

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Başar SEVİNDİK

**TÜRKİYE’ DE DOĞAL OLARAK YETİŞEN VE KÜLTÜRÜ YAPILAN
BAZI *CROCUS* TÜRLEİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS’ İN
ARAŞTIRILMASI**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2014

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’ DE DOĞAL OLARAK YETİŞEN VE KÜLTÜRÜ YAPILAN BAZI
CROCUS TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESIS’ IN
ARAŞTIRILMASI**

Başar SEVİNDİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2014 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. N.Yeşim YALÇIN MENDİ Prof. Dr. Selim ÇETİNER Yrd.Doç. Dr. Nezihe KÖKSAL
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE’ DE DOĞAL OLARAK YETİŞEN VE KÜLTÜRÜ YAPILAN BAZI *CROCUS* TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS’ İN ARAŞTIRILMASI

Başar SEVİNDİK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Yıl : 2014, Sayfa : 59
Jüri : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Yrd. Doç. Dr. Nezihe KÖKSAL

Bu çalışma kapsamında; ülkemizde doğal olarak yetişen ve kültürü yapılan bazı Çiğdem türlerinin (*Crocus sativus* L., *Crocus ancyrensis*, *Crocus pallasii* subs. *pallasii*) somatik embriyogenesis yöntemi ile çoğaltılması ve *Crocus sativus* türünde histolojik analizler ile kallus oluşum safhalarının gözlenlenmesi amaçlanmıştır.

Ülkemizin önemli bir genetik zenginliği olan bu bitkinin *in vitro* koşullarda çoğaltım olanaklarının araştırılması amacıyla, soğan eksplantları kullanılarak *in vitro* rejenerasyon denemeleri kurulmuştur. Denemede bitki büyüme düzenleyicilerinden; NAA (0, 0.5, 1, 2 mgL⁻¹), BA (0, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹), 2 iP (0, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹) ve 2,4-D (0, 0.5, 1, 2 mg L⁻¹)’nin farklı kombinasyon ve konsantrasyonları kullanılarak bitkilerin *in vitro*’da gelişim ve farklılaşmaları gözlenmiştir.

Çalışma sonucunda; tüm *Crocus* türlerindeki eksplantların embriyojenik kallusa dönüşüm oranı, kallus yapısı, embriyojenik kallusların embriyoya dönüşüm oranı, embriyo aşamaları ve eksplantların canlılık oranı incelenmiş ve sadece *Crocus sativus* L. türünde, kallus oluşumunun başlangıç zamanı histolojik analizler ile saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Crocus*, safran, somatik embriyogenesis, genetik kaynak, histolojik analiz

ABSTRACT

MSc.THESIS

INVESTIGATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SOME CROCUS SPECIES GROWN NATURALLY IN TURKEY

Başar SEVİNDİK

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor : Prof. Dr. N.Yeşim Yalçın MENDİ
Year: 2014, Pages: 59
Jury : Prof. Dr.N. Yeşim Yalçın MENDİ
: Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Assoc. Prof. Dr. Nezihe KÖKSAL

The aim of this study was to propagate some *Crocus* species which are cultivated and grown naturally in our country (*Crocus sativus* L., *Crocus ancyrensis*, *Crocus pallasii* ssp. *pallasii*) using somatic embryogenesis technique and to observe the stages of callus growth histologically for only *Crocus sativus* L.species .

In vitro regeneration experiments were conducted using corm explants belong to different *Crocus* species to search micropropagation possibilities of this plant which is a valuable genetic resource of Turkey. In the experiments, different plant growth regulators; NAA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L⁻¹), BA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L⁻¹), 2 iP (0, 0.5, 1.0, 2.0 mgL⁻¹) and 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 2.0 mgL⁻¹) combinations and concentrations were used to determine the growth and development of plants ,

As a result, conversion ratio of explants to the embryogenic callus, conversion ratio of embryogenic callus to embryo, investigation of embryo stages, survival ratio of explants were investigated for all *Crocus* species and the beginning stage of callus formation in *C. sativus* L. was determined via histological analysis.

Keywords: Crocus, saffron, somatic embryogenesis, genetic resources, histological analyses

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana “Türkiye’ de Doğal Olarak Yetişen ve Kültürü Yapılan Bazı *Crocus* Türlerinde Somatik Embriyogenesis’ in Araştırılması” yüksek lisans tez konusunu veren, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN-MENDİ’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince düşünceleri ve fikirleri ile çalışmalarına yön veren ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen laboratuvarımızın kurucusu Prof.Dr. Selim ÇETİNER’ e, çalışmalarımın histolojik analiz kısmında beni yönlendiren Prof. Dr. Sinan ETİ’ye ve ders aşamamda ve laboratuvardaki çalışmalarım sırasında her konuda destek olan Prof.Dr.Yıldız AKA KAÇAR’a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezim süresince bitki örneklerini toplamada bana destek veren Dr. Onur KOYUNCU’ ya ve Koray YAYLACI’ ya katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezim süresince laboratuvarıda bana destek olan Tolga İZGÜ, Macide Burcu KEKİL, Ehsan TAGİPOUR, Biyolog Özhan ŞİMŞEK, Dr.Pembe Evcı ÇÜRÜK’e, istatistiksel analizlerde yardımcı olan Araştırma Görevlisi Mehmet Ali SARIDAŞ’a ve histolojik analizlerde yardımcı olan Dilek TEKDAL’a teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanlığı’na, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’na (Proje no: 113O795) içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Samiye SEVİNDİK, babam Necati SEVİNDİK ve kardeşim Onur SEVİNDİK’e, yüksek lisans tezim boyunca bitkisel materyal temininde bana yardımcı olan Yaşar ÇALIŞKAN’a, Recep KARTAL’a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
3. MATERYAL VE METOD	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. <i>Crocus sativus</i> L. (Safran)	17
3.1.2. <i>Crocus ancyrensis</i> (Ankara çiğdemi)	18
3.1.3. <i>Crocus pallasii</i> ssp. <i>pallasii</i>	18
3.1.4. Bitkisel materyallerin toplanması	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Yüzey Sterilizasyonu	20
3.2.2. Somatik embriyo geliştirme ortamı	21
3.2.3. Farklılaşma ve Çimlenme	21
3.2.4. Histolojik analizler	24
3.2.4.1. Eksplantların Fiksasyon Solüsyonu İçerisine Alınması	25
3.2.4.2. Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması	25
3.2.4.3. Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması	25
3.2.4.4. Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanması	26
3.2.4.5. İncelenen Kriterler ve Deneme Planı	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1.1. <i>Crocus sativus</i> L. Soğanlarının Yüzey Sterilizasyonu	29

4.1.2. <i>Crocus sativus</i> L. Türünün Kallus Oluşturma ve Somatik Embriyo Geliştirme Bulguları	29
4.1.3. <i>Crocus sativus</i> L. Histolojik analiz bulguları.....	38
4.2.1. <i>Crocus pallasii</i> subs. <i>pallasii</i> Soğanlarının Yüzey Sterilizasyon Bulguları	44
4.2.2. <i>Crocus pallasii</i> subs. <i>pallasii</i> Soğanlarının Somatik Embriyogenesis Bulguları.....	45
4.3.1. <i>Crocus ancyrensis</i> Soğanlarının Yüzey Sterilizasyon Bulguları	49
4.3.2. <i>Crocus ancyrensis</i> Soğanlarının Somatik Embriyogenesis Bulguları	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
6. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge.3.1. Kallus geliştirme ortamı (MS Besi Yeri İçeriği).....	22
Çizelge.3.2. Embryogenik Kallus Oluşumu için Kullanılan Büyüme Düzenleyicileri Konsantrasyonları.....	23
Çizelge 3.3. Farklılaşma ve Çimlenme Besi Yeri	24
Çizelge 3.4. Johansen Karışımları (Stösser ve ark., 1985).....	26
Çizelge 4.1. <i>Crocus sativus</i> L. kallus oluşumu istatistiksel analiz sonuçları	31
Çizelge 4.2. <i>Crocus sativus</i> L. türünde somatik embriyoların sürgüne dönüşme yüzdeleri	36
Çizelge 4.3. <i>Crocus</i> türlerinde eksplant başına düşen embriyo sayıları	50

Şekil 3.1. Saksılarda kültüre alınmış <i>Crocus sativus</i> L. bitkisi.....	17
Şekil 3.2. <i>Crocus ancyrensis</i>	18
Şekil 3.3. <i>Crocus pallasii</i> ssp. <i>pallasii</i>	19
Şekil 3.4. <i>Crocus</i> soğanları için uygulanan yüzey sterilizasyon protokolü A) Çeşme suyu altında 30 dk. bekletme. B) <i>Crocus pallasii</i> spp. <i>pallasii</i> soğanlarının sterilizasyonunda kullanılan antibakteriyel sabun ile yıkama. C)%0,1' lik HgCl ₂ de 10 dk. D)% 70'lik alkolde bekletilen <i>Crocus</i> soğanları. E) % 20'lik NaOCl debekletilen <i>Crocus</i> soğanları. F) Yüzey sterilizasyonu yapılmış olan ve steril saf suda bekletilen soğanlar	20
Şekil 3.4. <i>Crocus</i> soğanlarının somatik embriyo gelişim ortamlarına aktarılması A)Soğanların küçük parçalara. B-C)Soğanların besi yerlerine yerleştirilmesi.....	21
Şekil 4.1. <i>Crocus sativus</i> L. türünde embriyojenik olmayan kallusların rejenerasyonu. A) Eksplantların ortamlara alınma aşaması, B) Eksplantların 3. haftada gösterdikleri gelişim, C) Eksplantların 3. haftadan itibaren oluşturdıkları embriyojenik olmayan kallus yapıları, D) Kallusların rejenerasyonu, E) Kallus yapılarının soğana dönüşümü (6.hafta), F) Eksplantların tam soğan görünümü alması (7. hafta).....	30
Şekil 4.2. A) Kallusların 4. haftadaki gelişimleri, B) <i>Crocus sativus</i> L. bitkisi kalluslarının şeffaf ve yumuşak olduğu safha, C) Embriyojenik kallusların oluşumu, D-E) Embriyojenik kallusların somatik embriyolara dönüşümü, F) <i>Crocus sativus</i> L. bitkisinde somatik embriyolar, G) Aynı eksplant üzerinde farklı safhalardaki embriyo oluşumları, H) Somatik embriyoların globular(G) ve kalp safhaları(K), I) Eksplanttan ayrılmış globular ve kalp safhasındaki embriyolar	32

Şekil 4.3. Ön çalışma denemelerinde 2iP ve kinetin arasındaki haftalık gelişme farkları, A) 2iP içeren besi yerinde 1. haftadaki gelişme, B) 2iP içeren besi yerinde 3. haftadaki kallus oluşumu, C) 2iP içeren besi yerinde 6. haftada rejenerasyon ve soğana dönüşüm, D) Kinetin içeren besi yerinde 1. haftadaki görünüm, E) Kinetin içeren besi yerinde 3. haftadaki görünüm, F) Kinetin içeren besi yerindeki 5. haftadaki kallus oluşumları	33
Şekil 4.4. A). Kallus oluşumlarının apikal tomurcuklarda meydana gelmesi. B) Kallusların başlangıç aşamasında renklerinin açık sarı ve saydam olması. C) Açık sarı yapıların zamanla kahverengiye dönüşmesi	35
Şekil 4.5. A). Somatik embriyo sayısının belirlenmesi için seçilen örnek B) Somatik embriyoların ayrılması, C) Somatik embriyoların sayılması	37
Şekil 4.6. A-B).Somatik embriyoların torpedo safhaları C-D) Somatik embriyoların bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi yerinde kültüre alınması E-F) Bitkiciklerin oluşumu.....	38
Şekil.4.7. A) Eksplantın 1. haftadaki gelişimi, B-C) Eksplantın histolojik görünümü	39
Şekil 4.8. A) Eksplantın 2. haftadaki gelişimi, B-C) Eksplantın histolojik görünüm	41
Şekil 4.9. A) Eksplantın 3. haftadaki kallus gelişimi, B-C) Eksplantta oluşan kallus yapısının yığılmış hücreleri ve normal dokularının histolojik görüntüsü.....	42
Şekil.4.10. A) Eksplantın 4.haftadaki kallus oluşumu, B-C) Oluşan kallus dokusunun yığılmış hücreleri ve normal doku ile vakuol (V) farklılıklarının histolojik görüntüsü	43
Şekil 4.11. A) Eksplantta 3. haftada gözlenen büyüme bölgelerinin (BB) oluşumu, B) Epidermal tabakadan (ET) oluşan kallus oluşumlarının histolojik analiz görüntüleri	44

Şekil 4.12. A) <i>Crocus pallasii</i> ssp. <i>pallasii</i> 'de 3. haftada kallus oluşumu, B-C) Kallusların renklerinin kahverengiye dönüşümü, Kallusların gelişimi, D) Kallusların farklılaşması ve embriyojenik kallusa dönüşümü, E-F) Somatik embriyoların farklı safhalarının görünümü	45
Şekil 4.13. A) <i>Crocus sativus</i> L. soğanlarının embriyojenik kalluslarının renk görünümü, B) <i>Crocus pallasii</i> ssp. <i>pallasii</i> soğanlarının embriyojenik kallus renginin görünümü	47
Şekil.4.14. A) <i>Crocus pallasii</i> ssp. <i>pallasii</i> soğanlarının başlangıç aşamasındaki şeffaf hali, B) Kallusların gelişim aşamasında renklerinin koyulaşması ve kahverengiye dönüşmesi.....	48
Şekil.4.15. <i>Crocus pallasii</i> ssp. <i>pallasii</i> A) Globular safhadaki somatik embriyo (G) görüntüsü, A) Kalp safhasındaki somatik embriyo (K), B) Somatik embriyolardan oluşan mikroyumrular (MY)	48
Şekil.4.16. <i>Crocus ancyrensis</i> soğanlarının kallus ve somatik embriyogenesis aşamaları A) <i>Crocus ancyrensis</i> bitkisinde 3. haftada oluşan şeffaf ve beyaz renkli kalluslar, B) Kallusların koyulaşması ve sararması, C) Somatik embriyoların oluşumu, D-E-F) Farklı somatik embriyo safhalarının oluşumu ve globüler ve kalp safhası (K).....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

2İP	: 2-Izopentil Adenin
°C	: Santigrat derece
IBA	: Indol Butirik Asit
L	: Litre
mg	: Miligram
mg/l	: Miligram/Litre
ml	: Mililitre
MS	: Murashige ve Skoog besi ortamı
NAA	: Naftalen Asetik Asit
2,4D	: 2,4-Diklorofenoksiastik asit
Kin	: Kinetin
Dk.	: Dakika
HgCl ₂	: Civa klorid
ETOH	: Etil alkol
NaOCl	: Sodyum HipoKlorit
LS	: Linsmaier and Skoog

1. GİRİŞ

Geofit, soğan, yumru ve rizom gibi özelleşmiş toprak altı organlarında gıda maddesi depo eden otsu bitkilere verilen isimdir. Çiçek soğanları, bir bitkinin büyümek için ihtiyacı olan her şeyi içinde barındırmaktadır. Soğanlı bitkilere örnek olarak çiğdem, lale, sümbül, iris, zambak ve nergis verilebilir (Anonim, 2008).

Hollanda, da doğal soğanlı süs bitkileri üretimi bakımından %70 oranıyla Dünyada ilk sırada yer almaktadır. İngiltere, Fransa, Çin gibi ülkeler soğanlı çiçek üretiminde Hollanda'yı takip etmektedirler. Ülkemizde doğal soğanlı süs bitkileri pazarı önceleri doğadan toplamaya dayalı olarak yapılsa da, günümüzde yeni yeni kültüre alınma çalışmalarına başlanarak önem kazanır hale gelmiştir (Karagüzel ve ark., 2007).

Açıklama [u1]:

Dünya genelinde 34 biyoçeşitlilik noktasında bulunan bitki türlerinin %50'den fazlası endemiktir. Bu endemik bitkiler bir zamanlar dünyada kara yüzeyinin % 15.7'sini kaplamakta iken, şu an yalnızca % 2.3'ünü kaplamaktadır. Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği'nin 2010 yılında yayınladığı kırmızı listeye göre 8.000'den fazla bitki türü yok olmaya başlamıştır (IUCN, 2010).

Türkiye'de en az 3 bin 500'ü endemik, yaklaşık 12 bin bitki türü bulunmaktadır. Endemik türlerden yarısı ilaç, gıda veya süs bitkisi kullanımı, tarla açma, aşırı otlatma, sanayileşme, yapılaşma vb. insan faaliyetleri nedeniyle ya da çok dar bir alanda yayılış gösterdiği için tehlike altında bulunmaktadır. Toplamda 152 çiçek türü ise kritik olarak tehlike altında veya her an yok olma tehlikesi altındadır (Ekim, 2010). Nesli tükenmekte olan bu bitkiler içinde ülkemize endemik çiğdem türleri de büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde kültürü yapılan önemli süs bitkileri; zambak, lale, sıklamen, anemon ve çiğdem'dir. Çiğdem (Crocus), Iridaceae familyası içerisinde tanımlanan ve 4 alt familyanın en geniş grubunu oluşturan *Crocoideae* alt familyasına aittir. (Fernandez ve ark., 2011). Bu familyanın içinde 60 cins ve 1500 tür bulunmaktadır. Safranın da içinde bulunduğu bu familyanın bütün türleri otsu ve çok yıllık, yaprak ve çiçekleri ise mevsimlidir (Vurdu ve ark., 2003). Familyanın çok yıllık özelliği,

türlerinin korm, yumru ve rizoma sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Vurdu ve Güney, 2004). Genel olarak *Iridaceae* familyasının bazı cinslerinde birleşik, bazı cinslerinde ise ayrı olmak üzere 6 parçalı periant ve tek bir ovaryumdan meydana gelen çiçekler bulunur (Vurdu ve Çiçek, 1992). Tabandan çıkan yapraklar, ince, uzun, şeritsi, etli, üst yüzü tek kanallı ve koyu yeşil renklidir. Çiçekler kısa bir sap ucunda tek, çiçek örtüsü ışınal simetrlili, tabanda birleşik 6 parçalı ve sarı, beyaz-mor ve pembe renklidir (Yücel, 2002).

