formation ratio (33.3%) was detected on MS medium with the same content. In the studies was made by using the green leaf explants, it is recorded that regenerated callus in MS based nutrient media had more tendency to form both somatic embryo (the maximum embryogenic callus ratios 92.31% and 56.25%, respectively) and shoot regeneration (the maximum shoot forming callus ratios 88.89% and 37.50%, respectively) than regenerated callus in B5 based nutrient media. Among these media, MS and B5 media supplemented with higher concentration

of BAP (1.0 mg/l) combined with auxins (0.5 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA) were more successful (88.89% and 37.50%, respectively) than low concentration BAP (0.1 mg/l) combined with same auxins (53.85% and 16.67%, respectively) regarding callus ratios forming shoot.

In the studies which used green leaf explants as starting material, the medium supplemented with BAP cytokinin and auxins was more efficient in shoot regeneration, while the medium containing Kin or TDZ cytokinins and auxins was more effective in callus stimulation. At the *F. imperialis* species that using MS medium include 1 mg/l NAA + 2 mg/l 2,4-D and roots as initial explants the first time which was grown by themselves on bulbs during storage and, photoperiod conditions of 16 hours light/8 hours dark were more suitable than fully dark conditions in terms of callus regeneration. The green leaf explants were subculture after six weeks of culture, 1.35 shoots per green leaf explant and total 146 shoots regenerated. Total 62 bulblets were obtained from callus that developed on green leaf explants which maintained 36 weeks in culture without subculture, while the petal leaves formed no bulblets. At the end of the 36 weeks culture periods, 1.89 bulblets were obtained per green leaf explant (at the FS7 coded medium which was included B5 + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA).

Keywords: Crown imperial, *Fritillaria imperialis*, *in vitro*, Bulblet, Regeneration.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında bana yol gösterici olan sayın danışmanım Prof. Dr. Aynur GÜREL’e, çalışmalarım sırasında ümit verdiği ve destek olduğu için Yrd. Doç. Dr. Meltem BAYRAKTAR’a, benden desteğini esirgemeyen Begüm AKYOL’a, manevi desteği ve gösterdiği sabırla bana güç veren Oktay AYIŞIĞI’na ve varlığı için her zaman şükrettiğim biricik babam Ömer İLHAN’a, annem Ayşegül İLHAN’a ve kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmamızın yürütülmesini destekleyen **Aliye Üster Vakfı**’na (Bilimsel Araştırma Projesi: “Ters Lale (*Fritillaria imperialis* L.) Bitkisinde *in vitro* Koşullarda Organ Rejenerasyonlarının Sağlanması”) ve **Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü**’ne katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	7
2.1. Geofitlerle İlgili Genel Bilgiler.....	7
2.2. Ters Lalenin Bitkisel Özellikleri.....	8
2.3. Ters Lalenin Yetiştirilme Koşulları.....	10
2.4. Ters Lalenin Üretim Yolları.....	11
2.5. Ters Lalenin Tıbbi Kullanımı ve Sekonder Metabolit İçeriği.....	13
2.6. Nektar Bileşimi.....	15
2.7. Doku Kültürü ile Yapılan Çalışmalar.....	15
2.7.1 Sterilizasyon çalışmaları.....	15
2.7.2 Rejenerasyon çalışmaları.....	17
3. MATERYAL VE METOD.....	22

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1. Materyal.....	22
3.2. Metod.....	23
3.2.1 Soğanların toprağa dikimi.....	23
3.2.2 <i>In vitro</i> koşullarda sterilizasyon çalışmaları.....	23
3.2.3 Eksplantların kültüre alındığı besin ortamları.....	27
3.2.4 Kültür koşulları.....	29
3.2.5 İstatistiksel değerlendirme.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Toprağa Dikilen Soğanların Gelişimleri.....	30
4.2. Sterilizasyon Çalışmaları ve Kararma.....	32
4.2.1 Yeşil yaprak eksplantları ile kurulan sterilizasyon çalışmaları ve kararma durumları.....	32
4.2.2 Petal yaprak eksplantları ile kurulan sterilizasyon çalışmaları ve kararma durumları.....	33
4.2.3 Petal yaprak ve yeşil yaprak eksplantlarının NaOCl ile sterilizasyon başarıları.....	35
4.2.4 Soğan eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları ve kararma durumlar.....	36
4.2.5 Gövde eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları ve kararma durumları.....	36

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.6 Kök eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları ve kararma durumları.....	36
4.3. Rejenerasyon Bulguları.....	37
4.3.1 Yeşil yaprak eksplantları ile yapılan çalışmaların 12 haftalık kültür periyodu sonundaki rejenerasyon sonuçları.....	37
4.3.2 Petal yaprak eksplantları ile yapılan çalışmaların rejenerasyon sonuçları.....	47
4.3.3 Kök eksplantları ile yapılan çalışmaların rejenerasyon sonuçları.....	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
6. ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR DİZİNİ	62
ÖZGEÇMİŞ.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Dikime alınan soğanlar.....	22
3.2. Dikilen <i>F.imperialis</i> soğanlarından gelişen bitkiler.....	23
3.3. Petal yaprak eksplantları.....	25
3.4. <i>F.imperialis</i> soğanlarının muhafaza süreci içerisinde, soğanların üzerinde kendiliğinden gelişen köklerden alınan 1 cm uzunluğunda eksplantlar.....	27
4.1. Soğanların dikiminden 12 hafta sonra elde edilen <i>F.imperialis</i> sürgünlerinin görünüşleri.....	30
4.2. İlk dikimden 15 hafta sonraki <i>F.imperialis</i> 'de sürgün durumu ve çiçeklenme.....	31
4.3. 18 haftanın sonunda büyümekte olan ters laleler.....	31
4.4. Yeşil yaprak eksplantlarına uygulanan sterilizasyon yöntemlerine ait 12 haftalık kültür sonrasında sterilizasyon yüzdeleri.....	33
4.5. Petal eksplantları üzerinde farklı sterilizasyon tekniklerinin karşılaştırılması.....	34
4.6. Petal yapraklarında sterilizasyon yöntemlerine göre sterilizasyon başarıları ve kararma oranları.....	34
4.7. Petal yaprak ve yeşil yaprak eksplantlarının NaOCl ile sterilizasyon başarıları.....	35
4.8. Kararma oranlarının eksplant tipine göre karşılaştırılmaları.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9. Kök eksplantlarının NaOCl ile sterilizasyon başarıları ve kararma oranları.....	37
4.10. Farklı besin ortamlarında ve fotoperiyot koşullarında kök eksplantlarının kararma durumları.....	37
4.11. Kültüre alınmış yeşil yaprak eksplantları.....	38
4.12. 12 Haftalık kültür periyodu sonunda yeşil yapraklardan embriyogenik kallus rejenerasyonları.....	38
4.13. 12 Haftalık kültür sonrası farklı besin ortamlarının karşılaştırılmaları....	39
4.14. Farklı besin ortamlarında gelişen kalluslar arasında embriyogenik kallus oranı (%) ve sürgün oluşturan kallus oranı (%).	41
4.15. Farklı tipte sitokinin (BAP, Kin ve TDZ) içeren MS besin ortamlarında kallus oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%) ve sürgün oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%),.....	42
4.16. 12. Haftada altkültüre alınan embriyogenik kalluslar üzerinde 6 hafta sonra elde edilen sağlıklı ve camsılaşmış sürgün sayıları.....	43
4.17. Altkültüre alınmayan kalluslardan 36 hafta sonra rejenere olan soğancıklar.....	45
4.18. Rejenere olan bazı soğancıkların tüpte ve mikroskop altında görünüşleri.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.19. 36 haftalık kültürde rejenere olan soğancıkların (adet) besin ortamlarına göre dağılımları.....	47
4.20. Kültüre alınan yeşil yaprak eksplantı başına soğancık sayıları (adet)....	47
4.21. Petal eksplantlarında 12 hafta sonra gelişen ve embriyonik olmayan kalluslar.....	48
4.22. Petal eksplantlardan kallus rejenerasyonu denemesi.....	48
4.23. Petal kökenli kalluslarda somatik embriyo ve sürgün gelişimleri.....	49
4.24. Petal kökenli kalluslarda gelişen kalın gövdeli sürgünler.....	49
4.25. Bir gövde üzerinde yerleşmiş üst yaprakları ve daha aşağı kısımda alt yaprakları oluşturmuş sürgün.....	50
4.26. Aydınlık koşullarda kök eksplantlarında gelişen kalluslar.....	51
4.27. Karanlık koşullarda kök eksplantlarında gelişen kalluslar.....	51
4.28. Farklı besin ortamlarında ve farklı fotoperiyot koşullarında kök eksplantlarında kallus rejenerasyon durumları.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. 1997-2003 yılları arası Türkiye’deki bazı firmaların ters lale soğanı ihracat kontenjanları (%).....	3
1.2. <i>F. imperialis</i> türünün 2000-2005 yılları arasında ülkemiz tarafından gerçekleştirilen ihracatı.....	5
1.3. Ülkelere göre <i>Fritillaria</i> cinsine ait türlerin bulunma durumları.....	9
3.1. Soğan pul eksplantları için kullanılan besin ortamları.....	28
3.2. Yeşil yaprak eksplantları için kullanılan besin ortamları.....	28
3.3. Kök eksplantları için kullanılan besin ortamları.....	29
4.1. Sterilizasyon yöntemlerinin sterilizasyon başarı durumları (%) ve kararma yüzdeleri (%).....	32
4.2. 12 haftalık kültür sonrası farklı besin ortamlarında meydana gelen kararan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%), kallus oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%), somatik embriyo oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%), sürgün oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%), yeşil yaprak eksplantlarından sürgün oluşturan kallus yüzdesi (%) ve embriyogenik kallus oranı (%).....	40
4.3. 12. haftada altkültüre alınan embriyogenik kalluslar üzerinde 6 hafta sonra besin ortamlarına göre rejenere olan sürgün sayıları (adet).....	43
4.4. Altkültüre alınmayan kalluslardan 36 hafta sonra soğancık rejenerasyonu.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)ÇizelgeSayfa

4.5. Fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında, farklı besin ortamlarında kültüre alınan kök eksplantları arasında kallus rejenerasyonu görülen kök eksplantı yüzdesi (%). 52

4.6. Kök eksplantlarının, karanlık ve fotoperiyot koşullarında farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda kallus rejenerasyonu görülen kök eksplantı yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları. 52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ	Mikron
M	Mol
N	Normalite
g/l	gram/litre
mg/l	miligram/litre
ml	mili-litre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
<u>Kısaltmalar</u>	
MS	Murashige & Skoog (1962)
B5	Gamborg et al (1968)
NAA	Naftelen Asetik Asit
BAP	Benzil Amino Purin
IAA	İndol Asetik Asit
2,4-D	2,4-Dichlorofenoksi Asetik Asit
CPPU	<i>N</i> -(2-Kloro-4-piridil)- <i>N'</i> -fenilüre, Forklorfenuron
KNA	Potasyum Naftalen Asetat

1. GİRİŞ

Liliaceae familyasından *Fritillaria* cinsine bağlı olan ters lale (*Fritillaria imperialis* L.), ülkemizde Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinin yüksek rakımlı arazilerinden, İran, Afganistan, Pakistan platolarına uzanan Himalaya'ların eteklerine kadar yetişme gösteren yarı endemik bir bitki türüdür. 60 cm'den 1 metreye kadar uzayabilen bir gövdenin tepesinden yere doğru bakan çiçeklerin üzerinde taç şeklinde yapraklar bulunmaktadır. Her gövdede 3 ile 8 lalenin ters büyüdüğü *Fritillaria imperialis*, soğan şeklinde toprak altı organlarına sahip geofit bir bitkidir. Doğada çoğunlukla turuncu-kırmızı renklerde çiçekleri görülmekle birlikte, yetiştirilen türlerde renkler koyu kırmızıdan sarıya kadar da değişebilmektedir (Anonim 1).

Dünya'da *Fritillaria* cinsine ait 100 civarında tür mevcuttur. Türkiye'de ise bu sayı toplam 37 olup, bunun %35'i endemiktir. Bu değerler, Dünya'daki *Fritillaria* türlerinin yaklaşık üçte birinin Türkiye'de doğal olarak yetiştiğini ve %15'inin ise sadece Türkiye'de bulunduğunu göstermektedir (Dilik, 2006).

Bitki yoğun olarak Hakkari ve Şemdinli bölgesinde yetiştiği için halk arasında Şemdinli lalesi ve Hakkari lalesi olarak da tanınmaktadır. *F. imperialis*, görkemli çiçekleri nedeniyle çok uzun zamandır bahçe süs bitkisi olarak kullanıldığından başta Hollanda olmak üzere Avrupa'ya ihraç edilmektedir ve doğadan sökümlü yasaktır (Anonim 2).

1960'lı yıllarda artan dış talebe bağlı olarak ihracatta ortaya çıkan yükseliş, ülkemizde cazibe kazanan bu türlerin doğadan bilinçsizce ve çok miktarlarda kontrolsüz olarak toplanmalarına neden olmuştur. Bu durum, doğal floranın ağır şekilde tahrip edilmesiyle sonuçlanmıştır. Dolayısıyla bazı türlerin yok olma tehlikesine karşın yasal tedbirlerin alınması kaçınılmaz olmuştur. Bu kapsamdaki ilk yönetmelik 1989 yılında çıkartılmış, ancak daha sonra 1991 ve 1994 yıllarında iki kez daha revize edilmiş ve 24 Ağustos 2004 tarih ve 25563 sayılı Resmi Gazete'de "**Doğal Çiçek Soğanlarının Sökümü, Üretimi ve Ticaretine İlişkin Yönetmelik**" adı altında yayımlanarak yürürlüğe girmiştir. Bu yönetmelik ile doğal çiçek soğanlarının üretimi, hasadı, depolanması ve

ihracatı tamamen denetim altına alınmaya çalışılmıştır. 19 Temmuz 2012 tarih ve 28358 sayılı Resmî Gazete’de bu yönetmelik de kaldırılarak, “Doğal Çiçek Soğanlarının Üretimi, Doğadan Toplanması Ve İhracatına İlişkin Yönetmelik” olarak yayınlanmıştır (Anonim 3). Ayrıca 1994 yılında Türkiye Büyük Millet Meclisi’nde onaylanan, nesli tehlike altında olan yabani bitki ve hayvan türlerinin uluslararası ticaretini düzenleyen ‘CITES’ anlaşmasının resmi üyelik prosedürü 1996 yılında tamamlanmış ve Türkiye resmen CITES üyesi olmuştur (Karagüzel vd., 2007).

Söz konusu yönetmeliğe göre her yıl sökülme alanları CITES komitesi, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Çevre ve Orman Bakanlığı’nın koordineli çalışmaları sonucu bölgeler bazında görevlendirilen bilim adamları ve teknik elemanlar tarafından yerinde izlenmekte ve gerekli raporlar ilgili mercilere sunulularak ihracat kotaları belirlenmektedir (Çizelge1.1) (Anonim 4; Dilik, 2006). Teknik komite toplantısında ise bu kota; ihracat yeterliliği tespit edilmiş ve Teknik Komite tarafından onaylanmış olan firmalara kontenjan puanları oranında dağıtılmaktadır. Her yıl yeniden düzenlenen bu listenin dışında teknik komitenin izni olmadan doğadan ticari amaçlarla çiçek soğanı toplayıp ihraç etmek yasaktır (Bozkurt vd., 2006). Dağıtılan bu kotalar; aktif halde bulunan ihracatçı firmalara (Yasemin, Tezel, Marla, Bilgin vb.) üretim, büyütme (elek altı diye tabir edilen ihraç boyutunun altındaki soğanların tekrar yerine dikilip büyütülmesi) ve doğadan sökülme şeklinde gruplar halinde ayrılmaktadır (Karagüzel vd., 2007).

Çizelge 1.1. 1997-2003 yılları arası Türkiye’deki bazı firmaların ters lale soğanı ihracat kontenjanları (%)

FİRMALAR	Yıllar İtibarı İle Kontejan Puanları (%)				
	1997	1998	1999	2003	ÜLKELER
Marla (Yalova)	57.34	56.33	55.43	53.51	Hollanda-İsviçre
Yasemin (İzmir)	17.58	18.08	18.67	22.29	Hollanda
Bilgin (Trabzon)	13.2	13.54	13.83	10.72	Hollanda-İsviçre
Tezel (İzmir)	13.2	13.54	13.83	13.48	Hollanda

Kaynak: Anonim 4; Dilik, 2006.

CITES komitesi her yıl ihracatı yapılan çiçek soğanlarının cins, tür, miktar, doğa kontenjanı, söküm takvimini belirlemekte ve hazırlanan doğal çiçek soğanı ihracat listesi de her yıl Ekim-Kasım aylarında resmi gazetede tebliğ edilmektedir. Hazırlanan 2006 yılı doğal çiçek soğanları ihracat listesine göre, ihracat yasağı veya izni olan türler dikkate alınarak 3 grup oluşturulmuştur:

1. Doğadan toplanarak ihracatı yasak olan çiçek soğanları,
2. İhracatı kotayla veya başka herhangi bir kayıtla sınırlandırılan çiçek soğanları,
3. İhracatı üretimden serbest olan çiçek soğanları.

F. imperialis bu düzenlemede 2. gruba, yani ihracatı kotayla veya başka herhangi bir kayıtla sınırlandırılan çiçek soğanları grubuna dahil edilmiştir. Bu gruptaki çiçek soğanlarının üretimi için doğadan materyal toplanması, Doğal Çiçek Soğanları Uzman Kurulu’nun görüşleri alınmak suretiyle Bakanlığın iznine tabidir.

Türkiye’de süs bitkileri üretiminin %48’ini kesme çiçek, %47’sini dış mekan bitkileri, %3’ünü iç mekan bitkileri, %2’sini ise çiçek soğanları oluşturmaktadır. Çiçek soğanları, Türkiye’de süs bitkilerinin tanınmasına ilk olarak öncülük eden süs bitkisi grubudur. 1970’li yıllarda yaşanan döviz kıtlığı sorununun çözümünde doğal çiçek soğanları ihracatından gelen 2 milyon dolarlık büyük gelir oldukça büyük bir katkı sağlamıştır (Karagüzel vd., 2007).

Diğer bitkiler yönünden olduğu kadar çiçek soğanları bakımından da oldukça zengin olan ülkemiz yaklaşık 700 adet soğanlı, yumrulu ve rizomlu bitki türünün anavatanıdır. Uzun yıllardan beri doğadan sökülen çiçek soğanları, park ve bahçe süs bitkisi, ıslah materyali veya tıbbi bitki olarak değerlendirmek üzere çeşitli ülkelere ihraç edilmektedir. Türkiye dışarıya çiçek soğanı ihraç eden tek ülke olmamakla birlikte, dünya çiçek soğanı ihracatında ilk sıralarda yer almaktadır (Karagüzel vd., 2007).

Dünya çiçek soğan ticaretinde en önemli rolü oynayan Hollanda’nın doğal çiçek soğanları ithalatında Türkiye’nin payı; *Galanthus*’ta %65, *Cyclamen*’de %99, ***Fritillaria***’da %99, *Leucojum*’da %80, *Anemone*’da %90 *Eranthis*’de %95, *Ornithogalum*’da %1, *Arum*’da %98, *Sternbergia*’da %100’dür. Hollanda ithal ettiği geofitlerin büyük bir kısmını ambalajlanmış halde, başta A.B.D. olmak üzere, diğer alıcı ülkelere ihraç etmektedir. Türkiye’nin doğal çiçek soğanlarından elde ettiği gelir, yılda 2-2.5 milyon dolar civarındadır (Kahraman, 2006).

Fritillaria türleri ülkemizde henüz süs bitkisi olarak hak ettiği konuma ulaşamamış olmalarına rağmen, Avrupa ülkelerinde park ve bahçelerde, tarihi mekanların bahçelerinde kullanılan türlerdir ve ihraç potansiyelleri oldukça yüksektir. *F. imperialis*’in geçmiş yıllara ait ihracat kayıtlarına bakıldığında, 1989 yılında üreticilere doğadan damızlık olarak 150.000 adet soğan sökümü için izin verildiği ve 2000 yılı için *F. imperialis* ihracatının yasaklandığı görülmektedir. Bu yasaklamanın amacı, 1999 yılında *F. imperialis* için sökülmek üzere izin verilen 100.000 adet damızlık soğan kontenjanının ihracata gitmesini önleyerek üretimde kullanılmasını sağlamak olmuştur (Kahraman ve Özzambak, 2011).

Çizelge 1.2.'de TUGEM kayıtlarından alınan 2000-2005 yıllarına ait soğan ihracat miktarları yer almaktadır. 2010 yılına ait verilen kota 75.000 adet olmuş, ancak gerçekleşen ihracat miktarı yine kotaya ulaşamamıştır. Dolayısıyla son yıllarda özellikle *F. imperialis* türünde ihracat sıkıntısı yaşanmaktadır.

Çizelge 1.2. *F. imperialis* türünün 2000-2005 yılları arasında ülkemiz tarafından gerçekleştirilen ihracatı

Yıllar (adet)	<i>F.imperialis</i>	
	Verilen kota (adet)	İhraç miktarı
2000	Yasaklama	-
2001	100.000	19.810
2002	200.000	53.960
2003	200.000	98.860
2004	60.000	22.890
2005	100.000	38.527

Kaynak: Dilik, 2006.

Ülkemiz açısından, gerek yurt içinde süs bitkisi olarak tanınırlığının artırılması ve kullanımının yaygınlaştırılması, gerekse doğal florayı koruyarak ihracatın arttırılabilmesi için bu bitkide üretimin artırılması oldukça önem taşımaktadır.

