

**BASKİL TERS LALESİ (*Fritillaria baskilensis* Behcet)’NİN DOKU KÜLTÜRÜYLE
ÇOĞALTILMASI**

Tuba SARİ

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU

AĞUSTOS-2016

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BASKİL TERS LALESİ (*Fritillaria baskilensis* Behcet)'NİN DOKU KÜLTÜRÜYLE
ÇOĞALTILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

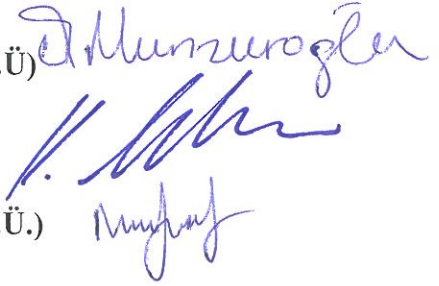
Tuba SARİ

(111110107)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29 Temmuz 2016

Tezin Savunulduğu Tarih : 18 Ağustos 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU (F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Kadri ÇETİN (F.Ü)
Yrd. Doç. Dr. Murat KÜRŞAT (B.E.Ü.)



AĞUSTOS-2016

ÖZET

Yüksek Lisans

BASKİL TERS LALESİ (*Fritillaria baskilensis* Behcet)'NİN DOKU KÜLTÜRÜYLE ÇOĞALTILMASI

Tuba SARİ

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU

2016

Bu çalışmada ülkemiz için endemik olan ve türü tehlike altında olduğu bildirilen Baskil Ters Lalesi (*Fritillaria baskilensis* Behcet)'nin *in vitro* çoğaltımı amaçlandı. Eksplantlar bitkinin soğan, açmamış çiçek tepalleri ve çiçek saplarından elde edildi. Deneylerde MS (vitaminli) temel besi ortamı, %3 ve %6 süktroz ile NAA, IAA ve BA gibi bitki büyüme düzenleyicileri (PGR) kullanıldı. Yüzey sterilizasyonu işlemleri etil alkol ve sodyum hipoklorit (NaOCl) kullanılarak yapıldı. Eksplantlar 20±1 °C'de gelişmeye bırakıldı. 8 saat karanlık ve 16 saat ışık fotoperiyot uygulandı.

İlk 30 günlük inkübasyon sonunda, canlı kalan (%85,94) soğan eksplantlarının %38.4'ünde kallus oluşumu, % 8.6 'sında soğancık oluşumu görüldü. 120 günlük inkübasyon süresinin sonunda en iyi sonuç %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortam (1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA)'da alındı. Bu ortamda soğan eksplantlarının % 96.42'sinde direkt veya indirekt organogenez, geriye kalan % 3.57'sinde sadece kallus oluşumu görüldü. PGR içermeyen temel besi ortamında süktroz bulunmadığı zaman %48.13 oranında kallus oluşumu görülmesine rağmen organogenez gerçekleşmedi. %3 süktroz oranı % 6 süktroza göre kallus + sürgün oluşumunda %147.2, kallus + soğancık oluşumunda %153.3 oranlarında daha fazla etkili oldu. %3 süktroz ve yüksek sitokinin (1 mg/L BA + 0.6 mg/L NAA + 0.4 mg/L IAA) birlikte bulunduğu zaman toplam

organogenez arttı. Kallus + sürgün oluşum hızında %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortam, kallus + soğancık oluşum hızında % 3 süktroz içeren düşük sitokininli ortam (0,1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA) daha etkili oldu. %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamı endirekt organogenezle meydana gelen sürgün sayısını %50 oranında arttırdı. Eksplant başına endirekt sürgün oluşumu ortalama 13.7 adet ile %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda, endirekt soğancık oluşumu 13.9 adet ile %3 süktroz içeren düşük sitokininli ortamda elde edildi. Sürgün ve soğancık oluşumu görülen eksplantlar ½ MS+ %0.6 agar+ %3 süktroz + 5mg/L NAA+0.5 mg/L BA içeren ortamda köklenmeye alındı. 329 eksplantın ilk 30 günlük inkübasyonu sonunda %48.32'sinde, 60 günlük inkübasyonu sonunda %77.50'sinde köklenme gerçekleşti. Soğan eksplantlarından *in vitro* şartlarda elde edilen tam bitkiciklerin dış ortama adaptasyonunda kayda değer bir sonuç elde edilemedi. Dış ortama (saksılara) aktarımın 40. gününde bitkiciklerin %98'i öldü. Ayrıca açmamış çiçek petalleri ile çiçek saplarının eksplant olarak kullanıldığı deneylerde kallus oluşumu dâhil direkt ve endirekt organogenez gerçekleşmedi.

Anahtar Kelimeler: *Fritillaria baskilensis*, *in vitro*, mikro çoğaltım

ABSTRACT

Master's Thesis

MICROPROPAGATION OF BASKIL REVERSE TULIP (*Fritillaria baskilensis* Behçet) VIA TISSUE CULTURE

Tuba SARI

Elazığ University

Institute of science

Department of Science

Committee Chair: Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU

2016

The aim of this study is to provide *in vitro* micropropagation of *Fritilla baskilensis* Behçet which is an endemic plant of our country and has a risk of becoming extinct. Parts of bulb scales of *Fritillaria baskilensis* tepals of not open flowers and flower stalks were used as the explant source. In experiments, MS (with vitamins) basic nutrition medium, %3 and %6 sucrose and plant growth regulators as NAA, IAA and BA were used. Ethyl alcohol and sodium hypochlorite (NaOCl) were used for surface sterilization. Explants were allowed to grow at 20 ± 1 °C. A Photoperiod of 8 hours dark+16 hours light were applied.

At the end of first 30 days of incubation period, the formation of callus was observed on %38.4 and formation of bulblets was observed on %8.6 of survived bulb explants (survived bulb explants: %85.94). At the end of 120 days of incubation period, the best result was obtained from the medium (1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA) supplemented with high cytokinin and %3 sucrose. In this medium, direct and indirect organogenesis was observed on %96.42 of bulb explants and callus formation was observed on the % 3.57. When PGR free basic medium does not contain sucrose, ratio of callus formation was be %48.13 but the organogenesis was not observed. As a comparison, medium containing %3 sucrose to medium containing %6 sucrose; at medium containing %3 sucrose is more effective on formation of callus + shoot (relatively %147.2 more effective) and on formation of bulblet (relatively %153.3 more effective). When %3 sucrose and high

cytokinin (1 mg/BA + 0.6 mg/L NAA + 0.4 mg/L IAA) are used together, the probability of organogenesis is increased. Medium supplemented with high cytokinin and %3 sucrose is more effective on rate of formation of callus and shoot; medium supplemented with low cytokinin and %3 sucrose (0.1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA) is more effective on rate of formation of callus and bulblet. Quantity of shoot formed by indirect organogenesis was increased %50 by medium supplemented with high cytokinin and %3 sucrose. Average 13.7 units of shoot formation per explant were obtained in medium supplemented with high cytokinin and %3 sucrose; average 13.9 units of bulblet formation per explant were obtained in medium supplemented with low-cytokinin and %3 sucrose. Explants which observed formation shoot and bulblet were allowed to take root in medium supplemented with ½ MS+ % 0,6 agar+ %3 sucrose + 5 mg/L NAA+0.5 mg/L BA. At the end of first 30 days of incubation period, rootings were observed on %48.32 of 329 units of explants and at the end of 60 days of incubation period, rootings were observed on %77.50 of 329 units of explants. Significant result regarding adaptation of little plants obtained from bulblet explants *in vitro* conditions to open field could not be obtained. %98 of little plants were died after transportation to external environment (flowerpots). In addition, callus formation and direct + indirect organogenesis was not observed in the experiments where cleistogamus and pedicles were used as explants.

Key terms: *Fritillaria baskilensis*, *in vitro*, micro multiplication.

TEŞEKKÜR

Fritillaria baskilensis türünün *in vitro* koşullarda üretimi üzerine çalışmalar konulu araştırmayı yüksek lisans tezi olarak veren, çalışmalarımda beni yönlendiren , araştırmanın her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Ömer Munzuroğlu'na ve Yrd. Doç. Dr Murat Kürşat'a teşekkürü bir borç bilirim . Aynı zamanda tez hazırlık aşamasında emeği geçen arkadaşım Ayşegül Çelik ve desteğiyle yanımda olan hayat arkadaşıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tuba SARİ

ELAZIĞ - 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET	III
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
SİMGELER DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLolar LİSTESİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Türkiye Geofit Üretimi ve İhracatı.....	3
2.2. Liliaeceae Familyası	5
2.3. <i>Fritillaria</i> Cinsinin Taksonomik tarihi	6
2.4. <i>Fritillaria</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	7
2.5. <i>Fritillaria</i> Cinsinin Doğal Yetiştirme Ortamları.....	8
2.6. <i>Fritillaria</i> Cinsinin Dünya Üzerinde Yayılışı	9
2.7. Türkiye’deki <i>Fritillaria</i> Türleri	11
2.8. <i>Fritillaria</i> Türlerinin Çoğaltılması	15
2.8.1. Generatif Çoğaltım	15
2.8.2. Vejetatif Çoğaltım	16
2.8.2.1. Yavru Soğanlar İle Üretim.....	17
2.8.2.2. Soğan Pulları İle Üretim (Scaling).....	17
2.8.2.3. Parçacık (Dilimlere Ayırma - Chipping) ve İkiz Pul (Twin-Scaling) İle Üretim	18
2.8.2.4. Soğan Tabanının Kesilmesi İle Üretim.....	18

2.8.2.4.1.	Çapraz kesim (cross cutting):	19
2.8.2.4.2.	Soğanda merkez çıkarma ve soğan tabanın oyulması (scoopimg): ..	19
2.8.2.5.	Doku Kültürü Yöntemiyle Çoğaltım	20
2.8.2.5.1.	Bitki Doku Kültürünün Tarihçesi	21
2.8.2.5.2.	Bitkilerin Çoğaltılmasında Kullanılan İn Vitro Teknikler.....	23
2.8.2.5.2.1.	Organogenez ve Embriyogenez'in Kökeni.....	23
2.8.2.5.2.2.	Somatik Embriyogenez.....	24
2.8.2.5.2.3.	Organogenez	25
2.8.2.5.3.	Doku Kültürü Teknikleri ile Bitkilerin Çoğaltılma Aşamaları	25
2.8.2.5.3.1.	Kültürlerin başlatılması.....	25
2.8.2.5.3.2.	Sürgünlerin Çoğaltılması	26
2.8.2.5.3.3.	Köklenme.....	26
2.8.2.5.3.4.	Adaptasyon (Aalıştırma).....	26
2.9.	<i>Fritillaria</i> Türlerinin Kullanım Alanları Ve Ekonomik Önemi	27
2.9.1.	Kullanım Alanları.....	27
2.9.1.1.	Peyzaj Düzenlemelerinde Kullanımı	27
2.9.1.2.	Medikal Kullanımı	28
2.9.1.3.	Gıda Olarak Kullanımı.....	29
2.9.2.	Ekonomik Önemi.....	30
2.10.	Literatür Özeti.....	31
3.	MATERYAL ve METOT	39
3.1.	Besi ortamlarının hazırlanması:.....	39
3.2.	Bitkisel Materyalin Toplanması ve Eksplantların Hazırlanması.....	40
3.3.	Soğanlardan eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması	42
3.4.	Çiçeklerin taç yapraklarından eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması.....	47
3.5.	Çiçek saplarından eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması	49
3.6.	İstatistiksel analiz	51

4. BULGULAR.....	52
4.1. Soğan Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular	52
4.2. Çiçek Taç Yaprığı Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular	70
4.3. Çiçek Sapı Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular.....	71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
6. KAYNAKÇA.....	83



SİMGELER DİZİNİ

BA	Benzil aminopürin
°C	Derece santigrat
cm ³	Santimetre küp
EB	Epibrassinolide
IAA	Indol 3-asetik asit
2,4-D	2,4-Dikloroasetikasit
g/l	Gram/litre
LS	Linsmaier and Skoog
mg/L	Miligram/litre
ml	Mililitre
µM	Mikromolar
µmol m ⁻² s ⁻¹	Mikro mol/metre kare.saniye
Mol	Molar
MS	Murashige and Skoog
NAA	Naftalen asetik asit
PEG	Polietilen glikol
Ppm	Milyonda bir kısım
N	Normal
µl	Mikrolitre
PGR	Bitki Büyüme Düzenleyicisi
KN	Kinetin
TDZ	Thidiazuron

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Fritillaria</i> cinsinin dünya üzerindeki yayılışı.....	11
Şekil 2.2 <i>Fritillaria imperialis</i>	11
Şekil 2.3 Mersin kökenli <i>F. persica</i> bitkisi	12
Şekil 2.4 Siverek kökenli <i>F. persica</i> bitkileri.....	12
Şekil 2.5 <i>Fritillaria</i> Cinsinin Türkiye’deki yayılışı.....	13
Şekil 2.6 Selimiye camisinde Ters lale motifi.....	14
Şekil 2.7 <i>Fritillaria</i> türlerinde tohumla çoğaltım aşamaları.....	15
Şekil 2.8 Potsdam (Almanya) şehri saray bahçesinde <i>Fritillaria</i> bitkileri.....	28
Şekil 2.9 Chan Bei Mu	29
Şekil 3.1 <i>Fritillaria baskilensis</i> (Baskil Ters Lalesi) bitkisinin toplandığı lokaliteler.....	41
Şekil 3.2 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinin doğal ortamındaki görünümü	41
Şekil 3.3 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinin laboratuvarında, musluk suyu altında yıkandıktan sonraki görünümü	42
Şekil 3.4 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkilerinden elde edilen soğanlar.....	42
Şekil 3.5 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet’in soğanlarından elde edilen eksplantlar	44
Şekil 3.6 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet’in soğanlarından elde edilerek petrilere ekilen soğan eksplantlarının görünümleri	45
Şekil 3.7 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinden koparılan açmamış yeşil veya mor-yeşil renkteki çiçeklerin görünümü	47
Şekil 3.8 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinin açmamış yeşil çiçeklerinin ve açmaya yakın morumsu renkteki çiçeklerinin petallerinden elde edilen eksplantlar	48
Şekil 3.9 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinin açmamış yeşil çiçeklerinin ve açmaya yakın morumsu renkteki çiçeklerinin petallerinden elde edilerek petrilere ekilen ortamlarına ekilen eksplantların görünümleri.....	48
Şekil 3.10 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinin eksplant kaynağı olarak kullanılan çiçek sapları	49
Şekil 3.11 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinin çiçek saplarından eksplant elde edilmesi	50
Şekil 3.12 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinin çiçek saplarından elde edilen ve petrilere ekilen ortamlarına ekilen eksplantların görünümleri.....	50
Şekil 4.1 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet’in soğanlarından elde edilerek petrilere ekilen soğan eksplantlarından gelişen kallusların görünümleri	52
Şekil 4.2 120. günden sonra <i>Fritillaria baskilensis</i> soğan pulu eksplantlarından elde edilen kallus yapıları	61
Şekil 4.3 120. günde <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet Bitkisinde Sürgün ve Soğancık oluşumu	67
Şekil 4.4 Endirekt ve Direkt Organogenezle Oluşan Soğancıkların Köklenme Ortamına Aktarıldıktan 60 gün Sonra Oluşturduğu Kök Yapıları.....	68
Şekil 4.5 Köklenen soğancıkların saksılara aktarılması	70
Şekil 5.1 Farklı Besin Ortamlarında Kallus Oluşumu ve Farklılaşması (%)	75

Şekil 5.2 Farklı Besin Ortamlarında Direkt Sürgün ve Soğancık Oluşumu (%).....	75
Şekil 5.3 Farklı Besin Ortamlarında Eksplant Başına Oluşan Sürgün ve Soğancık Sayısı (Kallus Üzerinde).....	80
Şekil 5.4 Farklı Besin Ortamlarında Eksplant Başına Oluşan Sürgün ve Soğancık Sayısı.	80



TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1 2016 Yılı Doğal Çiçek Soğanlarının İhracat Listesi Tablosu	4
Tablo 2.2 <i>Fritillaria</i> cinsinin tür sayısı açısından farklı bölgelerdeki ülkelerle karşılaştırılması.....	10
Tablo 2.3 TÜBİTAK-Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı'na göre Türkiye'de bulunan <i>Fritillaria</i> tür ve alttür taksonları.....	13
Tablo 2.4 Doku Kültürü Yöntemiyle Üretililebilecek Bazı Geofitler	21
Tablo 2.5 Bitki doku kültüründe önemli çalışmalar	22
Tablo 4.1 <i>Fritillaria baskilensis</i> Behçet bitkisinin soğanlarından elde edilen eksplantların, besi ortamlarına ekimlerinden itibaren ilk bir aylık süre içinde her on günde bir yapılmış ölçümler ile belirlenmiş, gelişme oranları (%6'lık sükroz ortamı)	22
Tablo 4.2 <i>F. baskilensis</i> Behçet bitkisinin soğanlarından elde edilen eksplantların, besi ortamlarına ekimlerinden itibaren ilk bir aylık süre içinde her on günde bir yapılmış ölçümler ile belirlenmiş, gelişme oranları (%3'lık sükroz ortamı)	53
Tablo 4.3 Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen bulgular	56
Tablo 4.4 Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen bulgular	57
Tablo 4.5 Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen bulgular	58
Tablo 4.6 Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen bulgular	59
Tablo 4.7 Sitokinin ve Sükroz Konsantrasyonlarında İndirekt Soğancık Oluşumu.....	61
Tablo 4.8 İndirekt Soğan Oluşumu Lojistik Regresyon Sonuçları.....	62
Tablo 4.9 Sitokinin ve Sükroz Konsantrasyonlarında İndirekt Sürgün Oluşumu	62
Tablo 4.10 İndirekt Sürgün Oluşumu Lojistik Regresyon Sonuçları	63
Tablo 4.11 Sitokinin ve Sükroz Konsantrasyonlarının Direkt Sürgün Oluşumuna Etkisi ..	64
Tablo 4.12 Direkt Sürgün Oluşumu Lojistik Regresyon Sonuçları	64
Tablo 4.13 Sitokinin ve Sükroz Konsantrasyonlarının Direkt Soğancık Oluşumuna Etkisi	65
Tablo 4.14 Direkt Soğancık Oluşumu Lojistik Regresyon Sonuçları	65
Tablo 4.15 Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda endirekt ve direkt organogenezle sürgün ve soğancık oluşumu görülen eksplantların köklendirme amacıyla hazırlanmış magentalardaki besi ortamlarına aktarılmalarının 30. ve 60. gününde yapılmış ölçümlerden elde edilmiş köklenme oranları.....	67
Tablo 4.16 Kök ve sürgün oluşumu görülen bitkiciklerin dış ortama (saksılara) aktarıldıktan sonra, 60 gün boyunca her 10 günde bir tespit edilen gelişme oranları	68

1. GİRİŞ

Türkiye, topoğrafya, iklim ve jeomorfolojik yönden geniş çeşitlilik göstermesinin doğal sonucu olarak, bitki genetik çeşitliliği bakımından önemli bir zenginliğe sahiptir. Avrupa ve Asya Anakaralarına yayılmış ortalama 78 milyon ha alanda toplam 12.476 takson bulundurmaktadır (Karagöz ve ark. 2010). Türkiye florasının önemi, sahip olduğu tür zenginliğinin yanında, çok sayıda endemik tür de içermesinden kaynaklanır (Ekim ve ark. 2000; Yaylaci ve ark. 2013). Diğer Avrupa ülkelerindeki endemik taksonların toplamı 2750 kadar iken, ülkemizde bu sayı 4.080 (Güner ve ark. 2000; Şahin ve ark. 2015; Yaylaci ve ark. 2013; Özhatay ve Kültür 2006) dir.

Dünyada toplam 165 türü bulunan *Fritillaria* cinsi Türkiye’de 48 takson ile temsil edilmektedir. Bu taksonlarından 27 takson endemik olup endemizm oranı %36.53’tir. Bu yüksek oran Türkiye florasının bu cinsin genetik çeşitliliğinin merkezi olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, *Fritillaria* cinsine ait türler tarımsal ve ekonomik açıdan yüksek öneme sahiptirler (Tekşen ve Aytaç 2008; TÜRKTAS ve ark. 2012).

Fritillaria cinsine ait türler morfolojik özellikleri ve çevreye karşı fizyolojik uyumları bakımından geniş bir varyasyon göstermekte, bu varyasyonun bir sonucu olarak yaygın bir şekilde soğanlı süs bitkisi olarak kullanılmaktadırlar (Tekşen ve Aytaç 2011).

Bazı *Fritillaria* türleri geleneksel Çin tıbbında öksürük giderici ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadırlar (Shujun ve ark. 2006). *Fritillaria* cinsine mensup bitkiler 1200–2000 m yükseklikler arasında yayılış göstermektedir.

İlk defa 1998 yılında Elazığ - Baskil ilçesinden toplanan ve bilim dünyasına yeni tür olarak kazandırılan *Fritillaria baskilensis* Türkiye’nin endemik ters lale türlerinden biridir (Behçet, 1998) . Şu ana kadar bilinen tek yaşam alanı tip örneğinin alındığı bu popülasyon olup, günümüze kadar başka kayıt bulunmamıştır. Bitki Baskil ilçesine bağlı Kuluşağı köyünde selil dağında iki tepenin alt kesimlerinde doğal popülasyonlar oluşturmakta olup, toplam olarak ortalama 20 dekar sayılabilecek bir alanda tek veya birkaç birey bir arada doğal olarak yetişmektedir. Soğanları 1.5 cm çapında ve küreseldir. Gövdesi 9-12 cm boyunda dik ve pürüzsüzdür. Mızrak şeklinde 4-5 yapraklı ve yaprak dizilişi alternattır. Çoğu zaman tek çiçek açar. Çiçeklenme dönemi Mart -Mayıs aylarıdır.

Soğanlı bitkiler doğal ortamda sınırlı sayıda bulunmakta, kaçak sökümler nedeniyle sürekli bir baskı altına bulunmaktadır. Nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan türlerin başında *Fritillaria* türleri gelmektedir. Gerek süs bitkisi olarak, gerekse de tıbbi amaçla kullanılan *Fritillaria* türlerinin Türkiye için ekonomik önemi oldukça fazladır. Türkiye'nin *Fritillaria* türleri bakımından çok zengin olduğu göz önünde tutulursa; bu türlerin toplanmaması ve doğada korunması ve generatif veya vejetatif yollarla çoğaltılma tekniklerinin araştırılması ve yetiştiriciliğinin geliştirilmesi gereklidir.

Fritillaria cinsine ait olan Baskil ters lalesi (*Fritillaria baskilensis*) nesli tükenme tehlikesi altında olan, estetik amaçla kullanılabilecek türlerden biridir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın 06.12.2012 tarih, 2012/77 tebliğ no ve 28489 sayılı Resmi gazetede yayımlanan tebliğinde doğada toplanmak suretiyle ihraç edilmesi yasak olan çiçek soğanları arasındadır.

Bu çalışmada bir geofit olan endemik baskil ters lalesi (*Fritillaria baskilensis*) 'nin *in vitro*da doku kültürü ile çoğaltılması amaçlanmıştır. *Fritillaria baskilensis* türüne ait soğan pul yaprağı parçaları kullanılarak direkt organogenesis, kallus oluşumu ve indirekt organogenesis elde edilecektir. Sürgün ve kök oluşumunun en iyi gerçekleştiği koşullar tespit edilmeye ve bitkinin rejenere bitkicik potansiyelleri belirlenmeye çalışılacaktır. Ayrıca bu ters lale türünün doku kültürüyle çoğaltılmasında en uygun eksplant tipi belirlenmeye çalışılacaktır. Bunun için bitkinin açmamış çiçek, bu çiçeklerin sapları ve bitkinin gövdesinden elde edilen parçalar eksplant kaynağı olarak kullanılacaktır. Yüzey sterilizasyonu işlemlerinde en iyi sterilizasyonu sağlamak için, literatür bilgileri de göz önüne alınarak çeşitli ön protokoller hazırlanacak ve farklı konsantrasyonlarda alkol, sodyum hipoklorit ve Tween 20 kullanılacaktır. Çalışmada besin ortamı olarak MS bileşimi ve değişik büyüme düzenleyicileri ve dozları (NAA, IAA, BA, Kinetin) kullanılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Türkiye Geofit Üretimi ve İhracatı

Doğal çiçek soğanlarının ihracatı 1875 yılından beri düzenli olarak yapılmakla birlikte, 1960'lardan itibaren ihracatı giderek artmış, 1984–85 yıllarında 84 milyon adete kadar çıkmış; daha sonra azalarak günümüze kadar gelmiştir. İhracatın büyük çoğunluğu Hollanda'ya, az miktarda Almanya, İngiltere, Japonya ve Danimarka'ya yapılmaktadır. Hollanda bizden aldığı soğanların büyük kısmını A.B.D.'ne ihraç etmektedir (Uluğ 1997).

Türkiye'nin soğanlı, yumrulu ve rizomlu bitki türlerinin satın alınmasında tercih edilen ülkelerden birisi olmasının ana nedeni bu materyalin doğada hazır olarak ve ucuz sağlanmasıdır. Bu olgunun yüzyılı aşkın bir geçmişe dayanması doğada onarılması çok zor bir tahribatın ve tür azalmasının nedeni olmuştur. Nitekim salep yapımında kullanılan Orchidaceae familyasına dâhil türler sürekli olarak doğadan sökülmesinden dolayı kaybolma tehlikesi ile karşı karşıya kalmışlardır. 1981–84 yılları arasında yürütülen iki TÜBİTAK projesinin sonuçlanmasından sonra bazı türlerin ihracatı yasaklanmış; bazı türlerde de üretime geçilmiştir. 1989 yılında bir yönetmeliğin çıkarılması, Doğal Çiçek Soğancıları Derneği'nin kurulması ile bu bitkilerin koruma önlemleri artırılmış, ihracatına sınırlamalar getirilmiştir. Bu arada dış ülkelerdeki çevre örgütlerinin girişimleri ile CITES heyetlerinin Türkiye'de yaptıkları incelemeler de etkili olmuştur. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından 1989 yılında çıkarılan yönetmelik 1991, 1995 ve 2005 yıllarında yeniden düzenlenerek yayınlanmıştır. Bu yönetmelikle ülkemiz florasının korunması, çiçek soğanlarının tahrip edilmeden ve tüketilmeden doğadan toplanması, üretilmesi, depolanması ve ihracatı konuları disiplin altına alınmıştır (Uluğ 1997).

Türkiye Cumhuriyeti Hükümeti CITES (Convention an International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: Nesilleri Tehlike Altındaki Doğal Bitki ve Hayvan Türlerinin Uluslararası Ticaretini Düzenleme Antlaşması)'e 1996 yılında taraf olmuştur. Ancak daha önce Türk bilim adamlarının girişimi ile *Galanthus*, *Cyclamen* ve *Eranthis* cinslerine giren türler CITES Ek II listesine alınmıştır. 2005'te geliştirilerek ve daha kapsamlı hale getirilen yeni yönetmeliğe göre Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı nezdinde oluşturan teknik komite her yıl ihracatı yapılan çiçek soğanlarının cins, tür, miktar, doğa

kontenjanı, söküm takvimini belirlemekte ve hazırlanan doğal çiçek soğanı ihracat listesi de her yıl ekim-kasım aylarında resmi gazetede tebliğ edilmektedir.

Bu listenin dışında teknik komitenin izni olmadan doğadan ticari amaçlarla çiçek soğanı toplayıp ihraç etmek yasaktır. Bu yönetmelik gereğince hazırlanan 2006 yılı doğal çiçek soğanları ihracat listesine göre, ihracat yasağı veya izni olan türler dikkate alınarak 3 grupta oluşturulmuştur (Tablo 2.1.). Bunlar;

1-Doğadan toplanarak ihracatı yasak olan doğal çiçek soğanları

2- İhracat kotayla sınırlandırılan doğal çiçek soğanları

3- Üretilme kaydıyla ihracatı serbest olan doğal çiçek soğanları

Tablo 2.1 2016 Yılı Doğal Çiçek Soğanlarının İhracat Listesi Tablosu

Doğadan Toplanmak Suretiyle İhraç Edilmesi Yasak Olan Çiçek Soğanları	İhracatı Kotaya Tabi Olan Çiçek Soğanları	Yıllık limit (Adet)		İhracatı Üretimden Serbest Olan Çiçek Soğanları
Tür ismi	Tür ismi	Doğa	Üretim	Tür İsmi
1. <i>Allium</i> (Yabani soğan) türlerinin hepsi	1. <i>Anemone blanda</i> (Yoğurt çiçeği)	4.000.000.	2.000.000	1. <i>Lilium candidum</i> (Miszambağı)
2. <i>Crocus</i> (Çiğdem) türlerinin hepsi	2. <i>Arum italicum</i> (Yılan yastığı)	50.000	300.000	2. <i>Iris tuberosum</i> (Süsen)*
3. <i>Fritillaria</i> türleri (<i>F. persica</i> , <i>F. imperialis</i> hariç)	<i>Arum dioscorides</i>	50.000	200.000	3. <i>Calla aethiopica</i> (Kalla)*
4. <i>Lilium</i> (Zambak) türleri (<i>L.candidum</i> ve <i>L. martagon</i> hariç)	3. <i>Cyclamen cilicium</i> (Sıklamen)	200.000	300.000	4. <i>Polyanthus tuberosa</i> (Sümbülteber)*
5. <i>Muscari</i> (Muskari) türlerinin hepsi	<i>Cyclamen coum</i> (Sıklamen)	700.000	250.000	5. <i>Fritillaria persica</i> (Adıyaman lalesi)
6. <i>Sternbergia</i> (Kara çiğdem) türleri (<i>S.lutea</i> hariç)	<i>Cyclamen hederefolium</i> (Sıklamen)	200.000	3.000.000	
7. <i>Tulipa</i> (Lale) türlerinin hepsi	4. <i>Dracunculus vulgaris</i> (Yılan bıçağı)	50.000	300.000	
8. <i>Eminium</i> türlerinin hepsi	5. <i>Eranthis hyemalis</i> (Sarı kar çiçeği)	2.000.000	1.000.000	
9. <i>Biarum</i> türlerinin hepsi				
10. <i>Nympheaceae</i>				

(Nilüfer) türlerinin hepsi	6. <i>Galanthus elwesii</i> (Toros kardeleni)	4.000.000	3.000.000
11. <i>Orchidaceae</i> (Salep) türlerinin hepsi	<i>Galanthus woronowii</i> (Karadeniz kardeleni)	3.000.000	2.000.000
12. <i>Arum</i> (Yılan yastığı) türleri (<i>Arum italicum</i> , <i>Arum dioscorides</i> hariç)			
13. <i>Pancratium maritimum</i> (Kum zambağı)	7. <i>Leucojum aestivum</i> (Göl soğanı)	-	6.000.000
14. <i>Hyacinthus orientalis</i> (Şark sümbülü)			
15. <i>Gentiana lutea</i> (Censiyan)	8. <i>Urginea maritima</i> (Ada soğanı)	50.000	10.000
16. <i>Cyclamen</i> (Sıklamen) türleri (<i>C. coum</i> , <i>C. cilicium</i> ve <i>C. hederefolium</i> hariç)	9. <i>Geranium tuberosum</i> (Deve tabanı)	500.000	400.000
17. <i>Galanthus</i> (Kardelen) türleri (<i>G. elwesii</i> ve <i>G. woronowii</i> hariç)	10. <i>Fritillaria imperialis</i> (Ters lale)	-	50.000
18. <i>İris</i> (Süsen) türleri	11. <i>Sternbergia lutea</i> (<i>Karaçiğdem</i>)	-	2.500
19. <i>Paeonia</i> (Şakayık) türleri			
20. Diğer yumrulu ve soğanlı türler			

* Üretimi yapılan egzotik türler.