Dünyada genel olarak Orta ve Güney Avrupa, Afrika'nın kuzeyi, Güneybatı Asya ve Çin'in batısında kültürü yapılmaktadır (Fernandez ve ark., 2011).

Crocus türleri çoğunlukla ormanlık alanlarda ya da çayırılık ve fundalıklarda kendiliğinden yetişmektedir (Vurdu ve ark., 2003). Yetiştirme istekleri bakımından yarı gölge-aydınlık yerleri ve ılıman iklimleri daha çok tercih eder. Drenajı iyi, verimli, kumlu, yaprak çürüğü ve organik maddece zengin, nemli toprakları tercih etmektedir. Su istekleri az ve soğuğa karşı dayanıklıdır (Yücel, 2002).

Ülkemizde bazıları endemik 36 tür ve 36 alt tür olmak üzere toplamda 72 taksonla temsil edilmektedirler. Bu bitkilerden 19'u tür olarak, 21 tanesi ise alt tür olarak toplam 40 takson, Türkiye için endemik çiğdem türleridir.

Baharın müjdecisi olarak doğada beyaz, sarı, mor, kırmızı ve turuncu renklerde çiçekler açan çiğdemlerin büyüme ortamlarının, büyük tahribat altında olduğu gözlenmektedir (Vurdu ve ark., 2006). Bu cins özellikle baharatı için yıllardır kültüre alınan safran (*Crocus sativus* L.) bitkisi ile özdeşleşmiştir (Fernandez, 2004).

Crocus sativus L. türü sonbaharda çiçeklenir ve yaz ayları boyunca dormant durumda kalır, safran çiçekleri triploid steril ($2n=24$) olduğu için canlı tohum oluşturmadiğından kormları ile vejetatif olarak çoğaltılır (Velasco-Negueruela, 2001, İnan ve ark., 2009)

Safran, *Crocus sativus* L. dünya üzerinde kuzey yarım kürenin tropikal ve subtropikal bölgelerinde yayılış göstermektedir. Daha çok İtalya, İspanya, Yunanistan gibi Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde ve Türkiye dahil olmak üzere Japonya, Çin, İran ve Azerbaycan'da kültürü yapılan kormlu, çok yıllık otsu bir bitkidir (Vurdu ve ark., 2000). 2009 istatistiklerine göre işlenmiş olarak İran, 300 ton; Hindistan, 6 ton; Yunanistan, 5 ton; Azerbaycan, 3.5 ton; İspanya, 1 ton; Fas,

0.8 ton; İtalya 100, kg; Türkiye, 10 kg; Fransa, 4/5 kg safran üretmektedir. Dünya safran üretiminin % 97 sini İran tek başına karşılamaktadır (Anonim, 2013).2013)

Ülkemizde de kültürü yapılan en önemli çiğdem türü ise yine safran olarak bilinen *Crocus sativus* L.'dir. Safran bitkisinin, Karabük ilinin Safranbolu ilçesindeki Davutobası ve Yazıköy'de, Şanlıurfa'da ise Harran ovasında kültürü yapılmaktadır. Safran bitkisi Safranbolu ilçesinde eskiden beri kültüre alındığından dolayı, ilçenin adını safran bitkisinden aldığı bilinmektedir. Safranbolu ve çevresinde çok eskiden beri safran tarımının yapılması, bölgenin iklim özellikleri ile yakından ilgilidir (Özdemir 2001).

Safran bitkisinin endüstride kullanılan kısmı stigmalarıdır. Stigmalar, kurutularak baharat, boyar madde, dokuma sanayi, endüstri ve halk tıbbında eskiden beri kullanılmaktadır. Baharat olarak başta balık olmak üzere su ürünlerinde, et ürünlerinde, hamur işlerinde, pilavlarda, çorbalarda, peynir, limonata, likör, soslarda ve baharat karışımlarında renk ve aroma verici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca safranın alternatif tıpta da yaygın olarak kullanımı vardır. Sinir sistemi rahatsızlıkları ve uykusuzlukta yatıştırıcı, solunum sistemi rahatsızlıklarında (astıma karşı, öksürük kesici), sindirim sistemi rahatsızlıklarında (mide hastalıkları, kolik ve karminatif olarak), genital sistem rahatsızlıklarında (adet düzensizlikleri ve ağrıları, afrodizyak), dolaşım sistemi rahatsızlıklarında (kalp kuvvetlendirici), gut hastalığında ve göz hastalıklarında tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Safran, 1874 tarihli Dustur al-Edviye'de ve 1940 tarihli Türk kodeksinde kayıtlı drogdur. Son zamanlarda bazı kanser rahatsızlıklarının tedavisinde, hipertansiyonda, yüksek kolesterole karşı ve saç toniklerinde de kullanılmaktadır. Safrana bu özelliklerini veren, yapısında bulunan etken maddelerdir (İpek ve ark. 2009).

Safranda bulunan etken maddeler; crocin, crocetin, safranal ve picrocrocine'dir. Crocin, renk veren madde olarak tespit edilmiştir. Safranın yüksek boyama özelliği bu maddeden kaynaklanmaktadır. Safranal, aroma üzerine etkili etken madde olarak tespit edilmiştir. Safranın acılığını veren madde ise picrocrosindir (Sarma ve ark., 1989).

Crocus sativus'un atalarından biri olduğu bilinen *Crocus pallasii* subs. *Pallasii*, 2n=14 kromozom yapısına sahiptir (Brighton, 1977). *Crocus pallasii* subs.

pallasii, soluk mor çiçekli, fark edilmeyecek kadar kısa dişicik borusu demetine ve yarıdan daha az perigonyum segmentinde çiçek yapısına sahiptir (Caiola ve ark., 2010). Bu tür, ekim ayının ortalarında çiçek açar. Dünyada en yaygın yayılış alanı olan *Crocus* türüdür. *Crocus pallasii* subs. *pallasii*, kuru, çalılık ve ağaçlık alanlarda yetişir. Ülkemizde Doğu Akdeniz’ de, Toros dağlarında, Ege bölgesinde, İç Anadolu ve Karadeniz’ in batısında yayılış göstermektedir (Sanei ve ark., 2006).

Crocus ancyrensis, Türkiye’ye endemik bir tür olup İç Anadolu’da ve Batı Karadeniz’de yayılış göstermektedir. Soğanları zarla kaplıdır. Yaprakların ortasında beyaz şerit bulunmaktadır. Altın sarısı çiçekleri olan bu tür, ağır otlatma, şehirleşme ve kontrolsüz toplama nedeniyle tehlike altındadır. Bu türde Şubat ayında çiçeklenme başlar ve mart ayının ilk yarısına kadar devam eder. Yapraklar çiçeklerden birkaç gün önce çıkar. Çiçek ömürleri, iklim ve çevresel şartlara göre 15 gün olarak gözlenmiştir. Tohumla çoğalır. Tohumlar, nisan ayının oluşmaya başlarken, tohumun tam olarak gelişimi mayıs ayının ortalarını bulmaktadır. Yapraklar ise temmuz ayında kuruyup kaybolur. Bir kapsülde ortalama 30 tohum bulunur. Fakat tohum kabuğunda bulunan büyüme engelleyicilerden dolayı tohumla üretilmesinde problemler bulunmaktadır. Tohum kabuğu, uzun tohum dormansisine neden olmaktadır (Vurdu ve ark., 2010).

Dünyada ve ülkemizde önemi gün geçtikçe artan süs bitkisi sektöründe yeni çeşitlerin ıslahı, süs bitkisi tür ve çeşitlerinin tanımlanması, bitkilerin mikro-çoğaltımı ve *in vitro* şartlarda muhafazası için şüphesiz biyoteknolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bitki biyoteknolojisi çalışmaları arasında yer alan somatik embriyogenesis, bitkilerin somatik hücre veya dokularından embriyo elde edilmesi sürecidir. Somatik embriyogenesis hem süs bitkilerinde hem de diğer bitkilerde önemli ıslah aracı olarak kullanılmaktadır. Somatik embriyogenesis çalışmaları ile genetik mühendisliği çalışmalarına uygun eksplant kaynakları üretilebilmekte ve süs bitkileri için çok önemli bir alan olan genetik mühendisliği çalışmalarının önü açılmaktadır. Bitki genetik kaynaklarının muhafazası için elde edilen embriyjenik kalluslar ve embriyoların kullanılması başarı ile devam etmektedir. Bu açıdan bakıldığında ülkemiz için önemli endemik tür ve çeşitlerin *in vitro* muhafazasında somatik embriyogenesis çalışmaları kilit bir rol oynamaktadır.

Doku kültürü çalışmaları geleneksel metodlarla çoğaltımla kıyaslanacak olursa, özellikle çiğdemler için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Geleneksel üretim yöntemleri çok yavaş olduğu için, doku kültürü yöntemi ile çoğaltım daha fazla önem kazanmaktadır. Özellikle safran bitkisinde sekonder metabolit elde etmek amacıyla, farklı eksplant tipleri kullanılarak doku kültürü tekniklerinden geniş ölçüde yararlanılmaktadır (Zeybek ve ark., 2012).

Türkiye’de bulunan *Crocus* türleri, tarla açmalar ve aşırı otlatma, sanayileşme, tarımsal mücadeleler, orman yangınları, kara yollarının yol genişletme ve yeni yol açma faaliyetleri, izinsiz toplayıcılar, ayrıca da özellikle ihracat ürünü olarak kullanılması nedeniyle tehdit altındadır. Halen gerek bilinçsizce toplanması açısından, gerekse yukarıda belirtilen faktörlerden dolayı büyük bir doğa tahribatı söz konusudur. Doğal ortamda yok olma tehlikesi altında olan bu türlerin, *in vitro* koşullarda muhafaza edilerek genetik çeşitliliğin korunması çok büyük önem arz etmektedir.

Dünyada bulunan toplam bitki türlerinin üçte birinden fazlasının yok olma tehlikesiyle yüzyüze olduğu belirlenmiştir. Sanayileşme, kentleşme ve özellikle de küresel ısınma bu durumu daha kötü hale getirmektedir (Esquinas-Alcazar, 2005; Thuiller ve ark., 2005; Lynch ve ark., 2007).

Orman alanlarının aşırı tahribi, bitki habitatlarının yerleşke yapımları için yok edilmesi, maden işletmeciliği, kentselleşme sonucu ortaya çıkan sanayileşme ve geniş ölçüde yapılan insan yapımı zirai ürünlerin ve bunların üretim sistemlerinin birleşmesi doğada bulunan bitki türleri için çok büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Vijayana ve ark., 2010).

Dünya nüfusunun bugün 6.992.000.000 olduğu ve 2050 yılından önce nüfus artışının bu rakamdan % 50 daha fazla olacağı belirlenmiştir (UNFPA, 2012). Bu denli hızlı büyüyen bir popülasyona güvenli bir şekilde gıda tedarik etmek, zirai ürün üretimini büyük oranda arttırmayı gerektirmektedir. Buna bağlı olarak zirai ürün kalitesini ve miktarını kontrol altına almak ve geliştirmek gün geçtikçe zorlaşmaktadır (Hobbs, 2007).

Gıda ve Tarım için Bitki Genetik Kaynakları Uluslararası Antlaşması’ı; gıda ve tarım için bitki genetik kaynaklarının muhafazası, doğru kullanımı, adil dağıtımı

konularıyla ilgili pek çok düzenlemeyi ortaya koymuştur. Bitki genetik kaynaklarının muhafazası ve akılcıca kullanımını esas alan uluslararası materyal transfer antlaşması 3 Kasım 2001 yılında FAO konferansında kabul edilmiştir. Bunu takiben Birleşmiş Milletler 2010 yılını ‘Uluslararası Biyoçeşitlilik Yılı’ ilan etmiş ve konunun hassasiyetine değinmiştir (FAO, 2012).

Bitki genetik çeşitliliğinin korunması ile ilgili problemler dikkate alındığında 1970’den bu yana biyoteknolojinin sunduğu imkanlardan yararlanarak özellikle *in vitro* teknikler kullanılarak problemlere çözüm bulma eğilimi gelişmiştir. Doku kültürü çalışmaları, bitki germplazmını toplama, çoğaltma ve saklama konuları ile yoğun olarak ilgilenmektedir (Engelmann, 1991; Bunn ve ark., 2007). Bununla birlikte *in vitro*’da geliştirilen sürgün uçlarının kullanımı kolay, yılın her zamanı kullanılabilir ve bitki rejenerasyonuna oldukça uygundur (Reed, 2002).

Günümüzde yetiştiriciliği ve pazarlanması büyük önem taşıyan *Crocus* türleri ile ilgili pek çok doku kültürü çalışması yapıldığı bilinmektedir. Bu çalışmalarda kullanılacak materyallerin kolay ve hızlı temini için genetik kaynakların uzun süreli muhafazasında yeni ve farklı tekniklerin bulunması ve bu tekniklerin pek çok farklı bitki türüne modifiye edilmesi son derece önemlidir.

Histolojik çalışmalar, eksplantların rejenerasyon esnasında hücrelerdeki farklılaşmalarının saptanması, uyartım bölgelerinin belirlenmesi ve meristematik yapılardan sürgün oluşumunun anlaşılması bakımından önem taşımaktadır.

Türkiye’de bulunan *Crocus* türleri, tarla açmalar ve aşırı otlatma, sanayileşme, tarımsal mücadeleler, orman yangınları, kara yollarının yol genişletme ve yeni yol açma faaliyetleri, izinsiz toplayıcılar, ayrıca da özellikle ihraç ürünü olarak kullanılması nedeniyle tehdit altındadır. Halen gerek bilinçsizce toplanması açısından, gerekse yukarıda belirtilen faktörlerden dolayı büyük bir doğa tahribatı söz konusudur. Doğal ortamda yok olma tehlikesi altında olan bu türlerin, *in vitro* koşullarda muhafaza edilerek genetik çeşitliliğin korunması gerekmektedir.

Ülkemizde gün geçtikçe yok olmaya yüz tutan, yabani, otsu ve özellikle de endemik bitki türlerinin korunması son derece önemlidir. Endemik bitki türleri ve bunların yabani akrabaları zirai üretimde önemli yer tutmaktadır, çünkü bu türler hem gıda ve giyecek ürününe, hem de insan ve hayvan yaşamında elzem pek çok

ürüne kaynak olarak kullanılmaktadır (Vijayana ve ark., 2010). Kültür bitkilerinin ve yabani akrabalarının muhafaza altına alınmış olması, klasik veya biyoteknolojik ıslah yöntemleriyle yeni bitkilerin üretilmesi için temel oluşturmaktadır. Ürün kalitesi ve miktarını garantilemek, genetik kaynakların muhafazası ve doğru kullanımına bağlıdır (Esquinas-Alcazar, 2005). Yabani türlerin ve otsu akrabalarının muhafazası ve akıllıca kullanımı genetik erozyonu engellemek için de oldukça önemlidir. Ayrıca bahçe bitkilerinin adaptasyon özelliklerini arttırmak ve bitkileri pek çok hastalık veya zararlı etmenine dayanıklı kılmak için, genetik çeşitliliği arttırmak da aynı derecede önem taşımaktadır (Vijayana ve ark., 2010).

Ülkemizin genetik zenginliklerinden olan bu türlerin, *in vitro* koşullarda muhafaza olanaklarının araştırılması amacıyla farklı büyüme düzenleyicileri kullanılarak somatik embriyogenesis çalışması yürütülmüştür. Dünyada ve ülkemizde şu ana kadar yapılan araştırmalara bakıldığında, çalışmaların yalnızca *Crocus* cinsinin bir türünde (*C. sativus* L.) yoğunlaştığı görülmektedir. Geliştirilmiş olan bu protokoller hem diğer endemik türler için uygulanacak hem de ileride yürütülecek olan kryoprezervasyon ve genetik mühendisliği çalışmalarında kullanılacaktır.

Bu tez çalışmasında; ülkemizde doğal olarak yetişen bazı *Crocus* türlerinde farklı hormon konsantrasyonları kullanılarak somatik embriyogenesis protokolünün oluşturulması ve *in vitro*'da çoğaltılan *Crocus sativus* L. türünün kallus oluşum aşamalarının histolojik analizler ile gözlenmesi amaçlanmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fakhrai ve ark. (1990) *Crocus sativus* L.' de yapmış oldukları çalışmada, çiçekli safran soğanlarının,soğan,petal, ovaryum, stigma ve anterlerini kültüre almışlardır. Stigmaların pigment içeren ve içermeyen kısımlarını ayırmışlar ve ovaryumları da ikiye ayırarak %2' lik hindistan cevizi sütü,200 mgL⁻¹ lik glutamin ve farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren White(1963) bazal ortamında kültüre almışlardır. BAP ve 2,4-D içeren ortamlarda kallus oluşumu görülürken, organogenesise rastlanmamıştır.Aynı eksplantların Zeatin ve NAA kombinasyonlarında stigma benzeri yapılar elde etmişlerdir. Bütünolarak kültüre alınan ovaryumlarda gelişme gözlemlenmemiş, ikiye bölünmüş ovaryumlarda ise 2 mgL⁻¹ NAA ve 4 mgL⁻¹ zeatin içeren besi ortamlarında 6-8 haftada stigma benzeri yapılar elde edilmiştir. Anter filamentlerinde ise 8 mgL⁻¹ NAA ile 4-8 mgL⁻¹ zeatin içeren ortamlarda yarı organize kallus oluşumu ,daha sonra bu kalluslardan 6 hafta sonra stigma benzeri yapılar oluştuğu gözlenmiştir. Çalışma sonucu elde edilen stigmalar ile doğal olarak elde edilen stigmalardeki benzerlikler kromatografik yöntemlerle bulunmuştur.