Yavru soğanların ayrılması, pullarına ayırma ve dilimlere ayırma gibi vejetatif olarak çoğaltılması mümkün olan *F. imperialis*'in aynı zamanda tohumla üretimi de yapılmaktadır. Tohumlar, tohum kapsülleri kuruduktan sonra toplanmaktadır. Bitkinin bir çiçeğinde yaklaşık 3 - 5 tohum kapsülü ve her kapsül içerisinde de yaklaşık 200 tohum bulunmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, generatif yöntemin vejetatif yöntemden daha fazla ürün sağladığı düşüncesi doğmaktadır (Aksu, 2011). Ancak tohumla çoğaltımda genetik varyasyonlar ortaya çıktığından, elde edilen bireylerin çiçek rengi, yapısı, çiçeklenme zamanı gibi özellikler bakımından ana bitkiye benzememesi ve ayrıca ekilen bir tohumun satılabilir ebatta bir soğan haline gelmesinin 4-5

seneyi bulması gibi çeşitli sorunları barındırmaktadır. Vejetatif yolla soğanlar üzerinden gerçekleştirilen üretimde ise çoğalma katsayısı ve hızı yavaş olmakta, buna ek olarak ana soğanın kaybı da ortaya çıkmaktadır. Bütün bu sorunların ortadan kaldırılması ve üretimin arttırılması ile ihracat açığının karşılanabilmesi adına **doku kültürüyle çoğaltım yöntemi** yeni bir alternatif oluşturmakta ve oldukça büyük bir potansiyel barındırmaktadır.

Tohumla ya da çelikle üretimin zor olduğu bitkilerin doku kültürü teknikleri ile üretilmeleri önemli ve popüler tekniklerden biridir. Optimum aseptik koşullar altında özelleşmiş ve olgunlaşmış hücre ve dokuların ana bitki ile aynı olan çok sayıda bitkinin eldesi için manipüle edilmeleri ile gerçekleştirilen doku kültürü teknikleri, klonal çoğaltım teknikleri olarak da adlandırılırlar (Razavizadeh and Ehsanpour, 2008).

Bu çalışmanın amacı kapsamında, vejetatif ve generatif çoğaltım işlemlerinde pek çok kısıt barındıran *F.imperialis* türünün, gelecek vaat eden alternatif bir yol olarak, çeşitli *in vitro* besin ortamlarında ve farklı kültür koşullarında doku kültürü teknikleri ile çoğaltımı hedeflenmiştir. Buradan hareketle, *F. imperialis* L. bitkisinden alınan çeşitli eksplantlardan (soğan, yaprak, gövde, kök), *in vitro* koşullarda organ rejenerasyonlarının gerçekleştirilmesine çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Geofitlerle İlgili Genel Bilgiler

Antik dönemden günümüze kadar kesme çiçek, çelenk, çevre düzenlemesi, gıda ve boya maddesi ile geleneksel tıp gibi pek çok alanda kullanılan soğanlı bitkilerin, çevre düzenlemesinde kullanılmaları her zaman en ön sırada yer almıştır. Park, hastane, saray, tapınak, resmi binalar, villa bahçeleri ve apartman balkonları gibi çevre düzenlemelerinde, çiçek soğanları yüzyıllardır kullanılmaktadır. Antik dönemden günümüze gelindiğinde geofitler; halen, tıp alanında, boya sanayinde, süs bitkisi olarak peyzaj düzenlemelerinde, kesme çiçek olarak aranjmanlar halinde oldukça geniş kullanım alanına sahiptirler (Elinç ve Baktır, 2006).

Geofitler, “Doğal Çiçek Soğanları” olarak ifade edilen soğanlı, rizomlu veya yumrulu süs bitkileri olarak bilinirler. Gövde, yaprak ve çiçek gibi toprak üstü organları gelişme mevsimini tamamladıktan sonra kuruyarak ölmekte ve yaşamlarını yaz aylarında toprak altında soğan, soğanımsı gövde (corm), yumru ve rizom şeklindeki depo organları ile devam ettirmektedirler (Aksu, 2011). Geofit bitkiler, bordürlerde, koruluklarda, çimlerle birlikte, çiçek parterlerinde (çiçeklerin dikilmeleri için ayrılan yerler), bahçelerde ya da saksılarda kullanılabilmektedirler (Alp ve Aşur, 2006).

Geofitler, deniz kıyılarından yüksek dağların sert koşullarına kadar, oldukça ekstrem koşullarda dahi yetişebildiklerinden, genetik olarak üstün özelliklere sahiptirler. Türkiye’de ekonomik değeri bulunan 498 geofit türünden 162 türü endemiktir (Elinç ve Baktır, 2006). Bu geofitlerin büyük kısmı, endemik türler bakımından zengin olan; Zambakgiller (Liliaceae), Nergisgiller (Amaryllidaceae) ve Süsengiller (Iridaceae) familyaları içerisinde yer almaktadır (Titiz vd., 2000).

Ülkemizde Osmanlı döneminden beri ihracatı yapılan bazı geofit türlerinin, ticari amaçlarla doğadan kontrolsüz bir şekilde toplanmaları ve doğanın tahrip edilmesi nedeniyle doğal popülasyonlarında meydana gelen bozulmalar, bu türlerin yaşam alanlarının daralmasıyla sonuçlanmıştır. Buna

rağmen, doğal çiçek soğanları ihracatı 1960 yılından itibaren hız kazanmış ve günümüze kadar da giderek artan oranda süregelmiştir (Onay, 2008).

2.2. Ters Lalenin Bitkisel Özellikleri

Fritillaria cinsine ait türler, Türkiye'nin Doğu Anadolu ve Trakya Bölgeleri ile Akdeniz bölgesi başta olmak üzere, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgeleri ve İran, Irak, Afganistan, Rusya, Suriye, Lübnan, Filistin, Ürdün, Pakistan, Çin, Japonya, Yunanistan, Bulgaristan, İtalya, İspanya, Portekiz, Kuzey Afrika ve Amerika'nın Kaliforniya ile Oregon eyaletlerinde yayılış göstermektedirler (Tekşen and Aytaç, 2011).

İlk olarak 1753 yılında, *Fritillaria* cinsinden *F. imperialis* L., *F. persica* L., *F. pyrenaica* L., *F. meleagris* L. türleri tanımlanmıştır ve tüm dünyada 7 altcins, 2 bölüm (section) ve 165 takson (139 tür, 17 alttür ve 9 varyete) ile temsil edilmektedirler (Linnaeus, 1753; Tekşen, 2004). Bu tür ve alttür taksonları; Türkiye'de 39 (33 tür ve 6 alttür), Yunanistan'da 25, Çin'de 24, Rusya'da 22, Kaliforniya'da 20 ve İran'da 18 adet olmak üzere dağılım göstermektedir (Tekşen and Aytaç, 2014).

Türkiye, tür sayılarının karşılaştırıldığı ülkeler arasında ilk sırada yer almaktadır (Çizelge 1.3). Türkiye Florası'nın 11. cildine göre *Fritillaria* (36 tür, 43 tür ve tür altı takson) en fazla tür içeren 4. cinstir (Tekşen, 2004).

Çizelge 1.3. Ülkelere göre *Fritillaria* cinsine ait türlerin bulunma durumları

Kıta	Ülke	Toplam Tür Sayısı	Endemik
Asya	Türkiye	36	19
	Çin	24	15
	Rusya	22	13
	İran	18	7
	Japonya	6	-
	Irak	5	1
	Lübnan	2	-
	Suriye	2	-
	Afganistan	2	-
	Pakistan	1	-
Avrupa Kıtası	Yunanistan	25	13
	Bulgaristan	6	-
	İtalya	4	-
	İspanya	3	-
	Portekiz	2	-
Amerika Kıtası	A.B.D. (Kaliforniya Eyaleti)	20	13
	A.B.D. (Oregon Eyaleti)	1	-

Kaynak: Tekşen and Aytaç, 2011.

2011 yılında yayınlanan bir revizyonda ise Türkiye Florası'ndaki *Fritillaria* cinsi, 35 tür ve 6 alttür ile yer almıştır. Daha önce 19 olarak bilinen endemik tür sayısı ise 21 olarak belirlenmiştir (Tekşen and Aytaç, 2011).

F. imperialis'in (şahtuğu, ağlayan gelin, ters lale, kerbela, imparator lalesi, kral lalesi, kral tacı, Meryem'in gözyaşları), gösterişli çiçekleri sebebiyle yoğun bir şekilde kültürü yapılmakta ve başta Hollanda olmak üzere birçok Avrupa ülkesine ihraç edilmektedir. Soğanlarının çapı 8 cm'ye kadar büyüebilmekte ve bir metreye kadar uzayabilen gövdesi ile sahip olduğu umbel çiçek durumu üzerinde yoğun bir yaprak kümesi bulundurması ile *Fritillaria* cinsi içerisindeki diğer türlerden ayrılabilir. Ayrıca diğer türler arasında en büyük polen ölçülerine sahiptir. Moleküler genetik özellikleri

bakımından ($2n=24$), *F. persica* haricinde diğer türlerden çok uzaktır ve aynı zamanda morfolojik olarak da *F. persica*'dan oldukça farklıdır (Tekşen, 2004).

F. imperialis, ilkbaharın başlarında toprakaltı soğanlarından gelişen bir bitkidir. Çimlenen tohumlarının çiçeklenme aşamasına gelebilmesi en az 8 yıl sürmektedir. Sarı çiçekli bitkiler ise diğerlerine göre daha da geç çiçeklenmektedir. Soğanlarda oldukça güçlü nahoş bir koku mevcuttur. (Búrquez, A. 1989).

2.3. Ters Lalenin Yetiştirilme Koşulları

Fritillaria türlerinin soğanları, kışa dayanıklı çiçek soğanları grubuna girmektedir ve dikim için en uygun zaman Eylül-Ekim-Kasım ayları iken, çiçeklenme genellikle Nisan-Mayıs aylarında gerçekleşmektedir. Asidik olmayan (pH'sı 7 civarında), iyi drenajlı, humuslu ve kumlu topraklar, *F. imperialis*'in gelişimi için uygundur (Pala, 2006). Ters lâle soğanları kışa doğru soğukta aktifleşmekte ve kış sonundan bahar ortasına kadarki dönemde ise çiçeklenmektedirler. Çiçekli bir ters lalenin boyu cinsine göre ve toprak kalitesine göre 30 cm'den 1 metreye kadar değişmektedir. Gün ışığını seven bir bitkidir. Ancak yüksek sıcaklığa hassastır (Anonim 5). Bu nedenle, yarı gölge veya günün en sıcak zamanında gölge kalan yerler en uygun alanlardır (Anonim 6).

Ters lale soğanları açıkta bekletilmemelidir. Çünkü soğanların toprak dışında bekletilme durumunda bozulma ve çürüme ihtimalleri yüksektir. Büyük soğanlar 20 cm, küçük soğanlar ise 10 – 15 cm kadar derine gömülmelidirler. Soğanların dondan korunmaları önemlidir, ancak soğuktan doğabilecek hasarlar, sıcak yerde muhafaza edilmelerinden dolayı doğacak hasarlardan daha azdır. Saksıda yetiştirmek için toprak karışımında torf kullanılmaması tavsiye edilmektedir. Suyu iyi süzdüren, çabuk kuruyan, organik besleyiciliği yüksek toprak kullanılmalıdır (Anonim 5). Soğanlar, suya oldukça hassastırlar ve suya hassaslıkları köklendikten sonra bile devam etmektedir. Saksı toprağı aşırı derecede kurumadıkça sulanmamalıdır ve bir kez sulama yaklaşık 1,5-2 ay gidebilmektedir (Anonim 7).

2.4. Ters Lalenin Üretim Yolları

F. imperialis türü tohumdan çimlenmeyle, farklı vejetatif üretim yöntemleriyle (yavru soğandan üretim, çapraz kesim, dilimlere ayırma, pullarına ayırma, merkez çıkarma vb.) ve doku kültürü tekniği ile üretilmektedirler.

Tohumla Üretim: Tohumla üretim, generatif bir üretim yöntemi olarak bol miktarda ürün eldesine olanak sağlamasına karşın, tohum ekiminden çiçek açma büyüklüğünde soğan elde edilmesine kadar geçen sürenin (*Fritillaria* cinsinde 4 ile 8 yıl arası) çok uzun sürmesi nedeniyle dezavantajlıdır (Aksu, 2011). Ayrıca tohumla çoğaltımda genetik varyasyonlar ortaya çıktığından, elde edilen bireylerin çiçek rengi, yapısı, çiçeklenme zamanı gibi özellikler bakımından ana bitkiye benzememesi gibi kısıtlar da söz konusudur.

Vejetatif Üretim Yöntemleri: Ana soğandan ayrılan yavru soğanların özel tavalara dikilmesi yoluyla yapılan üretimden başka; soğanın tepesindeki büyüme noktasının tahrip edilmesi ile apikal dominansinin kırılmasına dayanan; dilimlere ayırma (chipping), çapraz kesim, pullarına ayırma (scaling), ikişerli pullarına ayırma (twin-scaling) ve merkez çıkarma (scooping) yöntemleri de *Fritillaria* türleri için uygulanabilirliği bulunan vejetatif üretim teknikleridir.

Dilimlere ayırma yönteminde dilim sayısı arttıkça elde edilecek soğan büyüklüğü azalmakta ve daha geç çiçeklenme iriliğine ulaşabilmektedir. *F. imperialis* türünde soğan dilimleri 25°C'de inkübe edilerek, 2-3 yıllık bir büyüme periyodundan sonra ancak ticari boya ulaşabilmektedirler. Pullarına ayırma yönteminde (scaling) her pul bir miktar bazal kısım içerecek şekilde ayrılarak özel yetiştirme tavalara dikilirken, ikişerli pullarına ayırma yönteminde (twin-scaling) ise; dilimleme yönteminin bir aşama ilerisi olarak her soğan dilimindeki pulların birbirine bazal kısım ile bağlı ikişerli gruplar halinde ayrılarak özel tavalara dikilmesi şeklinde uygulanmaktadır. Dilimleme yöntemi ile elde edilecek soğanlar, ikişerli pullarına ayırma yöntemi ile elde edilecek soğanlara göre daha büyük olmaları nedeniyle, daha kısa sürede

çiçeklenme büyüklüğüne ulaşabilmektedirler. Ancak ikişerli pullarına ayırma yönteminde boyutlar küçük olsa da ana soğanın çok daha fazla sayıda soğan elde edilmektedir. Dolayısıyla vejetatif üretim tekniğinin seçimi, elde edilmek istenen soğanın amacına göre değişiklik göstermektedir (Aksu, 2011).

F. persica türünde yapılan bir çalışmada, değişik kesim yöntemleri ile farklı gruplar oluşturulmuş ve bu soğanlardan elde edilen bitkilerin bazı özellikleri ve oluşan yavru soğanların özellikleri incelenmiştir. Uygulanan kesim yöntemleri; soğanın alt kısmından ortasına kadar dikey kesim, üst kısmından orta kısmına kadar dikey kesim, tabana derin dairesel kesik atma ve alt tabanı oyarak çıkarma ile hiç kesim yapılmamış kontrol grubundan oluşmaktadır. Araştırma sonucunda, bitki başına en yüksek yavru soğan oluşumunun alttan kesilen soğanlarda tespit edildiği ve aynı zamanda bu yavruların deneme içerisinde en küçük çevre uzunluğuna sahip oldukları belirtilmiştir. Aynı zamanda en düşük yavru soğan verimi, üstten kesim yönteminde ortaya çıkmıştır. Sonuçta, soğanı çoğaltmak, yavru soğan sayısını arttırmak için seçilmesi gereken yöntemin alttan kesim yöntemleri olduğu ifade edilmiştir (Arslan vd., 2008).

Çapraz kesim yönteminde ise olgun soğanın dip kısmı, dip tablasını ve büyüme konisini geçecek şekilde 3-4 kez kesilerek, soğan pullarının koltuklarındaki büyüme noktalarının soğancık şeklinde gelişmeleri hedeflenmektedir. Soğanın dip kısımlarının oyulması (scooping) yönteminde de amaç soğanların köklenme bölgesi olan dip kısımlarının çıkarılması sonucu apikal dominansinin kırılması ile oyulan bölgede soğancıkların oluşumunu teşvik etmektir. Bu yöntemden farklı olarak merkez çıkarma tekniğinde, soğanın merkezinde bulunan büyüme konisi, elma çekirdek bölgesini çıkarmaya yarayan özel bir bıçakla ya da uygun bir mantar deliciyle tamamen çıkarılmaktadır. Böylece bütün büyüme potansiyeli, soğanın dip tablasında oluşan soğancıkların gelişmesi üzerine toplanmaktadır. Bu yöntem *F. imperialis* türünde oldukça başarılı sonuçlara yol açmaktadır (Aksu, 2011).

Uluğ et al. (2010), *F. persica* türünde beş farklı vejetatif üretim tekniği (çapraz kesim, merkez çıkarma, yatayda kesik atma, dikey 4'e dilimleme ve

dikey 8'e dilimleme) ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, elde ettikleri soğancık sayısı, soğancıkların ağırlıkları ve çevre uzunlukları bakımından bu yöntemleri karşılaştırmışlardır. Sonuçta en fazla yavru soğancık oluşumu yatay olarak kesik atılan soğanlar üzerinde ve en az sayıda soğancık oluşumu ise hiçbir tekniğin uygulanmadığı kontrol grubunda ve merkez çıkarma yönteminde tespit edilmiştir.

2.5. Ters Lalenin Tıbbi Kullanımı ve Sekonder Metabolit İçeriği

Süs bitkisi olmasının yanında, *Fritillaria* cinsi içerdiği steroidal bileşiklerden dolayı, birçok hastalığın tedavisinde umut vaat etmektedir. *Fritillaria* türlerine ait soğanların geleneksel Çin tıbbında binlerce yıldır önemli bir ilaç olarak kullanılan “Bei mu”; yüksek ateş, süt yetersizliği, abse, romatizma ve göz hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Özler, 2001).

Literatürlerdeki çalışmalarda soğanların içerdiği alkaloidlerin öksürüğü engelleyici temel biyolojik aktif maddeler olduğu, bunların tipleri ve içeriklerinin türler içerisinde farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur. *Fritillaria* türlerinin, alkaloidler haricinde; saponinler, terpenoidler, steroidler, suksin asidi (kehribar asidi), tiymidin, adenosin, polisakkaritler, nişasta, flavonoid, yağ asitleri, organik asitler ve uçucu yağlar gibi bileşenler içerdiklerine dair veriler de bulunmaktadır. *F. thunbergii* türünde bulunan “peimine” ve “peiminine” alkaloidlerinin kan şekerini düşürmede yardımcı olduğu, öksürük giderici ve ekspektoran ilaçların bileşiminde kullanıldıkları belirtilmektedir (Dilik, 2006). *Fritillaria* türlerinin soğanlarında bulunan alkaloidlerin öksürük giderici etkilerinin incelendiği kapsamlı bir çalışmada; imperialin, vertisin, vertisinon ve ebeidin adlı izosteroidal alkaloidlerin, sıçanlardan izole edilen trakeal ve bronşiyal preparatlar üzerindeki antitusif (öksürük önleyici) etkileri araştırılmış, olumlu sonuçlara ulaşılmıştır (Chan et al., 2011).

F. imperialis türü ise antik çağlardan bu yana hem tıbbi bitki olarak, hem de nişasta üretimi amacıyla yetiştirilmiştir. Günümüzde daha çok içerdiği imperialin alkolodi nedeniyle ya da süs bitkisi olarak kültüre edilmektedirler. *F. imperialis* türüne ait bitki ekstraktları, öksürük, bronşit, astım ve salgıbezi

tümörleri için; antibakteriyel, anti-trombosit, anti-kolinerjik ve damar genişletici etkileri gösterebilmektedirler (Hanelt, 2001). Anti-kolinerjik etkinin incelenmesi amacıyla yapılan örnek bir çalışmada, *F. imperialis* soğanlarından ekstrakte edilerek saflaştırılan; sevanin-tip alkaloidler olan imperisin ve fortisin ile steroidal alkaloidler olan delavin, persikanidin ve imperialin bileşiklerinin, asetil-kolinesteraz ve bütiril-kolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Beyindeki bu enzimlerin inhibisyonunun Alzheimer hastalığından kaçınmaya olumlu etki sağlayabileceği düşünülmektedir (Attatur-Rahman et al., 2002). Aynı araştırmacı grubu tarafından gerçekleştirilen bir sonraki çalışmada ise, *F. imperialis* soğanlarından üç yeni steroidal alkaloid (impranin, dihidroimpranin ve fetisin) tanımlanmış ve izole edilmiştir (Akhtar et al., 2002).

Fritillaria türleri, sahip oldukları gösterişli çiçeklerinden dolayı çoğunlukla bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilmektedirler. Ancak; soğanlarından, gövdelerinden, yapraklarından ve çiçeklerinden yayılan keskin ve hoş olmayan kokudan dolayı iç mekan bitkisi olarak kullanılamamaktadırlar. Bu rahatsız edici kokudan sorumlu bileşenin kimyasal yapısı henüz tanımlanamamışsa da, Helsper et al. (2006) tarafından, bazı *Fritillaria imperialis* türlerinde bu kokuya “3-metil-2-büten-1-tiyol” isimli tek bir bileşiğin sebep olduğu ifade edilmiştir.

2.6. Nektar Bileşimi

Ters lale (*F. imperialis*), her biri dip kısmında nektar salgılanan kısımları içeren altı çiçek yaprağının bulunduğu büyük çiçeklere sahip bir bitkidir. Nektar salgılanması, çiçeklerin açmasıyla başlayarak tüm çiçek ömrü boyunca devam etmektedir. Gündüzleri özellikle de sabahın erken saatlerinde en yüksek seviyesine ulaşan nektar salgısı, çiçeğin yaşlanması ile birlikte azalma göstermektedir (Búrquez and Corbet, 1991).

Bitkilerde vertebralılar (omurgalı hayvanlar) tarafından gerçekleştirilen polinasyon, bol ve seyreklik nektar varlığı ile ilişkilendirilmektedir. *F. imperialis* türünde de nektarın miktarı ve konsantrasyonu, diğer passerin grubu

kuşlar tarafından tozlanan bitkilerde karşılaşılan ölçülerdedir. Nektar salgılanması; 4-8 ml/çiçek ve 2.1 mg şeker/saat.çiçek miktarlarında iken, nektar bileşimi sükrozdan yoksun, temel olarak glukoz ve fruktoz karışımından oluşmaktadır. Kırmızı ve sarı çiçekli bitkilerin her ikisinde de nektar salgısı aminoasit içeriği bakımından benzerlik göstermekte ve başlıca aminoasit olarak aspartik asit içerilmektedir. Bu konudaki en belirgin farklılık, sarı çiçekli bitkilerin nektarında; fenilalanin, izolösin, lösin ve histidin bulunmamasıdır (Búrquez, 1989).