Ülkemizin zengin florası içinde geofitler 26 cins ve 540 türle temsil edilmektedir (Güner ve ark. 2000). Bu türlerin yaklaşık 1/3'ü endemik olup hemen tamamından insanlar çeşitli şekillerde yararlanmaktadır. Bu bitkilerden 29 tür 41 taksonla temsil edilen *Fritillaria* türlerinin ayrı bir yeri ve önemi vardır. (Güner ve ark. 2012)

2.2. Liliaceae Familyası

Türkiye Florası'na göre 36 tür ve 7 alt tür ile temsil edilen *Fritillaria* L. cinsinin ait olduğu liliaceae familyası Monokotiledonae sınıfından bir familyadır. Dünyada yaklaşık 250 cins ve 3500 türle temsil edilen Liliaceae familyası çok yıllık (nadiren bir yıllık) otsu, genellikle rizomlu, soğanlı, yumrulu nadiren dikenli tırmanıcılardır. Yaprakları tabanda

veya gövdededir. Bazen körelmiş olup gövdede pul, ovat veya linear kladotlar şeklindedir. Çiçek durumu panikula, raşem, umbel, korimboz veya tek çiçek halindedir. Perigon 2 seri halinde, tepaler (4-) 6 (-8) adet, serbest veya tabanda birleşik, genellikle parçalar birbirine benzerdir. Stamenler (3-) 6 (-10) adettir. Nektaryumlar septumda, tabanda veya perigonun üzerindedir yada bulunmaz. Ovaryum üst durumlu, 3-bölmelidir. Ovuller çok sayıda ve her lokulusta iki sıra halinde dizilmiştir. Stilus 1-3, nadiren 5, basit veya lobludur. Stigma genellikle 3 veya 1 tane olup 3 lobludur. Plasentasyon aksillardır. Meyve septisit veya lokulusid kapsül veya bakkadır. Tohumlar çok sayıda, yuvarlak, üç köşeli veya disk şeklinde ve endospermlidir. Endosperm yağlıdır. Tohumlar kanatlı (örneğin; *Lilium* L.) veya kanatsız olabilir. Embriyo klorofilsizdir (*Fritillaria* ve *Tulipa* L.). Testa kahverengi ve açık kahverengidir. Tozlaşma böcekler ile olmaktadır (Davis 1965; Heywood 1978; Tekşen ve Aytaç 2011; Watson ve Dallwitz 1999; Choe 2003)

Fritillaria cinsinin yer aldığı Liliaceae familyası Dünyada yaklaşık 250 cins ve 3500 tür ile temsil edilirken, Türkiye’de 44 cins ve 426 tür ile temsil edilir. Kozmopolit bir familya olup daha çok tropikal ve ılıman bölgelerde doğal yayılış gösterir. Familya tıbbi türleri, önemli süs bitkilerini içermekte ve bazı türleri de gıda maddesi olarak kullanılmaktadır. Liliaceae familyası endemizm oranı yüksek bir familyadır. Yurdumuzda familyanın 227 türü endemiktir. Liliaceae familyası üyeleri süs bitkisi (lale, sümbül, zambak ve ters lale) ve sebze (soğan, pırasa ve sarımsak) olarak kullanılabildiği gibi içerdikleri kimyasal maddeler nedeniyle tıbbi bitki olarak ta kullanılabilmektedirler (Heywood 1978).

2.3. *Fritillaria* Cinsinin Taksonomik tarihi

Fritillaria cinsinin 1753 yılında ilk tanımlanan türleri *F. imperialis* L., *F. persica* L., *F. pyrenaica* L., ve *F. meleagris* L.’dir. Bunlardan *F. imperialis* ve *F. persica* Türkiye’de de yetişmektedir (Marshall 1988). Bu cinsin özellikleri ilk olarak 1754’te Linnaeus’un *Genera Plantarum* adlı eserinde verilmiştir. Bu eserde Linnaeus, *Petilium* L. ve *Corona* Fisch et R. Grah cinslerini *Fritillaria*’nın sinonimi olarak belirtmiştir (Linnaeus. 1960). *Fritillaria* ile ilgili ilk önemli çalışma Baker’e aittir (Baker 1874). Baker 1874 yılında *Petilium*, *İmperialis* Adans, *Ambrilion* Rafin, *Theresia* K. Koch, *Rhinopetalum* Fisch., *Sarana* Fisch., *Liliorhiza* Kellogg, *Monocodon* Salisb., *Lyperia*

Salisb., *Eucrinium Neuttall*, *Notholirion Wall.*, *Tozzettia Parl* ve *Korolkovia Regel* cinslerini *Fritillaria*'nın sinonimi olarak vermiş ve bu cinsi 10 altcins uyarlamıştır. Boissier 1884 yılında Flora Orientalis'de *Petillum*, *Rhinopetalum* ve *Theresia* cinslerini *Fritillaria*'nın sinonimi olarak vermiş, seksiyon ve seriler şeklinde bir sınıflandırma yapmıştır (Rønsted ve ark. 2005). 1968 yılında Rus florasında *Fritillaria* cinsini yazan A. Lozina-Lozinskaya da *Amblirion*, *Corona*, *İmperialis* ve *Monocodon* cinslerini sinonim olarak belirlemiş *Korolkovia* ve *Rhinopetalum*'u ayrı cinsler olarak değerlendirerek sınıflandırmayı seksiyon ve seriler şeklinde yapmıştır (Komarov 1968). Daha sonra Rix, *Fritillaria*'lar üzerinde 1975 ve 1979 yıllarında yoğun çalışmalar yapmış (Rix 1975, 1979) ve Türkiye Florası'nda bu cinsi yazmıştır (Davis 1965). 1998'de Khaniki, *Fritillaria*'nın sinonimi olan *Rhinopetalum* cinsinin nektaryum özelliklerinden dolayı farklı bir cins olduğunu belirtmiştir (Bakhshi Khaniki 1998). 2001 yılında Rix tarafından hazırlanan dünyadaki *Fritillaria* türlerinin listesinde *Fritillaria* altcins, seksiyon ve seriler şeklinde sınıflandırılmıştır (Rix 2001). *Rhinopetalum* ve *Korolkovia* cinsleri Rix tarafından *Fritillaria* cinsinin altcinsi olarak değerlendirilmiştir.

Fritillaria cinsi üzerine farklı alanlarda çalışmalar yapılmıştır. Rusya'da Kosenko (Kosenko 1991b, 1991a, 1992, 1999), Schulze (Schulze 1980) ve Türkiye'de (Özler 2001) tarafından *Fritillaria* cinsinin polen özellikleri incelenmiştir. Zaharof (Zaharof 1989b, 1989a), Kamari (Kamari 1991), Khaniki (Khaniki 1995; Khaniki 1997; Khaniki 1998) Schweizer (Schweizer 1973), Başak (Basak 1991) ve La Cour (La Cour 1978) bu cinsin çeşitli türlerinin karyolojisi üzerine çalışmışlardır. *Fritillaria* cinsi üzerinde özellikle Çin'de moleküler çalışmalar yapılmaktadır (Cai ve ark. 1999; Bian ve ark. 2000; Li ve ark. 2003). Bei Mu adlı ilacın elde edildiği *Fritillaria* türlerinin soğanlarını kullanarak moleküler incelemeler yapılmıştır. Bazı türlerin içerdikleri alkaloidler (Akhtar ve ark. 2003; Akhtar ve ark. 2002; Li ve ark. 1999; Lin ve ark. 2001; Farooq ve ark. 1994; Bingöl 1997) ve tıbbi alanda kullanımları ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır.

2.4. *Fritillaria* Cinsinin Genel Özellikleri

Alem: Plantae- Bitkiler

Altalem: Tracheobionta- Tracheopyta (Damarlı Bitkiler)

Üstbölüm: Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)

Bölüm: Magnoliophyta (Çiçekli Bitkiler)
Sınıf: Liliopdisda- Monocotyledonae (Tek çenekliler)
Altsınıf: Liliidae
Üstordo: Liliiflorae
Ordo: Liliales
Familiya: Liliaceae- Zambakgiller
Altfamiliya: Lilioideae
Tribus: Lilieae
Cins: *Fritillaria*

Fritillaria ismi Latince zar kutusu anlamına gelen fritillus kelimesinden gelmektedir. *Fritillaria* cinsi soğanlı ve çok yıllıktır. Soğan, globoz, ovat, obovat, iğ şeklinde, nadiren birleşmiş iki böbrek tanesi şeklinde; az sayıda pul ve genellikle soğanın büyümesiyle görünmeyen ince, şeffaf bir tunikaya sahiptir. Taban yaprağı, gövde oluşmadan önce veya nadiren çiçeklenmeden önce kurur. Gövde dik; basit; yapraklı; tabanda ve alt yaprakların etrafında papillalı veya düzdür. Yapraklar vertisillat, opozit veya alternattır; brakte yaprakları çoğunlukla tek veya 2 ya da 4'lüdür. Çiçek tek veya çiçeklenme durumu umbel ya da raşemdir. Perigon genellikle aşağı doğru dönüktür. Perigon kampanulat, konik veya tabak şeklinde; tepaller düz renk veya mozaik taşları gibi renkli ve bazen de boyuna çizgilidir. Nektaryumlar belirgin olup tabanda veya tepallerin bükülme noktasında bulunur. Filamentler bazifiks, papillalı veya düz. Stilus bölünmemiş, 3- parçalı veya uçta 3- loblu; yüzeyi papillalı veya düz; dökülücüdür; stigma düz veya klavattır. Meyve lokulisit kapsül, kapsül dik, oblong, ovat, obovat, ovat-lanseolat, tabanı kuneat, bazen saplı, tepesi trunkat, bazen boyuna 6 kenarlıdır. Tohumlar çok sayıda, her bölmede iki sıra halinde dizilmiş, yassı, orbikular ile ovat arasında değişik şekillere sahiptir (Ozler ve Pehlivan 2007; Rushden 1993).

Türkiye Florası'nda Liliaceae familyasının 23. cinsi ile temsil edilmektedir. *Fritillaria*, *Lilium*, *Tulipa* ve *Erythronium* L. birbirine yakın olan cinslerdir.

2.5. *Fritillaria* Cinsinin Doğal Yetiştirme Ortamları

Fritillaria cinsine ait türler kalker kayalıklar, taşlık alanlar, tarlaıçi, tarla kenarları, taşlı tarlalar, çayırılık alanlar, sulu çayırlar, yol kenarları, *Pinsu* L., *Juniperus* L., *Cedrus* Link ormanları, dökülücü *Quercus* L. ormanları, orman açıklıkları, *Quercus coccifera* L.

makilikleri, çalılıklar, dağlık step, Umbelliferae ve Astragalus L. stepleri, serpantin alanlar, denize yakın kayalık ve kumlu alanlar, karın yeni kalktığı yerler, gevşek yamaçlar gibi çok farklı habitatlarda bulunabildiği gibi benzer kültür alanlarına da çok iyi bir şekilde adapte olur. Deniz seviyesinden 3500 m'lere kadar yayılış gösterir. Çiçeklenme zamanı Şubat ve Temmuz ayları arasındadır.

Fritillaria türlerinin soğanları ince bir tunika içerir. Böylece yaz aylarındaki aşırı kuraklığa karşı savunma mekanizması geliştirmiştir. Yaz kuraklığı başlamadan önce çiçeklenme ve tohum verme periyodunu tamamlar. *Fritillaria* soğanları ilkbahar mevsiminde kısa bir süre içerisinde besin maddesi depolar ve kışı ılık ve yağışlı yazı sıcak ve kuru olan Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü bölgeleri tercih eder.

2.6. *Fritillaria* Cinsinin Dünya Üzerinde Yayılışı

Dünyada 139 tür, 17 alttür ve 9 varyete olmak üzere toplam 165 taksonla ifade edilen *Fritillaria* cinsi Avrupa, Orta Doğu ve Merkezi Asya ve Kuzey Amerika'nın batısında yayılış göstermektedir (Rix 2001) (Şekil 2. 9). *Fritillaria* cinsinin tür sayısı açısından ülkemiz ve diğer bazı ülkelerle karşılaştırılması Tablo 2. 3 'de verilmiştir (Komarov 1968; Naqinezhad ve Mehrvarz 2007; Tutin ve ark. 1964; Feinbrun-Dothan 1986; Tosheva ve Traykov 2013; Konchar ve ark. 2011; Pignatti 1982; Donner 1990). Bu cins Türkiye'de 36, Yunanistan'da 25, Rusya'da 22, Çin'de 24, İran'da 18 ve Kaliforniya'da 20 tür ile temsil edilmektedir. Ayrıca Bulgaristan'da 6, İtalya'da 4, İspanya'da 3, Lübnan, Suriye, Portekiz, Afganistan'da 2'şer tür, İsrail ve Pakistan'da 1'er tür ve Afrika kıtasında 1 tür bulunmaktadır.

Ülkelerin içerdiği tür sayılarına bakıldığında *Fritillaria* cinsinin en fazla türle Türkiye' de temsil edildiği görülmektedir. Amerika kıtasında Kaliforniya, Avrupa kıtasında Yunanistan, Asya'da Türkiye ve Çin'de tür sayılarının diğer ülkelere göre fazla ve cinsin bu ülkelerde farklı türler ile temsil edildiği görülmektedir. Farklı bölgelerde farklı türlerle temsil edildiği ve kesintili yayılış gösterdiği için bu cinsten üç gen merkezinden söz edilebilir;

Birinci gen merkezi, Kaliforniya,

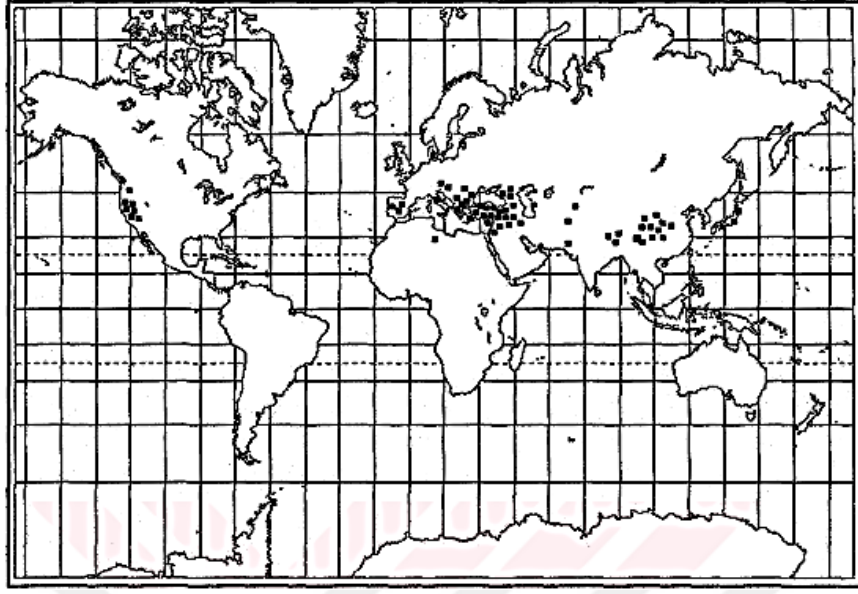
İkinci ge merkezi, Yunanistan ve Türkiye,

Üçüncü gen merkezi, Çin'dir.

Tablo 2.2 *Fritillaria* cinsinin tür sayısı açısından farklı bölgelerdeki ülkelerle karşılaştırılması

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

Fritillaria cinsinin dünya üzerindeki dağılımı Şekil 2.1.'de görülmektedir. Bu haritaya göre dünyadaki yayılış itibariyle Holoarktik aleme ait bir cinstir. Bu alemin Tetis altalemnin Akdeniz ve İran-Turan, Boreal altalemnin Avrupa-Sibirya ve Doğu Asya, Madrean altalemnin Madrean fitocoğrafik bölgelerinde yayılış gösterir. Holoarktik alemin ılıman iklimi, özellikle Akdeniz iklimine sahip 30° ve 40° enlemleri arasında yayılış gösterdiği görülmektedir (Rix 2001).



Şekil 2.1 *Fritillaria* cinsinin dünya üzerindeki yayılışı

2.7. Türkiye'deki *Fritillaria* Türleri

Türkiye Florası'nın 11. cildi itibariyle Monocotyledonae içerisinde *Fritillaria* (36 tür ve 43 Tür ve tür altı takson), *Allium* (160 tür ve 184 tür ve tür altı takson), *İris* (40 tür ve 47 Tür ve tür altı takson) ve *Crocus* L. (36 tür ve 63 tür ve tür altı takson)'dan sonra en fazla tür içeren 4. cinstir (Duran ve Duman 2002; Guner ve ark. 2000; Yıldırım 1988)



Şekil 2.2 *Fritillaria imperialis*

Fritillaria cinsinin Türkiye'deki yayılışı Şekil 2.12' de verilmiştir (Duran ve Duman 2002; Güner ve ark. 2000) Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi içerdikleri tür sayısı bakımından *Fritillaria* cinsinin en yoğun olduğu bölgelerdir. En az tür Karadeniz, Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu bölgelerinde bulunmaktadır. Tür sayısı açısından en

zengin iller ise Muğla, Antalya, İçel, Kahramanmaraş, Hatay, Erzurum, Van ve Hakkâri'dir. Türkiye Florası'nda Akdeniz fitocoğrafik bölgesi 21, İran-Turan fitocoğrafik bölgesi 17, Avrupa-Sibirya fitocoğrafik bölgesi ise 4 tür ve türaltı seviyede takson ile temsil edilmektedir.

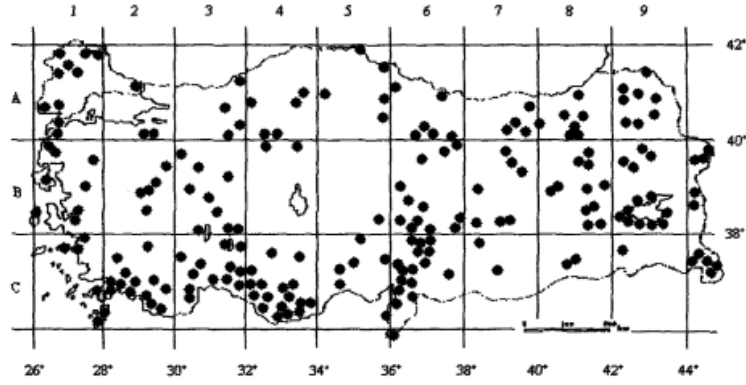


Şekil 2.3 Mersin kökenli *F. persica* bitkisi

Türkiye Flora'sının 8. Cildine göre 31 tür ile temsil edilen *Fritillaria* cinsinden 1987 yılından beri beş yeni tür (*Fritillaria kittaniae* Sorger (Tan ve McBeath 1987), *Fritillaria sororum* J. Persson ve K. Persson (Persson ve Persson 1998), *Fritillaria baskilensis* Behçet (Behçet 1998), *Fritillaria pelineae* Kamari, *Fritillaria byfieldii* N. Özhatay ve Rix (Guner ve ark. 2000) ve bir alttür (*Fritillaria sibthorpiana* (Smith) Baker subsp. *enginiana* Byfield ve N. Özhatay (Ozhatay ve Byfield 1995)) tanımlanmıştır. Yeni türler Türkiye Florası'nın 2000 yılında yayınlanan 11. cildinde verilmiştir.



Şekil 2.4 Siverek kökenli *F. persica* bitkileri



Şekil 2.5 Fritillaria Cinsinin Türkiye’deki yayılışı

Tablo 2.3 TÜBİTAK-Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı’na göre Türkiye’de bulunan *Fritillaria* tür ve alttür taksonları

<i>F. acmopetala</i> Boiss.	<i>F. acmopetala</i> Boiss. subsp. <i>Acemopetala</i>
* <i>F. acmopetala</i> Boiss. subsp. <i>wendelboi</i>	* <i>F. alburyana</i> Rix
<i>F. alfredae</i> Post	* <i>F. alfredae</i> Post subsp. <i>Glaucoviridis</i>
<i>F. alfredae</i> Post subsp. <i>platyptera</i>	* <i>F. armena</i> Boiss.
<i>F. assyriaca</i> Baker	<i>F. assyriaca</i> Baker subsp. <i>Assyriaca</i>
* <i>F. assyriaca</i> Baker subsp. <i>melananthera</i>	* <i>F. aurea</i> Schott
Rix	
* <i>F. baskilensis</i> Behçet	<i>F. bthynica</i> Baker
* <i>F. byfieldii</i> N. Özhatay & Rix	<i>F. carica</i> Rix
<i>F. carica</i> Rix subsp. <i>carica</i>	* <i>F. carica</i> Rix subsp. <i>Serpenticola</i>
<i>F. caucasica</i> J. F. Adam	<i>F. crassifolia</i> Boiss. & Huet
* <i>F. crassifolia</i> Boiss. & Huet subsp. <i>Crassifolia</i>	<i>F. crassifolia</i> Boiss. & Huet subsp. <i>Hakkarensis</i>
<i>F. crassifolia</i> Boiss. & Huet subsp. <i>kurdica</i>	* <i>F. elwesii</i> Boiss.
* <i>F. fleischeriana</i> Steudel & Hochst ex Schultes & Schultes fil.	* <i>F. forbesii</i> Baker
<i>F. hermonis</i> Fenzl	<i>F. hermonis</i> Fenzl subsp. <i>Amana</i>
<i>F. imperialis</i> Linnaeus	* <i>F. kittaniae</i> Sorger
<i>F. latakiensis</i> Rix	<i>F. latifolia</i> Wild.
* <i>F. michailovskyi</i> Fomin	* <i>F. minima</i> Rix
* <i>F. minuta</i> Boiss & Noe	<i>F. persica</i> Linnaeus
<i>F. pinardii</i> Boiss.	<i>F. pontica</i> Wahlenb.
<i>F. rhodia</i> A. Hansen	<i>F. sibthorpiana</i> (Sm.) Baker
* <i>F. sibthorpiana</i> (Sm.) Baker subsp. <i>enginiana</i> Byfield & N. Özhatay	. * <i>F. sororum</i> Jim. Perss. & K.M. Perss.
<i>F. straussii</i> Bornm.	<i>F. stribnyi</i> Velen.
<i>F. uva-vulpis</i> Rix	<i>F. viridiflora</i> Post
* <i>F. whittallii</i> Baker	* <i>F. zagrica</i> Stapf

(*) ile işaretli olanlar endemik taksonlardır.

Fritillaria türleri arasında tam endemik olanlar bulunmakta, ancak çiçeklerinin süs bitkisi olarak kullanılabilmesi potansiyeline sahip olan yarı endemik iki türü *Fritillaria imperialis* ve *Fritillaria persica*'nın ticari önemi bulunmaktadır. Geofit bitkileri içinde en gösterişli ve güzel türlerden birisi *F. imperialis*, Şemdinli lalesi, ters lale, ağlayan gelin, Hakkâri lalesi, Şahtuğu ve Tuğu Şahi kral tacı olarak ta bilinmektedir. *Fritillaria persica* türü ise Adıyaman ili ve çevresinde doğada sıkça bulunduğundan bu bitkiye de Adıyaman lalesi veya karagöz lalesi adı verilmektedir. Bazen her iki türe birden ağlayan gelin olarak genel bir isim verildiğine de rastlanabilmektedir. Avrupa ülkelerinde park ve bahçelerde, tarihi mekânların bahçelerinde kullanılan türler olmasına karşılık, *Fritillaria* türleri ülkemizde henüz süs bitkisi olarak yeterince tanınmamakta ve kullanılmamaktadır. Buna karşılık ihraç potansiyeli yüksek türlerdir.

Fritillaria imperialis L., en eski süs bitkilerinden birisi olup, Osmanlılar zamanında lale, nergis, sümbül kadar popüler bir bitki olmuştur, 1554-55 yıllarında lale ile birlikte veya bundan hemen sonra yıllarda Avrupa'ya götürülmüştür. 1576 yılında Viyana'da saray bahçesinde çiçek açtığı; *Fritillaria persica* L.'nin ise 1570 yılında Avrupa'ya gönderildiği ve 1583 yılında çiçek açtığı belirtilmektedir. Rix ve Phillips (Rix ve Phillips 1981), Avrupa'da 16.yy'dan beri kültürü yapılmakta olan *Fritillaria imperialis* L.'in İstanbul'dan Viyana'ya getirildiğini, oradan da Hollanda ve İngiltere'ye yayıldığını rapor etmiştir.



Şekil 2.6 Selimiye camisinde Ters lale motifi

Fritillaria 400 yıl önce Türk bahçelerinin çok kıymetli bitkilerinden birisiydi ve I.Selim zamanında en çok sevilen bitki türlerindendi (GENÇER, EROĞLU, ve Ufuk 2009). Zaman içerisinde unutilan ve eski önemini yitiren bitki, 1960'lı yıllarda Adıyaman'da Ali Deniz tarafından yeniden fark edilmiş ve bunun ardından doğadan sökülerek ihraç edilmeye başlamıştır.

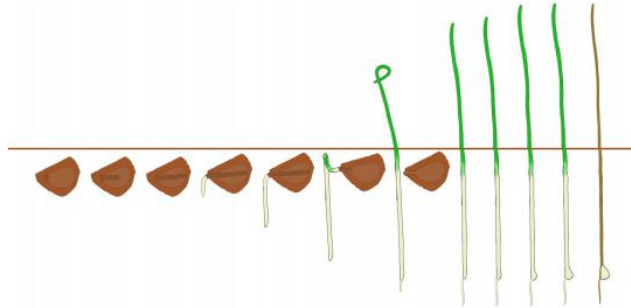
Fritillaria imperialis L., Doğu ve Güneydoğu Anadolu, Irak, Afganistan, İran ve Kuzey Hindistan'ın dağlık bölgelerinde doğal olarak yetişmektedir. *Fritillaria imperialis* L.'e Van'da Ters Lale, Hakkâri'de Gülnahun denilmektedir. Bazı yerlerde Şerefeli Lale de denilen bu bitkiye Ağlayan Gelin denilmesinin nedeni, çiçeklerinin dip kısımlarındaki gözyaşına benzeyen nektar bezlerinden kaynaklanmaktadır. *Fritillaria persica* L. Anadolu, Filistin, Ürdün, Suriye, Irak ve İran'da doğal yayılış gösteren bir türdür (Arslan ve Gümüşçü 2002). Adıyaman lalesi olarak adlandırılan bu bitki, birçok kaynaktan, *F. persica* L. cv. Adıyaman olarak da anılmaktadır.

2.8. *Fritillaria* Türlerinin Çoğaltılması

Toprakaltı özelleşmiş gövde yapısı bakımından soğanlı bitkiler grubuna giren bu bitkinin çoğaltımı, hem vejetatif hem de generatif yolla yapılabilir.

2.8.1. Generatif Çoğaltım

Tohum ile üretim tekniğidir. Çiçeklenmeden sonra olgunlaşan tohumlar toplanarak hemen ekilebileceği gibi uygun koşullarda tohum ekim zamanına kadar bekletilebilir. Tohumları kapsül içerisine dizilmiş ince pullar biçiminde olan *Fritillaria* türlerinde çimlenme yönüyle herhangi bir sorun bulunmamakla birlikte, çok küçük fideciklerden bitkilerin gelişmesi ve bunlardan çiçek açacak büyüklükteki bitkilere ulaşmaya kadar yaklaşık 6 yıl geçmektedir.



Şekil 2.7 *Fritillaria* türlerinde tohumla çoğaltım aşamaları

Bu nedenle ticari üretim düşünüldüğünde kısa sürede çok sayıda yeni üretim materyalinin elde edilebilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca genetik olarak açılım ve varyasyon çok geniştir. Çiçek renkleri, bitki boyu, çiçek açma zamanı, çiçek şekli gibi süs bitkisi yetiştiriciliğinde ilk sırada düşünülmesi gereken özellikler, açılım nedeniyle tohumdan yetiştirilen bitkiler arasında geniş bir varyasyon gösterecektir.

Tohumla çoğaltımın, genetik varyasyon ortaya çıkması nedeniyle olduğu kadar çiçeklenme aşamasında bir bitki elde edilmesine kadar geçen sürenin uzun olması nedeniyle ticari bitki çoğaltımında tercih edilmesi mümkün görülmemektedir.

2.8.2. Vejetatif Çoğaltım

Fritillaria türlerinde soğanlardan yapılan vejetatif çoğaltım, şu anda bilinen ve uygulanan en etkin yöntemdir. Soğan, değişikliğe uğramış özel bir toprakaltı organı olup, çoğunlukla dikey duran tepesinde bir büyüme konisi veya bir çiçek taslağı bulunan, etli yaprak pullarına sahip bir gövde ekseninden ibarettir. Bu etli pullar özellikle karbonhidratlar bakımından önemli bir besin deposudur.

Soğanın merkezinde ya vejetatif büyüme konisi veya uzamış bir çiçek sapı bulunur. Büyüme konileri gelişen pulların koltuğunda yavru soğancıklar oluşur. İlkbaharda çiçeklenen soğanlarda, gelişmenin vejetatif devresinde önce soğanın gelişmiş bazı pulların koltuğunda soğancık oluşumu meydana gelir ve bu oluşum soğanın iç kısmında olduğundan dışarıdan gözlenemez. *Fritillaria*'lar da da aynı durum söz konusudur ve yaz boyunca soğan içinde çiçek sürgünlerinin farklılaşması olur.

Genel olarak soğanlar, kabuk yapısına sahip olup olmamalarına göre ikiye ayrılmaktadır. Yemeklik soğan ve lale soğanlarının da yer aldığı kabuklu (tunikli, laminalı) soğanlarda dış pullar, kuru ve membranlıdır. Pullar üzerindeki bu kabuk, soğanı mekanik zararlardan ve kurumaktan korumaktadır. Zambak soğanlarının da içinde bulunduğu diğer bir soğan grubu da tuniksiz (pullu) soğanlardan oluşmaktadır. Bu gruptaki soğanlarda, soğanın bütün yüzeyini kaplayan tek parçadan ibaret kabuk yoktur. Pullar ayrı ayrı olup, soğana balık pulu gibi görünüş verir. *Fritillaria* soğanları da tuniksiz soğan grubuna girmektedir. *Fritillaria* türlerinde soğanlar 2 ya da 3 etli soğan yaprağından (pul) meydana gelir ve soğanlarda kabuk bulunmaz (Ulus ve Seyidoğlu 2006).