Ahuja ve ark. (1993)' ları *Crocus sativus* L. bitkisinin sürgün meristemlerini BA ve NAA içeren LS besi yerinde kültüre almışlardır. Aynı besi yerinde farklı somatik embriyogenetik aşamalarını gözlemlemişlerdir. Somatik embriyo aşamalarında globular embriyo safhalarında bipolar böğelerin oluşumunu gözlemlemişlerdir. Olgunlaşmış embriyolar GA3 içeren yarım MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Oluşan bitkiler %2 aktif kömür, BA ve NAA ,içeren MS besi yerinde köklendirilmiştir. 2n=3x=24 kromozom dizilimine sahip bitkiler elde edilmiştir.

Luskutov ve ark.(1999), gelişmemiş ovaryumları ikiye bölerek eksplant kaynağı olarak kullandıkları bu çalışmada farklı büyüme düzenleyicileri içeren 5 farklı besi yeri denemişlerdir. Stigma benzeri yapıların oluşumu ve pigmentasyon derecesi baz alınarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Elde edilen stigma benzeri yapıların içerdiği etken madde miktarına bakılmıştır. % 1'lik aktif kömür, 5.4 µM

NAA, 44,4µM BA içeren B5 bazal ortamı stigma benzeri yapılar elde etmek amacıyla kullanılan en etkili ortam olarak saptanmıştır.

Piqueras ve ark.(1999)' ları safran bitkisinin meristemeatik dokularını nodular kormojenik kallus oluşturmak üzere yüksek dozda BA ve düşük dozda 2.4-D içeren MS besi yerinde kültüre almışlardır. Paklobutrazol ve imazalil eklenmesi ile yüksek oranda karmojenik mikrokormlar elde etmişlerdir.

Bhagyalakshmi (2000) *Crocus sativus* L. ile yapmış olduğu çalışmada ovaryum eksplantlarını farklı gelişim aşamalarında stigma renklerine göre gruplara ayırmıştır. Stigmalarından ayrılmış ovaryum eksplantları, NAA ve BA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren modifiye edilmiş katı MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Sürgün gelişimi için farklı MS, LS ve White besi yerleri kullanılmıştır. Bu çalışmada safranda organogenesisi etkileyen birçok faktör olduğu belirtilmiştir. Bunlardan en önemlileri olarak, büyüme düzenleyicileri, eksplantın hangi gelişim aşamasında olduğu ve eksplant tipleri öne çıkmıştır. NAA ve BA kombinasyonlarının organogenesis üzerinde etkili olduğu ortaya konulmuştur. 53.7 µM NAA, 44.4 µM BA içeren MS ortamının en etkili konsantrasyon olduğu belirlenmiştir.

Ebrahimzadeh ve ark.(2000)' larısafran bitkisinin sürgünlerini kullanarak somatik embriyo ve yeni bitkicikler elde etmişlerdir. Safran bitkisinin sürgünlerini NAA, BA, IAA, 2,4-D ve Kinetin'in farklı kombinasyonlarını içeren LS ortamında karanlıkta kültüre almışlardır. İlk somatik embriyo oluşumu 8 hafta sonra görülmüştür. En fazla kallus oluşumu ve embriyo oluşumu NAA ve BAP içeren LS ortamında gözlenmiştir. Bipolarite gösteren somatik embriyolar çimlendirilmek üzere 5 farklı GA₃ konsantrasyonu içeren 1/2 MS ortamındakültüre alınmışlardır . En iyi çimlendirme ortamının 2,5 mgL⁻¹ GA₃ içeren 1/2 MS ortamı olduğu gözlenmiştir.

Karamian ve ark.(2001)' ları *Crocus cancellatus* bitkisinin sürgün meristmelerini MS ortamında kültüre alarak elde ettikleri embriyolardan protoplast füzyonu yapmışlar ve daha sonra bitki rejenerasyonu sağlamışlardır. Embriyoları elde etmek için Kin ve 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamı kullanmışlardır. Protoplastlar direk olarak embriyojenik kalluslardan elde edilmiştir. 9.28 µM Kin ve 4,52 µM 2.4D içeren MS bazal ortamında embriyoların elde edildiği gözlenmiştir.

Karamian (2003) *C. sativus*, *C. cancellatus*, *C. michelsonii* ve *C. caspius* türlerinde yapmış olduğu çalışmada NAA , BA, 2,4-D ve KİN kullanarak somatik embriyoları elde etmişlerdir. Çalışılan dört türde de somatik embriyo gelişimi ve somatik embriyoların bütün oluşum aşamalarını gözlemlemiştir. Somatik embriyolar ABA içeren yarım MS ortamına aktarılmıştır. Olgunlaşan embriyolar çimlendirme amacıyla GA3 içeren yarım MS besi yerine aktarılmışlardır. Gelişimini tamamlamış bitkiler NAA ve BA içeren yarım MS besi yerinde kültüre alınmışlardır.

Raja ve ark.(2006)'ları safran bitkisinin yaprak segmentlerini BA ve NAA içeren MS besi yerinde kültüre almıştır. En etkili sonucu 1mgL^{-1} BA ve 1mgL^{-1} 2,4D büyüme düzenleyicilerini içeren besi yerinde elde etmişlerdir. Benzer sonuçları 2mgL^{-1} BA ve $0,5\text{mgL}^{-1}$ NAA içeren MS besi yerinde de gözlemlemiştir. Olgunlaşan embriyolar GA₃ ve ABA içeren MS besi yerinde 5 gün süreyle çimlendirmeye alınmıştır.

Sheibani ve ark. (2006)'ları safran bitkisinde yapmış oldukları çalışmada 5 farklı eksplant ve TDZ nin farklı konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Embriyoların gelişimi için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde kültüre almışlardır. Olgunlaşmış embriyolar büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında bitkiye dönüşmüştür.

Roya Karamian (2007) *Crocus pallasii* subs. *Haussknechtii* de yaptığı çalışmada sürgün mersitemlerinden elde ettiği embriyojenik kalluslardan protoplast kültürü ile bitki rejenerasyonunu sağlamışlardır. Sürgünleri %3 sakkaroz, %0,8 agar, 2,4-D, Kinetin, NAA ve BA içeren MS bazal ortamında kültüre almışlardır. 6 hafta sonra kallus oluşumları görülmüş, embriyojenik ve embriyojenik olmayan kalluslar ayrılmıştır. Embriyojenik kalluslar ve globular embriyolar, 2,4 D, Kinetin ve Askorbik asit içeren MS ortamına aktarılmış ve 2-3 ay sonra elde edilen somatik embriyolar protoplast izolasyonu için kullanılmıştır.

Sharma ve ark.(2008)'ları *Crocus sativus* L. ile yapmış oldukları çalışmada *in vitro* soğan oluşumu için protokol geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışma'da safran soğanlarının apikal tomurcuk içeren kısımlarını, küçük soğanlarını ve *in vitro*'da elde edilmiş sürgünleri $0-3\text{mgL}^{-1}$ IBA ve $6-14\text{mgL}^{-1}$ BA içeren MS ortamında kültüre almışlar ve 30 günde bir de alt kültüre almışlardır. Üçüncü ayda gözlemleri

değerlendirmişlerdir. *In vitro* sürgünler ise soğan gelişimleri için demetlere ayrılmış ve IBA, BA ve NAA içeren tam ve 1/2 MS ortamında kültüre alınmıştır. Apikal tomurcuklarda 10. gün sonunda gelişim gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan IBA ve BA kombinasyonlarında gelişimin daha etkili olduğu fakat IBA'nın soğan başına sürgün oluşumunda etkisiz kaldığı gözlenmiştir. Soğan gelişimi için en etkili bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunun, 3 mgL⁻¹ BA içeren 1/2 MS ortamı olduğu saptanmıştır.

Ahouran ve ark. (2009a)'ları *Crocus sativus* L. ile yapmış oldukları çalışmada embriyojenik kalluslardan elde ettikleri protoplastları modifiye edilmiş MS ortamında kültüre almışlardır. 4-5 hafta sonra Ca-aljinat kapsüllerinin yüzeyinde mikro-kalli oluşumları gözlemişlerdir. Bitki gelişimi, kapsüller % 6'lık sakkaroz içeren katı MS ortamına alındıktan 6 ay sonra gözlenmiştir.

Ahouran ve ark. (2009b)'ları *Crocus cancellatus*' un soğanlarını kullanarak *in vitro* çoğaltım yapmışlardır. Soğan segmentlerini kullanarak yaptıkları bu çalışmada, en iyi gelişimi ve çoğaltımı %3 sakkaroz, 2mgL⁻¹ NAA ve 1 mgL⁻¹ BA içeren katı MS ortamında gözlemişlerdir. Daha sonra soğanları +4°C'de 1 ay beklettikten sonra direk toprağa aktarmışlardır.

George ve ark.(2009)'ları, safran ile yapmış oldukları çalışmada soğanların meristematik bölgelerini kullanarak somatik embriyo ve embriyolardan rejenerasyon elde etmişlerdir. Soğanlar, 2,4-D ve Kinetin içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. 2 mgL⁻¹ IAA, 2 mgL⁻¹ Kinetin ve 100 mg L⁻¹ askorbik asit içeren ortamlara transfer edilen kalluslardan somatik embriyolar elde edilmiştir. Globular embriyolar 1 mgL⁻¹ absisik asit içeren sıvı ½ MS ortamında farklılık göstermişlerdir. Kalluslardan oluşan sürgünler, 2 mgL⁻¹ NAA ve 4 mgL⁻¹ Kinetin içeren MS ortamında belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Globular kalluslardan oluşan bitki formlarının ise 2 mgL⁻¹ IAA ve 2mgL⁻¹ Kinetin ve 100 mgL⁻¹ askorbik asit içeren ortamlarda gelişim gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen bitkilerde histolojik analiz yapılmıştır.

Blazquez ve ark.(2009)'ları safran bitkisinde somatik embriyogenesis, histolojik farklılıklar ve bazı enzimatik aktiviteleri incelemişlerdir. Safran bitkisinin soğanlarındaki meristematik dokular, 2,4-D ve BA içeren MS ortamında kültüre

alınmıştır. Altıncı haftanın sonunda nodüler embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Elde edilen nodüler kalluslar, NAA ve BA içeren MS ortamına aktarılmıştır. Somatik embriyogenesis boyunca farklı gelişim safhalarındaki embriyolar histolojik analizler ve enzim aktivitelerinin incelenmesi için kullanılmıştır.

Sharifi ve ark.(2010a), *Crocus sativus* L. ile yapmış oldukları çalışmada safran soğanlarını kullanarak farklı sitokininlerin (BA ve TDZ) globular embriyo benzeri yapılar oluşumundaki etkilerini karşılaştırmışlardır. MS ve B5 besi yerini kullandıkları bu çalışmada kallus oluşumu için her iki ortama da 1.13, 4.54, 9.08 μM TDZ ve 2.22, 8.87, 17.75 μM BA eklemiştir. Kallusların çoğaltımı için ortamlama %0.05'lik aktif kömür ile NAA ve BA hormon kombinasyonlarını denemiştir. İstatistiksel analizler sonucunda TDZ bulunan B5 ortamındaki gelişimin MS ortamındakine göre daha fazla olduğu ve TDZ' nin organogenesis ve somatik embriyogenesis oluşumunda önemli rol oynadığını saptamışlardır.

Sharifi ve ark (2010b)'ları safran bitkisinde yapmış oldukları çalışmada TDZ bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarını B5 Gamborg ve MS besi ortamlarını kullanarak sürgün oluşturma frekanslarını incelemiştir. Farklı NAA ve BA büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarını iki besi yeri ile kombine etmişler ve sürgün oluşum aşamalarındaki enzim aktivitesini incelemiştir.

Vatankhah ve ark. (2010), safranda yapmış oldukları çalışmada meristem dokulardan aldıkları eksplant örneklerinin farklı büyüme düzenleyiciler kullanarak organogenesis boyunca enzim aktivitesine bakmışlardır. En etkili rejenerasyon ortamının $1\text{mgL}^{-1}\text{NAA} - 1\text{mgL}^{-1}\text{TDZ}$ ve $1\text{mgL}^{-1}\text{NAA} - 2\text{mgL}^{-1}\text{Kinetin}$ içeren MS ortamı olduğu gözlenmiştir. Filizlenme için ise rejenera sürgünler $1\text{mgL}^{-1}\text{NAA}$ ve $1\text{mgL}^{-1}\text{BAP}$ kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Organogenesis boyunca protein içeriği ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinin rejenera sürgün ve köklerde düştüğü gözlenirken, filizlenen sürgünlerde arttığı saptanmıştır. Fakat katalaz, peroksidad ve polifenol oksidaz aktivitesi, filizlenen sürgünlerde organogenesis boyunca azalmış, sürgün ve köklerde artmıştır.

Mir ve ark.(2010), *Crocus sativus* L. ile yapmış oldukları çalışmada eksplant olarak ovaryum, yarım ovaryum, stil ve apikal tomurcukları, besi yeri olarak ise BA ve NAA içeren LS, MS ve G5 Gamborg ortamları kullanılmıştır. Karanlık-aydınlık

fotoperiyod uygulanarak kültüre alınan eksplantlar 4 hafta arayla kültüre alınmışlardır. Altı haftada mikrokorm oluşumu, sürgün filizleri ve stigma benzeri yapılar elde edilmiştir. Apikal tomurcukların 20. gün sonunda tek sürgün verdiği gözlenmiştir. Ovaryumlardan ve apikal tomurcuklardan sürgün oluşumları saptanmıştır. Maksimum büyüklükteki soğanların büyüme düzenleyicileri içeren LS ortamında oluştuğu belirlenmiştir. Yarım ovaryumların, G5 Gamborg ortamında stigma benzeri yapılar oluşturdıkları saptanmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir.

Demeter ve ark.(2010), *Crocus heuffelianus* ile yapmış oldukları çalışmada bu bitkinin soğanlarındaki sürgün primodiyumlarından yararlanarak somatik embriyo ve rejenerasyon elde etmeye çalışmışlardır. Eksplantlardan, Gamborg vitaminleri, NAA ve BA büyüme düzenleyicileri içeren MS bazal ortamında embriyojenik kalluslar elde edilmiştir. Globuler embriyo safhaları, bu ortamda gözlenmiş ve oksin sitokinin oranları ve ortamdaki karbon miktarının embriyo ve bitki gelişimi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Safran soğanlarının filizlenen tomurcukları, %3 sakkaroz, %0.8 agar , 2,4-D, BAP, IAA ve IBA kombinasyonları içeren ortamlarda kültüre alınmışlardır. Bazı eksplantlar, büyüme geciktirici içeren ortamlara konulmuşlardır. *In vitro* şartlarda gelişen bitkilerin %60'ı seralara aktarılmıştır. Daha sonra aylara göre gelişimleri gözlemlenmiştir. En etkili bitki gelişimi Kasım-Aralık ayında görülürken, en az gelişimin Mayıs ayında olduğu belirlenmiştir. Bitki tomurcuklarının sürgün vermesi ve çoğalması 9.05 mM 2,4-D ve 26.64 mM BAP içeren besi ortamlarında etkili bir şekilde gerçekleşmiştir. Sürgünlerin çoğaltılması için ise 26.64 mM BAP ve 5.0 mM NAA kombinasyonunun etkin olduğu saptanmıştır. Soğan oluşumu ise 1.7 mM paclobutrazol içeren ortamdan elde edilmiştir (**Devi ve ark.2011**).

Sivanesan ve ark. (2011) *Crocus vernus* ile yaptıkları çalışmada soğanları ve sürgünleri ayırarak BA, TDZ ve NAA içeren MS ortamında 0, 7, 14 hafta karanlıkta daha sonra karanlık-aydınlık fotoperiyodlarda kültüre almışlardır. 45. günün sonunda globular embriyo formundaki eksplantları, BA ve GA₃ içeren MS bazal ortamına aktarmışlardır. BA ve NAA kombinasyonlarında gelişimin, yalnızca BA içeren besin ortamına göre daha iyi olduğu istatistiksel analizler sonucu ortaya konmuştur. En

etkili gelişme ortamının 2 mgL^{-1} BA ve 0.5 mgL^{-1} NAA kombinasyonlarında olduğu gözlenmiştir. Ayrıca soğan ve sürgün tomurcuklarından, TDZ ve NAA içeren MS bazal ortamında gelişme gözlenmiştir. Embriyo olgunlaşması için ise en etkili ortamın 2.0 mgL^{-1} BA ve 1.0 mgL^{-1} GA₃ içeren MS ortamı olduğu saptanmıştır.

Sharifi ve ark.(2012), *Crocus sativus* L. ile yaptıkları çalışmada soğanlardan elde ettikleri embriyojenik ve embriyojenik olmayan kallusların proteom profillerini karşılaştırmışlardır. Safran soğanlarının meristematik dokularını 1 mgL^{-1} 2,4-D ve 4 mgL^{-1} Kinetin içeren MS bazal ortamında kültüre almışlardır. 5-6 hafta sonra embriyojenik kallus oluşumlarını gözlemişlerdir. Dört alt kültürden sonra embriyoların morfolojilerini incelemişler ve elde ettikleri embriyoları protein analizleri için kullanmışlardır.

Sivanesen ve ark.(2012) ları *C. vernus* türünde yapmış oldukları çalışmada sekonder somatik embriyogenesis oluşumu üzerine çalışmalar yapmışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Bu tez çalışmasında, bitkisel materyal olarak *Crocus sativus* L., *Crocus ancyrensis*, *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* kullanılmıştır. *Crocus sativus*, Karabük ilinin Safranbolu ilçesi Yazı köyünden, *Crocus ancyrensis*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Meşelik yerleşkesi ormanlık arazisinden, *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* ise Eskişehir'den temin edilmiştir. *Crocus sativus* L. ve *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* sonbaharda çiçeklenen çiğdemlerdir. *Crocus ancyrensis* ise şubat ayında çiçeklenmektedirler .