2.7. Doku Kültürü ile Yapılan Çalışmalar

2.7.1. Sterilizasyon çalışmaları

Geofitlerin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımları için; soğan pullarından, sürgün uçları, çiçek yaprakları, nodlar, kökler ve olgun yapraklara, olgun tohumlardan, ince hücre tabakalarına kadar çok geniş bir yelpazede farklı eksplant tipleri kullanılabilmektedir (Uranbey, 2011).

Yapılan literatür araştırmaları kapsamında *F. imperialis*'in de dahil olduğu soğanlı bitkiler ile gerçekleştirilen doku kültürü çalışmalarında sıklıkla soğan pul parçalarının eksplant olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Ancak eksplant kaynağı olarak bitki soğanlarının kullanılması oldukça ağır kontaminasyonlara sebebiyet vermekte, her *F. imperialis* soğanının ortalama 3-5 pul içermesi bu riski daha da arttırmaktadır. Ayrıca *F. imperialis*, Liliaceae familyasındaki diğer türlere göre daha az aktif meristematik bölge içerdiğinden, bu tür için soğan parçaları ile yapılan doku kültürleri yeterince etkili olamayabilmektedir.

F. imperialis'in doku kültürü yoluyla çoğaltımı ile ilgili literatürde oldukça az çalışma bulunmaktadır. Witomska ve Lukaszewska (1997), sürgün dibindeki genç soğancıklar, sürgünün dip kısmı, yapraksız sürgünün alt kısmı, yapraklı sürgün parçaları, reseptakulum ve çiçek sapındaki yapraklar gibi farklı bitki eksplantlarını kullandıkları çalışmalarında en başarılı sterilizasyonu toprakla en az temas eden bitki kısmı olan genç soğancıklardan elde etmişlerdir. Buna karşın sürgünün dip kısmından alınan eksplantlardan

neredeyse hiç temiz materyal sağlanamamıştır. Ayrıca reseptakulum ve çiçek sapındaki yapraklar haricinde tüm eksplantlarda rejenerasyon elde edilmiştir.

Dilik (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *F. imperialis* ve *F. persica* türlerinde gövde segmentinden (çiçek sapı) alınan eksplantlar 1 mg/L BA ve 0.5 mg/L NAA veya KNA, %6 süktroz içeren MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamında, karanlıkta kültüre alınmış ve 90 günlük kültür sonunda bu segmentlerde gelişen kallus dokusu üzerinden adventif soğancıklar rejenere edilmiştir. Söz konusu çalışmada yüzey sterilizasyonu için sodyum hipoklorit ve kloramin çözeltilisinin kullanıldığı farklı denemeler uygulanmış ve ayrıca besin ortamlarına da antibiyotik eklenmiştir. Sonuçta Augmentin'in bulunduğu kültürlerde enfeksiyon oranı en aza indirilirken, kallus ve soğancık gelişiminin de olumsuz etkilendiği belirtilmiştir. Sodyum hipokloritin enfeksiyon önleme bakımından kloraminden daha etkili olduğu, besin ortamında KNA bulunmasının kallus ve soğancık oluşumunu NAA'ya göre daha olumlu etkilediği rapor edilmiştir. Yüzey sterilizasyonu için kloraminin kullanıldığı ve antibiyotiğin eklenmediği besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda enfeksiyon oranının en yüksek olduğu, buna rağmen gelişen eksplant oranının da en yüksek bulunduğu kaydedilmiştir. Hem Augmentin, hem de hipoklorit parametresinin bir arada bulunduğu kombinasyonlarda ise en düşük kallus ve soğancık oluşum oranları gözlenmiştir.

2.7.2. Rejenerasyon çalışmaları

Geofitlerin yetiştiriciliğindeki en önemli sorunlardan biri, düşük çoğalma hızlarıdır. Bu nedenle, bitkisel materyalin hızlı ve kısa sürede çoğaltımına olanak sağlayan bir yöntem olan, *in vitro* koşullarda bitki doku kültürü tekniği, kısa sürede ve çok sayıda soğancık üretimi için uygun bir yöntemdir. Geofitler ile yapılan doku kültürü çalışmaları soğancık üretiminden başka, virüslerden ari materyal üretimi ve sekonder metabolit eldesi amacıyla da sıklıkla gerçekleştirilebilmektedir (Allahverdikhani-Vaziri, 2009). Toprak altı depo organlarının başlangıç materyali olarak kullanılmaları durumunda ortaya çıkan eksplant kökenli kontaminasyon sorununun aşılmasında, olgunlaşmamış embriyolar daha avantajlı eksplant kaynağı olabilmektedirler (Uranbey, 2011).

F. meleagris türünün olgun zigotik embriyolarının başlangıç materyali olarak ele alındığı bir çalışmada, sitokinin (TDZ) içeren besin ortamında kallus uyarımı ve yine aynı besin ortamı ile yapılan altkültür sonrasında soğancık oluşumu başarılmıştır. Çalışmada elde edilen bu *in vitro* soğancıklar da pullarına ayrıldıktan sonra farklı oranlarda oksin (2,4-D) veya sitokinin (TDZ) içeren besin ortamlarına aktararak, bu pul kısımlarından da somatik embriyo rejenerasyonu ve soğancık eldesi sağlayabilmişlerdir (Marija et al., 2011).

Olgunlaşmamış zigotik embriyoların eksplant olarak kullanılması başarılı bir *in vitro* teknik olsa da, söz konusu eksplant kaynağı generatif kökenli olduğundan ve her embriyo farklı bir genetik bilgiyi taşıdığından, tam anlamıyla vejetatif bir çoğaltım kapsamında değerlendirilememektedir (Dilik, 2006).

Soğan pullarından başlatılan *in vitro* kültürlerde bitki büyüme düzenleyicilerinin rejenerasyon başarısına etkilerinin; yarı katı, çalkalamalı sıvı ve durağan sıvı faz olmak üzere farklı kültür tipleri ile birlikte ele alındığı bir çalışma Paek ve Murthy (2002) tarafından *F. thunbergii* türünde gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak soğan pul eksplantlarından, *in vitro* soğancık rejenerasyonunun sağlanabilmesi için sitokininin varlığının çok önemli olduğu ve NAA'nın en etkin oksin tipi olarak önerildiği belirtilmiştir. Hem yarı katı, hem de çalkalamalı sıvı kültürlerin, *F. thunbergii* türünün kitlesel çoğaltımı için etkili bir şekilde kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

F. imperialis L. türünde, ilk olarak soğan pullarının eksplant olarak kullanılmasıyla başlatılan *in vitro* vejetatif çoğaltım çalışmaları, daha sonraları yapılan araştırmalarla ayrıntılı bir şekilde ele alınarak; eksplant tipi ve ışıklanma, ana soğanların depolanması sırasındaki sıcaklık derecesi ve *in vitro* koşullarda kültürde kalma süresi, ortamdaki bitki büyüme düzenleyicileri ve besin ortamındaki şeker konsantrasyonu gibi birçok değişik parametrenin, adventif soğancık oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir (Dilik, 2006).

F. imperialis bitkisinin farklı kısımları araştırıldığında, gövdenin üst kısmında ABA konsantrasyonunun en düşük seviyede olduğu ve bu bölgede

rejenerasyon kabiliyetinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buradan hareketle, bitkinin alt kısımlarında ise ABA konsantrasyonu yaklaşık olarak iki kat daha yüksek bulunmuş ve dolayısıyla bu kısımların rejenerasyon yetilerinin daha düşük olduğu ifade edilmiştir (Lukaszewska et al., 1998).

Witomska (2001), bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitro* rejenerasyon üzerine etkilerini incelediği bir başka araştırmasında *F. imperialis* bitkisine ait genç soğancık segmentleri ve gövde eksplantlarını kullanmış ve en yüksek soğancık oluşum oranını 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L BA içeren MS ortamında tespit etmiştir. Sürgün eksplantları önce 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L BA eklenmiş ortama transfer edilmiş ve daha sonra hormonsuz MS ortamına aktarıldıklarında en iyi sonuç elde edilmiştir.

F. imperialis L. bitkisinin petallerinin başlangıç materyali olarak kullanılması ile *in vitro* koşullarda doğrudan soğancık rejenerasyonunun gerçekleşebildiği rapor edilmiştir (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2008). Yeşilimsi çiçek koncası (nektar salgılanmasından önce) ve kırmızımsı çiçek koncası (nektarın salgılanmaya başladığı) gibi farklı gelişim basamağındaki petallerin eksplant olarak kullanıldığı bu çalışmada, farklı oksin ve sitokinin oranlarının doğrudan soğancık oluşumu üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Doğrudan soğancık rejenerasyonuna dair literatürdeki ilk olan bu çalışmada, *in vitro* morfogenez olayının başlatılabilmesi için kültür ortamında bulunan eksojen büyüme düzenleyicileri tarafından endojen hormon seviyesinin artırılması gerektiği, ancak yolağın tamamlanabilmesi için devam eden altkültürlerde besin ortamından büyüme düzenleyicilerinin uzaklaştırılması ile doğrudan soğancık rejenerasyonunun gerçekleşebileceği rapor edilmiştir. Ayrıca kırmızımsı haldeki çiçek koncasından alınan petallerin (nektar salgısının başlamış halde olduğu) doğrudan soğancık rejenerasyonunun uyarılması ve tamamlanmasında çok daha yüksek performans gösterdiklerini, bu durumun şeker içerikli nektar salgısının bir etkisi olarak açıklanabileceğini de eklemişlerdir.

Aynı araştırmacılar yayınladıkları bir önceki raporlarında (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007) da petal eksplantlarının büyüme düzenleyici içeren

besin ortamı ile düzenli olarak altkültüre alındıklarında, besin ortamının tazelenmesi ve endojen hormon seviyesinin artmaya devam etmesi sonucu doğrudan soğancık rejenerasyon yolağının baskılandığını, kallus ve doğrudan olmayan rejenerasyon yolağının harekete geçtiğini belirtmişlerdir.

Kültür ortamında farklı oksin (IAA ve NAA) ve sitokinin (BAP ve TDZ) miktarlarının kullanılması ile dolaylı soğancık rejenerasyonunun gerçekleştirildiği bir başka çalışmada ise eksplant kaynağı olarak yine nektar salgılanmaya başlamamış haldeki petaller, yaprak taslakları ve soğan pulları kullanılmıştır. Karanlıkta muhafaza edilen 6 haftalık kültürlerde en fazla kallus miktarı (2.1 g) 1 mg/L NAA içeren MS ortamındaki pul eksplantlarından elde edilmiştir. 6 hafta sonunda eksplantlar, kallustan dolaylı organ rejenerasyonunu başarmak amacı ile farklı konsantrasyonlarda TDZ, NAA ve IAA içeren 7 farklı MS besin ortamına aktararak aydınlık koşullarda muhafaza edilmişlerdir. 12 hafta sonunda tüm ortamlarda soğancık rejenerasyonu gözlenmiş, ancak soğan pulu ve yaprak taslaklarından köken alan kallusların rejenerasyon oranının petal eksplantlardan köken alan kalluslardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak TDZ ile birlikte düşük konsantrasyonda oksin içeren MS besin ortamında, yalnızca TDZ içeren MS besin ortamına göre daha yüksek rejenerasyon oranı kaydedilmiştir (Rahimi et al., 2013).

Dilik (2006), *F. persica* ve *F. imperialis* türlerinin gövde eksplantlarını kullanarak, soğancık ve kallus oluşumunu 1.0 mg/L BA ile birlikte 0.5 mg/L KNA veya NAA içeren MS besin ortamlarında gerçekleştirmiştir. KNA uygulaması, soğancık oluşumu bakımından *F. imperialis* türünde *F. persica* türüne göre daha başarılı bulgular elde edilmiştir. Ancak yine de, NAA içeren ortamlarda KNA içeren ortamlara göre daha başarılı sonuçlar belirlenmiştir. Yapılan şeker denemelerinde, glukoz ve fruktozun, sükroza kıyasla daha etkili olduğu ifade edilmiştir.

F. imperialis ve *F. persica* türlerinin olgunlaşmamış embriyolarının başlangıç eksplantı olarak kullanıldığı en güncel çalışmada, *F. imperialis* türünde kallus ve sürgün oluşturan eksplant oranı çok düşük bulunmuş,

soğancık oluşturan eksplant oranı 7.22 ile 0.5 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA içeren besin ortamında elde edilmiştir (Gürlek, 2011). Aynı çalışmada; yaprak, yaprak sapı ve çiçek eksplantları sterilizasyondan sonra tamamen kararmış, soğan pul eksplantlarının ise üç farklı sterilizasyon yöntemi dahilinde; fungusit ön uygulaması, %70 etanolde bekletme, %50 hidrojen peroksit, %50 ticari çamaşır suyu, %100 ticari çamaşır suyu muamelerine rağmen tamamına yakını kontamine olmuştur.

İnce Hücre Tabaka (TCL) tekniği, homojen bir dokunun sınırlı sayıda hücresinden köken alan küçük boyutta eksplantlara dayanan basit, ancak etkili bir sistemdir. Dolayısıyla, bu sistemde hücreler, hızlı difüzyona olanak sağlayan yakın temas mesafeleri ve içsel faktörlerin etkileşiminin indirgenmiş olması nedeniyle kültür ortamı bileşenlerine daha çok duyarlıdır. Diğer bir ifade ile tamamen kültür ortamı ile doğrudan ilişkili sistemlerdir (Silva et al., 2003).

TCL tekniği, bitkilerin farklı organlarının boylamasına (longitudinally, ITCL) veya enlemesine (transversely, tTCL) küçük boyutlu eksplantlar halinde kesilmesiyle ele alınmaktadır (Shivani et al., 2010). Bu teknik, bitkilerin çiçek sapı, damar, yaprak ve petiol gibi floral kısımlarından, kök, rizom ve soğan pulları gibi toprak altı kısımlarına kadar oldukça farklı organlarından boylamasına veya enlemesine küçük boyutlu eksplantların kesilmesiyle uygulanmaktadır. İnce hücre tabaka tekniğinde hücre sayısının az miktarda olması, hücrenin gelişimsel veya morfogenetik programları için oldukça önemlidir (Rout et al., 2006). Kültür koşullarının yönetilmesi ile sadece birkaç hücre tabakasını içeren çok küçük eksplantlardan istenen morfogenetik yanıtlar elde edilebilmektedir. Bu durum ise, İnce Hücre Tabaka tekniğini ekonomik değeri yüksek olan pek çok bitki türünün kitlesel çoğaltımı için etkin kılacaktır (Shivani et al., 2010). Süs bitkisi biyoteknolojisinde ve mikroçoğaltımında bu tekniğin kullanılması, transformasyon aracılığıyla genetik ıslah çalışmalarını ve bitki rejenerasyonunda somatik embriyogenez ve organogenez konularını öne çıkarmaktadır (Rout et al., 2006).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışma kapsamında kullanılan çeşitli büyüklükteki soğanlar, Adıyaman-Gerger’de ters lale üretimi yapan Abdülselem Acar tarafından temin edilmiştir. Bu soğanların bir kısmı *in vitro* kültür için eksplant olarak kullanılırken (Şekil 3.1), bir kısmı da toprağa dikilerek oluşan çiçekli bitkilerden denemeler için gerekli çeşitli eksplantlar (yeşil yapraklar, gövde/çiçek sapı ve petaller) sağlanmıştır (Şekil 3.2). Soğanlardan depolama sürecinde gelişen kökler de *in vitro* doku kültürü için başlangıç materyali olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Dikime alınan soğanlar.



Şekil 3.2. *F. imperialis* soğanlarından gelişen çiçekli bitkiler.

3.2. Metod

3.2.1. Soğanların toprağa dikimi

Soğanların dikimi için 20x15 cm ve 20x20 cm boyutlarında 5-6 L hacimli plastik saksılar kullanılmıştır. Bir ölçü bahçe toprağı ile bir ölçü ince kum karıştırılarak harç hazırlanmıştır. Soğanların nemli kalmaması gerektiğı için torf kullanılmamıştır. Ayrıca saksılar yerden yüksek köpük ızgaralar üzerine yerleştirilerek drenajın etkinliğı arttırılmıştır.

Ortalama 5-6 cm çapındaki soğanların her biri ayrı bir saksıya üzeri yaklaşık olarak 1 cm harçla örtülecek şekilde dikilmiş ve bu aşamada verilen cansuyundan başka sulama yapılmamıştır. Saksılar, Kasım 2013- Mart 2014 arasında Bornova'da arazi koşullarında bırakılmışlardır.

3.2.2. *In vitro* koşullarda sterilizasyon çalışmaları

3.2.2.1. Yeşil yaprak eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları

Gümüş nanopartikül kullanımı: Ters lale bitkilerinin alt ve üst kısımlarındaki yeşil yaprakların yüzey sterilizasyonları için *Gentiana cruciata* ekstraktı ve *Rubia tinctorum* özütü aracılığıyla gerçekleşen yeşil sentez sonucu elde edilmiş Ag nanopartikül çözeltileri ve %50 konsantrasyonda hazırlanmış sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltileri ile sterilizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yeşil yapraklar Tween 20 damlatılmış deterjanlı suda yaklaşık olarak bir dakika boyunca çalkalandıktan sonra akan suyun altında durulanarak ön yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Ön yıkama işleminin sonrasında laminar akışlı steril kabinde önce %70'lik etil alkol çözeltisinde bir dakika bekletilmişler ve ardından G ve R sterilantlarında 15 dakika ve 30 dakika sürelerinde bekletilerek, durulanmadan kültüre alınmışlardır. G ve R sterilantlarının hazırlanma prosedürleri aşağıda verilmiştir:

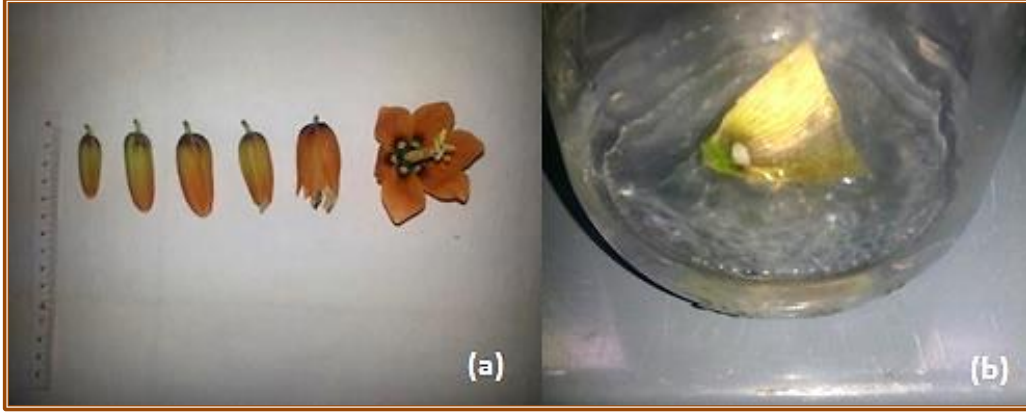
- G sterilantı için, *in vitro* koşullardaki *G. cruciata* bitkisinin taze yapraklarının suda kaynatılması ile elde edilen *G. cruciata* ekstraktı AgNO_3 çözeltisi ile karıştırılarak bir gece bekletilmiştir.

•R sterilantı için ise, *R. tinctorum* bitkisinin *in vitro* koşullardaki süspanse hücre kültüründen ayrıştırılan hücrelerin mekanik olarak parçalanması ile elde edilen ekstrakt yine AgNO_3 çözeltisi ile karıştırılarak bir gece bekletilmiştir.

NaOCl Kullanımı: NaOCl (ticari çamaşır suyu - Domestos %4 etken madde) ile yapılan sterilizasyon denemeleri sırasında ise ön yıkama prosedürü aynı şekilde izlenmiş ve eksplantlar 4 dakika ile 6 dakika sürelerinde %50 NaOCl çözeltisi ile muamele edildikten sonra üç kez steril su ile durulanmışlardır. Yaklaşık 7-10 cm boylarında ve 1.5-2 cm genişliğinde olan bu yapraklar daha sonra, aseptik koşullar altında ortalama birer santimetrelilik kareler halinde kesilerek Çizelge 3.2’de belirtilen altı farklı besin ortamında (FS5, FS6, FS7, FS8, FS9 ve FS10) kültüre alınmışlardır. Bu ortamlardan ilk dördünde 12 hafta sonra gelişen kallusların bir kısmı altkültürlenerek, bir kısmı ise altkültüre alınmayarak 36 hafta süresince inkübe edilmişlerdir.

3.2.2.2. Petal yaprak eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları

F. imperialis bitkilerinin çiçekleri nektar salgılanmasından önceki dönemlerinde toplanmış, bir dakika boyunca Tween 20 damlatılmış deterjanlı suda yıkanarak deterjan kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Sterilizasyon için petaller kesilmeden önce %50 konsantrasyonda NaOCl ile 4 dakika ve 6 dakika muamele edilerek, üç kez steril suda durulanmışlardır. Yaklaşık 4 cm boyunda ve 1.5 cm genişliğinde olan bu petal yapraklar (Şekil 3.3-a ve 3.3-b) daha sonra, aseptik koşullar altında 1.5x2 cm boyutlarında kesilerek petal uç kısımları ve petal dip kısımları (nektar salgının gerçekleştirildiği bölge) olmak üzere kültüre alınmışlardır.



Şekil 3.3. Petal yaprak eksplantları, (a) Petal yaprak boyları, (b) 1.5x2 cm boyutlarında kültüre alınmış petal dip eksplantı.

3.2.2.3. Soğan eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları

F. imperialis soğanlarına ait pul parçalarına dört farklı sterilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Birinci yöntemde, soğanlar bütün halde %0.06'lık (0.06g/100ml) Benolex (etken madde %50 benomil) fungusit çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiş ve ardından akan suyun altında 10 dakika durulanarak fungusit kalıntılarından uzaklaştırılmıştır. Daha sonra soğanlar dikey olarak 8-10 dilime ayrılmıştır. Bu aşamanın ardından soğan dilimleri laminar akışlı steril kabin içerisinde önce %70'lik etanolde bir dakika, sonrasında da %0.1'lik $HgCl_2$ 'de 3, 5 ve 7 dakika çalkalanmışlardır.