Vegetatif yolla çoğaltmada kullanılan teknikleri yedi grup altında toplayabiliriz. Bunlar;

1. Yavru soğanlar ile üretim,
2. Yumru, rizom ve soğanımsı yumruların bölünmesiyle üretim,
3. Koltukaltı yavru soğanlar ile üretim,
4. Soğan pulları ile üretim,
5. Parçacık ve ikiz pul ile üretim,
6. Soğan tabanın kesilmesi ile üretim
7. Doku kültürü ile üretim teknikleri

Bu yöntemlerden *Fritillaria* türlerinin çoğaltılmasında kullanılanlar;

2.8.2.1. Yavru Soğanlar İle Üretim

Vegetatif üretim yöntemleri içinde en çok kullanılanıdır. Bu yöntemde, büyüme mevsiminde ana soğanların yanında oluşan yavru soğanlar üretimde kullanılır. Ana soğana bitişik yavru soğanlar fizyolojik faaliyetlerin minimuma indiği (dormansi durumu), yaprakların sararıp kuruduğu dönemde topraktan çıkarılıp, ana soğandan ayrılır. Büyüklüklerine göre sınıflandırılarak hazırlanan dikim yerlerine çiçeklenme iriliğinde soğan elde etmek amacıyla dikimleri yapılmaktadır. Ana soğandan elde edilen yavru soğan miktarı, bitkinin türü, üretim yapılan bölge, ana soğanın büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir.

Genellikle *Fritillaria* (Ters lale), *Galanthus* (Kardelen), *Leucojum* (Göl soğanı), *Narcissus* (Nergis), *Iris*, *Lilium* (Zambak), *Tulipa* (Lale) gibi cinslerde uygulanmaktadır. Bu yöntemle çiçek meydana getirebilecek büyüklükte soğan elde etmek için genellikle 1–3 yıl gereklidir.

2.8.2.2. Soğan Pulları İle Üretim (Scaling)

14. yy.'dan beri bilinen bu teknik, soğandan koparılan her pulun dikilerek yeni bitki elde edilmesi yöntemidir. Pullama olarak da adlandırılan bu yöntem, genellikle *Lilium* türlerinin üretilmesinde kullanılır. Soğan pulu soğan tabanında kök bölgesi içerecek

şekilde ayrılır ve hastalıklara karşı fungusitle ilaçlandıktan sonra dikilirler. En dıştaki buruşmuş ve suyunu kaybetmiş pullar kullanılmaz.

Dıştan içe doğru ilk iki veya üç sıra soğan pulu kullanılması tavsiye edilmektedir. Her bir pulun dip tarafında adventif soğancıklar meydana gelir. Genellikle her bir puldan 3–5 soğancık elde edilmektedir. *Lilium* türleri dışında, *Hyacinthus*, bazı *Fritillaria* türleri, *Muscari* ve *Scilla* 'larda da uygulanmaktadır (Rees 1992; Aksu ve ark. 2002; Ulus ve Seyidoğlu 2006).

2.8.2.3. Parçacık (Dilimlere Ayırma - Chipping) ve İkiz Pul (Twin-Scaling) İle Üretim

Soğanı dilimlere ayırma (parçacık - Chipping) yöntemi, büyük miktarlarda soğan elde etmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bir soğanı eşit büyüklükte parçalara ayırmak amacıyla yapılan diklemesine kesme işlemidir. Soğanın bazal plakasının meristematik bölümünden yararlanmayı, yani hücre bölünmesi yolu ile soğancık üretilmesinden faydalanmayı sağlamaktadır.

Genellikle *Galanthus*, *Fritillaria*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Chionodoxa*, *Nerine*, *Scilla*, *Sternbergia* gibi cinslerde uygulanmaktadır. Çiçeklenme büyüklüğündeki iyi bazal plaka oluşturan tercihen yuvarlak soğanlar materyal olarak seçilmelidir.

2.8.2.4. Soğan Tabanının Kesilmesi İle Üretim

Bu üretim tekniği için çevre büyüklükleri daha fazla olan, sağlıklı, çok iyi bazal plaka içeren soğanlar kullanılır. Çapraz kesim, soğanda merkez çıkarma ve soğan tabanının oyulması şeklinde iki farklı yöntemle yapılır.

- Çapraz kesim (cross cutting);
- Soğanda merkez çıkarma ve soğan tabanının oyulması (scoopimg).

2.8.2.4.1. Çapraz kesim (cross cutting):

1930'lu yıllardan beri kullanılan bu yöntemdir. Bu yöntemde ilk önce soğan tabanındaki kökler uzaklaştırılır ve soğanlar kurumaya bırakılır. Soğanlar kuruduktan sonra, soğan tabanında keskin bir bıçak ile soğan büyüklüğüne göre, 3 veya 4 çapraz kesim yapılır. Kesim soğan tabanının ayrılabilceği şekilde yapılmalıdır. Bu şekilde hazırlanan soğanlar, kesim kısımları yukarıya gelecek şekilde 25 °C de tutulurlar. Kesim yapılan yere kum serpiştirilir ve bununda üzeri 5 cm kalınlığında kum ile kapatılır. Yaklaşık 1 hafta sonra kesim yerinde ince bir mantar tabakası oluşmuştur ve soğanlar sökülerek sağlıklı olup olmadıkları kontrol edilir ve kesim yerleri aşağıya gelecek şekilde 20–32°C de 2.5–3 ay üretim odalarında dikilerek yavru soğancık oluşumu sağlanır. Yavru soğancıklar ana soğanlarla birlikte açık alana dikilirler. İlk yıl ana soğan parçalanıp dağılır, daha sonraki yıllarda yavru soğanların büyütülür, yavru soğanlar her yıl sınıflandırmaya tabii tutularak çiçek verme büyüklüğünde olanlar ayrılmaktadır (Aksu ve ark. 2002; Ulus ve Seyidoğlu 2006).

2.8.2.4.2. Soğanda merkez çıkarma ve soğan tabanın oyulması (scooping):

Soğan dip kısmının oyulması, 19.yy'da geliştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, yapraklar sarardıktan sonra toplanan iri ve olgun soğanlar, öncelikle 25°C'de depolanırlar. Depodan çıkarılan soğanlar temizlenerek ilaçlanır ve kurutulur. Daha sonra soğanların kökleri kesilerek, kaşık veya bıçak ile soğanın taban kısmı çıkarılır. Bu kesim soğan pulları ile soğan tabanının birleştiği sınırdan yapılır. Bu şekilde hazırlanan soğanlar, birkaç hafta kesim yerleri yukarıya gelecek şekilde, daha sonra düz olarak depoda tutulurlar. Soğan tabanındaki yara yerlerinden yavru soğanlar meydana gelmektedir. Bu yöntem *Hyacinthus* ve *Muscari* ve *Scilla* da uygulanmaktadır.

Merkez çıkarmada ise, soğanın merkezinde bulunan büyüme konisi çıkarılır. Soğanın büyüme potansiyeli soğanın bazal plakasında oluşacak yavru soğanlara yönlendirilmiş olur. Merkez çıkarma işlemi yapıldıktan sonra kesimlerde uygulandığı gibi önce soğanlar kesim yeri yukarıya, daha sonra aşağıya gelecek şekilde depoda tutulurlar. Bu yöntem *Hyacinthus* ve *Fritillaria*'larda uygulanabilmektedir.

2.8.2.5. Doku Kùltürü Yöntemiyle Çoğaltım

Bitki doku kùltürü; kontrol edilebilen ışıık ve sıcaklık koşulları altında kùltür kapları içerisinde, yapay besin ortamında bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir.

Doku kùltürü ile üretim, geleneksel üretim yöntemlerinden, biyolojik komponentlerin sistemde ayrılması, her rejenerasyon ve gelişme sürecinde yüksek düzeyde kontrol olanağının bulunması açısından farklılık göstermektedir. Bu yöntem önceleri bilimsel çalışmalarda ve araştırmalarda kullanılmış, daha sonra pratik anlamda üreticiler tarafından benimsenmiştir.

Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak, hem çok sayıda bitki üretimini zamandan, yerden ve anaçlık bitki materyalinden tasarruf ederek gerçekleştirmek hem de virüsten ve hastalıklardan arı, yüksek kalitede bitki yetiştirme olanağı sağlamak doku kùltürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde de doku kùltürü yöntemleri uygulanmaktadır. Bitki doku kùltürü ile üretim birçok bitkide olduğu gibi, geofitlerde de diğer vegetatif üretim teknikleri ile başarısız olunan türlerin çoğaltılmasını sağlamak, çok sayıda ve yüksek kalitede bitki edilmesine imkân sağlaması açısından tercih edilebilmektedir (Rees 1992; Ulus ve Seyidoğlu 2006; Babaoğlu, Gürel, ve Özcan 2001).

Doku kùltürü yönteminin başarıyla uygulandığı familyalar ve bunlara ait cinsler Tablo 2.4. 'de gösterilmektedir.

Tablo 2.4 Doku Kùltürü Yöntemiyle Üretilbilecek Bazı Geofitler

Familya	Cins
Liliaceae	<i>Lilium</i>
	<i>Tulipa</i>
	<i>Hyacinthus</i>
	<i>Muscari</i>
	<i>Fritillaria</i>
	<i>Colchicum</i>
	<i>Ornithogalum</i>
	<i>Scilla</i>
Iridaceae	<i>Iris</i>
	<i>Gladiolus</i>
	<i>Crocus</i>
Amaryllidaceae	<i>Galanthus</i>
	<i>Sternbergia</i>
	<i>Leucojum</i>
Ranunculaceae	<i>Eranthis</i>
	<i>Anemone</i>
Primulaceae	<i>Cyclamen</i>
Oxalidaceae	<i>Oxalis</i>

2.8.2.5.1. Bitki Doku Kùltürünün Tarihçesi

20. yüzyılın başlarında, bilim adamları ve botanistler, her bitki hücresinin, bir kùltürde, kökler ve filizler oluşturarak yeni bir bitki meydana getirme yeteneği olduğunu ispatladılar. Yıllarca süren araştırmalar ve sonsuz olasılıklar neticesinde, yepyeni bir üretim tekniği ortaya çıktı. Bu teknikten ticari anlamda ilk faydalanan orkide endüstrisi oldu.

Mikro çoğaltım teknikleri, 1930'ların ortalarına doğru odunsu bitkilere de uygulandı. 1940'lı yıllarda, zararlı virüslerin mikro çoğaltım teknikleri yoluyla bitkilerden ayrılabilieceği keşfedildi. Daha sonraları, bu alandaki çalışmalar hızlanmış ve sera teknolojileriyle beraber daha kaliteli üretimler gerçekleştirilmeye başlandı.

1980'lerin başlarından itibaren, o ana kadar ağırlıklı olarak süs bitkileri ve ormancılık alanlarında faaliyet gösteren mikro çoğaltım teknikleri, birkaç ÷lkede daha ticari bir kimliğe bürünmüş ve yüksek üretim maliyeti nedeniyle, bu teknik çok fazla çeşitte uygulanamadı. Yüksek pazar değeri olan ürünler, bu teknik için tercih edildi. Yeni yeni gelişen bu endüstrinin kurulması için tek yol, yüksek kaliteli ve makul fiyatlı bitkiler

üretmek oldu. 2000'li yıllara gelindiğinde ise bitki doku kültürü ile mikro çoğaltım, hastalıksız, virüsten ari, kaliteli ve sağlıklı bitki üretimiyle günümüzün ve geleceğin tarımsal üretimi için tüm dünyada çok önemli bir yer edindi.

Bitki doku kültürü ile ilgili önemli çalışmalar Tablo 2.5.'de verilmiştir.

Tablo 2.5 Bitki doku kültüründe önemli çalışmalar

Tarih	Çalışmalar	Araştırmacılar
1902	İlk izole hücrelerin kültürü	Haberlandt
1904	Olgun embriyoların kültürü	Hanning
1917	Biyoteknoloji teriminin ilk defa kullanımı	Karl Ereky
1920	Oksin hormonunun keşfi ve tanımlanması	Went ve ark.
1922	Kök ve sürgün uçlarının tek başına laboratuvarda çoğaltımı	Kotte ve Robbins
1924	İlk embriyo kurtarma tekniği (mısır)	Dieterich
1934	İlk sürekli olarak tek başına çoğalan kök kültürleri (domates)	White
1934	İlk kallus (değişmeden bölünüp çoğalan hücre topluluğu) kültürleri	Gautheret
1942	İlk kallus kültürlerinden sekonder metabolit eldesi	Gautheret
1946	İlk sürgün uçlarından (apikal meristem) bitki eldesi	Ball
1953	DNA'nın yapısının belirlenmesi	Watson ve Crick
1954	İlk hücre süspansiyonlarından bitki eldesi	Muir ve ark.
1957	İlk sitokin hormonunun tanımlanması ve öneminin ortaya konulması	Skoog ve Miller
1958	İlk somatik embriyogenesis (havuç)	Steward ve ark.
1960	Enzimler kullanılarak ilk canlı protoplast izolasyonu	Cocking
1962	MS doku kültürü besin ortamının geliştirilmesi	Murashige ve Skoog
1965	Tek hücreden bitki elde etme (rejenerasyon)	Vasil ve Hilderbrandt
1967	İlk haploid bitkinin üretimi (anter polen kültürü)	Bourgin ve Nitsch
1968	B5 ortamının geliştirilmesi	Gamborg ve ark.
1970	HEPA filtrelerin kullanılmaya başlanması	
1978	Cinsler arası ilk somatik melezleme	Melchers ve ark.
1983–86	Transgenik ilk bitkinin elde edilmesi ve tarla testleri (tütün)	Murai ve ark.
1990	Sentetik tohum geliştirme ve hızlı dondurma yoluyla germplazm muhafazası çalışmalarının başlaması	-
1995	İlk rekombinant (genetik olarak değiştirilmiş) insan gıdası	(Flavr Savr, domates)

2.8.2.5.2. Bitkilerin oğaltılmasında Kullanılan İn Vitro Teknikler

Bitkilerin oğaltılmasında kullanılan bütün hücre ve doku kültürü tekniklerinde görülen farklılaşma tipleri, kök ve sürgün üretimidir. Bu iki olaya birleşik olarak organogenez adı verilir. Bazen bu iki süreç kendiliğinden düzenlenmiş olarak (zigotik bitki embriyolarındaki gibi) meydana gelir ve bu olay somatik veya adventif embriyogenez olarak adlandırılır (Onay 2003, 2005). Somatic embriyolar bazı durumlarda zigotik embriyolara benzer şekilde bir gelişme sırası izlemektedir. Kök, sürgün ve somatik embriyoların oluşumu çok sayıda biyokimyasal olayı kapsamaktadır. Farklılaşmanın düzenlenmesi iç kontrol mekanizması ile yapılır. Kültürlerde morfolojik değişiklikler görülmesine karşın, morfolojik olarak aynı ürün oluşmasına neden olan başka biyokimyasal farklılaşmalar da meydana gelebilir.

2.8.2.5.2.1. Organogenez ve Embriyogenez'in Kökeni

Kültürdeki hücreler genellikle gruplar halinde bulunurlar. Grup içindeki hücreler şekil ve büyüklük bakımından oldukça değişiktirler. Organ ve embriyo oluşumuna neden olan olayların sırasını belirlemek oldukça zordur. Bitkilerin embriyogenez aracılığıyla karışık hücre süspansiyonlarından elde edilmesi, somatik hücrenin çok hücreli kökene sahip olduğunu göstermez. Çünkü çoğu bitki türlerinde tek hücreler izole edilerek, tam bitkiler elde edilmiştir (Onay 2000). İn vitro morfogeneze neden olan doku kültürü (hücre kültürüne karşıt olarak) ya meristematik hücrelerin çoğalması ya da dokulardaki meristematik hücrelerle oluşur. Somatic embriyolar *in vitro* kültüre alınan diploid hücrelerin  kaynağından oluşabilirler;

- 1) Yaşlı bitkilerin vejetatif hücrelerinden,
- 2) Zigot hariç diğer üreme dokularından ve
- 3) Genç bitkilerin ve embriyoların hipokotil ve kotiledonlarından oluşabilirler.

2.8.2.5.2.2. Somatik Embriyogenez

Somatik embriyogenezde hücre bölünme ve gelişmesinin sırası zigotik embriyogenezden farklıdır. Bunun nedeni; *in vitro* kültürler araştırmacının kontrolü altında gelişirken, bütün bitki sistemini kontrol etmek zordur. Bu yüzden somatik embriyolar zigotik embriyolardan şekil ve büyüklük bakımından farklılıklar gösterir. Havuç bitkisi hücre farklılaşması çalışmaları için model bir sistem olarak kullanılmaktadır ve bilinen en iyi kontrol edilebilen somatik embriyogenez sürecidir. Somatik embriyogenez, sadece *in vitro* kültürde meydana gelmemekle birlikte; *Citrus*'un nuseller dokusunda olduğu gibi, doğada kendiliğinden de oluşabilmektedir ki (nuseller embriyonu) bu somatik embriyo oluşumu üzerine genotipin etkisini göstermektedir (Koltunow, Hidaka, ve Robinson 1996). Doğal olarak poliembriyogenik olan türler oldukça embriyogenik doku kültürleri oluştururken; embriyogenik olmayan türler daha az somatik embriyo oluştururlar. Kültürde embriyogenezin başlatılması için gerekli bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) çeşit ve konsantrasyonu bitki türleri arasında değişiklik gösterir. Fakat çoğu kültürler embriyo oluşumu için gerekli olan hücre bölünmesinin hızlı bir oranını elde etmek için bu başlama basamağından önce yüksek oksine ihtiyaç duyarlar.

İki tip somatik embriyogenez vardır (Koltunow, Hidaka, ve Robinson 1996):

Doğrudan somatik embriyogenez: Zigotik embriyo, kotiledon, yaprak ve gövde gibi bitki dokularından direkt olarak eşeysiz olarak embriyoların üretimidir. Tek bir hücre (veya hücre grubu), meristematik büyümeyi başlatır ancak bu hücre soyunun embriyoyu oluşturması çok nadir görülür. Bu durumun *Citrus* nuseller dokusunda, bazı anter kültürlerinde ve bazen protoplastlarda meydana geldiği tespit edilmiştir.

Dolaylı somatik embriyogenez: Farklılaşmamış kallus ve süspansiyon kültürlerinden embriyoların farklılaşması olarak tanımlanır. Somatik embriyo önceden oluşmuş meristematik gruptaki bir hücreden gelişir. Genel olarak bir gruptaki bütün hücreler embriyogenez potansiyeline sahipse de, böyle bir grupta genellikle yüzeydeki bazı hücreler embriyo oluşturur.,

2.8.2.5.2.3. Organogenez

Organogenez çok yaygındır ve embriyogeneze göre daha kontrol edilebilir bir süreçtir. Organogenezisin kontrolü uygun BBD'lerin küllona. Bu BBD'lerin doğası türler arasında farklılık gösterse de, oksin-sitokinin oranı değişik sistemlerde belirli bir etkiye sahiptir.

Kültüre alınan hücrelerin organogenezi, önceden var olan veya teşvik edilmiş meristematik primordiyumların varlığına bağlıdır. Bu primordiyumlar hızlıca bölünen meristematik hücre gruplarına sahiptirler ve biyokimyasal organizasyon derecesi farklılaşmaya yardımcı olur.

Meristematik hücre grupları, uygun şartlar altında genellikle yüksek oksin seviyelerinde çok sayıda vakuol içeren kültüre alınmış uyku halindeki hücrelerden oluşur. Kültüre alınan dokular ve önceden var olan aksillar meristemler durumunda, apikal baskınlığın etkisi uzaklaştırılarak, bölünme teşvik edilebilir. Bu durum, sitokininlerin ilavesi ile başarılır. Adventif meristemler ya doğrudan olarak kültüre alınan dokuların hücrelerinden ya da kallus oluştuktan sonra oluşur. Takip edilen bu yol rejenerasyonu yapılan bitkilerin genetik yapısında da etkili olur.

2.8.2.5.3. Doku Kültürü Teknikleri ile Bitkilerin Çoğaltılma Aşamaları

Doku kültüründe çoğaltım için izlenebilecek her biri çok özel beslenme ve inkübasyon koşulları gerektiren temel dört aşama tanımlamıştır (Murashige 1974). Bu aşamalar sırasıyla şu şekilde gerçekleşmektedir;

2.8.2.5.3.1. Kültürlerin başlatılması

Bu aşamada eksplantları (sürgün ucu, lateral tomurcuk, yaprak vb.) yüzeyinde bulunan bulaşıklardan arındırmak için yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur. Bu aşamanın ana hedefi, büyüme miktarına bakılmaksızın takip eden aşamalarda kullanılabilecek aksenik (steril) veya enfeksiyonsuz rejenerantlar elde etmektir. Bu aşamada kültürler çoğaltma metoduna uygun olarak sürekli ya da periyodik ışık altında inkübe edilirler.

2.8.2.5.3.2. Sürgünlerin Çoğaltılması

Üretilen bitkilerin sayısını belirlediği için, herhangi bir çoğaltma programındaki en önemli aşamadır. Bu aşamada planlanan ya da istenilen bitki sayısı elde etmek için tekrarlanan alt kültür ve yeniden kültürle sürgünler çoğaltılır. Besi ortamının fiziksel durumu, kimyasal içeriği ve inkübasyon koşulları sürgünlerin çoğaltılmasında oldukça önemlidir.

2.8.2.5.3.3. Köklenme

Önceki aşamada üretilen sürgünler, bitki türüne göre değişen uzunluklarda kesilerek, yüksek oksin içeren bir ortamda bireysel olarak köklendirilir. Bu aşamada, iyi bir kök sistemi oluşur ve tam bitkiler elde edilir.

2.8.2.5.3.4. Adaptasyon (Alıştırma)

Epidermislerinde kutikula tabakası tam olarak gelişmediği ve fonksiyonel stomalara sahip olmadıkları (Czynczyk ve Jakubowski 2004) için *in vitro* rejenerasyonla gelişen bitkiler heterotroftur (Adelberg, Kroggel, ve Toler 2000). İn vitro üretilen bitkiler direkt olarak dış ortama aktarıldıklarında, fazla miktarda su kaybettikleri için birçoğu hemen ölür. Bu nedenle rejenerasyon sonucu oluşan bitkiler kademeli olarak doğal gelişme ortamına alıştırılması gerekir. Doğal büyüme ortamına alıştırma safhasında bitkicikler modern tesislere sahip olmayan işletmede polietilen torbalarla kapatılır ve geçen zamanla birlikte torbada delikler açarak, dış ortama tedricen uyumu sağlanır veya ışık, sıcaklık ve nemin kontrol edilebildiği özel büyüme odaları veya kabinlerinde dış ortama alıştırılır. Alıştırma yapılmayan bitkiler dış ortama aktarıldığında hemen ölür. Bu yüzden *in vitro* çoğaltılan bitkiler toprağa transfer edilmelerinden önce kutikula gelişimi ve stoma fonksiyonlarının başlatılması ve fotosentezi uyarmak için adaptasyona veya alıştırmaya tabi tutulmalıdır. Bu nedenle bu safha bütün çoğaltım sürecindeki en önemli aşamadır. Bu yüzden bu aşama toprak, ışık, sıcaklık ve sulama ile ilgili koşulların düzenlenmesi yoluyla yapılmalıdır. Bu aşamadan önceki bütün aşamalarda her bitki türü kendi çok özel ihtiyaçları göz önüne alınmalıdır.

Doku kültürü ile çoğaltılacak her bitki türü için aşağıda belirtilen parametrelerin değerlendirilmesi gerekir:

- 1) Eksplant kaynağı,
- 2) Besi ortamı içeriği ve fiziksel koşullar,
- 3) Işık yoğunluğu, sıcaklık, ışık-karanlık periyodu ve nemlilik ile ilgili inkübasyon koşullarının belirlenmesi ve
- 4) Adaptasyon koşulları ve toprağa aktarma.

2.9. *Fritillaria* Türlerinin Kullanım Alanları Ve Ekonomik Önemi

2.9.1. Kullanım Alanları

2.9.1.1. Peyzaj Düzenlemelerinde Kullanımı

Ters lalenin bazı türleri Avrupa ve Amerika’da çok eski yıllardan beri bilinmekte ve yetiştirilmektedir. Avrupa ve Amerika’da genel olarak bordürlerde ve kaya bahçelerinde, ağaç ve çalı altlarına dikilerek yer örtücüler gibi, bazı türleri ise saksı bitkisi olarak kullanılmaktadır.

Fritillaria’ lar, sıcak ve kurak yaz sezonunu toprak altında dormant halde soğan olarak geçirirler. Bu nedenle *Fritillaria* soğanlarının sıcak ve kurak koşullara adaptasyon kabiliyetleri yüksektir. Yaz sezonunda su ve bakım ihtiyaçları yoktur. Bu özelliklerinden dolayı küresel ısınma nedeniyle kısıtlı olarak kullandığımız su kaynaklarının ekonomik kullanımı prensipleri doğrultusunda, az su ve bakım isteyen, ayrıca çok gösterişli çiçeklere sahip olan *Fritillaria*’ lar ve benzeri türlerin peyzaj düzenlemeleri ve bitkilendirme çalışmalarında kullanımlarına öncelik verilmeye başlanmıştır.



Şekil 2.8 Potsdam (Almanya) şehri saray bahçesinde *Fritillaria* bitkileri

Peyzaj amaçlı kullanılabilmeleri, bu bitkilerin soğanlarının geniş bir ticaret hacmine sahip olmasına olanak tanımıştır. Bu sebeple *Fritillaria* ‘lar, tüm dünyada süs bitkisi olarak en çok tercih edilen ve soğanlarının ticareti yapılan bitkilerdendir (Kahraman ve Özzambak 2006).

2.9.1.2. Medikal Kullanımı

Fritillaria soğanları Çin’de “Bei-mu” veya “Pei-mu” adıyla, Japonya’da ise “Bai-mo” adıyla yaygın olarak bilinmekte olup, Çin geleneksel tedavisinde önemli bir yer tutmaktadır (Kitajima ve ark. 1981; Yuoh-Fong, Kao, ve Chang 1936). Başta uzak doğu olmak üzere yayılım gösterdiği ülkelerdeki insanlar tarafından binlerce yıldan beri ilaç olarak kullanılmaktadır (Rønsted ve ark. 2005; Wang ve ark. 2005). Bu nedenle çok eski tarihlerden beri ekonomik öneme sahiptirler. Bu bitkilerin soğanlarının ateşi ve yüksek tansiyonu düşürücü; akciğeri nemlendirici, astımı ve bronşiti tedavi edici, boğaz ağrısını giderici ve balgamı söktürücü olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Akhtar ve ark. 2002; Wang ve ark. 2005; Rønsted ve ark. 2005; Seon ve ark. 1997).



Şekil 2.9 Chan Bei Mu

Fritillaria cinslerinin farmasötik endüstrideki önemleri özellikle soğanlarında depoladıkları steroidal alkaloidlerden kaynaklanır. Saponin, terpenoid, steroid, suksin asidi (kehribar asidi), tymidin, adenosin, imperiallin, peiminie ve peiminine gibi bileşikler *Fritillaria* soğanlarında depolanan bileşiklerden bazılarıdır (Wang ve ark. 2005).

Majör bileşik olan imperialin'in, kolinerjik ve kolinesteraz enzim inhibitörü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Kolinerjik aktivite bitkinin Çin tıbbında astımda kullanılma sebebini doğrulamaktadır.

Alzheimer hastalığının tedavisinde kolinesteraz enzim inhibitörlerinden yararlanılmaktadır. *Fritillaria* türleri içerdiği alkaloidler nedeniyle, kolinesteraz enzim inhibitörü olarak da önemli bir potansiyele sahiptir (Arslan ve Gümüşçü 2002).

Fritillaria thunbergii türünde bulunan peimine ve peiminine alkaloidlerinin kan şekerini düşürmede yardımcı olduğu konusunda raporlar vardır (Paek ve Murthy 2002).

Ayrıca *Fritillaria* türlerinden *F. camschatcensis*, Hokkaido adasında yaşayan yerlilerin diyetinde yer alan önemli bir bitkidir.

2.9.1.3. Gıda Olarak Kullanımı

Fritillaria türleri üzerinde yapılan araştırmada, alkaloidlerin dışında sterol, polisakkarit, nişasta, flavonoid, yağ asitleri, organik asitler ve uçucu yağların bulunduğu belirlenmiştir. *Fritillaria* soğanları patatese benzer besin içeriğine sahiptir, ancak %50

daha fazla protein, 6 kat daha fazla kalsiyum ve 30 kat daha fazla demir içerir (Norton ve ark. 1984).

Nişastanın toplam organik madde içeriğinin yaklaşık %80'i oluşturduğu bazı *Fritillaria* türleri, özellikle Uzakdoğu'da gıda olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark. 2005).

2.9.2. Ekonomik Önemi

Ters Lale, güzel görünümüyle park ve bahçeleri süslerken diğer yandan kozmetik sanayisinde ve ilaç sanayisinde hammadde olarak kullanılır. Yayılış alanı dar ve popülasyonu sınırlı olduğu için doğadan toplanması ya da habitatlarının tahrip edilmesi, bitkinin geleceğini tehlikeye atmıştır.

Fritillaria lar, Türkiye'nin de taraf olduğu CITES (Nesilleri Tehlike Altındaki Doğal Bitki ve Hayvan Türlerinin Uluslararası Ticaretini Düzenleme Antlaşması) kurallarında ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı , "Doğal Çiçek Soğanlarının İhrac Listesi" hakkındaki tebliğlerinde doğadan toplanarak ihracatı yasak olan doğal çiçek soğanları arasında yer almaktadır.

Çıkarılan Doğal Çiçek soğanları Yönetmeliği ile alınan koruma önlemleri sayesinde ters lâle türlerinin doğadan toplanması yasaklanmıştır. Doğadan toplanma konusunda yapılan düzenlemelerden sonra, bazı *Fritillaria* türlerini üretmek koşulu ile ihracatına izin verilmektedir.

Fritillaria türleri bakımından dünyanın en zengin florasının ölkemizde bulunduğu göz önüne alındığında iki önemli sonuç ortaya çıkmaktadır:

-Birincisi *Fritillaria* türlerinin doğada korunmasıdır. Bu amaçla soğanlarının toplanmasının tür bazında planlı ve bilinçli bir şekilde yapılması gerekir.