3.1.1. *Crocus sativus* L. (Safran)

Dünyada kuzey yarım kürede Akdeniz ülkelerinde yayılış gösteren çok yıllık bir bitkidir. Ülkemizde, Karabük ilinin Safranbolu ilçesinde çok az bir alanda kültürü yapılmaktadır. Ekim ayında çiçeklenmektedir. Çiçeklenme süresi Kasım ortasına kadar devam etmektedir (Şekil.3.1).



Şekil 3.1. Saksılarda kültüre alınmış *Crocus sativus* L. bitkisi

3.1.2. *Crocus ancyrensis* (Ankara çiğdemi)

Ülkemize endemik ve çok yıllık bir bitki olup Orta Anadolu'da ve Batı Karadeniz bölgesinde yayılış göstermektedir. Kayalık yerler, çalılıklar ve çam ormanları yaşam alanlarıdır. 1000-1600 m rakımda yayılış gösterirler (Şekil.3.2).



Şekil.3.2. *Crocus ancyrensis*

3.1.3. *Crocus pallasii* ssp. *pallasii*

Crocus sativus'un yakın akrabası olarak bilinen bu tür, kuzey yarım kürede geniş yayılış alanlarına sahiptir. Ülkemizde Doğu Karadeniz, Akdeniz'in yüksek kesimleri, Ege bölgesi ve İç Anadolu bölgesinde yetişmektedir. 70 ile 2000 m rakımları arasında yayılış göstermektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Crocus pallasii* ssp. *pallasii*

3.1.4. Bitkisel materyallerin toplanması

Crocus sativus, çiçeklenme dönemi olan ekim ayında, Karabük ilinin Safranbolu ilçesinin Yazı köyünden saksılı bir şekilde temin edilmiştir.

Crocus ancyrensis, şubat ayında çiçeklenmektedir. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Meşelik yerleşkesi Pinus sp. ormanlık alanından temin edilmiştir. *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* Eskişehir'den temin edilmiştir. Toplanan bitkiler seraya getirilerek topraklarından ayrıldıktan sonra 13 cm derinliği olan torf/perlit/kum karışımı (1:1:1) içeren 3 litrelik plastik saksılara dikilmiştir. Seradaki saksılarda fazla bekletilmeden *in vitro* koşullarda kültüre alma çalışmaları yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yüzey Sterilizasyonu

Eksplant olarak *Crocus* türlerinin soğanları kullanılmıştır. *Crocus* türlerinin soğanları topraktan çıkartıldıktan sonra yapraklar ve çiçekler ayrılmış, soğanların kabukları soyulmuştur. Kabukları çıkarılmış soğanlar, musluk suyu altında 30 dk. bekletildikten sonra %0,1'lik $HgCl_2$ çözeltisinde 10 dk. bekletilmiş ve daha sonra steril su ile bir kaç kez yıkanmıştır. Steril kabin içerisine alınmış olan eksplantlar, %70'lik ETOH'da 1 dk. bekletildikten sonra steril saf su ile yıkanmış, daha sonra %20'lik NaOCl (Sodyum hipoklorid)'de 15 dk. çalkalanarak bekletilmiştir. Steril saf su ile 4-5 kez yıkanmış olan bitkilerin yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.4).

Crocus pallasii ssp. *pallasii* türünde belirtilen yüzey sterilizasyon protokolüne ek olarak kabukları ayrılan soğanlar antibakteriyel sıvı sabunla yıkanmış ve $HgCl_2$ miktarı iki katına (%0,2) çıkarılmıştır.



Şekil 3.4. *Crocus* soğanları için uygulanan yüzey sterilizasyon protokolü, A) Çeşme suyu altında 30 dk. bekletme, B) *Crocus pallasii* spp. *pallasii* soğanlarının sterilizasyonunda kullanılan antibakteriyel sabun ile yıkama C) %0,1' lik $HgCl_2$ de 10 dk.bekletme, D)% 70'lik alkolde bekletilen *Crocus* soğanları, E) % 20'lik NaOCl'de bekletilen *Crocus* soğanları, F) Yüzey sterilizasyonu yapılmış olan ve steril saf suda bekletilen soğanlar.

3.2.2. Kallus ve Somatik embriyo geliştirme ortamı

Eksplantlar karanlık ortamda, oda sıcaklığında (24-25°C), farklı büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarını içeren (2,4-D, BA, NAA ve Kinetin) (Çizelge 3.2) katı MS ortamında kültüre alınmışlardır (Şekil 3.5). Soğan eksplantlarından embriyojenik kallus oluşumu, 6 hafta içerisinde gerçekleşmiştir. Bu aşamadan sonra 4 hafta daha aynı büyüme düzenleyicilerini bulunduran besi yerlerinde alt kültüre alınmıştır. Somatik embriyolar, belirgin hale gelene kadar aynı MS ortamı kullanılmıştır. *Crocus sativus* L. bitkisinde yapılan çalışmada bitkinin aşırı fenolik salgılaması üzerine 1g L⁻¹ PVP (Polyvinyl-pyrrolidone) kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Crocus soğanlarının somatik embriyo gelişim ortamlarına aktarılması
A) Soğanların küçük parçalara ayrılması, B-C) Soğanların besi yerlerine yerleştirilmesi.

3.2.3. Farklılaşma ve Çimlenme

Eksplantlar, son 4 haftalık kültür periyodunun ardından, farklılaşma ortamlarına aktarılmıştır (Çizelge 3.3). Bu safhada, embriyolar ayrılarak bireysel olarak hormon içermeyen farklılaşma ortamlarında kültüre alınmıştır. Somatik embriyolar 22-25°C'de ve 16 saat fotoperiyodisite gösteren büyütme odası koşullarında gelişerek 3-5 mm büyüklüğe ulaştıkları ve kök ve kotiledon yapraklarını içerdikleri gözlenmiştir.

Çimlenmiş embriyolar, gelişip iyi bir kök sistemi ve gerçek yaprakları oluşturan kadar, her 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Bitkicikler, hormonsuz ortama transfer edildikten 2-4 ay sonra alıştırma aşamasına geçilmiştir. Somatik embriyolar elde edildikten sonra teker teker ayrılarak sayılacaktır.

Çizelge 3.1. Kallus geliştirme ortamı (MS Besi Yeri İçeriği)

Makro elementler	mgL ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	mgL ⁻¹
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ x 1H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	10.6
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
Sukroz	60
pH	5.8
2,4-D	(0-0,5-1-2 mgL ⁻¹)
BA	(0-0,5-1-2mgL ⁻¹)
Kin	(0-0,5-1-2 mgL ⁻¹)
NAA	(0-0,5-1-2 mgL ⁻¹)
Gelrite	4.5 gL ⁻¹
PVP	1 gL ⁻¹

Çizelge 3.2. Embryogenik Kallus Oluşumu için Kullanılan Büyüme Düzenleyicileri Konsantrasyonları

Hormon No	NAA (mgL ⁻¹)	BA (mgL ⁻¹)	Hormon No	NAA (mgL ⁻¹)	Kinetin (mgL ⁻¹)	Hormon No	2,4-D (mgL ⁻¹)	BA (mgL ⁻¹)	Hormon No	2,4-D (mgL ⁻¹)	Kinetin (mgL ⁻¹)
1	0	0.5	16	0	0.5	31	0	0.5	46	0	0.5
2	0	1	17	0	1	32	0	1	47	0	1
3	0	2	18	0	2	33	0	2	48	0	2
4	0.5	0	19	0.5	0	34	0.5	0	49	0.5	0
5	0.5	0.5	20	0.5	0.5	35	0.5	0.5	50	0.5	0.5
6	0.5	1	21	0.5	1	36	0.5	1	51	0.5	1
7	0.5	2	22	0.5	2	37	0.5	2	52	0.5	2
8	1	0	23	1	0	38	1	0	53	1	0
9	1	0.5	24	1	0.5	39	1	0.5	54	1	0.5
10	1	1	25	1	1	40	1	1	55	1	1
11	1	2	26	1	2	41	1	2	56	1	2
12	2	0	27	2	0	42	2	0	57	2	0
13	2	0.5	28	2	0.5	43	2	0.5	58	2	0.5
14	2	1	29	2	1	44	2	1	59	2	1
15	2	2	30	2	2	45	2	2	60	2	2

Çizelge 3.3. Farklılaşma ve çimlenme besi yeri

Makro elementler	mgL ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	mgL ⁻¹
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ x 1H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	10.6
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
Sakkaroz	60
Ph	5.8
	grL ⁻¹
Gelrite	4.5 gL ⁻¹
PVP	1 gL ⁻¹

3.2.4. Histolojik analizler

Deneme sonucunda kallus oluşum aşamalarında belirlenen en iyi konsantrasyonda (2 mg L⁻¹ 2,4D + 1 mg L⁻¹ 2İp) histolojik analizler için tekrar bir deneme kurulmuştur. Analizler için örnekler, 7, 14, 21 ve 28. günlerde alınmıştır.

3.2.4.1. Eksplantların Fiksasyon Solüsyonu İçerisine Alınması

Eksplantlar hiçbir işlem yapılmadan, ilk olarak hücresel gelişimlerinin incelenmesi amacıyla fiksasyon (FPA:formaldehit: propiyonik asit: alkol) (900 ml %70'lik alkol + 50 ml propiyonik asit +50 ml formaldehit) solüsyonu içerisine alınmıştır.

3.2.4.2. Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması

Fiksasyon solüsyonundaki eksplantlar, parafinleme için Johansen alkol konsantrasyonlarından geçirilmiştir (Çizelge 3.4).

Örnekler, parafin bloklar içerisine yerleştirilmeden önce sırasıyla %70, %85, %95, %100' lük Johansen çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.

In vitro'dan alınmış, FPA solüsyonu içerisinde bekletilmiş olan örnekler, her bir alkol serisinde yaklaşık 2 saat bekletilerek vakum altında 30- 35 dakika süreyle havaları alınmıştır. Daha sonra, tersiyer butil alkol (TBA-1) sıvısı içerisinde 1 gece, TBA-2 ve TBA-3 sıvıları içerisinde 3'er saat bekletilmiş ve petri kapları içerisinde 60-65°C'de eritilen sıvı parafin içerisine konulmuştur. Etüvde 60-65°C'de 2-3 gün süreyle tutulduktan sonra, etüv dışına alınmış, buz üzerinde hızla soğumaya bırakılmış ve sertleşmesi sağlanmıştır.

3.2.4.3. Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması

Örneklerin üzerindeki fazla parafin kesilip ayrıldıktan sonra, tahta bloklar üzerine yine parafin yardımı ile yapıştırılmıştır. Rotasyon mikrotom kullanılarak, tahta bloklar üzerine alınan örneklerden 8 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitlerin etiketleme işlemi, lamların kenarlarına yapılmıştır. Kesitlerin lamların üzerine yapışmasını sağlamak amacıyla daha önceden hazırlanmış olan 1:1 oranındaki yumurta akı: gliserin karışımından oluşan sıvı, lamların üzerine sürülmüştür. Daha sonra, örneklerden alınan kesitler lamlara yerleştirildikten sonra 35-40 °C sıcaklığındaki sıcak yüzey (hot plate) üzerine konulmuştur. Sıcak yüzey

üzerindeki her bir lam'a bir damlalık yardımıyla saf su ilave edilmiştir. Bu yolla kesitlerin su yüzeyinde yüzmesi ve sıcaklığın yardımıyla suyun parafini gergin duruma getirmesi ve suyun buharlaşmasıyla birlikte kesitlerin lam üzerine gergin bir vaziyette yapışması sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra, lam üzerindeki kesitler bir gece boyunca 30-35 °C'deki etüv içerisinde bekletilmiştir.

Çizelge 3.4. Johansen Karışımları (Stösser ve ark., 1985)

Alkol Karışım Konsantrasyonları (%)	Saf su (ml)	%96'lık Etil alkol (ml)	Tersiyer Bütil alkol (ml)
%70	300	500	200
%85	100	500	350
%95	—	450	550
%100	—	200	800

3.2.4.4. Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanması

Lamlar, lam taşıyıcıları üzerine yerleştirilmiş ve 10'er dk. ksilol-1, ksilol-2' de bekletilmiş, parafinin erimesi ve örneklerden ayrılması sağlanmıştır. Bu aşamada örnekler, ilk olarak izopropil alkol-1 ve izopropil alkol-2'de 5'er dk., daha sonra % 96'dan başlayarak sırasıyla % 70, % 40 ve % 20 olacak şekilde dereceleri azalan alkol küvetlerinde ve son olarak da saf su içerisinde 3'er dk. bekletilmiştir.

Bu işlemlerin sonunda örneklerin boyanması işlemine geçilmiştir. Boyama işlemi için hematoksilin boya çözeltisi kullanılmıştır. Hematoksilin boya çözeltisini hazırlamak için; 1 g hematoksilin, 6 ml etil alkol içerisinde eritilmiştir. Ayrıca, 12.5 g KAl_3SO_4 (potasyum alüminyum sülfat) 100 ml suda eritilip ve bu suya 0.18 g $KMnO_4$, 25 ml gliserin ve 25 ml metanol eklenmiş ve bundan sonra önceden eritilen hematoksilin ile karıştırılarak stok çözeltisi hazırlanmıştır. Boyama işlemi için 1 birim stok çözelti, 10 birim saf suyla seyreltilerek kullanılmıştır. Örnekler, boyama sıvısı içerisinde 30 dk., daha sonra su dolu bir kap içerisinde hafif akan çeşme suyu altında 15 dk. bekletilmiştir. Daha sonra boyanan örnekler başlangıçta izlenen alkol

serilerinden ters yönde yeniden geçirilmiştir. Bu amaçla boyanan örnekler % 20, % 40, % 70, % 96'lık alkolde yine 3'er dk. ve izopropil alkolde 5'er dk. bekletilerek ayrı bir ksilol kabı içerisine alınmıştır. Ksilol kabı içerisinden alınan lamaların üzerindeki ksilol iyice süzölmüş ve üzerlerine entellan yapıştırıcı damlatılarak birer lamel ile kapatılmıştır. Bu şekilde devamlı preperat haline getirilen örnekler, 30°C'deki etüvde bekletilerek incelemeye hazır hale getirilmiştir (Eti, 1987).

3.2.4.5. İncelenen Kriterler ve Deneme Planı

Yapılan çalışmada eksplantların kallus geliştirme ortamlarına alındıktan kallusların oluşmaya başladığı aşamaya kadar geçen sürede kallusa dönüşüm oranları yüzde olarak hesaplanmıştır. Kallusların yapısı kallus oluşumunun 4. haftasından itibaren makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. Kallusların rengi, ve genel durumları belirlenmiştir. Kallusların bitkiye dönüşüm oranları incelenmiştir.

Deneme her konsantrasyonda 5 tekkürrür (5 petri), her tekerrüde 4 eksplant olacak şekilde faktöriyel düzende tesadüf blokları deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen yüzde (%) değerlere açı transformasyonu yapıldıktan sonra SPSS 15.0 paket programı kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırma sonunda üç türe ait bulgular ayrı ayrı sunulmuştur.

4.1. *Crocus sativus* L.' a Ait Rejenerasyon ve Histolojik Analiz Bulguları

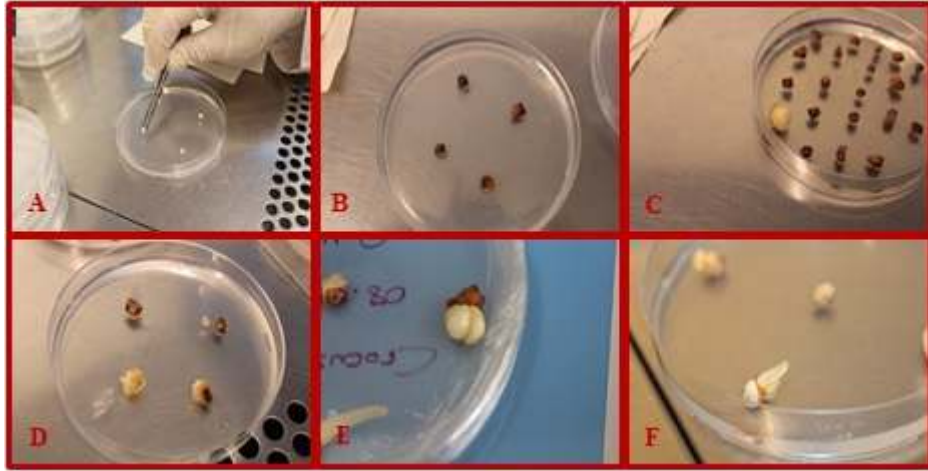
4.1.1. *Crocus sativus* L. Soğanlarının Yüzey Sterilizasyonu

Tez çalışmasında, *Crocus sativus* L. soğanları, zar, yaprak ve çiçeklerinden ayrıldıktan sonra 30 dk. musluk suyu altında %0,1'lik $HgCl_2$ 'de 10 dk., %70'lik EtOH'da 1 dk., %20'lik NaOCl'de 15 dk. bekletilerek sterilizasyonda %100 başarı sağlanmış, kontaminasyon problemi ile karşılaşılmamıştır. Bu nedenle sterilizasyonda farklı yöntemlere başvurulmamıştır.

4.1.2. *Crocus sativus* L. Türünün Kallus Oluşturma ve Somatik Embriyo Geliştirme Bulguları

Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış olan *Crocus sativus* L. soğanları, farklı konsantrasyonlarda (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg L⁻¹) oksin ve sitokinin (NAA, BA, 2,4 D, 2iP) kombinasyonlarını içeren MS besi yerinde kültüre alınmış, kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil4.1).

