ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Aslıhan ÖZKAYA

BAZI *COLCHICUM* TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE SENTETİK TOHUM ÜRETİM PROTOKOLLERİNİN OLUŞTURULMASI

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2021

ÖZ

DOKTORA TEZİ

BAZI *COLCHICUM* TÜRLERİNDE SOMATİK EMBRİYOGENESİS VE SENTETİK TOHUM ÜRETİM PROTOKOLLERİNİN OLUŞTURULMASI

Aslıhan ÖZKAYA

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Yıl: 2021, Sayfa: 105
Jüri : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Doç. Dr. Pembe ÇÜRÜK
: Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK
: Dr. Öğr. Üyesi Başar SEVİNDİK

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de doğal olarak yetişen tıbbi aromatik bitkilerden olan *Colchicum*'un bazı türlerinde *(C.atticum, C. triphyllum, C. speciocum, C. burtii ve C. sobolifera)* yüzey sterilizasyonu, somatik embriyogenesis yöntemi ile rejenerasyon ve sentetik tohum protokolleri elde etme olanakları araştırılmıştır. Yüzey sterilizasyonu ve somatik embriyogenesisin araştırıldığı denemeler kapsamında eksplant olarak *Colchicum* türlerinin kormları, sentetik tohum denemelerinde ise embriyojenik yapılar kullanılmıştır. Somatik embriyogenesis ile rejenerasyonun araştırılmasında, 2,4-D (0.5, 1, 2 mg/l) ve NAA (0.5, 1, 2 mg/l [1])'nın BA (0, 0.1, 0.5 mg/l) ve 2iP (0, 0.1, 0.5 mg/l) ile kombinasyonunu içeren MS besi yeri denenmiştir. *C. atticum*'da 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde en yüksek rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo elde edilmiştir. *C. triphyllum* türünde en yüksek rejenerasyon, 2 mg/l NAA içeren MS besi yerinde elde edilmiştir. *C. triphyllum'da* 2 mg/l 2,4 D ve *C. speciocum* 6 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde en yüksek somatik embriyo elde edilmiştir. *C. burtii* ve *C. sobolifera*'da ise en yüksek rejenerasyon 0.5 mg/l 2,4-D +0.5 mg/l 2iP içeren MS besi yerinden elde edilmiştir. *C. speciocum*'da bitkiciğe dönüşüm sağlanmıştır. Yüzey sterilizasyonu denemelerinde bütün türlerde %0.2'lik $HgCl_2$'de enfeksiyon oranının en düşük olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında bütün türlerde sentetik tohum denemeleri yapılmış ve sadece *C. atticum*'da çimlenme gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Colchicum*, *in vitro*, Somatik embriyogenesis, Sentetik tohum

ABSTRACT

Phd THESIS

GENERATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SYNTHETIC SEED PRODUCTION PROTOCOLS IN SOME *COLCHICUM* SPECIES

Aslıhan ÖZKAYA

CUKUROVA UNIVERSTY
SCIENCE INSTITUTE
DEPARTMENT OF HORTICULTURAL PLANTS

Supervisor : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
Year: 2021 Page: 105
Jury : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Assoc.Prof. Dr. Pembe ÇÜRÜK
: Assoc.Prof. Dr. Özhan ŞİMŞEK
: Asst. Prof. Dr. Başar SEVİNDİK

In this thesis study, the possibilities of surface sterilization, regeneration with somatic embryogenesis method and obtaining synthetic seed protocols in some species of *Colchicum* which is one of the Medicinal and Aromatic Plants and naturally grown in Turkey were investigated. *Colchicum* species *(C.atticum, C. triphyllum, C. speciocum, C. burtii ve C. sobolifera)* corms were used as explants within the scope of experiments investigating surface sterilization and somatic embryogenesis besides embryogenic structures were used in synthetic seed experiments.it was determined that the infection rate was the lowest at 0.2% of $HgCl_2$ in all species. MS medium containing the combination of 2,4-D (0.5, 1, 2 mg/l) and NAA (0.5, 1, 2 mg/l) with BA (0, 0.1, 0.5 mg/l) and 2iP (0, 0.1, 0.5 mg/l) was tested in the investigation of regeneration with somatic embryogenesis. The highest regeneration of *C. triphyllum* was obtained in MS medium containing 2 mg/l NAA. Besides, the highest somatic embriyo ratio was obtained within MS medium containing in *C. triphyllum* (2mg/l 2,4-D) and *C. speciocum* species (6mg/l 2,4-D). The highest regeneration were obtained within MS medium containing 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP in *C. burtii* and *C. sobolifera.* The embryogenic structures formed were taken as a substitute for hormone-free MS, but they darkened and lost their vitality. Plantlets were obtained in *C.speciocum*. Synthetic seed trials were made in all species and germination occurred only within in *C. atticum*.

Key Words: *Colchicum*, *in vitro*, Somatic embryogenesis, synthetic seed

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Türkiye sahip olduğu coğrafi özellikler nedeniyle 3 floristik bölgenin kesişim noktasında bulunmaktadır. Çoğrafik ve iklim özelliklerinden dolayı yeryüzündeki zengin bir ekosisteme sahiptir (Uzun ve Bayır, 2009). Ülkemiz florasında bulunan yaklaşık 12000 bitki türünün üçte biri endemik türler olup, yaklaşık olarak 688 geofit türü doğal olarak yetişmekte ve bu türlerin 162 tanesinin endemik olduğu bilinmektedir. Dünya üzerinde geniş bir yayılış gösteren *Colchicum*'un, 90 türü bulunmaktadır. Bu türlerin 50 tanesi ülkemiz florasında doğal olarak yetişmektedir ve 22 tanesi endemiktir. Bu da Anadolu'nun *Colchicum* için gen merkezi olduğunu göstermektedir.

Geofitler botanik anlamda 800'den fazla cinse sahiptirler. Soğanlı bitkiler morfolojik olarak metamorfoza uğramış besin maddesi depo eden toprak altı organlarında (rizom, korm, soğan, korm) bulunan tomurcuklara sahiptir.Bu bitki türleri kesme çiçek, saksılı süs bitkisi ve dış mekanda da park ve bahçelerde kullanılmak üzere çoğaltım materyali olarak değerlendirilmektedir ve global çiçek sanayisinde önemli bir yere sahiptir (Kamanetsky ve Okubo, 2013).

Ülkemizde önemli soğanlı süs bitkilerinden biri olan *Colchicum* cinsi, *Colchicaceae* familyası içerisinde yer alan 19 cinsten biridir. *Colchicum* cinsine ait taksonlar Anadolu'da "Güzçiğdemi", "Göçkovan", "Öksüz çiçeği", "Kalkgit", "Acı çiğdem", "Ayı çiğdemi", "İtboğan", "Likofor", "Ligoser", ve "Tarhana çiçeği" "Göç çiçeği", "Koyun dölü" ve "Avu" adları ile bilinir. *Colchicum* cinsine ait türler dünya üzerinde geniş bir yayılım alanına sahip olup, yaklaşık 90 tür ile temsil edilmektedir. Bu türlerin yaklaşık 50 tanesi Türkiye'de doğal olarak yayılış göstermekte olup bunların yaklaşık %50'si (22 takson) endemiktir. *Colchicum* cinsindeki bu yüksek endemizm oranı bu cinsin başlıca gen merkezinin Anadolu olduğunu göstermektedir. *Colchicaceae* familyası sitogenetik olarak ploidy seviyeleri açısından (2n=14'den 2n=216'ya kadar) geniş farklılıklar göstermektedir

(Chacon 2014, Akan ve Eker, 2005; Düşen Dinç ve Sümbül, 2007; Pırıldar vd., 2010).

Gerek süs bitkisi olarak gerekse de tibbi açıdan önemli bir genetik kaynağımız olan acı çiğdem türlerimiz günümüze kadar ihmal edilmiştir. *Colchicum* türleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde genel olarak alkaloid ve sekonder metabolit üretmek üzerinde durulmuştur. Ülkemizde 45'den fazla *Colchicum* türünün doğal olarak yayılım gösterdiği ve bu türler bakımından endemizm oranının yüksek olduğu bilindiğine göre; bu genetik çeşitliliği korumak, colchicum türlerinden yeni çeşit elde etmek ve ekonomik olarak kıymetli ürünler üretme yönünden oldukça önemlidir.

Bu tez kapsamında ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bazı *Colchicum* türlerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması amacıyla somatik embriyogenezis protokolü geliştirilmiştir. Ayrıca sentetik tohum üretim denemeleri yapılmıştır. Geliştirilen bu protokoller hem diğer türler için uygulanabilecek hem de ileride yürütülecek genetik mühendisliği, mutasyon ıslahı ve sekonder metabolit üretimi çalışmalarında başarıyla kullanılabilecektir.

Eksplant olarak kullanılan *Colchicum* kormlarının sterilizasyonu için farklı yüzey sterilizasyon yöntemleri denenmiştir. Yüzey sterilizasyon denemelerinde H_2O_2, % 30'luk NaOCl, %0.1'lik $HgCl_2$ ve %0.2'lik $HgCl_2$ denenmiş ve tüm türlerde en düşük enfeksiyon oranı sırası ile 20 dk. musluk suyunda, 1 dk. %0.1'lik fungusitte, %0.2'lik $HgCl_2$'de 30 dk., %70 etil alkolde 3 dk., %30'luk Domestos®'da 20 dk. bekletme işlemlerinden oluşan yüzey sterilizasyon yönteminden elde edilmiştir.

Hem yüzey sterilizasyon hem de somatik embriyogenesis denemelerinde genotipler arasındaki farklı tepkiler dikkat çekmiştir. Genotip farkından dolayı yüzey sterilizasyonunda enfeksiyon oranlarında, somatik embriyogenesis çalışmalarında rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranlarında farklılıklar meydana gelmiştir.

Embriyojenik kallus oluşumunu teşvik etmek için 2,4-D ve NAA'nın BA ve 2iP ile farklı kombinasyon ve konsantrasyonunu içeren 36 farklı besin ortamı kullanılmıştır.

C. atticum'da en yüksek rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP ve 1 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP içeren MS besi yerinde elde edilmiştir. *C. triphyllum*'da en yüksek rejenerasyon 2 mg/l NAA içeren MS besi yerinde, en yüksek embriyojenik kallus oluşumu 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP ve en yüksek somatik embriyo oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilmiştir. *C. speciosum*'da en yüksek, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilmiştir. *C. burtii*'de en yüksek rejenerasyon 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP ve 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP içeren MS besi yerinde, en yüksek embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilmiştir. *C. sobolifera*'da en yüksek rejenerasyon, 0,5 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA, 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP ve 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA içeren MS besi yerinde, en yüksek embriyojenik kallus oluşumu ise 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP içeren MS besi yerinde, en yüksek somatik embriyo oluşumu ise 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP'den elde edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen tez konumun belirlenmesinde bana yardımcı olan Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyeleri hocalarım Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR, Doç. Dr. Pembe ÇÜRÜK'e tez süresi boyunca göstermiş oldukları ilgi ve destekten dolayı teşekkür ederim. Doktora tez jüri üyelerimden Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK'e ve Dr. Öğr. Üyesi Başar SEVİNDİK'e eğitimim boyunca destekleri için çok teşekkür ederim

Tez çalışmam süresince arazi ve laboratuvar çalışmalarında büyük yardım ve destek aldığım Arş. Gör. Mehmet TÜTÜNCÜ, Dr. Tolga İZGÜ, Ziraat Yüksek Mühendisi M.Şamil ÖZDEMİR, Ziraat Yüksek Mühendisi Mahmut SARI ve Ziraat Yüksek Mühendisi Senem UĞUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım aşamasında desteklerini esirgemeyen Arş.Gör.Ebru KURT ve Ziraat Yüksek Mühendisi Edanur KORKUT'a teşekkür ederim.

Doktora yapmama teşvik eden beni yönlendiren bilgi ve deneyiminden faydalandığım sevgili eşim Prof.Dr. Okan ÖZKAYA ve oğlum Yiğit Ali'ye yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen her koşulda yanımda olan Babam Ramazan AĞAR, Annem Emine AĞAR, Ablam Arzu YAĞLU, Abim Savaş AĞAR, Kardeşim M.Can AĞAR'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
SİMGELER VE KISALTMALAR XVIII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 13
3. MATERYAL VE METOD 25
3.1. Bitkisel Materyal 27
3.1.1. *Colchicum atticum* (Yırtık Çiğdem) 27
3.2.2. *Colchicum triphyllum* (Ankara acı çiğdemi) 28
3.2.3. *Colchicum sobolifera* 29
3.2.4. *Colchicum burtii* 30
3.2.5. *Colchicum speciocum* 31
3.2. Metod 32
3.2.1. Yüzey Sterilizasyonu 33
3.2. Somatik Embriyogenesis Denemeleri 37
3.4. Enkapsülasyon (Sentetik tohum) Protokolünün Geliştirilmesi 40
3.5. Somatik Embriyoların Çimlendirilmesi 43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 45
4.1. Yüzey Sterilizasyonuna Ait Bulgular 45
4.2. Somatik Embriyogenesis Denemelerine Ait Bulgular 50
4.2.1. *Colchicum atticum* Türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları 50

4.2.2. *Colchicum triphyllium* türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları..56
4.2.3. *Colchicum speciosum* türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları...67
4.2.4. *Colchicum burtii* türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları.....75
4.2.5. *Colchicum sobolifera* türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları ..80
4.3. Sentetik Tohum (Enkapsülasyon) Denemelerine Ait Bulgular.....84
5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 93
KAYNAKLAR 97
ÖZGEÇMİŞ 105

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Somatik embriyogenesis, yüzey sterilizasyonu ve sentetik tohum üretiminde kullanılan *Colchicum* türleri ve toplandığı lokasyonlar. 26
Çizelge 3.2. %30'luk NaOCl ile yapılan yüzey sterilizasyonu denemesi 35
Çizelge 3.3. %0.1'lik $HgCl_2$ ile yapılan yüzey sterilizasyonu denemesi 35
Çizelge 3.4. H_2O_2 ile yapılan yüzey sterilizasyonu denemesi 36
Çizelge 3.5. %0.2 $HgCl_2$ ile yapılan yüzey sterilizasyonu 36
Çizelge 3.6. *Colchicum* türlerinde birinci dönem somatik embriyogenesis denemelerinde kullanılan bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları 37
Çizelge 3.7. Somatik embriyogenesis denemelerinde kullanılan MS (Murashige ve Skoog 1962) besi yeri içeriği 38
Çizelge 3.8. *Colchicum* türlerinde 2. dönem somatik embriyogenesis denemelerinde kullanılan bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları 39
Çizelge 3.9. Üçüncü dönem Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonları 39
Çizelge 3.10. Sentetik tohum MS ve ROM besi yerindeki deneme planı 41
Çizelge 3.11. Sentetik tohum denemelerinde kullanılan ROM (Rugine Olive Medium) içeriği (Rugini, 1984). 42
Çizelge 4.1. *Colchicum* türlerinde %0.1'lik $HgCl_2$ yüzey sterilizasyonu enfeksiyon değerleri (%) 45
Çizelge 4.2. *Colchicum* türlerinde %30 NaOCl yüzey sterilizasyonu enfeksiyon oranları (%) 46
Çizelge 4.3. *Colchicum* türlerinde %0.2 $HgCl_2$ yüzey sterilizasyonu enfeksiyon değerleri (%) 47

Çizelge 4.4. *Colchicum* türlerinde H_2O_2 ile yapılan yüzey sterilizasyonu enfeksiyon değerleri (%) 48
Çizelge 4.5. *Colchicum atticum* türünde farklı MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranları (%) 51
Çizelge 4.6. *Colchicum triphyllum* türünde farklı MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranları üzerine etkisi (%) 57
Çizelge 4.7. *Colchicum triphyllum* türünde farklı MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranları (%) 64
Çizelge 4.8. *Colchicum triphyllum* türünün rejenerasyon, kallus ve embriyo oranları (%) 65
Çizelge 4.9. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen rejenerasyon, kallus ve embriyo oranı (%) 69
Çizelge 4.10. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oranı (%) 70
Çizelge 4.11. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oranı (%) 71
Çizelge 4.12. *Colchicum burtii* türünde meydana gelen rejenerasyon, kallus ve embriyo oranı (%) 76
Çizelge 4.13. *Colchicum sobolifera'da* Meydana Gelen Rejenerasyon, Embriyojenik Kallus ve Somatik Embriyo Oranı (%) 81
Çizelge 4.14. *Colchicum* türlerinde MS besi yeri sentetik tohum çimlenme oranları (%) 85
Çizelge 4.15. *Colchicum atticum* MS Besi Yeri Sentetik Tohum Kol Sayısı (%) 86
Çizelge 4.16. *Colchicum* türlerinde ROM besi yeri sentetik tohum çimlenme oranları (%) 88
Çizelge 4.17. *Colchicum atticum* ROM Besi Yeri Sentetik Tohum Kol Sayısı (%) 89

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. *Colchicum* bitkisinin morfolojik yapısı 5
Şekil 3.1. *Colchicum* türlerinin Türkiye'de yayılış gösterdiği alanlar..... 27
Şekil 3.2. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum atticum* türü A-B) Doğal ortamında araziden çekilmiş görüntüsü C-D) Laboratuvar ortamındaki görüntüsü 28
Şekil 3.3. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum triphyllum* A-B-C) Doğal ortamında araziden çekilmiş görüntüsü D) Laboratuvar ortamındaki görüntüsü 29
Şekil 3.4. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum sobolifera* A-B) Laboratuvar ortamındaki görüntüsü C-D) Serada saksılara aktarılan bitkiler 30
Şekil 3.5. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum burtii* A-D) Doğal ortamında araziden çekilmiş görüntüsü C) Doğadan toplanarak *in vitro* denemeler için laboratuvara getirilmiş bitkisel materyaller B) Serada kültüre alınmak üzere saksılarda kültüre alınmış bitkisel materyal 31
Şekil 3.6. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum speciosum* türü A-B-E) Doğal ortamında araziden çekilmiş görüntüsü C-D-E) *In vitro* denemelerde eksplant olarak kullanılmak üzere laboratuvara getirilmiş bitkisel materyal 32
Şekil 3.7. *Colchicum* kormlarına uygulanan yüzey sterilizasyonu aşamaları A) Kormların ön temizlenmesi B) Antibakteriyal sabun ile yıkanması C-D) Musluk suyu altında bekletilmesi E) Kormların H_2O_2 ve $HgCl_2$'de bekletmesi F) Steril saf su ile durulama G) Kormların %70'lik etil alkolde bekletilmesi H) Steril saf su ile durulama I) %30'luk sodyum hipoklorit'de bekletilmesi İ) Steril saf su ile durulama J) Sterilizasyonu tamamlanmış *Colchicum* kormları 34

Şekil 3.8. Sentetik tohum üretimi A) Embriyoların steril filtre kağıtlar üzerinde kesilmesi B) Embriyoların sodyum aljinat içine aktarılması C) Embriyoların kalsiyum klorür içerisine mikropipet ile alınması D-E) Sentetik tohumların steril saf su ile yıkanması F-G) Polimerize olmuş sentetik tohumlar H) Sentetik tohumların kurutma kağıdında kurutulması I) Sentetik tohumların besi ortamlarına aktarılması 43
Şekil. 4.1. *C. atticum* türünde embriyojenik yapıların gelişimi (1 mg/l 2,4-D; 10. hafta sonunda), A ve B) Kallus gelişimi, C ve D) Embriyoların olgunlaşması ve bitkiciğe dönüşüm 52
Şekil. 4.2. *C. atticum* türünde 0,5 mg/l 2,4 D +0,5 mg/l 2İP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar..... 52
Şekil. 4.3. *C. atticum* türünde 0,5 mg/l 2,4 D +0,1 mg/l 2İP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar..... 53
Şekil. 4.4. *C. atticum* türünde 1 mg/l 2,4-D hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar..... 53
Şekil. 4.5. *C. atticum* türünde elde edilen somatik embriyoların çimlendirilmesi..... 54
Şekil. 4.6. *C. atticum* türünde kararma olan embriyojenik yapılar..... 54
Şekil. 4.7. *C.atticum* türünde Somatik embriyo çimlenme oranları (%) 55
Şekil. 4.8. C. *triphyllum* türünde 1 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA içeren somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar, A) Globular aşamadaki somatik embriyo, B) Kalp aşamasındaki somatik embryo, C) Torpedo aşamadaki somatik embriyo, D) Kotiledon oluşumu, E) Somatik embriyoların gelişim aşamaları..... 58

Şekil. 4.9. *C. triphyllum* türünde 2 mg/l NAA içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar 59
Şekil. 4.10. *C. triphyllum* türünde 1mg/l 2,4-D +0,1 mg/l 2IP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar A B,C, D verilmiştir 59
Şekil. 4.11. *C. triphyllum* türünde 2mg/l 2,4-D hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar 60
Şekil. 4.12. C. *triphyllum* türünde 2mg/l 2,4-D +0,1 mg/l 2IP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embryogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar 60
Şekil. 4.13. *C. triphyllum* türünde 2mg/l 2,4-D +0,5 mg/l 2IP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar 61
Şekil. 4.14. *C. triphyllum* türünde 1mg/l NAA +0,5 mg/l 2IP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar 61
Şekil. 4.15. *C. triphyllum* türünde 2mg/l NAA + 0,1 mg/l 2IP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar 62
Şekil. 4.16. *C. triphyllum* türünde 2mg/l NAA + 0,5 mg/l 2IP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar 62
Şekil. 4.17. *Colchicum triphyllum* türünün rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oranları (%) 65
Şekil. 4.18. *C.triphyllum* türünde Çimlenme Oranları (%)..... 66

Şekil. 4.20. *C. triphyllum* türünde çimlendirme ortamında (2 mg/l GA_3 ve 0.5 mg/l BA) Elde edilen gelişmeler A, B ve C) Uzayan sürgün benzeri yapılar ve oluşan somatik embriyolar D, E ve F) Sürgün Benzeri Gelişmeler 67
Şekil. 4.21. *C. speciosum* türünde 2mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilen embriyojenik yapıların gelişimi, A) Soğan eksplantı, B, C ve D) Globüler yapıların oluşması 68
Şekil. 4.22. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen rejenerasyon, kallus ve embriyo oranı (%) 72
Şekil. 4.23. *C. speciosum*'da embriyojenik gelişimler A ve B) 2mg/l 2,4-D+ 0,1 mg/l 2İP gelişen sürgün benzeri rejenerasyon uzamaları C) 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/L2IP ortamında elde edilen rejenerasyon uzaması D, E ve F) 2mg/l 2,4-D'de elde edilen rejenerasyon uzamaları ve somatik embriyolar G, H ve I) 6 mg/L 2,4-D'de gelişen somatik embriyolar ve uzamalar 72
Şekil. 4.24. *Colchicum speciosum* türünde somatik embriyogenesis denemeleri bitkicik oluşum aşaması. 73
Şekil. 4.25. *C. speciosum* türünde MS besi yerinde sağlanan gelişmelerin ardından 2 mg/l GA_3 + 0.5 mg/l BA içeren çimlenme ortamına aktarılan eksplantlardan elde edilen gelişmeler 74
Şekil. 4.26. *C. burtii* türünde somatik embryogenesis denemeleri sonucunda 2 mg/l 2,4-D MS besiyerinde meydana gelen somatik embriyoların gelişim aşamaları 77
Şekil. 4.27. *C. burtii* türünde 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embryogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar. 78
Şekil. 4.28. *C. burtii* türünde iki farklı besi yerinde meydana gelen embriyoların çimlenme oranları 78

Şekil. 4.29. *C. burtii* türünde çimlendirme ortamında kültüre alınan embriyojenik yapıların ve kallusların sürgüne dönüşmesi 79
Şekil. 4.30. *C. burtii* türünde kararma olan embriyojenik yapılar 79
Şekil. 4.31. *C. sobolifera* türünde soğan eksplantlarının gelişimi, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP B) Soğan eksplantlarında kararma ve sürgün benzeri yapı oluşumu, C ve D) Sürgün benzeri yapı 82
Şekil. 4.32. *Colchicum atticum* türlerinde MS besi yeri sentetik tohum çimlenme oranları (%) 86
Şekil. 4.33. *Colchicum atticum* MS Besi yeri Sentetik Tohum Kol Sayısı (%) 87
Şekil. 4.34. *Colchicum* türlerinde ROM Besi yeri Sentetik Tohum Çimlenme Oranları (%) 88
Şekil. 4.35. *Colchicum* türlerinde ROM Besi yeri Sentetik Tohum Kol Sayısı (%) 89
Şekil. 4.36. *Colchicum* türlerinde çimlenmeyen sentetik tohumlar 90
Şekil. 4.37. *C.atticum* türünde MS içeren besi yerinde Na-alginate ile kaplanan sentetik tohumlarda A, B ve C) Enkapsülasyondan 10 gün sonra çimlenen sentetik tohumlar D, E ve F) Çimlenen sentetik tohumlardan elde edilen yapılar G, H ve I) Sürgün ve kök benzeri yapılardaki uzamalar 90
Şekil. 4.38. *Colchicum atticum* türünde ROM besi yerinde Na-alginate ile kaplanan sentetik tohumlarda A, B ve C) Enkapsülasyondan 20 gün sonra çimlenen sentetik tohumlar 91

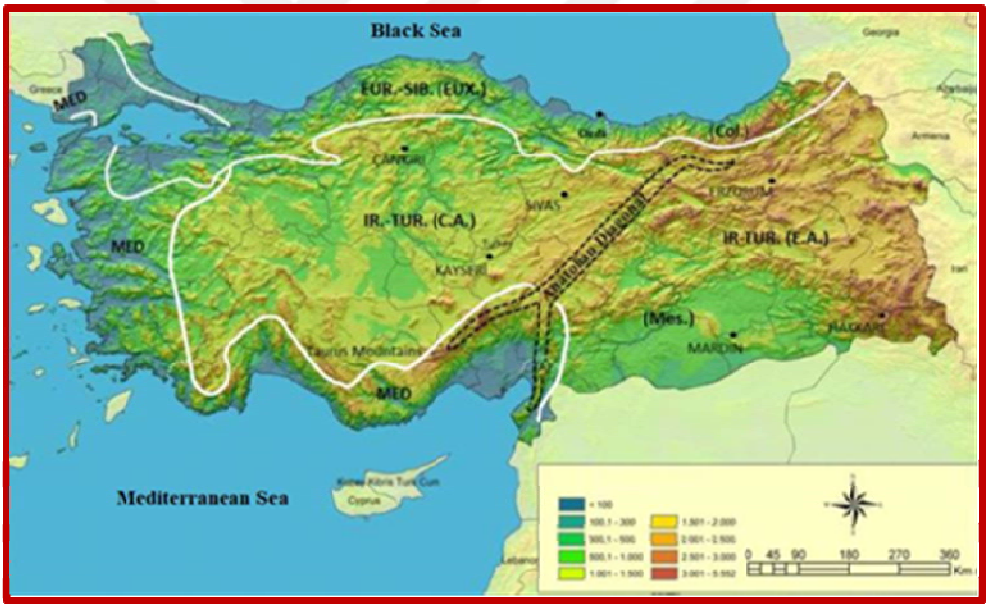
SİMGELER VE KISALTMALAR

2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxyaceticacid
2İp	: 6-(γ ,γ –dimethylallylamino)purine
BA	: Benzyl Adenine
IBA	: Indol Butirik Asit
BAP	: Benzil amino pürin
WH	:White besi ortamı
GA_3	: Giberellic acid
g/l	: Gram/Litre
µl	: Mikrolitre
Mg/l	: Miligram/Litre
Ml	: Mililitre
MS	: Murashige & Skoog
NAA	: Naftalen asetik asit
$AgNO_3$	: Gümüş nitrat
$AlSO_4$	:Alüminyum Sülfat
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
ROM	: Rugine Olive Medium
$HgCl_2$	: Civa Klorür
FeEDTA	: Demir Etilendiaminetetraasetik asit
Mm	: Milimetre
%	: Yüzde
B5	: Gambourg besi ortamı
NN	: Nisch and Nisch Besi ortamı
µM	: Mikromolar
NaOCl	: Sodyum Hipo Klorür
KNO_3	: Potasyum Nitrat

pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)
LS	: Linsmaier and Skoog Besi yeri
IAA	: İndol Asetik Asit
NH_4Cl	: Amonyum Klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
HCl	: Hidroklorik asit
ABA	: Absisic Acid
TDZ	:Thidiazuron

1. GİRİŞ

Türkiye içinde bulunduğu coğrafik özelliklerden dolayı yeryüzündeki en zengin ekosisteme sahip ülkelerden birisidir. Dünya'da bilinen sekiz biyoçeşitlilik merkezinin üçü (Akdeniz, Avrupa-Sibirya ve İran-Turan) Türkiye'de kesişmektedir (Uzun ve Bayır, 2009). Türkiye'de bitki örtüsünde doğal olarak yetişen yaklaşık 12000 bitki türü bulunmakta ve her geçen gün bu sayı artmaktadır (Şekil 1.1). Ülkemizde yetişen bu bitki türlerinin endemizm oranı yaklaşık %34 olup, birçok Avrupa ülkesinden. Ülkemiz florasında doğal olarak yayılım gösteren türlerden 3000'den fazlası endemiktir (Dilaver, 2013).



Şekil 1.1. Türkiye'nin fitoçoğrafik haritası (Alp, 2020)

Soğanlı bitkiler, toprak altı organları metamorfoza uğramış gövde yapısına sahiptir.Bu bitkiler yaşamlarını başkalaşım geçirmiş bu organlarıyla sürdürürler ve "geofit" olarak adlandırılırlar. Ülkemizde geofit olarak adlandırılan soğanlı süs bitkileri bünyelerinde bulunan alkoloidler ve renkli gösterişli çiçeklerinden dolayı

süs bitkisi, kozmetik sanayi ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır (Karaoğlu, 2010).

Geofitler, 800'den fazla botanik cinsi barındıran, gelişme mevsimi tamamlandıktan sonra gövde, yaprak ve çiçek gibi organları kuruyarak canlılığını yitiren bitkilerdir. Geofitler soğan, yumru, rizom ve corm gibi gıda maddesi depo eden, metamorfoza uğramış toprak altı gövdeleri ile yaşamlarını devam ettiren bitkilerdir. Soğanlı bitkiler morfolojik olarak metamorfoza uğramış besin maddesi depo eden toprak altı organlarında (rizom, korm, soğan, korm) bulunan tomurcuklara sahiptir. Bu bitki türleri kesme çiçek, saksılı süs bitkisi ve dış mekanda da park ve bahçelerde kullanılmak üzere çoğaltım materyali olarak değerlendirilmektedir ve global çiçek sanayisinde önemli bir yere sahiptir (Kamanetsky ve Okubo, 2013).