İkinci yöntemde ise görülen gereklilik üzerine bir önceki sterilizasyon yöntemindeki %0.1'lik $HgCl_2$ muamele süresi 10-20-30 dakika olarak uzatılmıştır.

Üçüncü yöntemde ise kullanılan fungusit konsantrasyonu 10 kat arttırılarak %0.6'lık Benolex'de bütün halindeki soğanlar 5 saat süreyle bekletilmişlerdir. Fungusitte bekletmenin ardından dilimlenen soğanlar, diğer uygulamalarda da olduğu gibi steril kabin içerisinde önce %70'lik etanolde, sonra %0.1'lik $HgCl_2$ çözeltisinde 3, 4 ve 5 dakika sürelerde sterilizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır.

Dördüncü yöntemde söz konusu fungusit konsantrasyonu daha artırılarak başlangıcın yirmi katına, yani %1.2 ye çıkarılmıştır. %1.2'lik Benolex içerisinde yarım saat bekletilerek dilimlenen soğanlar, kabinde %70'lik etanolde bir dakika bekletilmenin ardından %0.1'lik HgCl_2 'de 5 dakika süreyle çalkalanmışlardır.

Steril edilen soğan dilimleri steril pens ve bisturi yardımı ile 2-3 mm kalınlığında dikey olarak kesitlere ayrılmış ve farklı dozlarda BAP ve NAA ile modifiye edilmiş 60 g/l sükroz içeren, FS1, FS2, FS3 ve FS4 kodlu (Çizelge 3.1) MS besin ortamlarında kültüre alınmışlardır.

3.2.2.4. Gövde eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları

F. imperialis sürgünlerinden yeşil yaprakların uzaklaştırılması ile elde edilen gövde kısımları 1 dakika süresince deterjanlı suda yıkanarak 15 dakika boyunca akan suyun altında durulanmış, böylelikle ön yıkama işlemleri tamamlanmıştır. Ön yıkamanın ardından steril kabin içerisinde %0.1'lik HgCl_2 çözeltisi ile 6 dakika çalkalanmışlar ve üç kez steril su ile durulanmışlardır. Durulanan gövde kısımlarından steril pens ve bisturi yardımıyla 1 mm kalınlığında yatay gövde kesitleri (TCL-İnce Hücre Tabaka) alınarak besin ortamlarına aktarılmışlardır.

3.2.2.5. Kök eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları

F. imperialis soğanlarının denemelerde kullanılmasına kadar geçen muhafaza süreci içerisinde soğanların üzerinde kendiliğinden gelişen kökler kesilerek, %50 konsantrasyonda NaOCl ile 4 dakika muamele edilmiş ve üç kez steril suda durulanmışlardır. Daha sonra farklı dozlarda NAA ve 2,4-D oksinlerinin eklendiği MS besin ortamlarında (K1, K2, K3 ve K4 kodlu ortamlar) (Çizelge 3.3) yaklaşık 1 cm uzunluğunda parçalar halinde kültüre alınmışlardır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *F. imperialis* soğanlarının muhafaza süreci içerisinde, soğanların üzerinde kendiliğinden gelişen köklerden alınan 1 cm uzunluğunda eksplantlar

3.2.3. Eksplantların kültüre alındığı besin ortamları

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında kullanılan besin ortamları Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3’de gösterilmektedir. MS ve B5 (Gamborg et al., 1968) temel besin ortamları 60 g/l sükroz içerecek şekilde hazırlanarak, pH değeri düşük ise NaOH, yüksek ise HCl kullanılarak 5.8’e ayarlanmışlardır. pH değerleri ayarlandıktan sonra 3 g/l Gelrite® (Duchefa) ile katılaştırılan besin ortamlarının 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Soğan pul eksplantları için kullanılan besin ortamları ve içerikleri Çizelge 3.1’de, yeşil yapraklar için kullanılan besin ortamları ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Gövde kısımları ile yapılan TCL çalışmaları için FS1, FS2, FS3, FS4, FS5, FS6, FS7 ve FS8 kodlu besin ortamları, petal yapraklar için ise FS1, FS2, FS5, FS6, FS7 ve FS8 kodlu ortamlar kullanılmışlardır (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2). Ayrıca kök eksplantları Çizelge 3.3’de gösterilen K1, K2, K3 ve K4 kodlu besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Denemelerde tekerrür başına 6-9 eksplant kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Soğan pul eksplantları için kullanılan besin ortamları

KOD	Besin Ortamı	Sükroz Miktarı (g/l)	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)
FS1	MS	60	2.0	0.25
FS2	MS	60	1.0	0.5
FS3	MS	60	-	1.0
FS4	MS	60	-	2.0

Çizelge 3.2. Yeşil yaprak eksplantları için kullanılan besin ortamları

KOD	Besin Ortamı	Sükroz Miktarı (g/l)	BAP (mg/l)	Kin (mg/l)	TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)
FS5	MS	60	1.0	-	-	0.5	0.4
FS6	MS	60	0.1	-	-	0.5	0.4
FS7	B5	60	1.0	-	-	0.5	0.4
FS8	B5	60	0.1	-	-	0.5	0.4
FS9	MS	60	-	1.0	-	0.5	0.4
FS10	MS	60	-	-	1.0	0.5	0.4

Çizelge 3.3. Kök eksplantları için kullanılan besin ortamları

KOD	Besin Ortamı	Sükroz Miktarı (g/l)	NAA (mg/l)	2,4-D (mg/l)
K1	MS	30	1.0	1.0
K2	MS	30	1.0	2.0
K3	MS	30	2.0	1.0
K4	MS	30	2.0	2.0

3.2.4. Kültür koşulları

Denemeler, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta (3.500 lux altında) ve 24°C $\pm$ 1 sıcaklıkta inkübasyona bırakılmışlardır. Gövde eksplantları ile kurulan TCL denemeleri ve kök denemeleri ayrıca karanlık koşullarda da bırakılmışlardır.

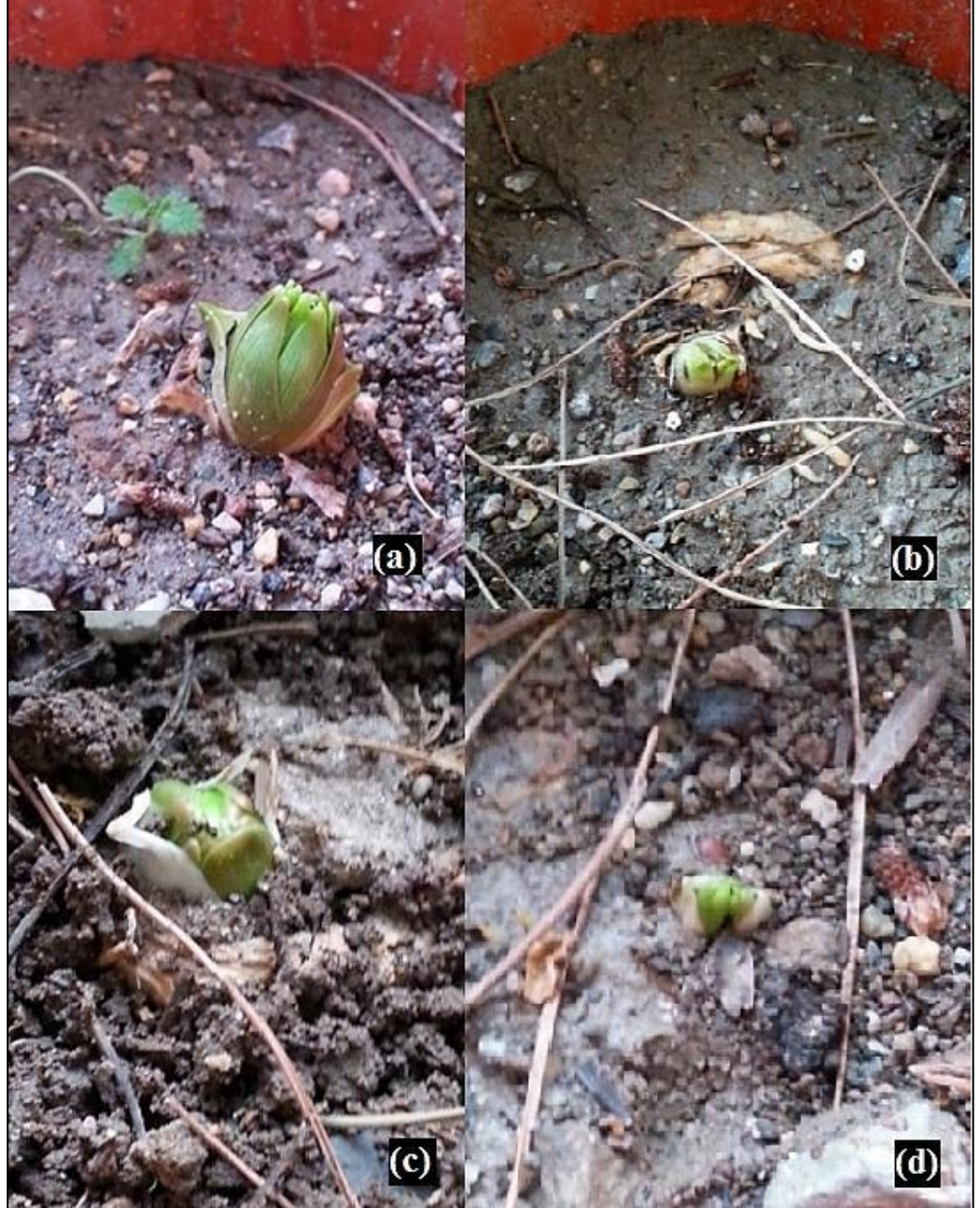
3.2.5. İstatistiksel değerlendirme

Üç tekerrürlü olarak kurulan denemelere ait sonuçlar, tek faktörlü (besin ortamı) ve iki faktörlü (kültür koşulu*besin ortamı) tesadüf parselleri deneme desenine göre TARİST (Açıkgöz vd., 2004) istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Toprağa Dikilen Soğanların Gelişimleri

5-6 cm çapındaki 6 adet *F. imperialis* soğanı saksılara dikildiklerinden itibaren 12 haftanın sonunda, soğanların 4'ünde ilk filizlenmeler kaydedilmiştir (Şekil 4.1 a-d).



Şekil 4.1. Soğanların dikiminden 12 hafta sonra elde edilen *F. imperialis* sürgünlerinin görünümleri, a) birinci sürgün, b) ikinci sürgün, c) üçüncü sürgün, d) dördüncü sürgün.

Dikimden 15 hafta sonra yapılan 2. gözlemde ilk filizlenen soğanda çiçeklenmenin başladığı kaydedilmiştir (Şekil 4.2, sağ ön).



Şekil 4.2. Dikimden 15 hafta sonra *F. imperialis*'de sürgün durumu ve çiçeklenme.

Soğanların dikiminden 18 hafta sonra ise 6 adet soğandan 4'ünde turuncu renkli çiçekler elde edilmiştir (Şekil 4.3 a-f).



Şekil 4.3. 18 haftanın sonunda büyümekte olan ters laleler, a-d) çiçeklenmiş bitkiler, e-f) gelişimin olmadığı soğanlar.

4.2. Sterilizasyon Çalışmaları ve Kararma

4.2.1. Yeşil yaprak eksplantları ile kurulan sterilizasyon çalışmaları ve kararma durumları

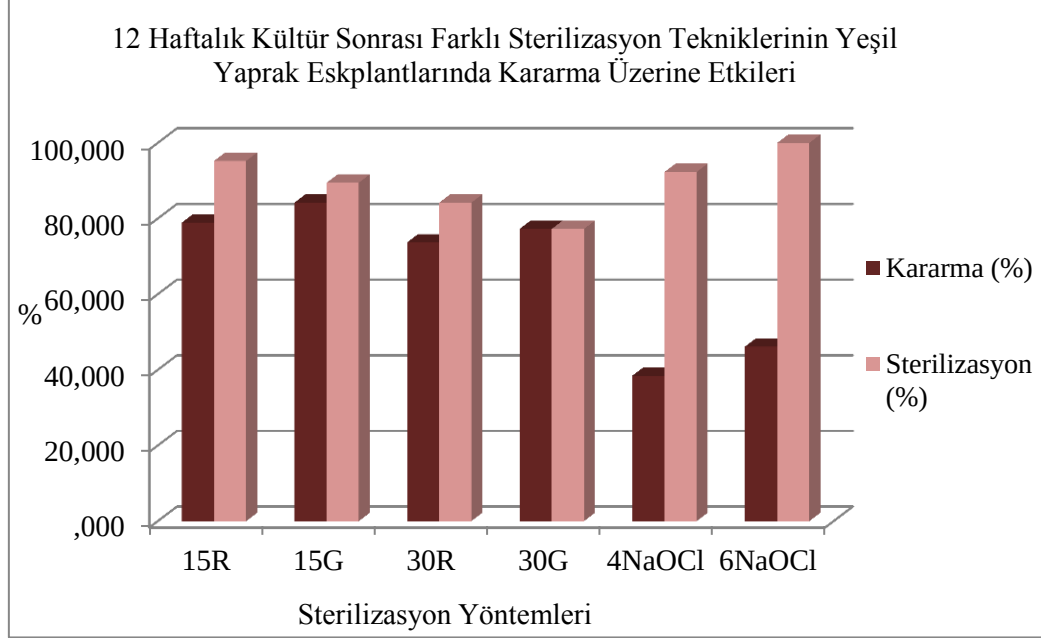
6 farklı sterilizasyon yönteminin uygulandığı, 12 hafta süreyle *in vitro*'da kültüre alınan yeşil yaprak eksplantlarında en başarılı sterilizasyon sonucu (%100), %50'lik NaOCl ile 6 dakika süreyle çalkalanan eksplantlarda elde edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4). En düşük kararma oranına (%38.46) ise 4 dakika süreli %50 NaOCl uygulaması ile ulaşılmış, ayrıca bunu takip eden ikinci en düşük kararma oranı (%46.15) da yine NaOCl'nin kullanıldığı yöntemle ortaya çıkmıştır. Sterilizasyon yöntemleri için yapılan istatistiki değerlendirmede anlamlı bir fark yakalanmamıştır.

Çizelge 4.1. Sterilizasyon yöntemlerinin sterilizasyon başarı durumları (%) ve kararma yüzdeleri (%)

Sterilizasyon Yöntemi	Sterilizasyon (%)	Kararma (%)
15R	95.24	78.95
15G	89.47	84.21
30R	84.20	73.68
30G	77.27	77.27
4NaOCl	92.31	38.46
6NaOCl	100.00	46.15

En yüksek kontaminasyon oranı, 30 dakika süreyle gerçekleştirilen G sterilantı muamele işleminde bulunmuştur. Gümüş nanopartikül çözeltilerinde, 30 dakika süren sterilizasyon işlemlerinin 15 dakika süren sterilizasyon işlemlerine kıyasla beklenenin aksine daha düşük sterilizasyon oranına sahip olmaları, bu süreçte nanopartiküllerin bozunmaya uğradıkları ve etkinliklerini kaybettikleri olasılığını düşündürmektedir.

NaOCl ile gerçekleştirilen sterilizasyon işlemlerinde ise beklenildiği gibi sterilant ile muamele süresi arttırıldığında kontaminasyon oranı düşmüş, ancak bununla birlikte kararma oranı artmıştır.

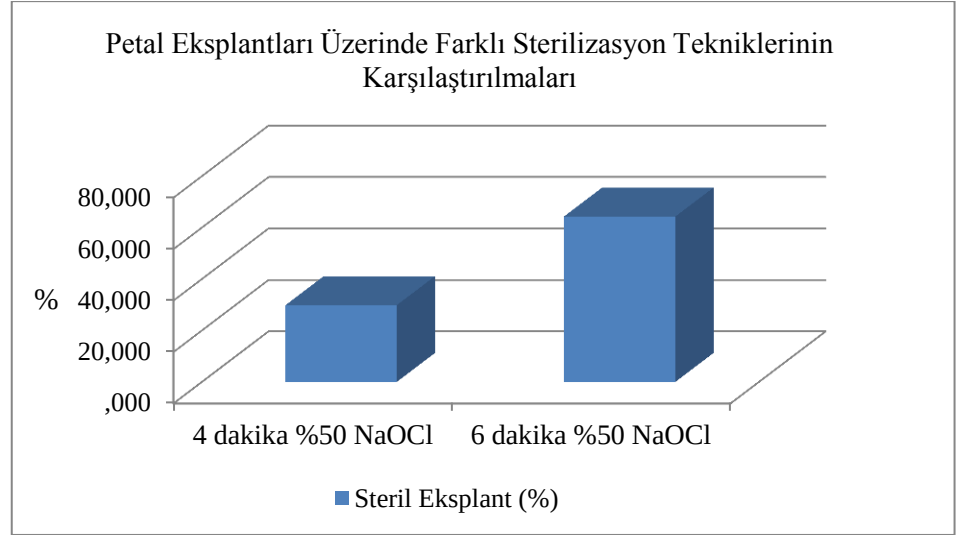


Şekil 4.4. Yeşil yaprak eksplantlarına uygulanan sterilizasyon yöntemlerine ait 12 haftalık kültür sonrasında sterilizasyon yüzdeleri.

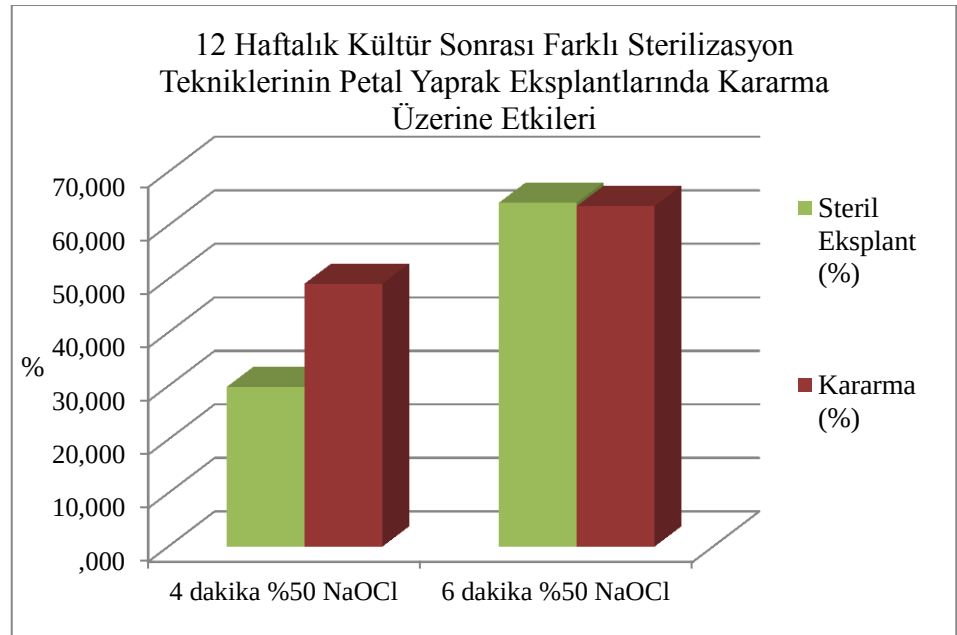
4.2.2. Petal yaprak eksplantları ile kurulan sterilizasyon çalışmaları ve kararma durumları

4 dakika boyunca %50'lik NaOCl ile sterilizasyon işlemi: Bu işlem, toplam 57 adet petal eksplantına uygulandıktan sonra 8 farklı besin ortamında kültüre alınmışlardır. 57 adet eksplantın 40 tanesi kontamine olmuş, sterilizasyon yüzdesi ise %29.82 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).

6 dakika boyunca %50'lik NaOCl ile sterilizasyon işlemi: 14 adet eksplanta uygulanmış ve bunlardan 5 tanesinin kontamine olmasıyla, sterilizasyon yüzdesi %64.29 (9/14) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5). NaOCl ile muamele süresinin uzaması sterilizasyon başarısında artışla sonuçlanmıştır. Sürenin uzaması ile kararma oranı da artma göstermiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Petal eksplantları üzerinde farklı sterilizasyon tekniklerinin karşılaştırılması.

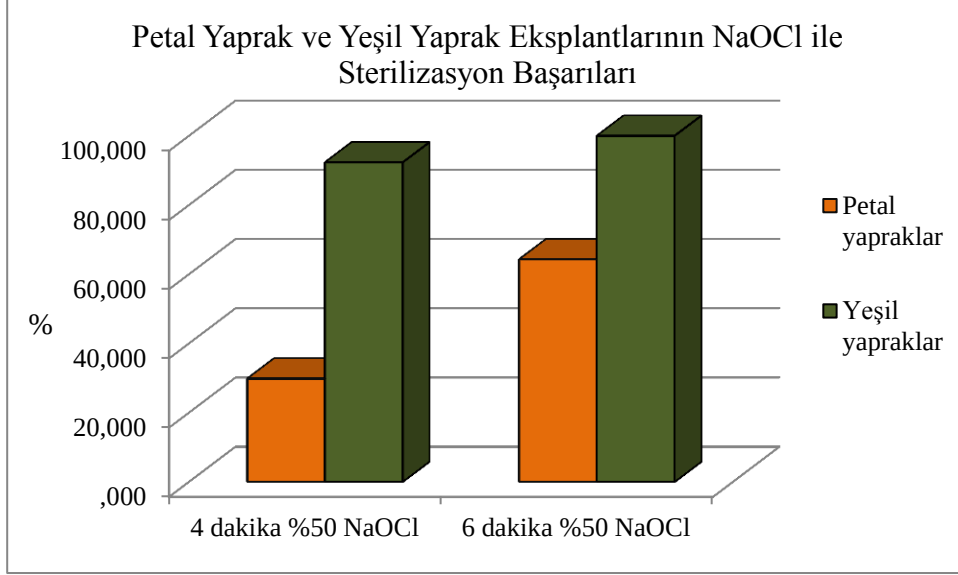


Şekil 4.6. Petal yapraklarında sterilizasyon yöntemlerine göre sterilizasyon başarısı ve kararma oranları.