Yapılan çalışmada, farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlarda, kallus gelişim oranları istatistiksel olarak değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.1).



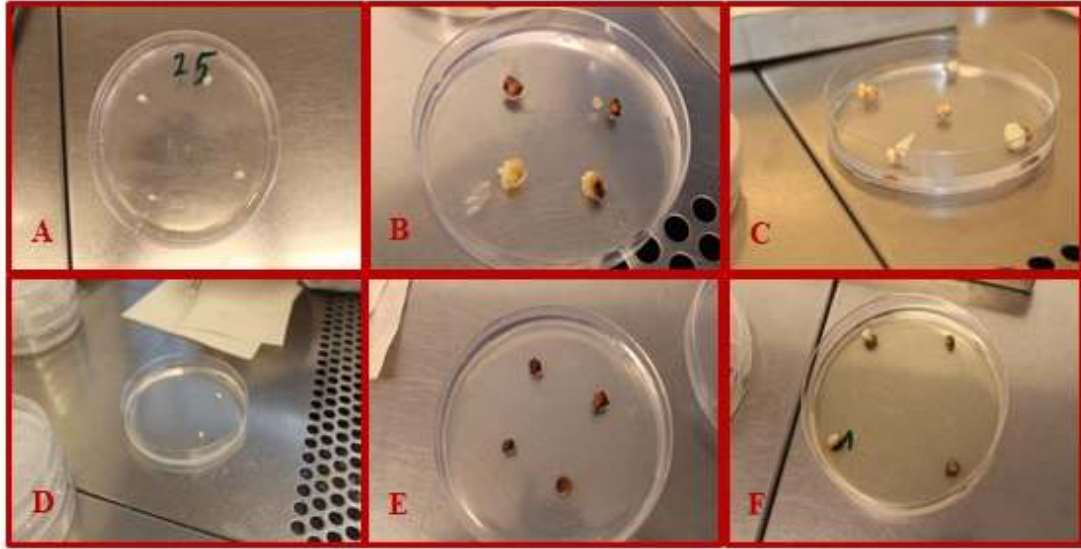
Şekil 4.1. *Crocus sativus* L. türünde embriyojenik olmayan kallusların rejenerasyonu.

A) Eksplantların ortamlara alınma aşaması, B) Eksplantların 3. haftada gösterdikleri gelişim, C) Eksplantların 3. haftadan itibaren oluşturdıkları embriyojenik olmayan kallus yapıları, D) Kallusların rejenerasyonu, E) Kallus yapılarının soğana dönüşümü (6.hafta), F) Eksplantların tam soğan görünümü alması (7. hafta).



Şekil 4.2. A) Kallusların 4. haftadaki gelişimleri, B) *Crocus sativus* L. bitkisi kalluslarının şeffaf ve yumuşak olduğu safha, C) Embriyojenik kallusların oluşumu, D-E) Embriyojenik kallusların somatik embriyolara dönüşümü, F) *Crocus sativus* L. bitkisinde somatik embriyolar, G) Aynı eksplant üzerinde farklı safhalardaki embriyo oluşumları, H) Somatik embriyoların globular(G) ve kalp safhaları(K), I) Eksplanttan ayrılmış globular ve kalp safhasındaki embriyolar

Yapılan ön denemelerde materyal ve metoddaki belirtilen protokole ek olarak farklı oksin ve sitokinin denemeleri de yapılmıştır. Bu denemelerde 4 haftalık süreçte kinetin içeren besi yerlerine oranla 2iP (2 mg L^{-1} 2,4D + 1 2iP mg L^{-1}) içeren besi yerlerinde daha kısa sürede kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil.4.3.). 2iP içeren besi yerinde 2. haftadan itibaren kallus oluşumları gözlenirken, kinetin içeren besi yerinde kallus oluşumlarının 3-4. haftalar arasında gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu nedenle kinetin yerine 2iP'nin kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil.4.3).



Şekil 4.3 Ön çalışma denemelerinde 2iP ve kinetin arasındaki haftalık gelişme farkları, A) 2iP içeren besi yerinde 1. haftadaki gelişme, B) 2iP içeren besi yerinde 3. haftadaki kallus oluşumu, C) 2iP içeren besi yerinde 6. haftada rejenerasyon ve soğana dönüşüm, D) Kinetin içeren besi yerinde 1. haftadaki görünüm, E) Kinetin içeren besi yerinde 3. haftadaki görünüm, F) Kinetin içeren besi yerindeki 5. haftadaki kallus oluşumları.

Çalışılan 60 büyüme düzenleyici içeren konsantrasyonun yüksek oranda oksin içeren 34'ünde kallus ve somatik embriyo gelişimi gözlenirken, diğer 26 kombinasyonda hiçbir şekilde gelişim gözlenmemiştir. Gelişme gözlenmeyen besi yerlerindeki eksplantlar siyahlaşarak ölmüşlerdir.

Yapılan çalışmalar sonucunda; en yüksek kallus gelişim yüzdesi %100 ile 2 mg L⁻¹ 2,4 D + 1mg L⁻¹ 2iP içeren besi yerinde gözlenmiştir (Çizelge 4.1). En düşük kallus gelişim oranı ise 1mg L⁻¹ NAA+ 0 mg L⁻¹ BA, 2 mg L⁻¹ 2,4D + 0 mg L⁻¹ 2iP, 0,5mg L⁻¹ 2,4D + 1 mg L⁻¹ 2iP, 0 mg L⁻¹ 2,4D + 1 mg L⁻¹ 2iP, 2 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ BA, 1mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ 2iP, 2mg L⁻¹ 2,4D + 0 mg L⁻¹ BA, 1mg L⁻¹ NAA + 0 mg L⁻¹ 2iP, 0,5mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ 2iP, 0 mg L⁻¹ NAA + 1 mg L⁻¹ BA, 2mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ BA, 1mg L⁻¹ NAA + 0,5 mg L⁻¹ BA ve son olarak 0,5 mg L⁻¹ NAA + 1mg L⁻¹ BA içeren konsantrasyonlarda % 5 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Kallusların 3. haftadan itibaren gelişim gösterdiği gözlenmiştir. Bu bulgular histolojik analiz çalışmaları ile de desteklenmiştir. Somatik embriyoların ise 8. haftadan sonra net olarak oluştuğu belirlenmiştir.

George ve ark. (1992), *Crocus sativus* L. bitkisi ile yapmış oldukları somatik embriyogenesis çalışmalarında farklı büyüme düzenleyicilerini (2,4D ve kinetin) kullanarak denemelerini kurmuşlardır. Somatik embriyo gelişimi, yapılan tez çalışması ile paralel olarak 2 mg L⁻¹ 2,4D + 0,5 mg L⁻¹ kinetin içeren besi yerinden elde edilmiştir. Tez çalışmasında kinetin yerine sitokinin olarak 2iP kullanılmış ve 2 mg L⁻¹ 2,4D ve 1 mg L⁻¹ 2iP büyüme düzenleyicilerini içeren besi yerinde yaklaşık %100 oranında etkili somatik embriyo gelişimi gözlenmiştir.

Bhagyalakshmi (2000), ise yapmış olduğu çalışmada, *Crocus sativus* L. bitkisinin ovaryumlarından, NAA ve BA içeren MS besi yerinde rejenerasyon gözlemiştir. Yapılan çalışmada farklı olarak, besi yerlerine 400 mg L⁻¹ askorbik asit ilave etmiş ve rejenerasyonda askorbik asidin yüksek derecede etkili olduğunu belirtmiştir. Mir ve ark. (2011), *Crocus sativus* L. bitkisinin soğanlarını eksplant kaynağı olarak kullanmış, mikrokorm ve stigma benzeri yapılar elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, NAA ve BA büyüme düzenleyicilerini kullanarak etkili rejenerasyonu gözlemişlerdir. Tez çalışmasının aksine yüksek oranda sitokinin içeren besi yerlerinde gelişmenin daha etkili olduğunu saptamışlardır.

Çalışmada gelişen eksplantlardaki kallusların yapıları gelişme aşamalarına göre 1-12. haftalar arasında makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. Elde edilen kallusların genelde kahverengi olduğu ve yapılarının yumuşak olduğu saptanmıştır. Mikroskobik incelemeler sonucunda ise kallusların genelde apikal tomurcuk barındıran yüzeylerden, parlak renkli şekilde oluştukları gözlenmiştir (Şekil4.4).



Şekil 4.4. A) Kallus oluşumlarının apikal tomurcuklarda meydana gelmesi. B) Kallusların başlangıç aşamasında renklerinin açık sarı ve saydam olması. C) Açık sarı yapıların zamanla kahverengiye dönüşmesi

Mikroskopik yapılar incelendiğinde ise, başlangıçta oluşan kallusların şeffaf renkte oldukları ve haftalık gözlemler sonucu yapılan incelemelerde şeffaf ve yumuşak olan kısımların kahverengileştiği ve sertleştiği gözlenmiştir. Kalluslar sıkı şekilde yapılanmış olup, embriyojenik olanlar sertleşmeye başlamışlardır (Şekil4.4).

Karamian ve Ebrahimzadeh (2001), LS ortamında BA-NAA ve kinetin- 2,4D bitki büyüme düzenleyicilerini kullandıkları çalışmada embriyojenik olmayan kallusların besi ortamı yüzeyine daha yayılmış şekilde olduğunu, embriyojenik olanların ise kompakt yapıda olduklarını gözlemişlerdir. Yapılan tez çalışmasında yüzeye yayılan kalluslar görülmemiş olup, embriyojenik olan ve embriyojenik olmayan kallusların kompakt yapıda oldukları saptanmıştır. Bu tez çalışması sonuçlarına paralel olarak, Karamian ve ark. (2001), George ve ark. (1992), Ahuja ve ark. (1994), elde ettikleri *Crocus sativus* L. kallus yapılarının gelişme aşamalarında renklerinin sarıdan kahverengiye dönüştüğünü gözlemişlerdir.

Karamian (2007), yapmış olduğu çalışmada *Crocus sativus* L. bitkisinde 2,4D ve kinetin içeren MS besi yerinde kallus gelişimlerini gözlemiş, embriyojenik olmayan kallusların yumuşak ve saydam olduğunu, embriyojenik olanların ise tanecikli olduğunu belirlemişlerdir. Kallusların gelişimleri boyunca renklerinin sarıdan kahverengiye dönüştüğünü gözlemişlerdir. Yapılan tez çalışmasında da benzer bulgulara rastlanmıştır.

Somatik embriyoların mikroyumrulara dönüşümleri, yüzde değer olarak hesaplanmıştır. Yüzde değerler eksplant başına oluşan somatik embriyoların, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerlerine ayrılarak alındıktan sonra oluşan sürgün sayısına göre hesaplanmıştır. Somatik embriyolardan en yüksek oranda

soğan ve sürgünlerin oluşturulduğu ortamlar; %60 ile 2 mg L^{-1} NAA + 2 mg L^{-1} BA içeren ortamlardan elde edilmiştir (Şekil.4.5) 2 mg L^{-1} NAA + 1 mg L^{-1} BA içeren ortamlardan ise % 50 oranında soğan ve sürgün gelişimleri gözlenmiştir. Somatik embriyogenesis aşamasından sonra mikroyumruların soğana ve sürgüne en az dönüştüğü besi yeri ise % 5 ile $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2.4D ve $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP içeren ortam olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasında eksplant başına düşen somatik embriyo sayısı 1 mg L^{-1} 2.4D ve 1 mg L^{-1} 2iP içeren besi yerinde ortalama olarak 130 adet olarak gözlenmiştir. Somatik embriyolar, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerine alınırken, birbirlerinden ayrılarak her biri teker teker alınacak şekilde ortamlara yerleştirilmiş ve kültüre alınırken bir eksplanttaki somatik embriyolar sayılmıştır (Şekil 4.5.). Gelişme gözlenen farklı bitki büyüme düzenleyicisi içeren ortamlardaki eksplantlardan da örnekler alınarak somatik embriyo sayısı karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda farklı büyüme düzenleyicilerini içeren besi yerlerinde çok yüksek oranda fark gözlenmemiştir. Oluşan kallus alanına bağlı olarak az sayıda rakamsal farklılıklar saptanmıştır.

Çizelge 4.2. *Crocus sativus* L. türünde somatik embriyoların sürgüne dönüşme yüzdeleri.

En yüksek dönüşüm gözlenen besi yeri	Orta seviyede dönüşüm gözlenen besi yeri	En düşük dönüşüm gözlenen besi yeri
$(2 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA} + 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA})$ %60	$(2 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA} + 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA})$ %50	$(0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2.4D ve } 0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ 2iP})$ %5

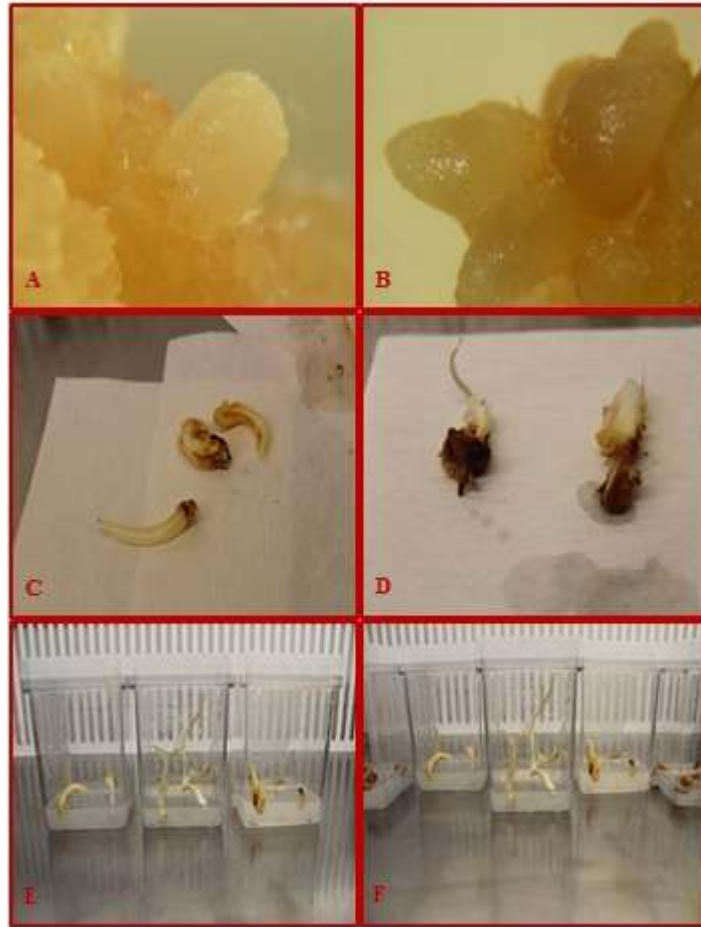


Şekil 4.5. A) Somatik embriyo sayısının belirlenmesi için seçilen örnek, B) Somatik embriyoların ayrılması, C) Somatik embriyoların sayılması.

Yapılan tez çalışmasında, elde edilen somatik embriyolar daha sonra çimlendirme ortamı olarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerine aktarılmışlardır. Vivancos ve ark. (2011), yapmış oldukları rejenerasyon çalışmasında ise elde ettikleri kallusları 5 mg L^{-1} BA içeren MS ortamında çimlendirmişlerdir. Demeter ve ark. (2010), *Crocus heuffelianus* bitkisinden elde ettikleri somatik embriyoları, büyüme düzenleyicisi içermeyen besi yerinde kültüre almışlardır. Yaptıkları çalışmada yüksek sitokinin (BA) düzeyinin somatik embriyoları çimlendirmede etkili rol oynadığını gözlemlemişlerdir. Genel olarak bakıldığında çalışmalarda bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi yerlerinde çimlenme gözlenmiştir. Tez çalışmasında, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi yerinin çimlenmede etkili olduğu saptanmıştır.

Somatik embriyoların farklılaşma aşamaları, alınan haftalık gözlemler sonucunda değerlendirilmiştir (Şekil.4.5). Yapılan mikroskopik çalışmalarda, embriyoların globular, kalp, torpedo safhalarından sonra mikroyumurulara dönüştüğü gözlenmiştir (Şekil.4.6). Aynı eksplant üzerindeki embriyoların gelişim aşamalarında zamana bağlı olarak şekilsel farklılıklar saptanmıştır. Yapılan tez çalışması sonucunda, büyüme düzenleyicisi içermeyen besi yerinde somatik embriyolardan gelişen mikroyumrulara soğan zarı oluşumu gözlenmemiştir (Şekil.4.6). Soğan zarının oluşmamasının nedeni bitkinin yeteri kadar soğuğa maruz kalmadığından dolayı olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla akklimatizasyon çalışmaları gerçekleştirilememiştir. Svanesan ve ark. (2011), *Crocus vernus* türünde yapmış oldukları çalışmada sürgün elde etmişler fakat elde ettikleri bitkiciklerin akklimatizasyonunu gerçekleştirilememişlerdir. Morata ve ark.(2013), *Crocus sativus* L. türünde yapmış oldukları çalışmada yüksek oranda sitokinin ve 9 aylık soğuk

uygulamasına tabii tutulan *Crocus* soğanlarının, *in vitro* sonrası aklimatizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Soğuk uygulamasının *in vitro*'da oda (25 °C) koşullarındaki iklimlendirme odalarında besi yerlerinde kültüre alınan mikro yumrulara oranla daha fazla sürgün verdiğini ve aklimatizasyon için daha uygun bitkicikler geliştiğini gözlemişlerdir.