Geofitlerin tamamı tohumlu bitkiler (*Spermatophyta*) bölümünde yer alan, kapalı tohumlu bitkiler (*Magnoliophyta*) alt bölümünde bulunmaktadırlar. Genellikle "tek çenekli bitkiler" sınıfında olmalarına rağmen, çift çenekli geofitlere de rastlamak mümkündür. Geofitler toprak üstü organlarının gelişimleri için elverişli olan kış mevsiminde, büyüme ve gelişimlerini tamamlayarak yazın havaların ısınmasıyla dinlenmeye girerler. Dinlenme dönemini toprak altında uykuda geçiren bitkiler, sıcaklıkların normale dönüp yağışların başlaması ile birlikte hızlı bir gelişme dönemine girerek yaprak ve çiçek yapılarını oluştururlar (Karagüzel, 2007). Geofitlerin toprak altı kısımları, yedek besin depo eden kısımlar olduğundan dolayı, bu organların toprağa dikilmesiyle kolayca çoğalabilmektedirler.

Dünya'da geofitler genellikle 23° kuzey ve 45° güney enlemleri arasında yayılış göstermektedir. Geofitler dünya üzerinde yoğun olarak Güney Afrika'da (yaklaşık 2000 tür) bulunmaktadır. Diğer yandan Akdeniz iklimine sahip ülkelerde, Amerika ve Avusturalya gibi ülkeler de de yoğun olarak yayılış göstermektedir (Sevindik, 2018).

Doğadan izinsiz ve bilinçsiz olarak toplanan geofitler ihraç edilmekte bu da geofitlerin neslini tükenme tehlikesi altına sokmaktadır. Bundan dolayı ilk defa 1989'da bir yönetmelik hazırlanmış, 11 Ağustos 1995'de Tarım Bakanlığı tarafından toplanan bir komiteyle bu yönetmelik tekrar incelenerek, eksik yönleri tamamlanarak yürürlüğe girmiştir. Bu incelemelerden sonra 24 Ağustos 2004 tarih ve 25563 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan yönetmelik içeriğine göre artık doğadan toplama işlemi Bakanlık denetimi altında yapılmaktadır. Yıllar içerisinde pek çok değişiklik yapılmıştır. Çiçek soğanlarının doğadan toplanması ve ihracatı ile alakalı 21 Mart 2017 yılında resmi gazetede Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yayınlanmış olan "Doğal Çiçek Soğanlarının Doğadan Toplanması, Üretimi ve İhracatına İlişkin Yönetmelik" mevcuttur (Resmi Gazete, 2017)

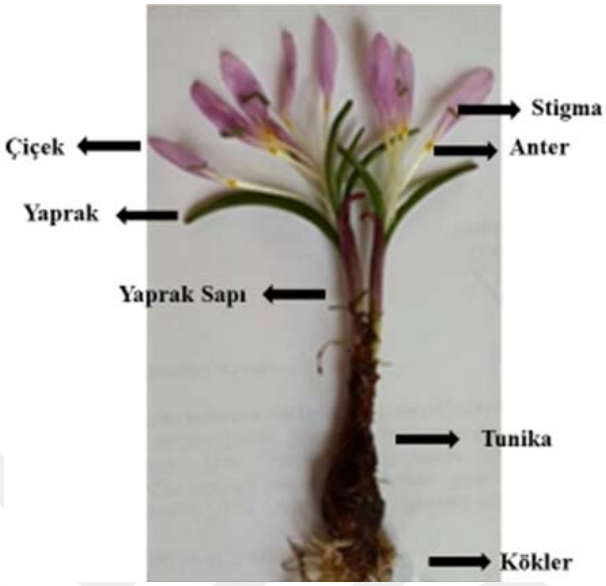
Ülkemiz sahip olduğu zengin florasında çok fazla soğanlı bitki türü doğal olarak yetişmektedir (Özhatay ve Byfield, 2005). Ülkemizde yetişen çoğu bitki türünde olduğu geofitler aşırı otlatma, sanayileşme, doğadan bilinçsiz söküm gibi birçok olumsuz etmenden dolayı nesli tükenme tehlikesi altındadır. Ülkemizde eskiden geofitlerin doğadan bilinçsiz birşekilde sökülerek ticareti yapılmaktaydı, son yıllarda bu durumun önüne geçebilmek için kültüre alma ve yeni çeşit geliştirme çalışmaları başlamıştır (Karagüzel, 2007).

Ülkemizde önemli soğanlı süs bitkilerinden biri olan *Colchicum* cinsi, *Colchicaceae* familyası içerisinde yer alan 19 cinsten biridir. *Colchicum* cinsine ait taksonlar Anadolu'da "Güzçiğdemi", "Göçkovan", "Öksüz çiçeği", "Kalkgit", "Acı çiğdem", "Ayı çiğdemi", "İtboğan", "Likofor", "Ligoser", ve "Tarhana çiçeği" "Göç çiçeği", "Koyun dölü" ve "Avu" adları ile bilinir. *Colchicum* cinsine ait türler dünya üzerinde geniş bir yayılım alanına sahip olup, yaklaşık 90 tür ile temsil edilmektedir. Bu türlerin yaklaşık 50 tanesi Türkiye'de doğal olarak yayılış göstermekte olup bunların yaklaşık %50'si (22 takson) endemiktir (Şekil 1.2). *Colchicum* cinsindeki bu yüksek endemizm oranı bu cinsin başlıca gen merkezinin Anadolu olduğunu göstermektedir. *Colchicaceae* familyası sitogenetik olarak

ploidy seviyeleri açısından (2n=14'den 2n=216'ya kadar) geniş farklılıklar göstermektedir (Chacon 2014, Akan ve Eker, 2005: Düşen Dinç ve Sümbül, 2007; Pırıldar vd., 2010)

Şekil 1.2. *Colchicum* türlerinin doğada yayılış gösterdiği alanlar

Colchicum türleri çok yıllık otsu bitkiler olup, toprak altı kısımları yumrulu, kormlu bazende stolonludur. Yumrular tunika ile sarılmıştır ve tunika toprağın üstünde yumru boyunca uzanır. Yapraklar düz ya da mızraksı şekildedir ve tohumlar olgunlaştıktan sonra kaybolur. Çiçekler genellikle morumsu-pembe, pembe ve beyazdır ve çiçeklenme dönemlerine göre baharda çiçeklenenler ve güz döneminde çiçeklenenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Ovaryum üst durumludur, meyveler toprak düzeyinde olgunlaşır ve çok sayıda tohum meydana getirir (Sütlüpınar, 1981) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. C*olchicum* bitkisinin morfolojik yapısı

Colchicum cinsi içerisine giren türlerin kormlarının ve tohumlarının yüzyıllardır geleneksel tedavi yöntemlerinde; astım, dizanteri, romatizmaya karşı kullanıldığı bilinmektedir (Gökel, 2000: Komjathyová ve ark., 2000: Khan ve ark., 2011). Günümüz modern tıbbında ise *Colchicum* yumru ve tohumları kolşisinoidler olarak adlandırılan terapötik aktif alkaloid kaynağı olarak kullanılmaktadır. Kolşisin, *Colchicum* cinsi içerisine giren türlerden elde edilen başlıca alkoloid türevidir (Peter, 1995).

Tarımsal biyoteknolojide bitki ıslahçıları tarafından kromozomların katlanmasında da kullanılan kolşisinin, antitümoral ve antiinflamatuvar özellikleri tespit edilmiş ve gut hastalığı ile birlikte ailevi akdeniz ateşi, behçet hastalığı, siroz ve sedef hastalığı gibi birçok hastalıkta tedavi amaçlı kullanılmış ve halen de kullanılmaktadır (Le Hello, 2000; Pırıldar ve ark., 2010). Her ne kadar tıpta tedavi amaçlı kullanılıyor olsa da kolşisin toksik bir madde olup doz aşımında tehlikeli sonuçlar doğurmaktadır (Gökel, 2000: Finkelstein ve ark., 2010).

Son yıllarda farklı renkleri, tek ya da çoklu çiçek yapısına sahip farklı formlarının bulunması, acı çiğdemin süs bitkisi olarak kullanımını ön plana

çıkarmaktadır, ancak türlerin yeni keşfediliyor olması çeşit geliştirme çalışmalarını geciktirmektedir (Kaya, 2009). Süs bitkilerde döllenme biyolojisinde farklı seviyelerde görülebilen kendileme depresyonu, değişik seviyelerde ploidi ve abortif embriyo oluşumuna sebep olan kendine uyuşmazlık gibi nedenlerden ötürü klasik yöntemlerle ıslah da bir hayli zordur (Jalali ve ark. 2012:Sugiyama ve ark. 2008)

Diğer taraftan türlere göre değişmekle birlikte *Colchicum*'un çoğaltım kat sayısı düşüktür. Tohumların çimlenme oranı da düşüktür ve düzensiz çimlenmektedir. Ayrıca ana yumru kaybolmaya yakın yılda sadece bir tane yavru yumru meydana getirir (Ellington ve ark. 1997). Bu nedenle dünyada ve ülkemizde önemi gün geçtikçe artan süs bitkisi sektöründe yeni çeşitlerin ıslahı, süs bitkisi tür ve çeşitlerinin tanımlanması, bitkilerin mikroçoğaltımı ve *in vitro* şartlarda muhafazası amacıyla biyoteknolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Diğer taraftan bitki genetik çeşitliliğinin korunmasında da ilgili problemler dikkate alındığında 1970'den bu yana biyoteknolojinin sunduğu imkanlardan yararlanılarak özellikle *in vitro* veya doku kültürü kullanılarak problemlere çözüm bulma eğilimi gelişmiştir.

Geofitler, generatif ve vegegatif yolla üretilebilmektedir. Generatif (tohumla üretim), olarak üretilen bitkilerin açılım göstermesinden dolayı ana bitkiye benzememesi, bazı bitkilerin yeterli oranda tohum oluşturamaması ve tohumun ekiminden çiçek oluşuncaya 4-5 yıl gibi uzun zaman almasından dolayı ve birtakım olumsuz etmenlerden ötürü bu üretim yöntemi pek tercih edilmemektedir. Vegetatif üretim yöntemleri arasında ise yavru soğanlar, yumru, rizom, koltuk altı yavru soğanları ve soğan pulları ile üretim ile doku kültürü yöntemi yer almaktadır (Ulus ve Seyidoğlu, 2004).

Bitki doku kültürü; steril koşullarda, içerisine bitki gelişimi için gerekli olan besin elementlerinin eklenmesi ile oluşturulmuş ortamda, bitki, hücre, doku gibi çeşitli bitki kısımları veya apikal meristem, kök gibi organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) elde

edilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik çeşitliliği oluşturmak doku kültürünün en önemli amaçları arasında yer almaktadır. Bundan dolayı *in vitro* çalışmalar, genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Diğer yandan nesli tükenmekte olan bitkilerin korunması ve çoğaltılması zor olan bitkilerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri kullanılmaktadır. Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur (Babaloğlu, 2002).

Doku kültürü çalışmaları steril koşullarda yapılmaktadır, geofitler ise yaşamlarını toprak altında çeşitli mikroorganizmalarla ve diğer hastalık faktörleriyle beraber sürdürmektedir. Bu nedenle geofitlerle yapılan doku kültürü çalışmalarında karşılaşılan ilk sorun yüzey sterilizasyonudur ve içsel endojen kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Yapılan yoğun sterilizasyon uygulamalarına rağmen bitkilerde bulaşıklık devam etmektedir. Yapılacak olan sterilizasyon yöntemi, eksplant kaynağına göre değişilklik göstermektedir. Örneğin eksplant kaynağı yaprak ise düşük konsantrasyonlu alkol ya da sodyum hypoklorit uygulamasından olumlu sonuç alınırken, kullanılan eksplant soğan ise yüksek konsantrasyonda solusyonların kullanılması gerekmektedir (Karaoğlu, 2010). *In vitro* çalışmalarda bu enfeksiyonların önüne geçmek amacıyla EtOH, NaOCl veya CaOCl, $HgCl_2$, $AgNO_3$ ve H_2O_2 gibi kimyasalların farklı konsantrasyon ve sürelerde ve aynı zamanda sıcaklık uygulamaları, fungusit, bakterisit ve antibiyotiklerle beraber kullanılması önerilmektedir. Ayrıca sterilizasyon amacıyla biyositler de kullanılabilmektedir (Babaloğlu, 2002). Bazı kalın kabuklu tohumlar, gövde parçaları veya yumrular, endojen kontaminasyon etmenleri taşıyabilirler. Bu nedenle mutlaka sağlıklı başlangıç materyali kullanmak gerekir.

Doku kültürü işlemlerinin başlangıç aşamasında verilecek en öncelikli kararlardan birisi kullanılacak besin ortamlarının seçimidir.Birçok bilimsel araştırmada kullanılan bitki yetiştirme ortamının içeriği belirlenmiş olmasına rağmen yalnızca bir kısmı (örnek: MS, B5 ve LS, WH, NN) ve bu ortamların değiştirilmiş içerikleri genel olarak kullanılmaktadır. (Ulus ve Seyidoğlu, 2004).

Bitki besin ortamlarında bulunması gereken temel maddeler su, makro elementler, mikro elementler, vitaminler, şekerler (karbon kaynağı), katılaştırıcılar (jel yapıcılar; agar, agaroz vb.), bitki büyüme düzenleyicileri, tamponlar, amino asitler ve kimyasal olarak tanımlanamayanlardır (Ulus ve Seyidoğlu, 2004)

Doku kültürü ıslah çalışmalarında, embriyo kültürü, haploid bitki üretimi, somaklonal varyasyon, *in vitro* seleksiyon, *in vitro* döllenme, *in vitro* germplasm çoğaltma ve muhafaza yöntemleri yoğun olarak kullanılmaktadır (Engelmann 1991; Bunn ve ark., 2007).

In vitro kültür şartlarında bitkisel hormonlar kullanılarak bitkinin herhangi bir doku veya organındaki somatik hücresinden direkt veya indirekt olarak embriyo elde etmek mümkündür (Çölgeçen 2006). Somatik embriyoların kaynağı somatik hücreler olduğı için elde edilen bitkilerde genetik açılım olmamaktadır. Aksine zigotik embriyolarda genetik açılım söz konusudur. Somatik doku hücreleri başlangıçta yüksek oranda oksin (2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), pikloram, naftalen asetik asit (NAA)), dikampa içeren ortamlarda sonraki aşamada ise oksin içermeyen ortamlara aktarılarak embriyo üretme yeteneği kazanmaktadırlar. Somatik embriyogenesiste kök ve gövde aynı anda oluşmaktadır. Sentetik tohum üretimi ve klonal çoğaltım, uygulama alanları arasına girmektedir. Oksin grubu hormonların, somatik bitki hücrelerine embriyo oluşturması için zigotik özellik kazandırdığı bilinmektedir (Çölgeçen, 2006).

Bitki biyoteknolojisi çalışmaları arasında yer alan somatik embriyogenezis, bitkilerin somatik hücre veya dokularından embriyo elde edilmesi sürecidir. Somatik embriyogenezis, 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 embryojenik kalluslar ve embriyoların kullanılması başarı ile devam etmektedir. Bu açıdan

bakıldığında ülkemiz için önemli endemik tür ve çeşitlerin *in vitro* muhafazasında somatik embriyogenezis çalışmaları kilit bir rol oynamaktadır.

Doku kültürü çalışmalarının genetik kaynakların muhafazası için önemli rol oynamasının yanı sıra *Colchicum* türünde *in vitro* çalışmalar daha çok önemli bir sekonder metabolit olan kolşisinin üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. *Colchicum* türünde kolşisin üretimi amaçlı hücre süspansiyon kültürünün kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Kolşisin eldesi için ilk *in vitro* kültüre alınan *Colchicum* türü ise *Colchicum autumnale*'dir (Shibli ve ark., 2010).

Genetik kaynakların korunmasında, tohum veya polen muhafazası en yaygın ve kolay yöntem olarak değerlendirilmektedir. Çünkü çok az çaba, alan ve kaynak gerektirmektedir. Buna rağmen pek çok bitki türü, ebeveynlerde görülen heterozigotik yapı, vejetatif üreme ve abortif tohumlara sahip olması gibi nedenlerden dolayı tohum veya polen muhafazası yöntemiyle korunamamaktadır. Bu tip bitkiler vejetatif yöntemlerle ya da tüm bitki olarak korunaklı depolarda *in situ* ve *ex situ* olarak muhafaza edilmektedir (Shii ve ark., 1994). Ancak ıslahçılar açısından bu kadar fazla çeşidi geleneksel yöntemlerle korumak, maddi anlamda kaynak ayırmak ve yeterli miktarda boş alan bulmak çok zordur. Diğer taraftan birçok süs bitkisi türü yok olma sınırına gelmiştir. Hızlı ve kolay uygulanabilir, yüksek kalitede ve birçok çeşit içeren gen bankaları süs bitkisi üreticileri için anahtar rol oynamaktadır. Bu yüzden bitkisel materyalin uzun süreli muhafazasında etkili bir yöntemin olması, ıslah ve bahçe bitkileri üretimi açısından oldukça önemlidir (Halmagyi ve ark., 2004).

Somatik embriyogenesisin kullanım alanlarından birisi olan sentetik tohum, hem *in vitro* hem de sera koşullarında bitki meydana getirebilme yeteneğine sahip olan ve somatik embriyo, propagüller, sürgün tomurcukları ya da herhangi bir bitki dokusunun yapay olarak kaplanması işlemidir. Sentetik tohum üretiminde bitkiden doğal olarak elde edilen sürgün tomurcukları, bitki doku kültürü yoluyla elde edilen somatik embriyolar temel olan materyallerdir. Sentetik tohum üretimi, klonal bitki çoğaltımını ve klonlanan özelliklerin devam etmesini

sağlamaktadır. Yaş tohumlar (hydrated seeds) ve kuru tohumlar (desiccated seeds) olmak üzere iki tip sentetik tohum bulunmaktadır Sentetik tohumların üretimi, temel olarak nesli tükenmekte olan türlerin, tıbbi ve ticari bitkilerin korunması ve çoğaltılması için önerilmiştir. Sentetik tohum üretim teknolojisi ile mevcut *in vitro* kültür sistemlerine kıyasla eksplantların hayatta kalma oranı önemli ölçüde arttırılmıştır. (Magray ve ark., 2017).

Somatik embriyoların ve embriyojenik kallusların sentetik tohum olarak kullanımı, büyük bir ekonomik öneme sahiptir. Özellikle zigotik embriyolardaki gibi açılımlar olmamakta ve somatik embriyolardan elde edilen sentetik tohumlardan çoğaltma klonal çoğaltım şeklinde olmaktadır. Somatik embriyoların sentetik tohum olarak hızlı klonal çoğaltımda kullanılması, *Colchicum* gibi endemizm oranı yüksek türler için büyük önem taşımaktadır. Sentetik tohum üretiminde somatik embriyolar yapay tohum kabuğu olarak görev yapacak aljinat ile kaplanır. Bu embriyolar bitkiciklerin oluşturulması için sera koşullarında ve *in vitro* koşullarda çimlendirilebilirler. Sentetik tohumlar birçok avantaja sahiptir; çalışılması kolaydır, potansiyel olarak uzun süre saklanabilirler ve büyük ölçekli üretimleri düşük maliyetle gerçekleştirilebilirler. Üretim işleminin bütün aşamalarının otomasyona bağlanma imkanının olması bir diğer avantajıdır. Çünkü somatik embriyogenesisin ticari uygulaması, çok büyük miktarda üretime ihtiyaç duyar. Sentetik tohumlar, +4 °C'de kısa süreli periyotlar için veya sıvı azotta dondurularak (kriyoprezervasyon, -196 °C) uzun süreli muhafaza için saklanabilirler (Fang ve ark., 2004). 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 büyük bir önem taşımaktadır. *Colchicum* türlerinde doku kültürü çalışmaları henüz başlangıç aşamasında olup özellikle ülkemize endemik olan türlerde her hangi bir kriyoprezervasyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Ancak bazı geofitlerde gerekli protokoller oluşturularak bu teknikler başarıyla uygulanmaya başlanmıştır.

Bu tez kapsamında ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bazı *Colchicum* türlerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması amacıyla somatik embriyogenezis protokolü geliştirilmiştir. Ayrıca sentetik tohum üretim denemeleri yapılmıştır. Gerek süs bitkisi olarak gerekse de tibbi açıdan önemli bir genetik kaynağımız olan *Colchicum* türlerimiz günümüze kadar ihmal edilmiştir. Dünya genelinde şu ana kadar yapılan araştırmalar, bazı *Colchicum* türlerinden alkaloid ve sekonder metabolit elde etme üzerine yoğunlaşmıştır. Ülkemizde 45'den fazla *Colchicum* türünün doğal olarak yayılım gösterdiği ve bu türler bakımından endemizm oranının %50 olduğu düşünüldüğünde; bu genetik çeşitliliği korumak, ileride bu türlerden yeni çeşitler geliştirmek ve katma değeri yüksek yeni ürünler üretmek açısından son derece önemlidir.

Bu tez kapsamında geliştirilmiş olan bu protokoller hem diğer türler için uygulanabilecek hem de ileride yürütülecek genetik mühendisliği, mutasyon ıslahı ve sekonder metabolit üretimi çalışmalarında başarıyla kullanılabilecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hayashi ve ark. (1988) tarafından doku kültürü yöntemi ile ilk kez Kolşisin üretimi çalışmaları yapılmıştır. *C. autumnale* türünün çiçekli bitkilerindeki sürgünleri eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. Eksplantları ilk olarak 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) içeren MS besi yerinde kültüre aldıktan sonra Indole-3-butyric acid (IBA) içeren MS besi yerinde (Murashige and Skoog, 1962) kültüre alma işlemlerini devam ettirmişlerdir. Ayrıca yapmış oldukları bu çalışmada besi yeri için etkili karbon kaynağının %3'lük sakkaroz olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar doku kültürü çalışmalarında farklı azot miktarlarını denemişler ve etkili azot miktarının 20 mM amonium ve 40 mM nitrat olduğunu belirlemişlerdir.

Tanker ve ark. (1995) Araştırmacının bildirdiğine göre ülkemizde acı çiğdem tohumu ihracatı 1987 yılında 10.000 kg iken bu değer ilerleyen yıllarda katlanarak artmış ve 1991 yılında 87.000 kg olmuştur. Ancak, günümüze kadar geçen süre içinde acı çiğdem tohumunun ihracatı ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Ellington ve ark. (1997) *C. autumnale* türünde paclobutrazolun sıvı MS kültüründe yavru kormların gelişmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada başlangıç olarak vejetatif tomurcuklar, 0.5 mg/l benzyladenin (BA), %3 sakkaroz ve makro elementlerin ½ MS ortamına aktarılmış ve karanlıkta kültüre alınmıştır. 2 ay sonra yavru kormlar, %6 sakkaroz ve 10 mg/l paclobutrazol içeren sıvı MS kültürüne transfer edilmiştir. Kontrol grubu olarak paclobutrazol içermeyen sıvı MS kültürü kullanılmıştır. Belirli aralıklarla kormların gelişme durumu incelenmiş ve paclobutrazol uygulaması yapılan yumruların kontrole göre gelişiminin daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Persson (1999) Ülkemizde acı çiğdem türlerinin tespit edilmesi üzerine en geniş çalışma, İsveç'li botanik bilimci Persson tarafından 1990'lı yıllarda yapılmıştır. Araştırmacı ülkemizde geniş bir arazi çalışması sonrasında topladığı

canlı bitkisel materyali İsveç'e götürerek tür teşhisi ve kültüre alma çalışmaları yapmış ve ülkemize endemik altı *Colchicum* türünü (*C. munzurense, C. minutum, C. sanguicolle, C. micaceum, C. heldreichii, C. inundatum*) yayınlamıştır

Shatnawi ve ark. (2003) Avustralya'da oldukça popüler ve pahalı bir süs bitkisi olan *Ceratopetalum gummiferum* Sm.'nin *in vitro* çoğaltımı ve muhafazasını araştırmışlardır. Bitkinin sürgün uçlarında başarılı bir enkapsülasyon/dehidrasyon tekniğiyle kriyoprezervasyon çalışması yapmışlardır. Çalışma sonucunda optimum rejenerasyon ortamının, 0.3 M ve 0.5 M sakkaroz içeren hormonsuz MS ortamı olduğunu rapor etmişlerdir. Sürgün uçlarının aljinat kaplaması için %3'lük kalsiyum aljinat kullanmışlardır. Kriyoprezervasyon işleminin ardından sürgün uçlarının gelişme oranlarının %61.4 olduğunu ve bitkiye dönüşümlerinin ise başarılı olarak gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

Mirici ve ark. (2005) nesli tükenmekte tehlikesi altında bir geofit olan *Sternbergia fischeriana*'da (Kış nergizi) olgunlaşmamış embriyo ve çiçek soğancığı yaprağı eksplantları için çeşitli bitki büyüme düzenleyiciler içeren besi ortamı kullanmışlardır. Olgunlaşmamış embriyodan elde edilen eksplant parçasından daha fazla sayıda çiçek soğancığı bulmuşlardır. 4 mg/l BA ve 0.25 mg/l NAA ya da 2 mg/l 2,4-D içeren besin ortamında eksplant başına ortalama 80 adet soğancık üretmişlerdir. Üretilen soğancıklar büyüklüklerine göre sınıflandırılarak 5 ºC'de muhafaza edilmiş, bu şartlarda 5 hafta tutulduktan sonra soğancıkların toprağa aktarıldığını bildirilmiştir.

Oran ve ark. (2005) *Amaryllidaceae* familyasına ait nesli tükenmekte olan tıbbi aromatik soğanlı bir bitki olan 'da *Sternbergia clusiana* (Kış nergizi)'da eksplant kaynağı olarak çiçek soğanını kullanmışlardır. *Sternbergia clusiana*'da hızlı ve etkili vejetatif çoğaltım için bir protokol geliştirmişlerdir. Çalışmada kullandıkları çiçek soğanı eksplanlarını, 1 dakika süreyle %70'lik etanol ve 30 dakika boyunca Tween 80 ile %6.5 NaOCl (2-3 damla 100 ml^{-1}) bekleterek sterilizasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir. Bitki büyüme düzenleyiciyisi olarak indol-3-butirik asit (IBA) ve benziladenin (BA) (0, 1, 5, 10 veya 20 µM)

kullanmışlardır. En yüksek rejenerasyon tekli eksplantlarda oranı (%73) 20 µM IBA içeren ortamdan, çiftli eksplantların %73'ü 10 µM IBA ve1,0 µM BA içeren ortamda doğrudan çiçek soğancığı oluşturmaya başlamıştır. Köklendirme işleminde herhangi bir büyüme düzenleyici kullanmamışlardır. Böylece *Sternbergia clusiana*'nın eksplantlarından bir bitki rejenerasyon sistemi oluşturmuşlardır.

Düşen ve Sümbül (2007) Akdeniz Bölgesi'nden toplanan 15'i sonbaharda 5'i ise ilkbaharda çiçeklenen toplam 20 *Colchicum* türünün morfolojik özelliklerini incelemişlerdir. Bu *Colchicum* türlerinin tipifikasyonları, sinonim listeleri, deskripsiyonları, ekolojik ve fitocoğrafik dağılışlarını ve yakın türlerle olan yakınlık derecelerini araştırmışlardır. Türkiye florasındaki *Colchicum* türlerinin tanımlanmasında daha önceden yer almayan yeni özellikler belirlemiş ve Akdeniz Bölgesi'nde doğal olarak yayılış gösteren bütün *Colchicum* türleri için uygun bir teşhis anahtarı (hem çiçekli, hem de yapraklı ve meyveli halde toplanan örnekler için) oluşturmuşlardır.

Gangophadyay ve ark. (2007) *Colchicum luteum* türünün ticari değeri yüksek ve en önemli etken maddesi olan kolşisin üretimi üzerine yaptıkları araştırmada, eksplant kaynağı olarak *C. luteum* türünün kormları kullanmışlardır. Eksplantları sürgün gelişimi için 8.88 µM BAP içeren MS besi yerinde kültüre almışlardır ve eksplant başına 12 adet sürgün oluştuğunu rapor etmişlerdir. Elde edilen sürgünlerin köklenmesi için ise, 5.71 µM IAA veya 4.92 µM IAA bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiş MS besi yerinin köklenme için etkili besi yeri olduğunu saptamışlardır. Elde edilen bitkilerin aklimatizasyonunda %99 oranında başarı sağlamışlardır. Bir yıllık bitkilerin, HPLC, TPC ve UV-vis spektral analizleri ile kolşisin içeriğine bakmışlardır. *In vitro* şartlarda elde ettikleri bitkilerin genetik kararlılığını, genetik markörler kullanarak doğrulamışlardır.

Ptak ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, lalede *in vitro* çoğaltma yöntemi olan somatik embriyogenesis için uygun protokol geliştirmişlerdir. Eksplant kaynağı olarak düşük sıcaklık uygulanan ''Apeldoorn'' soğanlarından izole edilen

çiçek saplarını kullanmışlardır. Soğanların bir kısmı düşük sıcaklık uygulaması yapılmamış, diğer kısmı ise 5 °C'de 12 veya 24 hafta boyunca bekletilmiştir. Eksplantları, 2,4 diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit (Pikloram), α-naftalenasetik asit (NAA)'in 1-100 µM ve benziladenin (BA) ve zeatin (ZEA)'in 0.5-50 µM konsantrasyonda kültüre almışlardır. Oksin konsantrasyonlarındaki artışın, homojen renksiz kallusa dönüşen eksplant parankimasında yoğun bir genişlemeye neden olduğunu bulmuşlardır. Pikloram'ın, 2,4-D'ye göre embriyojenik kallus oluşumunda daha etkili olduğu bulunmuştur. Oniki hafta boyunca soğutulmuş soğanlardan izole edilen çiçek sapının alt kısmının, kallus oluşumu için en iyi eksplant olduğunu kanıtlamışlardır. En fazla sayıda somatik embriyoyu, 25 µM pikloram ve 0.5 µM BA içeren ortamda üretmişlerdir. Globular embriyoların, BA (5 µM) ve NAA (0.5 µM)'nın etkisi altında torpido aşamasındaki embriyolara dönüştüğü tespit edilmiştir.

Raja ve ark. (2007) safranın yaprak eksplantlarını kullanarak mikrosoğan elde etmek amacıyla yaptıkları *in vitro* çalışma sonucunda, 4.0 mg/l BA+0.5 mg/l NAA+% 9 sakkaroz içeren ortamlarda mikrosoğan üretiminin sağlandığını bildirmişlerdir. Eksplant kaynağı olarak yaprak kullanıldığında, BA (1.0 mg/l) ve 2,4-D (1.0 mg/l) içeren MS ortamında canlılık oranının (%48.90) ve kallus oluşumunun yüksek olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, 2.0 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında (%56.3) mikrosoğan çoğaltımının en yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, 1.0 mg/l BA ve 1.0 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinden elde ettikleri kalluslardan somatik embriyogenesis yoluyla bitki elde etmişlerdir. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2.25 mg/l BAP+0.1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında ortalama 8.66 embriyo/eksplant ile somatik embriyoları elde etmişlerdir. Çimlendirme ortamı olarak içerisine 20.0 mg/l GA_3+2.0 mg/l ABA içeren MS ortamlarında 5 gün süre ile kültüre aldıkları somatik embriyoların çimlendirdiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca 2.0 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında çoğalttıkları embriyolardan ortalama 10.82 sürgün/eksplant elde edildiğini bildirmişlerdir.

