



**SAFRAN (*Crocus sativus* L.) BİTKİSİNİN
MİKROÇOĞALTIMI**

Ayça ŞAHİNALP

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Nazmi GÜR
TEMmuz-2017**

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAFRAN (*Crocus sativus* L.) BİTKİSİNİN MİKROÇOĞALTIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayça ŞAHİNALP

(132132101)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 Temmuz 2017
Tezin Savunulduğu Tarih : 27 Temmuz 2017

Tez
Danışmanı :

Doç. Dr. Nazmi GÜR (F.Ü)

Diğer Jüri
Üyeleri :

Prof. Doç. Dr. Ömer MUNZUROĞLU (F.Ü)

Yrd. Doç. Dr. Murat KÜRŞAT (B.E.Ü)



TEMMUZ-2017

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan, laboratuvar çalışmalarında her türlü çalışma olanağını sağlayan, çalışma sürecini sürekli olarak izleyen ve başarıyla bitirilmesi için tüm aşamalarında değerli görüş ve katkılarıyla çalışmamı yönlendiren, ilgi ve desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocam, Tez danışmanım Doç. Dr. Nazmi GÜR'e çok teşekkür ederim.

Bu süreçte büyük bir fedakârlık ile her türlü maddi ve manevi desteği esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve beni bugünlere getiren değerli anne ve babama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayça ŞAHİNALP

Elazığ-2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
RESİMLER LİSTESİ.....	VIII
FOTOĞRAF LİSTESİ.....	IX
TABLolar LİSTESİ	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.) Genel Bilgi.....	1
1.2. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.) Bitkisinin Tarihçesi.....	1
1.2.1. Doğu Akdeniz	2
1.2.2. Asya.....	3
1.2.3. Avrupa.....	3
1.3. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.)' ın Taksonomisi	4
1.4. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.)'nın Morfolojisi.....	4
1.5. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.) Yetiştirme Şartları.....	7
1.6. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.) Baharatının Elde Edilişi.....	8
1.7. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.)'ın Kimyasal Yapısı	9
1.8. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.)'ın Ekonomik Önemi	11
1.9. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.)'nın Yetiştirme Zorlukları.....	12
1.10. Önceki Çalışmalar.....	14
2. MATERYAL-METOT	16

2.1. Materyal	16
2.2. Metot	18
2.2.1. Kullanılan MS Besi Ortamı ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....	18
2.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması:	18
2.2.3. Sterilizasyon İşlemleri.....	20
2.2.3.1. Ekim Esnasında Kullanılacak Malzemelerin Sterilizasyonu.....	20
2.2.3.2. Ön Sterilizasyon İşlemi	20
2.2.3.3. Safran Kormlarının Yüzey Sterilizasyonu:	20
2.2.4. Safran Kormlarının Kültüre Alınması.....	21
2.2.4.1. BBD'siz MS Besi Ortamında Sürgün Rejenerasyonu	21
2.2.4.2. Sürgün Uçlarından Somatik Embriyo Rejenerasyonu.....	21
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	22
3.1. SONUÇLAR.....	22
3.1.1. Safran Kormlarından Sürgün Rejenerasyonu.....	22
3.1.2. Sürgün Uçlarından Somatik Embriyo Rejenerasyonu	24
3.2. TARTIŞMA	35
4. KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	42

ÖZET

Bu çalışmada, in vitro şartlarda safran (*Crocus sativus* L.) bitkisinin soğanlarından elde edilen sürgün uçları kullanılarak, somatik embriyo üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla; besin ortamlarına farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiş ve bunların somatik embriyo oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir.