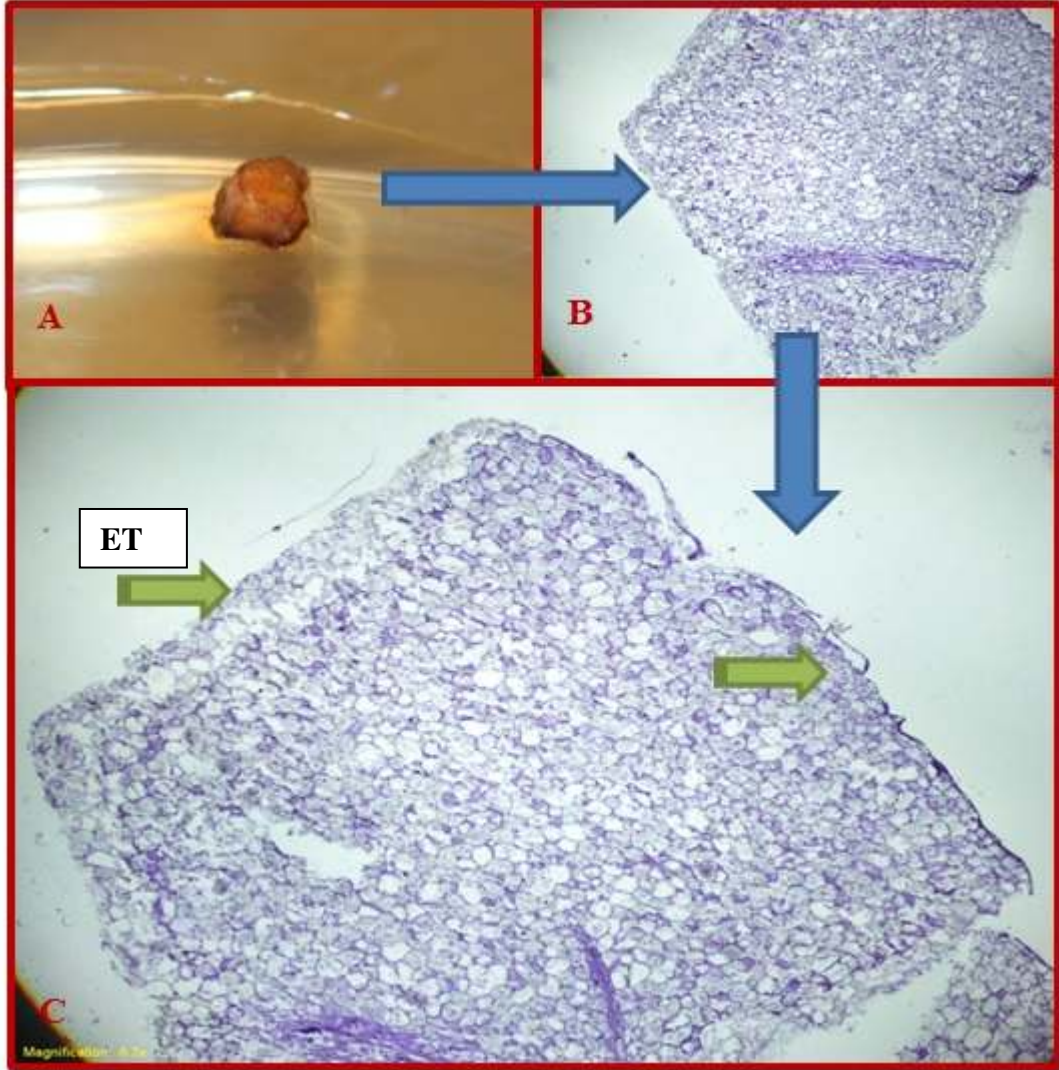


Şekil 4.6. A-B) Somatik embriyoların torpedo safhaları, C-D) Somatik embriyoların bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi yerinde kültüre alınması, E-F) Bitkiciklerin oluşumu.

4.1.3. *Crocus sativus* L. Histolojik Analiz Bulguları

Yapılan analiz sonucunda, kallus yapılarının 2 mg L^{-1} 2,4D + $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ MS ortamında gelişen eksplantlarda, 21. günde başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.7, Şekil4.8, Şekil.4.9). Winkelmann ve ark. (2010)'larının yaptığı çalışmada ise kallus

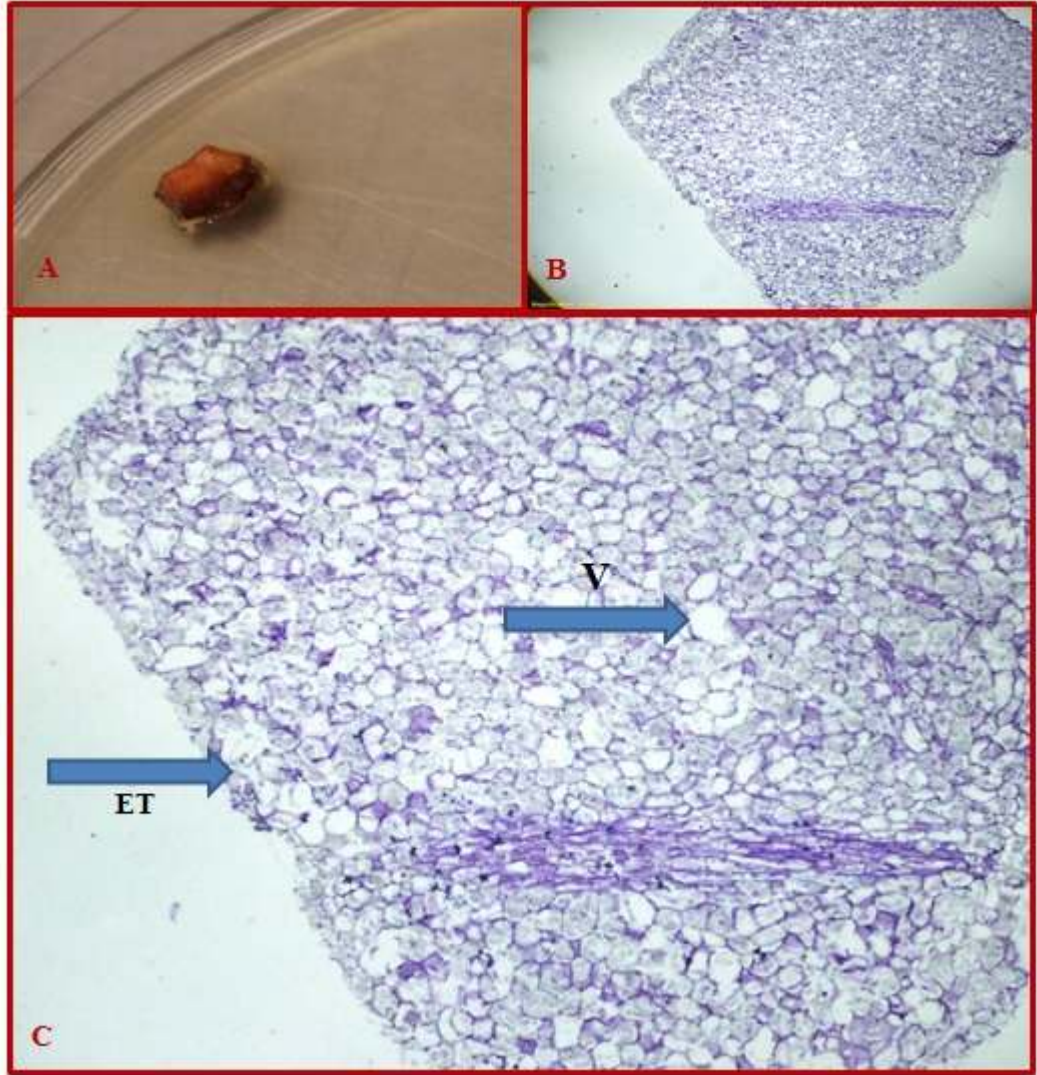
yapılarının 2 mg L^{-1} 2,4D + $0,8 \text{ mgL}^{-1}$ $\frac{1}{2}$ MS içeren ortamda gelişen eksplantlarda 14. günde meydana geldiği gözlenmiştir.



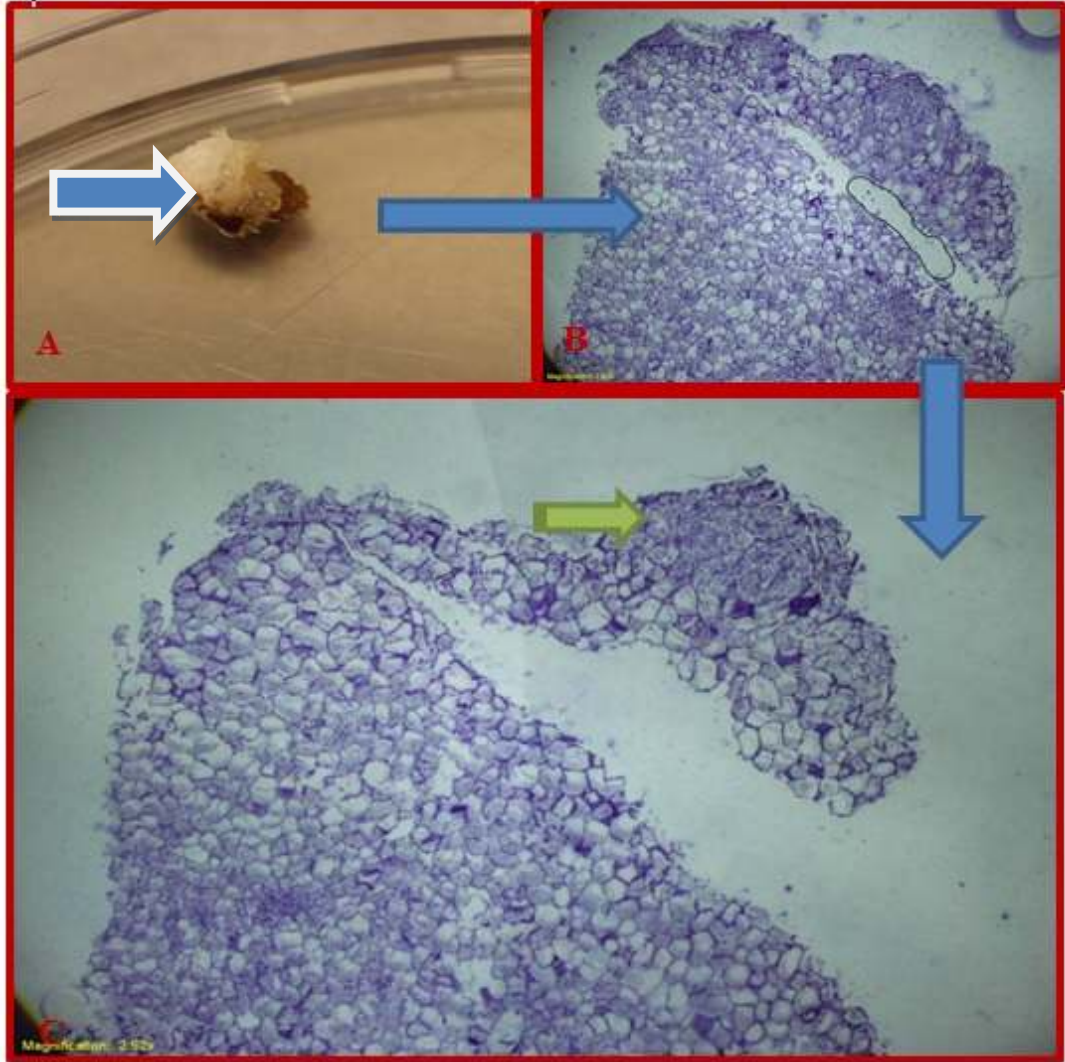
Şekil.4.7. A) Eksplantın 1. haftadaki gelişimi, B-C) Eksplantın histolojik görünümü .

Histolojik analizler sonucunda alınan görüntülerde, diğer dokulara oranla kallus dokularının daha düzensiz hücrelere sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil4.10). Kallus dokularındaki hücre zarlarının tam gelişmemiş ve yığın halinde oldukları belirlenmiştir. Kallus oluşumlarının büyük oranda kesit alınan eksplantların kenar kısımlarında yani dış tarafa bakan epidermal tabakada oluşmaya başladığı görüntülenmiştir.Yapılan çalışmada dokulardaki çoğalma bölgeleri tespit edilmiştir. Ayrıca eksplantlardaki kallus dokuları ile diğer dokular arasındaki vakuol

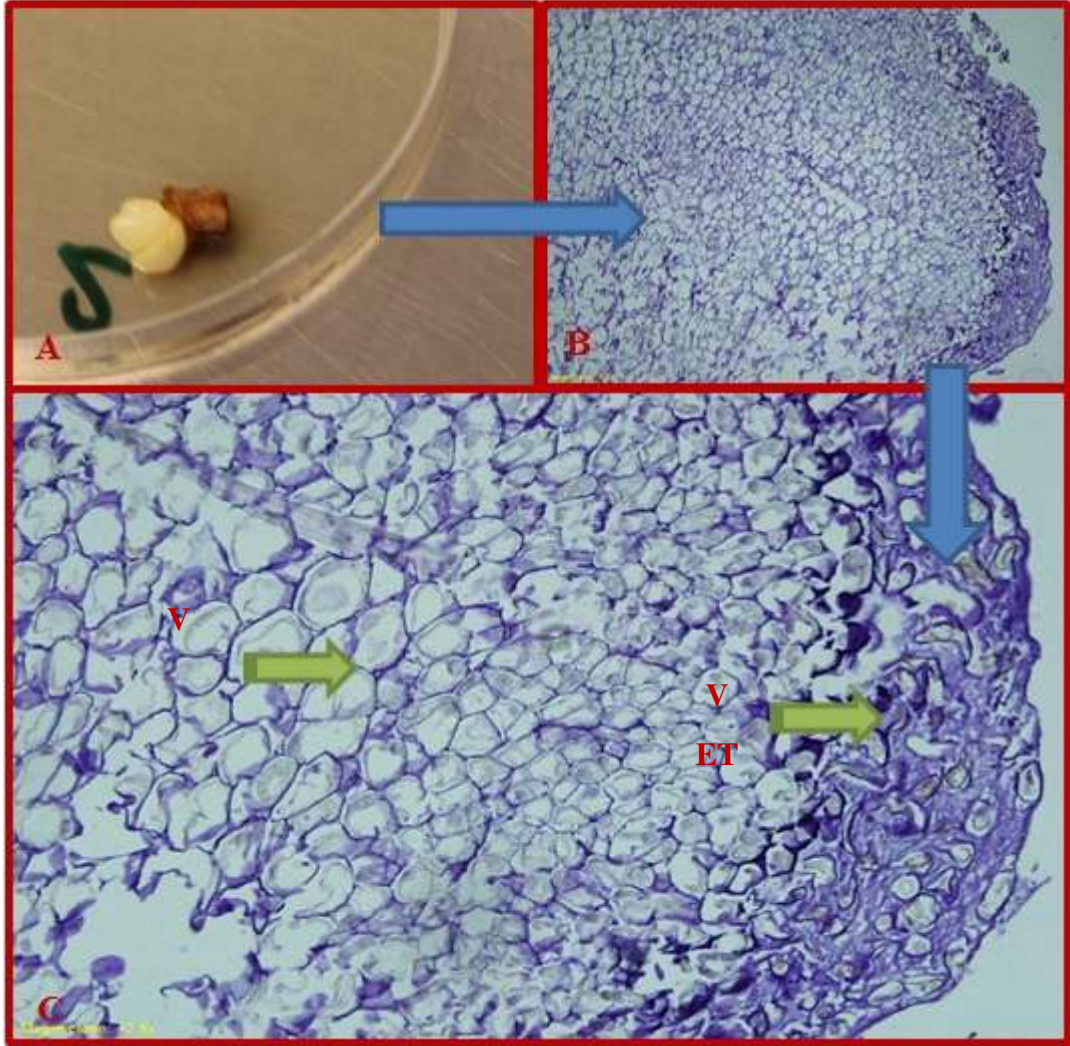
farklılıkları da gözlenmiştir (Şekil.4.9). Morata ve ark. (2013)'ları yapmış oldukları çalışmada meydana gelen kallusların dokularındaki farklılaşmaları histolojik çalışmalarla gözlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada, eksplantın yüzeyinde parankimatik ve epidermal hücrelerin farklılaşmalarının meydana geldiğini saptamışlardır. Araştırmacıların bulguları, yapılan bu tez çalışması ile büyük benzerlik göstermektedir. Eksplanttaki farklılaşmanın daha çok dış yüzeyde meydana geldiği ve kallus yapısının genelde eksplantın dış yüzeyinde olduğu gözlenmiştir (Şekil.4.9) (Şekil 4.10). Bunun nedeni ise eksplantların besi yerlerine yerleştirilmeden önce kesilirken oluşan yara dokuları ve apikal tomurcukların dış yüzeyde yer alması olarak düşünülmüştür.