Kaya ve ark. (2009) TÜBİTAK 1007 Kamu Projeleri Programı tarafından desteklenen "Bazı Doğal Bitkilerin Kültüre Alınması, Yeni Tür ve Çeşitlerin Süs Bitkileri Sektörüne Kazandırılması-I (Proje no: 105G068)" çalışması ile diğer soğanlı süs bitkileri ile birlikte 49 *Colchicum* taksonu taranmış ve koruma altına alınmıştır.

Persson (2009) Yaptığı çalışmada ülkemize endemik *C. paschei, C. dolichantherum, C. imperatoris-friderici* ve *C. leptanthum* K. Perss.'in tanımlamasını yapmıştır.

Baghdadi ve ark. (2010) farklı *Crocus* türlerinde yapmış oldukları enkapsülasyon vitrifikasyon çalışmasında, kallus yapılarını %3'lük aljinat ile 4 mm çapında olacak şekilde kaplamışlardır. Enkapsüle edilen eksplantlar yoğun Plant Vitrifikasyon 2 solüsyonunda 10, 20, 30, 60 ve 90 dakika boyunca dehidre edildikten sonra en az 1 saat olacak şekilde sıvı azota daldırılmıştır. Kallus yapılarının rejenerasyon ve canlılık oranının %100 oranı ile Plant Vitrifikasyon 2 solüsyonunda 20 dakika bekletildikten sonra kültüre alınan eksplantlardan gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Jevremovic ve ark. (2010) *I. pumila*'da, yaptıkları çalışmada bitki büyüme düzenleyicisi olarak 0.1-10 µM 2,4-D konsantrasyonu içeren MS besiyerine ekleyerek hazırladıkları ortamda, doku kültüründe organogenesis ve somatik embriyogenesis yöntemleriyle bitki rejenerasyonu sağlamışlardır. Bu çalışmada, 0.5 µM kinetin ve 5.0 µM 2,4 D içeren ortamdan elde ettikleri beyaz embriyojenik kallusun somatik embriyoya ve gelişen yeşil kallusun ise sürgüne dönüştüğünü bildirmişlerdir. Bu sürgünler, 0.1 uM BAP + 0.3 uM GA_3 içeren ortama alındığında bazı bitkicik çiçeklenmelerinin renk ve morfolojik olarak ana bitkiyle aynı özelliklere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Hormonsuz MS ortamına alınan somatik embriyoların kök yapılarının oluştuğunu bildirmişlerdir.

Daradkeh ve ark. (2012) yabani *Colchicum hierosolymitanum* Feib. türünün tohumlarını 0.45 µM 2,4-D içeren MS besi yerinde karanlıkta kültüre almışlar ve kallus yapılarını elde etmişlerdir. Elde ettikleri kallusları, 2,4-D (0.0,

0.45, 1.40, 2.30, 4.52 µM) ve Naphthalene acetic acid (NAA) (0.0, 0.54, 1.61, 2.70, 5.40 µM)'nın farklı konsantrasyonlarında karanlık ve aydınlık koşullarda alt kültüre almışlardır. Karanlık ortamda 4.52 µM 2,4-D içeren MS besi yerinde kallus oluşumu ve embriyoya dönüşüm oranlarının yüksek olduğunu saptamışlardır. Ayrıca karanlık ortamda 1.61; 2.70 veya 5.40 µM NAA içeren MS besi yerinde kültüre alınan eksplantlarda ise kallus oluşum oranının düştüğünü belirtmişlerdir. Kallusların embriyoya dönüşümü için ise farklı konsantrasyonlarda IBA (0.49, 2.5 µM), Kinetin (0.46, 1.4, 2.32, 4.7 µM), 6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino) purine (2iP, 2.5, 3.44, 5,10 µM), Zeatin (0.46, 1.4, 2.3, 3.2, 4.6 µM) veya Thidiazuron (TDZ) 0.45, 1.4, 2.3, 4.5 µM)'nin kombinasyonlarının yanı sıra, 2,4-D (0.45, 0.9 µM) ve BA (2.22, 3.11, 4.44,9 µM) kombinasyonlarını denemişlerdir. Bu çalışmada, belirttikleri büyüme düzenleyicileri içeren MS besi yerinde kallusların devamlılığını da gözlemlemişlerdir. Kallusların devamlılığını, farklı karbon kaynaklarında ve farklı azot miktarlarında test etmişler ve karbon kaynağı olarak 0.2 M sakkaroz ile azot kaynağı olarak NH_4+:NO_3 10:20 µM desteklenmiş besi yerinden etkili rejenerasyon elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Genişel ve ark. (2013) ISSR markör sistemi ile ülkemizin farklı yerlerinden toplanan 14'ü bilenen 20'si ise yeni tür adayı olan toplam 34 *Colchicum* örneğinin moleküler tanılamasını yapmışlardır. Araştırmacı çalışmasında 100 adet ISSR primeri ile örneklerde ön tarama yapmış ve 24 adet primeri polimorfik bularak çalışmalara bu primerlerle devam etmiştir. Araştırma sonucunda kullanılan primerler 799 adet bant üretmiş ve kullanılan primerler %100 polimorfizm oranı göstermiştir. Ancak *Colchicum* türleri her nekadar ISSR markör analizleri sonucunda oluşturulan dendogramda farklı dallarda yer alsa da, filogenetik ilişki tam olarak açıklanamamış ve yeni türlerin tanımlanmasında moleküler analizlerin yanında morfolojik karyolojik ve hatta biyokimyasal yöntemlerin kullanılması önerilmiştir

Kaya ve ark. (2013) ülkemiz florasında bulunan 35'i endemik toplam 48 *Colchicum* türüne ait belirlenen 384 populasyonun adaptasyon yeteneğini

incelemişlerdir. Her popülasyonu temsilen 10 adet yumru 8 birim orman toprağı, 4 birim torf, 1 birim nehir kumu ve yavaş çözünen gübre karışımını içeren saksılara dikilmiştir. Araştırmada bitkilerin çiçeklenme durumu ile birlikte çiçek ve yapraklara ait morfolojik kriterler incelenmiştir. Sonuç olarak 48 tür içerisinden sadece 1'inde (*C. paschei*) çiçeklenme meydana gelmez iken, diğer türler kültüre alındığı Yalova ekolojik şartlarına adapte olarak normal büyüme gelişme göstermişlerdir.

Singh ve ark. (2013) yok olma tehlikesi altında olan *Colchicum luteum* Baker türü için uygun mikroçoğaltım protokolü geliştirmişlerdir. Eksplant kaynağı olarak kormları kullanmışlar ve yüzey sterilizasyon protokolü için eksplantların 20 dakika süre ile %0.15 $HgCl_2$ içinde bekletilmesinin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ve 5.0 mg/l BA, 50.0 mg/l $AlSO_4$ ve 10.0 mg/l sitrik asit içeren MS bazal besi yerinde tomurcukların sürmesinin yanı sıra mikroçoğaltım oranının da yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Eksplant başına sürgün sayısı 9.67 oran ile belirtilen ortamda elde edilmiştir. Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için farklı konsantrasyonlarda IBA içeren MS besi yeri kullanmışlar ve etkili kök oluşumu 6.67 sürgün/kök oranı ile 0.5 mg/l IBA içeren MS besi yerinden elde etmişlerdir. İklimlendirme çalışmalarında ilk 10 günlük sürede kokopeat içeren tünellerde kültüre alma işlemlerini gerçekleştirmiş, ikinci 10 günlük sürede ise 1:1 oranında bahçe toprağı ve kum kullanarak %70'lik yaşama oranı elde etmişlerdir.

Karakaş ve ark. (2014) ülkemizde yayılış gösteren Colchicum türlerinden 14'ünün (*C. dolichantherum, C. kotschyi, C. szovitsii, C. balansae, C. decaisnei, C. polyphyllum, C. cilicicum, C. inundatum, C. heldreichii, C. serpentinum, C. chalcedonicum ssp punctatum, C. macrophyllum* ve *C. speciosum*) filogenetik ilişkisini AFLP markör sistemi kullanarak analiz etmişlerdir. 5 primer kombinasyonu ile yapılan çalışmada örnekler 3 ana grup altında toplanmış ancak filogenetik ilişkinin tam olarak ortaya koyulması için farklı markör sistemlerinin denenmesi önerilmiştir.

Wagh ve ark. (2015) *Colchicum luteum* kormlarının çimlenmesi ve büyümesi üzerine kitosanın etkilerini araştırdıkları çalışmada, MS besi yerine farklı konsantrasyonda çözülebilir kitosan eklemişlerdir. Kitosanın 0.5 mg/l konsantrasyonunu uygulanmayanlara göre çimlenmeyi artırdığını bildirmişlerdir. *In vitro* aşamada kullandıkları kormlara yüzey sterilizasyonunda Tween 20 içeren % 5 sıvı deterjan çözeltisinde 10-12 dk yıkandıktan sonra saf su ile durulama daha sonra EtOH'de 30 dakika, % 0.15'lik $HgCl_2$'de 10 dakika bekleterek yüzey sterilizasyonunu sağlamışlardır.

Özdemir ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, Akdeniz'de doğal olarak yetişen, Amaryllidaceae familyası üyelerinden kum zambakları (*Pancratium maritimum* L.) kullanılmıştır. Bu çalışmada *Pancratium maritimum* L. soğanlarının sodyum hipoklorid (NaOCl) çözeltisinin farklı konsantrasyonları (% 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) içerisinde belirli sürelerde (15, 20, 25, 30, 35 dakika) bekletilmesinin ardından soğanlarda oluşan deformasyon oranını (%) hesaplamışlardır. Soğanlar, 5'er dakika süre ile 3 tekrar şeklinde saf sudan geçirilmiş ve hormon içermeyen MS besin ortamına aktarıldıktan 10 gün sonra meydana gelen kontaminasyon oranları (%) belirlenmiştir. Sodyum hipoklorid çözeltisinin %2 ve 3 oranındaki konsantrasyonları içerisinde bekletilen soğanlarda deformasyon gözlenmezken, %100 oranında kontaminasyon tespit edildiğini belirtmişlerdir. En etkili yüzey sterilizasyonunun %5-6 oranında sodyum hipoklorid çözeltisi içerisinde 30 ve 35 dakika bekletilerek sağlandığını bildirmişlerdir. Soğanlarda, sodyum hipoklorid konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça yüzey sterilizasyonun arttığını, ve aynı zamanda soğanların pul yapraklarındaki deformasyon oranının da bu artışa bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir.

Yüzbaşıoğlu ve ark. (2017) Türkiye'de yetişen endemik türlerden olan *Galanthus woronowii* soğanının biyoteknolojik yöntemler ile *in vitro* koşullarda soğancık üretilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve aktif kömür kullanarak optimum ortam koşullarını belirlemeyi hedeflemişlerdir. Bu amaç için bitkisel hormon (BAP, NAA, GA_3 ve 2,4-D)

kombinasyonları ve farklı konsantrasyonlarda aktif kömür içeren MS ortamlarından soğancık oluşumunu teşvik etmişlerdir. Çalışmada kullanılan hormon kombinasyonları arasında 1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamında 3.67 adet soğancık elde etmişlerdir. En yüksek soğancık üretimi, 5 g/l aktif kömür içeren MS besi yerinde bulunmuştur. Ayrıca 1 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA içeren ortamlarda soğancık üretiminin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. *In vitro* koşullarda elde edilen tüm soğancıklar, 1 g/l ve 5 g/l aktif kömür içeren MS besiyeri ortamında köklendirilmiş ve dış ortama aktarımları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, *in vitro* koşullarda kullanılan tüm ortamlar arasında, aktif kömür uygulamasının soğancık oluşumunu teşvik ettiğini ortaya koymuşlardır.

Alp, (2020) Ülkemiz florasında doğal olarak yetişen *C. persicum, C. graecum, C. cilicium, C. coum ve C. pseudibericum* türlerinde somatik embriyo elde edilmesi amacıyla yaptığı çalışmada, eksplant kaynağı olarak türlerin yumrularını kullanmıştır. Bu çalışmada somatik embriyo yapılarını elde etmek için bitki büyüme düzenleyicisi olarak, 2,4-D ve 2iP'nin farklı kombinasyonlarını kullanmış, *C. persicum* türünde 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP ve 1.5 mg/l 2,4-D + 0.8 mg /l 2iP içeren, *C. coum* türünde ise 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2iP ve 2 mg/l 2,4-D + 0.3 mg/l 2iP içeren ½ MS ortamlarında somatik embriyo yapıları elde etmiştir. *C. cilicium* türünde 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg /l 2iP içeren besi yerinde somatik embriyo oluşumları gözlemlemiştir.

Karlik ve ark. (2020) Türkiye'de yayılış gösteren endemik türlerden biri olan *Colchicum calcedonicum* türünün üretimi ve korunması için *in vitro* çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada *colchicum* türünün toprak altı organlarını kullanarak bu türün üretimi için verimli kallus protokolünü oluşturmaya çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonunda, 20 dk %0.25 (w/v) civa klorür ($HgCl_2$) buna ek olarak 30 dk. Tween 80, %6.5 NaOCl'de bekletmişlerdir. Çalışmada, 19 farklı besiyeri kullanılmış olup primer kallus oluşumu, 2,4-D (2 mg/l), 2İP (0.5 mg/l), %3 sükroz ve %0.05 aktif karbon içeren Murashige & Skoog bazal

besiyerinden elde edilmiştir. Çalışmada aktif karbon kullanımının kallus oluşumuna etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Winkelmann ve ark. (2004) önemli bir süs bitkisi olan *Cyclamen persicum*'da yaptıkları çalışmada somatik embriyogenesisin vejetatif üretme ve sentetik tohum oluşturulmasında etkili bir sistem olduğunu bildirdikleri çalışmada, sıvı kültürde ürettikleri embriyoları kullanarak sentetik tohum üretmişlerdir. Bu çalışmada, globular aşamadaki somatik embriyoları kullanmışlardır. Sentetik tohum üretmek için klasik aljinat ile kaplama ve oluklu tanecik olmak üzere iki farklı kapsülasyon sistemini denemişlerdir. Klasik aljinat ile kaplanarak elde ettikleri sentetik tohumların çimlenme oranları kaplama yapılmamış kontrol embriyoları kadar yüksek (%97) bulunmuş, ancak çimlenme daha geç olmuştur. Oluklu taneciklerde ise çimlenme oranını %71 olarak bildirmişlerdir. Diğer yandan oluklu taneciklerde de çimlenme klasik aljinat ile kaplananlardan daha geç olmuştur. Oluklu taneciklerde çimlenme kapsül içerisinde olmuştur ve kapsül dışına çıkış aljinat kapsüllerindekilere göre daha zor olmuştur. Elde edilen sentetik tohumlar 28 gün +4°C'de muhafaza edilmiş kontrol ve kapsüllenmiş embriyoların canlılıklarında azalma olduğunu saptamışlardır.

Seyring ve Hohe (2005) *Cyclamen persicum* Mill'de somatik embriyolardan sentetik tohum üretmek için yaptıkları çalışmada, elde edilen sentetik tohumların kuruma toleransının uyarılması için çeşitli yöntemler kullanmışlardır. Morfolojik özelliklere göre belirlenen olgun embriyoların özenli bir şekilde seçilmesinin önemli bir etken olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek çimlenme oranı, 700-1000 µM boyutlarındaki torpedo şeklinde ve kuru gramında 0.2 gr H_2O içeren somatik embriyolardan elde edildiğini bildirmişlerdir. Olgunlaşma besiyerine, 75 g/l polietilen glikol ve 10 mg/l absisik asit ilavesinin kuruduktan sonra somatik embriyoların çimlenme oranını %28'e kadar çıkardığını belirtmişlerdir.

Yücesan ve ark. (2014) *Muscari armeniacum*'de etkili *in vitro* rejenerasyon protokolü geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada değişik

konsantrasyonlarda BA (0.5, 1.0 veya 2.0 mg/l) ve 0.5 mg/l NAA içeren LS ortamı kullanmışlardır. Bu çalışmada en yüksek somatik embriyo oluşumunun, 10 hafta sonra 2.0 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA içeren LS ortamında geliştiğini belirtmişlerdir. Olgunlaşmamış soğanlar, sodyum aljinat ile kaplanarak ya da doğrudan 0.5-1 mg/l GA_3 içeren ya da içermeyen LS ortamlarına aktarıldıktan sonra, 4 °C'de karanlıkta 10 hafta süre ile muhafaza edilmiş ve canlılıklarını korudukları bildirilmişdir.

Bektaş ve Sökmen (2016) *Serapias vomeracea*'nın *in vitro* çoğaltımının zor olduğu ve etkili mikroçoğaltım tekniğinin bulunmaması ve neslinin tehlike altında olması nedeniyle etkin bir mikroçoğaltım ve sentetik tohum protokolü geliştirmişlerdir. TDZ'nin farklı konsantrasyonlarını (0.1, 0.25, 0.5,1.0, ve 2.0 mg/l) ve 1.0 mg/l IBA içeren Orchimax ortamını kullanarak protokorm benzeri yapıları elde etmişlerdir. Sentetik Tohum üretimi için %3 sodyum aljinat ve 75 mM kalsiyum klorür kullanmışlardır. Yapay endosperm olarak aktif karbon içermeyen hormon olarak 2 mg/l Zeatin ve 1mg/l IBA içeren Orchilmax ortamı kullanmışlardır. Sentetik tohumların çimlendirilmesini, hem *in vitro* hem de steril toprak koşullarında yapmışlardır. *In vitro'*da çimlenme oranı, %80 olarak elde edilirken, toprak koşullarında bu oran %75 olarak hesaplanmıştır.

Baltacı ve ark. (2019) *Lamiaceae* familyasına ait çok yıllık bir bitki olan *Melissa officinalis*'ten sentetik tohum elde etmek amacı ile yaptıkları bu çalışmada, yan tomurcuklar ve somatik embriyoları sodyum aljinat ile enkapsüle ederek sentetik tohum elde etmişlerdir. Yan tomurcuk ve somatik embriyo kullanarak elde ettikleri sentetik tohumların çimlenme potansiyellerini incelemişlerdir. Somatik embriyo elde etmek için yaptıkları *in vitro* çalışmada, en yüksek kallus oluşumu 1.0 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l Kinetin (%62.5) ve 1.5 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l IAA + 0.5 mg/l Kinetin (%62.5) ortamlarından elde edilmiştir. Oluşan kalluslar en iyi 0.5 mg/l Kinetin içeren MS içeren ortamında somatik embriyo oluşturmuştur. Yan tomurcuk ve somatik embriyolar %4 sodyum aljinat kullanılarak enkapsüle edildikten sonra elde edilen sentetik tohumlar, torf ve MS ortamı içerisinde çimlendirilmiştir. Kullandıkları somatik embriyodan elde ettikleri

sentetik tohumlar, torf ve MS besi yerinde çimlenme göstermezken, yanal meristemlerden elde edilen sentetik tohumlar MS (%15) içeren besi yerinde çimlenme göstermişdir.

Koçak, (2019) *Cyclamen coum* türünde sentetik tohum üretimi için yaptığı çalışmada MS, WPM ve ROM olmak üzere 3 farklı ortam denemiştir. Eksplant kaynağı olarak somatik emriyogenesis yöntemiyle elde ettiği torpedo ve kotiledon aşamasındaki embriyoları kullanmıştır. Somatik embriyoları %3'lük Na aljinat ile enkapsüle ettikten sonra sentetik tohumların bir kısmını prolin (1 g/l) ve spermin (0.05 g/l) içeren ortamlara diğer kısmını içermeyen ortamlarda kültüre almıştır. Kaplama yapılarak kültüre alınan embriyolarda ilk haftadan itibaren irileşme gözlemlediğini bununla birlikte embriyolarda kararma olduğu bildirmiştir. Kapsüllenmiş embriyolarda embriyo oluşumunun MS besiyerinde ROM besiyerine göre daha yüksek olduğunu belirtmiştir. MS ortamında embriyo oluşum oranlarının prolin ve spermin içeren uygulamalarda daha yüksek olduğunu, ROM kullanılan ortamlarda ise önemli bir değişikliğe sahip olmadığını belirtmiştir. Yaptığı çalışmalarda bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır.

Alp, (2020) Ülkemiz florasında doğal olarak yetişen *C. persicum, C. graecum, C. cilicium, C. coum ve C. pseudibericum* türlerinde sentetik tohum elde edilmesi için yaptığı çalışmada eksplant kaynağı olarak somatik embriyo ve sürgün yapıları kullanmıştır. Sentetik tohum denemelerinde besi ortamı olarak MS kullandığı çalışmada kaplama materyali içerisine bitki büyeme düzenleyici olarak BA (1 ve 2 mg /l) ve NAA (0.1 mg/l) ayrıca prolin ve spermin eklemiştir. Somatik embriyoları ve sürgün yapılarını %3'lük Na aljinat ile kapladığı çalışmada prolin, spermin ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılan BA'nin çimlenmeyi olumlu yönde etkilediğini bildirmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

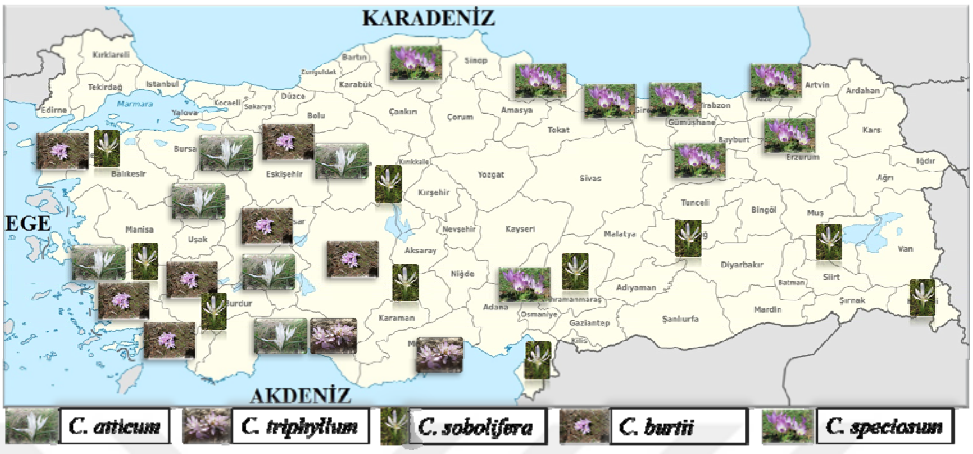
Tez çalışması kapsamında kullanılmış olan *Colchicum* türleri, TÜBİTAK 1160215 no'lu proje kapsamında doğadan toplanarak kültüre alınmıştır. Doğadan toplama işlemi için gerekli izinler; TAGEM, BÜGEM ve Orman Genel Müdürlüğü'nden sağlanmıştır. Yüzey sterilizasyonu, somatik embriyogenesis protokollerinin geliştirilmesi ve sentetik tohum üretiminde kullanılmış olan *Colchicum* türleri vejetasyon dönemlerinde aşağıda belirtilen lokasyonlardan toplanmıştır (Tablo 3.1).

Colchicum türleri, doğal yayılış gösterdikleri lokasyonlardan toplanarak Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Süs Bitkileri serasına (ısıtma-soğutma sistemli, aklimatizasyon odalı polikarbon sera) getirilmişlerdir. Türlerin kök bölgeleri topraktan arındırılıp, 13 cm derinliği olan torf: perlit:kum karışımı (1:1:1) içeren 3 litrelik plastik saksılara dikildikten sonra serada tezgahların üzerine yerleştirilmiştir. Saksılardaki bitkilerin güneş ışığından zarar görmemeleri için gölgeleme yapılarak, musluk suyu ile haftada bir 300 ml/saksı olacak şekilde sulanmıştır. Saksıdaki bitkilerin iki ayda bir %0.2'lik N:P:K (18:6:26) gübre solüsyonu hazırlanarak kültürel bakım işlemleri yapılmıştır.

Tez süresince materyal sıkıntısı yaşanmaması amacıyla bazı türler daha önce belirlenmiş lokasyonlardan tekrar toplanmıştır.

Çizelge 3.1. Somatik embriyogenesis, yüzey sterilizasyonu ve sentetik tohum üretiminde kullanılan *Colchicum* türleri ve toplandığı lokasyonlar.

No	**Tür adı ve Familyası (*Colchicaceae*)**	**Toplandığı Lokasyon**	**Toplama zamanı**
1	*Colchicum atticum*	Antalya Termesos çevresi, Kemer Kesmeboğazı ile Sumrak arası, Isparta Anamas çevresi 39° 25' 008" K; 30° 39' 215" D)	Şubat-Mart-Nisan
2	*Colchicum sobolifera*	Muğla; Datça Marmaris arası 39° 11' 2,0" N; 30° 33' 48" E),	Şubat-Mart-Nisan
3	*Colchicum burtii*	Eskişehir: Seyitgazi Şükranlı köyü civarı 39° 16' 18,3" N; 30° 40' 28" E)	Şubat-Mart-Nisan
4	*Colchicum speciosum*	Samsun, Atakum, Erikli köyü (36° 03' 33,9" K; 41° 21' 39,9" D)	Ekim-Kasım
5	*Colchicum triphyllum* Kunze	1. Eskişehir, Seyitgazi yolu Akpınar köyü ilerisi (39° 38' 728" K 30° 33' 45" D), 2. Antalya, Manavgat-Akseki yolu, Sandıklar köyü, Taşlıca yaylası (36° 55' 09,1" K, 31° 52' 02,3" D) 3. Mersin, Arslanköy, Yedigöz, (36° 55' 09,1" K, 31° 52' 02,3" D)	Ocak-Şubat-Mart



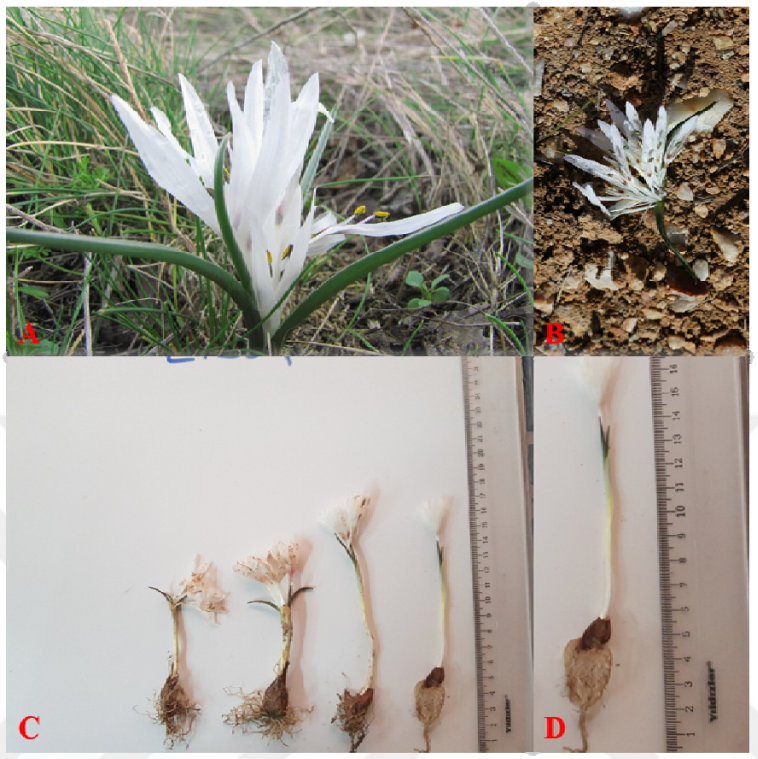
Şekil 3.1. *Colchicum* türlerinin Türkiye'de yayılış gösterdiği alanlar

3.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışması kapsamında kullanılan bitki türlerinin seçiminde, süs bitkisi olarak kullanılabilme potansiyelleri ve ulaşılabilir olmaları dikkate alınmıştır. Çalışmada kullanılan türler; *Colchicum sobolifera, Colchicum triphllyum, Colchicum speciosum, Colchicum atticum, Colchicum burtii*'dir.

3.1.1. *Colchicum atticum* (Yırtık Çiğdem)

Ülkemizde Bolu, Afyonkarahisar, Ankara, Bilecik, Burdur, Bursa, Isparta, İzmir, Kütahya, Manisa, Antalya bölgelerinde 100 m-2000 m yükseklikler de yayılış göstermektedir (Şekil 3.1). Yaygın bulunan bir tür değildir. Kış mevsiminde soğuk ve karlı, yaz mevsiminde ise sıcak ve kuru iklim isteği bulunmaktadır. Çiçeklenme zamanı, Şubat-Mart-Nisan ayları arasındadır. Kormlar (sert soğan) 15-20 x 10-15 mm çapında, dikdörtgen-oval şekillidir. Dış tunika (örtü pulu) siyah veya siyahımsı kahverenginde iken iç tunikalar koyu kahverengi tonlarındadır. Yapraklar, 3-5 adet, yeşil renkli, ince yapılı, ortadan belirgin kanallı ve kenarları tüylüdür. Çiçekler 3-5 adet olup, beyazdan morumsu pembe renge kadar değişir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum atticum* türü A-B) Doğal ortamında araziden çekilmiş görüntüsü C-D) Laboratuvar ortamındaki görüntüsü

3.2.2. *Colchicum triphyllum* (Ankara acı çiğdemi)

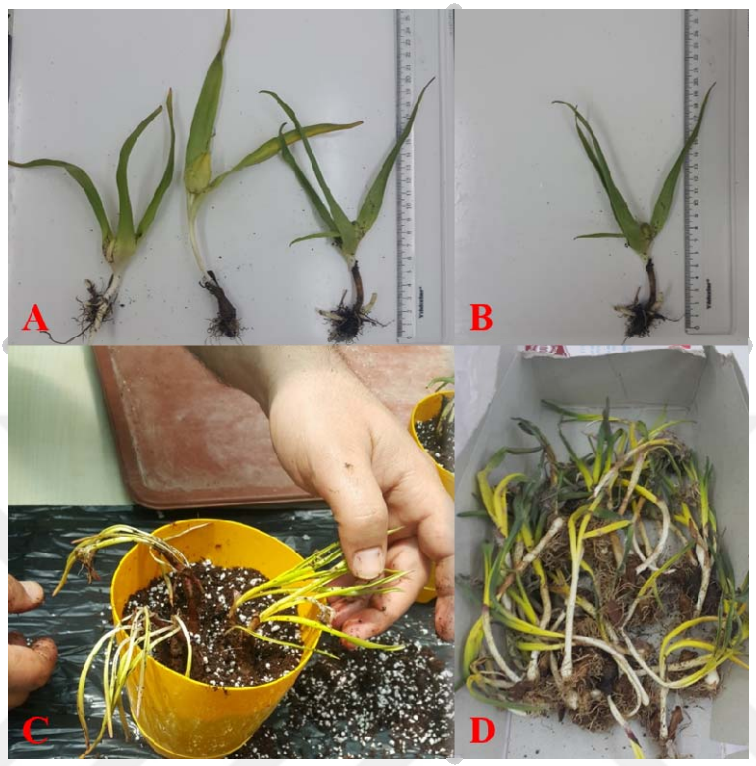
Ülkemiz coğrafyasında Batı, Orta ve Güney Anadolu bölgelerinde 700m-2100m yüksekliklerde, bozkır ve taşlı yamaçlarda yayılış göstermektedir (Şekil 3.1). Çiçeklenme zamanı, Ocak-Şubat-Mart ayları arasındadır (Kaya, 2009). Kormlar, 0.8-2.5x0.5-1.5 cm çapında, oval ya da yarı küremsi şekle farklılık gösterir. Dış tunika zarımsı ve koyu kahverenginde iken iç tunikalar sarımsı kahverenginden açık kahverengi tonlarında değişir. Yapraklar 3 adet, yarı dik ya da kavisli, mızrak şeklinde, hafif dalgalı ya da düzdür (Şekil 3.3). Çiçekler, 1-6 adet arasında olup huni şeklinden çan şekline doğru farklı yapılarda olabilir. Çiçekler açık pembe veya eflatun tonlardadır (Dinç Düşen ve Sümbül, 2007).