Ön sterilizasyon ve yüzey sterilizasyonu işlemleri yapılan safran soğanları, içerisine bitki büyüme düzenleyicisi eklenmemiş, % 3 sukroz ve % 0.8 plant agar içeren ve pH'sı 5.8'e tamponlanmış, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilen MS (Murashige Skoog) besiyerine ekilmiştir. Kültür ortamı olarak 24±2 °C ve 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyot kullanılmıştır. Sürgün oluşumunun ardından sürgün uçları kesilerek, somatik embriyo oluşumu için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. İn vitro somatik embriyo üretiminde sukroz ve plant agar içeren MS besiyeri içerisine bitki büyüme düzenleyicisi olarak; iki farklı konsantrasyonda (1 ve 0.5 mg/l) BAP (6-Benzilaminopürin) ile desteklenmiş farklı konsantrasyonlarda (1, 0.5, 0.25 mg/l) 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit), P (Pikloram), NAA (Naftalin asetik asit), IBA (İndol-3-Bütirik asit), IAA (İndol-3-Asetik asit) eklenmiştir. Farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda BBD içeren besi ortamında kültüre alınan sürgünlere iki ayda bir alt kültürleme işlemi yapılarak yaklaşık 151 günde sonuçlar alınmış ve sürgünlerden somatik embriyolar rejenere edilmiştir. Sürgünlerden somatik embriyo rejenerasyonu için 1 mg/L BAP içeren ortamlardan en iyi sonuçlar alınmıştır. IAA ve 2,4-D içeren ortamlarda somatik embriyo gelişimi gözlenmemiştir. Sürgünlerden somatik embriyo rejenerasyonunda en iyi sonuç veren BBD konsantrasyonu 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA olmuştur. Rejenere edilen somatik embriyo sayısı 104'tür. Bunun haricinde en iyi sonuç veren diğer iki BBD konsantrasyonları 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l P içeren ortam ve 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l IBA içeren ortam olmuştur. Bu iki ortamdan rejenere edilen somatik embriyo sayısı sırasıyla 77 ve 79'dur.

Yapılan bu in vitro kültür çalışmaları sonucunda, somatik embriyolar sürgünlerden başarılı bir şekilde rejenere edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Crocus sativus* L., safran, korm, in vitro, rejenerasyon, somatik embriyo, 2,4-D, NAA, BAP, Pikloram, IBA, IAA, BBD

SUMMARY

Micropropagation of Saffron (*Crocus sativus* L.)

In this study, it was aimed to produce somatic embryo in vitro using shoot tips obtained from corm of saffron (*Crocus sativus* L.). For this purpose; plant growth regulators have been applied to the nutrient media at different combinations and concentrations and their effects on somatic embryo formation have also been examined.

The saffron corms subjected to pre-sterilization and surface sterilization were MS (Murashige and Skoog), which had no plant growth regulator added, 3% sucrose and 0.8% plant agar and pH 5.8 buffered, sterilized in autoclave at 121°C for 15 minutes, 24 ± 2 °C and 16 h light / 8 h dark photoperiod were used as culture media. After shoot formation, shoot tips were cut and used as explant source for somatic embryo formation. As a plant growth regulator in MS medium containing sucrose and plant agar in in vitro somatic embryo production, 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), Picloram, NAA (Naphthalene Acetic acid) at different concentrations (1, 0.5, 0.25 mg/l) supplemented with BAP (6-Benzylaminopurine) at two different concentrations (1 and 0.5 mg/l), IBA (Indole-3-Butyric acid), IAA (Indole-3-Acetic acid). At different combinations and concentrations, cultures were cultured in medium containing BBD and sub-cultivation was performed every two months. The results were obtained in about 151 days and somatic embryos were regenerated from shoots. Best results were obtained from media containing 1 mg/l BAP for somatic embryo regeneration from shoots. Somatic embryo development was not observed in IAA and 2,4-D containing media. Best results were obtained from media containing 1 mg/l BAP for somatic embryo regeneration from shoots. Somatic embryo development was not observed in IAA and 2,4-D containing media. The best result for somatic embryo regeneration from shoots was the concentration of BBD 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA. The number of somatic embryos regenerated is 104. Apart from this, the two other best performing BBD concentrations were medium containing 1 mg/l BAP + 0.25 mg/l P and medium containing 1 mg/l BAP + 0.25 mg/l IBA. The number of somatic embryos regenerated from these two mediums was 77 and 79, respectively.