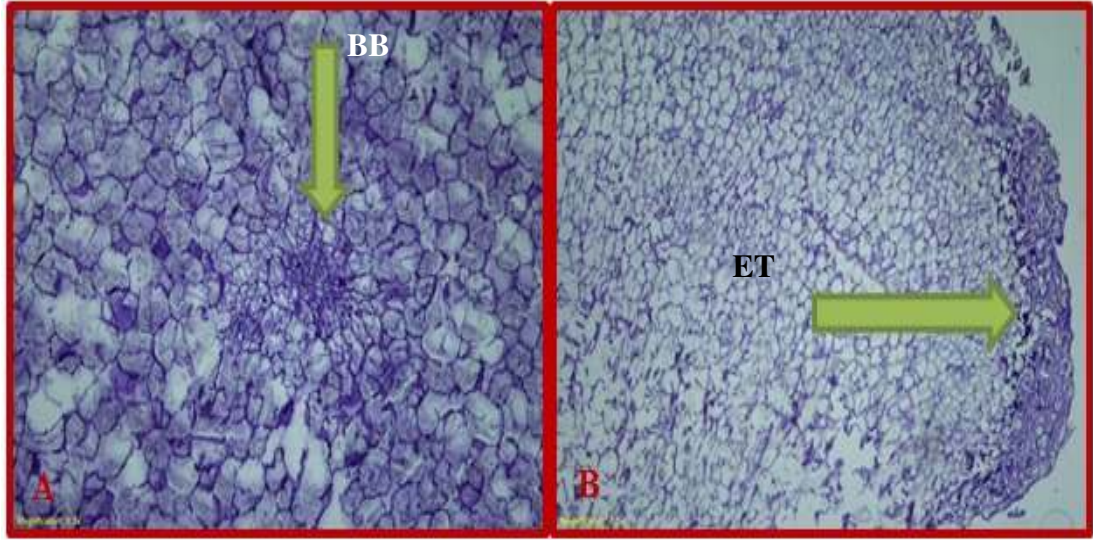
Şekil 4.8.A) Eksplantın 2. haftadaki gelişimi, B-C) Eksplantın histolojik görünüm,



Şekil 4.9. A) Eksplantın 3. haftadaki kallus gelişimi, B-C) Eksplantta oluşan kallus yapısının yığılmış hücreleri ve normal dokularının histolojik görüntüsü,



Şekil.4.10. A) Eksplantın 4.haftadaki kallus oluşumu, B-C) Oluşan kallus dokusunun yığılmış hücreleri ve normal doku ile vakuol (V) farklılıklarının histolojik görüntüsü,



Şekil 4.11. A) Eksplantta 3. haftada gözlenen büyüme bölgelerinin (BB) oluşumu, B) Epidermal tabakadan (ET) oluşan kallus oluşumlarının histolojik analiz görüntüleri

4.2.1. *Crocus pallasii* subs. *pallasii* Soğanlarının Yüzey Sterilizasyon Bulguları

Yapılan çalışmada, *Crocus pallasii* subs. *pallasii* türü için belirlenmiş olan protokol yetersiz kalmış, enfeksiyon problemi ile karşılaşmıştır. Enfeksiyonların genelde fungal kaynaklı olduğu gözlenmiştir. Eksplant kaynağı olarak toprak altı organının kullanılması ve dolayısıyla toprak içerisindeki mikroorganizmaların fungal etkilerinden dolayı enfeksiyon problemi ile karşılaşıldığı düşünülmüştür

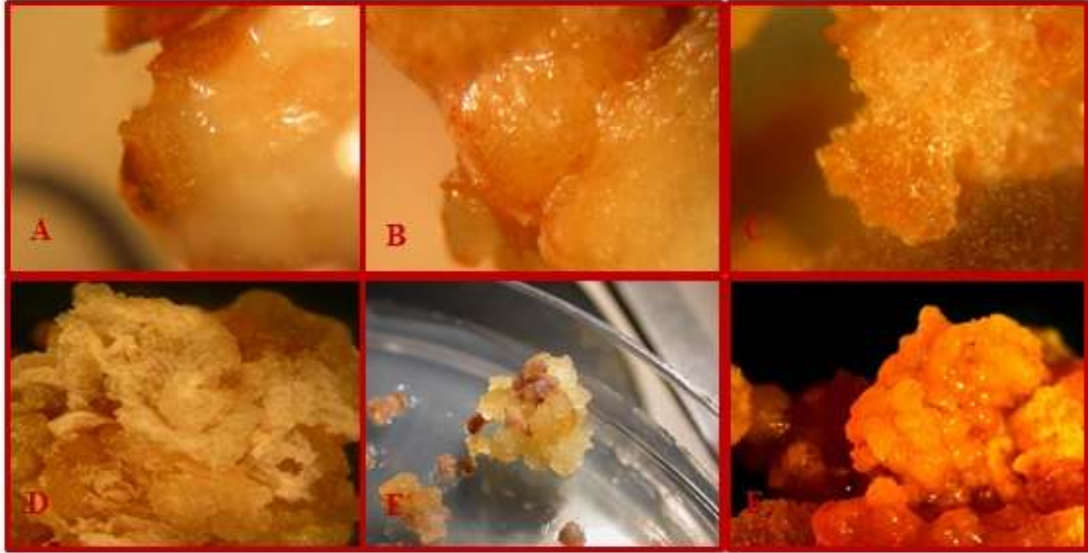
Enfeksiyon probleminin aşılması için materyal ve metodda belirtilen yönteme (30 dk. musluk altında, % 0,1'lik HgCl₂ de 10 dk., %70'lik EtOH da 1 dk. %20'lik NaOCl' de 15 dk.) ek olarak; zarlari, yaprakları ve çiçekleri ayrılmış olan soğanlar, çeşme suyu altına konulmadan önce antibakteriyel sabunla yıkanmıştır. Bu şekilde kurulan denemeler, enfeksiyon problemini azaltmış fakat kesin olarak ortadan kaldıramamıştır. Bundan dolayı yüzey sterilizasyon protokolünde belirtilen HgCl₂ miktarı iki katına çıkarılarak enfeksiyon problemi ortadan kaldırılmıştır. Yüzey sterilizasyon protokolü yeniden şekillendirilmiş ve *Crocus pallasii* subs. *pallasii* türüne ait yeni sterilizasyon protokolü geliştirilmiştir.

4.2.2. *Crocus pallasii* subs. *pallasii* Soğanlarının Somatik Embriyogenesis

Bulguları

Yüzey sterilizasyon aşamasında başarı sağlanan ve sterilizasyon protokolü geliştirilen *Crocus pallasii* subs. *pallasii* soğanları, farklı konsantrasyonlarda (0, 0.5, 1, 1.5, 2 mg L⁻¹) oksin ve sitokininlerle (NAA, BA, 2.4 D, 2iP) kombine edilmiş MS besiyeri yerinde kültüre alınmış, kallus oluşumu ve somatik embriyo gelişimleri gözlenmiştir (Şekil.4.12).

Yapılan çalışmada, bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarında kallus ve somatik embriyo gelişim oranları nitel olarak gözlenmiş olsada, toplanan eksplantların sterilizasyon denemelerinde büyük bir kısmının enfeksiyon oluşturması ve bu problemin aşılması çalışmalarında çok sayıda soğan harcanması nedeniyle istatistiksel analiz gerçekleştirilememiştir. Haftalık alınan gözlemler neticesinde bulgular yüzde olarak verilmiştir.



Şekil 4.12. A) *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* 'de 3. haftada kallus oluşumu, B-C) Kallusların renklerinin kahverengiye dönüşümü, kallusların gelişimi, D) Kallusların farklılaşması ve embriyojenik kallusa dönüşümü, E-F) Somatik embriyoların farklı safhalarının görünümü.

Crocus pallasii subs. *pallasii* soğanlarının somatik embriyogenesis çalışmalarında, *Crocus sativus* L. türüne benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Somatik embriyo denemelerinde, en etkili kallus gelişiminin, %75 oranı ile 2 mg L⁻¹ 2.4D + 2 mg L⁻¹ 2iP ve 2 mg L⁻¹ 2.4D + 1mg L⁻¹ 2iP içeren MS besisi yerinde elde edildiği gözlenmiştir. Kallus oluşumlarının yüksek olduğu diğer konsantrasyonlar ise % 50 ile 2 mg L⁻¹ NAA + 1 mg L⁻¹ 2iP ve 2 mg L⁻¹ 2.4D + 0 mg L⁻¹ BA içeren besisi yerleri olarak saptanmıştır (Şekil 4.12).

Demeter ve ark. (2010)' ları *Crocus heuffellainus* türü ile yapmış oldukları somatik embriyogenesis çalışmasında, Gambourg vitaminleri ve 10 mg L⁻¹ NAA ve 1mg L⁻¹ BA içeren MS besisi yerinde yüksek oranda embriyojenik kallus elde ettiklerini belirtmişlerdir. Yapılan tez çalışmasına benzer olarak oksin miktarı yüksek olan besisi yerinde embriyojenik kallus oluşumunun daha fazla olduğunu saptamışlardır (Şekil 4.12.). Yaptıkları çalışmada, rejenerasyonun yüksek oranda sitokinin içeren besisi yerlerinde oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

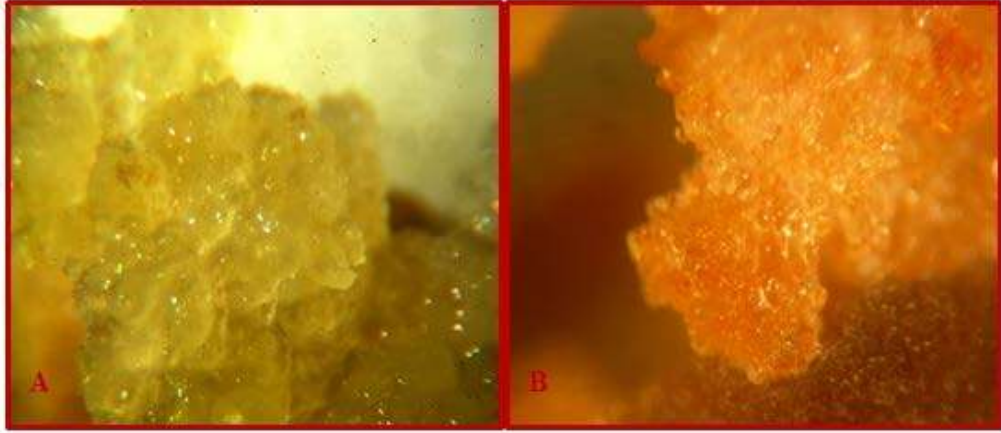
Crocus pallasii ssp. *pallasii* embriyojenik kallusların, *Crocus sativus* L. türündeki embriyojenik kalluslara oranla daha koyu renkte oldukları gözlenmiştir. Embriyojenik kallusların koyu kahverengiye yakın oldukları saptanmıştır. Ayrıca bu yapıların, embriyojenik olmayan kalluslara oranla daha sert yapıda oldukları ve bazılarının yüzeye yayılmış olup bazılarının ise daha kompakt yapıda oldukları gözlemlenmiştir. *Crocus pallasii* subs *pallasii* türünün kalluslarının, *Crocus sativus* L. bitkisinin kalluslarına oranla besin ortamı yüzeyine daha çok yayıldığı ve *Crocus sativus* L. bitkisine oranla daha koyu renkte olduğu saptanmıştır (Şekil.4.13).



Şekil 4.13. A) *Crocus sativus* L. soğanlarının embriyojenik kalluslarının renk görünümü, B) *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* soğanlarının embriyojenik kallus renginin görünümü.

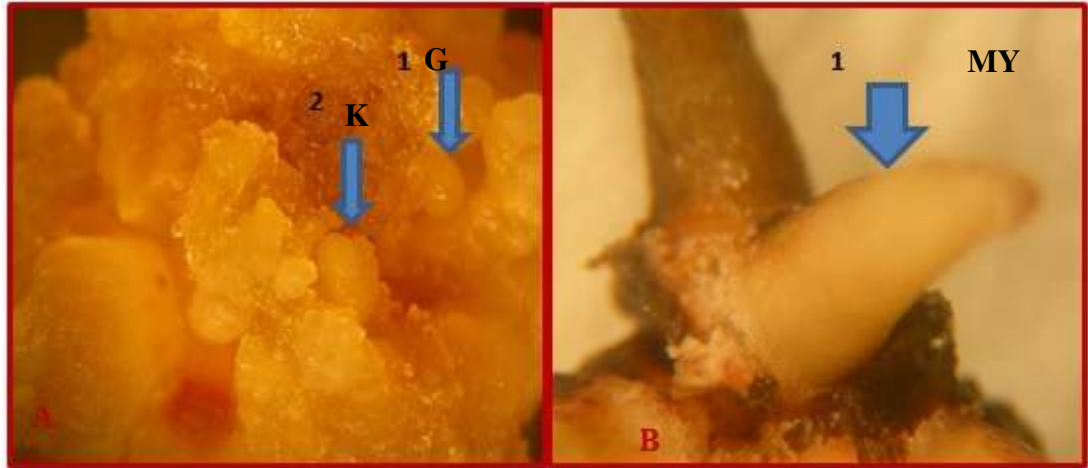
Mikroskopik açıdan bakıldığında ise, kallus oluşumlarının ilk haftalarda şeffaf oldukları ve ilerleyen zamanlarda açık kahverengi ve koyu kahverengi rengine dönüştükleri gözlenmiştir. Kallus oluşumlarının, apikal tomurcukların fazla olduğu dış yüzeyde geliştikleri saptanmıştır (Şekil 4.14).

Somatik embriyo çalışmasında, embriyoların 8. haftadan sonra globular, kalp ve torpedo aşamaları gözlenmiştir. Aynı eksplant üzerinde oluşan embriyoların zamanla farklı şekil aldıkları ve aynı hafta içerisinde globular, kalp ve torpedo aşamalarının görüldüğü belirlenmiştir. Somatik embriyoların safhaları ve bu safhalardan sonra mikroyumru oluşumları mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil.4.14. A) *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* soğanlarının başlangıç aşamasındaki şeffaf hali, B) Kallusların gelişim aşamasında renklerinin koyulaşması ve kahverengiye dönüşmesi

Eksplant başına düşen somatik embriyo, ortalama 90 adet olarak saptanmıştır. Eksplant başına düşen somatik embriyo sayısı, oluşan somatik embriyoların çimlendirilmek üzere büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besisi yerine alınırken teker teker ayrılarak sayılması ile bir eksplanttaki somatik embriyo sayısı baz alınarak hesaplanmıştır.



Şekil.4.15. *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* A) Globular safhadaki somatik embriyo (G) görüntüsü, A) Kalp safhasındaki somatik embriyo (K), B) Somatik embriyolardan oluşan mikroyumrular (MY)

Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besisi yerine alınan mikroyumrulara sürgün oluşumları gözlenmemiştir (Şekil.4.15).

4.3.1. *Crocus ancyrensis* Soğanlarının Yüzey Sterilizasyon Bulguları

Tez çalışması sırasında, bitki toplama aşamasında iklim şartlarından dolayı bitkinin erken çiçeklenmesi ve normal zamanından önce çiçeklerini dökmesinden dolayı bitkisel materyal sayısı yetersiz kalmıştır. Ayrıca yüzey sterilizasyonu açısından metotta belirtilen yöntem yetersiz kaldığından dolayı, belirtilen kimyasalların oranları ve bekleme sürelerinde değişiklikler yapılmış, *Crocus ancyrensis* bitkisi için sterilizasyon protokolü geliştirilmiştir.

Enfeksiyon problemi ise, 30 dk. musluk suyu altında %0,1'lik HgCl_2 'de 10 dk., %70'lik EtOH'da 1 dk., %20'lik NaOCl'de 15 dk. ek olarak anti bakteriyel sabun ile yıkama ve 30 dk. çeşme suyu altında %0,1'lik HgCl_2 'de 20 dk. %70'lik EtOH'da 1 dk., %30'lik NaOCl de 20 dk. olacak şekilde yapılarak aşılmıştır.

4.3.2. *Crocus ancyrensis* Soğanlarının Somatik Embriyogenesis Bulguları

Sterilizasyon çalışmalarında başarı sağlansa da, gerek iklim şartlarındaki olumsuzluklardan dolayı, gerekse sterilizasyon aşamasında çok sayıda soğanın kullanılması bu tür için kapsamlı bir deneme yapılmasını engellemiştir.

Bu nedenle, *Crocus sativus* L. ve *Crocus pallasii* subs. *pallasii* soğanlarının kallus oluşum oranlarına bakılarak istatistiksel olarak da öne çıkan $2 \text{ mg L}^{-1} 2.4\text{D} + 2 \text{ mg L}^{-1} 2\text{iP}$ içeren ortam kullanılarak deneme kurulmuştur (Şekil.4.16).

Tez çalışmasında, bu türdeki eksplantların yetersizliğinden dolayı istatistiksel analiz yapılamamış, fakat gelişme gözlenen besi yerlerinde petri başına düşen kallus sayısı yüzde olarak belirlenmiştir. Haftalık gelişimlere göre gözlem alınan petrilerdeki eksplantların her petrideki gelişim oranlarına bakıldığından kallus oluşturma yüzdesi %65 olarak belirlenmiştir.

Crocus ancyrensis türünde kallus oluşumunun 4. haftada başladığı alınan haftalık gözlemlerle tespit edilmiştir. Kallusların somatik embriyoya dönüşümlerinin ise 12. haftada meydana geldiği gözlenmiştir. Kallusların renk bakımından, *Crocus sativus* L. ve *Crocus pallasii* subs. *pallasii* kalluslarına oranla beyaza yakın derecede açık sarı renkte oldukları saptanmıştır. Yapı bakımından ise *Crocus sativus*

L. ve *Crocus pallasii* subs *pallasii* kalluslarına göre daha kompakt ve sert oldukları gözlenmiştir. *Crocus ancyrensis* kallusları besi yeri üzerinde hacimsel olarak *Crocus pallasii* subs. *pallasii* bitkisinin kalluslarına oranla daha az yer kaplamaktadır.

Elde edilen somatik embriyoların, globular, kalp, torpedo aşamaları mikroskopik incelemeler sonucunda gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil.4.16. *Crocus ancyrensis* soğanlarının kallus ve somatik embriyogenesis aşamaları A) *Crocus ancyrensis* bitkisinde 4. haftada oluşan şeffaf ve beyaz renkli kalluslar, B) Kallusların koyulaşması ve sararması, C) Somatik embriyoların oluşumu, D-E-F) Farklı somatik embriyo safhalarının oluşumu ve globüler ve kalp safhası (K)

Eksplant başına düşen somatik embriyo sayısı ise ortalama olarak 75 adet olarak saptanmıştır. Somatik embriyolar, eksplantın yetersizliğinden dolayı gelişme gösterdiği eksplant üzerinde sayılmış ve ortalama bir rakam verilerek hesaplanmıştır.

Mikro yumru oluşumları gözlemlense de, eksplantlar çimlendirme ortamına alınamamıştır.

Çizelge 4.3. *Crocus* türlerinde eksplant başına düşen embriyo sayıları.