Şekil 3.3. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum triphyllum* A-B-C) Doğal ortamında araziden çekilmiş görüntüsü D) Laboratuvar ortamındaki görüntüsü

3.2.3. *Colchicum sobolifera*

Ülkemizde Ankara, Çanakkale, Hatay, Hakkâri, Denizli, Muğla, Konya, Kahramanmaraş, Elâzığ ve Bitlis illerinde dağılım göstermektedir. Genellikle 1000 m- 2400 m yüksekliklerde yetişmektedir (Şekil 3.1). Çiçeklenme zamanı, Şubat-Nisan dönemindedir. Kalkerli arazilerde eriyen kar kütleleri, etrafında taşlık ve kayalık alanlarda bulunmaktadır.

Kormlar (sert soğan), sobolifer (sürünücü tabanlı) yapıdadır. Tunika (örtü pulu) zarımsı ve kahverengi renktedir. Yapraklar, 3 adet linear yapıda (karşı kenarları birbirine paralel olan dar, uzun ve ince şeritsi yaprak) ve tüysüzdür. Çiçekler,1-2 adet olup açık pembe, beyaz ve eflatun tonlarındadır. Çiçekler linear veya ince elips şeklindedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum sobolifera* A-B) Laboratuvar ortamındaki görüntüsü C-D) Serada saksılara aktarılan bitkiler

3.2.4. *Colchicum burtii*

Ülkemizde endemik olarak yetişen çok yıllık otsu bir türdür. Batı ve Güney Batı Anadolu'da dağılım göstermektedir. Özellikle Eskişehir, Çanakkale, Denizli, Muğla, Konya ve Afyon illerinde genel olarak taşlık yamaçlarda ve kısa otluk alanlarda yetişmektedir (Şekil 3.1). Çiçeklenme zamanı Mart-Mayıs ayları arasındadır. Kormlar, 3.5 x 1.5-2 cm çapında, oval ya da dikine uzun şekildedir. Dış tunika siyahımsı kahverengidir. Çiçekler, 2-3 adet olup huni şeklindedir. Çiçekler, açık pembe veya eflatun tonlarındadır. Yapraklar yeşil renkli, dar doğrusal veya doğrusal mızrak şeklindedir (Şekil 3.5).

Şekil 3.5. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum burtii* A-D) Doğal ortamında araziden çekilmiş görüntüsü C) Doğadan toplanarak *in vitro* denemeler için laboratuvara getirilmiş bitkisel materyaller B) Serada kültüre alınmak üzere saksılarda kültüre alınmış bitkisel materyal

3.2.5. *Colchicum speciocum*

Ülkemizde Kuzey Anadolu özellikle Bolu, Kastamonu, Ankara, Amasya, Samsun, Gümüşhane, Giresun, Ordu, Trabzon, Artvin, Rize, Bayburt, Erzurum, Erzincan illerinde 700 m-2600 m yüksekliklerde yayılış göstermektedir (Şekil 3.1). Bitki, orman açıklıklarında ve kayalık alanlarda yetişir. Eylül-Ekim aylarında çiçeklenir (Kaya, 2009). Kormlar dikdörtgen-oval şekilli, 3-5 adet yaprağa sahip, yaprak şekli elipsten dikdörtgen-mızrak ucu şekline doğru farklılık gösterir (Şekil 3.6). Çiçekler çan ya da geniş çan şeklinde, beyaz, açık pembe-leylak tonlardadır. (Dinç Düşen ve Sümbül, 2007).

Şekil 3.6. Tez çalışması kapsamında toplanan *Colchicum speciosum* türü A-B-E) Doğal ortamında araziden çekilmiş görüntüsü C-D-E) *In vitro* denemelerde eksplant olarak kullanılmak üzere laboratuvara getirilmiş bitkisel materyal

3.2. Metod

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* denemelerinin tamamı ve bitkilerin kültürel bakım işlemleri, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarı ve süs bitkileri serasında gerçekleştirilmiştir.

Yüzey sterilizasyonu ve somatik embriyogenesis denemeleri öncesinde kullanılan tüm malzemeler (bistüri, pensler, kurutma kağıtları, cam malzemeler, pipet uçları, kullanılan saf su, vb.) 121ºC sıcaklıkta 15 dakika süresince ve 1.05 atmosfer basınç altında, otoklavda steril edilmiştir. Steril kabin içerisinde, steril koşulların sağlanması için tüm denemeler süresince, bistüri ve pensler %96'lık etil alkole batırıldıktan sonra elektrikli sterilizatörde sterilizasyonu gerçekleştirilerek altkültür ve transfer işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Yüzey Sterilizasyonu

Colchicum kormlarında optimum yüzey sterilizasyon protokolünü belirlemek amacıyla 4 farklı yöntem uygulanmıştır. Bu uygulamalarda; civa klorür ($HgCl_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve sodyum hipoklorit'in (ticari hypo) farklı süre ve konsantrasyonları denenmiştir (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3, Çizelge 3.4 verilmiştir).

Somatik embriyogenesis denemeleri kapsamında eksplant kaynağı olarak *Colchicum* türlerinin kormları kullanılmıştır. Araziden toplanan türler laboratuvara getirildikten sonra sağlam ve üzerinde herhangi bir hastalık belirtisi bulunmayan bitkiler seçilmiştir. Bitkilerin yaprak ve çiçekleri sadece kormlar kalacak şekilde temizlenmiştir. Ön temizleme işleminden sonra yüzey sterilizasyonu denemeleri yapılmıştır (Şekil 3.7). Denemede 2,2 mg/l MS (Mursahige ve Skoog, 1962), 30 gr/l sükroz, 0.5 gr/l aktif karbon, ve 4 gr/l gelrite kullanılmıştır. Hazırlanan MS besiyeri, otoklavda 121°C'de, 1.05 atm basınçta 15 dk. süre ile steril edilmiştir. Daha sonra MS besi yeri, laminar akımlı steril kabinler içerisinde her petriye (20x100mm) 30 ml olacak şekilde dökülmüştür.

Sterilize edilmiş kormlar, laminar akımlı steril kabin içerisinde 3x4 mm olacak şekilde steril pens ve bistüri yardımıyla parçalara ayrılmıştır. Denemeler her uygulama için 3 tekerrür, her tekerrürde 10 petri ve her petride 4 eksplant olacak şekilde kurulmuştur. Daha sonra petriler 25±1°C sıcaklıktaki büyütme odalarında karanlıkta kültüre alınmışlardır. Sterilizasyonda kullanılmayan bitkisel materyal ise + 4ºC'de % 85-90 nem ortamında karton kutularda muhafaza edilmiştir.

Şekil 3.7. *Colchicum* kormlarına uygulanan yüzey sterilizasyonu aşamaları A) Kormların ön temizlenmesi B) Antibakteriyal sabun ile yıkanması C-D) Musluk suyu altında bekletilmesi E) Kormların H_2O_2 ve $HgCl_2$'de bekletmesi F) Steril saf su ile durulama G) Kormların %70'lik etil alkolde bekletilmesi H) Steril saf su ile durulama I) %30'luk sodyum hipoklorit'de bekletilmesi İ) Steril saf su ile durulama J) Sterilizasyonu tamamlanmış *Colchicum* kormları

Çizelge 3.2. %30'luk NaOCl ile yapılan yüzey sterilizasyonu denemesi

	UYGULAMA	UYGULAMA SÜRESİ
%30 NaOCl	**Musluk suyu altında**	**20 dakika**
	Antibakteriyel sıvı sabunla yıkama	
	Saf su ile Durulama	
	%70'lik Etil Alkol	**1.5 dakika**
	Saf su ile Durulama	
	%30'luk zefiran	**5 dk**
	%30'luk Sodyum Hipoklorit (Twen 20)	**10, 20, 30 dakika**
	Saf su ile 3 kez Durulama	

Çizelge 3.3. %0.1'lik $HgCl_2$ ile yapılan yüzey sterilizasyonu denemesi

	UYGULAMA	UYGULAMA SÜRESİ
%0.1 $HgCl_2$	**Musluk suyu altında**	**20 dakika**
	Antibakteriyel sıvı sabunla yıkama	
	%0.1 $HgCl_2$	**10, 20, 30 dakika**
	Saf su ile Durulama	
	%70'lik Etil Alkol	**1.5 dakika**
	Saf su ile Durulama	
	%30'luk Sodyum Hipoklorit (Twen 20)	**30 dakika**
	Saf su ile 3 kez Durulama	

Çizelge 3.4. H_2O_2 ile yapılan yüzey sterilizasyonu denemesi

	UYGULAMA	UYGULAMA SÜRESİ
H_2O_2	**Musluk suyu altında**	**20 dakika**
	Antibakteriyel sıvı sabunla yıkama	
	%0.1'lik Fungusit	**1 dakika**
	H_2O_2 (%10,20,30)	**1.5 dakika**
	Steril Saf su ile Durulama	
	%70'lik Etil Alkol	**3 dakika**
	Steril Saf su ile Durulama	
	%30'luk Sodyum Hipoklorit (Twen 20)	**30 dakika**
	Steril Saf su ile 3 kez Durulama	

Çizelge 3.5. %0.2 $HgCl_2$ ile yapılan yüzey sterilizasyonu

	UYGULAMA	UYGULAMA SÜRESİ
%0.2 $HgCl_2$	**Musluk suyu altında**	**20 dakika**
	Antibakteriyel sıvı sabunla yıkama	
	%0.1'lik Fungusit	**1 dakika**
	%0.2 $HgCl_2$	**10, 20, 30 dakika**
	Saf su ile Durulama	
	%70'lik Etil Alkol	**3 dakika**
	Saf su ile Durulama	
	%30'luk Sodyum Hipoklorit (Tween 20)	**30 dakika**
	Saf su ile 3 kez Durulama	

3.2. Somatik Embriyogenesis Denemeleri

Somatik embriyogenesis denemelerinde yüzey sterilizasyonu tamamlanan *Colchicum* kormları kullanılmıştır. Optimum somatik embriyogenesis ortamını belirlemek amacıyla, farklı oksin (2,4-D, NAA) ve sitokinin (BA, 2iP)'in farklı konsantrasyonlarını içeren 30 farklı MS ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. *Colchicum* türlerinde birinci dönem somatik embriyogenesis denemelerinde kullanılan bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları

Konsantrasyon	2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)	Konsantrasyon	2,4-D (mg/l)	2iP (mg/l)
1	0,5	0,1	**7**	0,5	0,1
2	0,5	0,5	**8**	0,5	0,5
3	1	0,1	**9**	1	0,1
4	1	0,5	**10**	1	0,5
5	2	0,1	**11**	2	0,1
6	2	0,5	**12**	2	0,5
Konsantrasyon	**NAA (mg/l)**	**BA (mg/l)**	**Konsantrasyon**	**NAA (mg/l)**	**2iP (mg/l)**
13	0,5	0,1	**19**	0,5	0,1
14	0,5	0,5	**20**	0,5	0,5
15	1	0,1	**21**	1	0,1
16	1	0,5	**22**	1	0,5
17	2	0,1	**23**	2	0,1
18	2	0,5	**24**	2	0,5

In vitro çalışmalarda, sterilize edilmiş MS besi ortamı, steril kabinler içerisinde her petriye (20x100 mm) 30 ml olacak şekilde dökülmüştür. Ortamlar katılaştıktan sonra korm eksplantları, steril kurutma kağıtları üzerinde 3x4 mm çapında olacak şekilde bistüri ve pens yardımı ile parçalara ayrılarak MS besi yerinde kültüre alınmıştır (Çizelge 3.7).

Daha sonra petriler 25±1°C sıcaklıktaki büyütme odalarında, karanlıkta kültüre alınmışlardır. Denemeler, 3 tekerrür her tekerrürde 10 petri ve her petride 4 eksplant olacak şekilde kurulmuştur. Eksplantlardan her 4 haftada bir gözlem alınmıştır. Gözlem sırasında rejenerasyon, kallus oluşum ve embriyoya dönüşüm oranları incelenmiştir. Her 4-6 haftada bir eksplantlar alt kültüre alınmıştır.

Haftalık gözlemler sonucu elde edilen verilere göre gelişmenin sınırlı kaldığı ve ayrıca besi yerlerinde fenolik çıkışı meydana geldiği için MS besi yeri ve bitki büyüme düzenleyicilerine ek olarak besi yerine 0.5 g/l aktif karbon eklenmiştir.

Çizelge 3.7. Somatik embriyogenesis denemelerinde kullanılan MS (Murashige ve Skoog 1962) besi yeri içeriği

Makro elementler (MS)	**(mg/l)**
$NH4NO_3$	825
KNO_3	950
$CaCl_2$ x $2H_2O$	220
$MgSO_4$ x $7H_2O$	185
KH_2PO_4	85
Mikro elementler (MS)	**(mg/l)**
H_3BO_3	3.1
$MnSO_4$ x$1H_2O$	8.45
$ZnSO_4$ x$7H_2O$	5.3
KI	0.415
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0.125
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0.0125
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0.0125
Diğer Bileşikler	**(mg/l)**
Fe EDTA	34.51
Peptone	250
myo-Inositol	100
Glisin	2
Nikotinik asit	0.1
Thiamine HCl	0.5
Pyridoxine HCl	0.5

Denemelerde yapılan gözlemler sonucunda türlerin rejenerasyon yeteneğine bakılarak belirlenen 12 farklı konsantrasyonda bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri kurulmuştur (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. *Colchicum* türlerinde 2. dönem somatik embriyogenesis denemelerinde kullanılan bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları

Hormon Konsantrasyonları					
No	**2,4-D mg/l**	**BA mg/l**	**No**	**2,4-D mg/l**	**2 iP mg/l**
1	1 mg/l	0,1 mg/l	**4**	1 mg/l	0,1 mg/l
2	2 mg/l	0,1 mg/l	**5**	2 mg/l	0,1 mg/l
3	2 mg/l	0,5 mg/l	**6**	2 mg/l	0,5 mg/l
No	**NAA mg/l**	**BA mg/l**	**No**	**NAA mg/l**	**2 iP mg/l**
7	1 mg/l	0,1 mg/l	**10**	1 mg/l	0,1 mg/l
8	2 mg/l	0,1 mg/l	**11**	2 mg/l	0,1 mg/l
9	2 mg/l	0,5 mg/l	**12**	2 mg/l	0,5 mg/l

Somatik embriyogenesis denemeleri için daha önce başarılı olarak tespit edilmiş olan 6 farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonu içeren MS besi yeri kullanılmıştır (Çizelge 3.9)

Çizelge 3.9. Üçüncü dönem Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi konsantrasyonları

Hormon Konsantrasyonları (1 Litre)				
No	**2,4-D mg/l**	**2 iP mg/l**	**No**	**2,4-D mg/l**
A	2 mg/l	0,1 mg/l	**D**	2 mg/l
B	2 mg/l	0,5 mg/l	**E**	4 mg/l
No	**2,4-D mg/l**	**BA mg/l**	**F**	6 mg/l
C	1 mg/l	0,1 mg/l		

Somatik embriyogenesis denemelerinde incelenen kriterler

- Rejenerasyon (%)
- Embriyojenik Kallus oluşumu (%)
- Somatik embriyo oluşum oranı (%)

Rejenerasyon oranı (%) : Rejenerasyon meydana gelen eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir Kültüre alınan eksplantlarda meydana gelen şişkinleşmeler rejenerasyon olarak değerlendirilmiştir.

Embriyojenik Kallus Oluşum Oranı (%): Bu değer embriyojenik kallus oluşturan eksplant sayısının, toplam eksplant sayısına oranlamasıyla elde edilmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucunda elde edilen embriyojenik kallus yığınları açık sarı renkte, bazıları gevşek bazıları sıkı yapıdadır. Rejenerasyondan sonra organize olmamış hücre yığınları embriyojenik kallus olarak değerlendirilmiştir.

Somatik Embriyo Oluşum Oranı (%) : Her eksplanttan meydana gelen somatik embriyo sayısı, toplam eksplant sayısına oranlamasıyla elde edilmiştir.

Çalışmada ışık mikroskobu gözlemlerinde elde edilen görüntülerdeki embriyo aşamları g:globular, kp: kalp, tr: torpedo, kl:kotiledon ve E.K: embriyojenik kallus olarak gösterilmiştir**.**

Somatik embriyogenesis çalışmalarında bitkiçiğe dönüşüm olmamasından dolayı aklimatizasyon işlemi yapılmamıştır.

3.4. Enkapsülasyon (Sentetik tohum) Protokolünün Geliştirilmesi

Colchicum türlerinde somatik embriyogenesis protokolünün optimizasyonu sonrasında her tür için sentetik tohum üretim çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen embriyojenik yapılar ve başlangıç eksplantları enkapsüle edilmiştir. Sentetik tohum denemesinde, ½ MS ile farklı besi ortamlarının etkisini de araştırmak için, Rugini

Olive Medium (ROM, Rugini, 1984) (Çizelge 3.10) olmak üzere 2 farklı besi ortamı denenmiştir. Her bir ortam için prolin (1 g/l) ve spermin (0.05 g/l) içeren ve içermeyen kültürler kullanılmıştır.

Sentetik tohum üretimi için kullanılacak 1000 µl'lik mikro pipet uçları sentetik tohum büyüklüğüne uygun olacak şekilde kesilmiş ve otoklav edilerek steril hale getirilmiştir. Kullanılacak embriyolar bütün gruplar için homojen olacak şekilde dikkatlice gereken sayıda seçilmiş ve %3 aljinat + MS-ROM çözeltisi (%3 Na-alginat+Ca içermeyen sıvı MS-ROM) içerisine atılmıştır. Çözelti içerisinde 30 dk 25°C'de bekletilmiştir. Mikropipet uçları kullanılarak embriyolar aljinat ile birlikte çekilerek yavaşça 100 mM $CaCl_2$ çözeltisine aktarılmıştır (sentetik tohumların birbirine yapışmaması için çalkalama işlemi yapılmıştır). Damlatma işleminden sonra yaklaşık 10 dakika kalsiyum klorür çözeltisi içerisinde bekletilen ve dış kısmı sertleşen sentetik tohumlar steril metal bir süzgece aktarılmıştır. Süzgeç içerisinde birkaç kez steril saf su ile durulanan sentetik tohumların yüzeylerindeki kalsiyum klorür çözeltisi giderilmiştir. Daha sonra sentetik tohumlar steril kurutma kâğıdı üzerine serilerek kurutulmuştur (Şekil 3.8).

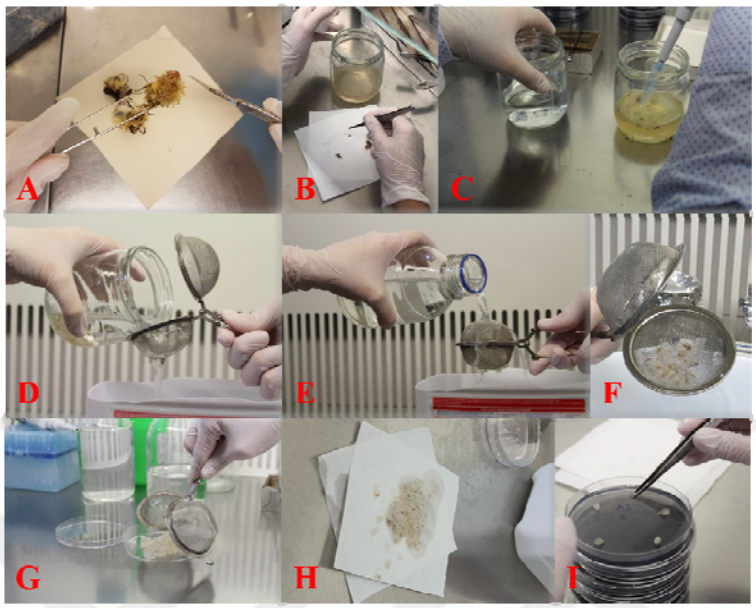
Polimerize edilen sentetik tohumların rejenerasyon yeteneklerini koruyup korumadıklarını belirlemek amacıyla, BA ve 2,4-D içeren MS ve ROM besi yerleri kullanılmıştır (25°C'de karanlıkta) (Çizelge 3.8). Deneme, her uygulama için 3 tekerrür her tekerrürde 5 petri ve her petride 10 eksplant olacak şekilde kurulmuştur.

Çizelge 3.10. Sentetik tohum MS ve ROM besi yerindeki deneme planı

Na-aljinat (MS-ROM) →	Kontrol 1 mg/BA+Prolin+Spermin 1 mg/BA 1 mg/ 2,4-D+Prolin+Spermin 1 mg/ 2,4-D 1mg/BA+1mg/2,4-D +Prolin+Spermin 1 mg/BA + 1 mg/ 2,4-D

Çizelge 3.11. Sentetik tohum denemelerinde kullanılan ROM (Rugine Olive Medium) içeriği (Rugini, 1984).

Makro Elementler	Miktar (mg/l)
NH_4NO_3	412
$CaCl_2$	332.16
$Ca(NO_3)_2$	416.9
KCl	500
KH_2PO_4	340
KNO_3	1100
$MgSO_4$. $7H_2O$	732.5
Mikro Elementler	Miktar (mg/l)
$CoCl_2$ $6H_2O$	0.025
$CuSO_4$ $5H_2O$	0.25
Na_2 EDTA $2H_2O$	37.5
$FeSO_4$. $7H_2O$	27.8
$MnSO_4$. H_2O	16.9
Na_2MoO_4. $2H_2O$	0.25
KI	0.83
$ZnSO_4$. $7H_2O$	14.3
H_3BO_3	12.4
Vitaminler	Miktar (mg/l)
D-Biyotin	0.05
Folik asit	0.5
Glisin	2
myo-Inositol	100
Nikotinik asit	5
Piridoksin HCl	0.5
Tiamin HCl	0.5



Şekil 3.8. Sentetik tohum üretimi A) Embriyoların steril filtre kağıtlar üzerinde kesilmesi B) Embriyoların sodyum aljinat içine aktarılması C) Embriyoların kalsiyum klorür içerisine mikropipet ile alınması D-E) Sentetik tohumların steril saf su ile yıkanması F-G) Polimerize olmuş sentetik tohumlar H) Sentetik tohumların kurutma kağıdında kurutulması I) Sentetik tohumların besi ortamlarına aktarılması

Sentetik Tohum Denemelerinde İncelenen Kriterler:

Çimlenme Oranı (%): Bu oran çimlenme gerçekleşen sentetik tohum sayısının, toplam sentetik tohum sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir.

Kol sayısı (%): Çimlenme meydana gelen sentetik tohumlarda oluşan toplam kol sayısının, çimlenen sentetik tohumlara oranlanmasıyla elde edilmiştir.

3.5. Somatik Embriyoların Çimlendirilmesi

Tez çalışma kapsamında, bütün türlerden elde edilen embriyojenik kallus ve embriyoların bir kısmı 2 mgL^{-1} GA_3 + 0.1 mgL^{-1} BA, 1 gL^{-1} prolin, 30 gL^{-1} sükroz ve 3.5 gL^{-1} gelrite içeren MS ortamında, diğer kısmı ise hormonsuz MS ’de çimlendirilmek üzere kültüre alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yüzey Sterilizasyonuna Ait Bulgular

Colchicum'un 5 farklı türünde yapılan yüzey sterilizasyonu denemelerinde etkili bir protokol oluşturmak amacıyla 4 farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler; civa klorür ($HgCl_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve sodyum hipoklorit'in (Ticari hypo) farklı süre ve konsantrasyonlarını kapsamaktadır.

Tez çalışmasında, %0.1'lik $HgCl_2$ (Civa Klorür) ile yapılan yüzey sterilizasyonu sonucunda elde edilen değerler, Çizelge 4.1'de verilmiştir. Civa klorür uygulamasında, farklı uygulama sürelerinin ve türün enfeksiyon oranı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çalışmada, tür x uygulama süresi interaksiyonu istatiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

%0.1'lik $HgCl_2$ ile yapılan yüzey sterilizasyonunda uygulama süreleri incelendiğinde, en yüksek enfeksiyon oranı 10 dakikalık bekleme süresinde (%48.93) belirlenirken, en düşük enfeksiyon oranı 30 dakikalık bekleme süresinde (%34.67) elde edilmiştir. Genel olarak sürenin uzaması ile enfeksiyon oranında azalmalar saptanmıştır. Türler arasında ise en düşük enfeksiyon oranı %27.00 ile *C. atticum* türünde görülmüştür ve bunu sırası ile %40.78 *C. sobolifera*, % 42.33 *C. burtii*, %44.22 *C. triphyllum* ve %46.22 ile *C. speciosum* türleri takip etmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Colchicum* türlerinde %0.1'lik $HgCl_2$ yüzey sterilizasyonu enfeksiyon değerleri (%)

Bitkisel Materyal	%0.1 $HgCl_2$			
	10 dk.	20 dk.	30 dk.	Ortalama (%)
Colchicum atticum	36.67	22.67	21.67	27.00 d
Colchicum sobolifera	48.33	38.33	35.67	40.78 c
Colchicum burtii	49.67	39.67	37.67	42.33 bc
Colchicum triphyllum	53.33	40.67	38.67	44.22 ab
Colchicum speciosum	56.67	42.33	39.67	46.22 a
Ortalama (%)	48.93 a	36.73 b	34.67 c	

$LSD_{(0,05)}$ Uygulama= 4,47 $LSD_{(0,05)}$Çeşit= 3,16 $LSD_{(0,05)}$Uygulama*Çeşit=Ö.D

Colchicum türlerinde %30 NaOCl (Sodyum Hipoklorit) kullanılarak yapılan yüzey sterilizasyonu denemesinde, elde edilen enfeksiyon oranları, Çizelge 4.2'de verilmiştir. Sodyum hipoklorit uygulamasında farklı uygulama sürelerinin, tür ve tür *uygulama interaksiyonunun enfeksiyon oranı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

%30'luk NaOCl kullanılarak yapılan yüzey sterilizasyonu denemesinde, uygulama süreleri incelendiğinde, en yüksek enfeksiyon oranı 10 dakikalık (%91.00) bekleme süresinden gözlemlenirken, en az enfeksiyon 30 dakikalık (%87.53) bekleme süresinde gözlemlenmiştir. Türler arasındaki fark incelendiğinde ise en az enfeksiyonun *C. atticum* türünde (%87.22), en fazla enfeksiyonun ise *C. Sobolifera* türünde (%90.56) olduğu belirlenmiştir. Tür*uygulama interaksiyonu incelendiğinde. en düşük enfeksiyon oranı 30 dakikalık bekleme süresinde *C. atticum* türünde (%85.00) en fazla enfeksiyon oranı ise 10 dakikalık bekleme süresinde *C. speciocum* türünde (%94.00) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Genel olarak incelendiğinde, %30'luk NaOCl kullanılarak yapılan yüzey sterilizasyonu denemesinde, bekleme süreleri arttıkça enfeksiyon oranı azalmaktadır. Enfeksiyon sonuçları incelendiğinde geofitlerde yapılacak çalışmalar için uygun olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.2. *Colchicum* türlerinde %30 NaOCl yüzey sterilizasyonu enfeksiyon oranları (%)

Bitkisel Materyal	**%30 NaOCl**			
	10 dk.	**20 dk.**	**30 dk.**	**Ortalama(%)**
Colchicum atticum	88.67 de	88.00 de	85.00 g	87.22 d
Colchicum sobolifera	92.67 ab	91.00 bc	88.00 de	90.56 a
Colchicum burtii	91.00 bc	89.33 cd	86.00 fg	88.78 c
Colchicum triphyllum	92.33 ab	89.00 d	87.00 ef	89.44 bc
Colchicum speciosum	94.00 a	89.00 d	88.00 de	90.33 ab
Ortalama (%)	91.00 a	89.27 b	87.53 c	

$LSD_{(0,05)}$ Uygulama= 2,13 $LSD_{(0,05)}$Çeşit= 1,51 $LSD_{(0,05)}$ Uygulama*Çeşit= 1,07

Colchicum türlerinde %0.2'lik $HgCl_2$ kullanılarak yapılan yüzey sterilizasyonu denemesinden elde edilen enfeksiyon oranları, Çizelge 4.3'de verilmiştir. %0.2'lik $HgCl_2$ uygulamasının farklı uygulama sürelerinin, tür ve tür*uygulama interaksiyonunun enfeksiyon oranı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

%0.2'lik $HgCl_2$ kullanılarak yapılan yüzey sterilizasyonu denemesinde, uygulama süreleri incelendiğinde, en yüksek enfeksiyon oranı 10 dakikalık (% 42.53) bekleme süresinde gözlemlenirken, en düşük enfeksiyon 30 dakikalık (% 29.93) bekleme süresinde gözlemlenmiştir. Türler arasındaki fark incelendiğinde ise en düşük enfeksiyon *C. atticum* türünden (% 24.44) elde edilirken, en yüksek enfeksiyon oranı *C. speciosum* türünden (% 40.67) sağlanmıştır. Tür*uygulama interaksiyonu incelendiğinde ise en düşük enfeksiyon 30 dakikalık bekleme süresinde *C. atticum* türünde (% 19.67) görülürken, en yüksek enfeksiyon oranı 10 dakikalık bekleme süresinde *C. triphyllum* (% 46.00) ve *C. speciocum* türlerinde (%47.67) belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Colchicum* türlerinde %0.2 $HgCl_2$ yüzey sterilizasyonu enfeksiyon değerleri (%)

Bitkisel Materyal	**%0.2 $HgCl_2$**			
	10 dk.	**20 dk.**	**30 dk.**	**Ortalama (%)**
Colchicum atticum	33.33 efg	20.33 h	19.67 h	24.44 d
Colchicum sobolifera	42.33 bc	35.67 e	31.67 fg	36.56 c
Colchicum burtii	43.33 b	39.67 d	31.33 g	38.11 b
Colchicum triphyllum	46.00 a	39.00 d	33.00 efg	39.33 ab
Colchicum speciosum	47.67 a	40.33 cd	34.00 ef	40.67 a
Ortalama (%)	42.53 a	35.00 b	29.93 c	
$LSD_{(0,05)}$ Uygulama= 2,9	$LSD_{(0,05)}$Çeşit= 2,10		$LSD_{(0,05)}$ Uygulama*Çeşit= 1,48	

Farklı *Colchicum* türlerinde H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) kullanılarak yapılan yüzey sterilizasyonu denemesinde elde edilen enfeksiyon oranları, Çizelge 4.4'de

verilmiştir. H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) uygulamasının farklı konsantrasyonlarının, türlerin ve tür*uygulama interaksiyonunun enfeksiyon oranı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılarak yapılan yüzey sterilizasyonu denemesinde konsantrasyonlar değerlendirildiğinde, en yüksek enfeksiyon oranı % 10'luk H_2O_2 (%76.47) uygulamasından en düşük enfeksiyon ise %30'luk H_2O_2 (%41.20) denemesinden gözlemlenmiştir. Tür*uygulama interaksiyonu incelendiğinde ise en düşük enfeksiyon oranı *C. atticum* türünde %30'luk H_2O_2 konsantrasyon uygulamasından (%36.67) en yüksek enfeksiyon ise *C. speciocum* türünde %10'luk H_2O_2 konsantrasyon uygulamasından (%84.33) belirlenmiştir. H_2O_2 ile yapılan yüzey sterilizasyonu uygulamasında, H_2O_2 konsantrasyon oranı arttıkça enfeksiyon oranının azaldığı görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *Colchicum* türlerinde H_2O_2 ile yapılan yüzey sterilizasyonu enfeksiyon değerleri (%)

Bitkisel Materyal	**H_2O_2**			
	%10	**%20**	**%30**	**Ortalama(%)**
Colchicum atticum	65.00 e	51.67 g	36.67 ı	51.11 d
Colchicum sobolifera	75.00 bc	57.00 f	40.67 hı	57.56 c
Colchicum burtii	76.33 b	58.33 f	41.67 hı	58.78 c
Colchicum triphyllum	81.67 a	66.00 de	42.33 h	63.33 b
Colchicum speciosum	84.33 a	70.33 cd	44.67 h	66.44 a
Ortalama (%)	76.47 a	60.67 b	41.20 c	

$LSD_{(0,05)}$ Uygulama= 6,28 $LSD_{(0,05)}$Çeşit= 4,44 $LSD_{(0,05)}$ Uygulama*Çeşit= 3,14

Geofitlerde *in vitro* çalışmalarda karşılaşılan en büyük sorun, yüzey sterilizasyonudur. Enfeksiyon oranının genel olarak yüksek çıkmasının endojen kaynaklı olduğu düşünülmektedir. *In vitro* çalışmalarda enfeksiyonun önüne geçmek için EtOH, $HgCl_2$, H_2O_2 gibi kimyasalların farklı konsantrasyonları ve uygulama süreleri, diğer yandan sıcaklık uygulamaları, fungusit, bakterisit ve

antibiyotiklerde kullanılmaktadır. Yapılan yoğun sterilizasyon uygulamalarına rağmen bitkiler bulaşık olmaktadır. Yapılacak olan sterilizasyon yöntemi, eksplant kaynağına göre değişiklik göstermektdir. Örneğin eksplant kaynağı yaprak ise düşük konsantrasyonlu EtOH ya da NaOCl uygulamasında olumlu sonuç alınırken, kullanılan eksplant soğan ya da korm ise yüksek konsantrasyon kullanılması gerekmektedir. (Karaoğlu 2010).