-İkincisi *Fritillaria* türlerinin generatif veya vejetatif yollarla çoğaltılma tekniklerinin araştırılması ve yetiştiriciliğinin geliştirilmesidir. Bu hem tehlike altındaki *Fritillaria* türlerinin korunmasına katkı sağlayacak hem de soğanlarının üretiminin daha hızlı ve yaygın bir şekilde gerçekteşmesine yönelik bir kısmı modifiye edilmiş alternatif yöntemler sunacaktır.

2.10. Literatür Özeti

Fritillaria türleri, süs bitkisi olma potansiyeli çok yüksek olan, doğal koşullarda yetişen soğanlı bitkilerdir. Bu bitki türlerinin yurtdışında park ve bahçelerde sıklıkla kullanıldığının bilinmesi, kesme çiçek olarak da değerlendirilmesi; aynı zamanda içermiş oldukları doğal tıbbi hammadde kaynağı kimyasal maddeler nedeniyle ihraç alanında yoğun talep görmeleri, bu bitki türleri konusu son yıllarda ülkemizde de artan bir ilgiye neden olmuştur. Geleneksel çoğaltma yöntemleriyle yeteri kadar bitkisel materyalin çoğaltılması güç olduğundan, doku kültürüyle çoğaltım ticari anlamda soğan çoğaltımı konusunda avantaj sağlayabilecektir. Bununla birlikte bu bitkilerin *in vitro* koşullarda çoğaltımı konusundaki çalışmalar oldukça sınırlıdır.

1971’de yapılan bir çalışmada *Fritillaria* türlerinin güneşli-yarı gölge alanlarda ve kireçli topraklarda yetişebildiğini, soğanlarının kışa dayanıklı çiçek soğanları grubuna girdiğini ve bu bitkinin Nisan-Mayıs aylarında turuncu renkte çiçek açıp yaklaşık 80 cm ulaşabildiğini bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışma, *F. imperialis*’in kendine has kokusunun farelere karşı repellent etkiye sahip olduğunu, nadir ve tehlike altında olan bitkilerin etrafının bu bitki ile çevrilmesinde farelerin zararının aza indirilebileceğini gözler önüne sermektedir (Scanzoni 1971).

Sun ve ark. *Fritillaria* türlerinde doku kültürü ile mikroçoğaltım konusunda ilk çalışmaları (Sun, Chu, ve Wang 1977) başlatmıştır. Sonraki yıllarda *in vitro* rejenerasyon protokolleri hakkındaki çalışmalar hızla bir artış kazanmıştır (Kukulczanka, Kromer, ve Czastka 1988; Sun ve Wang 1991; Gao ve ark. 1999; Paek ve Murthy 2002; Özcan ve ark. 2007).

F. meleagris L çok estetik ve güzel çiçekli bir tür olmasına karşılık bu türdeki doku kültürü çalışması sayısı çok yetersizdir. Kukulczanka ve ark. *F. meleagris*’in doku kültürü ile çoğaltılması konusunda yaptıkları çalışmalarında pul yaprağı parçalarından veya tüm soğancıklardan *in vitro* koşullarında adventif soğancıklar oluşturmaya gayret etmişlerdir (Kukulczanka, Kromer, ve Czastka 1988). Yapılan bu çalışmada en yüksek soğancık oluşumu, denenen besin ortamı bileşimleri arasında 1.0 mg/L NAA ve 2.0 mg/L BA içeren MS ortamında meydana gelmiştir.

Fritillaria türleri içerisinde özellikle tıbbi alanda kullanımları ön plana olanların doğrudan veya kallus üzerinden morfogenezisi yoluyla yeni bitkilerin elde edilmesi,

Fritillaria türlerinde doku kültürü çalışmalarının büyük bir bölümünü kapsamaktadır. Tang and Wu, *F.ussuriensis* türünde soğan pul yapraklarından (bulb scales) oluşturdukları doku parçalarını makro elementleri MS, mikro elementleri N6 ortam kompozisyonuna uyacak şekilde hazırladıkları besin ortamlarına dikmişlerdir (Tang 1993). Eksplantların %95'inden sadece kallus gelişimi elde edilirken, %1'lik bir bölümünden bitkiler geliştirilebilmiştir.

Tang ve ark. *F.ussuriensis* türünde başka bir çalışma daha yapmışlar; bu defa genç yapraklardan hazırladıkları eksplantları MS besin ortamında kültüre almışlardır (Tang 1995b). 2.4-D tek başına kullanıldığında kallus gelişimi üzerine etkenliği düşük bulunurken, kinetin ve BA'nin birlikte kullanılması halinde kallus gelişimi daha iyi olmuştur. Kinetin dozu artırıldığında kallus oluşumu daha fazla olmuştur. Ancak kallus oluşumunun en yüksek oranda elde edildiği ortam içerisinde 2.4-D, kinetin, BA ve kazeinhidrolizat bulunmakta olduğu ifade edilen çalışmada elde edilen kalluslar, BA, kinetin ve NAA içeren N6 ortamlarına aktarılmış, burada sekiz hafta içerisinde adventif soğancıklar meydana gelmiştir. Soğancıklar NAA içeren ortama alındığında ise iki hafta sonra köklenme elde edilebilmiştir. Somatik embriyogenezis aşamasında 2.4-D'nin tek başına kullanılmasının gelişim üzerine engelleyici etkisinin bulunduğu rapor edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada *F.ussuriensis* türünde, *in vitro* koşullarda elde edilmiş olan yaprakların karanlık koşullarda MS ortamında kültüre alınmasıyla bir ay içerisinde açık sarı renkli kallus gelişimi sağlanmıştır (Tang 1995a). 2 mg/L 2.4-D, 0.5 mg/L BA, 0.5 mg/L kinetin ve 500 mg/L kazeinhidrolizat içeren MS ortamında, 28 gün sonra kalluslar üzerinde somatik embriyolar görülmeye başlanmış ve bu embriyolar daha sonra 0.5 mg/L kinetin ve 100 mg/L kazeinhidrolizat bulunduran N6 ortamına aktarılmışlardır. Somatik embriyolar bunun ardından 0.1 mg/L NAA içeren MS ortamına transfer edilmişler ve burada 2 hafta içerisinde sağlıklı birer bitkiciğe dönüşmüşlerdir.

1991'de Yamagishi, triploid *F.camtschaticensis* (L.) Ker-Gawl. bitkisinden *in vitro* koşullarda çoğaltım yaparak materyali hızlı çoğaltmak amaçlamıştır (Yamagishi 1991). Soğan, yaprak ve gövde parçalarından eksplantlar hazırlayarak bunları değişik bileşimlere sahip Linsmaier and Skoog ortamına dikmiştir. Soğan parçalarından gelişen *in vitro* soğancıklardan alınan yeni eksplantlar, 5 mg/L NAA ve 0.005 mg/L BA içeren LS ortamına alındıklarında çok sayıda soğancık oluşturmıştır. Bu soğancıklar 2°C'de 100 gün bekletildikten sonra toprağa aktararak seraya alınmışlar; burada birkaç hafta sonra yaprak ve sürgün oluşturmaya başlamışlardır.

Paek ve ark., tıbbi bitki olarak kullanılan *Fritillaria* türlerinde, eksplant tipi ve yaşının, kültür ortamı bileşiminin (değişik oksin, sitokin ve şeker kombinasyonlarına sahip MS ortamları), mikro çoğaltım üzerindeki etkilerini araştırmışlardır (Paek, Sung, ve Park 1996). Soğan pul yaprağı eksplantı alınacak ana soğanlar kuru depolarda +4 °C’de 2-4 hafta veya nemli depolarda 10°C’de 4-6 hafta bekletildikten sonra alınırsa, *in vitro* koşullarda soğancık oluşumu elde edilebilmiştir. Pul yaprağı eksplantına göre, boğumlardaki tomurcuklar veya gövde segmentleri, daha iyi soğancık oluşumu sağlamışlardır. Kinetinin etkinliği de BA’ye göre daha yüksek bulunmuştur. Optimum kinetin dozu, eksplant tipine göre farklılık göstermekle birlikte, 1-5 mg/L arasında değişmiştir. Gövde segmentlerinin soğancık oluşturma kapasitesi de eksplant yaşına bağlı olarak değişiklik göstermiş olup genç gövde eksplantları bu konuda, yaşlı segmentlere göre daha iyi sonuçlar vermiştir. En yüksek çoğalma katsayısı 20 olmuş ve bu, gövde segmentlerinde elde edilmiştir.

Başka bir çalışmada, *F. Camtschaticensis* L. Ker-Gawl. türünün soğan pul yaprağı parçaları, büyüme düzenleyici içeren veya içermeyen MS Ortamında, karanlık/ışık ve 15, 2 veya 25°C inkübasyon sıcaklığı parametrelerinin kullanıldığı inkübasyon şartlarında *in vitro* kültüre alınmıştır (Ohkawa ve Kitajima 1998). Araştırmacıların devam eden çalışmalarında bitki hormonlarının yaprak gelişimi, soğancık gelişimi ve köklenme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Soğancıklar farklı dozlarda kinetin NAA veya 24-epibrassinolid (EB) ya da bunların kombinasyonlarının ilave edildiği MS ortamlarına dikilmiş, bu ortamlarda 8 hafta boyunca 1500 lux ışıklandırma koşullarında inkübe edilmiştir. 0.01 ppm EB, soğancık gelişimi ve köklenmeyi sağlarken, 0.1 ppm kinetin, en iyi yaprak sürmesini ve gelişimini teşvik etmiştir.

Ohkawa ve ark.’nın yaptığı denemelerde; soğancık oluşumu için en uygun koşullar; 0.1 mg/L NAA ve 0.1 mg/L 24 epibrassinolide ilave edilen MS ortamı, 20°C ’de ve karanlıkta inkübasyon olmuştur (Ohkawa ve ark. 1999). Araştırmacıların devam eden çalışmalarında bitki hormonlarının yaprak gelişimi soğancık gelişimi ve köklenme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Soğancıklar farklı dozlarda kinetin, NAA veya 24-epibrassinolide (EB) ya da bunların kombinasyonlarının ilave edildiği MS ortamlarına dikilmişler, bu ortamlarda 8 hafta boyunca 1500 lux ışıklandırma koşullarında inkübe edilmişlerdir. 0.01 ppm EB, soğancık gelişimi ve köklenmeyi sağlarken, 0.1 ppm kinetin, en iyi yaprak sürmesini ve gelişimini teşvik etmiştir (Ohkawa ve ark. 1999).

F. camtschatcensis L. Ker-Gawl üzerinde yoğun bir şekilde çalışan Japon araştırmacılar, bu türün doku kültürü koşullarını optimize etmek için ışık ve sıcaklık koşullarını da incelemişler, inkübasyon sırasında gerekli olan optimum değerleri belirlemişlerdir (Ohkawa ve Nishino 1999). *F. camtschatcensis* Ker-Gawl. türünde doku kültürü ortamına ilave edilen PEG ve süktroz dozlarındaki değişimin, yaprak gelişimi, köklenme ve soğancık gelişimi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 60 g/L süktroz konsantrasyonu yaprak gelişimi için uygun bulunurken, 60 ve 120 g/L süktroz konsantrasyonu köklenme için uygun bulunmuştur. 30 ve 60 g/L süktroz, soğancık gelişimi için yetersiz kalmıştır. PEG ilavesi, yaprak gelişiminde olmamakla beraber, Köklenme üzerinde etkili bulunmuş, bunun için 10 mg/L doz en iyi sonuçları vermiştir (Ohkawa ve Nishino 1999). Ohkawa (Ohkawa 2001), benzer bir deneyi, aynı türde bir yıl sonra sıvı besin ortamı kullanarak ve çalkalayıcı üzerinde kültürleri çalkalayarak gerçekleştirmiştir. Araştırmacı, %6 süktroz ve %1' lik standart MS ortamının, pul yapraklarından soğancık oluşumunda en iyi sonucu verdiğini rapor etmiştir.

F. pallidiflore türünde *in vitro* kallus kültürünün alt kültürleri boyunca kromozom sayılarındaki değişiminin incelendiği bir çalışmada (Wang ve ark. 1990), alt kültürlerin sayısı arttıkça kromozom sayılarında değişikliklerin oluşabildiği; bunun en fazla 2.4-D bulunduran ortamlarda ortaya çıktığı, IAA içeren ortamların ise ikinci sırada yer aldığı ve NAA içeren ortamlarda az da olsa ilerlemiş alt kültürlerde kromozomal farklılıkların ortaya çıkabildiği açıkça belirtilmiştir.

Önemi yıllardan beri değişik kaynaklarda vurgulanan ve gerek süs bitkisi potansiyelinin, gerekse ilaç endüstrisi alanında değerlendirilmesinin gerekliliği ifade edilen *Fritillaria* türleri ile ilgili son yıllarda gerçekleştirilen iki önemli projeden birisi, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü tarafından yürütülen ve TÜBİTAK tarafından desteklenerek bir Doktora çalışması kapsamında sunulan taksonomik revizyon programıdır (Ekim ve ark. 1991; Tümen ve ark. 1994; Arslan ve Gümüşçü 2002). Bu çalışmada, daha önceden yapılan revizyon çalışmaları kaynak olarak kullanılmış ve *Fritillaria* türlerinden bol örnekler toplanarak morfolojileri incelenmiş, morfolojik resimleri çizilmiş, slaytları çekilmiş olup, anatomi, polen ve tohum yüzeyi morfolojileri, DNA ve karyolojik çalışmaların da ışığında türlerin benzerlik ve farklılıkları (yakınlık dereceleri), sinonim olup olmadıkları, eksiklikler, problemler giderilmesine yönelik öneriler oluşturulmuştur.

Çin tıbbında ‘Bei-mu’ adıyla kullanılan ve ateş düşürücü özelliği başta olmak üzere öksürük giderici, ekspektoran olarak geleneksel tedavide önemi olan *F. hupahesis* Hsiao et C. Hsia türünün doku kültürü üzerinde çalışan araştırmacılar, bu bitkinin mikro soğancıklarının elde edilebilmesi için önceden pek çok aşamasının kendileri tarafından optimize edildiğini, bu eserde de ışıklandırma ve besin ortamı bileşiminin soğancıkların köklenmesi ve aklimatizasyon üzerindeki etkilerini araştırdıklarını belirtmektedir (UeiChin ve ark. 2000). Doğadan toplanan soğanların, Çin tıbbında çok değerli olan bu bitkiye olan talebi karşılayamadığını ve bu nedenle hızlı üretimi konusunda doku kültürlerinden yararlanılması konusunda çalışıldığını belirten araştırmacılar *in vitro* koşullarda elde edilen soğancıkların köklendirilmesi aşamasında 2 mg/NAA kullanılmasının köklenmeyi teşvik ettiğini; ½ MS , %3 sükröz, 0.5 mg/L BA, 4 mg/L NAA ortamında 60 gün inkübe edilen soğancıkların %65 oranında iyi bir kök sistemi oluşturduklarını belirlemişlerdir. Köklenmesi iyi olan soğancıkların, otoklavlanmış toprak, peat yosunu ve kumda oluşan (2:1:1) karışıma aktarılması halinde büyütme dolaplarında bir ay sonra %90’lık bir yaşama oranı sergilediklerini gözlemlemişlerdir.

Bei-mu bitkisinde embriyogenik kallus elde edilmesi ve bundan da soğancık oluşturulması konusunda çalışan bir başka araştırma ekibi de yine Çin’den YihJuh ve ark.,’dır. (YihJuh ve ark. 2000). Besin ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicileri üzerinde deneyler yapan ekip özellikle köklenme aşamasında 4 mg/L NAA kullanımının çok iyi sonuçlar verdiğinden söz etmektedirler.

Üzerinde çalışılan bir başka *Fritillaria* türü *F. unibracteata* Hisao et K. C. Hsia.’dır. Gao ve ark., bu türün yavru soğanlarının ribavirin, jasmonik asitin metil esteri, brassinolide veya sodyum humat ilave edilmiş besin ortamlarında kültüre alındığını bildirmektedirler (Gao ve ark. 1999). Çalışmada Ribavirin maddesinin, özellikle 10 mg/L dozda kullanıldığında soğancık oluşumunu önemli oranda artırdığı belirlenmiştir.

F. unibracteata Hisao et K. C. Hsia. türünde bir başka çalışma da Gao ve ark.,’na aittir (Gao ve ark. 1999). Araştırmacılar, soğanların küçük parçalar haline getirilerek besin ortamına dikilmesi sonucunda çoğaltılabildiğinden bahsetmektedirler. 50 günlük bir kültür döneminden sonra oluşan soğancıkların hasat edilebildiğini, bunun için en uygun hormon bileşiminin 4.44 µM BA ve 5.7 µM IAA olduğunu ve MS besin ortamının yeterli görüldüğünü kaydetmektedirler. Geleneksel çoğaltma yöntemlerine göre 3-50 kat fazla çoğalma katsayısı elde edildiği bildirilen araştırmada kültürdeki soğancıkların alkaloit ve

diğer yararlanılan bileşikler bakımından içeriklerinin, doğal koşullarda yetişenlerden daha zengin olduğu da belirlenmiştir. Bu nedenle bitki türünün endüstriyel anlamda üretimi için bu çalışmanın önemli bir adım olduğundan bahsedilmektedir.

F. thunbergii'nin soğan pul yaprağı parçaları, 3-5 mg/L kinetin ilave edilen MS ortamında adventif soğancık oluşturmuştur. Eksplantların alınacağı ana soğanların nemli koşullarda 10°C'de, 4-6 hafta bekletilmesinin soğancık oluşturma oranını artırdığı belirlenmiştir. Çiçek sapsarı, diğer tüm eksplant tiplerine göre soğancık oluşumunda en iyi sonucu vermiştir. Doku kültüründen elde edilen soğancıkların geliştiği ortama Vidarabine (50 mg/L'den az olacak dozlarda) katılması, gelişim kalitesi ve hızını artırmış olmakla birlikte, virüs enfeksiyonlarını tamamen ortadan kaldıramamıştır. Doku kültüründen çıkan bitkilerde TMV virüsünün belirtilerinin devam ettiği kaydedilmiştir (Seon ve ark. 1997).

Paek ve Murthy (Paek ve Murthy 2002), *Fritillaria thunbergii* soğanlarından, 1.62 µM NAA ve 4.65 µM KN ile takviye MS ortamı üzerinde optimum soğancık gelişimini elde etmiştir ve 25 °C' de 16 saat florasan ışığı (40 µmol m⁻² s⁻¹) ve 8 saat karanlık çevriminde inkübe edilen kültürlerin, 25 °C' de sürekli karanlık altında inkübe edilen kültürlerle karşılaştırıldığında daha uygun soğancık üretiminin sağlandığını belirtmiştir.

Yapılan başka bir çalışma ile Koyuncu, *F.persica* L.'nin Bolu, Adıyaman ve İzmir-Bozdağ'da üretim çalışmalarının bulunduğunu, bu çalışmalardan başarılı sonuçlar alındığını, kısa süre 29 gün içerisinde doğadan söküm yerine bu bitki türlerinde üretim yapılması yoluna gidileceğini ümidettiğini ifade etmektedir (Koyuncu 2000).

Arslan ve ark., farklı soğan kesme yöntemlerinin *Fritillaria persica* L.'nin özellikleri üzerine etkisini araştırarak, soğan kesme yöntemlerinin bitki başına soğan sayısına ve soğan verimine bağlı olduğunu bulmuştur (Arslan ve Gümüşçü 2002).

Rahimi ve ark., yaptıkları çalışmada *Fritillaria imperialis* soğanlarının *in vitro* da bitkicik oluşturma ve rejenerasyon yeteneklerini incelemiştir (Rahimi, Daneshvar, ve Heidari 2014). Rejenere sürgün sayısı; 0.5 mg/L TDZ ve 30 g/L süktroz ile takviye MS ortamı üzerinde en yüksek; kök sayısı 0.2 mg/L NAA, 30 g/L süktroz ile takviye MS ortamı üzerinde en yüksek olarak bulunmuştur.

Kizil ve Khawar (Kizil ve Khawar 2014), bitki büyüme düzenleyicileri ve inkübasyon sıcaklığının *Fritillaria persica* L.'de soğan oluşumu ve köklenme üzerine etkilerini araştırmıştır.

1997 yılında Trakya Üniversitesi'nde yapılan bir Yüksek Lisans tezinde, Adıyaman Lalesinin Soğanlarının Değişik Vejetatif Yöntemlerle Üretilmesi konusunda çalışılmış ve bu konuda değerli bir başvuru kaynağı oluşması sağlanmıştır (Ulug 1997).

Özcan ekonomik önemi yüksek olan endemik geofit (soğanlı-yumrulu) bitkilerin kültüre alınması ve in-vitro koşullarda hızlı çoğaltımı üzerinde yaptığı çalışmada *Fritillaria*, *Ornithogalum*, *Muscari*, *Bellevallia*, *Tulipa*, *Galanthus*, *Sternbergia*, *Crocus*, *Arum* ve *Biarum* cinslerinin endemik türler içerdiklerini ve bu türlerin soğanlarına, özellikle Avrupa'dan büyük talep geldiğini, bu türlerin içerdiği alkaloidlerin ve uçucu yağların ilaç ve parfümeri sanayinde de önemli bir yere sahip olduğunu belirtmiştir (Özcan 2005).

1995 yılında, Prof. Dr. Tuna Ekim ve Prof. Dr. Mehmet Koyuncu tarafından, Siverek'te *F.persica* L.'nin tarlalardan yabancı ot kapsamından sökülüp atıldığı belirlenmiş ve bu durum Gıda, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na rapor edilmiştir. Sonradan yapılan incelemelerde, yöreden çok miktarda soğan söküldüğü ve sökülen soğanların firmalara satılarak ihraç edildiği anlaşılmıştır. Bunun üzerine bitkinin üretilmesini teşvik etmek amacıyla Şırnak-Hakkâri yöresinden 150 bin adet soğanın damızlık olarak sökülerek üreticilere dağıtılması için iki yıl üst üste izin verilmiş olmakla birlikte, hedeflenen söküm, dağıtım ve üretime ulaşamamış, günümüzde de *Fritillaria* üretiminde sıkıntılar devam eder olmuştur (Arslan ve Gümüşçü 2002).

Fritillaria türlerinde doku kültürü çalışmaları dünya genelinde iki temel bölümde ilerlemektedir. Bir bölümü Çin tıbbında kullanılan türlerin doku kültüre alınması, diğer bir bölümü ise süs bitkisi olarak kullanılan türler olan *Fritillaria* türlerinin doğrudan veya kallus üzerinden morfogenezi yoluyla yeni bitkilerin elde edilmesi biçimindedir. Bu konudaki çalışmalar dünyada, ülkemizdekinden daha fazladır. Dünyada *Fritillaria* türleri konusunda Çin, Polonya ve son yıllarda İran'da yayınlara rastlanmaktadır.

Ülkemizde *Fritillaria* türlerinde doku kültürü çalışmaları 2000'li yılların başında, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde başlatılmış ve 2003–2006 yılları arasında *Fritillaria imperialis* ve *Fritillaria persica*'nın çiçek sapı eksplantları ile doku kültüründe çoğaltılması konusunda yapılan Yüksek Lisans çalışmasında (Kartal 2015) belli oranlarda soğancık ve kallus oluşumu sağlanabilmiştir.

Ülkemizde geofit türleri ile yapılan doku kültürü çalışmaları yok denecek kadar azdır. Peyzaj ve farmasötik endüstride önemli bir yere sahip olan *Fritillaria* türleriyle ilgili ülkemizde yapılan doku kültürü çalışmaları birkaç tane ile sınırlı kalmıştır. Bu nedenle

lkemizde çok sayıda endemik türü bulunan ve bazı türleri risk altında olan *Fritillaria*'ların *in vitro* koşullarda çoğaltılma yöntemlerinin araştırılmasının önemi açıktır. Doku kültürü çalışmaları öncelikli olarak risk altında bulunan *Fritillaria* türlerinin korunmasına ve popülasyonlarının genişletilmesine önemli katkılar sağlayacaktır. Bu alandaki çalışmaların çok sınırlı olması konunun önemini daha da arttırmaktadır.



3. MATERYAL ve METOT

Çalışmalarda bitkisel materyal olarak doğal yaşam ortamlarında toplanan Baskil Ters Lalesi (*Fritillaria baskilensis* Behcet) bitkilerinin soğanları, açmamış çiçeklerinin petalleri ve çiçek sapları eksplant kaynağı olarak kullanıldı. Deneylerde temel besi ortamı olarak Murashige and Skoog (MS, vitaminli - Duchefa), sükroz (Duchefa), plant agar (Duchefa), bitki büyüme düzenleyicisi (PGR) olarak oksin (NAA= α -Naphtalene acetic acid ve IAA=Indole-3-acetic acid, SIGMA) ve sitokinin (BA=6-Benzylaminopurine, SIGMA) hormonları, ayrıca etil alkol, sodyum hipoklorit (NaOCl), Twenn 20 gibi kimyasallar kullanıldı.

3.1. Besi ortamlarının hazırlanması:

Deneylerde Murashige and Skoog (MS, vitaminli) temel besi ortamının sükroz içermeyen, sükroz ile farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi (Plant Growth Regulator = PGR) içeren ortamları kullanıldı. Kullanılan besi ortamı kombinasyonları eksplant tipine göre aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Eksplantların kültüre alındığı besi ortamları:

1) İlk olarak 'MS (Murashige and Skoog, vitaminli) + %0.6 agar besi ortamı' hazırlandı. Bu besi ortamının her 1000 mL'si için steril bir erlene 4.4 g MS konuldu. Üzerine toplam hacim 1000 mL olacak şekilde duble distile su (ddH₂O) eklenerek manyetik karıştırıcıda tamamen çözdürüldü. Daha sonra çözeltinin pH'ı 1 N sodyum hidroksit (NaOH) ve 1 N hidroklorik asit (HCl) kullanılarak 5.8'e ayarlandı ve otoklavlanmak için 300'er ml'lik hacimler şeklinde cam şişelere aktarıldı (MS besi ortamı). Cam şişelerdeki bu 300 ml'lik besi ortamları %0.6 agar (Plant agar, Duchefa) içerecek şekilde kombine edildi. Bunun için her bir cam şişedeki 300 ml'lik besi ortamına 1.8 gram agar eklendi. Bu 300 ml'lik çözeltilerin tamamı manyetik karıştırıcıda iyice karıştırıldı.

2) İkinci olarak MS (Murashige and Skoog, vitaminli) + %6 sükroz (bir seri olarak da (%3 sükroz) + %0.6 agar ve farklı miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren besi ortamı hazırlandı. Burada litresinde 4.4 gram MS bulunan besi ortamına 60 g sükroz eklendi (+ %6 sükrozlu ortam) ve manyetik karıştırıcıda iyice karıştırıldı. Daha sonra bu

MS + %6 süzkroz besi ortamı 300 ml'lik hacimler şeklinde cam şişelere aktarıldı. Bu şişelerin her birine %0.6 gram agar içerecek oranda 1.8 gram agar eklendi.

Bu 300 ml'lik çözeltiler otoklavlanmadan önce üç (a, b ve c) gruba ayrıldı.

Bu gruplardan;

a) Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortam [MS+ %6 süzkroz (veya %3süzkroz) +%0.6 agar besi ortamı]

b) Yüksek sitokininli ortam (Cam şişelerde bulunan her bir 300 ml'lik MS+ %6süzkroz (veya %3 süzkroz) +%0.6 agar besi ortamına 30 µl BA, 18 µl NAA ve 12 µl IAA ilave edildi. Bu şekilde 1 mg/L BA + 0.6 mg/L NAA + 0.4 mg/L IAA içeren ortam hazırlandı).

c) Düşük sitokininli ortam (Cam şişelerde bulunan her bir 300 ml'lik MS+ %6süzkroz (veya %3) +%0.6 agar besi ortamına 3 µl BA, 18 µl NAA ve 12 µl IAA ilave edildi. Bu şekilde 0.1 mg/L BA + 0,6 mg/L NAA + 0.4 mg/L IAA içeren ortam hazırlandı).

Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri uygun çözücülerde çözdürüldükten sonra +4°C karanlık ortamda saklandı. Çalışmada BA sıvı solüsyon halinde kullanıldı. IAA duble distile su (ddH₂O)'da, NAA ise 1N NaOH solüsyonunda çözdürülerek kullanıldı.

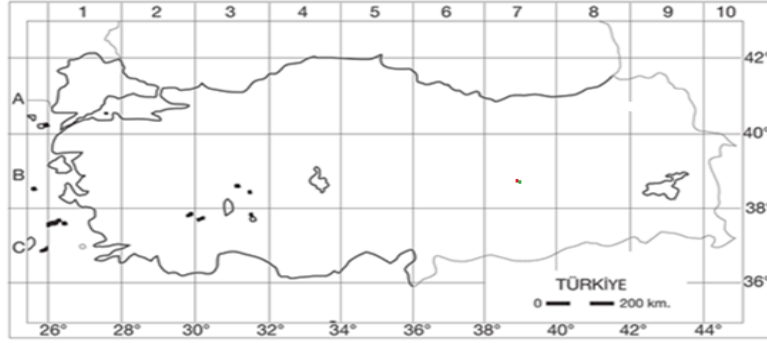
Yukarıdaki gibi hazırlanan ve 300 ml'lik cam şişlere aktarılan besi ortamlarının tamamı 121°C 'de 25 dakika otoklavlandı. Otoklavlanan besin ortamları flow kabin içinde 40 °C'ye kadar soğutuldu. Bu besi ortamları flow kabin içinde daha önce steril hale getirilmiş petrilere (90 x 15mm) her birine 30 ml olacak şekilde aktarıldı. Bu petrilere yüzey sterilizasyon işleminden geçirilmiş soğan, açmamış çiçek ve bu çiçeklerin saplarından elde edilen eksplantlar flow kabin içinde ekildi.

3.2. Bitkisel Materyalin Toplanması ve Eksplantların Hazırlanması

Fritillaria baskilensis Behçet türüne ait bitkiler iki farklı lokaliteden toplandı. Bitkilerin toplandığı lokaliteler ve toplanma tarihleri aşağıda verilmiştir;

B7 Elazığ: Baskil. Yukarı Kuluşığı köyü. Selil dağı. 1300 m. 10.04.2014 ve 12.04. 2015

B7. Elazığ. Baskil. Hasan dağı. Step, 2000-2100 m, 19.04.2014 ve 26.04.2015



Şekil 3.1 *Fritillaria baskilensis* (Baskil Ters Lalesi) bitkisinin toplandığı lokaliteler

Bitkiler doğal ortamlarından soğanlarının çevresindeki bir miktar toprak ile birlikte toplandı ve küçük saksılara yerleştirildi. Bu şekliyle laboratuvara taşınan bitkiler dokunulmadan 16 saat beyaz floresan ışık ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanarak $+4^\circ\text{C}$ de 2 gün süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda saksılardan alınan dokunulmamış bitkiler eksplant kaynağı olarak kullanılmak üzere önce akar musluk suyu altında dört saat süreyle yıkandı.