<i>Crocus sativus</i> L.	<i>Crocus pallasii</i> ssp. <i>pallasii</i>	<i>Crocus ancyrensis</i>
130	90	75

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Crocus türlerinin önemi gün geçtikçe değer kazanmaktadır. Tıbbi aromatik ve endüstriyel bitki olarak bilinen *Crocus* cinsi, son zamanlarda süs bitkisi sektörü için de önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Gün geçtikçe artan şehirleşme, yol açma ve hayvan otlatma nedenleriyle bu türler tehlike altına girmektedir .

Tez çalışmasında kültürü yapılan ve ekonomik olarak büyük değere sahip olan *Crocus sativus* L. türünün yanı sıra endemik ve tehlike altında bulunan Ankara çiğdemi olarak da bilinen *Crocus ancyrensis* bitkisinde somatik embriyogenesis çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *Crocus sativus* L. 'nin atası olarak bilinen *Crocus pallasii* subs. *pallasii* türünde de somatik embriyolar elde edilmiştir. Çalışma sonucunda, farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren 60 farklı konsantrasyondaki besi yerlerinden 34'ünde embriyojenik kallus gelişimi gözlenmiştir. Üç türde de yüksek oksin konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda somatik embriyo oluşumu saptanmıştır.

Kallus yapılarının geliştiği en etkili besi yeri $2 \text{ mg L}^{-1} 2.4\text{D} + 1 \text{ mg L}^{-1} 2 \text{ iP}$ büyüme düzenleyicilerini içeren MS besi yeri olarak saptanmıştır. Kallusların mikroyumruya dönüştüğü en etkili besi yeri, %60 oranı ile $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$, $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ BA}$ içeren MS ortamı olarak belirlenmiştir. En az sürgün ve mikroyumru oluşumu ise % 5 ile $0,5 \text{ mg L}^{-1} 2.4\text{D}$ ve $0,5 \text{ mg L}^{-1} 2\text{iP}$ içeren MS ortamından elde edilmiştir.. Embriyojenik kalluslar, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerine alındığında mikroyumruların sürgüne verdiği saptanmıştır.

Eksplant başına düşen somatik embriyo sayısı, *Crocus* türleri arasında farklılık göstermiştir. *Crocus sativus* L. türünde soğanlardan alınan eksplant başına 130 somatik embriyo oluşumu gözlenirken, *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* türünde 90, *Crocus ancyrensis* türünde ise 75 olarak tespit edilmiştir. *Crocus sativus* L. bitkisinin soğanlarının dış yüzeyinde bulunan apikal tomurcuk sayısının fazla olması, endemik olan *Crocus ancyrensis* ve doğal olarak yetişen *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* türüne oranla daha fazla sayıda kallus ve somatik embriyo oluşturmaya neden olmuştur. Endemik olan *Crocus acnyrensis* türündeki embriyojenik kallus oluşumunun, *Crocus sativus* L. kültür türünden farklı olarak daha geç geliştiği gözlenmiştir. *Crocus*

ancyrensis türünün inatçı olmasının nedeni endemik oluşu ve doğada birçok iklimsel olayla karşı karşıya kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. *Crocus pallasii* ssp. *pallasii* türünde ise kallus ve somatik embriyo oluşumlarının *Crocus sativus* L. türü ile aynı zaman aralığında meydana geldiği gözlenmiştir.

Aklimatizasyon aşaması için üç türde de soğan zarı oluşumu ve kök oluşumu görülmemiş, dolayısıyla dış ortama adaptasyon gerçekleştirilememiştir. Soğan zarı oluşumlarının uzun süreli soğuk uygulaması sonucunda oluşabileceği düşünülmektedir.

Crocus sativus L. bitkisinde yapılan histolojik analizler sonucunda kallus oluşumunun 3. haftada meydana geldiği ve kallus yapılarının epidermis tabakasında olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kallus oluşumlarının epidermal tabakanının yanısıra apikal tomurcuk bulunduran büyüme bölgelerinde olduğu saptanmıştır. Normal dokulara oranla kallus dokularındaki hücreler arası boşlukların daha az olduğu, vakuollerin ise daha büyük olduğu Kallus dokularında ise daha küçük oldukları saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular sonucunda *Crocus* türlerinde farklı büyüme düzenleyicileri ile denemeler kurulara somatik embriyogenesis kapasitelerine bakılması, *in vitro* koşullarda elde edilen soğanların köklenme ve soğan zarı oluşumları için *in vitro*da kültüre alınmadan uzun süreli soğuk uygulaması yapılmalı, ülkemize endemik olan ve süs bitkisi potansiyeline sahip diğer *Crocus* türlerinde somatik embriyo çalışmaları yapılmalı ve erkek kısır olarak bilinen *Crocus sativus* L. bitkisinde protoplast füzyonu ile biyoteknolojik yöntemler kullanılarak ilerisi için ıslah çalışmalarına temel oluşturulmalıdır. Endemik türler için genetik materyalallerin muhafazası konusunda biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmalı ve *Crocus pallasii* spp. *pallasii* ve *Crocus ancyrensis* türünde histolojik analiz çalışmaları araştırılmalı ve kallus aşamalarının başlangıç zamanı tespit edilmelidir. Endemik türlerde genetik materyallerin biyoteknolojik yöntemler ile korunması amacıyla kriyoprezervasyon çalışmaları araştırılmalıdır. Daha etkili rejenerasyon ve somatik embriyogenesis protokollerinin geliştirilmesi için enkapsülasyon yöntemi ile sentetik tohumların oluşturulması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- AHOURAN, M., HOSSEİNİ, R., ZARGHAMİ, R. 2009. *In vitro* micropropagation of *Crocus cancellatus*. New Biotechnology 25.
- AHOURAN, M., HOSSEİNİ, R., ZARGHAMİ, R. 2009. Regeneration of plantlet from protoplast of *Crocus sativus* L. New Biotechnology 25.
- AHUJA A., KOUL S., KAUL, G., 1994. "Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in saffron, *Crocus sativus* L." *Indian journal of experimental biology* 32: 135-135.
- ANONİM. 2008. TC Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı Antalya İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği. BATEM, Antalya
- BHAGYALAKSHMİ, N., 1999. "Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron." *Plant cell, tissue and organ culture* 58.3: 205-211.
- BRIGHTON, C. A. 1977. Cytology of *Crocus sativus* L. and its allies (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution* 128: (3-4)137-157.
- BLAZQUEZ, S., OLMOS, E., HERNANDEZ, J. A., GARCÍA, N. F., FERNANDEZ, J. A., PÍQUERAS, A., 2009. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 97:49–57.
- BUNN, E.; TURNER, S.R.; PANAIÁ, M.; DIXON, K. W., 2007. The contribution of *in vitro* technology and cryogenic storage to conservation of indigenous plants. *Aust J Bot* 55: 345–355
- DEMETER, Z., SURANYI, G., MOLNAR, A., SRAMKO, G., BEYER, D., KONYA, Z., VASAS, G., HAMVAS, M., MATHE, C. 2010. Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 100:349–353.
- DEVİ, K., SHARMA, M., SINGH, M., AHUJA, P. S. 2011. *In vitro* cormlet production and growth evaluation under greenhouse conditions in saffron (*Crocus sativus* L.) - A commercially important crop. *Eng. Life Sci.* 11- 2: 189-194.

- EBAHİMZADEH, H., KARAMİAN, R., NOORİ-DALOÏİ, M. R. 2000. Somatic Embriogenesis and Regeneration of Plantlet in Saffron, *Crocus sativus* L. J. Sci. I. R. Iran
- EKİM, T., 2010. National Geographic Türkiye Dergisi 2010.,
- ENGELMANN, F., 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. Euphytica 57: 227–243.
- ESCRIBANO, J., PÍQUERAS, A., MEDİNA, J., RUBİO, A., ORTİ, M.A., FERNANDEZ, J.A., 1999. "Development of cormogenic nodules and microcorms by tissue culture, a new tool for the multiplication and genetic improvement of saffron." *Agronomie* 19.7 603-610.
- ESQUİNAS-ALCA'ZAR, J., 2005. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. *Nature Reviews Genetics*, 6, 946–953.
- ETİ S., 1987, Über das Pollenschlauchwachstum und die Entwicklung der Samenanlagen in Beziehung zum Fruchtsatz und zur Fruchtqualitaet bei der Mandarinensorte e Clementine (*Citrus reticulata* Blanco) Disertation Univ. Hohenheim 127s.
- FAKHRAÏ, F., EVANS, P.K. .1990.Morphogenic Potential Of Cultured Floral Explant of *Crocus sativus* L. fort he *in vitro* production of saffron.Journal of Experimental Botany, 41-222 : 47-52.
- FERNANDEZ, J.A., 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Res Dev Plant Sci* 2:127–159.
- FERNANDEZ, J.A., SANTANA,O., GUARDİOLA,J.L., MOLİNA,R.V., HARRİSON,P.H.,BORBELY, G., BRANCA,F., ARGENTO,S., MALOUPA,E., TALOU,T.,THİERCELİN,J.M., GASİMOV,K., VURDU,H., ROLDAN,M., SANTAELLA,M., SANCHİS,E., LUİS,A.G., SURANYİ,G., MOLNAR,A., SRAMKO,G., GURYAS,G.,BALAZS,L., HORVAT,O., RODRİGUEZ,M.F., VİOQUE,R.S., ESCOLANO,M.A., REİNA,J.V., KRİGAS,N., PASTOR,T., MORATA,B.R., RAYNAUD,C., IBADLİ,O. , POLİSSIÖU,M., TSİMİDOU,M.Z., TSAFTARİS,A., ELDİN,M.S., MEDİNA,J., CONSTANTİNİDİS,T., KARAMPLİANİS,T.,

- PASCUAL,M.D.L.M., 2011.The World Saffron and Crocus collection: strategies for establishment, management, characterisation and utilisation. Genet Resour Crop Evol.58:125–137.
- FİNER J.J.,1995 .Direct somatic embriyogenesis .İn gamborg OL,Philips GC(eds), Plant Cell ,Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods :.92-102.
- GEORGE, P.S., VİSVANATH, S., RAVİSHANKAR, G.A., VENKATARAMAN, L.V., 2009. Tissue Culture of Saffron (*Crocus sativus* L.): Somatic Embriogenesis and Shoot Regeneration. Food Biotechnology .6-3:217-217.
- HOBBS, P.R., 2007. Conservation agriculture: what is it and why is it important for future sustainable food production. Journal of Agricultural Science, 145, 127–137.
- İNAN, M. D. A. Kaya, S. Kirici, 2009, Safranda (*Crocus Sativus* L.) Farklı Korm Ağırlıklarının Tohumluk Korm Üretimine Etkisi, Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19- 22 Ekim 2009 Hatay, poster Bildiri Kitabı:356-359.
- İPEK, A., ARSLAN, N., SARIHAN, O.E., 2009 Farklı Dikim Derinliklerinin ve Soğan Boylarının Safranın (*Crocus sativus* L.) Verim ve Verim Kriterlerine Etkisi . Tarımsal Bilimler Dergisi Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi 15-1:38-46
- KARAGÜZEL, Ö., AYDINŞAKİR, K., KAYA, A.Ş., 2007. Dünyada ve Türkiye’de çiçek soğanları sektörünün durumu .
- KARAMİAN, R., 2007. Somatic Embriogenesis and Plant Regeneration from Protoplast Culture of *Crocus pallasii* subs.*haussknechtii* . Pakistan Journal of Biological Science 10-4: 659-663.
- KARAMİAN, R., EBRAHİMZADEH, H., 2001. Plantlet regeneration from protoplast-derived embryogenic calli of *Crocus cancellatus* . Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65: 115–121.
- KARAMİAN, ROYA., 2003 "Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of Crocus." *I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology* 650..5

- KRAVKAZ S., VURDU H., 2010. Botany of *Crocus ancyrensis* Through Domestication International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation Research and Economics .
- MİR, J.I., AHMED, N., WANİ, S.H., RASHİD, R., MİR, H., SHEİKH, M.A., 2010. *In vitro* development of microcorms and stigma like structures in saffron (*Crocus sativus* L.). *Physiol Mol Biol Plants* 16-4:369–373.
- MORATA, R.B., MOYA,L., NEBAUER,S.G., SİMARRO, J.M.S., VEGA,V.P., GOMEZ, M.D., MOLİNA,R.V., 2013.The use of corms produced under storage at low temperatures as a source of explants for the *in vitro* propagation of saffron reduces contamination levels and increases multiplication rates.*Industrial Crops and Products*: 97–104
- LYNCH, P.T., BENSON, E.E., HARDİNG, K., 2007 Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82, 157–160
- LUSKUTOV, A.V., BENİNGER, C.V., BALİ, T.M., HOSFIELD, G.L., NAİR, M., SİNK, K.C.,1999, Optimization of *in vitro* Conditions for Stigma Like Structure production from Half Ovary Eksplants of *Crocus sativus* L. In *VitroC ell. Development Biology-Plant*35:200-205.
- RAJA, W., G. ZAFFER, S. A. WANİ.2006. "In vitro microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.)." *II International Symposium on Saffron Biology and Technology* 739.
- REED, B.M., 2002. Implementing cryopreservation for longterm germplasm preservation in vegetatively propagated species. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cryopreservation of Plant Germplasm*. Volume 50, pp. 22–33.
- SANEİ, M., RAHİMYAN, H., AGAYEV, Y.M. , SHOEİLİVAND, S., 2006. New Cytotype of *Crocus pallasii* sub sp. *haussknechtii* from West of Iran .II International Symposium on Saffron Biology and Technology.

- SHARİFİ, G., EBAHİMZADEH, H., GHAREYAZİE, B., KARİMİ, M., 2010. Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron-induced multiple shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 46:274-280.
- SHARİFİ, G., EBRAHİMZADEH, H., GHAREYAZİE, B., GHARECHAHİ, J., VATANKAKH, E., 2012. Identification of Differentially Accumulated Proteins Associated with Embriogenic and Non Embriogenic Calli in Saffron. *Proteome Science* 10:3.
- SHARMA, K.D., MAESATO, K., HARA, T., SONODA, Y., 1990. *In Vitro* Production of Stigma-like Structures from Stigma Explants of *Crocus sativus* L. *Journal of Experimental Botany*, 41-227:745-748.
- SHARMA, K.S., RATHOUR, R., SHARMA, R., GOEL, S., SHARMA, T.R., SİNGH, B.M., 2008. In vitro Corm Development in *Crocus sativus* . *Biologia Plantarum* 52- 4:709-712.
- SHEİBANİ, M., NEMATİ, S.H., DAVARİNEJAD, G.H., AZGHANDİ, A.V., HABASHİ, A.A., 2006. "Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron (TDZ)." *II International Symposium on Saffron Biology and Technology* 739.
- SİVANESAN, I., LİM, M.Y., JO, E.H., JEONG, B.Y., 2011. Somatic Embriogenesis and Plant Regeneration of *Crocus vernus*. 2nd International Conference on Environmental Science and Development.(4).
- SİVANESAN, İYYAKKANNU, JEONG, BR. 2012 "SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CROCUS VERNUS (L.) HILL." *Propagation of Ornamental Plants* 12.3: 163-170.
- STÖSSER, R., KAŞKA, N., ANVARI, S., ETİ, S., 1985. Bahçe Bitkileri Döllenme Biyolojisi Uygulamaları Kurs Notları , 18-22 Mart 1985 Adana.
- THUİLLER, W., LAVOREL S., ARAU' JO, M.B., SYKES, M.T., PRENTİCE, I.C., 2005 Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8245–8250.

- VELASCO-NEGUERUELA, A. 2001, Saffron In Handbook of Herbs and Spices (Ed: K. V. Peter) pp: 276-286. CRC Pres, Cambridge England
- VATANKHAH, E., NIKNAM, V., EBRAHİMZADEH, H., 2010. Activity of antioxidant enzyme during *in vitro* organogenesis in *Crocus sativus*., *Biologia Plantarum* 54-3:509-514.
- VİJAYANA, K., SARATCHANDRA, B., TEİXERİA DA SİLVA, J. A., 2010. Germplasm conservation in mulberry (*Morus spp.*), 128. 371-379
- VURDU, H., GÜNEY, K., ÇİÇEK F.F., 2003. Biology of *Crocus oliveri* subsp. *oliveri*.
Proceedings of the First International Symposium on Saffron and Biotechnology, *Acta Horticultura*, 650:71-83.
- VURDU, H., GÜNEY, K., 2004. Safran Kırmızı Altın. 975-92006-0-0.
- VURDU, H., KRAVKAZ, İ., S., TÜRKYILMAZ, E., 2006. Potansiyel Süs Bitkisi Olarak Çiğdemler. (*Crocus spp.*). Gazi Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi *Kastamonu* 6:1
- VURDU, H., ÇİÇEK, F.F., 1992. Biyolojik zenginliklerimiz: Çiğdem (*Crocus spp.*) *Fidan*. 57 :2-5.
- VURDU, H., ŞALTU, Z., AYAN, S. 2000. *Crocus sativus* L. (Safran)'un yetiştirme tekniği. *Gazi Üni. Orman Fak. Derg.*, 2: 175-187.
- YÜCEL, E., 2002. Çiçekler ve Yer örtücüler. 1- 7:116.
- ZEYBEK, E., ÖNDE, S., KAYA, Z., 2012. Improved in vitro micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron. *Central European Journal Biology*. 7-1:138-145
- <http://www.iucn.org/> (IUCN) (Erişim tarihi: 1 Şubat 2012)
- (<http://www.persiansaffrononline.com>, erişim: 6.02.2013)
- <http://www.fao.org/> (FAO) (Erişim tarihi: 3 Şubat 2012)

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana/Seyhan 'da doğdu. İlk, orta ve Lise öğrenimini Adana'da , 2005 yılında başladığıEskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. Aynıyıl Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünde yüksek lisansa başladıve 2014 ılında tamamladı.