Yapılan yüzey sterilizasyonu denemelerinde kullanılan 4 farklı yöntemde genel itibariyla konsantrasyon ve uygulama sürelerinin artmasıyla enfeksiyon oranının azaldığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada kullanılan yöntem olan %0.1 ve %0.2'lik $HgCl_2$ uygulamalarında sürenin artması enfeksiyon oranını azalttığı, kullanılan türler arasında ise en az enfeksiyon oranı ise soğan çapı küçük olan *C.atticum* türünde elde edilmiştir. Bu da bize uygulamada soğan çapının küçüldükçe enfeksiyon oranının azaldığını göstermektedir.

Sodyum hipoklorit (NaOCl) uygulamasında uygulama süresinin uzaması ile enfeksiyon oranlarında azalma meydana gelmiştir. Ancak enfeksiyon oranı ortalamaları incelendiğinde, tüm ortalamaların çok yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak bu uygulamanın incelenen türlerin yüzey sterilizasyonı için uygun bir yöntem olmadığı saptanmıştır.

Hidrojen peroksit uygulaması incelediğinde, konsantrasyon artmasıyla enfeksiyon oranlarında azalmalar meydana gelmiştir. Ancak belirtilen uygulamalarda konsantrasyonun artmasıyla soğanlarda yüzey sterilizasyonu sırasında deformasyonlar belirlenmiştir. Bu nedenle yüzey sterilizasyonunda kullanılacak hidrojen peroksitin konsantrasyonuna dikkat edilmesi gerekmektedir. Çalışılan bitki dokularında fitotoksitite meydana getirdiği görülmüştür.

Sonuç olarak bu araştırma kapsamında incelen türlerde yapılacak en uygun yüzey sterilizasyonu, % 0.2 HgCl2 30 dakikalık uygulama süresi olduğu belirlenmiştir.

Oran ve Fattash (2005) tarafından yapılan çalışmada kara çiğdemin soğanları kullanılmış ve soğanlar %70 ethanol'de 1 dakika, 1 ml % 6.5'luk NaOCl

ile 2-3 damla Tween 80 içeren çözeltide 30 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonunu sağlamışlardır. Özdemir ve ark. (2016) *Pancratium maritimum* L. soğanlarında hipoklorid (NaOCl) çözeltisinin farklı konsantrasyonlarını kullanarak yaptıkları çalışmada, en etkili yüzey sterilizasyonunun %5-6 oranında sodyum hipoklorid çözeltisi içerisinde 30 ve 35 dakika bekletilerek sağlandığını bildirmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında kullanılan %30'luk NaOCl ile yapılan yüzey sterilizasyonu çalışması benzerlik göstermemektedir. Karlık ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada *colchicum* türünün kormlarını %0.25 civa klorür ($HgCl_2$)'de 20 dakika bekletilerek yüzey sterlizasyonu yapmışlardır. Bu tez çalışmasında $HgCl_2$ile yapılan yüzey sterilizasyonu ile parellik göstermektedir. Wagh ve ark. (2015) *C.luteum* türünde % 0.15 lik $HgCl_2$'de 10 dakika bekleterek yüzey sterilizasyonu sağlandığını belirtmişlerdir.

4.2. Somatik Embriyogenesis Denemelerine Ait Bulgular

4.2.1. *Colchicum atticum* Türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları

C.atticum türünde optimum somatik embriyogenesis protokolünü belirlemek amacıyla bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D, 2İP ve BA içeren farklı MS besi yerleri kullanılmıştır. *C.atticum* türünde bitkisel materyal toplanmasında yaşanan sıkıntılar nedeni ile yapılması planlanan 30 farklı MS besi yeri kombinasyonundan yalnızca 11 farklı hormon konsantrasyonu içeren MS besi yeri kullanılmıştır.

Yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda, rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo yapıları elde edilmiştir. Kullanılan farklı bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS besi yerlerinin *C. atticum* türünün rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşturma yeteneği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.5). Kullanılan bütün MS besi yerlerinde rejenerasyon meydana gelirken, embriyojenik kallusun 6 farklı MS besi yerinde, somatik embriyonun ise 3 farklı MS besi yerinde oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). En yüksek rejenerasyon oranı, %

80 ile 0,5 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l 2,4-D MS besi yerlerinden, en düşük rejenerasyon oranı ise %15 ile 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA MS besi yerinden meydana gelmiştir.

Embriyojenik kallus oluşumları incelendiğinde, 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde en yüksek (% 45), 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA içeren MS besi yerinde ise en düşük (% 10) embriyojenik kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Somatik embriyo oluşum değerleri incelendiğinde ise en yüksek somatik embriyo oluşum oranı (%80) 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinden elde edilmiştir (Şekil 4.5).

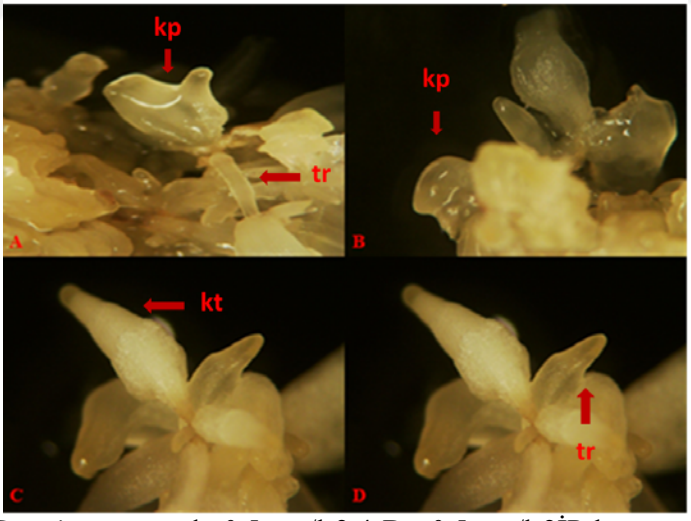
Çizelge 4.5. *Colchicum atticum* türünde farklı MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranları (%)

Besi Yeri	***Colchicum atticum***		
	Rejenerasyon %	**Embriyojenik Kallus %**	**Somatik Embriyo %**
Kontrol	40ab	0	0
1. 0,5 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA	80a	20bc	0
2. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	45ab	10c	0
3. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	20b	0	0
4. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	15b	0	0
5. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	35b	0	0
6. 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA	50ab	0	0
7. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	20b	0	0
8. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	30b	20bc	0
9. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	45ab	40ab	60b
10. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	40ab	40ab	60b
11. 1 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	80a	45a	80a

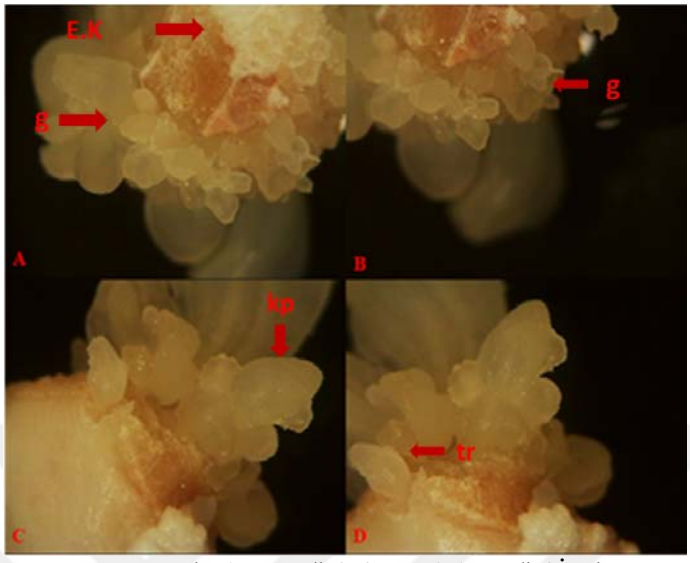
$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon=26,55 $LSD_{(0,05)}$Kallus= 16,39 $LSD_{(0,05)}$ Embriyo= 3,50

Eksplantların kültüre alındıktan yaklaşık 6 hafta sonra rejenerasyonun, 10 hafta sonra ise embriyojenik kallus oluşumlarının başladığı gözlemlenmiştir. Gelişen embriyojenik kalluslar sarı-krem renkte olup dağılgan ve kırılgan yapıdadır (Şekil. 4.1). Kallus oluşumuyla beraber yaklaşık 9 hafta sonra somatik embriyolar meydana gelmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4).

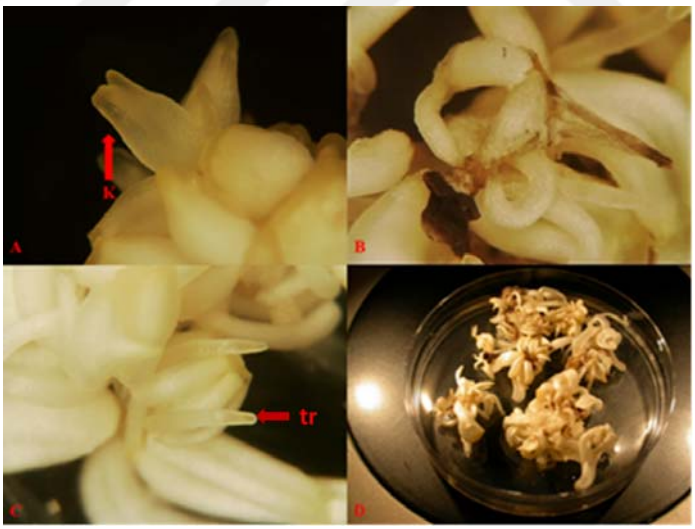
Şekil. 4.1. *C. atticum* türünde 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis sonucu oluşan yapılar gelişimi A)Eksplantlar kültüre alındıktan 6 hafta sonra rejenerasyon aşaması B) 10. Haftada Kallus gelişimi C) 4. Alt kültür sonucu oluşan yapılar D) Embriyoların 19. haftaki gelişimi



Şekil. 4.2. *C. atticum* türünde 0,5 mg/l 2,4 D +0,5 mg/l 2İP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemelerinde 19. Hafta sonu meyda gelen yapılar A) Kalp ve torpedo aşamaları B)) Kalp torpedo aşamaları C) Kotiledon aşaması D) Torpedo aşaması meydana gelen yapılar



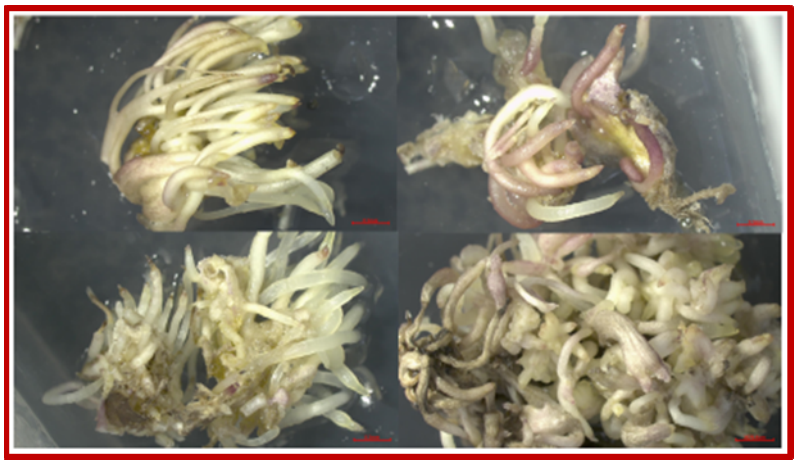
Şekil. 4.3. *C. atticum* türünde 0,5 mg/l 2,4 D +0,1 mg/l 2İP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemelerinde meyda gelen yapılar A) Embroyijenik kallusların somatik embriyoya dönüşümü ve Globular aşama B) Globular aşama C) Kalp aşaması D) Torpedo aşaması .



Şekil. 4.4. *C. atticum* türünde 1 mg/l 2,4-D hormonu içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar A) Kalp aşaması B) Alt kültürler sonunda meydana gelen oluşumlar C) Torpedo aşaması D) 4.Alt kültür sonucu elde edilen sürgün benzeri yapılar

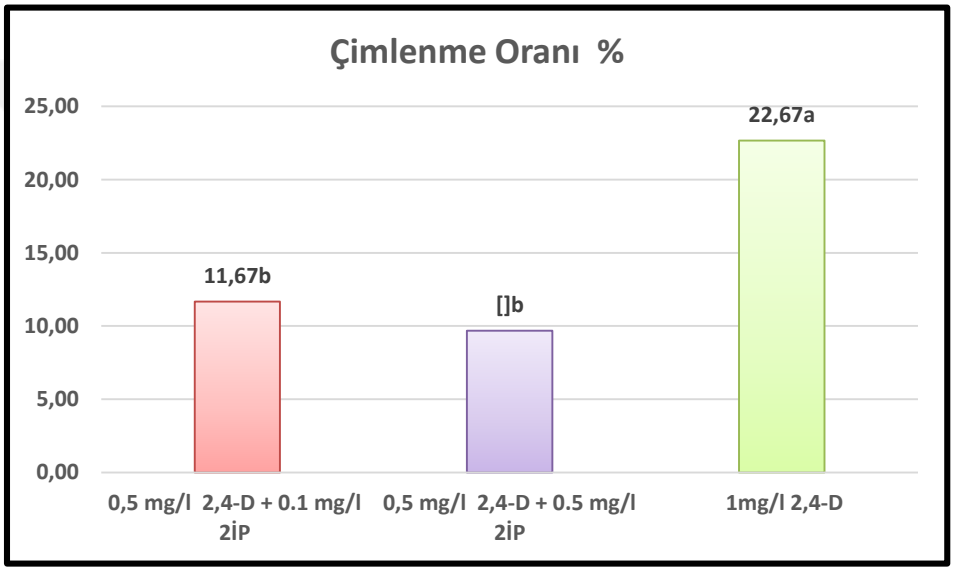
C. atticum türünde somatik embriyogenesis çalışmaları sonucu 4 farklı MS besi yeriden elde edilmiş olan somatik embriyolar çimlendirilmek amacıyla 2 mg/l GA_3 + 0.1 mg/l BA, 1 mg/l prolin, 30 mg/l sükroz ve 3.5 mg/l gelrite içeren MS besi yerinde kültüre alınmıştır. Kültüre alındıktan 8 hafta sonra çimlenme ve sürgün benzeri yapıların meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca bu türde elde edilen somatik embriyoların bir kısmı çimlendirilmek üzere bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde kültüre alındıktan 2 hafta sonra eksplantların siyahlaşarak canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).

Şekil. 4.5. *C. atticum* türünde 3 MS besi yerinde elde edilen somatik embriyoların çimlendirilmesi A) Meydana gelen uzantılar ve kararma başlangıcı B) Embriyojenik yapılardan elde edilen uzantılar



Şekil. 4.6. *C. atticum* türünde alt kültür sonucu meydana gelen oluşumlar

C. atticum türünde elde edilen 4 farklı MS besi yerinden elde edilmiş olan somatik embriyoların çimlenme oranları incelendiğinde, 0,5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l 2İP ve 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l 2İP ve 1mg/l 2,4-D bitki büyüme düzenleyicileri içeren besi yerlerinde meydana gelen embriyoların çimlenme oranları sırasıyla, %11.6, %9.67 ve % 22.67 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Çimlenme meydana gelmesine rağmen bitkiciğe dönüşüm olmamıştır.



Şekil. 4.7. *C.atticum* türünde Somatik embriyo çimlenme oranları (%)

İncelenen ortamların rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşturma oranları gözönünde bulundurulduğunda, 1 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP, 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP içeren MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum süreçlerini başarı ile tamamladığı saptanmıştır. Bu ortamların bu deneme kapsamında incelenen *C.atticum*'da somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılabileceği besi yerleri olduğu saptanmıştır.

4.2.2. *Colchicum triphyllium* türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları

C. triphyllum türünde yapılan somatik embriyogenesis denemeleri, 3 farklı dönemde yapılmıştır. İlk dönemde rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu için optimum besi yeri koşullarını belirlemek amacıyla büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D, BA, 2iP ve NAA kombinasyonlarını içeren 36 farklı hormon kombinasyonu içeren MS besi yeri kullanılmıştır.

Yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo yapıları elde edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol MS besi yerinde herhangi bir oluşum elde edilememiştir. Kullanılan farklı bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS besi yerlerinin *C.triphyllum* türünün rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşturma yeteneği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Rejenerasyon meydana gelen 17 farklı MS besi yerinde en yüksek rejenerasyon, 2 mg/l NAA (% 100), 2 mg/l 2,4-D+ 0,5 mg/l 2İP (% 95), 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP (% 95) içeren MS besi yerlerinde meydana gelmiştir. En düşük rejenerasyon oranı ise 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA (% 20) içeren MS besi yerlerinde oluşmuştur (Çizelge 4.6).

Embriyojenik kallus oluşumları, 16 farklı MS besi yerinde meydana gelmiştir. Bu MS besi yerleri incelendiğinde, en yüksek embriyojenik kallus oluşumu 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP içeren MS besiyerinde % 90 oranında, en düşük embriyojenik kallus oluşumu ise 0,5 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerlerinde %10 oranında meydana gelmiştir (Çizelge 4.6).

Somatik embriyo oluşum değerleri incelendiğinde ise en yüksek somatik embriyo oluşum oranı 2 mg/l 2,4-D (% 70) içeren MS besi yerinden elde edilmiştir (Şekil 4.11). En düşük somatik embriyo oluşumu ise 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP (%25) içeren MS besi yerinden meydana gelmiştir (Şekil 4.16, Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. *Colchicum triphyllum* türünde farklı MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranları üzerine etkisi (%)

Colchicum triphyllum			
Besi Yeri	**Rejenerasyon %**	**Embriyojenik Kallus %**	**Somatik Embriyo %**
Kontrol	0	0	0
1. 0,5 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA	40 def	10ef	0
2. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	65 bcd	0	0
3. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
4. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	85 abc	80ab	60ab
5. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
6. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	0	0	0
7. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	20 fg	20ef	0
8. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	30 efg	30def	0
9. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	30 efg	30def	0
10. 1 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	70abcd	35de	0
11. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	60cde	40cde	55abc
12. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	55cde	30def	0
13. 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	80abc	40cde	70a
14. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	55cde	55bcd	40cde
15. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	95ab	65abc	50bcd
16. 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
17. 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	0	0	0
18. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
19. 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	0	0	0
20. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
21. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	0	0	0
22. 0,5 mg/l NAA + 0 mg/l 2İP	0	0	0
23. 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	0	0	0
24. 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	0	0	0
25. 1 mg/l NAA + 0 mg/l 2İP	0	0	0
26. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	60cde	60abcd	0
27. 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	95ab	90a	35de
28. 2 mg/l NAA + 0 mg/l 2İP	100a	65abc	50bcd
29. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	55cde	55bcd	35de
30. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	75abc	75ab	25e

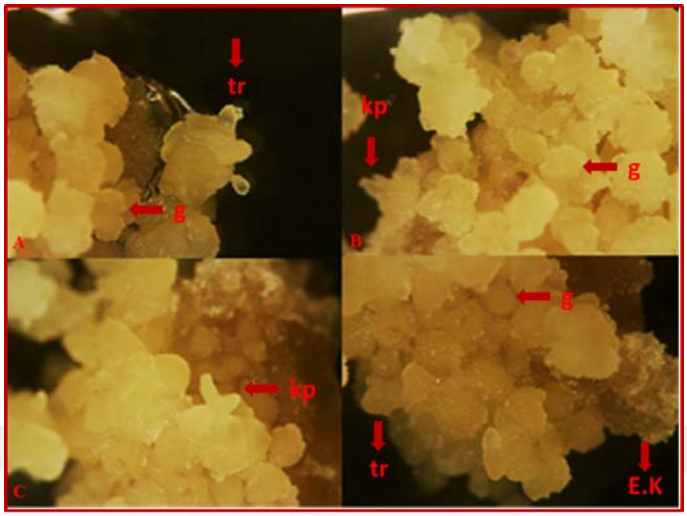
$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon=13,86 $LSD_{(0,05)}$Kallus= 12,58 $LSD_{(0,05)}$ Embriyo=6,77

Eksplantlar kültüre alındıktan 6 hafta sonra rejenerasyon, 12 hafta sonra embriyojenik kalluslar meydana gelmiştir. Kallus oluşumundan 12 hafta sonra ise embriyojenik yapılar oluşmuştur (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15). Meydana gelen kalluslar beyaz renkte, parlak ve sert yapıdadır. Kalluslardan

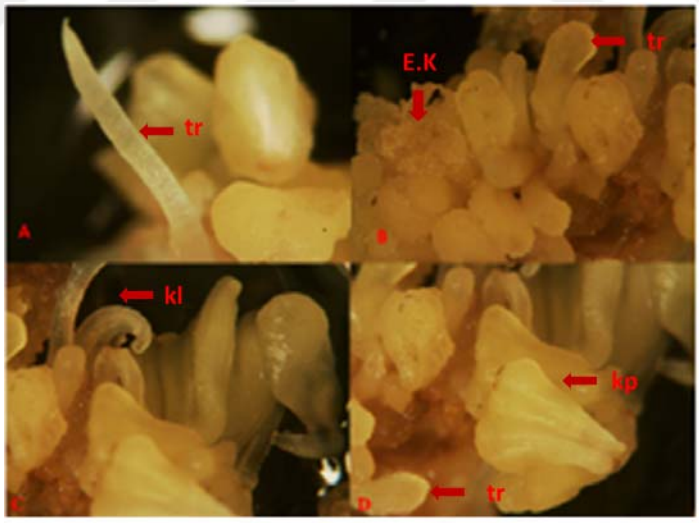
meydana gelen embriyoların bazılarının krem renginde bazılarının ise koyu kırmızı renkte olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8)

Şekil. 4.8. C. *triphyllum* türünde 1 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen 24. Hafta sonunda elde edilen yapılar, A) Globular aşamadaki somatik embriyo, B) Kalp aşamasındaki somatik embryo, C) Torpedo aşamadaki somatik embriyo, D) Kotiledon oluşumu, E) Somatik embriyoların gelişim aşamaları.

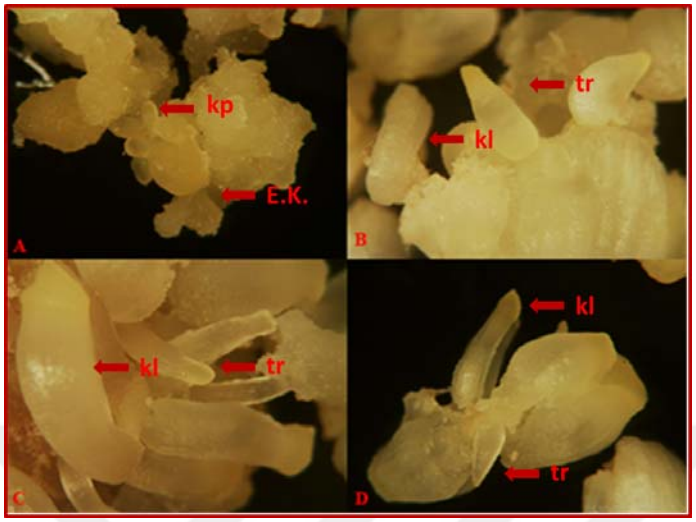
Bu çalışmada elde edilen somatik embriyo oluşumlarına ait fotoğraflar incelendiğinde genel olarak bütün embriyo aşamalarının (torpedo, kalp, globular ve kotiledon) oluştuğu görülmektedir. Ayrıca bu yapılar eş zamanlı olarak meydana gelmiştir(Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



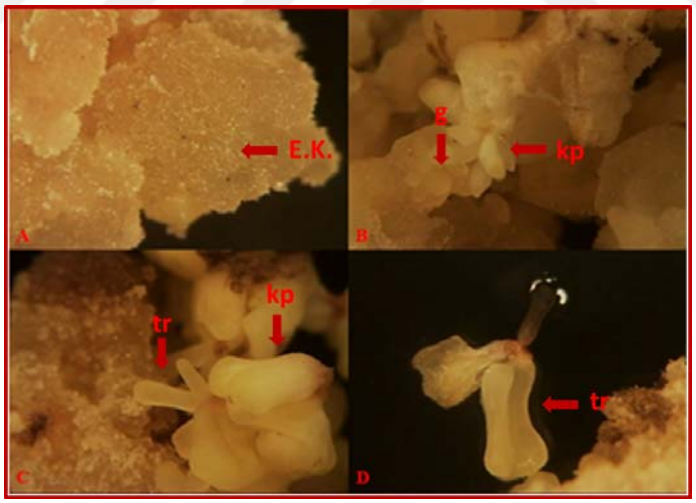
Şekil. 4.9. *C. triphyllum* türünde 2 mg/l NAA içeren MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar A) 24 .haftada elde edilen torpedo ve globular aşamalar B)Kalp ve globular aşama C) Kalp aşaması D)12.haftada oluşan embriyojenik kallus, globular ve torpedo aşaması



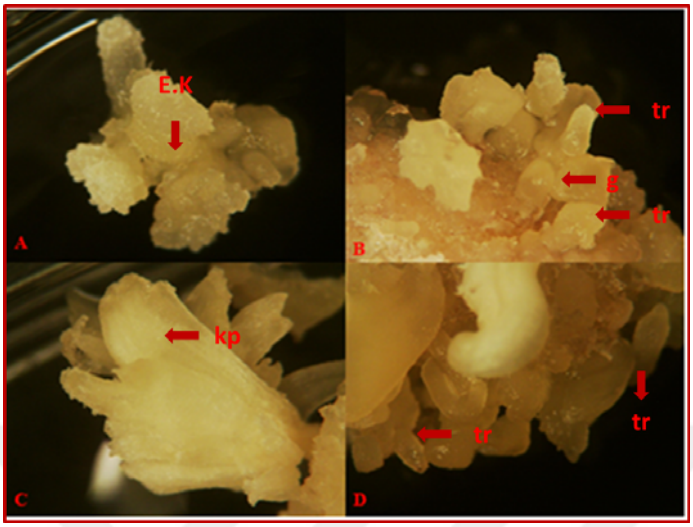
Şekil. 4.10. *C. triphyllum* türünde 1mg/l 2,4-D +0,1 mg/l 2IP MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar A) 24.haftada elde edilen torpedo aşaması B)12.haftada oluşan embriyojenik kallus ve torpedo aşaması C) Kotiledon aşaması D)24.haftada oluşan kalp ve torpedo aşaması



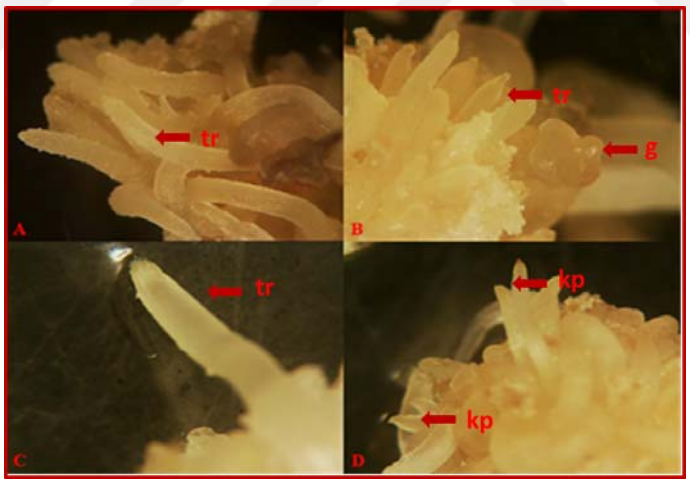
Şekil. 4.11. *C. triphyllum* türünde 2mg/l 2,4-D MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar A) 12.haftada oluşan embriyojenik kallus ve 24.haftada elde edilen kalp aşaması B) Kotiledon ve torpedo aşaması C) Kotiledon ve torpedo aşaması D)24.haftada oluşan kotiledon ve torpedo aşaması