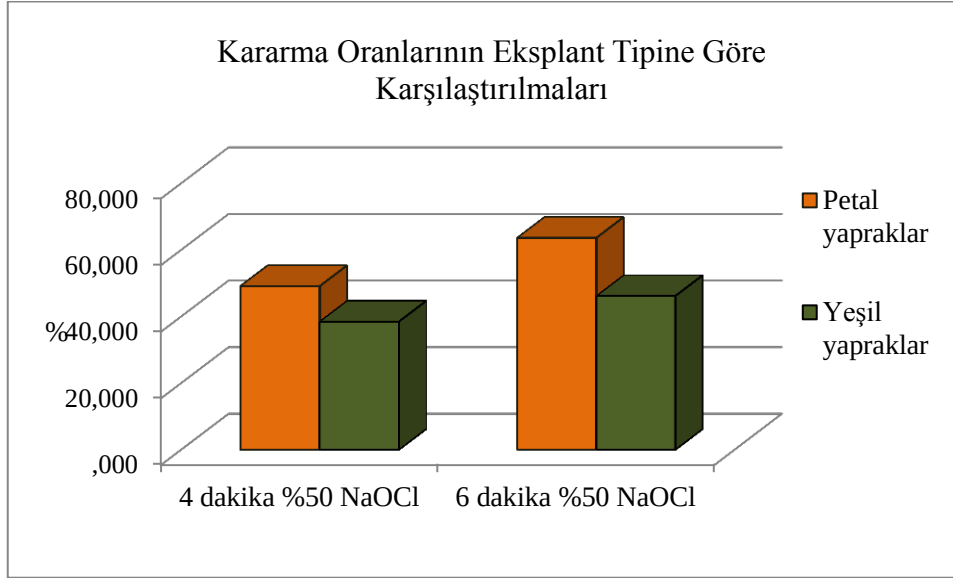
4.2.3. Petal yaprak ve yeşil yaprak eksplantlarının NaOCl ile sterilizasyon başarıları

NaOCl'ye dayalı aynı sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı petal yaprak ve yeşil yaprak eksplantları arasında sterilizasyon başarıları ve kararma

oranları farklılık göstermiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Yeşil yaprak eksplantlarında sterilizasyon başarıları daha yüksek bulunurken (%100), petal yapraklarında ise kararma oranı daha yüksek (%64.29) tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Petal yaprak ve yeşil yaprak eksplantlarının NaOCl ile sterilizasyon başarıları.



Şekil 4.8. Kararma oranlarının eksplant tipine göre karşılaştırılmaları.

4.2.4. Soğan eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları ve kararlar durumları

Denemeye alınan soğan parçalarıyla yapılan çalışmaların çok büyük çoğunluğunda etkili bir sterilizasyon yöntemi tespit edilememiştir. Eksplantların tamamına yakını kontamine olmuş ve kararmıştır.

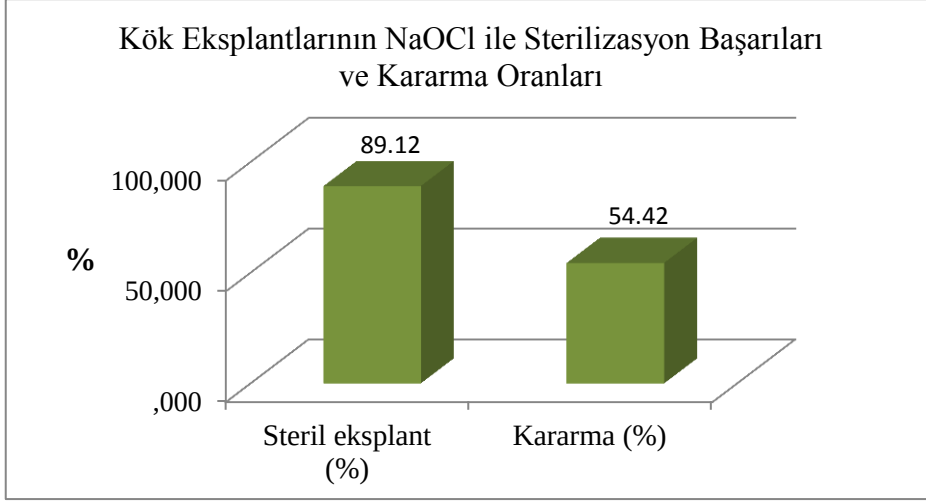
4.2.5. Gövde eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları ve kararlar durumları

F. imperialis bitkisinin yapraksız gövde kısımlarından alınan 1 mm kalınlığındaki eksplantlar (TCL), 6 dakika süreyle %0.1 konsantrasyonda HgCl₂ ile muamele edildiklerinde %100 sterilizasyon başarısı sağlanmış, ancak bu eksplantların hiçbirisinde bir gelişme gözlenememiştir.

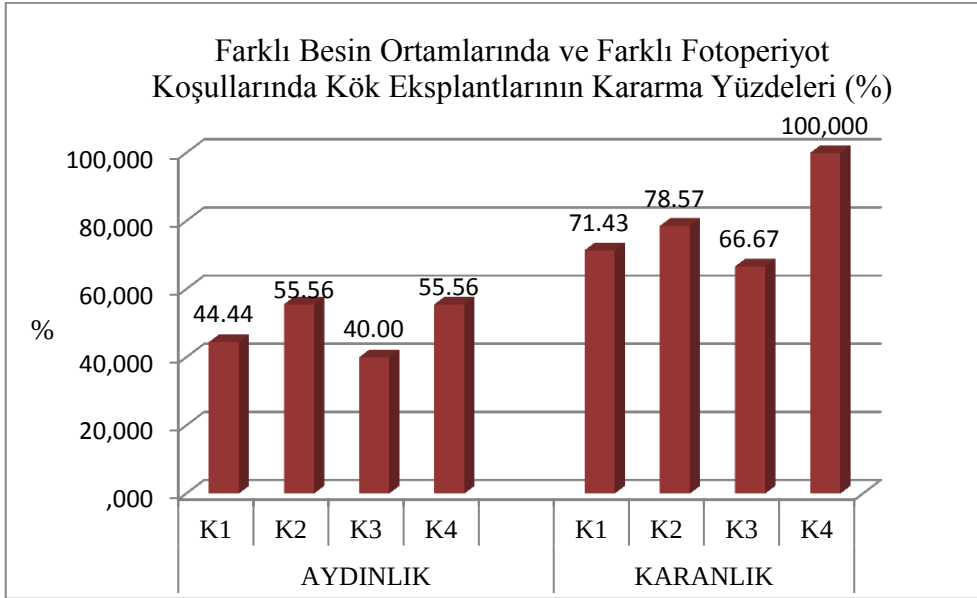
4.2.6. Kök eksplantlarında sterilizasyon çalışmaları ve kararlar durumları

F. imperialis soğanlarının depoda muhafaza sürecinde kendiliğinden geliştirdikleri köklerin başlangıç eksplantı olarak kullanıldığı denemelerde, %50 konsantrasyonda NaOCl ile 4 dakika boyunca muamele edilerek kültüre alınan 144 adet kök eksplantından sadece 16 tanesi kontamine olmuştur. Dolayısıyla %89.12 oranında bir sterilizasyon başarısı elde edildiğinden (Şekil 4.9) başka sterilizasyon yöntemlerinin denenmesine gerek görülmemiştir.

Kültüre alınan eksplantların büyük çoğunluğunda kararlar (%54.42) gözlenmişse de (Şekil 4.9) kararlar eksplantlar üzerinde kallus rejenerasyonları meydana gelmiştir. Şekil 4.10 incelendiğinde karanlık koşullarda kültüre alınan kök eksplantlarının (%100-%66.67), aydınlık koşullarda kültüre alınanlara göre daha yüksek oranda karardıkları görülmektedir. Aydınlık koşullarda ise en düşük kararlar yüzdesi kök eksplantlarında %40.00 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Kök eksplantlarının NaOCl ile sterilizasyon başarıları ve kararma oranları.



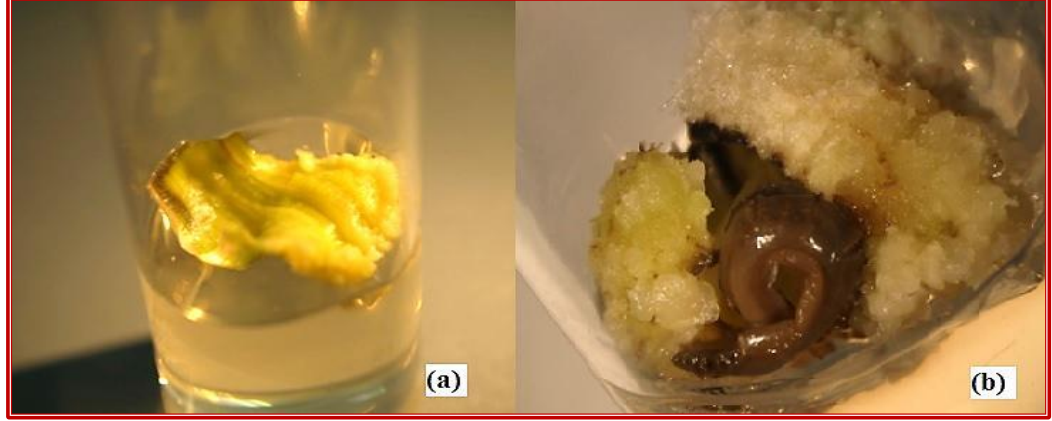
Şekil 4.10. Farklı besin ortamlarında ve fotoperiyot koşullarında kök eksplantlarının kararma durumları.

4.3. Rejenerasyon Bulguları

4.3.1. Yeşil yaprak eksplantları ile yapılan çalışmaların 12 haftalık kültür periyodu sonundaki rejenerasyon sonuçları

Kültüre alınan 1'er cm²'lik yeşil yaprak eksplantlarında yaklaşık 4 hafta sonra şişme ve kallus başlangıçları gözlenmiştir (Şekil 4.11a). Kültürün 12. haftasında ise 0.1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA içeren MS besin

ortamında (FS6) %40.00 oranında embriyogenik kallus oluşumunun yanı sıra embriyogenik olmayan kallus oluşumları (%60.00) da gerçekleşmiştir (Şekil 4.11b ve Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Kùltüre alınmış yeşil yaprak eksplantları, a) Kùltürün henüz başlangıcında şişme halindeki eksplant, b) 12 haftalık kùltür periyodu sonunda embriyogenik olmayan kallus oluşumları.



Şekil 4.12. 12 haftalık kùltür periyodu sonunda yeşil yapraklardan embriyogenik kallus rejenerasyonları.

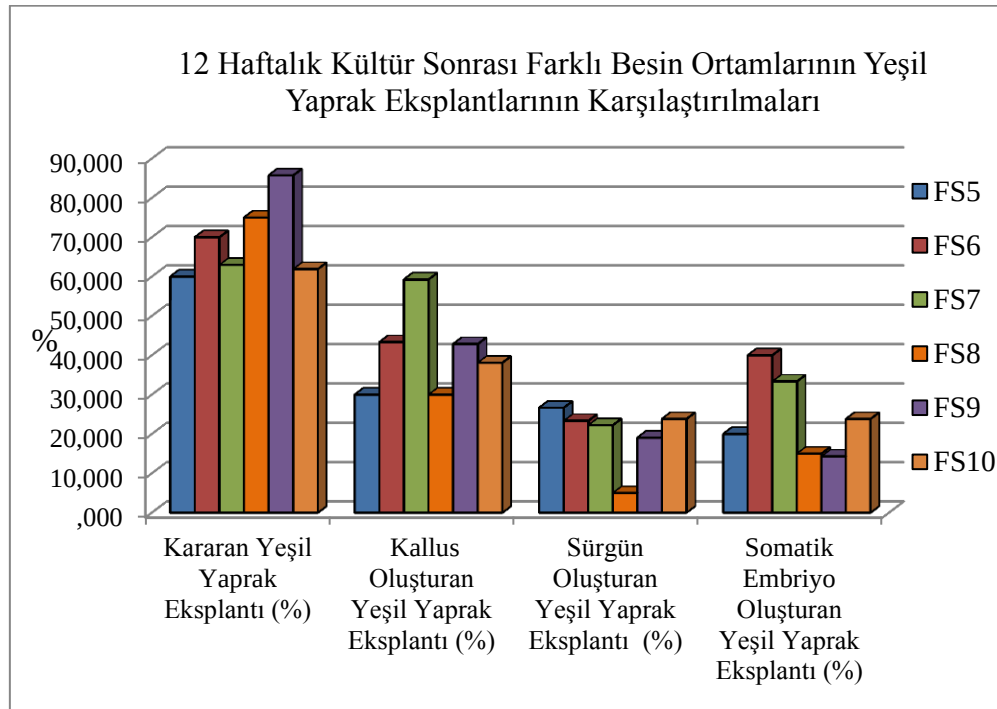
Kararma oranları, besin ortamlarına göre çok belirgin bir farklılık göstermemiştir ve %60.00 ile %85.71 aralığında değişmiştir (Şekil 4.13). En yüksek kallus oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdeleri sırasıyla %59.26, %43.33 ve %42.86 olarak FS7, FS6 ve FS9 ortamlarından elde edilmiştir (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.2). Bu besin ortamlarını, FS10 kodlu TDZ içeren besin ortamı %38.10 ile takip etmiştir. Kallus rejenerasyonunun gerçekleştiği yeşil yaprak eksplant yüzdesine bakıldığında, düşük konsantrasyonda BAP içeren

MS temelli besin ortamı (FS5-%30.00) ile yüksek konsantrasyonda BAP içeren ancak B5 temelli olan FS8 ortamı (%30.00) en başarısız sonucu vermiştir.

En yüksek kallus oluşumunun elde edildiği ortamlar olan FS6 ve FS7 kodlu besin ortamlarında, somatik embriyo oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdeleri; sırasıyla %40.00 ve %33.33 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Sürgün oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzde değerleri, kullanılan besin ortamlarında %5.00 ile %26.67 aralığında değişim gösterirken, bu değerler sırasıyla FS8 ve FS5 ortamlarında elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca denemelerde, yeşil yaprak eksplantlarında sürgün oluşturan kallus yüzdesi en yüksek FS5 besin ortamında %88.89 ve FS10 ortamında ise %62.50 olarak belirlenirken, en yüksek embriyogenik kallus oranları FS6'da %92.31 ve FS5'te %66.67 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Yeşil yaprak eksplantları ile yapılan denemelerden elde edilen verilerin, 3 tekerrürlü tesadüf parselleri deneme desenine göre değerlendirilmeleri ile gerçekleştirilen varyans analizi sonucunda, besin ortamı etkileşimlerinin LSD sınıflandırmasına göre anlamlı bulunmamıştır.



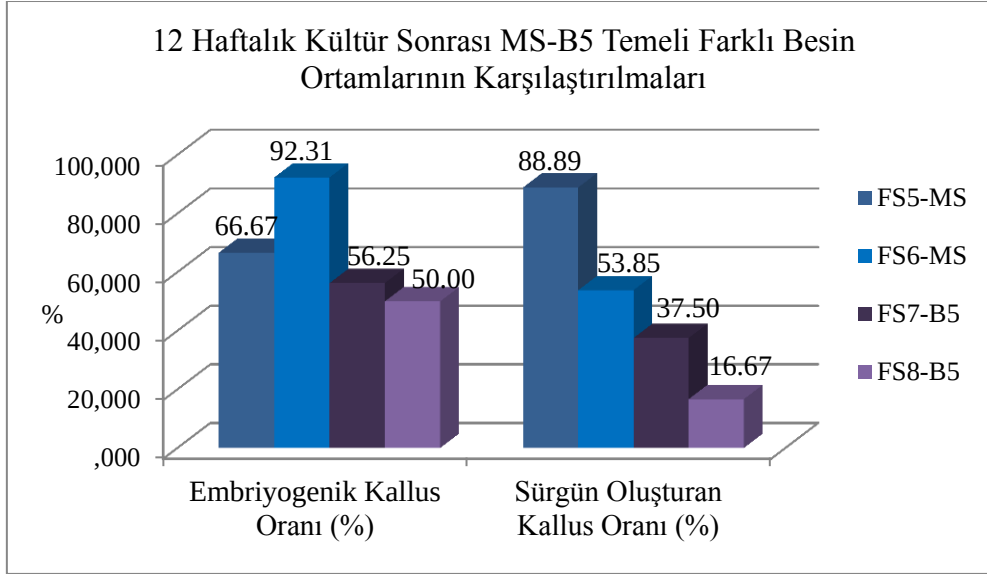
Şekil 4.13. 12 haftalık Kültür Sonrası Farklı Besin Ortamlarının Karşılaştırılması.

Çizelge 4.2. 12 haftalık kültür sonrası farklı besin ortamlarında meydana gelen kararan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%), kallus oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%), somatik embriyo oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%), sürgün oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%), yeşil yaprak eksplantlarından sürgün oluşturan kallus yüzdesi (%) ve embriyogenik kallus oranı (%)

Besin Ortamları	Kararan Yeşil Yaprak Eksplant Yüzdesi (%)	Kallus Oluşturan Yeşil Yaprak Eksplant Yüzdesi (%)	Somatik Embriyo Oluşturan Yeşil Yaprak Eksplant Yüzdesi (%)	Sürgün Oluşturan Yeşil Yaprak Eksplant Yüzdesi (%)	Yeşil Yaprak Eksplantlarından Sürgün Oluşturan Kallus Yüzdesi (%)	Embriyogenik-Kallus Oranı (%)
FS5	60.00	30.00	20.00	26.67	88.89	66.67
FS6	70.00	43.33	40.00	23.33	53.85	92.31
FS7	62.96	59.26	33.33	22.22	37.50	56.25
FS8	75.00	30.00	15.00	5.00	16.67	50.00
FS9	85.71	42.86	14.29	19.05	44.44	33.33
FS10	61.90	38.10	23.81	23.81	62.50	62.5

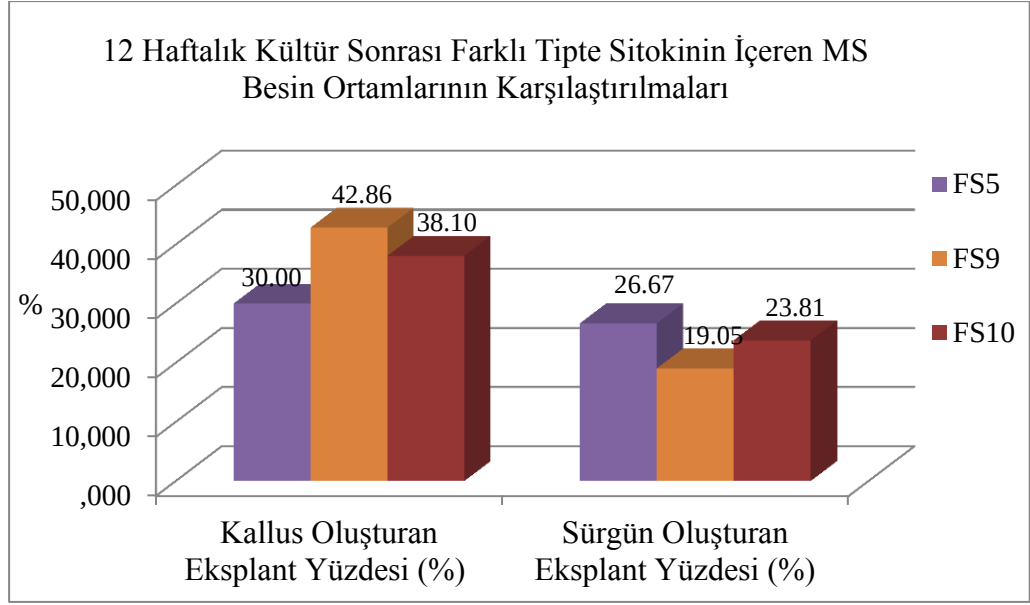
Yeşil yaprak eksplantlarının kültüre alındıkları besin ortamlarının hepsinde, farklı oranlarda kalluslar rejenere olmuşlardır (Şekil 4.13). Bu kalluslar üzerinde de kendiliğinden hem sürgün, hem de somatik embriyo

gelişimleri meydana gelmiştir. MS temelli besin ortamlarında (FS5 ve FS6) oluşan kallusların, B5 temelli besin ortamında (FS7 ve FS8) oluşan kalluslara göre, hem sürgün hem de somatik embriyo rejenerasyonlarına daha elverişli oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Farklı besin ortamlarında gelişen kalluslar arasında embriyogenik kallus oranı (%) ve sürgün oluşturan kallus oranı (%) .

1 mg/l konsantrasyonlarda farklı tipte sitokininler (BAP, Kin ve TDZ) ile birlikte 0.4 mg/l IAA + 0.5 mg/l NAA'nın eklendiği MS temelli besin ortamlarında (sırasıyla FS5, FS9 ve FS10) kültüre alınan yeşil yaprak eksplantlarında kallus, sürgün ve somatik embriyo rejenerasyonları Şekil 4.15'de görülmektedir. Buna göre, farklı sitokinin tipleri karşılaştırıldığında, en yüksek kallus oluşturan eksplant oranları (sırasıyla %42.86 ve %38.10) Kin ve TDZ içeren besin ortamlarında (FS9 ve FS10 kodlu) elde edilirken, sürgün oluşturan eksplant oranı ise en iyi (%26.67) ile BAP içeren besin ortamında (FS5) ortaya çıkmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Farklı tipte sitokinin (BAP, Kin, TDZ) içeren MS besin ortamlarında kallus oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%) ve sürgün oluşturan yeşil yaprak eksplant yüzdesi (%).