Eksplantlar bu bitkilerin soğanları, çiçek taç yaprakları (tepalleri) ve çiçek sapları olmak üzere üç farklı kısımdan elde edildi.



Şekil 3.2 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinin doğal ortamındaki görünümü



Şekil 3.3 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinin laboratuvarında, musluk suyu altında yıkandıktan sonraki görünümü

3.3. Soğanlardan eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması

Soğan eksplantları doğal ortamlarından toplanan bitkilerin çapları 0.5 ile 1.3 cm arasında değişen soğanlarından elde edildi. Bitkilerin taze soğanları ilk önce musluk suyu altında temizce yıkanarak saçak köklerinden ve dış kabuğundan arındırıldı ve yaklaşık dört saat süreyle akan musluk suyu altında bekletildi. Bu soğanlar daha sonra yüzey sterilizasyon işlemine tabi tutuldu.



Şekil 3.4 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkilerinden elde edilen soğanlar

Yüzey sterilizasyonunda, en iyi sterilizasyonu sağlamak amacıyla daha önce yapılmış ön denemelerin sonuçları dikkate alındı. Literatür bilgileri de göz önüne alınarak yapılan bu ön denemeler için aşağıda verilen altı farklı protokol hazırlandı.

1. Protokol

4 saat süreyle musluk suyu altında yıkanarak dış kabuğundan ve köklerinden arındırılmış soğanlar 70% etanolde 1 dakika tutuldu. Sonra birkaç damla Twenn 20 damlatılmış % 20 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 20 dakika bekletildi. Son olarak 4 defa 5'er dakika double distile su (ddH₂O) ile yıkandı.

2. Protokol

4 saat süreyle musluk suyu altında yıkanarak dış kabuğundan ve köklerinden arındırılmış soğanlar %96 etanolde 30 saniye tutuldu. Sonra birkaç damla Twenn 20 damlatılmış %20 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 20 dakika bekletildi. Son olarak 4 defa 5'er dakika double distile su (ddH₂O) ile yıkandı.

3. Protokol

4 saat süreyle musluk suyu altında yıkanarak dış kabuğundan ve köklerinden arındırılmış soğanlar %70 etanolde 2 dakika tutuldu. Sonra birkaç damla Twenn 20 damlatılmış %30 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 20 dakika bekletildi. Son olarak 4 defa 5'er dakika double distile su (ddH₂O) ile yıkandı.

4. Protokol

4 saat süreyle musluk suyu altında yıkanarak dış kabuğundan ve köklerinden arındırılmış soğanlar %96 etanolde 1 dakika tutuldu. Sonra birkaç damla Twenn 20 damlatılmış %30 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 20 dakika bekletildi. Son olarak 4 defa 5'er dakika double distile su (ddH₂O) ile yıkandı.

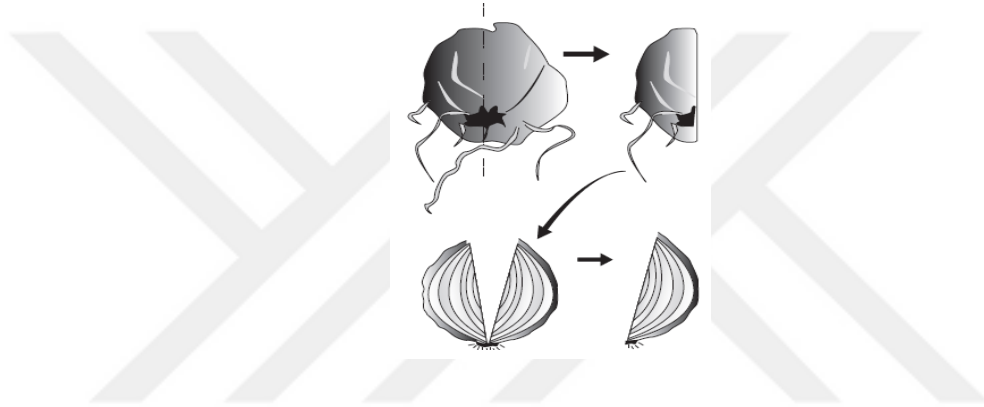
5. Protokol

4 saat süreyle musluk suyu altında yıkanarak dış kabuğundan ve köklerinden arındırılmış soğanlar %70 etanolde 1 dakika tutuldu. Sonra birkaç damla Twenn 20 damlatılmış %30 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 30 dakika bekletildi. Son olarak 4 defa 5'er dakika double distile su (ddH₂O) ile yıkandı.

6. Protokol

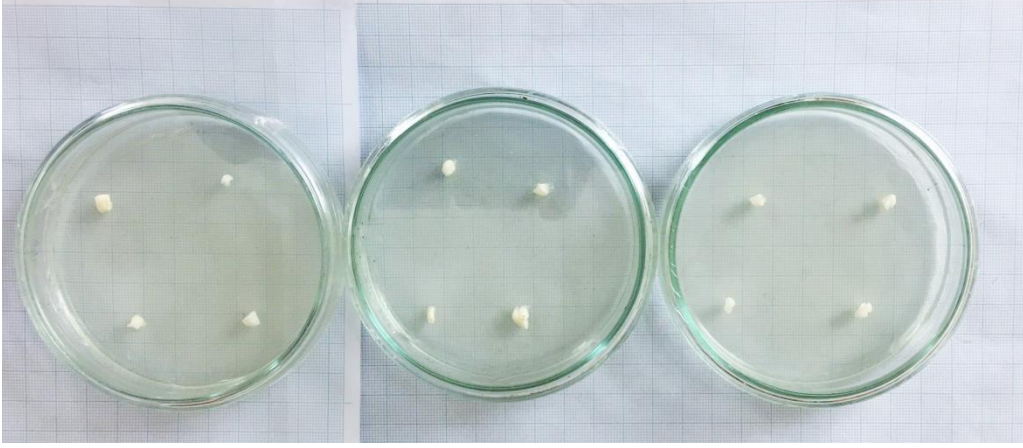
4 saat süreyle musluk suyu altında yıkanarak dış kabuğundan ve köklerinden arındırılmış soğanlar %96 etanolde 1 dakika tutuldu. Sonra birkaç damla Twenn 20 damlatılmış %30 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 30 dakika bekletildi. Son olarak 4 defa 5'er dakika double distile su (ddH₂O) ile yıkandı.

Sterilizasyon amacıyla yapılan ön denemelerde en iyi sonuç 5. protokolden elde edildi. Bu nedenle soğanların sterilizasyonunda 5. protokol uygulandı. Yüzey sterilizasyon işleminden sonra soğanlar flow kabin içinde aşağıdaki şekilde verildiği gibi steril bisturi ve pensler yardımıyla dört parçaya bölündü.



Şekil 3.5 *Fritillaria baskilensis* Behcet'in soğanlarından elde edilen eksplantlar

Her soğandan dört eksplant elde edildi. Bu eksplantlar köklerin çıktığı alt kısımları besi ortamıyla temas edecek şekilde daha önceden hazırlanmış petriler içindeki besi ortamlarına ekildi. Bu işlemlerin tümü flow kabin içinde yapıldı. Besi ortamı olarak aşağıda verilen farklı kombinasyonlar kullanıldı. Her bir besi ortamı için 8 petri (90 x 15 mm) hazırlandı ve 32 eksplant gelişmeye bırakıldı. Eksplantlar besi ortamlarına ekildikten sonra petrilerin kapakları kapatıldı. Streç film ile tamamen sarılan petriler 20±1°C'de 16 saat beyaz floresan ışık (30 µmolm⁻²s⁻¹) ve 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanarak kültüre alındı.



Şekil 3.6 *Fritillaria baskilensis* Behcet'in soğanlarından elde edilerek petrilere ekilen soğan eksplantlarının görünümleri

Soğan eksplantlarının besi ortamları olarak aşağıda verilen protokoller uygulandı.

- 1) Sadece Murashige and Skoog (MS, vitaminli) temel besi ortamı
- 2) MS + %6'lık süktroz (veya %3) + %0.6 agar
 - a) Bitki büyüme düzenleyicisi (Plant Growth Regulator = PGR) içermeyen
 - b) 1 mg/l BA + 0.6 mg/L NAA + 0.4 mg/L IAA içeren
 - c) 0.1 mg/L BA + 0.6 mg/L NAA + 0.4 mg/L IAA içeren

30 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarda her 10 günde bir ölçümler yapıldı. Bu ölçümlerle enfekte olan ve olamayan eksplant oranı, gelişmeyen eksplant oranı, kallus veya soğancık oluşumu görülen eksplant oranı gibi farklı parametreler belirlendi.

İlk 30 günlük sürenin sonunda canlı kalan eksplantlar ilk kültüre alındıkları besi ortamının aynısını içeren magentalara aktarıldı. Aktarılma işlemi flow kabin içinde yapıldı. Magentalardaki besi ortamlarını yenileme ve eksplantları aktarma işlemleri her 30 günde bir tekrarlandı. Eksplantlar magenta ortamlarında 90 gün boyunca izlendi. Bu arada her 30 günde bir ölçümler yapılarak sonuçlar kaydedildi. Bu ölçümler sırasında; enfekte olan eksplant oranı, canlı kalan eksplant oranı, sadece kallus oluşumu görülen eksplant oranı, kallus + sürgün oluşumu görülen eksplant oranı, kallus + sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı, kallus + soğancık oluşumu görülen eksplant oranı, kallus + soğancık oluşumu görülen eksplantlarda, eksplant başına soğancık sayısı, direkt sürgün oluşumu görülen eksplant oranı, direkt sürgün oluşumu görülen eksplantlarda

eksplant başına sürgün sayısı, direkt soğancık oluşumu görülen eksplant oranı ve direkt soğancık oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına soğancık sayısı gibi 11 farklı özellik ölçüldü.

Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda endirekt ve direkt organogenezle sürgün ve soğancık oluşumu görülen eksplantlar köklendirme amacıyla hazırlanmış magentalardaki besi ortamlarına aktarıldı. Köklendirme ortamı olarak, literatür bilgileri de göz önüne alınarak (UeiChin ve ark. 2000) 1/2 Murashige and Skoog (MS) + 0.6 agar + %3 sükröz + 4 mg/L NAA ve 0.5 mg/L BA içeren besi ortamı kullanıldı. Bu besi ortamlarının hazırlanmasında, daha önceki deneylerde kullanılan besi ortamlarının hazırlanış metodu izlendi. Magentalardaki eksplantların köklendirme ortamına aktarılmasında, eksplantın tipine göre davranıldı. Örneğin endirekt sürgün oluşumu görülen eksplantlar büyüklüğüne göre; ya tek parça halinde ya da iki - üç parçaya bölünerek, direkt sürgün olumu görülen eksplantlar tek parça halinde besi ortamına yerleştirildi. Üzerinde soğancık gelişimi görülen eksplantlarda, soğancığın büyüklüğü göz önüne alındı. Örneğin çapları ortalama 4 mm ve daha büyük olan soğancıklar teker teker, 1-2 mm çapındaki mikrosoğancıklar üzerinde geliştikleri eksplantla birlikte köklendirme ortamına aktarıldı. Bu işlemlerin tamamı flow kabin içinde yapıldı. Her bir besi ortamına aynı türden 2-5 arasında eksplant aktarıldı. Eksplantlar besi ortamlarına ekildikten sonra magentaların kapakları kapatıldı, streç film ile tamamen sarıldı. $20\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat beyaz floresan ışık ($30\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanarak 60 gün boyunca kültüre alındı. Bu sürenin 30. gününde besi ortamları yenilendi. Bu arada her 15 günde bir, flow kabin içinde olacak şekilde, magentaların kapakları açılarak ortam havalandırıldı. 30. ve 60. günlerde kök gelişimi görülen eksplantlar belirlenerek sonuçlar kaydedildi.

Köklendirme ortamındaki 60 günlük sürenin sonunda sürgün ve kök oluşturmuş bitkicikler içinde eşit miktarlarda (175 g) torf bulunan $350\ \text{cm}^3$ 'lük saksılara ekildi. Her saksıya 2 - 4 arasında bitkicik aktarıldı. Daha sonra musluk suyu ile bolca sulanan her saksının üst kısmına, ekilen bitkiciklerle temas etmeyecek şekilde şeffaf poşet geçirildi. Bu işlemle, bitkiciklerin ekildiği ortamın nemli kalması amaçlandı. Bu şekilde hazırlanan bütün saksılar $20\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat beyaz floresan ışık ($30\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanan ortama alınarak, bitkicikler gelişmeye bırakıldı. Gelişme süresi boyunca her saksı 4 günde bir 6 ml musluk suyu ile sulandı. Her 10 günde bir bitkiciklerin gelişmeleri üzerine nicel ve nitel gözlemler yapılarak sonuçlar kaydedildi.

3.4. Çiçeklerin taç yapraklarından eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması

Bitkiler bir bütün olarak akar musluk suyu altında iyice yıkandı. Daha sonra bitkilerin yeşil ve yeşil-mor renkli kapalı çiçek (veya çiçek tomurcukları)'leri steril bir pens yardımıyla bitkiden koparıldı. Koparılan çiçekler 1 saat süreyle bir erlen içindeki saf suda bekletildi.

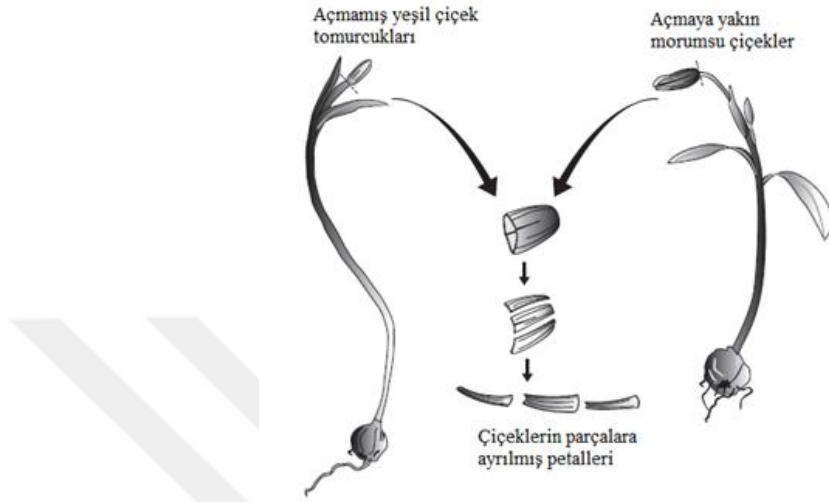
Saf suda 1 saat bekletilen çiçekler yüzey sterilizasyonu için önce %70'lik alkolde yirmi (20) saniye, daha sonra birkaç damla Tween 20 damlatılmış %1,5 sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde yirmi (20) dakika tutuldu. Sodyum hipoklorit çözeltisinden çıkarılan çiçekler 4 defa 5'er dakika distile su (ddH₂O) ile iyice yıkandı. Bu şekilde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan çiçeklerin yaprakları eksplant olarak kullanıldı. Yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan açmamış veya açmaya yakın çiçeklerin yeşil veya yeşil-mor renkteki petalleri aşağıdaki şekilde verildiği gibi kesilerek steril bir pens çifti yardımıyla besi ortamlarına alındı.



Şekil 3.7 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinden koparılan açmamış yeşil veya mor-yeşil renkteki çiçeklerin görünümü

Her çiçekten dört eksplant elde edildi ve çiçek sapına bağlanan taban kısımları besi ortamıyla temas edecek şekilde daha önceden hazırlanmış, aynı petri içindeki besi ortamına ekildi. Bu işlemlerin tamamı flow kabin içinde yapıldı. Soğan eksplantları için kullanılan 4 besi ortamı çeşidi çiçek eksplantlarının kültüründe de kullanıldı. Her bir besi ortamı protokolü için 8 petri (90 x 15 mm) hazırlandı ve 32 eksplant gelişmeye bırakıldı.

Eksplantlar besi ortamlarına ekildikten sonra petrilerin kapakları kapatıldı. Streç film ile tamamen sarılan petriler $20\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de sürekli ışık altında ışık ($30\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) gelişmeye bırakıldı.



Şekil 3.8 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinin açmamış yeşil çiçeklerinin ve açmaya yakın morumsu renkteki çiçeklerinin petallerinden elde edilen eksplantlar



Şekil 3.9 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinin açmamış yeşil çiçeklerinin ve açmaya yakın morumsu renkteki çiçeklerinin petallerinden elde edilerek petrilerdeki besi ortamlarına ekilen eksplantların görünüşleri

30 gün boyunca gelişimleri izlenen çiçek eksplantları, bu sürenin sonunda ilk kültüre alındıkları besi ortamının aynısını içeren petrilere aktarıldı. Aktarılma işlemi flow kabin içinde yapıldı. Petrilerdeki besi ortamlarını yenileme ve eksplantları aktarma

işlemleri her 30 günde bir tekrarlandı. Bu süre içinde eksplant gelişimi devamlı olarak izlendi.

3.5. Çiçek saplarından eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması

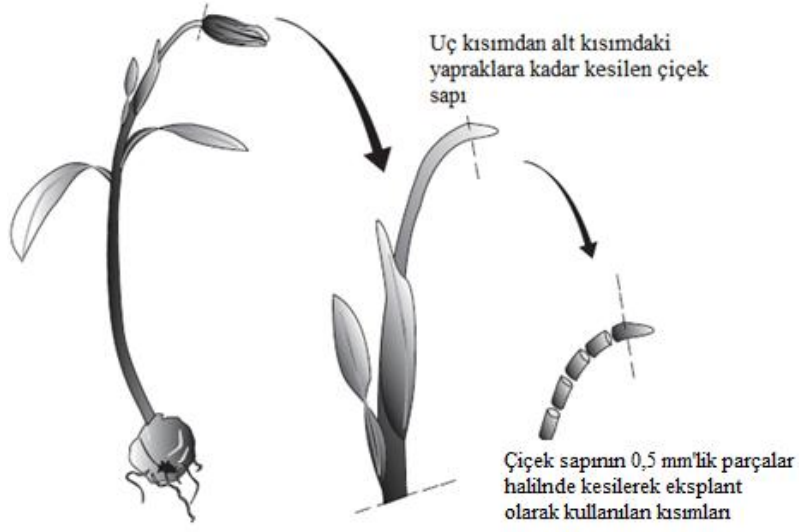
Bitkilerin çiçek saplarının kullanıldığı deney serilerinde eksplantlar, çiçeklenmenin başında olan ve henüz tam açılmamış bitkilerin çiçek saplarından elde edildi.

Doğal ortamlarından toplanan ve musluk suyu altında iyice yıkanan bitkilerin önce çiçeğin tabanından aşağıya doğru yapraksız kısımları bir bütün olarak steril bir pens yardımıyla kesilerek alındı. Bu parçalar saf su içeren bir beherde bir saat tutulduktan sonra yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu.

Yüzey sterilizasyonu için kesilen çiçek sapları önce %70'lik etanolde 20 saniye süreyle tutuldu. Daha sonra birkaç damla Tween 20 damlatılmış %10'luk sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 20 dakika bekletildi. Ardından 4 defa beşer dakika süreyle duble distile su (ddH₂O) ile yıkanan materyalden çiçek sapları laminar kabin içinde, steril bisturi uçları ve pensler yardımıyla yaklaşık 5 mm'lik parçalara kesildi. Bu şekilde elde edilen eksplantlar, laminar kabin içinde besi ortamına transfer edildi.



Şekil 3.10 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinin eksplant kaynağı olarak kullanılan çiçek sapları



Şekil 3.11 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinin çiçek saplarından eksplant elde edilmesi

Her bitkinin çiçek sapından ortalama dört eksplant elde edildi. Eksplantlar doğal ortamlarındaki pozisyonları dikkate alınarak, taban kısımları besi ortamıyla temas edecek şekilde daha önceden hazırlanmış, aynı petri içindeki besi ortamına ekildi. Bu işlemlerin tamamı flow kabin içinde yapıldı. Besi ortamı olarak çiçek soğanları için kullanılan protokolün aynısı uygulandı. Her bir besi ortamı protokolü için çiçek sapı eksplantlarından 8 petri (90 x 15 mm) ve $8 \times 4 = 32$ eksplant hazırlandı. Streç film ile tamamen sarılan petriler $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de sürekli ışık altında ışık ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 30 gün süreyle gelişmeye bırakıldı.



Şekil 3.12 *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinin çiçek saplarından elde edilen ve petrilerdeki besi ortamlarına ekilen eksplantların görünümü

30 gün boyunca gelişimleri izlenen iek sapı eksplantları, bu sürenin sonunda ilk kültüre alındıkları besi ortamının aynısını içeren petrilere aktarıldı. Aktarılma işlemi flow kabin içinde yapıldı. Petrilerdeki besi ortamlarını yenileme ve eksplantları aktarma işlemleri her 30 günde bir tekrarlandı. Bu süre içinde eksplant gelişimi devamlı olarak izlendi.

3.6. İstatistiksel analiz

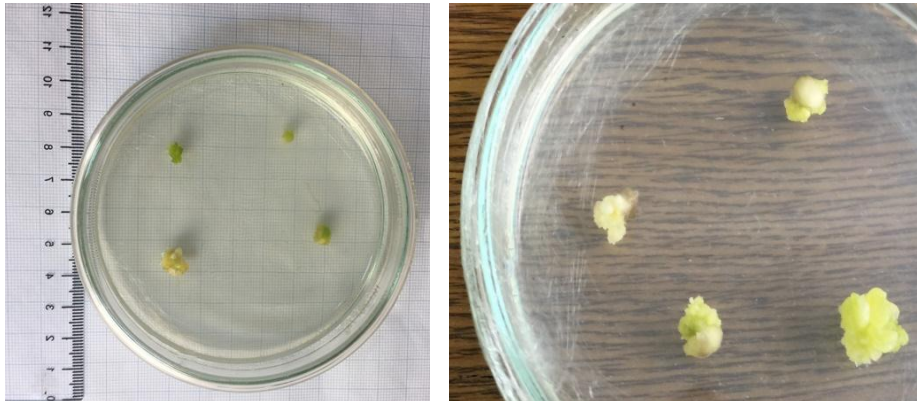
Verilerin istatistiksel yorumu R programının 3.2.4. versiyonu kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizler yapılırken R programının içeriğindeki “stats” istatistiksel analiz kütüphanesinden faydalanıldı (R Core Team, 2016).

4. BULGULAR

4.1. Soğan Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular

F. baskilensis Behçet bitkisinin soğanlarından elde edilen eksplantların besi ortamında gelişimleri ilk bir ayın her 10 gününde bir olacak şekilde gözlemler yapılmıştır. Bu gözlemler sırasında enfekte olan ve olmayan eksplantların sayısı, canlı kalan eksplantların sayısı, üzerinde kallus oluşumu veya soğancık oluşumu görülen eksplantların sayısı gibi parametreler göz önüne alınmış, elde edilen sonuçlardan aşağıdaki tablolar (Tablo 4.1, Tablo 4.2) oluşturulmuştur. Kararan veya koyu kahverengi renk alarak büzüşen eksplantlar gelişmeyen eksplantlar kategorisinde değerlendirilmiştir.

İlk 30 günde besi ortamlarındaki eksplantlarda görülen enfeksiyon oranı %6.25 ile %12.50 arasında değişmiştir. İlk bir aylık sürenin sonunda besi ortamlarındaki eksplantların ortalama % 9.765 oranında enfeksiyon görülmüştür. Yine ilk bir aylık sürenin sonunda eksplantların % 4.3'ünde enfeksiyon görülmüştüğü halde gelişme olmamıştır. Bu şekilde, toplam eksplantlar (256) içinde enfeksiyon görülen ve gelişme göstermeyen eksplantların oranı %14.06 olarak gerçekleşmiştir. Geriye kalan %85.94 oranındaki canlı eksplantlar içinde 30. günün sonunda kallus oluşumu görülen eksplant oranı %38.4, soğancık oluşumu görülen eksplant oranı %8.6 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.1 *Fritillaria baskilensis* Behçet'in soğanlarından elde edilerek petrilere ekilen soğan eksplantlarından gelişen kallusların görünümü

Tablo 4.1 *F. baskilensis* Behçet bitkisinin soğanlarından elde edilen eksplantların, besi ortamlarına ekimlerinden itibaren ilk bir aylık süre içinde her on günde bir yapılmış ölçümler ile belirlenmiş, gelişme oranları (%6'lık sükröz ortamı)

Besi ortamı	Günler	Enfekte olan eksplantlar		Enfekte olmayan eksplantlar		Gelişmeyen eksplantlar (Enfekte + gelişmeyen)		Canlı kalan eksplantlar		Kallus oluşumu görülen eksplantlar (Canlı eksplantlar içinde)		Soğancık oluşumu görülen eksplantlar (Canlı eksplantlar içinde)	
		Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar	10	2	6.250	30	93.750	2	6.250	30	93.750	0	0.000	0	0.000
	20	3	9.375	29	90.625	4	12.50	28	87.500	1	3.571	0	0.000
	30	3	9.375	29	90.625	5	15.625	27	84.375	5	18.518	0	0.000
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar + %6 sükröz (Bitki Büyüme maddesi yok)	10	0	0.000	32	100.00	0	0.00	32	100.0	0	0.00	0	0.000
	20	2	6.250	30	93.75	3	9.375	29	90.625	4	13.793	0	0.000
	30	3	9.375	29	90.625	4	12.50	28	87.50	8	28.571	1	3.571
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar + %6 sükröz (1BAP+ 0,6NAA + 0,4 IAA, (Yüksek sitokininli ortam)	10	2	6.250	30	93.75	2	6.250	30	93.750	0	0.00	0	0.000
	20	4	12.50	28	87.50	4	12.50	28	87.50	3	10.714	0	0.000
	30	4	12.50	28	87.50	4	12.50	28	87.50	11	39.285	3	10.714
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar + %6 sükröz 0,1BAP+ 0,6NAA + 0,4 IAA, (Düşük sitokininli ortam)	10	1	3.225	31	96.875	1	3.225	31	96.875	1	3.225	0	0.000
	20	2	6.250	30	93.750	2	3.225	30	93.750	5	16.666	0	0.000
	30	2	6.250	30	93.750	4	12.50	28	87.50	14	48.275	4	14.285

Tablo 4.2 *F. baskilensis* Behçet bitkisinin soğanlarından elde edilen eksplantların, besi ortamlarına ekimlerinden itibaren ilk bir aylık süre içinde her on günde bir yapılmış ölçümler ile belirlenmiş, gelişme oranları (%3'lük süktroz ortamı)

Besi ortamı	Günler	Enfekte olan eksplantlar		Enfekte olmayan eksplantlar		Gelişmeyen eksplantlar (Enfekte + gelişmeyen)		Canlı kalan eksplantlar		Kallus oluşumu başlayan eksplantlar (Canlı eksplantlar içinde)		Soğancık oluşumu görülen eksplantlar (Canlı eksplantlar içinde)	
		Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Murashige and Skoog (MS) + %0.6 agar	10	3	9.375	29	90.625	3	9.375	29	90.625	0	0.000	0	0.000
	20	4	12.50	28	87.50	4	12.50	28	87.500	3	10.714	0	0.000
	30	4	12.50	28	87.50	5	15.625	27	84.375	6	22.222	0	0.000
Murashige and Skoog (MS) + %0.6 agar + %3 süktroz (Bitki Büyüme maddesi yok)	10	1	3.225	31	96.875	2	6.250	30	93.750	1	3.333	0	0.000
	20	2	6.250	30	93.750	4	12.50	28	87.50	8	28.571	0	0.000
	30	3	9.375	29	90.625	5	15.625	27	84.375	13	48.148	3	11.111
Murashige and Skoog (MS) + %0.6 agar + %3 süktroz (1BA+ 0.6NAA + 0.4 IAA, (Yüksek sitokininli ortam)	10	1	3.225	31	96.875	2	6.250	30	93.750	1	3.333	0	0.000
	20	3	9.375	29	90.625	4	12.50	28	87.50	11	39.285	0	0.000
	30	3	9.375	29	90.625	4	12.50	28	87.50	13	46.428	4	14.285
Murashige and Skoog (MS) + %0.6 agar + %3 süktroz 0,1BA+ 0.6NAA + 0.4 IAA, (Düşük sitokininli ortam)	10	2	6.250	30	93.750	2	6.250	30	93.750	1	3.333	0	0.000
	20	3	9.375	29	90.625	4	12.50	28	87.50	12	42.857	1	3.571
	30	3	9.375	29	90.625	5	15.625	27	84.375	15	55.555	4	14.814

Gerek kallus ve gerekse soğancık oluşumu zamana ve besi ortamının niteliğine göre bazı önemli farklılıklar göstermiştir. Örneğin sükroz ve bitki büyüme maddesi içermeyen MS + % 0,6'lık agar ortamında; ilk 10 günde kallus ve soğancık oluşumu gerçekleşmemiştir. 20. ve 30. günlerde kallus oluşumu görülen eksplant oranı sırasıyla %7.14 ve %20.37 olarak ölçülmüşken soğancık oluşumu her iki zaman diliminde de gözlenmemiştir.

Bitki büyüme maddesi içermeyen MS + %0.6 agar + %6'lık sükroz ortamında 10., 20. ve 30. günlerde canlı kalan eksplantlar içinde kallus oluşumu görülenleri oranı sırasıyla % 0.00, %13.8, %28.58; soğancık oluşumu görülenlerin oranı %0.00, %0.00 ve %3.57 olarak ölçülmüştür. Bu değerler aynı parametrenin %3 sükroz içeren besi ortamında %3.33, %28.58, %48.15 ve %0.00, %0.00, %11.11 olarak ölçülmüştür.

MS + %0.6 agar + %6 sükroz ile yüksek oranda sitokinin içeren (1 BA + 0.6 NAA+ 0.4 IAA) ortamda 10., 20. ve 30. günlerde canlı kalan eksplantlar içinde kallus oluşumu görülenleri oranı sırasıyla %0.00, %10.71, %39.3; soğancık oluşumu görülenlerin oranı % 0.00, %0.00 ve %10.71 olarak ölçülmüştür. Bu değerler aynı parametrenin %3 sükroz içeren besi ortamında %3.33, %39.3, %46.43 ve %0.00, %0.00, %14.3 olarak ölçülmüştür.

MS + %0.6 agar + %6 sükroz ile düşük oranda sitokinin içeren (0.1 BA + 0.6 NAA+ 0.4 IAA) ortamda 10., 20. ve 30. günlerde canlı kalan eksplantlar içinde kallus oluşumu görülenleri oranı sırasıyla %3.22, %16.7, %48.3; soğancık oluşumu görülenlerin oranı % 0.00, %0.00 ve %14.3 olarak ölçülmüştür. Bu değerler aynı parametrenin %3 sükroz içeren besi ortamında %3.33, % 48.9, % 55.5 ve % 0.00, %3.6, %14.8 olarak ölçülmüştür.