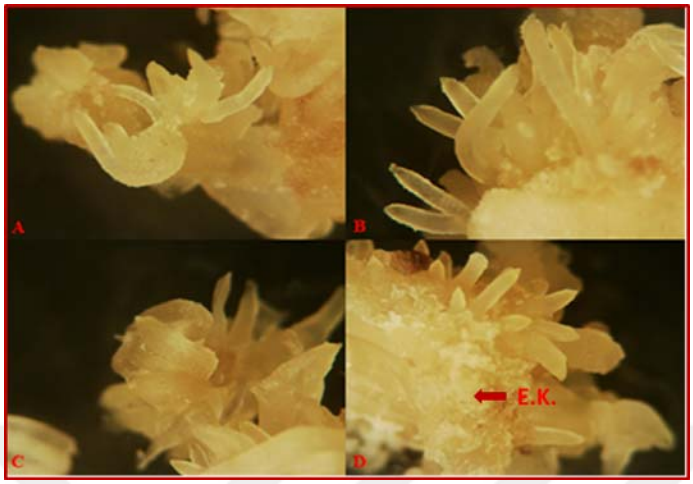
Şekil. 4.12. C. *triphyllum* türünde 2mg/l 2,4-D +0,1 mg/l 2IP MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar A) 12.haftada oluşan embriyojenik kallus B) 24.haftada elde edilen globular ve kalp aşaması C)Kalp ve torpedo aşaması D) Torpedo aşaması



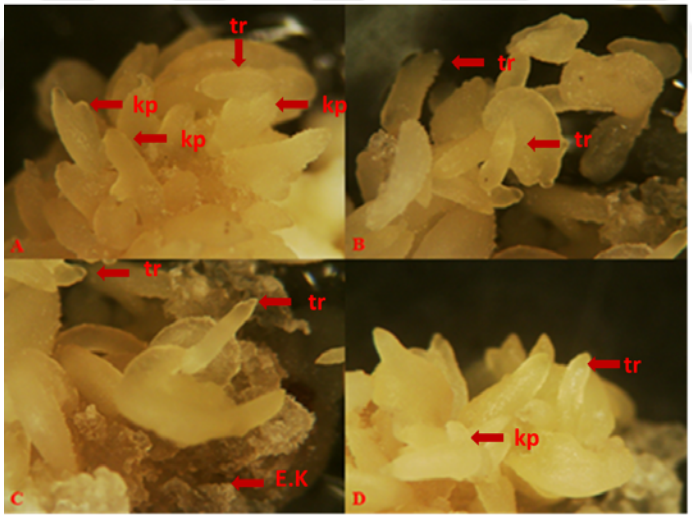
Şekil. 4.13. *C. triphyllum* türünde 2mg/l 2,4-D +0,5 mg/l 2IP MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar A) 12.haftada oluşan embriyojenik kallus B) 24.haftada elde edilen globular ve torpedo aşaması C)Kalp aşaması D) Torpedo aşaması



Şekil. 4.14. *C. triphyllum* türünde 1mg/l NAA +0,5 mg/l 2IP MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda 24.haftada meydana gelen yapılar A) Torpedo aşaması B) Globular ve torpedo aşaması C) Torpedo aşaması D) Kalp aşaması



Şekil. 4.15. *C. triphyllum* türünde 2mg/l NAA + 0,1 mg/l 2IP MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda 24.haftada meydana gelen yapılar A) B) ve C) Torpedo aşamasında olan yapılar D) 12.haftada meydana gelen embriyojenik kallus ve torpedo aşaması



Şekil. 4.16. *C. triphyllum* türünde 2mg/l NAA + 0,5 mg/l 2IP MS besi yerinde somatik embriyogenesis denemeleri sonucunda 24.haftada meydana gelen yapılar A) Kalp ve Torpedo aşaması B) Torpedo aşaması C) 12.haftada meydana gelen embriyojenik kallus Torpedo aşamasında olan yapılar D) Torpedo ve kalp aşaması

Optimum rejenerasyon ortamını belirlemek amacıyla 36 farklı hormon kombinasyonu içeren MS besi yerinde denemeler yapılmış, ancak bazı besi yerlerinden sonuç elde edilememiştir. Bu nedenle 2.dönemde 2,4-D, NAA, BA ve 2İP'nin 12 farklı hormon konsantrasyonlarını içeren MS besi yeri kullanılmıştır.

C. tripyhllum türünde 12 farklı MS besi yerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumuna etkisinin istatiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol MS besi yerinde rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo elde edilememiştir. En yüksek rejenerasyon, 2 mg/l 2,4-D+ 0,5 mg/l 2İP (% 100) ve 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP (% 80) içeren MS besi yerinde, en düşük rejenerasyon ise 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA (% 40) ve 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP (% 40) içeren MS besi yerlerinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.7).

Embriyojenik kallus oluşumları gözlemlenen 8 farklı MS besi yeri içerisinde en yüksek embriyojenik kallus oluşumu, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l2İP, 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP, 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP, 2mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP içeren 4 MS besi yerlerinde, % 60 oranında, en düşük kallus oluşumu ise 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP (%25) içeren MS besi yerinde gerçekleşmiştir.

Somatik embriyo oluşumları gözlemlenen 7 MS besi yeri içerisinde en yüksek somatik embriyo oluşumu 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA (% 60), en düşük somatik embriyo oluşumu ise 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP, 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP (% 30) içeren MS besi yerinde meydana gelmiştir.

Çizelge 4.7. *Colchicum triphyllum* türünde farklı MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranları (%)

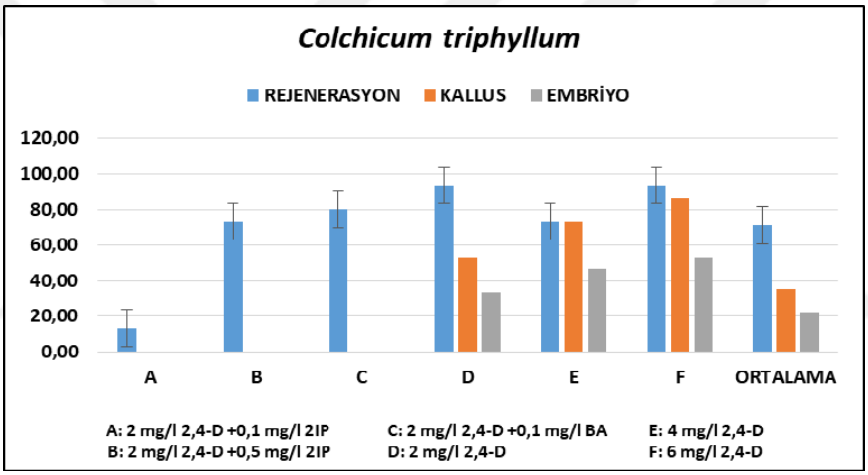
Colchicum triphyllum			
Besi Yeri	**Rejenerasyon %**	**Embriyojenik Kallus %**	**Somatik Embriyo %**
Kontrol	0	0	0
1. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	60bc	30b	60a
2. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	50c	30b	40c
3. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	50c	0	0
4. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	50c	25b	45bc
5. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	75b	60a	40c
6. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	100a	60a	50b
7. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	40c	0	0
8. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	50c	0	0
9. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	60bc	0	0
10. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	80ab	60a	0
11. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	40c	40ab	30d
12. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	60bc	60a	30d
$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon= 10,21	$LSD_{(0,05)}$Kallus= 10,66	$LSD_{(0,05)}$ Embriyo= 4,25	

C. triphyllum türünde 3. çalışma döneminde elde edilen bulgular neticesinde, yüksek konsantrasyonda 2,4-D içeren MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumlarına etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Rejenerasyon oranları incelendiğinde en yüksek rejenerasyon 2 mg/l 2,4-D ve 6 mg/l 2,4-D (% 93,33), en düşük rejenerasyon ise 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l2İP (% 13) içeren MS besi yerlerinden meydana gelmiştir. Somatik embriyo ve embriyojenik kallus oluşumu 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonunu içeren MS besi yerinde bulunmuştur. (Şekil 4.18)

Çizelge 4.8. *Colchicum triphyllum* türünün rejenerasyon, kallus ve embriyo oranları (%)

Besi Yeri	*Colchicum triphyllum*		
	Rejenerasyon (%)	**Embriyojenik Kallus %**	**Somatik Embriyo %**
2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l2iP	13,33 c	0,00	0,00
2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l2iP	73,33 b	0,00	0,00
2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/lBA	80,00 ab	0,00	0,00
2 mg/l 2,4-D	93,33 a	53,33 b	33,33 b
4 mg/l 2,4-D	73,33 b	73,33 a	46,67 ab
6 mg/l 2,4-D	93,33 a	86,67 a	53,33 a

$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon= 14,52 $LSD_{(0,05)}$ Kallus= 11,25 $LSD_{(0,05)}$ Embriyo=11,25

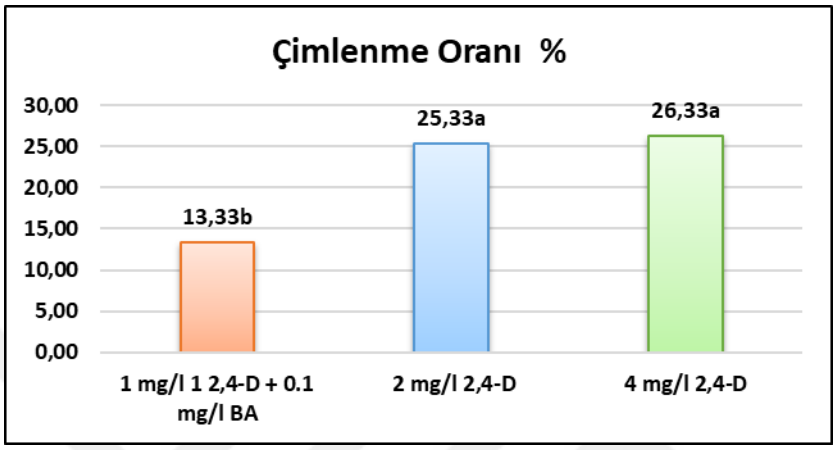


Şekil. 4.17. *Colchicum triphyllum* türünün rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oranları (%)

C.triphyllum türünde, somatik embriyogenesis çalışmalarından elde edilen somatik embriyolar, 2 mg/l GA_3 + 0.1 mg/l BA, 1 g/l prolin, 30 g/l sukroz ve 3.5 g/l gelrite içeren besi MS yerinde kültüre alındıktan 10 hafta sonra sürgün benzeri yapıların meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21).

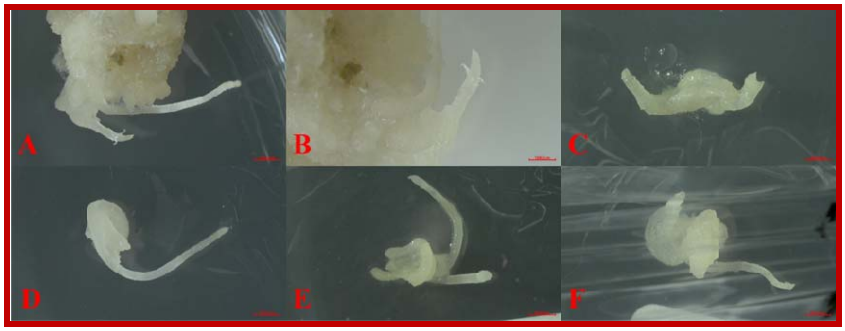
Çimlenme ortamına alınan embriyolardan yalnızca 1 mg/l 2,4-D+ 0.1 mg/L BA ve 2 mg/l 2,4-D, 4 mg/l 2,4-D elde edilen embriyoların çimlendiği, diğer somatik embriyoların çimlenmediği gözlenmiştir (Şekil 4.19). Ayrıca somatik embriyoların çimlendirilmesi denemelerinde bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen

MS besi yeri de kullanılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde embriyoların çimlenmediği, kararak canlılığını yitirdiği gözlemlenmiştir.



Şekil. 4.18. *C.triphyllum* türünde çimlenme Oranları (%)

Şekil. 4.19. *C. triphyllum* türünde çimlendirme ortamında (2 mg/l GA_3 + 0,1 mg/l BA) kültüre alınan embriyojenik yapılar A) B) Çimlenme ortamında meydana gelen uzama ve oluşan kararmalar



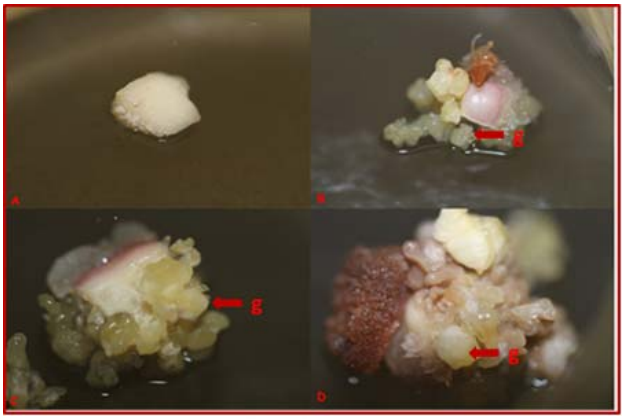
Şekil. 4.20. *C. triphyllum* türünde çimlendirme ortamında (2 mg/l GA_3 ve 0.5 mg/l BA) Elde edilen gelişmeler A, B ve C) Uzayan sürgün benzeri yapılar ve oluşan somatik embriyolar D, E ve F) Sürgün Benzeri Gelişmeler

Bu araştırma kapsamında kullanılan MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşturma oranları gözönünde bulundurulduğunda 1 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l BA, 2 mg/l 2,4-D, 4 mg/l 2,4-D, 6 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP, 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP ve 2mg/l NAA içeren MS besiyerlerinin rejenerasyondan itibaren embriyo oluşum sürecine kadar başarı ile tamamladığı saptanmıştır. Bu ortamların bu deneme kapsamında incelenen *C. triphyllum*'da somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılabileceği en uygun MS besiyerleri olduğu saptanmıştır.

4.2.3. *Colchicum speciosum* türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları

Colchicum speciosum türünde yapılan somatik embryogenesis denemeleri 3 farklı dönemde yapılmıştır. İlk dönemde rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu için optimum besi yeri koşullarını belirlemek amacıyla büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D, BA, 2İP ve NAA kombinasyonlarını içeren 30 farklı MS besi yeri kullanılmıştır (Çizelge 4.9).

Eksplantlarda kültüre alındıktan 5 hafta sonra rejenerasyon,12 hafta sonra ise embriyojenik kallus oluşumları başlamıştır. Embriyojenik kallus oluşumlarının diğer türlere göre daha yoğun olmamakla beraber açık kahverengi ve sert yapıda oldukları gözlenmiştir. Embriyojenik kallus oluşumuyla beraber yaklaşık 9 hafta sonra ise embriyojenik yapılar meydana gelmiştir. Meydana gelen embriyojenik yapılar, yoğun ve kompakt yapıdadır (Şekil 4.21).



Şekil. 4.21. *C. speciosum* türünde 2mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilen embriyojenik yapıların gelişimi, A) 5. Haftada meydana gelen rejenerasyon B) C)ve D) 21. Haftada Globüler yapıların oluşması

C. speciosum türünde farklı bitki büyüme düzenleyicisi içeren MS besi yerlerinin, rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranlarına etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur. Kontrol uygulamalarında rejenerasyon, kallus ve embriyo oluşumu elde edilmemiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda 10 farklı MS besi yerinde rejenerasyon meydana gelmiştir. Bu MS besi yerleri içerisinde en yüksek rejenerasyon, 2 mg/l 2,4-D (% 80), en düşük rejenerasyon ise 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA, 0,5 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP (% 20) içeren MS besi yerlerinde elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Embriyojenik kallus oluşumları, 6 farklı MS besi yerinde meydana gelmiştir. Bu MS besiyerleri incelendiğinde, en yüksek embriyojenik kallus oluşumu, 2 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde %46,66 oranında, en düşük embriyojenik kallus oluşumu ise 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerlerinde %20 oranında meydana gelmiştir (Çizelge 4.9).

Somatik embriyo oluşumu yalnızca 6 farklı MS besi yerinde meydana gelmiştir. Somatik embriyo oluşum değerleri incelendiğinde, en yüksek embriyo oluşumu, 2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l 2,4-D +0,1 mg/l 2IP (% 40) içeren MS besiyerinde, en düşük embriyo oluşumu ise 1 mg/l 2,4-D+0,1 mg/l 2IP (%11,66) ve 1 mg/l 2,4-D+ 0,5 mg/l 2IP (%13,33) içeren MS besiyerinde elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen rejenerasyon, kallus ve embriyo oranı (%)

Colchicum speciosum			
Besi Yeri	**Rejenerasyon %**	**Embriyojenik Kallus %**	**Somatik Embriyo %**
Kontrol	0	0	0
1. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	0	0	0
2. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
3. 1 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA	60 b	33,33 bc	31,66 b
4. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	0	0	0
5. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
6. 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA	80 a	46,66 a	40 a
7. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	20 d	0	0
8. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
9. 0,5 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	20 d	0	0
10. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	20 d	0	0
11. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	26,66 cd	0	0
12. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	33,33 c	40 ab	11,66 c
13. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	33,33 c	28,33 cd	13,33 c
14. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	33,33 c	33,33 bc	40 a
15. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	26,66 cd	23,33 de	30 b
16. 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
17. 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	0	0	0
18. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
19. 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	0	0	0
20. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
21. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	0	0	0
22. 0,5 mg/l NAA + 0 mg/l 2İP	0	0	0
23. 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	0	0	0
24. 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	0	0	0
25. 1 mg/l NAA + 0 mg/l 2İP	0	0	0
26. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	0	0	0
27. 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	0	0	0
28. 2 mg/l NAA + 0 mg/l 2İP	0	0	0
29. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	0	0	0
30. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	0	0	0
$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon=3,01	$LSD_{(0,05)}$Kallus= 2,24	$LSD_{(0,05)}$ Embriyo=1,73	

Optimum ortam koşullarını belirlemek amacıyla 30 farklı hormon kombinasyonunu içeren MS besi yerinde yapılan ön deneme işleminden sonra bazı ortamlarda sonuç elde edilememesi nedeniyle 2. dönemdeki denemeler 2,4-D, NAA, BA ve 2İP farklı konsantrasyonları içeren 12 farklı MS besi yerinde yürütülmüştür.

Colchicum speciosum türünde 12 farklı MS besi yerinin rejenerasyon ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisinin istatiksel olarak önemli, somatik embriyo oluşumu üzerine etkisinin ise istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmektedir. Çalışmada kullanılan besi yerleri içerisinde rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu sadece 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP, 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP içeren MS besi yerlerinde gözlemlenmiştir. Rejenerasyon ve embriyojenik kallus oluşumu, 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP içeren MS besi yerinde diğerlerine oranla daha yüksek oranda saptanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oranı (%)

Colchicum speciosum			
Besi Yeri	**Rejenerasyon %**	**Embriyojenik Kallus %**	**Somatik Embriyo %**
Kontrol	0	0	0
1. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	0	0	0
2. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	0	0	0
3. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
4. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	26,7 c	20 b	10b
5. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	40 b	26,66 ab	20a
6. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	53,3 a	33,33 a	23,30a
7. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
8. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
9. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	0	0	0
10. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	0	0	0
11. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	0	0	0
12. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	0	0	0
$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon= 3,8	$LSD_{(0,05)}$Kallus= 3,8	$LSD_{(0,05)}$ Embriyo= 1,78	

Yapılan denemelerde olumlu sonuçlar gözlemlenen BA, 2İP ve 2,4-D (2, 4 ve 6 mg/l)'nin farklı ve yüksek konsantrasyonları, 3.dönemde de denenmiş ve sürgün benzeri yapıların gelişimi gözlenmiştir (Çizelge 4.11).

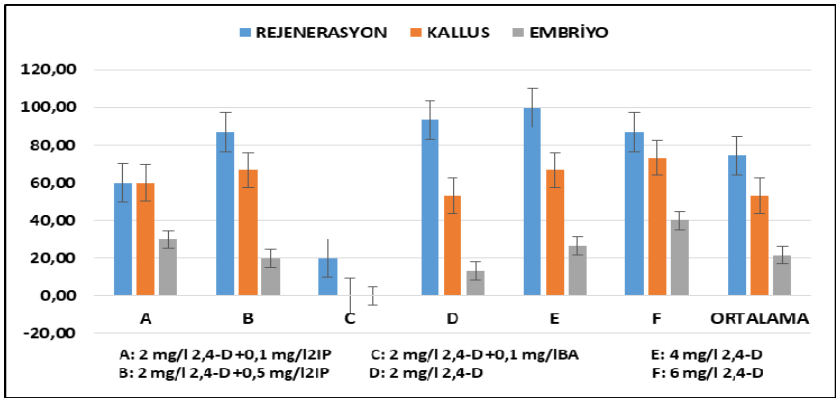
Colchicum speciosum türünde 6 farklı MS besi yerinde elde edilen bulgular neticesinde, besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumlarına etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.11). Rejenerasyon oranları incelendiğinde, en yüksek rejenerasyon 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP (% 86,67), 2 mg/l 2,4-D (% 93,33), 4 mg/l 2,4-D (%100) 6 mg/l 2,4-D (% 86,67) içeren MS besi yerinden en düşük rejenerasyon ise 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA (% 20) içeren MS besi yerlerinden meydana gelmiştir (Şekil 4.22).

Colchicum speciosum türünde Çizelge 4.11'de de görüldüğü gibi farklı MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumları, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP, 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP, 2 mg/l 2,4-D, 4 mg/l 2,4-D, 6 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilmiştir (Şekil 4.23). Sonuçlar incelendiğinde en yüksek embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumlarının 6 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde olduğu belirlenmiştir.

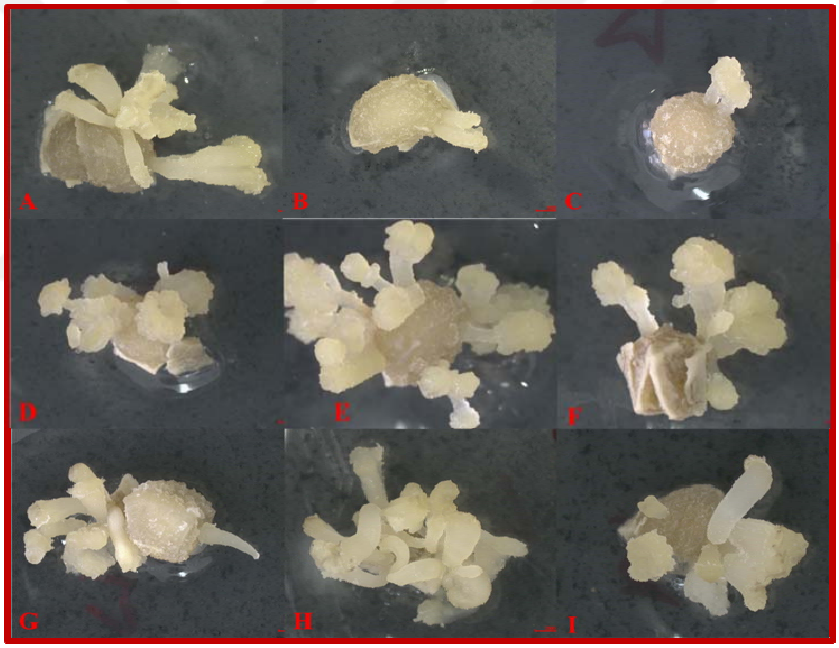
Çizelge 4.11. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oranı (%)

Besi Yeri	***Colchicum speciosum***		
	Rejenerasyon %	**Embriyojenik Kallus %**	**Somatik Embriyo %**
Kontrol	0	0	0
1. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l2İP	60,00 b	60,00 a	30,00 ab
2. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l2İP	86,67 a	66,67 a	20,00 b
3. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/lBA	20,00 c	0,00	0,00
4. 2 mg/l 2,4-D	93,33 a	53,33 b	13,33 bc
5. 4 mg/l 2,4-D	100,00 a	66,67 a	26,67 ab
6. 6 mg/l 2,4-D	86,67 a	73,33 a	40,00 a

$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon= 15,91 $LSD_{(0,05)}$Kallus= 17,18 $LSD_{(0,05)}$ Embriyo= 14,52

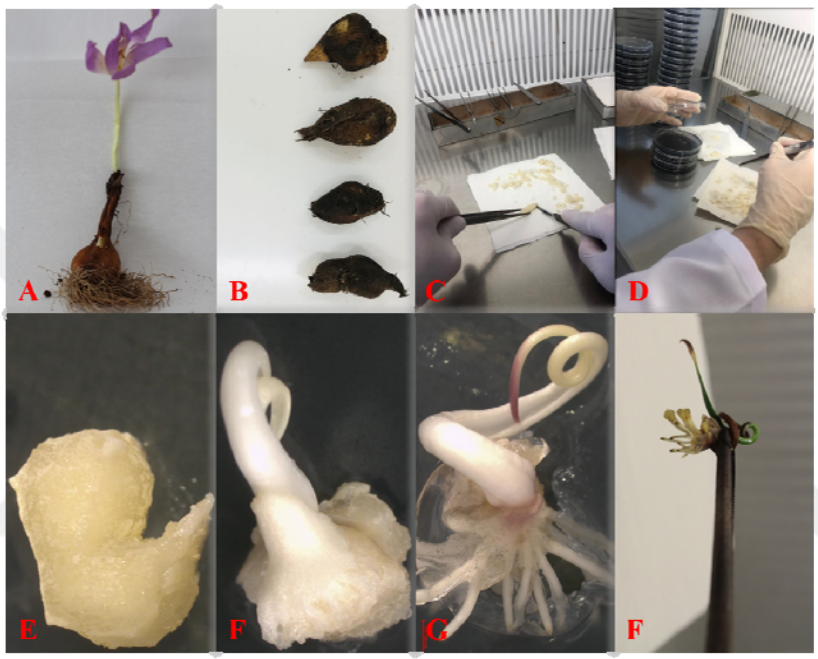


Şekil. 4.22. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen rejenerasyon, kallus ve embriyo oranı (%)



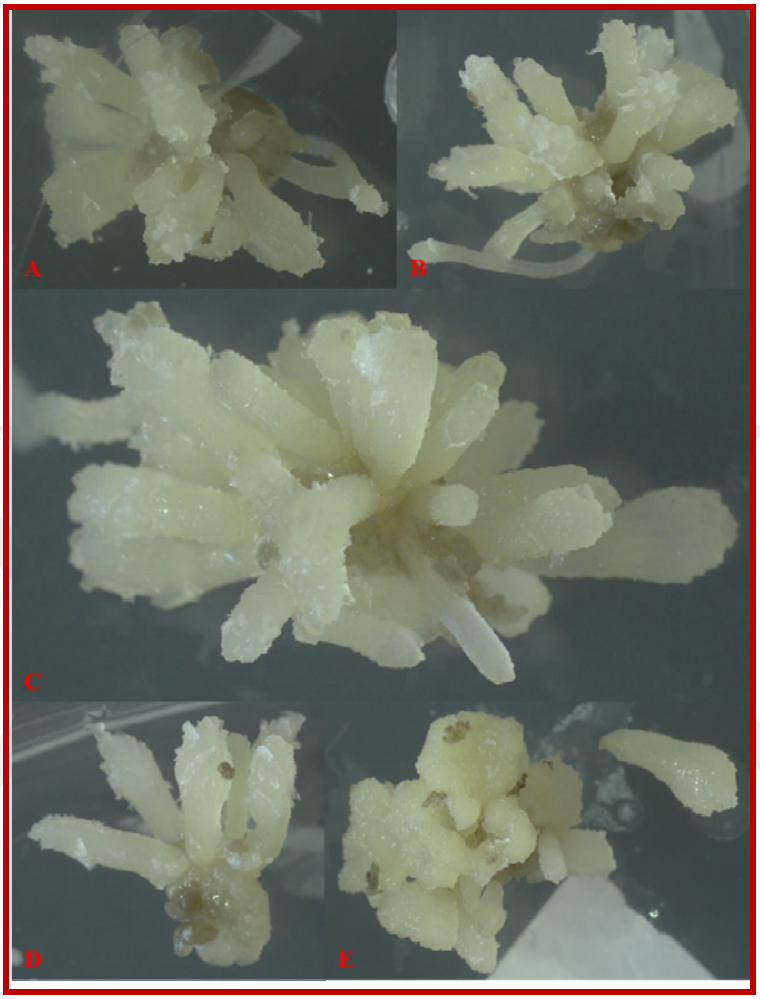
Şekil. 4.23. *C. speciosum*'da embriyojenik gelişimler A ve B) 2mg/l 2,4-D+ 0,1 mg/l 2İP gelişen sürgün benzeri rejenerasyon uzamaları C) 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/L2IP ortamında elde edilen rejenerasyon uzaması D, E ve F) 2mg/l 2,4-D'de elde edilen rejenerasyon uzamaları ve somatik embriyolar G, H ve I) 6 mg/L 2,4-D'de gelişen somatik embriyolar ve uzamalar

Colchicum speciosum türünde 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde bitkicik elde edilmiştir. Elde edilen bitkicik, gelişimine devam etmesi için 0.1 mg/l BA ve 2 mg/l GA_3 içeren MS besin yerine aktarılmış ancak önce kararmış sonra canlılığını kaybetmiştir(Şekil 4.24).



Şekil. 4.24. *Colchicum speciosum* türünde somatik embriyogenesis denemeleri bitkicik oluşum aşaması A) Araziden gelen bitki B) Temizlenmiş Kormlar C) Steril edilmiş korm eksplanlarının kesilmesi D) Eskplantların besi yerlerine transferi E) Rejenerasyon aşaması F) Kalus ve Sürgün G) Bitkicik elde edilmesi F) Tam bir bitki aşaması

C.speciosum türünde somatik embriyogenesis denemeleri kapsamında sürgün benzeri uzamalar ve somatik embriyolar elde edilmiştir (Şekil 4.25). Elde edilen bu yapılar, 2 mg/l GA_3 + 0.1 mg/l BA, 1 g/l prolin, 30 g/l sukroz ve 3.5 g/l gelrite içeren MS besi yerinde kültüre kültüre alınmış ve embriyolarda uzama meydana gelmiştir (Şekil 4.25). Bu oluşan yapılar 15 gün sonunda kararak canlılıklarını yitirmişlerdir.