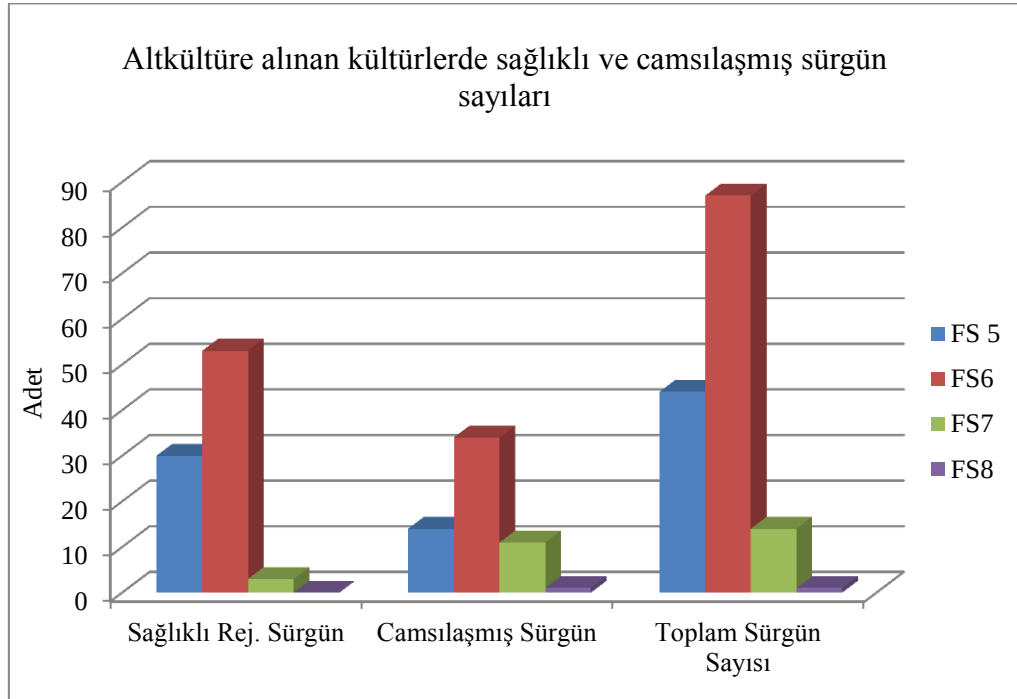
4.3.1.1. 12 hafta sonunda altkültüre alınan kalluslar

Yeşil yaprak eksplantlarının kültüre alınmaları ile 12 hafta sonra FS5, FS6, FS7 ve FS8 kodlu besin ortamlarında rejenere olan embriyogenik kalluslar, kesilerek parçalara ayrılmış ve ilk kültüre alındıkları besin ortamı içeriklerinin olduğu besin ortamlarında altkültüre alınmışlardır. Altkültürden 6 hafta sonra embriyogenik kallusların gelişimleri ve sürgün rejenerasyonu durumları değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.16).

En fazla sürgün sayısı 87 adet ile FS6 besin ortamında saptanmıştır. En düşük sayıda sürgün rejenerasyonu ise Şekil 4.16’da görüldüğü gibi FS8 kodlu besin ortamında 1 adet olarak tespit edilmiştir. İkinci en düşük sürgün rejenerasyonu da FS7 kodlu besin ortamında 14 adet olarak belirlenmiştir. Bu besin ortamlarında kültüre alınan 108 adet eksplanttan toplamda 146 adet sürgün olmak üzere yeşil yaprak eksplantı başına 1.35 adet sürgün rejenere olmuştur. En yüksek sürgün sayısının elde edildiği FS6 kodlu besin ortamında gelişen 87 sürgünden 34 adedinde (%39.08) camsılaşma görülmüştür. En yüksek camsılaşma ise %78.57 ile FS7 besin ortamında rejenere olan sürgünlerde gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. 12. haftada altkültüre alınan embriyogenik kalluslar üzerinde 6 hafta sonra besin ortamlarına göre rejenere olan sürgün sayıları (adet)

Besin Ortamı	Rejenere Olan Sağlıklı Sürgün Sayısı (adet)	Camsılaştırmış Sürgün Sayısı (adet)	Toplam Sürgün Sayısı (adet)
FS5	30	14	44
FS6	53	34	87
FS7	3	11	14
FS8	0	1	1
Toplam	86	60	146



Şekil 4.16. 12. Haftada altkültüre alınan embriyogenik kalluslar üzerinde 6 hafta sonra elde edilen sağlıklı ve camsılaştırmış sürgün sayıları (adet).

4.3.1.2. Altkültüre alınmayıp 36 haftalık kültürünü tamamlayan kalluslar

Yeşil yaprak eksplantlarının *in vitro* kültüre alınmalarından itibaren altkültürleme yapılmadan 36. haftalarını tamamlayan kalluslar üzerinde 3-8 mm arası çaplarda soğancıkların geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). B5 temelli ortamların (FS7- 51 adet ve FS8- 9 adet) soğancık rejenerasyonunda daha başarılı sonuçlar verdikleri Çizelge 4.4’de belirtilen rejenere toplam soğancık sayısından anlaşılabilmektedir. Bu ortamlar arasında ise göreceli olarak yüksek miktarda BAP (1 mg/l) içeren besin ortamında (FS7), düşük miktarda (0.1 mg/l) BAP’lı besin ortamında (FS8) elde edilen soğancık sayısının 5.67 katı kadar daha fazla soğancık rejenerasyonu gerçekleşmiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Bu çalışmada, 5-8 mm çapındaki soğancık oluşumları, 3-4 mm çapındaki soğancıklara göre 36 haftalık kültür sonunda daha fazla sayıda elde edilmiştir.



Şekil 4.17. Altkültüre alınmayan kalluslardan 36 hafta sonra rejenere olan soğancıklar.

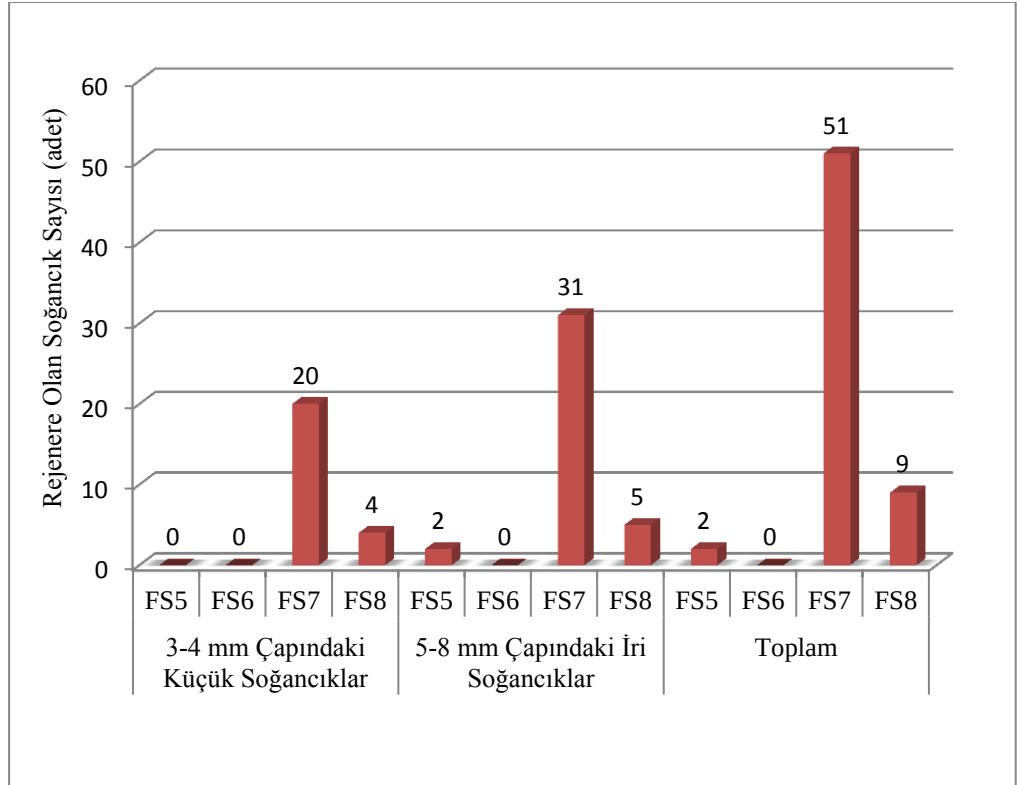
Çizelge 4.4. Altkültüre alınmayan yeşil yaprak kökenli kalluslardan 36 hafta sonra soğancık rejenerasyonu*

Soğancık Büyüklükleri (mm)	Besin Ortamı	Yeşil Yaprak Kökenli Kalluslardan Rejenere Olan Toplam Soğancık Sayısı (adet)	Kültüre Alınan Yaprak Eksplantı Başına Dolaylı Olarak Elde Edilen Soğancık Sayısı (adet)
3-4 mm Çapındaki Küçük Soğancıklar	FS5	0	0.00
	FS6	0	0.00
	FS7	20	0.74
	FS8	4	0.20
5-8 mm Çapındaki İri Soğancıklar	FS5	2	0.07
	FS6	0	0.00
	FS7	31	1.15
	FS8	5	0.25
Toplam	FS5	2	0.07
	FS6	0	0.00
	FS7	51	1.89
	FS8	9	0.45
Toplam		62	2.41

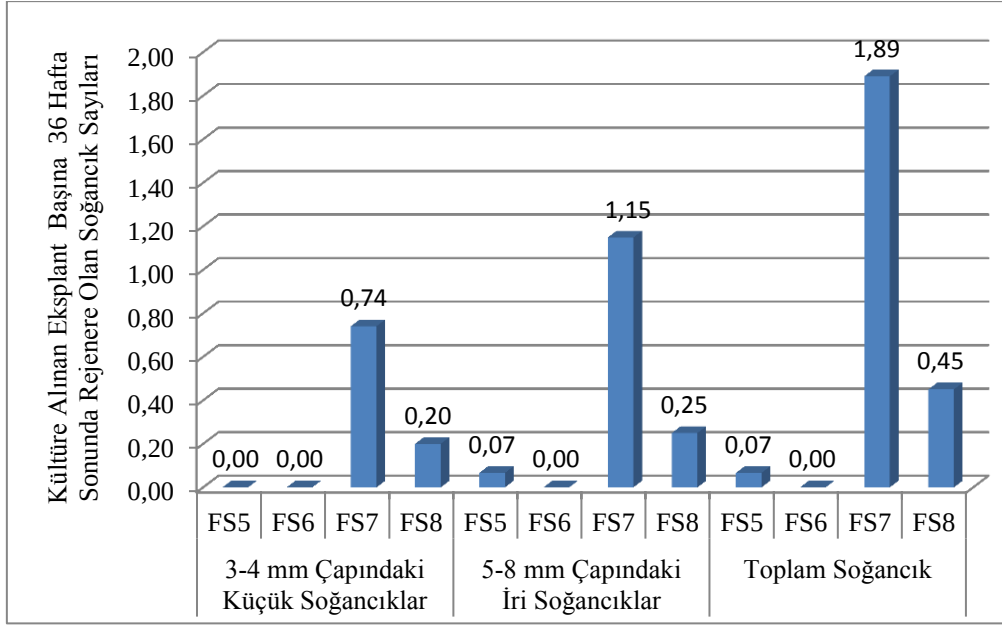
*Tekerrürlerde yeşil yaprak eksplant sayısı: 9



Şekil 4.18. Rejenere olan bazı soğancıkların tüpte ve mikroskop altında görünüşleri.



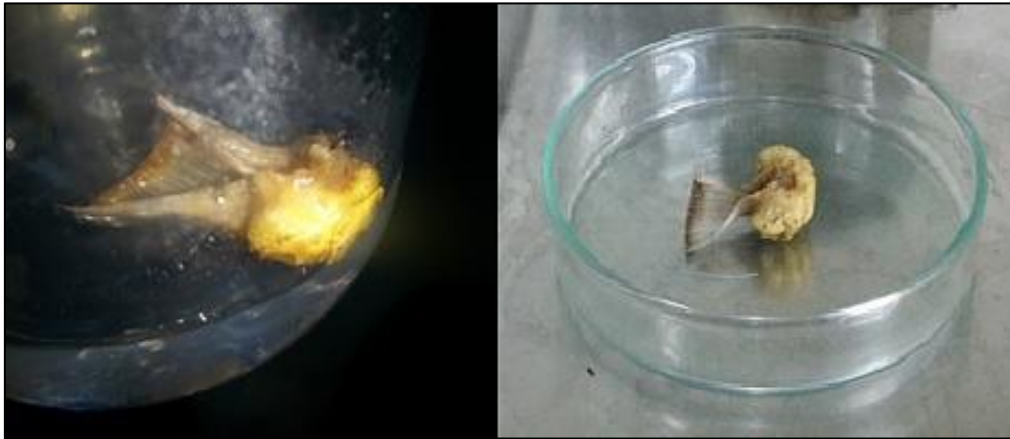
Şekil 4.19. 36 haftalık kültürde rejenere olan soğancıkların (adet) besin ortamlarına göre dağılımları.



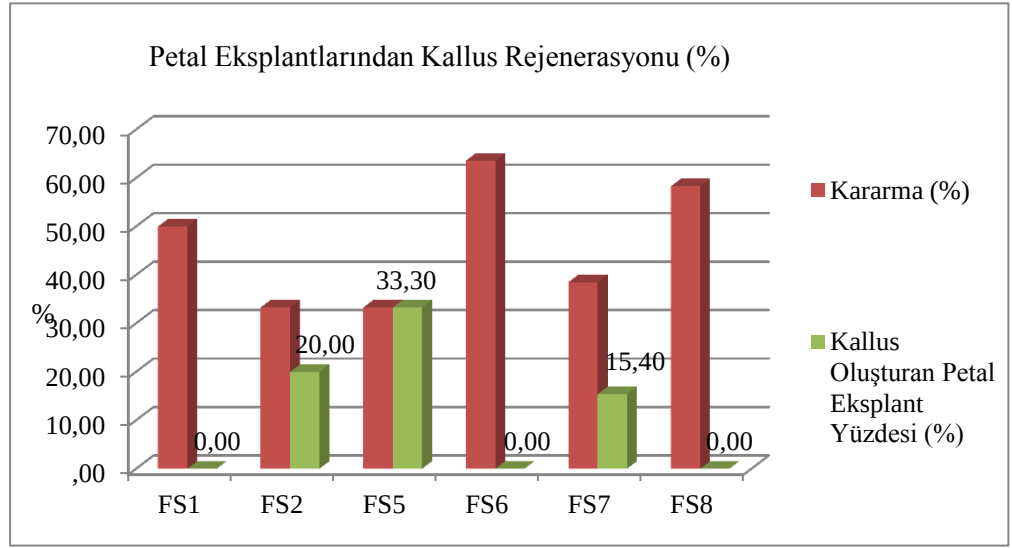
Şekil 4.20. Kültüre alınan yeşil yaprak eksplantı başına dolaylı yoldan elde edilen soğancık sayıları (adet).

4.3.2. Petal Yaprak Eksplantları ile Yapılan Çalışmaların Rejenerasyon Sonuçları

Kültüre alınan petal eksplantlarında, 12 hafta sonra dip kısımlarının etrafında gelişen embriyonik olmayan kalluslardan bazıları Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Bu kallusların kullanılan farklı besin ortamlarına göre dağılımları ve eksplantların bu ortamlarda gösterdikleri kararlı oramları Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

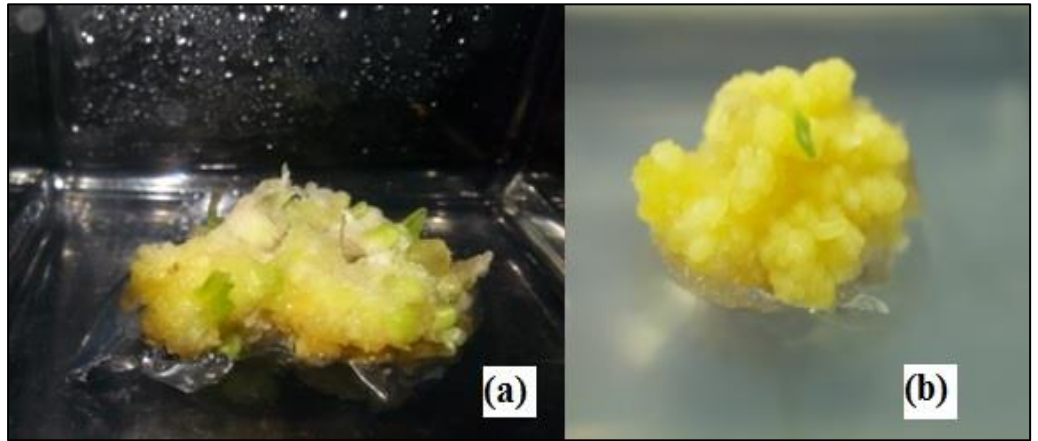


Şekil 4.21. Petal eksplantlarında 12 hafta sonra gelişen ve embriyonik olmayan kalluslar.



Şekil 4.22. Kallus oluşturan petal eksplant yüzdesi (%) ile kararma yüzde (%) değerleri.

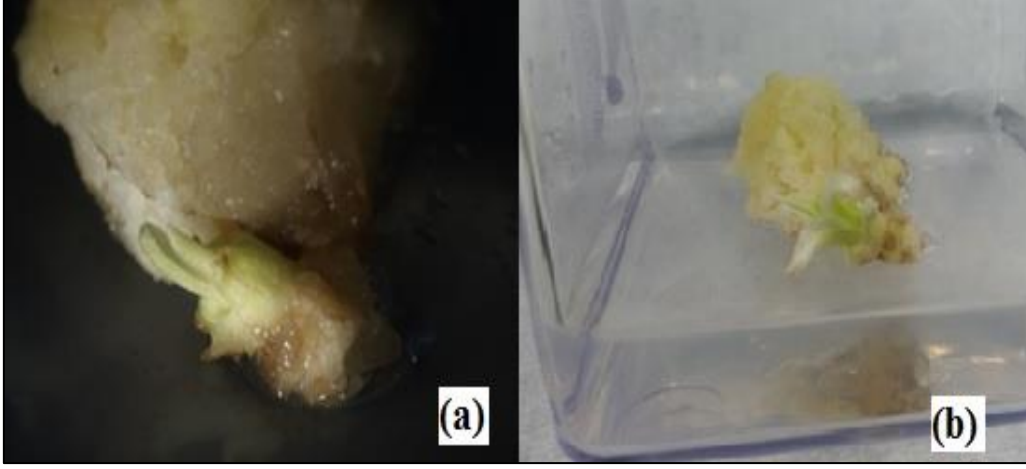
12 hafta sonra embriyonik olmayan bu kalluslar, büyüme düzenleyicisi içermeyen 60 g/l süktroz konsantrasyonuna sahip B5 veya MS temel besin ortamlarında altkültüre alınmışlardır. Büyüme düzenleyicisi içermeyen temel besin ortamlarında altkültüre alınan bu kalluslarda düşük miktarlarda da olsa dahi somatik embriyo ve sürgün gelişimleri teşvik edilebilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Petal kökenli kalluslarda somatik embriyo ve sürgün gelişimleri.

Rejenere olan sürgünlerden bazıları oldukça kalın gövdeli ve çoklu yapraklı olarak gelişmeye devam etmişler (Şekil 4.24), devam eden altkültür periyodu sırasında tam bir *F. imperialis* bitkisi gibi, bir gövde üzerinde

yerleşmiş üst yaprakları ve aşağı kısımda ise daha geniş yüzeye sahip alt yaprakları oluşturmuşlardır (Şekil 4.25).



Şekil 4.24. Petal kökenli kalluslarda gelişen kalın gövdeli sürgünler.

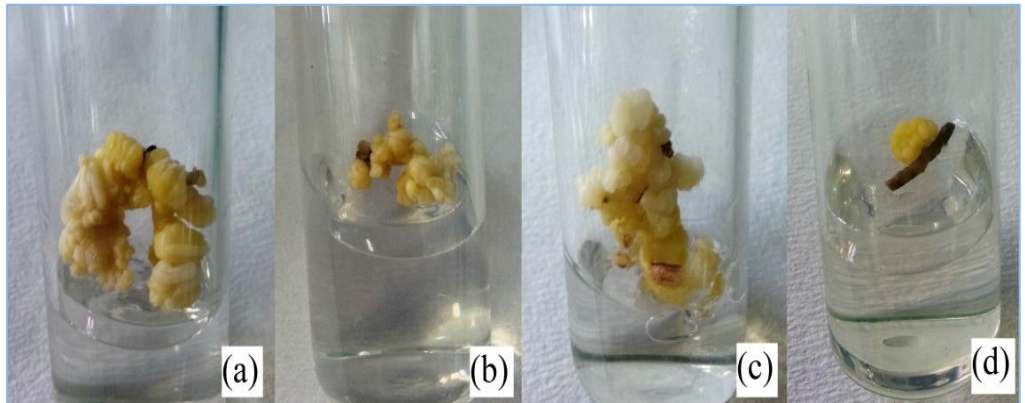


Şekil 4.25. Bir gövde üzerinde yerleşmiş üst yapraklar ve daha aşağı kısımda alt yapraklar oluşturmuş sürgün.

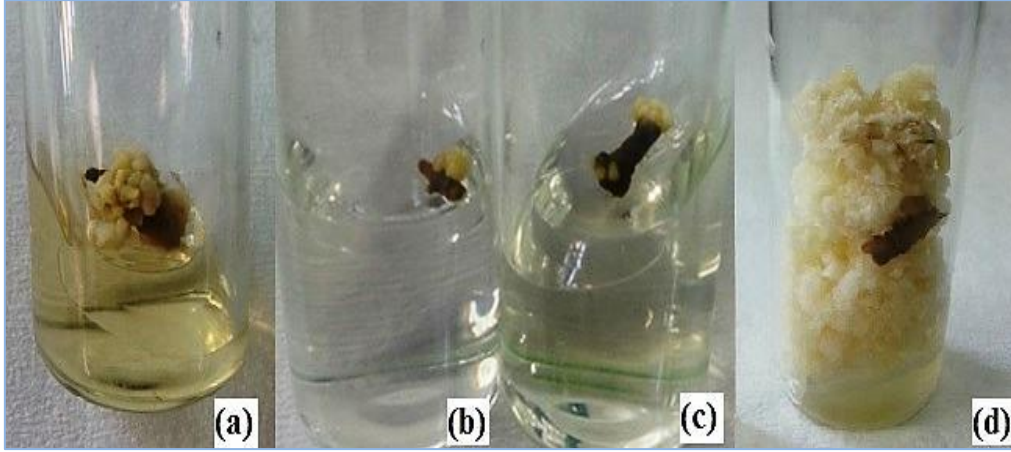
4.3.3. Kök eksplantları ile yapılan çalışmaların rejenerasyon sonuçları

Çalışmada farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında kültüre alınan kök eksplantlarının bir kısmı karanlık koşullarda, diğer bir kısmı ise fotoperiyot (3500 lux 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık) koşulları altında inkübe edilmişlerdir. Bu koşullarda gerçekleşen kallus rejenerasyonlarına ait veriler Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Fotoperiyot koşullarında kültüre alınan kök eksplantlarında, kallus oluşturan eksplant yüzdesi %18.99 iken, karanlık koşullarda kültüre alınanlarda bu sonuç %13.06 olarak tespit edilmiştir.