30 günlük inkübasyon süresinin sonunda canlı kalan soğan eksplantları (karma ve büzüşme görülmeyen, kallus ve mikro soğancık oluşumu görülen), ilk kültüre alındıkları besi ortamının aynısını içeren magentalara aktarılmıştır. Magentalardaki besi ortamları 30 günde bir yenilenmiş ve eksplantların gelişimi 90 gün boyunca gözlenmiştir. Bu süre içinde, 30 günde bir ölçümler yapılmıştır. Ölçümü yapılan parametreler ve elde edilen sonuçlar tablo 4.3., tablo 4.4., tablo 4.5. ve tablo 4.6.'da verilmiştir. Magentalardaki 90 günlük gelişme süresine, eksplantların ilk kültüre alındıkları 30 günlük süre de eklendiği için ölçüm yapılan aralıklar tablolarda 60. gün, 90. gün ve 120. gün şeklinde belirtilmiştir. Bu şekilde, eksplantların besin ortamlarına aktarılmalarının ilk gününden itibaren gösterdikleri gelişmeler daha sağlıklı bir şekilde izlenebilmiştir. Bu tablolardaki her besin ortamı için verilen eksplant sayısı, baştaki 32 eksplantın petrillerdeki 30 günlük inkübasyon

süresinin sonunda canlı kalan (kallus oluşumu görülen + soğancık oluşumu görülen + kallus veya soğancık oluşumu başlamamış canlı görünen) eksplantların sayısıdır. Örneğin Tablo 4.3'te MS + %0.6 agar besi ortamı için verilen toplam 27 eksplant, bu besi ortamının tablo 4.1'de verilen 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda canlı kalan 27 eksplanttır.



Tablo 4.3 Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen bulgular

	Murashige and Skoog (MS) + % 0.6 agar						Murashige and Skoog (MS) + % 0.6 agar + % 6 sükröz (Bitki Büyüme maddesi yok)					
	60. gün		90 gün		120. gün		60. gün		90 gün		120. gün	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Enfekte olan eksplant	1	3.70	0	3.70	0	3.70	1	3.57	0	3.57	0	3.57
Canlı kalan eksplant	26	96.3	22	81.5	12	44.4	27	96.43	25	89.3	23	82.14
Sadece kallus oluşumu görülen eksplant	8	29.6	8	29.6	8	29.6	11	39.3	12	42.8	12	42.8
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	3.57	3	10.71	3	10.71
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün	0	-	0	-	0	-	3	-	4.3	-	5	-
Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	7.14	3	10.71	4	14.3
Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına soğancık	0	-	0	-	0	-	5.5	-	3.5	-	4.25	-
Direkt sürgün oluşumu görülen eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	-	0	-	2	7.14
Direkt sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün	0	-	0	-	0	-	-	-	-	-	3.5	-
Direkt soğancık olumu görülen eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	3.57	2	7.14	2	7.14
Direkt soğancık olumu görülen eksplantlarda soğancık	0	-	0	-	0	-	6	-	5.5	-	5.5	-

Tablo 4.4 Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen bulgular

	Murashige and Skoog (MS) + %0.6 agar + %6 süktroz (1BA+ 0.6NAA + 0.4 IAA, (Yüksek sitokininli ortam)						Murashige and Skoog (MS) + %0.6 agar + %6 süktroz 0.1BA+ 0.6NAA + 0.4 IAA, (Düşük sitokininli ortam)					
	60. gün		90. gün		120. gün		60. gün		90. gün		120. gün	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Enfekte olan eksplant	0	-	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
Canlı kalan eksplant	28	100	28	100	28	100	28	100	28	100	28	100
Sadece kallus oluşumu görülen eksplant	15	53.6	13	46.42	6	21.43	13	46.43	12	42.86	7	25
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplant	3	10.71	5	17.86	9	32.14	1	3.57	2	7.14	5	17.86
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı	4.3	-	6.2	-	5.7	-	4	-	5.5	-	6.7	-
Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplant	4	14.3	5	17.86	6	21.43	6	21.43	8	28.58	9	32.14
Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına soğancık	4.5	-	5.6	-	7.2	-	4.8	-	7.3	-	8.4	-
Direkt sürgün oluşumu görülen eksplant	1	3.57	3	10.71	4	14.3	0	-	1	3.57	1	3.57
Direkt sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün	4	-	5.4	-	5.6	-	0	-	5	-	9	-
Direkt soğancık olumu görülen eksplant	2	7.14	2	7.14	3	10.71	4	14.3	5	17.86	6	21.43
Direkt soğancık olumu görülen eksplantlarda soğancık	6.5	-	6.5	9.3	6.3	-	6.7	-	8.4	-	10.2	-

Tablo 4.5 Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen bulgular

	Murashige and Skoog (MS) + % 0.6 agar						Murashige and Skoog (MS) + % 0.6 agar + %3 süktroz (Bitki Büyüme maddesi yok)					
	60. gün		90. gün		120. gün		60. gün		90. gün		120. gün	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Enfekte olan eksplant	1	3.70	1	7.41	0	7.41	0	0.00	1	3.70	0	3.70
Canlı kalan eksplant	26	96.3	23	85.18	18	64.28	27	100.0	26	96.3	26	96.3
Sadece kallus oluşumu görülen eksplant	9	33.33	9	33.33	9	33.33	18	66.67	14	51.85	9	33.33
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	3.70	3	11.11	5	18.52
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün	0	-	0	-	0	-	5	-	7.2	-	7.8	-
Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	4	14.81	5	18.52	7	25.9
Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına soğancık	0	-	0	-	0	-	6.4	-	8.3	-	8.6	-
Direkt sürgün oluşumu görülen eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	-	1	3.70
Direkt sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	7	-
Direkt soğancık olumu görülen eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	4	14.81	4	14.81	4	14.81
Direkt soğancık olumu görülen eksplantlarda soğancık	0	-	0	-	0	-	6.8	-	8.4	-	8.4	-

Tablo 4.6 Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen bulgular

	Murashige and Skoog (MS) + %0.6 agar + %3 sükröz 1BA+ 0.6NAA + 0.4 IAA, (Yüksek sitokininli ortam)						Murashige and Skoog (MS) + %0.6 agar + %3 sükröz 0,1BA+ 0,6NAA + 0,4 IAA, (Düşük sitokininli ortam)					
	60. gün		90. gün		120. gün		60. gün		90. gün		120. gün	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Enfekte olan eksplant	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Canlı kalan eksplant	28	100.0	28	100.0	28	100.0	28	100.0	28	100.0	28	100.0
Sadece kallus oluşumu görülen eksplant	12	42.85	6	21.43	1	3.57	11	39.28	5	17.85	2	7.14
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplant	5	17.86	10	35.71	14	50.0	2	7.14	5	17.85	6	21.42
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı	3.4	-	12.8	-	13.7	-	6.5	-	8.4	-	9.8	-
Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplant	5	17.86	6	21.42	7	25.0	8	28.57	11	39.28	13	46.43
Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına soğancık	5.4	-	4.9	-	7.8	-	12.4	-	13.7	-	13.9	-
Direkt sürgün oluşumu görülen eksplant	1	3.57	2	7.14	2	7.14	1	3.57	2	7.14	2	7.14
Direkt sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün	6	-	7.5	-	7.5	-	7	-	5.5	-	8.5	-
Direkt soğancık olumu görülen eksplant	4	14.28	4	14.28	4	14.28	5	17.85	5	17.85	5	17.85
Direkt soğancık olumu görülen eksplantlarda soğancık	8.1	-	8.1	-	12.7	-	8.3	-	11.6	-	12.4	-

Magentalardaki besi ortamlarında enfeksiyon ya hiç görülmemiş ya da çok düşük oranda ortaya çıkmıştır. Besi ortamlarındaki toplam 221 eksplantın sadece 5'inde (%2.26) enfeksiyon gelişmiştir. Enfeksiyon gelişmesi bitki büyüme maddesi içermeyen besi ortamlarında görülmüştür. Bu bulaşma da, muhtemelen eksplantların tazelenmiş besi ortamlarına aktarılması sırasında gerçekleşmiştir.

Eksplantların magentalardaki besin ortamlarına aktarılmalarından itibaren (30. günden itibaren) 90 günlük inkübasyon sırasında besi ortamının çeşidine göre eksplantların gelişme oranında ve özellikle de gelişmenin niteliğinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin sükroz ve bitki büyüme maddesi içermeyen MS + %0.6'lık agar ortamında 90 günlük inkübasyon sonunda (120. günde) toplam 54 eksplantın %54.6'sı canlı kalabilmiştir. Bu canlı eksplantların %57.63'ünde sadece kallus gelişimi (Şekil 4.3) görülmüş direkt veya endirekt organogenezis ile sürgün, kök veya soğancık oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 4.3 ve 4.5).



Şekil 4.2 120. günden sonra *Fritillaria baskilensis* soğan pulu eksplantlarından elde edilen kallus yapıları

Bitki büyüme maddesi içermeyen MS + %0.6 agar + %6'lık sükroz ortamında 90 günlük sürenin sonunda (120. günde) canlı kalan eksplant oranı % 82.12 olarak ölçülmüştür. Bu canlı eksplantların %52.1'inde sadece kallus oluşumu, %13.04'ünde kallus + sürgün oluşumu, %17.41'inde kallus + soğancık oluşumu, %8.7'sinde direkt sürgün oluşumu ve % 8.7'sinde de direkt soğancık oluşumu görülmüştür (Tablo 4.3). Bu değerler aynı parametrenin %3 sükroz içeren besi ortamında sırasıyla; %96.3, %34.61, %19.23, %26.7, %3.84 ve % 15.38 olarak ölçülmüştür (Tablo 4.5).

MS + %0.6 agar + %6 süzkroz ile yüksek oranda sitokinin içeren (1 BA + 0.6 NAA+ 0.4 IAA) ortamda 90 günlük sürenin sonunda (120. günde) canlı kalan eksplant oranı %100 olarak ölçülmüştür. Bu canlı eksplantların %21.43'ünde sadece kallus oluşumu, %32.14'ünde kallus + sürgün oluşumu, %21.43'ünde kallus + soğancık oluşumu, %14.3'ünde direkt sürgün oluşumu ve %10.71'inde direkt soğancık oluşumu görülmüştür (Tablo 4.4). Bu değerler aynı parametrenin % 3 süzkroz içeren besi ortamı için sırasıyla; %100, %3.57, %50.0, %25.0, % 7.14 ve % 14.28 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6).

MS + % 0.6 agar + % 6 süzkroz ile düşük oranda sitokinin içeren (0.1 BA + 0.6 NAA+ 0.4 IAA) ortamda 90 günlük sürenin sonunda (120. günde) canlı kalan eksplant oranı %100 olmuştur. Bu canlı eksplantların %25'inde sadece kallus oluşumu, %17.86'sında kallus + sürgün oluşumu, %32.14'ünde kallus + soğancık oluşumu, %3.57'sinde direkt sürgün oluşumu ve %21.43'ünde direkt soğancık oluşumu görülmüştür (Tablo 4.4). Bu değerler aynı parametrenin %3 süzkroz içeren besi ortamında sırasıyla; %100, %7.14, %21.42, %46.43, % 7.14 ve % 17.85 olarak ölçülmüştür (Tablo 4.6).

Tablo 4.7 Sitokinin ve Süzkroz Konsantrasyonlarında İndirekt Soğancık Oluşumu

Sükroz Konsantrasyonu	Sitokinin Seviyesi						Toplam	
	Sıfır		Düşük		Yüksek			
	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var
%0 Sükroz	54	0	-	-	-	-	54	0
%3 Sükroz	20	7	15	13	21	7	56	27
%6 Sükroz	24	4	19	9	22	6	65	19
Toplam	98	11	34	22	43	13	175	46

Not: “-“ işaretli hücreler çalışmanın dizaynında boş bırakılmıştır.

Tablo 4.7’de görüleceği üzere süzkroz ve sitokinin olmadığı koşullarda indirekt soğan tespit edilememiştir. İndirekt soğan oluşumu için sitokinin ya da süzkroz gerekmektedir. Analizin bundan sonraki adımlarında hem ortamda süzkroz hemde sitokinin olmayan 54 gözlem çalışma dışı bırakılmıştır. Öncelikle, sitokinin seviyesi’nin ve süzkroz konsantrasyonu’nun indirekt soğan üzerindeki etkileşim etkisi sapma istatistiği ile test edilmiş, etkileşimin $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır ($\chi^2(2) = 0.239$, $p = .888$). İkinci adımda sitokinin seviyesi ve süzkroz

konsantrasyonu'nun indirekt soğan oluşumu üzerindeki etkileri bir lojistik regresyon modeli ile anlaşılmasına çalışılmış, sonuçlar Tablo 4.8'de rapor edilmiştir.

Tablo 4.8 İndirekt Soğan Oluşumu Lojistik Regresyon Sonuçları

	Tahmin	Standart Hata	t	P
Kesen Sükroz Konsantrasyonu	-1.144**	0.372	-3.073	.0021
%6 Sükroz	-0.515	0.357	-1.440	.1499
Sitokinin Seviyesi				
Düşük Sitokinin	0.959*	0.437	2.194	.0283
Yüksek Sitokinin	0.188	0.465	0.403	.6868

Not: *p<.05, **p<.01, ***p<.001. %3 Sükroz Konsantrasyonu ve Sıfır Sitokinin seviyeleri referans kategorisi kabul edilmiş, karşılaştırmalar referans kategorisine kıyasla yapılmıştır.

Tablo 4.8'de belirtilen Lojistik Regresyon sonuçlarına göre %3 Sükroz içeren ve hormon içermeyen besin ortamındaki bitkilerde indirekt soğan oluşumu olasılığı .242'dir ve bu olasılık $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı olarak .50 olasılığından düşüktür (p=.0021). Sükroz konsantrasyonu aynı olmak üzere, düşük sitokinin'e tabi tutulan bitkilerde sıfır sitokinin'e tabi tutulan bitkilere göre $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı bir indirekt soğan oluşumu olasılığı artışı gözlemlenmiştir (p=.0283). %3 sükroz ve düşük sitokinin içeren ortamdaki bitkiler 454; %6 sükroz ve düşük sitokinin içeren ortamdaki bitkiler ise 332 olasılığıyla indirekt soğan oluşturmaktadırlar. Diğer ilişkiler için anlamlı bir farklılık söz konusu değildir.

Tablo 4.9 Sitokinin ve Sükroz Konsantrasyonlarında İndirekt Sürgün Oluşumu

Sükroz Konsantrasyonu	Sitokinin Seviyesi						Toplam	
	Sıfır		Düşük		Yüksek			
	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var
%0 Sükroz	54	0	-	-	-	-	54	0
%3 Sükroz	22	5	22	6	14	14	58	25
%6 Sükroz	25	3	23	5	19	9	67	17
Toplam	101	8	45	11	33	23	179	42

Not: "--" işaretli hücreler çalışmanın dizaynında boş bırakılmıştır.

Tablo 4.9'da görüleceği üzere sükroz ve sitokinin olmadığı koşullarda indirekt sürgün tespit edilememiştir. İndirekt sürgün oluşumu için sitokinin yada sükroz

gerekmektedir. Analizin bundan sonraki adımlarında hem ortamda sükröz hemde sitokinin olmayan 54 gözlem çalışma dışı bırakılmıştır. Öncelikle, sitokinin seviyesi'nin ve sükröz konsantrasyonu'nun indirekt sürgün üzerindeki etkileşim etkisi sapma istatistiği ile test edilmiş, etkileşimin $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır ($\chi^2(2) = 0.159$, $p = .9236$). İkinci adımda sitokinin seviyesi ve sükröz konsantrasyonu'nun indirekt sürgün oluşumu üzerindeki etkileri bir Lojistik Regresyon modeli ile anlaşılmasına çalışılmış, sonuçlar Tablo 4.10'de rapor edilmiştir.

Tablo 4.10 İndirekt Sürgün Oluşumu Lojistik Regresyon Sonuçları

	Tahmin	Standart Hata	t	P
Kesen Sükröz Konsantrasyonu	-1.512***	0.414	-3.652	.0003
%6 Sükröz	-0.563	0.376	-1.498	.1341
Sitokinin Seviyesi				
Düşük Sitokinin	0.361	0.512	0.705	.4810
Yüksek Sitokinin	1.426**	0.423	3.015	.0026

Not: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. %3 Sükröz Konsantrasyonu ve Sıfır Hormon seviyeleri referans kategorisi kabul edilmiş, karşılaştırmalar referans kategorisine kıyasla yapılmıştır.

Tablo 4.10'da belirtilen Lojistik Regresyon sonuçlarına göre %3 sükröz konsantrasyonu içeren ve hormon içermeyen besin ortamındaki bitkilerde indirekt sürgün oluşumu olasılığı .181'dir ve bu olasılık $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı olarak .50 olasılığından düşüktür ($p = .0003$). Sükröz konsantrasyonu aynı olmak üzere, yüksek sitokinin içeren besin ortamındaki bitkilerde hormon içermeyen besin ortamındaki bitkilere göre $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı bir indirekt sürgün oluşumu olasılığı artışı gözlemlenmiştir ($p = .0026$). %3 sükröz ve yüksek sitokinin içeren besin ortamındaki bitkiler .478; %6 sükröz ve yüksek sitokinin içeren besin ortamındaki bitkiler ise .343 olasılığıyla indirekt sürgün oluşturmaktadır. Diğer ilişkiler için anlamlı bir farklılık söz konusu değildir.

Tablo 4.11 Sitokinin ve Sükroz Konsantrasyonlarının Direkt Sürgün Oluşumuna Etkisi

Sükroz Konsantrasyonu	Sitokinin Seviyesi						Toplam	
	Sıfır		Düşük		Yüksek			
	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var
%0 Sükroz	54	0	-	-	-	-	54	0
%3 Sükroz	26	1	26	2	26	2	78	5
%6 Sükroz	26	2	27	1	24	4	77	7
Toplam	106	3	53	3	50	6	209	12

Not: “-” işaretli hücreler çalışmanın dizaynında boş bırakılmıştır.

Tablo 4.11’de görüleceği üzere sükroz ve sitokinin olmadığı koşullarda direkt sürgün tespit edilememiştir. Direkt sürgün oluşumu için sitokinin yada sükroz gerekmektedir. Analizin bundan sonraki adımlarında hem ortamda sükroz hemde sitokinin olmayan 54 gözlem çalışma dışı bırakılmıştır. Öncelikle, sitokinin seviyesi’nin ve sükroz konsantrasyonu’nun direkt sürgün üzerindeki etkileşim etkisi sapma istatistiği ile test edilmiş, etkileşimin $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır ($\chi^2(2) = 1.024$, $p = .5992$). İkinci adımda sitokinin seviyesi ve sükroz konsantrasyonu’nun direkt sürgün oluşumu üzerindeki etkileri bir Lojistik Regresyon modeli ile anlaşılmaya çalışılmış, sonuçlar Tablo 4.12’de rapor edilmiştir.

Tablo 4.12 Direkt Sürgün Oluşumu Lojistik Regresyon Sonuçları

	Tahmin	Standart Hata	t	P
Kesen Sükroz Konsantrasyonu	-3.048***	0.694	-4.392	<.0001
%6 Sükroz	0.356	0.610	0.583	.560
Sitokinin Seviyesi				
Düşük Sitokinin	-0.016	0.840	-0.019	.985
Yüksek Sitokinin	0.737	0.735	1.003	.316

Not: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. %3 Sükroz Konsantrasyonu ve Sıfır Hormon seviyeleri referans kategorisi kabul edilmiş, karşılaştırmalar referans kategorisine kıyasla yapılmıştır.

Tablo 4.12’de belirtilen Lojistik Regresyon sonuçlarına göre %3 sükroz içeren ve hormon içermeyen besin ortamındaki bitkilerde direkt sürgün oluşumu olasılığı .045’dir ve

bu olasılık $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı olarak .50 olasılığından düşüktür ($p < .0001$). Diğer ilişkiler için anlamlı bir farklılık söz konusu değildir.

Tablo 4.13 Sitokin ve Sükroz Konsantrasyonlarının Direkt Soğancık Oluşumuna Etkisi

Sükroz Konsantrasyonu	Sitokinin Seviyesi						Toplam	
	Sıfır		Düşük		Yüksek			
	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var
%0 Sükroz	54	0	-	-	-	-	54	0
%3 Sükroz	23	4	23	5	24	4	70	13
%6 Sükroz	26	2	22	6	25	3	73	11
Toplam	103	6	45	11	49	7	197	24

Not: “-” işaretli hücreler çalışmanın dizaynında boş bırakılmıştır.

Tablo 4.13’de görüleceği üzere sükroz ve sitokinin olmadığı koşullarda direkt soğancık tespit edilememiştir. Direkt soğancık oluşumu için sitokin yada sükroz gerekmektedir. Analizin bundan sonraki adımlarında Hem ortamda sükroz hemde sitokin olmayan 54 gözlem çalışma dışı bırakılmıştır. Öncelikle, sitokin seviyesi’nin ve sükroz konsantrasyonu’nun direkt soğancık üzerindeki etkileşim etkisi sapma istatistiği ile test edilmiş, etkileşimin $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır($\chi^2(2) = 0.747$, $p = .6883$). ikinci adımda sitokin seviyesi ve sükroz konsantrasyonu’nun direkt soğancık oluşumu üzerindeki etkileri bir Lojistik Regresyon modeli ile anlaşılmasına çalışılmış, sonuçlar Tablo 4.14’de rapor edilmiştir.

Tablo 4.14 Direkt Soğancık Oluşumu Lojistik Regresyon Sonuçları

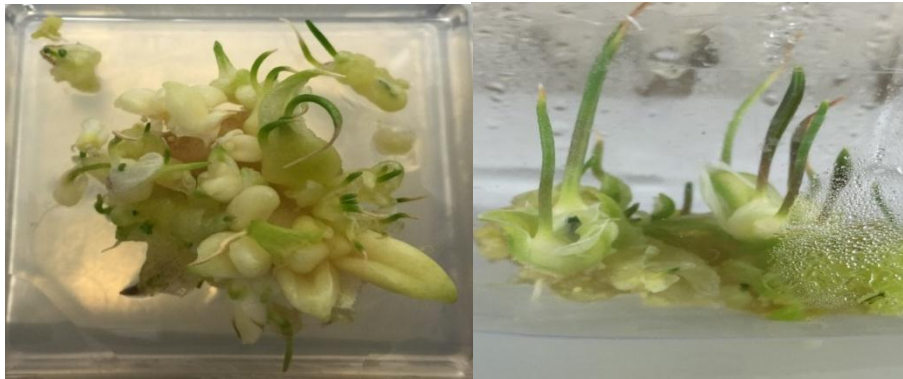
	Tahmin	Standart Hata	t	P
Kesen Sükroz Konsantrasyonu	-1.998***	0.480	-4.160	<.0001
%6 Sükroz	-0.208	0.445	-0.468	.6400
Sitokin Seviyesi				
Düşük Sitokin	0.690	0.548	1.259	.2080
Yüksek Sitokin	0.152	0.592	0.257	.7970

Not: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$. %3 Sükroz Konsantrasyonu ve Sıfır Hormon seviyeleri referans kategorisi kabul edilmiş, karşılaştırmalar referans kategorisine kıyasla yapılmıştır.

Tablo 4.14’de belirtilen Lojistik Regresyon sonuçlarına göre %3 sükroz içeren ve hormon içermeyen besin ortamındaki bitkilerde direkt soğancık oluşumu olasılığı 0.112’ dir ve bu olasılık $\alpha = .05$ seviyesinde anlamlı olarak 0.50 olasılığından düşüktür ($p < .0001$). Diğer ilişkiler için anlamlı bir farklılık söz konusu değildir.

Sürgün veya soğancık oluşumu görülen (Şekil 4.3) eksplantlarda, eksplant başına gelişen sürgün ve soğancık sayıları ve yüzdeleri tablo 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6’da verilmiştir. Bu tablolardan da görüleceği üzere eksplantların magentalardaki besin ortamlarına aktarılmasından itibaren (30. günden itibaren) 90 günlük sürenin sonunda (120. günde) sükroz ve bitki büyüme maddesi içermeyen besin ortamlarında sürgün ve soğancık gelişimi gözlenmemiştir.

Besin ortamlarının %6 sükrozbulunanlarında direkt veya endirekt organogenezis ile sürgün veya soğancık oluşumu görülen eksplantlar içinde eksplant başına gelişen sürgün ve soğancık sayısı; bitki büyüme maddesi içermeyen ortamlarda sırasıyla, 4.25, 4.875 (Tablo 4.3); yüksek sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 5.65, 6.75 (Tablo 4.4); düşük sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 7.85 ve 9.3 (Tablo 4.4) olmuştur. Bu değerler %3 sükroz bulunan ortamlarda sırasıyla, 7.4, 8.5 (Tablo 4.5); 10.6, 10.25 (Tablo 4.6); 9.15 ve 13.15 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3 120. günde *Fitillaria baskilensis* Behçet Bitkisinde Sürgün ve Soğancık oluşumu

Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda endirekt ve direkt organogenezle sürgün ve soğancık oluşumu görülen eksplantların köklendirme amacıyla hazırlanmış magentalardaki besi ortamlarında, inkübasyon süresinin 30. ve 60. günlerinde ölçülmüş köklenme oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4.15.).

Tablo 4.15 Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda endirekt ve direkt organogenezle sürgün ve soğancık oluşumu görülen eksplantların köklendirme amacıyla hazırlanmış magentalardaki besi ortamlarına aktarılmasının 30. ve 60. gününde yapılmış ölçümlerden elde edilmiş köklenme oranları

	Eksplant sayısı	Eksplantların köklenme ortamlarına aktarıldıktan sonra geçen süre (Gün)			
		30		60	
		Kök oluşumunun görüldüğü eksplant		Kök oluşumunun görüldüğü eksplant	
		Sayı	%	Sayı	%
Endirekt organogenezle oluşmuş sürgün taşıyan eksplant	124	54	43.54	87	70.16
Direkt organogenezle oluşmuş sürgün taşıyan eksplant	12	5	41.66	9	75.00
Endirekt organogenezle oluşmuş birden fazla mikrosoğancık taşıyan eksplant	28	12	42.85	22	78.57
Direkt organogenezle oluşmuş birden fazla mikrosoğancık taşıyan eksplant	13	7	53.84	10	76.92
Endirekt organogenezle oluşmuş soğancık	96	54	56.25	84	87.5
Direkt organogenezle oluşmuş soğancık	56	29	51.78	43	76.78

Bu tablodaki verilerden de anlaşılacağı üzere toplam 329 eksplantın ilk 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda ortalama %48.32'sinde, 60 günlük inkübasyon süresinin sonunda %77.50'sinde köklenme (Şekil 4.4) gerçekleşmiştir.



Şekil 4.4 Endirekt ve Direkt Organogenezle Oluşan Soğancıkların Köklenme Ortamına Aktarıldıktan 60 gün Sonra Oluşturduğu Kök Yapıları

Köklendirme ortamındaki 60 günlük inkübasyon süresinin sonunda kök ve sürgün oluşumu gerçekleşen 255 tam bitkiciğin saksılara (Şekil 4.5) ekildikten sonra (dış ortama aktarıldıktan sonra) ki gelişme durumları Tablo 4.16’de verilmiştir.

Tablo 4.16 Kök ve sürgün oluşumu görülen bitkiciklerin dış ortama (saksılara) aktarıldıktan sonra, 60 gün boyunca her 10 günde bir tespit edilen gelişme oranları

Saksılara ekimden sonra geçen süre (gün)	Su kaybından ölen bitkiler yeni sürgünler veren bitki		Canlı kalan bitki		Ölen sürgünler yerine yeni sürgünler veren bitki	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
10	163	63.9	92	36.1	-	
20	206	80.8	49	19.2	-	
30	220	86.3	35	13.7	7	2.7
40	250	98.0	5	2.0	12	4.7
50	250	98.0	5	2.0	21	8.2
60	250	98.0	5	2.0	21	8.2





Şekil 4.5 Köklenen soğancıkların saksılara aktarılması

Tablo 4.16'daki verilerden görüleceği üzere saksılara (dış ortama) aktarılan 255 tam bitkiciğin yaklaşık %64'ü ilk 10 gün içinde ölmüştür (Tablo 4.16). Bu değer 20. günde %80.8, 30. günde 86.3 ölçülmüş ve 40.günün sonunda %98 gibi çok yüksek bir orana çıkmıştır. Bitkilerin dış ortama alınmalarının 30 gününden itibaren sürgünleri ölen bitkicikler düşük oranlarda da olsa yeni sürgünler vermiştir. İlk sürgünlerini kaybedip yeni sürgün veren bitkilerin oranı 60. Günün sonunda % 8.2 olarak ölçülmüştür

4.2. Çiçek Taç Yaprığı Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular

Çiçek taç yapraklarından elde edilen ve 90 gün boyunca (30 + 30 + 30) gelişimleri izlenen eksplantlarda kayda değer bir gelişme olmamıştır. Açmamış çiçeklerin taç yapraklarından alınan ve besi ortamlarına aktarılan eksplantlarda ilk etapta az miktarda bir büyüme ve hacim artışı görülmüş, fakat bu süreç devam etmemiştir. 90. günde eksplantların tamamına yakını canlılığını kaybetmiştir. Bu parametre ile ilgili kallus oluşumu, sürgün, kök ve soğancık gelişimi gözlenmemiştir.

4.3. Çiçek Sapı Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular

Çiçeklerin saplarından elde edilen ve 90 gün boyunca (30 + 30 + 30) gelişimleri izlenen eksplantlarda kallus oluşumu, sürgün, kök ve soğancık gelişimi gözlenmemiştir. Açmamış çiçeklerin saplarından alınan ve besi ortamlarına aktarılan eksplantlarda ilk etapta uzama ile kendisini karakterize eden bir gelişme görülse de bu durum devam etmemiştir. 90. günlük inkübasyon süresinin sonunda eksplantların tamamına yakını canlılığını kaybetmiştir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'deki veriler şunları göstermektedir; *Fritillaria baskilensis* Behçet ters lalesi soğanların %70 etanolde 1 dakika, sonra birkaç damla Twenn 20 damlatılmış %30 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 30 dakika bekletilmesi ve son olarak olarak 4 defa 5'er dakika duble distile su (ddH₂O) ile yıkanması enfeksiyon oranını %10'lar seviyesinde tutmuştur. Bu değer doku kültürü çalışmalarının en büyük sorunlarından biri olan enfeksiyon riskinin azaltılması ve ortadan kaldırılması bakımından önemlidir ve bu protokolün benzer çalışmalarda kullanılabilirliğinin kanımızca göstergesidir.