Şekil. 4.25. *C. speciosum* türünde MS besi yerinde sağlanan gelişmelerin ardından 2 mg/l GA_3 + 0.5 mg/l BA içeren çimlenme ortamına aktarılan eksplantlardan elde edilen gelişmeler

Bu tez çalışmasında kullanılan MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşturma oranları gözönünde bulundurulduğunda, 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP, 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP, 4 mg/l 2,4-D ve 6 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerlerinin rejenerasyondan emberiyo oluşum sürecini başarı ile tamamladığı belirlenmiştir. Bu ortamların bu çalışma kapsamında incelenen *C. speciosum* türünde somatik

embriyogenesis çalışmalarında kullanılabileceği en uygun MS besiyerleri olduğu saptanmıştır.

4.2.4. *Colchicum burtii* türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları

Colchicum burtii türünde rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu için optimum koşulları belirlemek amacıyla 2,4-D, BA, 2İP ve NAA'nın farklı kombinasyonlarını içeren 30 farklı hormon kombinasyonunu içeren MS besi yeri kullanılmıştır (Çizelge 4.12).

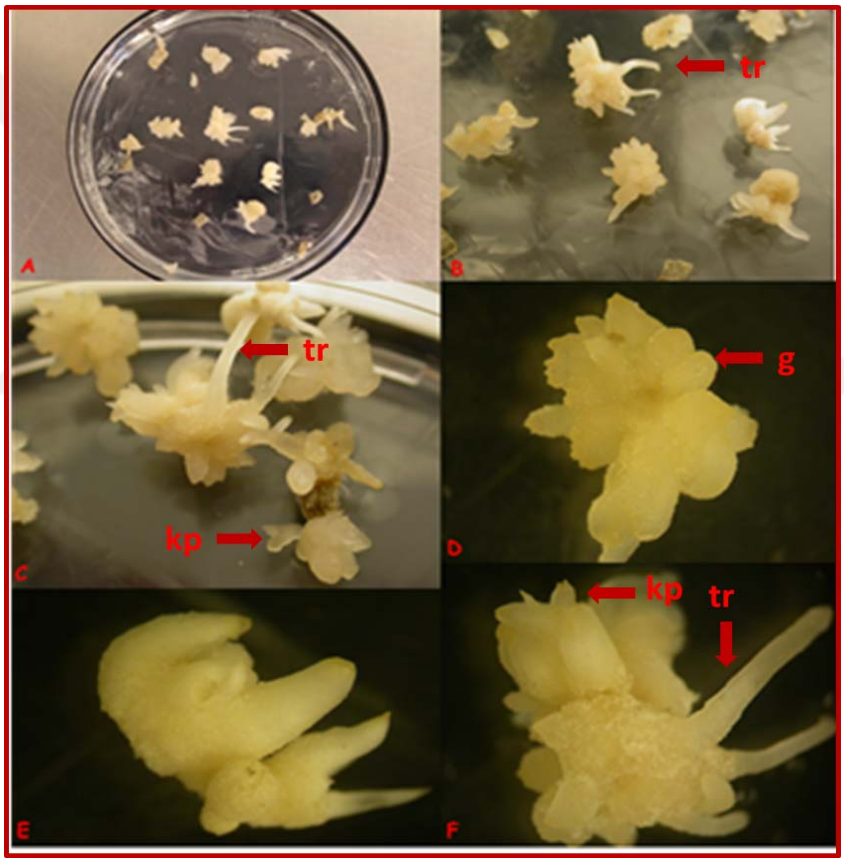
Colchicum burtii'de 30 farklı MS besi yerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumlarına etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol ortamında rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu elde edilmemiştir. Yapılan denemelerde 17 farklı MS besi yerinde rejenerasyon meydana gelmiştir. Bu MS besiyerleri içerisinde, en yüksek rejenerasyon 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP ve 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP (% 100) içeren MS besi yerinde, en düşük rejenerasyon ise 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA (% 25) ve 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA (% 25) içeren MS besi yerlerinde oluşmuştur.

Yapılan çalışmada embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumları, 6 farklı MS besi yerinde meydana gelmiştir. En yüksek embriyojenik kallus oluşumu 2 mg/l 2,4-D (% 31), en düşük kallus oluşumu ise 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP (% 9) içeren MS besi yerlerinden oluşmuştur. En yüksek embriyo oluşum oranı 2 mg/l 2,4-D (% 37), en düşük embriyo oluşum oranı ise 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP (% 7) içeren MS besi yerlerinden oluşmuştur.

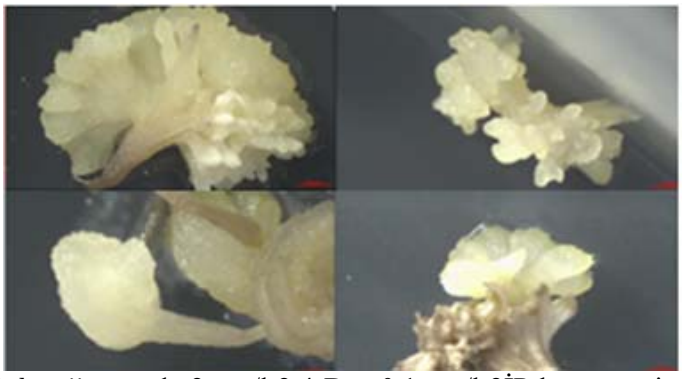
Çizelge 4.12. *Colchicum burtii* türünde meydana gelen rejenerasyon, kallus ve embriyo oranı (%)

Colchicum Burtii			
Besi Yeri	**Rejenerasyon %**	**Kallus %**	**Embriyo %**
Kontrol	0	0	0
1. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	0	0	0
2. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
3. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	25fg	0	0
4. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
5. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	65bcde	0	0
6. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	0	0	0
7. 0,5 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	0	0	0
8. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	100a	0	0
9. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	100a	18bc	8c
10. 1 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	85abc	27ab	12c
11. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	75abcd	9cd	7c
12. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	45 def	30a	27b
13. 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	45def	31a	37a
14. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	35ef	20abc	24b
15. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	55cdef	0	0
16. 0,5 mg/l NAA + 0 mg/l BA	75abcd	0	0
17. 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	60cde	0	0
18. 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	50def	0	0
19. 1 mg/l NAA + 0 mg/l BA	95ab	0	0
20. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
21. 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	25fg	0	0
22. 2 mg/l NAA + 0 mg/l BA	0	0	0
23. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l BA	0	0	0
24. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA	50def	0	0
25. 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	75abcd	0	0
26. 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	0	0	0
27. 1 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	0	0	0
28. 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	0	0	0
29. 2 mg/l NAA + 0,1 mg/l 2İP	0	0	0
30. 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP	0	0	0
$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon=12,39	$LSD_{(0,05)}$Kallus= 4,74	$LSD_{(0,05)}$ Embriyo=2,76	

Eksplantlardan kültüre alındıktan 8 hafta sonra rejenerasyon, 16 hafta sonra embriyojenik kallus, kallus oluşumundan 16 hafta sonra ise somatik embriyolar meydana gelmiştir. Meydana gelen embriyojenik kalluslar açık sarı renkte, parlak ve kırılgan yapıdadır. Bu yapılardan meydana gelen embriyoların ise krem renginde olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak farklı MS besi yerlerinde meydana gelen rejenerasyon oranları yüksek olmasına rağmen embriyoya dönüşüm oranları azdır. (Şekil 4.26, Şekil 4.27).

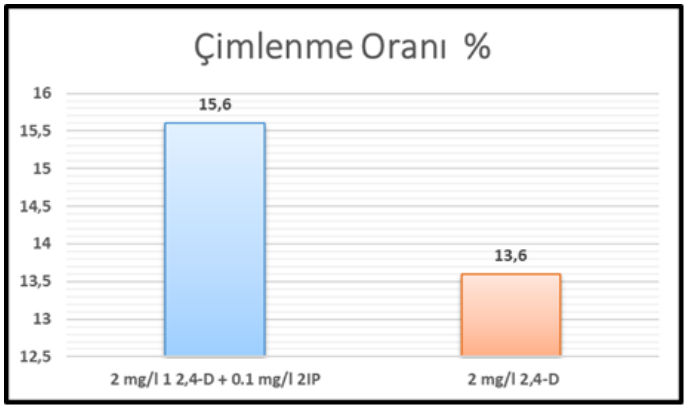


Şekil. 4.26. *C. burtii* türünde somatik embryogenesis denemeleri sonucunda 2 mg/l 2,4-D MS besiyerinde meydana gelen yapılar A) Petri kaplarında embriyoların oluşumları B) 32.hafta sonunda elde edilen torpedo aşaması C) Kalp ve Torpedo aşaması D) Golobular aşama F) Klap ve Torpedo aşaması



Şekil. 4.27*C. burtii* türünde 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP hormonu içeren MS besi yerinde somatik embryogenesis denemeleri sonucunda meydana gelen yapılar

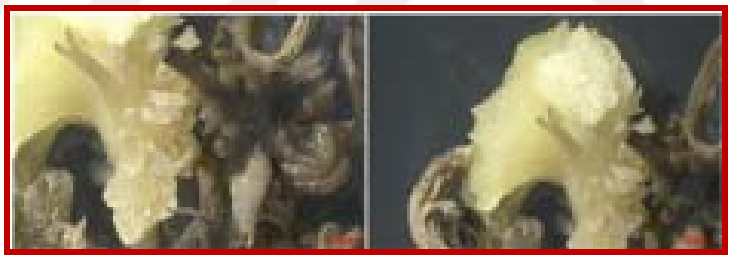
C. burtii türünde somatik embriyogenesis denemelerinden elde edilen embriyoların bir kısmı çimlendirilmek üzere 2 mg/l, GA_3 0.1 mg/l BA, 1 gL^{-1} prolin, 30 gL^{-1} sükroz ve 3.5 gL^{-1} gelrite içeren MS besi yerinde kültüre alındıktan 10 hafta sonra sürgün benzeri yapıların meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.29). Embriyoların çimlenme oranları incelendiğinde, yalnızca 2 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l 2İP ve 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde oluşan embriyolarda çimlenme gerçekleşmiştir. Çimlenme oranları sırasıyla %15.6 ve %13.6 'dır (Şekil 4.28).



Şekil. 4.28. *C. burtii* türünde iki farklı besi yerinde meydana gelen embriyoların çimlenme oranları

Çimlendirilmek üzere bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde kültüre alınmış eksplantlar, siyahlaşarak canlılıklarını yitirmişlerdir (Şekil 4.30). *C. burtii* türünde elde edilen embriyojenik yapıların çimlendirilmesi aşamasında kök oluşumlarının da meydana geldiği gözlenmiştir.

Şekil. 4.29. *C. burtii* türünde çimlendirme ortamında kültüre alınan embriyojenik yapıların sürgüne dönüşmesi ve oluşan kararmalar



Şekil. 4.30. *C. burtii* türünde kararma olan embriyojenik yapılar

Meydana gelen somatik embriyolarda alt kültür işlemi yapıldıktan sonra genel olarak karamalar meydana gelmiştir. Bu nedenle embriyojenik kallus ve embriyolar, altkültür sırasında kararak canlılıklarını yitirmişlerdir.

Çalışmada kullanılan MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşturma oranları gözönünde bulundurulduğunda 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP, 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP içeren MS besiyerlerinin rejenerasyondan embriyo oluşum sürecini başarı ile tamamladığı

belirlenmiştir. Bu ortamların bu çalışma kapsamında incelenen *C.burtii*'de somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılabileceği en uygun MS besiyerleri olduğu saptanmıştır.

4.2.5. *Colchicum sobolifera* türünde Somatik Embriyogenesis Bulguları

Colchicum sobolifera türünde rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu için optimum besi yeri koşullarını belirlemek amacıyla 2,4-D, BA ve 2İP'nin farklı kombinasyonlarını içeren MS besi yeri kullanılmıştır. *C. soboifera* türünde bitkisel materyal temininde yaşanan sıkıntıdan dolayı 15 farklı hormon konsantrasyonu içeren MS besi yeri kullanılmıştır.

Colchicum sobolifera'da 15 farklı MS besi yerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumuna etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol dahil bütün MS besi yerlerinde rejenerasyon meydana gelmiştir. Rejenerasyon oluşum oranlarına bakıldığında, en yüksek rejenerasyon 0,5 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA, 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP ve 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA (% 75) içeren MS besi yerlerinde, en düşük rejenerasyon oranı ise 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP (% 33,33) içeren MS besi yerinde elde edilmiştir (Çizelge 4.13).

Embriyojenik kallus oluşumu gözlenen 14 farklı MS besi yerinde en yüksek embriyojenik kallus oluşumu 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2IP (% 60), en düşük embriyojenik kallus oluşumu ise 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA (% 8,33) içeren MS besi yerlerinde meydana gelmiştir.

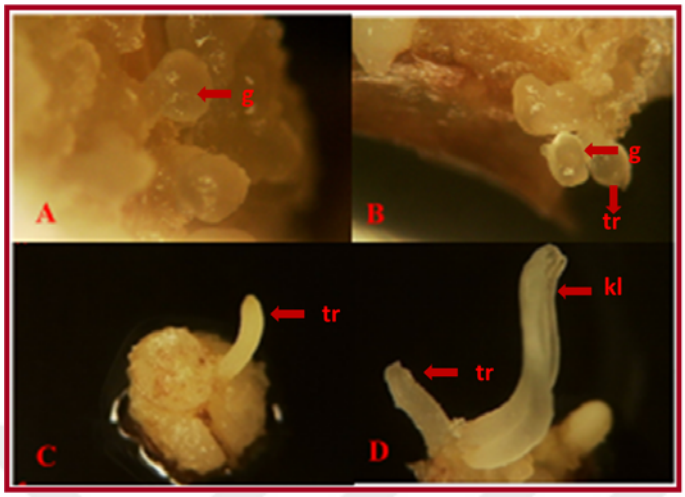
Somatik embriyo yalnızca 4 farklı MS besi yerinde elde edilmiştir. Bulgular incelendiğinde, en yüksek somatik embriyo oluşumu 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP ve 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA (% 48,33), en düşük somatik embriyo oluşumu ise 2 mg/l 2,4-D (% 13,33) içeren MS besi yerinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. *Colchicum sobolifera'da* Meydana Gelen Rejenerasyon, Embriyojenik Kallus ve Somatik Embriyo Oranı (%)

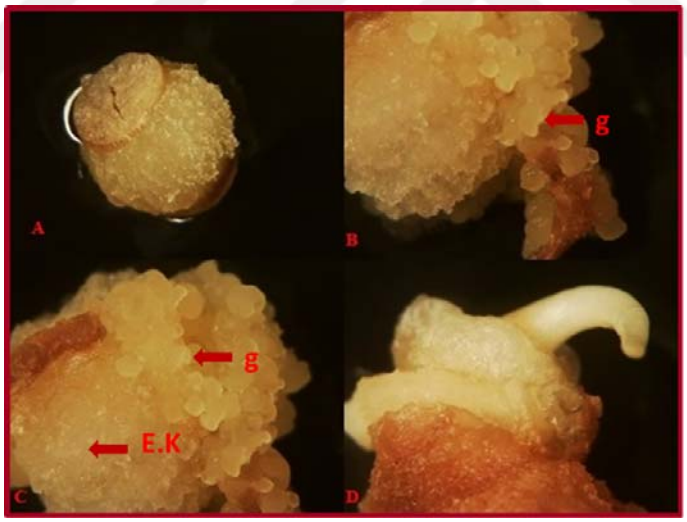
Colchicum sobolifera			
Besi Yeri	**Rejenerasyon %**	**Embriyojenik Kallus %**	**Somatik Embriyo %**
Kontrol	0	0	0
1. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	75a	16,66def	0
2. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	50abc	8,33ef	0
3. 1 mg/l 2,4-D + 0 mg/l BA	66,66ab	41,66abcd	0
4. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	50abc	15cde	0
5. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	75a	50abc	0
6. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA	41,66bc	10ef	0
7. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA	66,66ab	58,33ab	48,33a
8. 0,5 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	70a	25cde	0
9. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	50abc	60a	0
10. 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	58,33abc	16,66def	0
11. 1 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	50abc	25cdef	0
12. 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	33,33c	0	0
13. 2 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP	75a	30bcde	13,33c
14. 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP	70a	40abcd	48,33a
15. 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP	75a	40abcd	20b

$LSD_{(0,05)}$ Rejenerasyon=12,49 $LSD_{(0,05)}$Kallus=13,10 $LSD_{(0,05)}$ Embriyo=1,31

Colchicum sobolifera türünün eksplantları kültüre alındıktan 6 hafta sonra rejenerasyon,10 hafta sonra embriyojenik kallus yapıları elde edilmiştir. Embriyojenik kallus oluşumundan 6 hafta sonra ise somatik embriyo oluşumları gözlemlenmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda genel olarak rejenerasyon ve embriyojenik kallus oluşumları gözlemlenirken, bu yapıların somatik embriyoya dönüşüm oranlarının oldukça düşük ve kalitesiz olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.31ve Şekil 4.32).



Şekil. 4.31. *C. sobolifera* türünde soğan eksplantlarının gelişimi, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP MS besiyerinde meydana gelen yapılar A) 16.hafta sonunda elde edilen globular aşama B) Torpedo ve Globular aşama C) Torpedo aşamaD)Kotiledon ve torpedo aşamaları



Şekil 4.32 *C. sobolifera* türünde soğan eksplantlarının gelişimi, 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA MS besiyerinde meydana gelen yapılar A) 6.hafta sonunda elde edilen rejenerasyon aşaması B)16.hafta sonunda elde edilen globular aşama C) 10.hafta sonunda elde edilen embriyojenik kallus ve globular aşama D)Sürgün oluşumu

C. sobolifera türünde somatik embriyogenesis denemelerinden elde edilen embriyoların bir kısmı çimlendirilmek üzere 2 mg/l, GA_3 0.1 mg/l BA, 1 g/l prolin, 30 g/l sükroz ve 3.5 g/l gelrite içeren MS besi yerinde, diğer kısmı ise bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde kültüre alınmış, embriyojenik yapılar daha sonra kararak canlılıklarını kaybetmişlerdir.

Bu tez çalışmasında kullanılan MS besi yerlerinin rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşturma oranları gözönünde bulundurulduğunda 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP, 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP içeren MS besiyerlerinin rejenerasyondan emberiyo oluşum sürecini başarı ile tamamladığı belirlenmiştir. Bu ortamların bu çalışma kapsamında incelenen *C. sobolifera* somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılabileceği en uygun MS besiyerleri olduğu saptanmıştır**.**

Colchicum türlerinde yapılan somatik embriyogenesis çalışmalarında, bulgular neticesinde görülüyor ki kullanılan türler aynı ortamlarda farklı sonuç vermiştir. Diğer yandan aynı türün farklı korm eksplantları da aynı ortamda farklı sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar bize genotip farklılığını ortaya koymaktadır. Kullanın her bir C*olchicum* türünün en yüksek rejenerasyon oranına farklı konsantrasyon ve kombinasyonda BBD içerin besi yerinde ulaştığı görülmektedir.

Prange ve ark. (2010) *C. coum* türünde yaptıkları çalışmada 2,4 D içeren ortamlarda somatik embriyolar elde edildiği bildirilmişlerdir. Aynı türde Seyring ve ark. (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada da 2,4 D içeren ortamda somatik embriyo elde etmişlerdir. Hayashi ve ark. (1988) *C.autumnale* türünde yaptığı çalışmada 2,4-mg/l içeren MS besiyerlerinde beyaz renkli kalluslar elde etmiştir. Daradkeh ve ark. (2012) *Colchicum hierosolyminatum* türünde yaptıkları çalışamada 0,45 Mm 2,4-D içeren ortamlarda kallus indüklemesi olduğunu bildirmişledir. Karamian ve ark. (2003) Yaptıkları çalışmada *Crocus sativus* L. türünde 2,4D ve kinetin içeren MS besi yerinde embriyojenik kallus ve somatik embriyo elde etmiştir.

Bu çalışmalar da kullanılmış olan 2,4-D hormonun embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşturma yeteneklerine olan etkisi yapılan bu tez çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Karlık ve ark. (2020) tarafından *Colchicum* türünde yapılan çalışmada 2,4-D (2 mg/l) + 2IP (0.5 mg/l) bitki büyüme düzenleyici içeren MS besi yerinde kallus elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılmış olan 2,4-D (2 mg/l) + 2IP (0.5 mg/l) içeren MS besi yerinde embriyojenik kallus oluşumları bu çalışma ile benzerlik göstermiştir. Fakat embriyojenik kallus oluşumuna ek olarak tez çalışmasında somatik embriyo elde edilmiştir. Blazquez ve ark. (2009) *Crocus sativus* 0.1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP içeren MS besi yerlerinde embriyonik kallus, 0.05 mg/l NAA+ 2 mg/l BAP içeren MS besiyerlerinde Somatik embriyo elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan 5 *colchicum* türünden *C.triphyllum* 'da içeren MS besi yerinde, bu çalışmaya benzer olarak embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumları elde edilmiştir.Vahedi ve ark. (2014) *Crocus sativus* kormlarında yaptıkları invitro çalışamlarda MS besi yeri içeren ortamlar 2 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l BAP içeren ortamda Kallus 0.1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren ortamda Sürgün elde edmiştir. Mir ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada eksplant kaynağı olarak *Crocus sativus L*. bitkisinin soğanlarını kullanılmış, çalışma sonunda mikrokorm ve stigma benzeri yapılar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada, büyüme düzenleyicilerinin (BA ve NAA) rejenerasyon üzerine etkisini gözlemişlerdir.

4.3. Sentetik Tohum (Enkapsülasyon) Denemelerine Ait Bulgular

Sentetik tohum üretimi için yapılan denemede 2 farklı besi yeri (MS ve ROM) ve her besi yeri için prolin (1 g/l) ve spermin (0.05 g/l) içeren ve içermeyen besi yerleri kullanılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak BA ve 2,4-D kullanılmıştır. Sentetik tohum denemeleri *C .atticum, C. speciocum, C. burtii, C. triphyllum* ve *C. sobolifera* türlerine ait somatik embriyolar ve korm eksplantlarında yapılmıştır. Enkapsülasyon uygulamalarında bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ve ROM besi yerleri kontrol olarak kabul edilmiştir.

Korm eksplantlarında yapılan kaplama uygulamasında her iki besi yerinde de çimlenme olmamıştır.

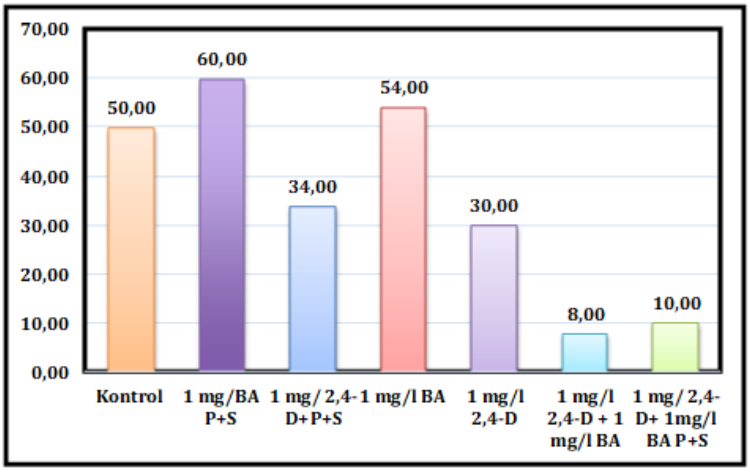
Sentetik tohum üretimi için yapılan çalışmalarda kullanılan MS besi yerinde elde edilen çimlenme oranları, Çizelge 4.14'de verilmiştir. Türler arasında sadece *C.atticum* türünün somatik embriyolarından elde edilmiş olan sentetik tohumlarda çimlenme meydana gelmiştir (Şekil 4.38). Kullanılan diğer türlerde sentetik tohumlarda çimlenme gözlemlenmemiştir (Şekil 4.37). Yapılan çalışmada kullanılan MS besi yerlerinin sentetik tohumların çimlenme oranları üzerine etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur. En yüksek çimlenme 1mg/l BA+ Prolin+ Spermin (% 60) içeren MS besi yerinde, en düşük çimlenme ise 1mg/l BA (% 8) içeren MS besi yerinde meydana gelmiştir (Şekil 4.33).

Çizelge 4.14. *Colchicum* türlerinde MS besi yeri sentetik tohum çimlenme oranları (%)

Besi Yeri	***Colchicum atticum***	***Colchicum sobolifera***	***Colchicum burtii***	***Colchicum triphyllum***	***Colchicum speciosum***
Kontrol	50 abc	0	0	0	0
1mg/l BA+P+S	60 a	0	0	0	0
1 mg/BA	54 ab	0	0	0	0
1mg/2,4D+P+S	34 cd	0	0	0	0
1 mg/ 2,4-D	30 d	0	0	0	0
1mg/BA+1mg/2,4D+P+S	10 e	0	0	0	0
1 mg/BA + 1 mg/ 2,4-D	8 e	0	0	0	0

$LSD_{(0,05)}$ Çimlenme= 16,47

Sentetik tohum çimlenme oranları incelendiğinde, prolin, spermin ve BA'nın çimlenmeye olumlu etki ettiği görülmüştür. Elde edilen somatik embriyolarda oluşan kollarda uzamalar meydana gelmiş fakat herhangi bir korm ya da bitkiye dönüşüm olmamıştır.



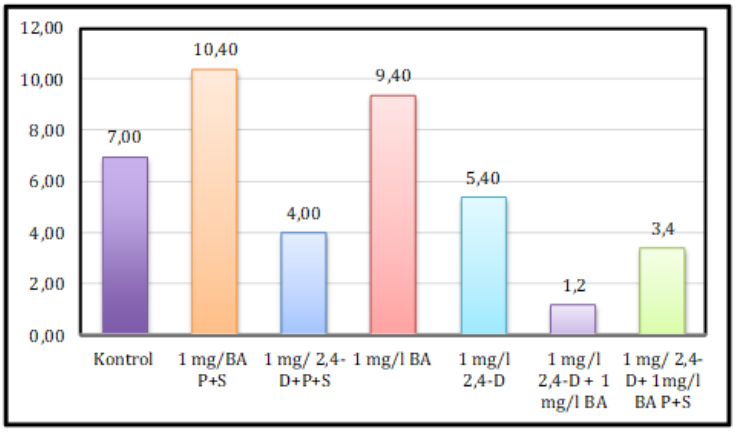
Şekil. 4.33. *Colchicum atticum* türlerinde MS besi yeri sentetik tohum çimlenme oranları (%)

Çimlenen sentetik tohumlardan oluşan uzantılar kol olarak adlandırılmıştır. Yapılan çalışmada kullanılan MS besi yerlerinin sentetik tohumlardan oluşan kol sayılarına etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.15). Çimlenme oranı ile kol sayısı arasında orantılı bir ilişki bulunmaktadır. En fazla kol sayısı, % 10,4 oranı ile 1mg/l BA+ Prolin+ Spermin içeren besi yerinden, en düşük kol sayısı ise % 1 1 mg/l BA + 1 mg/l 2,4-D besi yerinde elde edilmiştir (Şekil 4.34).

Çizelge 4.15. *Colchicum atticum* MS Besi Yeri Sentetik Tohum Kol Sayısı (%)

Colchicum atticum	
Uygulama	**Kol Sayısı**
Kontrol	7,0 abc
1 mg/BA+P+S	10,4 a
1 mg/l BA	9,4 ab
1 mg/ 2,4-D	5,4 bcd
1 mg/l 2,4-D+P+S	4,0 cd
1 mg/BA + 1 mg/ 2,4-D +P+S	3,4 cd
1 mg/BA + 1 mg/ 2,4-D	1,2 d

$LSD_{(0,05)}$ Kol Sayısı= 3,64



Şekil. 4.324. *Colchicum atticum* MS Besi yeri Sentetik Tohum Kol Sayısı (%)

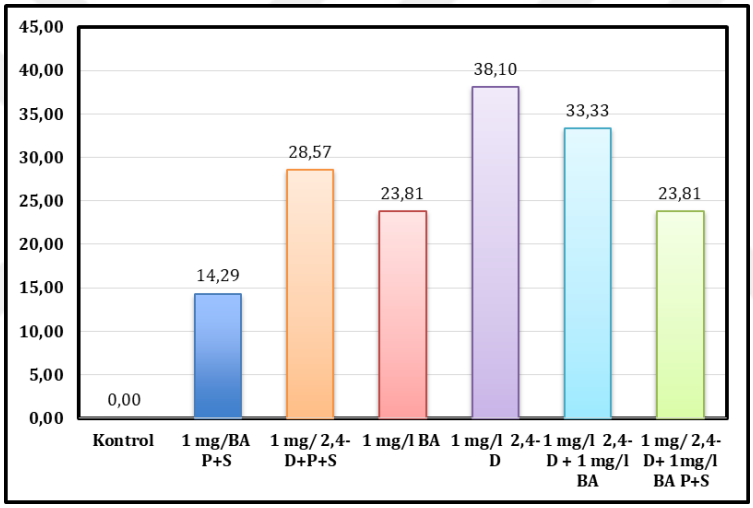
Sentetik tohum üretimi için kullanılan MS besi yerinde *C. atticum* türünde 10. günde çimlenme meydana gelmiştir. Bitkisel materyal olarak kullanılan diğer türlerde çimlenme gerçekleşmediği için farklı besi yeri olan ROM denenmiştir. Besi yeri olarak ROM kullanıldığında da aynı şekilde *C. atticum* dışındaki türlerde çimlenme olmamıştır (Çizelge 4.16).

Colchicum atticum türünde ROM besi yerinde kontrol dışındaki bütün besi yerlerinde çimlenme meydana gelmiştir (Şekil 4.39). Yapılan çalışmada kullanılan ROM besi yerlerinin sentetik tohumların çimlenme oranları üzerine etkisi istatiksel olarak önemli bulunmuştur. En fazla çimlenme, 1 mg/ l 2,4-D (%38,10) içeren ROM besi yerinde, en düşük çimlenme ise 1mg/l BA+ Prolin+ Spermin (% 14,29) içeren ROM besi yerinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.35).