Fotoperiyot koşullarında ve K2 kodlu besin ortamında kültüre alınan 1'er cm uzunluğundaki kök eksplantlarından %33.3'e varan oranda kallus rejenerasyonu gerçekleştirilebilmiştir. Aydınlık koşullarda kültüre alınan eksplantlarda rejenere olan kallusların tamamı embriyogenik kallus olmakla birlikte (Şekil 4.26), karanlık koşullarda rejenere olan kalluslardan da sadece bir tanesi hariç diğerleri embriyogenik formda oluşmuştur (Şekil 4.27). Şekil 4.26 ve Şekil 4.27 de görüldüğü üzere ana eksplantlar oldukça kararmışsa da bu durum kallus gelişimi için bir olumsuzluk yaratmamıştır. Aydınlık ve karanlık koşullarda gerçekleşen kallus rejenerasyonları (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27) incelendiğinde aydınlık koşullarda rejenere olan kallusların daha iyi geliştikleri gözlenebilmektedir.



Şekil 4.26. Aydınlık koşullarda kök eksplantlarında gelişen kalluslar, a-d) embriyogenik kalluslar.



Şekil 4.27 Karanlık koşullarda kök eksplantlarında gelişen kalluslar, a-c) embriyogenik kalluslar, d) embriyogenik olmayan kallus.

Farklı kompozisyonlardaki besin ortamlarında kültüre alınan kök eksplantlarında karanlık ve fotoperiyot koşullarda gerçekleşen kallus rejenerasyonlarına ait veriler Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Kök eksplantları denemelerinden elde edilen verilerin gerçekleştirilen varyans analizi sonucunda, besin ortamı ve besin ortamı*kültür koşulu interaksyonları anlamlı bulunmamıştır. Ancak kültür koşulu (fotoperiyot ve karanlık) faktörü %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). LSD sınıflandırmasına göre kallus oluşumunun en fazla (%18.99) olduğu fotoperiyot koşulları 1. grupta yer alırken, karanlık koşul 2. grupta (%13.06) yer almıştır.

Çizelge 4.5. Fotoperiyot ve karanlık kültür koşullarında, farklı besin ortamlarında kültüre alınan kök eksplantları arasında kallus rejenerasyonu görülen kök eksplantı yüzdesi (%)

Besin Ortamı	Fotoperiyot Koşul				Karanlık Koşul				ORT
	Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)				Kallus Oluşturan Eksplant Yüzdesi (%)				
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	
K1	16.67	50.00	0	22.23	13.33	12.00	8.00	11.11	16.67
K2	33.33	16.67	50.00	33.33	11.67	11.67	10.00	11.11	16.86
K3	33.33	0	0	11.11	28.33	28.33	26.67	27.78	19.44
K4	0	33.33	16.67	16.67	0	16.67	0	5.56	11.12
ORT				18.99a				13.06b	

*Kültüre alınan kök eksplantı sayısı her tekrerrde 6 adet olmak üzere deneme başına 18'dir.

**Kültür koşulları için HKO değeri 126.876; LSD değeri 12.554'dir

Çizelge 4.6. Kök eksplantlarının, karanlık ve fotoperiyot koşullarında farklı besin ortamlarında kültüre alınmaları sonucunda kallus rejenerasyonu görülen kök eksplantı yüzdeleriyle ilgili varyans analiz sonuçları

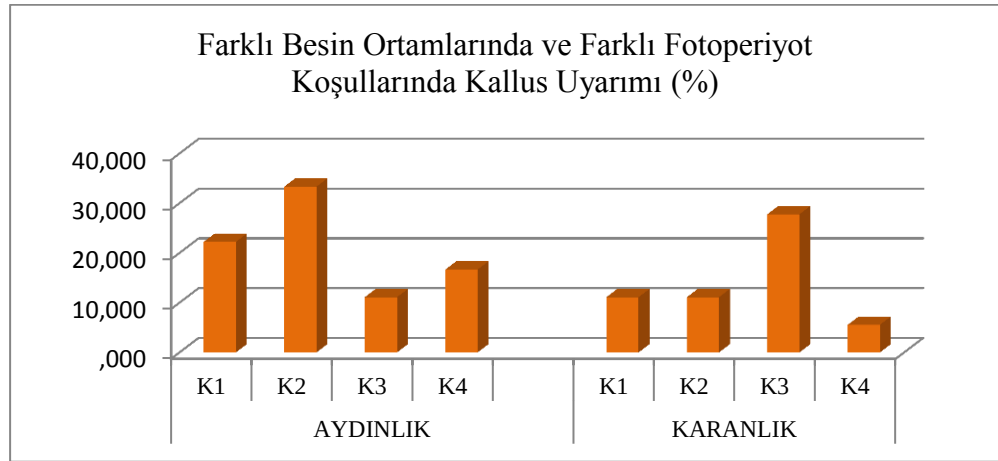
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Kültür Koşulu	1	945.173	945.173	7.450*	4.960	10.040
Besin ortamı	3	202.062	67.354	0.531ns	3.710	6.550
Kültür koşulu*Besin Ortamı	3	457.549	152.516	1.202ns	3.710	6.550
Hata	10	1268.756	126.876			
Genel	17	2873.540	169.032			

*= $\alpha:0,05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0,01$ önemlilik düzeyi

ns= anlamsız

Farklı konsantrasyonlarda NAA + 2,4-D içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış kök eksplantlarında en iyi kallus gelişimleri, aydınlık koşullarda K2 kodlu besin ortamında (%33.33), karanlık koşullarda ise K3 kodlu besin ortamında (%27.78) elde edilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 Farklı besin ortamlarında ve farklı fotoperiyot koşullarında kök eksplantlarında gelişen kallus rejenerasyon durumları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Zambaklar (Liliaceae) ile yapılan doku kültürü çalışmalarında, başlangıç materyali olarak ikiye bölünmüş pullarına ayrılmış eksplantlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Gangopadhyay et al, 2010). *F. imperialis*'in de dahil olduğu soğanlı bitkilerin doku kültürü çalışmalarında en çok soğan pul parçaları eksplant olarak kullanılmışsa da eksplant kaynağı olarak bitki soğanlarının kullanılması oldukça ağır kontaminasyonlara sebebiyet vermekte ve her *F. imperialis* soğanının ortalama 3-5 pul içermesi bu riski daha da arttırmaktadır. Dolayısıyla, *F. imperialis* soğanlarının eksplant olarak kullanıldığı literatür çalışmalarında uygun sterilizasyon ve organ rejenerasyonu için mevcut protokoller hala yetersiz kalmıştır.

Yapılan bu çalışmada, *F. imperialis* bitkisine ait soğan pul parçaları, yeşil yaprak, petal yaprak ve kök eksplantları kullanılarak vejetatif yolla etkili bir çoğaltım gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Petal yaprak ve yeşil yaprak eksplantlarından başarılı sonuçlar alınsa da, soğan pul parçalarının sterilizasyonları için başarılı bir protokol gerçekleştirilememiştir. Toprakaltı organı olması dolayısıyla soğanların başlangıç materyali olarak kullanımlarındaki sterilizasyon zorlukları literatürde de sıkça karşılaşılan bir durumdur. Gürlek (2011), *F. imperialis* soğanlarına denediği üç farklı sterilizasyon yönteminde de eksplantların tümünü kontaminasyon nedeniyle kaybetmiştir. Bu yöntemler deterjanlı suda ön yıkama ve %70'lik etanolde bekletme işlemlerinin ardından; 1- Tween 20 içeren %50'lik hidrojen peroksit ile muamele, ayrıca %1'lik PPM (Plant Protection Medium)'da bekletilerek soğanların parçalanmadan bütün halde kültüre alınması, 2- Tween 20 içeren %50'lik ticari çamaşır suyunda muamele ve ayrıca fungusit içeren saf suda bekletilerek soğanların parçalanmadan bütün halde antibiyotik içeren besin ortamında kültüre alınması, 3- %100'lük çamaşır suyu ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan soğanların 5 x 5 mm² olacak şekilde parçalanarak kültüre alınmaları şeklinde gerçekleştirilmiştir. Araştırmacı soğanlardaki kontaminasyon sorunu nedeniyle çalışmasına olgunlaşmamış embriyolardan ve *in vitro* çimlendirilen tohumlardan devam etmişse de bu eksplant kaynağının generatif kökenli bir materyal oluşu, her embriyonun ayrı bir bireyi temsil

etmesi nedeniyle söz konusu bu teknik tam bir vejetatif çoğaltmaya karşılık gelmemektedir. Bu çoğaltım şekli, ticari olarak özel bir çeşitten veya seçilmiş bir klondan yapılacak vejetatif klonal çoğaltıma olanak sağlamayacağı için vejetatif dokulardan alınacak eksplantlardan yapılacak klonal çoğaltım tekniği büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, yeşil yaprak eksplantlarından yeşil sentez yoluyla elde edilen gümüş nanopartikül çözeltileri ile yapılan sterilizasyon denemelerinde %77 ile %95 arasında değişen başarı oranları tespit edilmiştir. %50’lik NaOCl ile 6 dakika süresince çalkalanan yeşil yaprak eksplantlarında ise %100 sterilizasyon başarıları sağlanmıştır ve kararma oranı %38’e (4 dakika %50’lik NaOCl yöntemi ile) kadar düşürülebilmektedir. Dilik (2006) ise %30’luk ticari çamaşır suyunda 15 dakika bekletme işleminin %2’lik kloramin çözeltisinde 30 dakika bekletme işlemine göre daha etkili bir sterilizasyon yöntemi olduğunu ifade ettiği çalışmasında, %30’luk ticari çamaşır suyunda 15 dakika çalkalama işleminde %91 oranında (kullanılan iki besin ortamında toplamda elde edilen sonuç) steril eksplant elde edebilmiştir. Ancak araştırmanın ikinci yılında kullanılan bütün gövde eksplantları kontaminasyon nedeniyle kaybedilmiştir. Piyasada ticari formda temin edilebilen ve kimyasal olarak sentezlenmiş gümüş nanopartikül çözeltilerinin, doku kültüründe başlangıç materyali olarak kullanılacak eksplantların yüzey sterilizasyonunda kullanıldığı çalışmalar son yıllarda ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu konudaki öncü bir çalışma Abdi et al. (2008) tarafından, *Valleriana officinalis* bitkisinde gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, yüzey sterilizasyonundan önce ve yüzey sterilizasyonundan sonra NS “Nano-silver” solüsyonuna daldırdıkları eksplantları ve yüzey sterilizasyonu yapılmamış, yalnızca NS solüsyonuna daldırılmış eksplantları kültüre almışlardır. Yüzey sterilizasyonu olmadan NS solüsyonu uygulaması kontaminasyon için etkili bulunmamıştır. Yüzey sterilizasyonundan önce NS solüsyonu ile muamele edilen eksplantlarda sterilizasyon yüzdesi sadece %32 iken, yüzey sterilizasyonunu takiben ise 180 dakika boyunca 100 mg/L “Nano-silver” (NanoCid ‘L2000’- İran) içeren NS solüsyonu muamelesinde %89 sterilizasyon başarıları elde edilebilmiştir. Ancak bu çalışmada NS solüsyonu uygulaması fungal kontaminasyonlar için etkili bulunmamıştır. Shokri et al. (2014), 200 ppm konsantrasyonda Nano-silver çözeltisine daldırdıkları gül

nodlarında %80 steril eksplant oranını elde etmişlerdir. Çalışmamızda, *in vitro* kökenli *Gentiana cruciata* yaprakları ve *Rubia tinctorum* kallus ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yoluyla sentezi gerçekleştirilen gümüş nanopartiküllerin uygulandığı ters lale bitkisi yeşil yaprak eksplantlarında %77 ile %95 arasında sterilizasyon başarısı ortaya konmuştur. Yeşil sentez ile elde edilen gümüş nanopartiküllerinin yine bitki eksplantlarının yüzey sterilizasyonunda kullanılmaları alanında gerçekleştirilen öncü bir çalışma olma niteliğindedir. Bitkiler kullanılarak gümüş nanopartikül üretimi, diğer fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre daha düşük maliyetli, ölçek büyütme elverişli ve sentez sırasında herhangi bir toksik kimyasal kullanımı gerektirmeyen çevre dostu bir yöntem olarak avantaj sağlamaktadır (Malabadi et al., 2012). Özellikle bitkisel sistemler kullanılarak gümüş nanopartiküllerin eldesi geleneksel kimyasal sentez yöntemine göre daha çevre dostu, daha hızlı ve daha düşük maliyetli olması gibi özellikleri ile günümüzün ilgi çeken başlıklarından biri haline gelmiştir (Tran et al., 2013).

Gerçekleştirilen çalışmada, NaOCl'ye dayalı sterilizasyon yöntemlerinin uygulandığı petal yaprak ve yeşil yaprak eksplantları arasında sterilizasyon başarıları ve kararma oranları farklılık göstermiştir. Petal yapraklarda, kontaminasyon oranının daha yüksek olmasının, sükroz içerikli nektar salgısının petal eksplantları üzerindeki mikrobiyal yükü arttırabileceği ihtimalinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde petal eksplantlarında kararma oranlarının da yüksek olması petallerin daha hassas yapıda olmaları nedeniyle çalkalanma işleminden daha çok zarar görmüş olabileceklerinden kaynaklanabileceği ifade edilebilir. Gürlek (2011), tarlada ekili olan *F. imperialis* soğanlarından ilk çıkan yeşil yapraklara uyguladığı %70'lik etanolde 2 dakika bekletme ve ardından %50'lik ticari çamaşır suyu (ACE) ile 10 dakika çalkalama şeklinde gerçekleştirdiği sterilizasyon işleminin ardından eksplantları 24°C'de karanlıkta kültüre almıştır. Yeşil eksplantların hiçbirinde gelişme kaydedilemediğini ve karardıklarını ifade etmiştir. Dolayısıyla yeşil yaprak eksplantları kullanılarak gerçekleştirdiğimiz sterilizasyon çalışmalarının başarıyla sonuçlandığını belirtmemiz mümkündür.

Tarafımızdan gerçekleştirilen çalışmada, petal yaprak eksplantları ile yeşil yaprak eksplantları aynı besin ortamlarında (FS5, FS6, FS7 ve FS8 kodlu ortamlar) kültüre alındıklarında, 12 hafta sonunda yeşil yaprak eksplantlarında kallus gelişimleri ve bu kalluslar üzerinde somatik embriyo ile sürgün rejenerasyonları gerçekleşirken, petal yaprak eksplantlarında ise yalnızca embriyogenik olmayan kallus uyarımları gerçekleşmiştir. Bu kalluslar büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ve B5 temel besin ortamlarında altkültüre alındıklarında düşük miktarlarda olsa dahi somatik embriyo ve sürgün gelişimleri teşvik edilebilmiştir. Yeşil yaprak eksplantları için en yüksek kallus gelişimi oranı B5 temelli besin ortamında %59.26 iken, petal yaprak eksplantlarında MS temelli besin ortamında bu oran %33.33 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında hem yeşil yapraklar hem de petal yapraklar ile yapılan denemeler kıyaslandıklarında, petal yaprak eksplantlarında en yüksek kallus oluşturan eksplant oranı %33.3 ile FS5 (1 mg/l BAP, 0.5 mg/l NAA, 0.4 mg/l IAA ve 60 g/l sükroz içeren MS) besin ortamında elde edilirken, bu besin ortamında yeşil yapraklar ile gerçekleştirilen denemelerde kallus oluşturan eksplant oranı %30 olarak bulunmuştur. Aynı besin ortamında petal yaprak ve yeşil yaprak eksplantlarından benzer kallus oluşum oranları elde edilse de, yine aynı büyüme düzenleyici kombinasyonunun (1 mg/l BAP, 0.5 mg/l NAA, 0.4 mg/l IAA ve 60 g/l sükroz) MS yerine B5 temelli besin ortamına uygulandığı FS7 kodlu besin ortamında yeşil yaprak eksplantlarından %59.26 oranında kallus rejenerasyonu elde edilmiştir. Sonuç olarak, yeşil yapraklar için B5 temelli besin ortamı yaklaşık olarak iki kat daha yüksek oranda kallus rejenerasyonunu mümkün kılmıştır.

Sürgünler üzerindeki yeşil yapraklarla yapılan çalışmalarda; MS temelli besin ortamlarında rejenere olan kallusların, B5 temelli besin ortamında rejenere olanlara göre hem somatik embriyo (sırasıyla en yüksek embriyogenik kallus oranları %92.31 ve %56.25), hem de sürgün rejenerasyonuna yönelme bakımından (sırasıyla en yüksek sürgün oluşturan kallus oranları %88.89 ve %37.50) daha uygun oldukları kaydedilmiştir. Bu ortamlar arasında ise oksinlerin (0.5 mg/l NAA+ 0.4 mg/l IAA), yüksek dozda BAP (1 mg/l) ile birlikte kombine edildikleri MS ve B5 besin ortamlarında sürgün oluşturan kallus oranları (sırasıyla %88.89 ve %37.50), daha düşük BAP (0,1 mg/l)

konsantrasyonunda gelişenlere (sırasıyla %53.85 ve %16.67) göre daha başarılı bulunmuşlardır.

Yeşil yaprak eksplantları, farklı sitokininler içeren MS besin ortamlarında 12 hafta boyunca kültüre alındıklarında, en yüksek kallus oluşturan eksplant oranları (sırasıyla %42.86 ve %38.10) Kin ve TDZ içeren besin ortamlarında elde edilirken, sürgün oluşturan eksplant oranı ise en iyi %26.67 ile BAP içeren besin ortamında elde edilmişlerdir. Dolayısıyla başlangıç materyali olarak yeşil yaprak eksplantlarının kullanıldığı bu çalışmada, dolaylı organogenez bakımından oksinlerle birlikte besin ortamına eklenen BAP sitokininini sürgün rejenerasyonunda, Kin veya TDZ sitokininleri ise genellikle kallus uyarımında daha etkili bulunmuşlardır.

F. imperialis soğanlarının üzerinde gelişen kök kısımlarından alınan eksplantlar, ilk kez bu çalışma kapsamında *in vitro* koşullarda doku kültürü için başlangıç materyali olarak kullanılmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda NAA+2,4-D içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmış kök eksplantlarında en iyi kallus gelişimleri, aydınlık koşullarda K2 kodlu besin ortamında (%33.33), karanlık koşullarda ise K3 kodlu besin ortamında (%27.78) elde edilmiştir. Bu ortamlar, diğer ortamlardan daha yüksek dozda (K2: 1mg/l NAA+2mg/l 2,4-D ve K3: 2mg/l NAA+1mg/l 2,4-D olmak üzere toplamda 3 mg/l) oksin içerdiklerinden, yüksek oksin konsantrasyonunun kallus uyarımı ve gelişimi üzerinde olumlu yanıtların alındığı belirlenmiştir.

Yeşil yaprak eksplantlarının fotoperiyot koşullarında kültüre alınmalarından 12 hafta sonra rejenere olan embriyogenik kallusların, kesilerek parçalara ayrılması ve ilk kültüre alındıkları ortamlar ile aynı içeriğe sahip besin ortamlarında altkültüre alınması sonucu, embriyogenik kallusların gelişimleri ve sürgün rejenerasyonu durumları incelendiğinde; altkültürden 6 hafta sonra MS temelli besin ortamlarının (FS5 ve FS6), B5 temelli besin ortamlarına (FS7 ve FS8) göre sürgün rejenerasyonunu teşvik etmede daha uygun oldukları belirlenmiştir. Yeşil yaprak eksplantları altkültüre alındıktan 6 hafta sonra toplamda 146 adet olmak üzere yeşil yaprak eksplantı başına 1.35 adet sürgün rejenere olmuştur. Buradan hareketle yeşil yaprak eksplantları için

fotoperiyot koşullarının, Gürlek (2011) de uygulanan karanlık koşullara göre daha elverişli olduğu ifade edilebilir.

F. imperialis bitkisinin petal yaprakları ile gerçekleştirilen bir çalışmada (Mohammadi et al., 2007), farklı dozlarda BAP, NAA ve IAA ve 30 g/L süktroz içeren B5 besin ortamlarında, kültüre alınan eksplantların canlı kalma oranları (%) ile dolaylı yoldan somatik embriyogenez oluşturma potansiyellerini incelenmiştir. Toplamda 27 farklı besin ortamı içerisinde en yüksek canlı kalma oranı %83 olarak, “1 mg/l BAP + 0.3 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA” ve “0.1 mg/l BAP + 0.6 mg/l NAA + 0.4 mg/l IAA” kompozisyonunda büyüme düzenleyicileri içeren iki besin ortamında elde edilmiştir. Bu sonuçlar petal yaprak eksplantları ile gerçekleştirilen denemelerimizde en düşük kararma oranlarının (%33-%38 arasında), bahsedilen bu büyüme düzenleyici kombinasyonlarına benzer şekilde büyüme düzenleyicisi içeriğine sahip FS2, FS5 ve FS7 kodlu ortamlarımızda ortaya çıkmasını desteklemektedir (FS2: MS+1mg/l BAP+0.5mg/l NAA, FS5: MS+1mg/l BAP+0.5mg/l NAA+0.4mg/l IAA ve FS7: B5+1mg/l BAP+0.5 mg/l NAA+0.4mg/l IAA).

Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir sonraki çalışmada (Mohammadi et al., 2008) ise *F. imperialis* bitkilerinin petal yapraklarını başlangıç eksplantı olarak kullandıkları çalışmalarında, B5 besin ortamını 0.6 mg/l NAA ve 0.4 mg/l IAA oksinlerinin yanı sıra, düşük konsantrasyonda (0.1 mg/l) BAP ve göreceli olarak yüksek konsantrasyonda (1 mg/l) BAP ile modifiye ederek doğrudan soğancık rejenerasyonunu hedeflemişlerdir. Araştırmacılar, petal eksplantlarının göreceli olarak yüksek konsantrasyonda (1 mg/l) BAP içeren ortamda 1.3 kat gibi daha yüksek oranda cevap oluşturduklarını, ancak düşük konsantrasyonda (0.1 mg/l) BAP ile kombine edilmiş ortamlarda soğancık oluşum yüzdesinin 1.45 kat daha yüksek bulunduğunu ifade etmişlerdir. Dolayısıyla, çalışmamızda petal yaprak eksplantlarından 1 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA ve 0.4 mg/L IAA içeren FS5 ve FS7 ortamlarında en yüksek kallus oluşum yüzdelerinin (%33.3 ve %15.4) elde edilmesi bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Mohammadi et al (2008), söz konusu araştırmasında doğrudan organogenezi teşvik etmek amacıyla büyüme düzenleyicisi içeren ortamda kültüre alınan eksplantların, daha sonra büyüme

düzenleyici içermeyen besin ortamları ile altkültüre alınmalarını önermişler ve bu sayede kallus oluşumuna gerek olmaksızın petal eksplantlar üzerinden soğancık rejenerasyonu gerçekleştirebilmişlerdir. Bu bilginin ışığında, petal yaprakları ile yapılan denelemerde elde edilen embriyogenik olmayan kalluslar, büyüme düzenleyicisi içermeyen, MS veya B5 besin ortamları (60 g/l süktroz) ile altkültüre alındıklarında, bu kalluslar üzerinde somatik embriyo ve sürgün gibi organ rejenerasyonları sağlanabilmiştir.

. Kültürde 36 hafta boyunca altkültüre alınmadan inkübe edilen yeşil yaprak eksplantlarında toplamda 62 adet soğancık rejenerasyonu gerçekleşirken, petal yapraklarının eksplant kaynağı olduğu denemeler sonucunda ise soğancık gelişimi gözlenmemiştir. Rahimi et al. (2013), *F. imperialis* bitkisinin petal, yaprak taslağı ve soğan pul eksplantları ile gerçekleştirdiği dolaylı organogenez çalışmasında, petal eksplantlardan köken almış kallusların organ rejenerasyonu oranlarının, yaprak taslaklarından köken almış kallusların organ rejenerasyonu oranlarına göre daha düşük bulunduğunu kaydetmişlerdir.

Kültüre alınan yeşil yaprak eksplantlarından rejenere olan kallusların altkültüre alınmadan 36 hafta boyunca inkübe edilmeleri sonucu kalluslar üzerinden kendiliğinden soğancık rejenerasyonları meydana gelmiştir. 36 haftalık kültür periyodu sonunda yeşil yaprak eksplantı başına 1.89 adet soğancık (FS7: B5+1mg/l BAP+0.5mg/l NAA+0.4mg/l IAA besin ortamında) elde edilmesi sonuçların başarısını ortaya koymaktadır. Arzate-Fernández et al. (1997) da *Lilium longiflorum* Thunb. bitkisinin anterli veya antersiz filament eksplantları ile gerçekleştirdiği *in vitro* doku kültürü çalışmalarında kültür başlangıcından yaklaşık 7-8 ay sonra kallusların kendiliğinden soğancıklara farklılaştığını ifade etmiş, 1 g yaş kallustan ortalama 21 adet soğancık geliştiğini belirtmiştir. *Allium sativum* L. bitkisinin geç olgunlaşan “Howaito-roppen” çeşitinde sürgün uçlarından alınan eksplantların 6 ay boyunca düşük sıcaklıkta *in vitro* kültüre alınmasıyla sürgün çoğaltımının gerçekleştirildiği bir çalışmada ise, bu sürgünlerin %6-12 oranında süktroz içeren LS besin ortamlarına (Linsmaier and Skoog, 1965) aktarılmalarıyla soğancık oluşumu

ancak kültür başlangıcından itibaren 8 ay sonra sağlanabilmiştir (Nagakubo et al., 1993).

Bitkilerde organogenez konusunda ince hücre tabaka tekniğinin uygulanması ilk olarak 1970’li yıllarda ortaya konulmaya başlanmıştır. Daha sonraları, tütün, zambak ve krizantemi de kapsayan birçok türde uygulanmıştır. Özellikle ginseng gibi ticari olarak değerli türler içinde uygulanması mümkündür. Ayrıca TCL sistemlerinin kullanımı; eksplantın kültür ortamıyla doğrudan temasını sağlaması dolayısıyla daha etkili besin ve hormon alımına ve birincil sürgün/kök ve embriyo gibi farklı yapıların oluşumuna olanak sağlaması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Nhut, 2012). Çalışmamızda *F. imperialis* bitki türünde ilk kez denenen TCL (İnce Hücre Tabaka) tekniği kullanıldığında, eksplantlarda kararma gözlenmemiştir ve renk kayıpları da meydana gelmemiştir. Bu durumlar, sterilizasyondan kaynaklanan bir sorunun oluşmadığını gösterse de eksplantlarda herhangi bir şişme ya da organ rejenerasyonu yaklaşık 5 aylık bir kültür sürecinde gerçekleşmemiştir. Soğanlı bitkilerde gerçekleştirilen TCL çalışmaları konusunda yapılan örnek bir çalışmada, *Lilyum longiflorum* bitkisinin sürgün eksplantlarının *in vitro* koşullarda kültüre alınmaları ile elde edilmiş dört haftalık psödo-soğancıklardan, steromikroskop altında alınan 0.2-0.4 mm kalınlığındaki tTCL (enlemesine ince hücre tabaka) eksplantları, bir fenilüre türevi olan ve sitokinin aktivitesine sahip CPPU (Forklorfenuron, *N*-(2-Chloro-4-pyridyl)-*N'*-fenilüre) içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmışlardır (Le et al., 1999). Sonuçta kültüre alınan tTCL eksplantı başına 16-17 adet sürgün gelişimi elde edilebilmiştir.

F. imperialis bitkisine ait gövde disklerinin başlangıç materyali olarak kullanıldığı bir çalışmada (Dilik, 2006), ilk yıl uygulanan %30’luk ticari çamaşır suyunda 15 dakika çalkalama işleminde %91 oranında steril eksplant elde edebilmişse de araştırmanın ikinci yılında kullanılan bütün gövde eksplantları kontaminasyon nedeniyle kaybedilmiştir. Bu açıdan TCL çalışmalarımız için kullanılan sterilizasyon yönteminin gerekli başarıyı gösterdiği ifade edilebilir. Aynı çalışmada araştırmacı, MS besin ortamını, 1 mg/l BAP ve 0.5mg/l NAA veya 0.5mg/l KNA ile kombine ettikleri besin

ortamları arasında en yüksek “kallus veya soğancık” rejenerasyonunu %37.6 oranında KNA içeren besin ortamında elde etmiştir. Bu besin ortamına benzer oranlarda büyüme düzenleyici içeren FS7 kodlu, 1 mg/l BAP, 0.5 mg/l NAA ve 0.4 mg/l IAA içeren B5 besin ortamında ise yeşil yaprak eksplantlarından %59.26 oranında kallus oluşumu, %22.2 oranında sürgün rejenerasyonu ve %33.3 oranında somatik embriyo gelişimi elde edilmesi oldukça başarılı olarak nitelendirilebilmektedir. Lingfei et al. (2009), *Lilium davidii* var. unicolor bitkisinin *in vitro* kökenli yaprak eksplantlarını başlangıç materyali olarak kullandıkları çalışmalarında, en yüksek rejenerasyon oranını 0.5 mg/l TDZ ve 1.0 mg/l NAA ekledikleri Nitsch and Nitsch (1969) besin ortamında eksplant başına 3.83 adet olarak bulmuşlardır.

6. ÖNERİLER

Sonuç olarak, *F. imperialis* bitkisinde *in vitro* doku kültüründe etkili bir mikroçoğaltım için petal yaprakları ve yeşil yaprakların başlangıç materyali olarak kullanılmaları tavsiye edilebilir. Bu materyallerin yüzey sterilizasyonları için %50'lik NaOCl'de 6 dakika çalkalamak başarılı olabildiği gibi, yeşil sentez yolu ile elde edilen gümüş nanopartikül çözeltilerinin de alternatif bir teknik olabileceği ortaya çıkarılmıştır. Petallerden elde edilen embriyogenik olmayan kallusların büyüme düzenleyici içermeyen besin ortamları ile altkültüre alınmaları durumunda somatik embriyo rejenerasyonunun teşvik edilebildiği belirlenmiştir. Ayrıca yeşil yaprak eksplantları ile başlatılan doku kültürlerinde çoğunlukla embriyogenik-kalluslar elde edilmiş, bu kallusların aynı besin ortamları ile altkültürlemeleri sonucunda sürgün sayısında ciddi bir artış kaydedilirken, altkültüre alınmayan kalluslarda ise 36 hafta sonunda soğancık rejenerasyonları tespit edilmiştir. İlerleyen çalışmalar için soğan pul eksplantlarında sterilizasyon çalışmalarının yoğunlaştırılması ve yapılan çalışma kapsamında kullanılan sitokinin tipinin değiştirilmesi ile farklı oksin kombinasyonlarının birlikte denenmeleri önerilebilir.

TCL tekniği ile yapılacak ileriki çalışmalar için kullanılacak besin ortamlarının, BAP ve Kin'e göre çok daha yüksek frekansta sürgün oluşumunu teşvik ettiği bilinen CPPU ile modifiye edilerek denenmesi tavsiye edilmektedir.

12 haftalık kültür periyodunu tamamladıktan sonra altkültüre alınan yeşil yaprak eksplantlarından köken almış kalluslar üzerinde gelişen sürgünlerde önemli ölçüde camsılaşma gözlenmiştir. Camsılaşan sürgün oranının düşürülebilmesi için farklı agar tiplerinin, kültür kaplarının ya da mineral tuzlarının kompozisyonlarının denenmesi gerekmektedir.

Elde edilen soğancıkların güçlendirilmesi ve köklendirilmesi çalışmalarını takip eden bir aklimatizasyon prosedürü ortaya konulmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdi, G., Salehi, H. and Khosh-Khui, M., 2008. Nano silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiol Plant* 30, 709-714p.

Açıkgöz, N., İlker, E. ve Gökçöl, A., 2004. Biyoteknolojik Araştırmaların Bilgisayarda Değerlendirilmeleri, E.Ü. Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi No:2.

Akhtar, M.N., Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., Sener, B., Erdogan, I. and Tsuda, Y., 2002. New class of steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis*. *Phytochemistry* 63, 115–122p.

Aksu, E., 2011. İhraç Edilen Doğal Çiçek Soğanlarımız ve Üretim Teknikleri, Hasad Yayıncılık, İstanbul.

Allahverdikhani-Vaziri, P., 2009. Endemik *Muscari Aucheri*'nin *in vitro* Klonal Çoğaltımı Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi (Danışman: Prof. Dr. Cengiz SANCAK), Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Alp, Ş. ve Aşur, F., 2006. Geofitlerin Peyzaj Planlama Çalışmalarındaki Önemi ve Genel Kullanım Esasları, III. Süs Bitkileri Kongresi, İzmir.

Anonim 1. 2005. Hakkari Şemdinli ve Yüksekova'da Ters lale Yetiştiriciliğinin Teşviki Projesi.

Anonim 2. <http://www.hakkarim.net/terslale/#üst>
Erişim Tarihi: 16.03.2015

Anonim 3, 2015. http://www.tarimtv.gov.tr/HD1553_dogal-cicek-soğanlarının-uretimi-dogadan-toplanması-ve-ihracatına-iliskin-onetmelik.html
Erişim Tarihi: 29.07.2015

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Anonim 4, 2004. Tarım ve Köyişleri Bakanlığınca Resmi Gazetede Yayınlanan İhracat Miktarları, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı TÜGEM kayıtları. Erişim Tarihi: 1 Ekim 2014

Anonim 5, 2015. www.bitkivecicek.com/ters-lale-fritillaria-imperialis-aglayan-gelin-cicegi Erişim Tarihi: 21.01.2015

Anonim 6, 1999. Süs Bitkileri Yetiştiriciliği, Soğanlı ve Yumrulu Süs Bitkileri, Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı, Yayın No:40, Yalova.

Anonim 7, 2015. <http://seymacicekcilik.blogspot.com.tr/2012/07/ters-lale-yetistirciligi.html> Erişim Tarihi: 21.01.2015

Arslan, N., Sarıhan, E. O. ve İpek, A., 2008. Farklı Soğan Kesme Yöntemlerinin *Fritillaria persica* L.'nin Bazı Özellikleri Üzerine Etkisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 14(3), sf:246-250.

Arzate-Fernández, A. M., Nakazaki, T., Okumoto, Y. and Tanisaka, T., 1997. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). Plant Cell Reports, 16, 836–840p.

Atta-Ur-Rahman, Akhtar, M.N., Choudhary, M.I., Tsuda, Y., Sener, B., Khalid, A. and Parvez, M., 2002. New Steroidal Alkaloids from *Fritillaria imperialis* and Their Cholinesterase Inhibiting Activities, Chem. Pharm. Bull. 50(8), 1013-1016p.

Bozkurt, B., Yalvaç, K., Tanır, G., Onay, A., Eroğlu, F., Aktuz, N.C., 2006. Süs Bitkileri ve Doğal Çiçek Soğanları İthalat ve İhracat Uygulamaları ile Bakanlık Politikaları, III. Süs Bitkileri Kongresi, İzmir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Búrquez, A., 1989. Blue tits, *Parus caeruleus*, as pollinators of the crown imperial, *Fritillaria imperialis*, in Britain, *Oikos* 55, 335-340p.

Búrquez, A. and Corbet, S.A., 1991. Do flowers reabsorb nectar?, *Functional Ecology*, 5, 369-379p.

Chan, S.W., Li, P., Kwan, Y.W. and Lin, G., 2011. *In vitro* Tracheobronchial Relaxation of *Fritillaria* Alkaloids. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9 (5), 0345–0353p.

Dilik, M., 2006. Şemdinli Lalesi (*Fritillaria imperialis* L.) ve Adıyaman Lalesi (*F. persica* L.)’nin Doku Kültürüyle Çoğaltılması, Yüksek Lisans Tezi (Danışman: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU, Eş Danışman: Prof. Dr. Neşet ARSLAN), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, ANKARA.

Elinç, Z.B. ve Baktır, İ., 2006. Antik Dönemden Günümüze Çiçek Soğanlarının Kullanımı, III. Süs Bitkileri Kongresi, İzmir.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, 151-158p.

Gangopadhyay, M., Chakraborty, D., Dewanjee, S. and Bhattacharya, S., 2010. Clonal propagation of *Zephyranthes grandiflora* using bulbs as explants. *Biologia Plantarum* 54 (4), 793-797p.

Gürlek, D., 2011. *Fritillaria imperialis* L. ve *Fritillaria persica* L. Türlerinde *in vitro* Soğancık Üretimi Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi (Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, ANKARA.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hanelt, P., 2001. Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops (Except Ornamentals), Springer, First English Edition, Vol.2, 2287p.

Helsper, J.P.F.G., Bücking, M., Muresan, S., Blass, J. and Wietsma, W.A., 2006. Identification of the Volatile Component(s) Causing the Characteristic Foxy Odor in Various Cultivars of *Fritillaria imperialis* L. (Liliaceae), J. Agric. Food Chem., 54, 14, 5087-5091p.

Kahraman, Ö., 2006. Soğanlı Bitkilerde Bazı Topraksız Tarım Sistemlerinin Kullanım Olanakları, Doktora Tezi (Danışman: Prof. Dr. M. Ercan ÖZZAMBAK), Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, İzmir.

Kahraman, Ö., Özzambak, E., 2011. Adıyaman Lalesinde Farklı Soğan Çevre Büyüklüklerinin Bitki Gelişimi Üzerine Etkileri, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 6(2), sf: 59-64.

Karagüzel, Ö., Aydınşakir, K., Kaya, A.S., 2007. Dünyada ve Türkiye'de Çiçek Soğanları Sektörünün Durumu, Derim Dergisi 24(1), sf:1-10.

Le, B. V., Nhut, D. T. and Van, T. T., 1999. Plant production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulblet explants of *Lilium longiflorum* *in vitro*. Comptes Rendus De L Académie Des Sciences - Series III - Sciences De La Vie 322(4), 303-310p.

Lingfei, X., Fengwang, M. and Dong, L., 2009. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolor). Scientia Horticulturae 119, 458-461p.

Linsmaier, E.M. and Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant.18, 100-127p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lukaszewska, A. J., Witomska, M., Bianco, J. and Barthe, P. 1998. ABA contents and the regeneration ability of *Fritillaria imperialis* L. cultured *in vitro*. Acta Physiologiae Plantarum, Vol. 20. No. 3., 241-244p.

Malabadi, R.B., Naik, S.L., Meti, N.T., Mulgund, G.S., Nataraja, K. and Kumar, S.V., 2012. Silver nanoparticles synthesized by *in vitro* derived plants and callus cultures of *Clitoria ternatea*; Evaluation of antimicrobial activity, Research in Biotechnology, 3(5), 26-38p.

Marija, P., Angelina, S., Sladana, J. and Milana, T., 2011. Somatic embryogenesis and bulblet regeneration in snakehead fritillary (*Fritillaria meleagris* L.). African Journal of Biotechnology Vol. 10 (72), 16181-16188p.

Mohammadi-dehcheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Ebrahimie, E. and Sardari, M., 2007. Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. Pakistan Journal Biological Sciences, 10, 1875–1879p.

Mohammadi-dehcheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Ebrahimie, E. and Sardari, M., 2008. Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. Acta Physiol Plant 30, 395–399p.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497p.

Nagakubo, T., Nagasawa, A. and Ohkawa, H., 1993. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32, 175-183p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Nhut, D.T., Nga, L.T.M., Chien, H., X. and Huy, N.P., 2012. Morphogenesis of *in vitro* main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), African Journal of Biotechnology Vol. 11(23), 6274-6289p.

Nitsch, J.P. and Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163, 85–87p.

Onay, H.A., 2008. Türkiye’de Süs Bitkileri Sektörünün Üretim ve Yapısal Sorunları Ve Öneriler, Doktora Tezi (Danışman: Prof. Dr. Hayran ÇELEM), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Peyzaj Mimarlığı Anabilim Dalı, Ankara.

Özler, H., 2001. *Asparagus* L., *Allium* L., *Muscari* Miller ve *Fritillaria* L. (Liliaceae) Cinslerine Ait Bazı Türlerin Polenlerinin Morfolojik Yapılarının İncelenmesi, Doktora Tezi (Danışman: Prof. Dr. Sevil PEHLİVAN), Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Paek, K. Y. and Murthy, H. N., 2002. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68, 247–252p.

Pala, F., 2006. Ekonomik Öneme Sahip Bazı Soğanlı Bitkilerin Diyarbakır Ekolojik Koşullarında Kültür Olanakları, Yüksek Lisans Tezi (Danışman: Prof. Dr. Menşure ÖZGÜVEN), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.

Rahimi, M., Daneshvar, M.H., Heidari, M. and Yari, F., 2013. *In vitro* micropropagation of *Fritillaria imperialis* L. through induction of indirect organogenesis. International Journal of Agronomy and Plant Production, Volume 4 (3), 418-424p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Razavizadeh, R. and Ehsanpour, A.A., 2008. Optimization of *in vitro* propagation of *Rosa hybrida* L. cultivar *Black Red*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 3 (1), 96-99p.

Rout, G.R., Mohapatra, A. and Jain, S.M., 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects, Biotechnology Advances 24, 531–560p.

Shivani, V., Satyakam, G., Priyanka, K. and Rao, I.U., 2010. Micropropagation of Cymbidium Sleeping Nymph through protocorm-like bodies production by thin cell layer culture, Scientia Horticulturae 123, 551–557p.

Shokri, S., Babaei, A.r., Ahmadian, M., Hessami, S. and Arab, M.M., 2014. The effects of different concentrations of Nano-Silver on elimination of bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (*Rosa hybrida* L.) *in vitro* culture. International Journal of Farming and Allied Sciences. Vol., 3 (1), 50-54p.

Silva, J.A.T., Nhut, D.T., Tanaka, M. and Fukai, S., 2003. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs), Scientia Horticulturae 97, 397–410p.

Tekşen, M. and Aytaç Z., 2011. The revision of the genus *Fritillaria* L. (Liliaceae) in the Mediterranean region (Turkey). Turk J Bot 35, 447–478p.

Tekşen, M. and Aytaç, Z., 2014. The revision of *Fritillaria* L. (Liliaceae) Genus in the Regions in Turkey Except the Mediterranean Region. Research Journal of Biological Sciences 9 (2), 34-51p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tekşen, M., 2004. Akdeniz Bölgesi'ndeki (Türkiye) *Fritillaria* L. (Liliaceae) Cinsinin Revizyonu, Doktora Tezi (Danışman: Prof. Dr. Zeki AYTAÇ,) Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, ANKARA.

Titiz, S., Çakıroğlu, N., Yıldırım, B.T. ve Çakmak, S., 2000. Süs Bitkileri Üretim ve Ticaretindeki Gelişmeler, V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Cilt II, sf: 719-726.

Tran, Q.H., Nguyen, V.Q. and Le, A.T., 2013. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. (4) 033001, 20p.

Uluğ, B.V., Korkut, A.B., Sisman, E.E. and Ozyavuz, M., 2010. Research on Propagation Methods Of Persian Lily Bulbs [*Fritillaria persica* Linn.] with Various Vegetative Techniques, Pak. J. Bot., 42(4), 2785-2792p.

Uranbey, S., 2011. *In vitro* Bulblet Regeneration From Immature Embryos Of Endangered and Endemic *Muscari azureum*. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 63 (1), 209-215p.

Witomska, M. and Lukaszewska, A., 1997. Bulblet regeneration *in vitro* from different explants of *Fritillaria imperialis*. Acta. Hort. 430, 331-338p.

Witomska, M., 2001. Effect of growth regulators on regeneration of *Fritillaria imperialis* 'Rubra Maxima' *in vitro*. Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach, 9, 355-362p.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Adana’da doğdu. Lise öğrenimini Adana’nın Seyhan ilçesinde Ahmet Kurttepelı Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2007 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü’nü kazandı. 2012 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak Biyomühendis ünvanını aldı. Aynı yıl Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. 2014 yılında Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümüne Arş. Gör. olarak atandı.