Bu iki tablodaki değerlerden çıkarılabilecek bir diğer sonuç 20 ± 1 °C'de gelişmeye bırakılan ve 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanan *F. baskilensis* Behçet bitkisinin besi ortamındaki soğan eksplantlarında kallus gelişiminin en erken yaklaşık 2 hafta sonra, soğancık oluşumunu yine en erken yaklaşık 4 hafta sonra görülmesidir. Kültür başlangıç aşamasında inkübasyon şartları belirlenirken önceki yapılan çalışmalar incelenmiş ve *Fritillaria* türlerinin doku kültürü yöntemiyle çoğaltılmasında en uygun inkübasyon şartları değerlendirilmiştir (Ohkawa ve Kitajima,1998). Ohkawa ve Kitajima (1998), *F. camtschatcensis* L. Ker-Gawl. türünde, soğan pul yaprağı parçalarını in vitro kültüre almışlardır. MS ortamı, karanlık/ışık 15, 20 veya 25 °C inkübasyon sıcaklığı parametrelerinin kullanıldığı denemelerde, soğancık oluşumu için en uygun inkübasyon sıcaklığının 20 °C olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak karanlık şartların soğancık oluşumu için daha uygun olduğu belirtilmiştir. Kültür odasındaki ışık, sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler bitki türlerinin isteğine göre değişmekle birlikte 18-28 °C arasında 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyot, genellikle 30 µmol m⁻² sn⁻¹ ışık ve çoğunlukla beyaz floresan lambalar optimum koşullardır (Werbrouck ve Debergh, 1994; Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Tablo 1 ve Tablo 2' deki değerlerin ortaya çıkardığı önemli sonuçlardan biri de kallus gelişimi ile soğancık oluşumunun besi ortamındaki sükrözün ve bitki büyüme düzenleyicilerin yoğunluğuna göre değişiklik göstermesidir. Buna göre, kallus oluşumu MS + % 0.6 agardan ibaret, şeker ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kültür ortamında da gerçekleşmekte fakat bu hem çok yavaş olmakta hem de düşük oranda gerçekleşmektedir. Besi ortamında şekerin bulunması ve ayrıca şekerin yoğunluğu kallus oluşumunu büyük oranlarda olacak şekilde

hem hızlandırmış hem de yükseltmiştir. Örneğin ilk bir aylık inkübasyon süresinin sonunda MS + %0.6 agar + %3 süktroz ortamında kallus oluşumu görülen eksplant oranı süktroz içermeyen ortama göre %136, %6 süktroz içeren ortama göre %68 daha fazla olmuştur. Ortamda süktroz bulunması kallus oluşumuna göre çok daha düşük oranlarda da olsa soğancık oluşumunu teşvik etmiştir. İlk bir aylık inkübasyon süresinin sonunda süktroz içermeyen ortamda soğancık oluşumu görülmezken %3 süktroz içeren ortamda yaklaşık %11, %6 süktroz içeren ortamda yaklaşık %3 düzeyinde mikrosoğancık oluşumu gözlenmiştir.

Tüm bu sonuçlar kullanılan MS ortamının *Fritillaria baskilensis* Behçet bitkisinin *in vitro*da mikro çoğaltımı için etkili olduğunu göstermiştir. Bunu destekleyen bir çalışma da Gao ve ark. (1999) tarafından yapılmıştır. IAA, NAA ve BA'nın farklı konsantrasyonlarıyla desteklenmiş MS ortamında *F. unibracteata* bitkisinin soğanlarını kültüre alarak, MS ortamının *Fritillaria* türlerinin mikroçoğaltımı üzerine yüksek büyüme oranı ve verimine sahip olduğunu belirtmişlerdir (Gao ve ark. 1999).

Karbon kaynağı olarak %3 ve %6 oranında süktroz konsantrasyonları, soğancık oluşumunu sağlamış ancak %3 süktroz konsantrasyonu bu anlamda daha başarılı sonuçlar vermiştir. Bu sonucu destekler nitelikte bir çalışma Rahimi ve ark. tarafından *Fritillaria imperialis* bitkisi ile yapılmıştır (Rahimi, Daneshvar, ve Heidari 2014). Bu çalışmada da en yüksek rejenerasyon bitkicik sayısı 30 mg/L süktroz içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Yapılan bu çalışmada ayrıca köklenme için de %3 oranında süktroz kullanılan ortamda başarılı olunmuştur. *Fritillaria* türlerinin doku kültürü yöntemiyle çoğaltılmasında %3 süktrozun başarılı bir mikro çoğaltımı sağladığını rapor eden başka bir çalışma da Kukulczanka ve ark. (1989) tarafından yapılmıştır (Ulus ve Seyidoğlu 2006). Bu çalışmada *F. meleagris* bitkisi kullanılmıştır. Witomska ve Lukaszewska (2000) süktroz dozu 30, 60 ve 90 g/L olacak şekilde farklılaştırılan MS ortamlarında değişik eksplant tiplerini kültüre almışlardır (Witomska ve Łukaszewska 2000). Hem gövde, hem de soğan pul yaprağı (genç soğancık segmenti) eksplantlarında 60 g/L süktroz kullanılması, en yüksek soğancık oluşum oranını, en büyük soğan çapını vermiştir. Bu çalışmada en iyi sonuç %6 süktroz bulunan besin ortamından alınmasına rağmen bizim yaptığımız denemelerde en başarılı süktroz oranı 30 mg/l olarak gözlemlenmiştir. Bununla birlikte Ankara Üniversitesinde yapılan bir çalışmada *Fritillaria imperialis* ve *Fritillaria persica* türlerinden elde edilen eksplantlar fruktoz veya glukoz içeren ortamlara aktarılmıştır. Bu ortamlarda çok belirgin

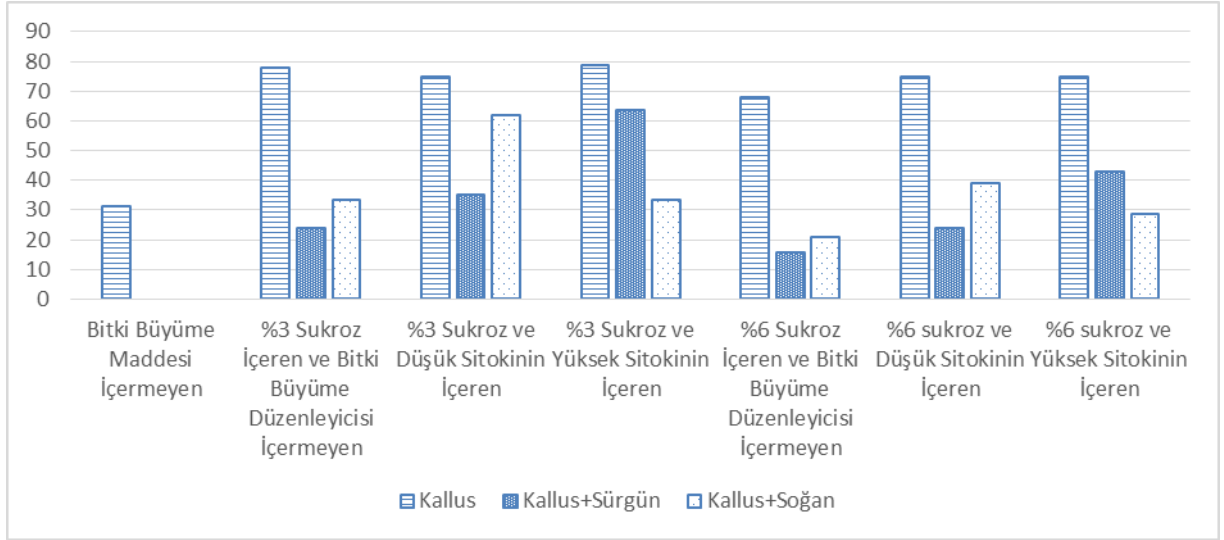
ve dikkat çekici olumlu gelişme kültürün ilk ayında ortaya çıkmış, daha sonra ise sağlıklı gelişen soğancıklar, sükrozlu ortamlarda gelişenlere göre daha fazla olmuştur (Dilik 2006). Sükrozun soğancık oluşumu üzerinde olumlu etkileri Bach and Pawlowska (1993), Gerrits and De Klerk (1992) tarafından rapor edildiği gibi, Witomska and Lukaszewska (2000) tarafından da vurgulanmaktadır (Bach ve Pawlowska 1993; Gerrits, Kim, ve De Klerk 1992; Witomska ve Lukaszewska 2000).

MS + %0.6 agar ortamında sükroza ilave olarak bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunması kallus ve soğancık oluşumunu arttırmıştır. %3 sükroz bulunan düşük sitokinin (0.1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA)'li ortamda 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda kallus oluşumu görülen eksplant oranı sükroz içermeyen ortama göre %172, bitki büyüme düzenleyicinin bulunmadığı %6 sükroz içeren ortama göre %94, yüksek sitokinin (1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA)'in bulunduğu %6 sükroz içeren ortama göre %41, düşük sitokinin (0.1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA)'in bulunduğu %6 sükroz içeren ortam ile bitki büyüme düzenleyicinin bulunmadığı %3 sükroz içeren ortama göre %15 daha fazla olmuştur. Bütün bunlar şunu göstermektedir; %3 sükroz özellikle kallus olumunu artırmakta, bu düşük sitokininli (0.1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA) besi ortamında daha fazla olmaktadır.

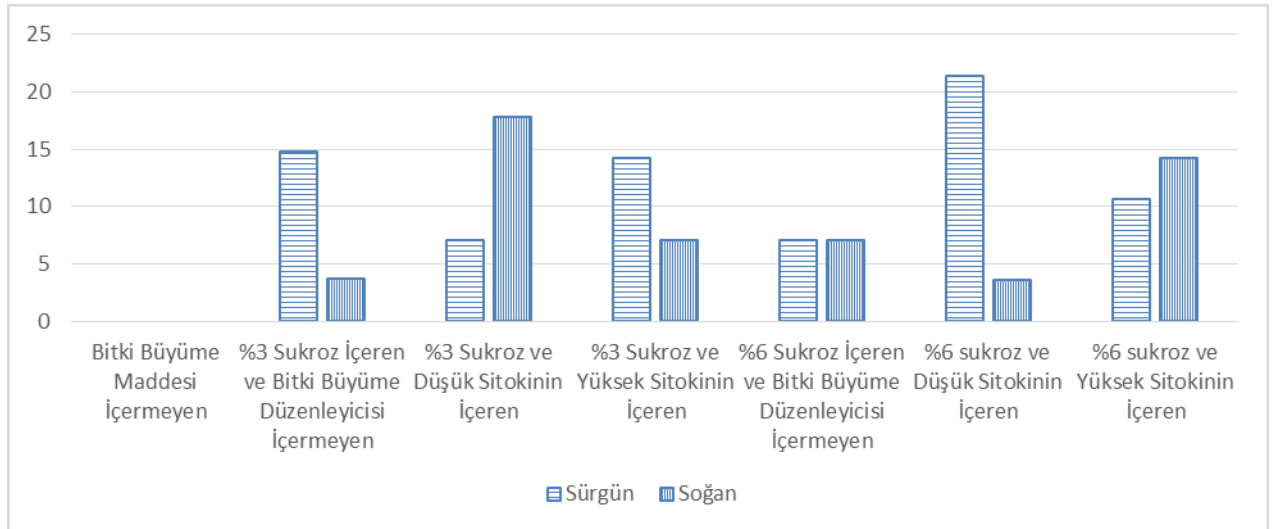
Burada ilginç bir husus da %3 sükroz içeren ortamlarda kallus oluşumun daha hızlı gerçekleşmesidir. Örneğin bir aylık inkübasyon süresinin 20. gününde yapılan ölçümlerde, %3 sükroz bulunan düşük sitokinin (0.1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA)'li ortamdaki kallus oluşumu sükroz oranı %6 olan aynı ortamdaki kallus oluşumuna göre %157, keza %3 sükroz bulunan yüksek sitokinin (1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA)'li ortamdaki kallus oluşumu sükroz oranı %6 olan aynı ortamdaki kallus oluşumuna göre %266, %3 sükroz bulunan ve bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamdaki kallus oluşumu sükroz oranı %6 olan aynı ortamdaki kallus oluşumuna göre %107 daha fazla olmuştur.

Bu dört tablo (Tablolar 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6)'daki bulguların ortaya koyduğu çarpıcı sonuçlar vardır. Bunlardan ilki temel besi ortamı MS'nda sükrozun varlığı veya yokluğunun ayrıca yoğunluğun eksplantların canlı kalma oranlarını, önceden de belirttiğimiz gibi kallus oluşumunu ve önemli bir tespit olarak organogenezi etkilemesidir. Örneğin magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda (120. günde) bitki büyüme maddesi bulunmayan %3 sükrozlu ortamda canlı kalan eksplant oranı %6 sükrozlu ortama göre %17.26, sükroz bulunmayan ortama göre %76.37 daha fazla olmuştur (Tablo 4.3 ve 4.5).

Hormonsuz temel besi ortamının (MS + %0.6 agar) süktroz içermeyenlerinde canlı kalan eksplantların yarıdan fazlasında (%57.63) kallus oluşumu gözlenmiş fakat herhangi bir doku ve organ farklılaşması, yani direkt veya indirekt organogenezis gerçekleşmemiştir (Tablo 4.3 ve 4.5). Oluşan kallusların önemli bir kısmının sert ve kompakt yapıda, az bir kısmının da yumuşak ve dağılıabilir nitelikte olduğu görülmüştür.



Şekil 5.1 Farklı Besin Ortamlarında Kallus Oluşumu ve Farklılaşması (%)



Şekil 5.2 Farklı Besin Ortamlarında Direkt Sürgün ve Soğancık Oluşumu (%)

Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicisi ve sükroz içeren ortamları kullanarak yaptığımız denemelerde kallus, kallus+sürgün, kallus+soğancık, soğancık ve sürgün oluşumu üzerine olumlu sonuçlar alınmıştır. Yalnızca bitki büyüme düzenleyicisi ve sükroz içermeyen ortamlarda sadece kallus oluşumu saptanmış, 30 g/L ve 60 g/L sükroz içeren ortamlarda az da olsa organogenezis gözlemlenmiştir.

Organogenezi ortamda sadece sükrozun bulunması değil ortamdaki sükrozun yoğunluğu da etkilemiştir. Hormonsuz temel besi ortamının (MS + %0.6 agar) %3 sükroz içerenlerinde 120. günde yapılan ölçümler sonucu canlı eksplantların yaklaşık %65'inde direkt veya endirekt organogenez, geriye kalan % 35'inde sadece kallus oluşumu görülmüştür (Tablo 4.5.). %6 sükroz içeren ortamda canlı kalan eksplantlar içinde organogenezin görüldüğü eksplant oranı yaklaşık %48 olarak ölçülmüşken (Tablo 4.3), sadece kallus oluşumu gözlenen eksplantların oranı %52 olmuştur. Yani organogenez hormon içermeyen %3'lük sükroz ortamında hormon içermeyen %6'lık sükroz ortamına göre %35 daha fazla gerçekleşmiştir. Bu besi ortamı için organogenezin görüldüğü eksplantlar incelendiğinde %3 sükroz ortamında %6 sükroz içeren ortama göre kallus + sürgün oluşumu %47.2, kallus + soğancık oluşumu % 53.3, direkt soğan oluşumu %76.7 daha fazla olmuştur. Burada sadece direkt sürgün oluşumunda bir sapma görülmüş, %6'lık sükroz ortamında %3'lük sükroz ortamına göre direkt sürgün oluşumu %126 daha fazla gerçekleşmiştir (Tablo 4.3 ve 4.5).

Besin ortamında sükrozun yanında bitki büyüme maddesi (BA, NAA, IAA) bulunması organogenezin hem süresini hem de oranını büyük oranlarda etkilemiştir.

MS + %0.6 agar + %3 sükroz ile yüksek oranda sitokinin (1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA) içeren ortamda magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda (120. günde) yapılan ölçümlerde eksplantların %96.42'sinde direkt veya endirekt organogenez, geriye kalan %3.57'sinde sadece kallus oluşumu görülmüştür (Tablo 4.6). Bu besi ortamının %6 sükroz içereninde organogenezin görüldüğü eksplant oranı %78.58, sadece kallus oluşumu gözlenen eksplantların oranı %21.43 olarak ölçülmüştür. (Tablo 4.4) Yani yüksek sitokinin ve %3 sükroz içeren besi ortamında organogenez yüksek sitokinin ve %6 sükroz içeren besi ortamına göre %22.7, hormon içermeyen %3'lük sükroz ortamına göre %48.3, hormon içermeyen % 6'lık sükroz ortamına göre %100 daha fazla olmuştur.

Bu besi ortamı için organogenezin görüldüğü eksplantlar incelendiğinde %3 sükroz ortamında %6 sükroz içeren ortama göre kallus + sürgün oluşumu %55.5, kallus +

soğancık oluşumu %16.8, direkt soğan oluşumu %33.3 daha fazla olmuştur. Burada yine sadece direkt sürgün oluşumunda bir sapma görülmüş, %6'lık sükroz ortamında %3'lük sükroz ortamına göre direkt sürgün oluşumu % 99.8 daha fazla gerçekleşmiştir (Tablo 4.3 ve 4.5).

MS + %0.6 agar + %3 sükroz ile düşük oranda sitokinin (0.1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA) içeren ortamda magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda (120. günde) yapılan ölçümlerde eksplantların %92.84'ünde direkt veya endirekt organogenez, geriye kalan %7.16'sında sadece kallus oluşumu görülmüştür (Tablo 4.6). Bu besi ortamının %6 sükroz içereninde organogenezin görüldüğü eksplant oranı %75, sadece kallus oluşumu gözlenen eksplantların oranı %25 olarak ölçülmüştür (Tablo 4.4). Yani düşük sitokinin ve %3 sükroz içeren besi ortamında organogenez düşük sitokinin ve %6 sükroz içeren besi ortamına göre % 23.7, hormon içermeyen %3'lük sükroz ortamına göre %42.8, hormon içermeyen %6'lık sükroz ortamına göre %93.4 daha fazla olmuştur.

Bu besi ortamı için organogenezin görüldüğü eksplantlar incelendiğinde %3 sükroz ortamında %6 sükroz içeren ortama göre kallus + sürgün oluşumu %19.9, kallus + soğancık oluşumu %44.4, direkt sürgün oluşumu %100 daha fazla olmuştur. Burada ise sadece direkt soğancık oluşumunda bir sapma görülmüş, %6'lık sükroz ortamında %3'lük sükroz ortamına göre direkt soğan oluşumu %20 daha fazla gerçekleşmiştir (Tablo 4.3 ve 4.5).

Temel besi ortamının sadece sükroz ve sükroz + bitki büyüme maddesi içerenlerinin hemen hepsinde belli oranlarda endirekt veya direkt organogenez görülmüştür. Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda (120. günde) yapılan ölçümlerde direkt + endirekt organogenezin görüldüğü eksplant oranları %3 sükroz içeren yüksek sitokininli ortamda %96.42 (Tablo 4.6) , %3 sükroz içeren düşük sitokininli ortamda %92.84 (Tablo 4.6), %6 sükroz içeren yüksek sitokininli ortamda % 78.58 (Tablo 4.4) ve % 6 sükroz içeren düşük sitokininli ortamda %75 olarak (Tablo 4.4) gerçekleşmiştir. Yani organogenez %3 sükroz içeren yüksek sitokininli ortamda %3 sitokinin içeren düşük sitokininli ortama göre % 3.8, %6 sükroz içeren yüksek sitokininli ortama göre %22.7 ve %6 sükroz içeren düşük sitokininli ortama göre %28.5 daha yüksek olmuştur.

Diğer taraftan endirekt organogenez direkt organogeneze göre daha yüksek oranlarda gerçekleşmiştir. Bu ortamların tamamında, magentalardaki 90 günlük

inkübasyon süresinin sonunda (120. günde) yapılan ölçümler sonucu canlı eksplantların ortalama %75.4'ünde organogenez gözlenmiştir. Canlı eksplantlar içinde endirekt organogenez ortalaması %53.73, direkt organogenezin ortalaması %21.68 olarak belirlenmiştir. (Tablolar 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6). Yani endirekt organogenez direkt organogeneze göre %139 daha fazla gerçekleşmiştir. Endirekt organogenez en fazla (% 75) %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda görülmüştür. Bu değer %3 süktroz içeren düşük sitokininli ortama göre %11.3, %6 süktroz içeren yüksek sitokininli ortama göre %40, %6 süktroz içeren düşük sitokininli ortama göre %50, %3 süktroz içeren hormonsuz ortama göre % 63 ve %6 süktroz içeren hormonsuz ortama göre %145 daha yüksektir.

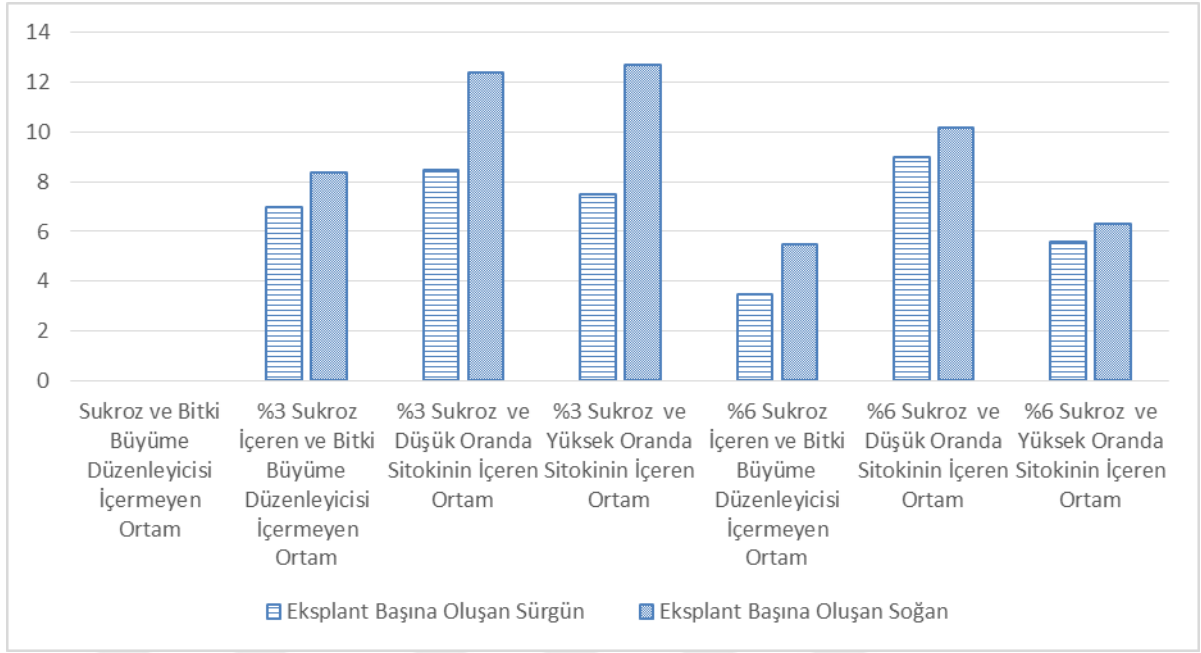
Canlı eksplantlar içinde direkt organogenez en yüksek %6 süktroz içeren yüksek sitokininli ve düşük sitokininli ortamlarda (her ikisinde de yaklaşık %25) görülmüştür (Tablo 4.4). Bunu %22 oranlarında %3 süktroz içerenlerin yüksek ve düşük sitokinin ortamları izlemiştir (Tablo 4.6). Direkt organogenez %3 süktroz içeren hormonsuz ortamda %19.22, %6 süktroz içeren hormonsuz ortamda %17.4 olarak ölçülmüştür (Tablo 4.6, Tablo 4.4). Yüksek oranda direkt sürgün ve soğancık oluşumunun gözleendiği bir çalışma da Hannweg ve ark. (1996) tarafından, *Bowiea volubilis* bitkisi kullanılarak yapılmıştır (Hannweg, Watt, ve Berjak 1996). Burda bitki büyüme ortamı olarak 30 mg/L süktroz, 1 mg/l oksin (2,4 D) ve 1 mg/L sitokinin (BA) içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara bakacak olursak bu oksin/sitokinin oranında (1:1) yüksek bir başarı elde edilmiştir. Bir başka çalışma da Göl soğanı (*Leucojum aestivum*) bitkisinin soğan pul yaprakları ve olgunlaşmamış embriyo eksplantları kullanılarak in vitro hızlı çoğaltım yapılmıştır. Bu çalışmada NAA ve BA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamı kullanılmış ve bizim elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak (oksin/sitokinin=1:1) 1 mg/L BA ve 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamında in vitro çoğaltım yüksek oranda sağlanmıştır (KARAOĞLU 2010).

Elde ettiğimiz bulgulardan çıkarılabilecek önemli bir sonuçta da sürgün ve soğancıkların oluşum hızı ile ilgilidir. %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda sürgün oluşumu daha hızlı gerçekleşmiştir (Tablo 4.6). Bu ortamda, eksplantların magentalara aktarılmasının 60. gününde yapılan ölçümlerde kallus + sürgün oluşumu görülen eksplantların oranı, %6 süktroz içeren yüksek sitokininli ortama göre %66,7, 90. günde yapılan ölçümlerde yaklaşık %100 (%99.9) daha fazla olmuştur (Tablo 4.6 ve 4.4). Bu

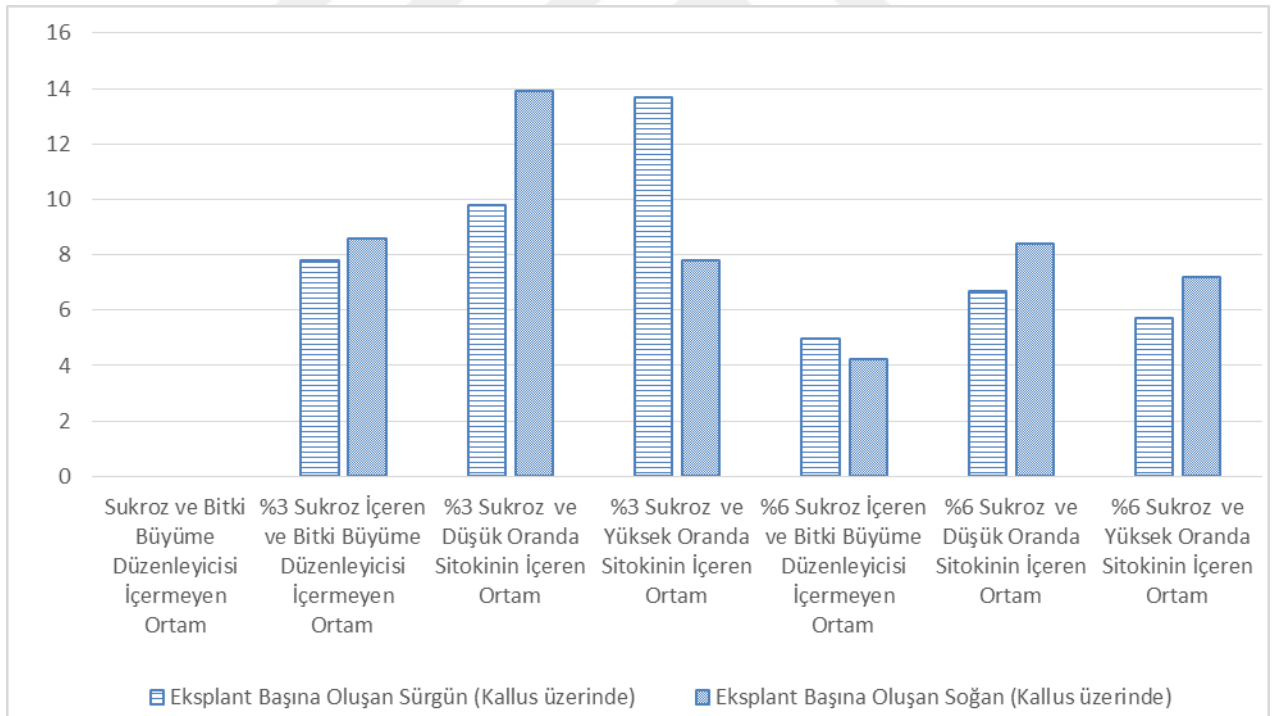
değerler %3 süktroz içeren düşük sitokinli ortama göre %150 ve %100, %6 süktroz içeren düşük sitokinli ortama göre %400 ve %400 olarak belirlenmiştir. (Tablo 4.6 ve 4.4)

Kallus + soğancık oluşum hızının ise %3 süktroz içeren düşük sitokinli ortamda en yüksek olduğu görölmektedir (Tablo 4.6). Bu ortamda, eksplantların magentalara aktarılmalarının 60. gününde yapılan ölçümlerde kallus + soğancık oluşumu görölen eksplantların oranı, %6 süktroz içeren düşük sitokinli ortama göre %33.3, 90. günde yapılan ölçümlerde yaklaşık %37.4 daha fazla olmuştur (Tablo 4.6 ve 4.4). Bu değerler %3 süktroz içeren yüksek sitokinli ortama göre %59.9 ve %83.3, %6 süktroz içeren yüksek sitokinli ortama göre %99.7 ve %119.9 olarak belirlenmiştir. (Tablo 4.6 ve 4.4).

Kallus + sürgün oluşumu görölen eksplantlar arasında, eksplant başına sürgün sayısı en fazla %3 süktroz içeren yüksek sitokinli ortamda gözlenmiştir (Tablo 4.6). Yani %3 süktroz içeren yüksek sitokinli ortam indirekt sürgün oluşumunu teşvik etmekle kalmamış, sürgün sayısında da önemli oranlarda artış sağlamıştır (Tablo 4.6). Bu hususla ilgili bir başka veri indirekt sürgün oluşumunun teşvikinde %3 süktrozdan %6 süktrozdan daha etkili olduğudur. Tablo 4.6'daki verilere bakıldığında %3 süktroz içeren sitokinli ortamlarda gerek indirekt sürgün oluşturan eksplant oranının gerekse eksplant başına sürgün sayısının %6 süktroz içeren hem yüksek hem de düşük sitokinli ortama göre daha yüksek olduğudur (Tablo 4.6 ve 4.4). Yani yüksek sitokin oranı ve %3 süktroz indirekt organogenezi hem hızlandırmakta hem de oranını yükseltmektedir.