Çizelge 4.16. *Colchicum* türlerinde ROM besi yeri sentetik tohum çimlenme oranları (%)

Besi Yeri	*Colchicum atticum*	*Colchicum sobolifera*	*Colchicum burtii*	*Colchicum triphyllum*	*Colchicum speciosum*
Kontrol	0	0	0	0	0
1mg/BA+P+S	14,29 bc	0	0	0	0
1 mg/BA	23,81 ab	0	0	0	0
1mg/2,4D+P+S	28,57 ab	0	0	0	0
1 mg/ 2,4-D	38,10 a	0	0	0	0
1mg/BA+1mg/2,4D+P+S	23,81 ab	0	0	0	0
1 mg/BA + 1 mg/ 2,4-D	33,33 ab	0	0	0	0

$LSD_{(0,05)}$ Kol Sayısı= 1,55



Şekil. 4.35. *Colchicum* türlerinde ROM Besi yeri Sentetik Tohum Çimlenme Oranları (%)

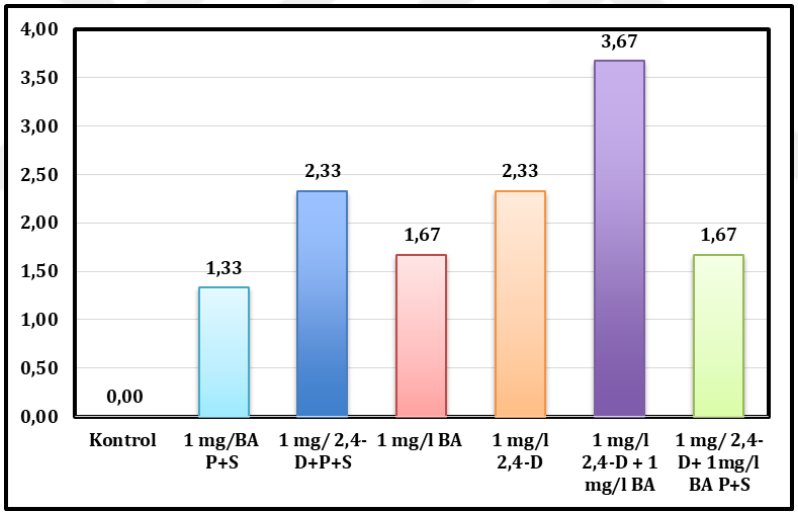
Sentetik tohum üretimi için kullanılan ROM besi yerinde çimlenme oranları ve oluşan kol sayılarının MS besi yerine göre düşük olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sentetik tohumlarda 20. günde çimlenme başlanmıştır. Kullanılan ROM besi yerleri incelendiğinde, prolin ve spermin içermeyen besi yerlerinde çimlenme oranları daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılan 2,4-D'nin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Elde edilen somatik embriyolarda oluşan kollarda uzamalar meydana gelmiş fakat herhangi bir korm ya

da bitkiye dönüşüm olmamıştır (Şekil 4.36). Kol sayıları arasında istatiksel olarak fark olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.17).

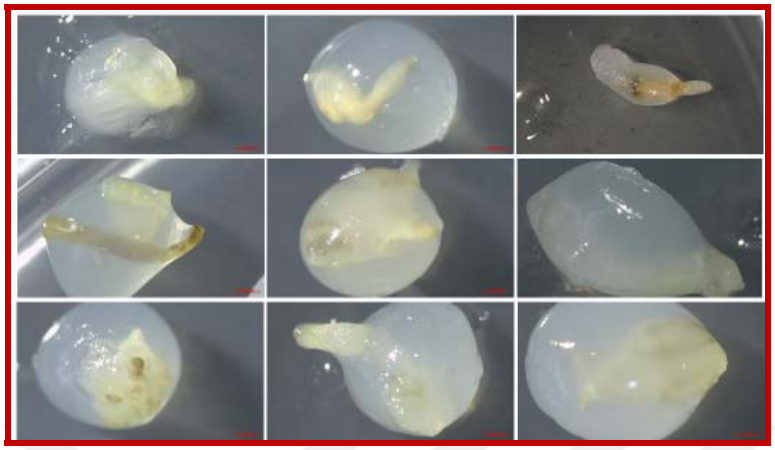
Çizelge 4.17. *Colchicum atticum* ROM Besi Yeri Sentetik Tohum Kol Sayısı (%)

Colchicum atticum	
Uygulama	**Kol Sayısı**
Kontrol	0
1 mg/BA+P+S	1,33 bc
1 mg/BA	1,67 abc
1 mg/ 2,4-D+P+S	2,33 ab
1 mg/ 2,4-D	2,33 ab
1 mg/BA + 1 mg/ 2,4-D +P+S	1,67 abc
1 mg/BA + 1 mg/ 2,4-D	3,67 a

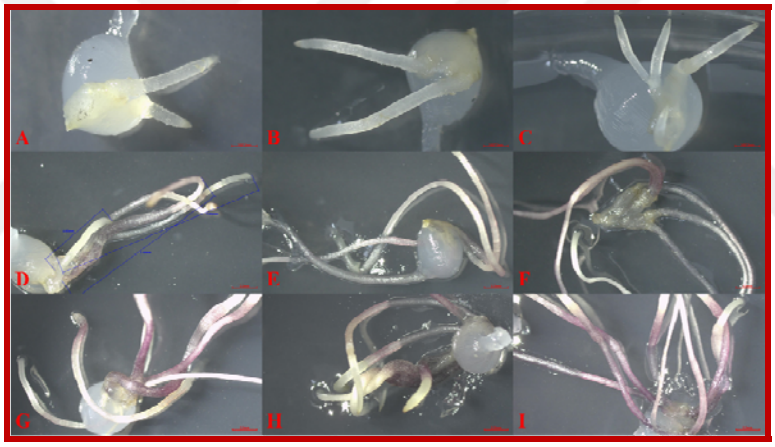
$LSD_{(0,05)}$ Kol Sayısı= 13,92



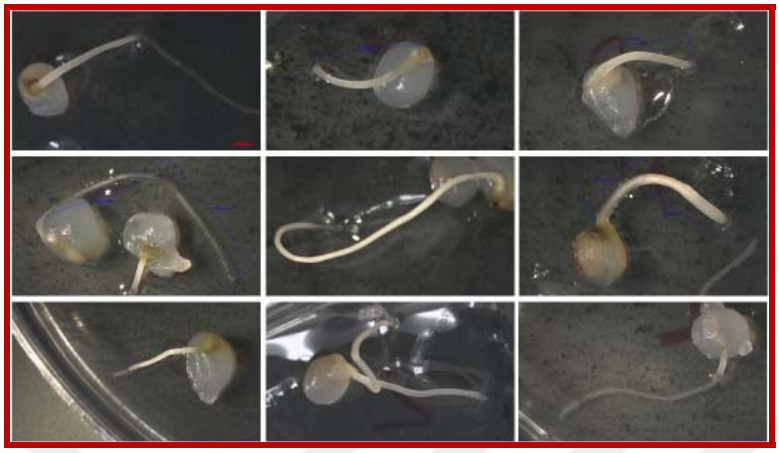
Şekil. 4.36. *Colchicum* türlerinde ROM Besi yeri Sentetik Tohum Kol Sayısı (%)



Şekil. 4.37. *C. triphyllum, C. sobolifera, C. speciosum ve C. burtii* türlerinde çimlenmeyen sentetik tohumlar



Şekil. 4.38. *C.atticum* türünde MS içeren besi yerinde Na-alginate ile kaplanan sentetik tohumlarda A, B ve C) Enkapsülasyondan 10 gün sonra çimlenen sentetik tohumlar D, E ve F) Çimlenen sentetik tohumlardan elde edilen yapılar G, H ve I) Sürgün ve kök benzeri yapılardaki uzamalar



Şekil. 4.39. *Colchicum atticum* türünde ROM besi yerinde Na-alginate ile kaplanan sentetik tohumlarda A, B ve C) Enkapsülasyondan 20 gün sonra çimlenen sentetik tohumlar

Bu tez kapsamında enkapsülasyon çalışmasında kullanılan besi yerleri karşılaştırıldığında çimlenme oranı, oluşan kol sayısı değerledirildiğinde MS besiyerinde daha olumlu sonuçlar alındığı görüşmüştür. MS ortamı içerisine eklenen prolin ve spreminin çimlenme oranını ROM besi yerine kıyasla arttırdığı gözlemlenmiştir. Koçak (2019) *Cyclamen* de yapmış olduğu sentetik tohum çalışmasında embriyo oluşumunun MS besiyerinde ROM besiyerine göre daha yüksek olduğunu, MS ortamında embriyo oluşum oranlarının prolin ve spermin içeren uygulamalarda daha yüksek, ROM kullanılan ortamlarda ise önemli bir değişikliğe sahip olmadığını belirtmiştir. Aycan (2020) *Cyclamen* türlerinde yaptığı sentetik tohum çalışmasında MS besiyeri kullanmış prolin ve sperminin olumlu etkisi olduğunu belirtmişdir.Winkelmann ve ark., (2004) sıklamen türünde yaptığı sentetik tohum çalışmasında 2 farklı yöntem kullanmıştır. Klasik aljinat ile yaptığı kaplamada çimlenme oranın yüksek olduğunu belirtmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde Dünya'nın başlıca gen merkezleri arasında 3 farklı fitocoğrafik bölgenin kesiştiği noktada yer almakta ve bitki genetik çeşitliliği ve endemik türler bakımından çok özel bir konuma sahiptir. Toprak altı organları metamorfoza uğraymış gövde yapısında olan ve hayatlarının büyük bir kısmını bu organlarıyla devam ettiren goeofitler olumsuz çevre koşullarına dayanıklı, üstün genetik özelliklere sahip güzel çiçekleri ve görünüşleri ile hem süs bitkileri sektöründe hemde içerdikleri alkoloidler ile tibbi aramatik bitki olarak tercih edilmektedirler. Ülkemiz florasında bulunan yaklaşık 12000 bitki türünün üçte biri endemik türler olup yaklaşık olarak 688 geofit türü doğal olarak yetişmekte ve bu türlerin 162 tanesinin endemik olduğu bilinmektedir.

Dünya üzerinde geniş bir yayılış gösteren *Colchicum*'un, 90 türü bulunmaktadır. Bu türlerin 50 tanesi ülkemiz florasında doğal olarak yetişmektedir ve 22 tanesi endemiktir. Bu da Anadolu'nun *Colchicum* için gen merkezi olduğunu göstermektedir.

Generatif (tohumla üretim) ve vejetatif yöntemlerle üretilebilen geofitler için; genetik açılım görülmesi, bazı türlerde yeterli miktarda tohumun oluşmaması ve tohum ekiminden sonra bitkinin çiçek oluşturmasına kadar geçen sürenin uzun sürmesi gibi nedenlerden dolayı tohumla üretim tercih edilmemektedir. Kontrollü şartlarda yapay besin ortamları kullanılarak hücre, doku ya da organ gibi bitki kısımlarından yeni bir bitkinin meydana geldiği ve klonal bitki çoğaltımı, virüsten ari bitki üretimi gibi avantajlar sağlayan doku kültürü tercih edilmektedir. Doku kültürü ile hem daha fazla sayıda bitki üretilebilir hem de yer ve zamandan tasarruf edilebilir. Ayrıca nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan türlerin korunmasında ve diğer vejetatif yöntemlerle çoğaltılması zor olan bitkilerin üretilmesinde de doku kültürü yöntemleri kullanılabilmektedir. Doğada her yıl 1 ya da 2 yavru korm oluşturarak çoğalan *Colchicum* bitkisi için doku kültürü oldukça etkili bir çoğaltma yöntemidir.

Doku kültürü yöntemlerinden birisi olan somatik embriyogenesis, bitkilerin somatik hücrelerinden yeni bir bitki elde edilmesi prensibine dayanmaktadır ve doku kültürü içerisinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Elde edilen somatik embriyolar hem bitkinin çoğaltılmasında hem de genetik kaynağın muhafazasında kullanılabilmektedir. Somatik embriyogenesisin kullanım alanlarından birisi olan sentetik tohum, hem in vitro hem de sera koşullarında bitki meydana getirebilme yeteneğine sahip olan ve depolanabilen somatik embriyo, hücre yığınları, sürgün tomurcukları ya da herhangi bir bitki dokusunun yapay olarak kaplanmasına denir

Bu nedenlerle yapılan bu tez çalışmasında, ülkemizde doğal olarak yetişen *Colchicum* türleri (*C. atticum*, *C. triphyllum*, *C. burtii*, *C. sobolifera*, *C. speciosum*) somatik embriyogenesis yöntemiyle çoğaltılarak somatik embriyolar elde edilmiştir. Elde edilen somatik embriyolar kaplanarak sentetik tohumla üretilebilmesi için etkili protokollerin elde edilmesi hedeflenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinden sunulmuştur.

- Tez çalışması kapsamında eksplant olarak kullanılan *Colchicum* kormlarının sterilizasyonu için farklı yüzey sterilizasyon yöntemleri denenmiştir. Yüzey sterilizasyon denemelerinde H_2O_2, % 30'luk NaOCl, %0.1'lik $HgCl_2$ ve %0.2'lik $HgCl_2$ denenmiş ve tüm türlerde en düşük enfeksiyon oranı sırası ile 20 dk. musluk suyu altında bekletme, 1 dk. %0.1'lik fungusitte bekletme, %0.2'lik $HgCl_2$'de 30 dk. bekletme %70 etil alkolde 3 dk. bekletme, %30'luk Domestos®'da 20 dk. bekletme işlemlerinden oluşan yüzey sterilizasyon yönteminde elde edilmiştir.
- Tez çalışmasında hem yüzey sterilizasyon denemelerinde hem de somatik embriyogenesis denemelerinde genotipler arasındaki farklı tepkiler dikkat çekmiştir. Genotip farkından dolayı yüzey sterilizasyonunda enfeksiyon oranlarında, somatik embriyogenesis çalışmalarında rejenerasyon,

embriyojenil kallus ve somatik embriyo oluşum oranlarında farklılıklar meydana gelmiştir.

- Doku kültürü çalışmaalrında toprak altı organlarda bulunan yoğun enfeksiyondan ötürü olgunlaşmamış embriyo çoğaltım materyali olarak tercih edilebilir.
- Embriyojenik kallus oluşumunu teşvik etmek için 2,4-D ve NAA'nın BA ve 2iP ile farklı kombinasyon ve konsantrasyonunu içeren 36 farklı besin ortamı kullanılmıştır.
- *C. atticum* türünde en yüksek rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP ve 1 mg/l 2,4-D + 0 mg/l 2İP çeren MS besi yerinde elde edilmiştir.
- *C. triphyllum* türünde en yüksek rejenerasyon 2 mg/l NAA içeren MS besi yerinde, en yüksek embriyojenik kallus oluşumu 1 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2İP ve en yüksek somatik embriyo oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilmiştir.
- *C. speciosum* türünde en yüksek embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilmiştir.
- *C. burtii* türünde en yüksek rejenerasyon 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP içeren MS besi yerinde,en yükek embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu 2 mg/l 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilmiştir.
- *C. sobolifera* türünde en yüksek rejenerasyon 0,5 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l BA, 2 mg/l 2,4-D, 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 2İP ve 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA içeren MS besi yerinde, en yüksek embriyojenik kallus oluşumu 0,5 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2IP içeren MS besi yerinde, en yüksek somatik embriyo oluşumu ise 2 mg/l 2,4-D + 0,1 mg/l 2İP elde edilmiştir.
- Elde edilen embriyojenik yapılar hormonsuz MS besi yeri ve 2 mg/l, GA_3 0.1 mg/l BA, 1 g/l prolin, 4.4 g/l MS 30 g/l sükroz, 3.5 g/l gelrite içeren

MS besi yeri içeren ortamda çimlenmeye alınmış ancak kararma göstererek canlılıklarını yitirmişlerdir.

- Sadece *C. speciosum* türünde bitkiciğe dönüşüm sağlanmıştır. Ancak dış koşullara alıştırma aşamasında canlılığını yitirmiştir.
- Sentetik tohum çalışmalarında sadece *C. atticum* türünde çimlenme gerçekleşmiştir. En yüksek çimlenme oranı 1mg/l BA+P+S içeren MS besi yerinde %60 elde edilmiştir.
- Bundan sonra yapılacak olan sekonder metabolit çalışmalarında *in vitro* koşullarda oluşan ve doğal olarak yetişen *Colchicum* türlerinden elde edilmiş olan kolşisin oranlarında karşılaştırma çalışması yapılabilir..
- Tez çalışmasında farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BDD denenmiş, somatik embriyolar elde edilmiş ancak yüksek oranda bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Bundan sonraki çalışmalar için farklı BDD kombinasyon ve konsantrasyonlarının denenerek elde edilen somatik embriyoların olgunlaştırılması ve bitkiye dönüşümünün sağlanması önerilmektedir.
- Somatitik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan MS ortamı yerine geofitlerde kullanılan özellikle başta N_5 olmak üzere ROM, NN, WH ortamları kullanılması önerilmektedir.
- Somatik embriyoların olgunlaştırılma çalışması yapılması önerilmektedir.
- Sentetik tohum çalışmasında *C. atticum* türünde çimlenme gerçekleşmiş fakat bitki elde edilememiştir. Bu nedenle farklı bitki büyüme düzenleyicisi içeren besi yerleri ile bitkiciğe dönüşüm sağlanması için denemelerin kurulması önerilmektedir.
- Sentetik tohum denemelerinde çimlenme gerçekleşmeyen türler için farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi içeren denemelerin kurulması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Akan, H., Eker, I., 2005. "Check-list of the genus *Colchicum* in the flora of Turkey", Turk J Bot 29, 327–331.

Alp, H.A., 2020. Türkiye'de yetişen bazı sıklamen türlerinin yumrularında somatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi araştırmaları, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 218.

Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, E., 2002. Bitki Biyoteknolojisi. 1.Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi. Vakıf Yayınları.374s.

Baghdadi, S.H., Syouf M.Q., Shatnawai M.A., Arabiat A., Makhadmeh I. M. 2010. "Cryopreservation by encapsulation-vitrification of embryogenic callus of wild *Crocus* (*Crocus hyemalis* and *Crocus moabiticus*)." Author Subject, 17.

Baltacı, A.M., Arslan, M., 2019. Oğulotu (*Melissa officinalis*) bitkisinde meristem ve somatik embriyo kültürlerinden sentetik tohum elde etme olanaklari. Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi, S.1, s.1-10.

Blazquez S, Olmos E, Hernandez JA, Fernandez-Garcia N, Fernandez JA, 2009. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the anti-oxidant enzymatic system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 97:49-57.

Bunn, E., Turner, S.R., Panaia, 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.

Chacon, J. Cusimano, N., Renner, S.S., 2014. "The evolution of *colchicaceae*, with a focus on chromosome numbers", Systematic Botany, 39(2), 415-427.

Daradkeh, N.M., 2012. "Callus, cell suspension culture and colchicine production in (*Colchicum hierosolymitanum* fieb), M.Sc. Thesis. Jordan University of Science and Technology, Irbid, Jordan.

Dilaver, Z., 2013. "Conservation of natural plants and their use in landscape architecture", Advances in Landscape Architecture. Editör: Ozyavuz, M., ISBN: 978-953-51-1167-2, InTech, DOI: 10.5772/55767.

Dinç Düşen, O., Sümbül, H., 2007. "A Morphological investigation of *Colchicum* L. (*Liliaceae*) species in the Mediterranean region in Turkey", Turk J Bot 31, 373-419.

Ellington, E., Adserias, T., Coma, A., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C., 1997. "Effect of paclobutrazol on in vitro culture of *colchicum autumnale* corms", Acta Hortic. 447, 131-134.

Engelmann, F., 1991. "In vitro conservation of tropical plant germplasm - a review", Euphytica, 57, 227–243.

Engelmann, F., 2004. "Plant cryopreservation: progress and prospects", In Vitro Cell Dev Biol Plant, 40, 427–433.

Fang, J., Wetten A., Hardley, P., 2004. "Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage", Plant Sci, 166, 669-675.

Finkelstein, Y., Aks, S.E., Hutson, J.R., Juurlink, D.N., Nguyen, P., Dubnov-Raz, G., Pollak, U., Korena G., Bentur, Y., 2010. "Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug", Clinical Toxicology, Volume 48, Issue 5, pages 407-414..

Genişel, H., 2013. "Türkiye florası'ndaki acı çiğdem (*Colchicum* L.) yeni tür adaylarının karakterizasyonunda ISSR markörlerin kullanımı", (Yüksek Lisans Tezi, Tez no: 337113), İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s.85.

Gökel, Y., Canataroğlu, A., Satar, S., Köseoğlu, Z., 2000. "Colchicine toxicity: a patient with pneumopericardium", Turk J Med Sci, 30, 401-403.

Güner, A., 2000. "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", Vol. 11, Suppl. 2, Edinburgh University Press, Edinburgh.

Hayashi, T., Yoshida, K., Sano. K., 1988. “Formatiom of alkaloids in suspension-cultured *Colchicum autumnale*. Phytochem., 27,1371-1374.

Jalali, N., Naderi, R., Shahi-Gharahlar, A., Teixeira Da Silva, J. A., 2012. “Tissue culture of cyclamen”, Scientia Hort., 137, 11-19.

Jevremovic, S., Calic, D., Subotic, A., Trifunovic, M., Petric, M., Ve Bohanec, B., 2010. Ploidyvariation and flowering of dwarf Iris derivedfrom tissue culture. ISHS Acta Horticulturae, 855: XXIII International EUCARPIA Symposium, Section Ornamentals, Colourful Breeding and Genetics-Part II.

Kamanetsky R., Okubo H., 2013. “Introduction”, Editors: Kamanetsky R., Okubo H., Ornamental geophytes from basic science to sustainable production, 1st ed., CRC Press, London, XV-XVII.

Karagüzel, Ö., Aydınşakir, Kaya, A.S., 2007. “Dünyada ve Türkiye’de çiçek soğanları sektörünün durumu”, Derim, 24, 1, 1-10.

Karakaş, M.Ö., Türktaş, M., Ertuğrul, F., Kaya, E., 2014. “Use of fluorescent-based amplified fragment length polymorphism to resolve phylogenetic relationships of Colchicum species from Turkey”, Genetics and Molecular Research, 13 (1), 1480-1490.

Karamian, R., 2003. "Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus."* I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650..5

Karaoğlu, C., 2010. Soğanlı Bitkiler ve İn Vitro Hızlı Çoğaltım. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, , 19 (1-2): 24-29.

Karlık, E., Değer, M., Üzen, E., Gözükirmizi, N., 2020. PIONEERING In Vitro Studies for Callus Formation of *Colchicum chalcedonicum* Azn. Trakya University Journal Of Natural Sciences, 21(2): 131-137, 202

Kaya, E., 2009. “*Colchicum* L”, Türkiye’nin doğal süs bitkileri kataloğu, Editör: Kaya, E. Yalova, Tasarım Matbaacılık Hizmetleri.

Kaya, E., Erken, K., Erken, S., Gülbağ, F., 2013. "The adaptation of Turkish *Colchicum* L. species to the conditions of culture", Acta Hortic, 1002, 67-80.

Khan, H., Tariq, Ş.A., Khan, M.A., 2011. "Biological and phytochemical studies on corms of *Colchicum luteum* Baker", Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 5(32), pp. 7031-7035.

Koçak, M., 2019. *Cyclamen coum*'da Somatik Embriyogenesis Yöntemi ile Rejenerasyonun Araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 123.

Komjathyová, H., Franková, L., Bóka, K., Pšenák, M., 2000. "Botanical and developmental aspects of *Colchicum autumnale* L. (autumn crocus)", (in Slovak). Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comenianae, Bot. 40, p. 67-80.

Le Hello, C., 2000. "The pharmacology and therapeutic aspects of colchicine", Alkaloids 53, 288–352.

Magray, M.M., Wani, K., Chatto, M., Ummyiah, H., 2017. ''Synthetic Seed Technology'', Int J Curr Microbiol App Sci 6:662–674.

Mir, J.I., Ahmed, N., Wani, S.H., Rashid, R., Mir, H., Sheikh, 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.

Mirici, S., Parmaksız, İ., Özcan, S., Sancak, C., Uranbey, S., Sarihan, E., Gümüşcü, O., Gürbüz, A.B., ve Arslan, N., 2005. ''Efficent in vitro bulblet production from immature embryos of endangered Sternbergia fischeriana''. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80: 239–246.

Murashige, T., Skoog, F., 1962. "A revised medium for rapid growth and bio assayswith tobacco tissue cultures", Physiol. Plant. 15, 473–497.

Oran, S., Fattash, I., 2005. In vitro propagation of an endangered medicinal bulbous plant *Sternbergia clusiana* Ker-Gawler (*Amaryllidaceae*). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 80, 399–402.

Özhatay, N., Byfield, A., 2005. “Türkiye’nin 122 önemli bitki alanı”, Doğal Hayatı Koruma Vakfı, s.1-24, İstanbul, s.476.

Özdemir, F, A., Yıldırım, M, U., Kiliç, Ö., 2016. Farklı Konsantrasyonlarda ve Sürelerde Sodyum Hipoklorid (NaOCl) Uygulamasının Pancratium maritimum L. Soğanlarının Yüzey Sterilizasyonu Üzerine Etkileri. BEÜ Fen Bilimleri Dergisi BEU Journal of Science,5(2), 156-163, 2016

Persson, K., 1999. “The genus *Colchicum* in Turkey: I. New species”, Edinburgh Journal of Botany, Vol. 56, Issue 01, pp. 85-102.

Persson. K., 2009. “A new soboliferous species of *Colchicum* in Turkey”, Botanical Journal of the Linnean Society, 135: 86-88.

Peter, O. J., 1995. “Chromatographic determination of constituents of the genus *Colchicum* (*Liliaceae*)”, Chromatography A., 704, 351-356

Pırıldar, S., Sütlüpinar, N., Atasever, B., Erdem-Kuruca, S., Papouskova, B., Šimánek, V., 2010. “Chemical constituents of the different parts of *Colchicum baytopiorum* and their cytotoxic activities on K562 and HL60 cell lines, Pharmaceutical Biology, 48, 1, 32-39.

Ptak A., Bach, A., 2007. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. İn vitro Cell.Dev.Biol.—Plant 43:35–39.

Ptak A., El Tahchy A., Wyżgolik G., Henry M., Laurain-Mattar D, 2010. Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 102, 61–67

Raja, W., Zaffer, G., Wani, S.A., 2007. In Vitro Microcorm Formation In Saffron (*Crocus sativus* L.). Acta Horticulturae, 739:291-296.

Resmi Gazete, 2017. Doğal Çiçek Soğanlarinin Doğadan Toplanmasi,Üretimi Ve İhracatina İlişkin Yönetmelik, Sayı : 30014.

Sevindik,B., 2018. Siklamende anter ve ovül kültürü yöntemleri ile haploid bitkilerin elde edilmesi Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 204.

Seyring, M., Hohe, A. 2005. Induction of desiccation-tolerance in somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Journal of Horticultural Science &Biotechnology, 80 (1) 65–69.

Sharma, S., Shazad, A., Teixeira Da Silva, J.A., 2013. Synseed technology-A complete synthesis. Biotechnology Advances, 31, 186–207.

Shatnawi, M.A., Johnson K.A., 2004. "Cryopreservation by encapsulation-dehydration of 'Christmas bush'(*Ceratopetalum gummiferum*) shoot tips."In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 40.2:239-244.

Shibli, R.A., Daradkah, N.Q., Makhadmeh, I.M., Baghdadi, S.H., 2010. "Colchicine production from *colchicum* and the role of in vitro cultures: A Review", Jordan Journal of Agricultural Sciences, 6, 2.

Shii, C.T., Ma, S.S., Huang, P.L., Chin, S.W., 1994. "Current and future developments in clonal germplasm conservation of vegetatively propagated crops", Plant Germplasm Conservation: Perspectives for the 2000s, pp. 83–99.

Singh, S., Banerjee, M., Haider, Z.A., 2013. "Conservation of *Colchicum luteum* Baker through micro propagation", Journal of research (BAU), 25(1), 96-100.

Skyba, M., Faltus, M., Zamecnik, J., Cellarova, E., 2011. "Thermal analysis of cryopreserved Hypericum perforatum L. shoot tips: cooling regime dependent dehydration and ice growth", Thermochimica Acta, 514: 22-27.

Sugiyama, M., Saito, M., Ichida, H., Hayashi,Y., Ryuto, H., Fukunishi, N., Terakawa, T., Abe, T. 2008. "Biological effects of heavy-ion beam irradiation on cyclamen", Plant Biotechnology, 25, 101–104.

Sütlüpınar, N., 1981. "Türkiye'de yetişen ve sonbaharda çiçek açan *Colchicum* türlerinin kolşisin ve demekolsin yönünden araştırılması", (Proje Sonuç Raporu), Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Temel Bilimler Araştırma Grubu, Proje No: TBAG-399.

Tanker, M., Koyuncu, M., Coşkun, M., 1995. "Türkiye'de yetişen bazı *Colchicum* (Acıçiğdem) türlerinin kolşisin ve kolşikozit yönünden incelenmesi", (Proje Sonuç Raporu), Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Temel Bilimler Araştırma Grubu, Proje No: 1138.

Uzun, I., Bayır, A., 2009. "Horticultural biodiversity in Turkey", Bulletin UASVM Horticulture, 66 (2).

Vassiliades, D., Persson, K., 2002. "A new winter-flowering species of *Colchicum* from Greece", Preslia Praha 74, 57–65.

Vinnersten A., Reeves, G., 2003. "Phylogenetic relationships within *Colchicaceae*", Am. J. Bot., 90, 1455-1462.

Vahedi, M., Kalantari, S., Salami, S,A,, 2014. Factors affecting callusinduction and organogenesis in saffron (Crocus sativus L.). Plant Tissue Culture abd Biotechnology, 24:1-9

Wagh, P.J., Patil, V.W., Kale, M.C. 2015. Effect of Soluble Chitosan Application on in vitro Germination and Growth of Dormant Corms of Colchicum Luteum Baker. International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology, 3:179-182.

Winkelmann, T., Meyer L., Serek, M., 2004A. "Germination of encapsulated somatic embriyos of *Cyclamen persicum*", 39(5), 1093-1097.

Yücesan, Bb., Çiçek, F., Gürel, E., 2014. Somatic embryogenesis and encapsulation of immature bulblets of an ornamental species, Grape hyacinths (*Muscari armeniacum* Leichtlin ex Baker). Turk J Agric For 38: 716-722.

Yüzbaşıoğlu, E., Dalyan, E., 2017. Büyüme Hormonları ve Aktif Kömürün In Vitro Koşullarda Kardelen (*Galanthus woronowii* Losinsk.) Soğancık Oluşumuna Etkisi. Mediterranean Agricultural Sciences, 30(3): 239-243.

ÖZGEÇMİŞ

29/10/1979 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 1998 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2002 yılında mezun oldu ve 2003 yılında Ç.Ü. Biyoteknoloji Anabilimdalında Yüksek Lisansa başladı. 'Aurantioideae Alt Familyasındaki Cinslerde Yer Alan Bazı Türlerin SSR Markılarıyla Moleküler Karakterizasyonu' konulu Yüksek Lisans Tezini 2007 yılında bitirdi. Ç.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümde 2013 yılında yüksek lisansa başladı ve Atık Su Arıtma Çamurunun Süs Lahanasının Gelişimi Ve Besin Elementi İçeriği Üzerine Etkisi konulu Yüksek Lisans Tezini 2015 yılında bitirdi. Ç.Ü.Z.F.Bahçe Bitkileri Bölümde 2016 yılında başladığı doktora eğitimi devam etmektedir.