Şekil 5.3 Farklı Besin Ortamlarında Eksplant Başına Oluşan Sürgün ve Soğancık Sayısı (Kallus Üzerinde)



Şekil 5.4 Farklı Besin Ortamlarında Eksplant Başına Oluşan Sürgün ve Soğancık Sayısı

Köklenme ortamı belirlenirken literatür bilgileri göz önünde tutulmuştur. Yapılan incelemeler sonucunda köklendirme ortamı protokolü UeiChin ve ark.(2000)'nın yapmış olduğu çalışma esas alınarak belirlenmiştir. Elde edilen soğancık ve sürgünlerden 1/2 MS

(Murashige and Skoog) + 0.6 agar + %3 sükröz + 4 mg/L NAA ve 0.5 mg/L BA içeren besi ortamı kullanılarak yüksek oranda köklendirme elde edilmiştir. Bu çalışmada tıbbi değere sahip olan *F.hupahesis* Hsiao et C. Hsia türünün doku kültürü ile çoğaltılması sağlanmıştır (UeiChin ve ark. 2000). Araştırmacılar, in vitro koşullarda elde edilen soğancıkların köklendirilmesi aşamasında 2-4 mg/L NAA kullanılmasının köklenmeyi teşvik ettiğini ; ½ MS, %3 sükröz, 0.5 mg/L BA, 4 mg/L NAA ortamında 60 gün inkübe edilen soğancıkların %65 oranında iyi bir kök sistemi oluşturduklarını belirlemişlerdir. Kullandığımız yüksek NAA konsantrasyonunu destekler nitelikte bir çalışma Ault ve James (1995) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada *Eucomis zambesi*, *E. comasa*, *E. autumnalis*'in çift pul yaprakları kullanılarak in vitro çoğaltım sağlanmış ve bu 3 türden elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda NAA içeren besiyerleri test edilmiştir. Bu çalışma sonucunda yüksek NAA eksplantların içeren ortamda tamamında köklenme elde edilmiştir (Ault 1995).

Köklenme ortamlarındaki eksplantların, iki aylık inkübasyon sürecinin sonunda yaklaşık 2/3'ünde (%77.50) köklenme gözlenmiştir (Tablo 4.15). Endirekt organogenezle oluşmuş soğancıklarda köklenme en fazla (%87.5), endirekt organogenezle oluşmuş sürgün taşıyan eksplantlarda köklenme en az (%70.16) olmuştur (Tablo 4.15). Genel olarak soğancıklardaki köklenme (%79.95) sürgün taşıyan eksplantlardaki köklenme (%72.58)'ye göre %10 daha fazla olmuştur. Bu süre içinde herhangi bir enfeksiyon gelişmesi olmamıştır. Köklenmeyen eksplantların önemli bir kısmında, eksplantın canlılık özelliğini kaybetmeye başlaması (veya kaybetmesi) belirtileri olarak nitelendirdiğimiz kahverengileşme, kararma ve büzüşme görülmüştür.

Bitkileri dış ortama aktarılmalarından sonraki süreçte büyük sorun yaşanmıştır. *Fritillaria* türlerinde dokuların gevşek olması ve su kaybı bu sorunu tetiklemiştir. Zaten bu tip çalışmalardaki temel sorunlardan biri budur (Gürlek 2011). Dış ortama (saksılara) aktarılan tam bitkiciklerin yarıdan fazlasının (%64) toprak üstü sürgünleri ilk 10 günde turgor durumunu tamamıyla kaybetmiş, plazmolize uğrayarak ölmüştür. Bu süre içinde, canlı kalan bitkiciklerde dikkate değer bir gelişme gözlenmemiş, büyük bir kısmında sürgün ucundan başlayarak aşağı doğru inen önce sararma, sonra nekrozis gözlenmiştir. Dış ortama aktarımın 40. gününde büyük bir kısmı su kaybından az bir kısmı da su kaybı + klorozis + nekrozisten dolayı bitkiciklerin %98'i ölmüştür. Geriye kalan %2 oranındaki bitkide büyüme ve gelişme gözlenmiştir. Toprak üstü sürgünlerini kaybeden bitkilerin bir kısmı yeni sürgünler vermeye başlamıştır (Tablo 4.16). 60 günlük sürenin sonunda yeni

sürgün veren bitkilerin oranı %8.2'ye çıkmıştır. Yeni sürgün veren bitkiler ve gelişme gösteren %2'lik bitki grubunun gelişmesi ilave 60 gün daha izlense de herhangi bir sonuç alınamamıştır. *Frillaria* türlerinden *in vitro* şartlarda elde edilen tam bitkiciklerin ve soğanların tarla koşulları veya saksı gibi dış ortamlara adaptasyonu aşılması gereken son engeldir. Bu son engelin aşılmasına yönelik çalışmalar yapılmasının ve yöntemler geliştirilmesinin önemi açıktır.

Bu bulguların ortaya koyduğu bazı önemli sonuçlar şunlardır; Temel besi ortamında sükrozun bulunması eksplantların canlı kalma oranını yükseltmektedir. Bitki büyüme maddesi içermeyen temel besi ortamında sükroz bulunmadığı zaman kallus oluşabilmekte, fakat organogenez gerçekleşmemektedir. Bitki büyüme maddesi içermeyen temel besi ortamında sükrozun bulunması kallus oluşumunu arttırdığı gibi düşük oranlarda da olsa organogenezi sağlayabilmektedir. %3 sükroz oranı eksplantların canlı kalması, kallus oluşumu ve organogenez üzerinde %6'lık sükroza göre daha etkili olmaktadır. %3 sükroz oranı %6 sükroza göre kallus + sürgün oluşumu ve kallus + soğancık üzerinde daha etkili olmaktadır. Temel besi ortamında %3 sükroz ve yüksek sitokinin birlikte bulunduğu zaman toplam organogenez (indirekt + direkt)'in oranı daha yüksek olmaktadır. Kallus + sürgün oluşum hızında %3 sükroz içeren yüksek sitokininli ortam, kallus + soğancık oluşum hızında %3 sükroz içeren düşük sitokininli ortam daha etkili olmaktadır. %3 sükroz ve yüksek sitokinin oranı özellikle indirekt organogeneze meydana gelen sürgün sayısını arttırmaktadır.

6. KAYNAKÇA

- Adelberg, J, M Kroggel, ve J Toler. 2000. 'Greenhouse and nursery growth of micropropagated Hostas from liquid culture', *HortTechnology*, 10: 754-57.
- Akhtar, M Nadeem, M Iqbal Choudhary, Bilge Sener, Ilkay Erdogan, ve Yoshisuke Tsuda. 2003. 'New class of steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis*', *Phytochemistry*, 63: 115-22.
- Akhtar, Muhammad Nadeem, Muhammad Iqbal Choudhary, Yoshisuke Tsuda, Bilge Sener, Assad Khalid, ve Masood Parvez. 2002. 'New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50: 1013-16.
- Aksu, Ali E, Richard N Hiscott, Peta J Mudie, André Rochon, Michael A Kaminski, Teofilo Abrajano, ve D Yaar. 2002. 'Persistent Holocene outflow from the Black Sea to the Eastern Mediterranean contradicts Noah's Flood hypothesis', *GSA Today*, 12: 4-10.
- Arslan, N, ve A Gümüşçü. 2002. 'Türkiye'nin *Fritillaria* türleri ve bunların tarımı konusunda yapılan çalışmalar. II', *Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, Antalya*: s303-09.
- Ault, James R. 1995. 'In vitro propagation of *Eucomis autumnalis*, *E. comosa*, and *E. zambesiaca* by twin-scaling', *HortScience*, 30: 1441-42.
- Babaoğlu, Mehmet, Ekrem Gürel, ve Sebahattin Özcan. 2001. 'Bitki Biyoteknolojisi. Doku kültürü ve uygulamaları', *Konya, Turkey: Selçuk University Press (in Turkish)*.
- Bach, A, ve B Pawlowska. 1993. 'Effect of type of carbohydrates in regeneration of *Hyacinthus orientalis* L. in long-term cultures', *Folia Horticulturae*, 5.
- Baker, John Gilbert. 1874. 'Revision of the Genera and Species of Tulipeæ', *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 14: 211-310.
- Bakhshi Khaniki, G. 1998. 'Taxonomy and karyology of the genus *Fritillaria* s. lat.(Liliaceae) in South West Asia with special reference to the species in Iran', Ph. D. Thesis, Göteborg University, Sweden.
- Basak, N. 1991. 'The genus *Fritillaria* (Liliaceae) in European Turkey', *Bot. Chronika*, 10: 841-44.
- Behçet, L. 1998. 'A new species of *Fritillaria* L.(Liliaceae) from east anatolia Turkey', *Bull. Pure Appl. Sci. B*, 17: 1-2.

- Bian, Y, P Li, Z Gao, Y Wang, K Zhou, KW Tsim, ve T Dong. 2000. '[Application of RAPD in the taxonomy of the genus *Fritillaria*]', *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials*, 23: 13-16.
- Bingöl, F., Şener, B., Koyuncu, M., Rahman, A. 1997. 'Steroidal Alkoloids of *Fritillaria persica*', *J.Fac. Pharm. Gazi*, 14,2: 81-85.
- Cai, ZH, P Li, TTX Dong, ve KWK Tsim. 1999. 'Molecular diversity of 5S-rRNA spacer domain in *Fritillaria* species revealed by PCR analysis', *Planta medica*, 65: 360-64.
- Choe, Hyeok-Jae. 2003. 'Taxonomy of the *Allium* sect. *Sacculiferum* in Korea: with a special reference to the morphology', *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 33: 339-39.
- Czynczyk, Alojzy, ve Tadeusz Jakubowski. 2004. "Value of standard and new selected rootstocks for apples in Poland." In *VIII International Symposium on Canopy, Rootstocks and Environmental Physiology in Orchard Systems* 732, 51-57.
- Davis, Peter Hadland. 1965. *Flora of Turkey and the east Aegean islands* (Edinburgh University Press).
- Dilik, Mehtap. 2006. 'Şemdinli Lalesi (*Fritillaria imperialis* L.) ve Adıyaman Lalesi (*F. persica* L.)'nin Doku Kültürüyle Çoğaltılması', Ankara Üniversitesi.
- Donner, Josef. 1990. 'Distribution maps to PH Davis, Flora of Turkey, 1-10', *Linz. Biol. Beitr*, 22: 381-515.
- Duran, Ahmet, ve Hayri Duman. 2002. "Two new species of *Centaurea* (Asteraceae) from Turkey." In *Annales Botanici Fennici*, 43-48. JSTOR.
- Ekim, T, M Koyuncu, A Güner, S Erik, B Yıldız, ve M Vural. 1991. 'Türkiye'nin ekonomik değer taşıyan geofitleri üzerinde taksonomik ve ekolojik araştırmalar', *Orman Genelen Müdürlüğü Yayını/ANKARA*.
- Ekim, T, M Koyuncu, M Vural, H Duman, Z Aytaç, ve N Adıgüzel. 2000. 'Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Pteridophyta ve Spermatophyta), Ankara: TTKD ve Van 100', *Yıl Üniversitesi Yayını*.
- Farooq, Afgan, M Iqbal Choudhary, Anwarul Hassan Gilani, Farhana Shaheen, Rahat Azhar Ali, ve Bilge Sener. 1994. 'A new anticholinergic steroidal alkaloid from *Fritillaria imperialis* of Turkish origin', *Planta medica*, 60: 377-79.
- Feinbrun-Dothan, Naomi. 1986. 'Flora Palaestina: part 4. Text. Alismataceae to Orchidaceae', *Jerusalem: Israel Academy of Sciences and Humanities* xiii, 462p.-illus., maps, chrom. nos., keys.. *En Icones, Maps, Chromosome numbers. Geog*, 2.

- Gao, SL, DN Zhu, ZH Cai, Y Jiang, ve DR Xu. 1999. 'Organ culture of a precious Chinese medicinal plant–*Fritillaria unibracteata*', *Plant cell, tissue and organ culture*, 59: 197-201.
- Gençer, Ayhan, Hüdaverdi EROĞLU, ve AYAZ Ufuk. 2009. 'Buğday Saplarından (*Triticum aestivum* L.) KOH-Hava Yöntemiyle Üretilmiş Kâğıtların Su Emiciliğinin Tayini (Cobb Metodu)', *Uluslararası Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 11.
- Gerrits, MM, KS Kim, ve GJ De Klerk. 1992. "Hormonal control of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* cultured in vitro." In *VI International Symposium on Flower Bulbs* 325, 521-28.
- Guner, A, N Ozhatay, T Ekim, ve KHC Baser. 2000. 'Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press'.
- Güner, A, N Özhatay, T Ekim, ve KHC Başer. 2000. 'Flora of Turkey and the east Aegean islands, Vol. 11', *Second Supplement, Edinburgh*.
- Gürlek, Derya. 2011. '*Fritillaria imperialis* L. Ve *Fritillaria perica* L. Türlerinde in vitro Soğancık Üretimi Üzerine Araştırmalar', Ankara Üniversitesi.
- Hannweg, K, MP Watt, ve P Berjak. 1996. 'A simple method for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants', *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 37.
- Heywood, VD. 1978. 'Flowering Plants Of The World, Oxford Üniv. Press, London, p. 239'.
- Kahraman, Özgür, ve Ercan Özzambak. 2006. 'Adıyaman Lalesinde Farklı Soğan Çevre Büyüklüklerinin Bitki Gelişimi Üzerine Etkileri', *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 6: 59-64.
- Kamari, G. 1991. 'The genus *Fritillaria* L.', *Greece: taxonomy and karyology. Bot. Chronika*, 10: 253-70.
- Karagöz, A, N Zencirci, A Tan, T Taşkın, H Köksel, M Sürek, C Toker, ve K Özbek. 2010. 'Bitki genetik kaynaklarının korunması ve kullanımı', *Türkiye Ziraat Mühendisleri Odası VII. Teknik Kongresi*: 11-15.
- Karaoğlu, Cuma. 2010. 'Soğanlı Bitkiler ve İn Vitro Hızlı Çoğaltım', *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 19.

- Kartal, Ciler. 2015. 'Microsporogenesis, microgametogenesis and in vitro pollen germination in the endangered species *Fritillaria stribnyi* (Liliaceae)', *Caryologia*, 68: 36-43.
- Khaniki, G Bakhshi. 1997. '*Fritillaria atrolineata* (Liliaceae), a new species from Iran', *Edinburgh Journal of Botany*, 54: 171-81.
- Khaniki, GB. 1995. 'Karyomorphological studies on *Fritillaria crassifolia* ssp. *kurdica*', *Nucleus*, 38: 49-55.
- Khaniki, Gholamreza Bakhshi. 1998. 'Taxonomy and karyology of the genus *Fritillaria* s. lat.(Liliaceae) in south west Asia with special reference to the species in Iran'.
- Kitajima, Junichi, Naoki Noda, Yoshiteru Ida, Kazumoto Miyahara, ve Toshio Kawasaki. 1981. 'Steroidal alkaloids of fresh bulbs of *Fritillaria thunbergi* and of crude drug" bai-mo" prepared therefrom', *Heterocycles*, 15: 791-96.
- Kizil, Suleyman, ve Khalid Mahmood Khawar. 2014. 'the Effects Of Plant Growth Regulators And Incubation Temperatures On Germination And Bulb Formation Of *Fritillaria Persica* L', *Propagation of Ornamental Plants*, 14: 133-38.
- Koltunow, Anna M, Tetsushi Hidaka, ve Simon P Robinson. 1996. 'Polyembryony in Citrus (Accumulation of Seed Storage Proteins in Seeds and in Embryos Cultured in Vitro)', *Plant physiology*, 110: 599-609.
- Komarov, VL. 1968. 'Flora of the USSR Israel Program for Scientific Translations', *Jerusalem, Israel*.
- Konchar, Katie, Xiao-Li Li, Yong-Ping Yang, ve Eve Emshwiller. 2011. 'Phytochemical Variation in *Fritillaria cirrhosa* D. Don (Chuan Bei Mu) in Relation to Plant Reproductive Stage and Timing of Harvest¹', *Economic botany*, 65: 283-94.
- Kosenko, VN. 1991a. 'Palinomorfologiya semeistva Liliaceae s. str', *Palynomorphology of the family Liliaceae s. str.) Bot. Zhurn*, 76: 1696-706.
- Kosenko, VN. 1991b. 'Pollen morphology of the genus *Fritillaria* (Liliaceae)', *Bot. Zh.(Leningrad)*, 76: 1696-706.
- Kosenko, VN. 1992. 'Pollen morphology and systematic problems of the Liliaceae family', *Bot. Zh., ross. Akad. Nauk*, 77: 1-15.
- Kosenko, VN. 1999. 'Contributions to the pollen morphology and taxonomy of the Liliaceae', *Grana*, 38: 20-30.
- Koyuncu, M., Yilmaz, O. 2000. "Peyzaj mimarlığında doğal geofitlerden yararlanma." In *2000'li yıllarda yaşadığımız çevre ve peyzaj mimarlığı sempozyumu*, 145. Ankara.

- Kukulczanka, K, K Kromer, ve B Czastka. 1988. "Propagation of *Fritillaria meleagris* L. through tissue culture." In *III International Symposium on Growth Regulators in Ornamental Horticulture* 251, 147-54.
- La Cour, Leonard Francis. 1978. 'The constitutive heterochromatin in chromosomes of *Fritillaria* sp., as revealed by Giemsa banding', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 285: 61-71.
- Li, Song-lin, Shun-wan Chan, Ping Li, Ge Lin, Guo-hua Zhou, Yan-jun Ren, ve Francis Chi-keung Chiu. 1999. 'Pre-column derivatization and gas chromatographic determination of alkaloids in bulbs of *Fritillaria*', *Journal of chromatography A*, 859: 183-92.
- Li, YF, YX Li, J Lin, Y Xu, F Yan, L Tang, ve F Chen. 2003. 'Identification of bulb from *Fritillaria cirrhosa* by PCR with specific primers', *Planta medica*, 69: 186-88.
- Lin, Ge, Ping Li, Song-Lin Li, ve Shun-Wan Chan. 2001. 'Chromatographic analysis of *Fritillaria* isosteroidal alkaloids, the active ingredients of Beimu, the antitussive traditional Chinese medicinal herb', *Journal of chromatography A*, 935: 321-38.
- Linnaeus., C. 1960. 'Genera Plantarum', *H. R. Engelman (J. Cramer) and Wheldon and Wesley Ltd*: 144.
- Marshall, Dale. 1988. 'A Bibliography of Rhubarb and Rheum species', *Bibliographies and literature of agriculture (USA)*.
- Murashige, Toshio. 1974. 'Plant propagation through tissue cultures', *Annual review of plant physiology*, 25: 135-66.
- Naqinezhad, A, ve Sh Saeidi Mehrvarz. 2007. 'Some new records for Iran and Flora Iranica area collected from Boujagh National Park, N. Iran', *The Iranian Journal of Botany*, 13: 112-19.
- Norton, HH, Eugene S Hunn, CS Martinsen, ve PB Keely. 1984. 'Vegetable food products of the foraging economies of the Pacific Northwest', *Ecology of Food and Nutrition*, 14: 219-28.
- Ohkawa, M. 2001. 'Effects of concentrations of MS medium, sucrose and polyethylene glycol on bulblet growth of *Fritillaria camtschaticensis* Ker-Gawl. by a rotary shaker', *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*.
- Ohkawa, M, ve J Kitajima. 1998. 'Studies on the propagation of *Fritillaria camtschaticensis* ker-gawl, by in vitro culture, 1: Characteristics of sprouting, leafiness, flowering

- and new bulb formation from mother bulb, and bulblet formation from small globule-scale', *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*.
- Ohkawa, M, J Kitajima, K Nishino, ve N Ohkawa. 1999. 'Studies on the propagation of *Fritillaria camtschaticensis* Ker-Gawl. by in vitro culture, 2: Effect of plant hormones on the growth, leaf emergence, and rooting of bulblets', *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*.
- Ohkawa, M, ve K Nishino. 1999. 'Effect of temperature and light intensity on growth of the regenerated bulblet of *Fritillaria camtschaticensis* Ker-Gawl. in vitro culture', *Environment Control in Biology (Japan)*.
- Onay, A. 2000. 'Histology of somatic embryo initiation and development in pistachio (*Pistacia vera* L.)', *Turkish Journal of Botany*, 24: 91-95.
- Onay, A. 2003. 'Micropropagation of pistachio. In: Micropropagation forest trees and fruits', *Forestry Sciences, The Netherlands*, 75.
- Onay, A. 2005. 'Pistachio, *Pistacia vera* L. In: Protocols for Somatic Embryogenesis In Woody Plants. In: Forestry Sciences', *Kluwer Academic Publishers, The Netherlands*: 289–300.
- Ozhatay, N, ve A Byfield. 1995. 'A new *Fritillaria* L.(Liliaceae) from south-west Turkey', *Karaca Arbor. Mag*, 3: 7-16.
- Ozler, H, ve S Pehlivan. 2007. 'Comparison of pollen morphological structures of some taxa belonging to *Asparagus* L. and *Fritillaria* L.(Liliaceae) from Turkey', *Bangladesh Journal of Botany*, 36: 111-20.
- Özcan, S., Sancak, C., Mirici, S., Parmaksız, İ., Uranbey, S., Sarihan, E., Çöçü, S., İpek, A. ve Kaya, M.D. . 2005. "*Muscari muscarimi*'nin in vitro Şartlarda Hızlı Çoğaltımı ve Kültüre Alınması." In.: Ankara Üniversitesi Bilimsel Araşt. Projesi Kesin Raporu
- Özcan, Sebahattin, İskender Parmaksız, Semra Mirici, Sati Çöçü, Serkan Uranbey, Arif İpek, Cengiz Sancak, Ercüment O Sarihan, Bilal Gürbüz, ve Cafer S Sevimay. 2007. 'Efficient in vitro bulblet regeneration from immature embryos of endemic and endangered geophyte species in *Sternbergia*, *Muscari* and *Fritillaria* Genera.' in, *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond* (Springer).
- Özhatay, Neriman, ve Şükran Kültür. 2006. 'Check-list of additional taxa to the supplement flora of Turkey III', *Turkish Journal of Botany*, 30: 281-316.

- Özler, H. 2001. '*Asparagus* L., *Allium* L., *Muscari* Miller ve *Fritillaria* L.(Liliaceae) Cinslerine ait bazı türlerin Polenlerinin Morfolojik Yapılarının İncelenmesi', *Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*, 161-184
- Paek, KY, ve HN Murthy. 2002. 'High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*', *Plant cell, tissue and organ culture*, 68: 247-52.
- Paek, KY, NS Sung, ve CH Park. 1996. "Several factors affecting bulblet regeneration from the culture of scale segment and node-bud in fritillary as medicinal bulbous plant." In *International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems* 440, 498-503.
- Persson, J, ve K Persson. 1998. '*Fritillaria sororum* (Liliaceae): a new species from Turkey', *New Plantsman (United Kingdom)*.
- Pignatti, S. 1982. "Flora d'Italia. Edagricole, Bologna, 3 Voll." In.
- Rahimi, Mojtaba, Mohammad Hosein Daneshvar, ve Mokhtar Heidari. 2014. 'Received: 4th May-2014 Revised: 24th May-2014 Accepted: 6th June-2014 Research article Propagation And Bulb Formation Of *Fritillaria* (*Fritillaria Imperialis* L.) Via In Vitro Culture'.
- Rees, Alun Rocyn. 1992. *Ornamental bulbs, corms and tubers* (CAB international).
- Rix, EM. 1975. 'Notes on *Fritillaria* (Liliaceae) in the Eastern Mediterranean Region, III', *Kew Bulletin*: 153-62.
- Rix, EM. 1979. 'Notes on *Fritillaria* (Liliaceae) in the Eastern Mediterranean Region: IV', *Kew Bulletin*: 585-600.
- Rix, EM. 2001. '*Fritillaria*. A Revised Classification. The *Fritillaria* Group of the Alpine Garden Society', *United Kingdom*.
- Rix, Martyn, ve Roger Phillips. 1981. *The bulb book: a photographic guide to over 800 hardy bulbs* (London: Pan Books Ltd. 192p.-col. illus.. En Ed. B. Mathew. Icones. Geog).
- Rønsted, Nina, Steve Law, Hannah Thornton, Michael F Fay, ve Mark W Chase. 2005. 'Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria*', *Molecular phylogenetics and evolution*, 35: 509-27.
- Rushden, J. 1993. 'Fritillaries', *Country-side*, 28: 40-41.
- Scanzoni, Erika von. 1971. 'Blutenzauber aus Zwiebeln und Knollen'.

- Schulze, W. 1980. 'Beitrage zur Taxonomie der Liliifloren. VI. Der Umfang der Liliaceae', *Wiss Z. Friedrich-Schiller-Univ. math.-naturw. Reihe*, 29: 607-36.
- Schweizer, Dieter. 1973. 'Differential staining of plant chromosomes with Giemsa', *Chromosoma*, 40: 307-20.
- Seon, JH, KY Paek, WY Gao, CH Park, ve NS Sung. 1997. "Factors affecting micropropagation of pathogen-free stocks in *Fritillaria thunbergii*." In *II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 3: Agricultural Production, Post Harvest Techniques, Biotechnology 502*, 333-38.
- Shujun, Wang, Gao Wenyuan, Jia Wei, ve Xiao Peigen. 2006. 'Crystallography, morphology and thermal properties of starches from four different medicinal plants of *Fritillaria* species', *Food Chemistry*, 96: 591-96.
- Sun, CS, CC Chu, ve CC Wang. 1977. 'Callus formation and organ regeneration in the tissue culture of *Fritillaria thunbergii* Miq', *Chih wu hsueh pao*.
- Sun, CS, ve DY Wang. 1991. '*Fritillaria* spp.(Fritillary): in vitro culture and the regeneration of plants.' in, *Medicinal and Aromatic Plants III* (Springer).
- Şahin, B., Aslan S., Ünal S., Mutlu, Z., Mermer, A., Öztekin, U., Ünal E., Özeydin, K. A., Aavaş, A., Yıldız, H. 2015. 'Çankırı İli Meralarının Floristik Özellikleri', *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24.
- Tan, K, ve RJD McBeath. 1987. 'Notes on some Fritillaries in cultivation', *Herbertia (USA)*.
- Tang, W. 1995a. 'Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of *Fritillaria ussuriensis* M.', *Journal of Northeast Agricultural University English Edition*, 2: 152-55.
- Tang, W., Guí, Y. L., Guo, Z. C. 1995b. 'A study of morphogenesis in tissue cultures of *Fritillaria ussuriensis* Maxim', *Research of Agricultural Modernization*, 16: 267-69.
- Tang, W., Wu, J.Y. 1993. 'Studies on somatic embryogenesis in *Fritillaria ussuriensis*', *Acta Agronomica Sinica*, 19: 188-89.
- Tekşen, M., ve Zeki, A., 2008. '*Fritillaria mughlae* (Liliaceae), a new species from Turkey.' In *Annales Botanici Fennici*, 141-47. JSTOR.
- Tekşen, M., ve Zeki, A., 2011. 'The revision of the genus *Fritillaria* L.(Liliaceae) in the Mediterranean region (Turkey)', *Turkish Journal of Botany*, 35: 447-78.
- Tosheva, A, ve I Traykov. 2013. 'Contribution to the Chorological Data of Some Aquatic Plants in Bulgaria', *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19: 222-24.

- Tutin, TG, VH Heywood, NA Burges, DH Valentine, SM Walters, ve DA Webb. 1964. 'Flora Europaea—Cambridge University Press', Cambridge (1964–1980).
- Tümen, G, M Koyuncu, N Kirimer, ve KHC Baser. 1994. 'Composition of the Essential Oil of *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal', *Journal of Essential Oil Research*, 6: 97-98.
- Türktaş, M., Aslay, M., Kaya, E., Ertuğrul, F., 2012. "Molecular characterization of phylogenetic relationships in *Fritillaria* species inferred from chloroplast trnL-trnF sequences", *Turkish Journal of Biology*, 36: 552-60.
- UeiChin, Chen, Tai ChungDer, Chen ChungChuan, ve Tsay HsinSheng. 2000. 'Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hsiao et KC Hsia. IV. Influence of medium component and light treatment on in vitro rooting, and acclimatization of bulblet', *Journal of Agricultural Research of China*, 49: 39-47.
- Ulug, BV. 1997. 'Researches on the effect of different ecologies and propagation of persian lily bulbs (*Fritillaria persica* Linn.) with various vegetative methods'.
- Uluğ, B. V. 1997. 'Adıyaman Lalesi (*Fritillaria persica* L.) Soğanlarının Değişik Vejetatif Yöntemlerle Üretilmeleri ve Farklı Ekolojilerin Yavru Soğan Gelişmesine Etkileri Üzerine Araştırmalar', *Tekirdağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı*.
- Ulus, Aysel, ve Nilüfer Seyidoğlu. 2006. 'Bazı doğal geofitlerin doku kültürü ile üretimi', *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University (JFFIU)*, 56: 71-80.
- Wang, LS, HB Ding, YF Wang, HM Yang, ve TY Jia. 1990. 'Chromosomal variation in callus subcultures of *Fritillaria pallidiflora*', *Acta Botanica Sinica*, 32: 241-44.
- Wang, Shujun, Wenyan Gao, Haixia Chen, ve Peigen Xiao. 2005. 'New starches from *Fritillaria* species medicinal plants', *Carbohydrate polymers*, 61: 111-14.
- Watson, L, ve MJ Dallwitz. 1999. *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval* (University of New Orleans).
- Witomska, M, ve A Łukaszewska. 2000. 'Effect of sucrose concentration on regeneration in vitro from different explants of *Fritillaria imperialis* L', *Annals of Warsaw Agricultural University, Horticulture (Landscape Architecture)*: 21-28.
- Yamagishi, M. 1991. 'In vitro propagation of triploid *Fritillaria camtschaticensis* (L.) Ker Gawler. Bulletin of Research Institute of Agricultural Resources', *Ishikawa Agricultural College*, 2: 19-26.
- Yaylaci, O Koray, Kurtulus Ozgisi, Okan Sezer, Gokhan Orhanoglu, Dervis Ozturk, ve Onur Koyuncu. 2013. 'Anatomical studies and conservation status of rare endemic

- Hypericum sechmenii* Ocak&Koyuncu (Sect: Adenosepalum) from Eskişehir-Turkey', *Journal of Selcuk University Natural and Applied Science*, 2: pp 1-11.
- YihJuh, Shiau, Tai ChungDer, Chen ChungChuan, ve Tsay HsinSheng. 2000. 'Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hsiao et KC Hsia. I. The induction of bulbscale and embryogenic callus from different source explants', *Journal of Agricultural Research of China*, 49: 29-38.
- Yıldırım, Ş. 1988. 'Türkiye'nin batı yarısı ve kuzeyindeki *Isatis* L', *Cruciferae) cinsinin revizyonu. Doğa Türk Botanik Dergisi*, 12: 332-400.
- Yuoh-Fong, Chi, YS Kao, ve KJ Chang. 1936. 'The Alkaloids of *Fritillaria roylei*. Isolation of Peimine1', *J. Am. Chem. Soc*, 58: 1306-07.
- Zaharof, E., 1989a. 'Karyological studies of twelve *Fritillaria* species from Greece', *Caryologia*, 42: 91-102.
- Zaharof, E.. 1989b. 'Karyotype variation of *Fritillaria graeca* and *F. davisii* from Greece', *Nordic journal of botany*, 9: 367-73.