As a result of these in vitro culture studies, the somatic embryos are successfully regenerated from shoots.



Key Words: *Crocus sativus* L., saffron, corm, regeneration, somatic embryo, in vitro, 2,4-D, NAA, BAP, Picloram, IBA, IAA, PGR

RESİMLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. “Xeste 3” binasındaki freskten "Safran Toplayıcıları" [14].....	3
Resim 2. Safran (<i>Crocus sativus L.</i>) soğanları [33]	5
Resim 3. Safran bitkisi morfolojisi [34].....	6
Resim 4. Çiçeklenmiş safran bitkisi [35]	7
Resim 5. Safran bitkisinin toplanması ve stigmaların ayrılması [36, 37]	8
Resim 6. Safran (<i>Crocus sativus L.</i>) kormlarının temin edildiği Karabük ili, Safranbolu ilçesi, Yukarı çiftlik köyü uydu görüntüsü.....	17

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa No

Fotoğraf 1. Safran (<i>Crocus sativus</i> L.) kormları	16
Fotoğraf 2. Dış kabuğu soyulmuş haldeki safran kormu.....	17
Fotoğraf 3. Safran kormlarından sürgün rejenerasyonunun başlaması (1. hafta).....	22
Fotoğraf 4. Safran kormlarından sürgün rejenerasyonu (15.gün)	23
Fotoğraf 5. Safran kormlarından sürgün rejenerasyonunda 29.gün	24
Fotoğraf 6. Safran kormlarından kesilerek alınan sürgün uçları	25
Fotoğraf 7. Küçük parçalara ayrılan sürgünler	26
Fotoğraf 8. Kalınlaşma gözlemlenen sürgün uçları (1.hafta)	27
Fotoğraf 9. Boyunda uzama görülen sürgün uçları (1.hafta).....	28
Fotoğraf 10. Alt kültürleme işleminden sonra somatik embriyo gelişiminin başlangıcı ...	29
Fotoğraf 11. Belirginleşen somatik embriyolar (İkinci alt kültürlemeden sonraki 52.gün)	30
Fotoğraf 12. Belirginleşen somatik embriyolar (İkinci alt kültürlemeden sonraki 70.gün)	31

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Crocus sativus</i> L.'nin Bilimsel Sınıflandırılması [10]	4
Tablo 2. Safranın Kimyasal Bileşimi [14]	11
Tablo 3. Türkiye’de Safranbolu’da Safran Bitkisinin Yıllara Göre Ekim Alanları [14]	12
Tablo 4. Murashige Skoog (MS) Bileşenleri	18
Tablo 5. Sürgünden somatik embriyo rejenerasyonu için besi ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları	19
Tablo 6. Uygulanan Sterilizasyon Protokolleri ve Teknikleri	20
Tablo 7. Somatik embriyo oluşum %’leri.....	32
Tablo 8. NAA’in somatik embriyo sayısı ve gelişimi üzerine etkisi.....	33
Tablo 9. IBA’in somatik embriyo sayısı ve gelişimi üzerine etkisi.....	33
Tablo 10. P’in somatik embriyo sayısı ve gelişimi üzerine etkisi	34

SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

USD	:Amerikan Doları
mg	:Miligram
g	:Gram
kg	:Kilogram
m	:Metre
cm	:Santimetre
mm	:Milimetre
L	:Litre
°C	:Derece Santigrad
BAP	:6-Benzilaminopürin
NAA	:Naftalin asetik asit
IBA	:Indol-3-bütirik asit
IAA	:Indol-3-asetik asit
2,4-D	:2,4-Diklorofenoksiasetik asit
KİN	:Kinetin
P	:Pikloram
MS	:Murashige Skoog
BBD	:Bitki büyüme düzenleyici
PPM	:Plant preservative mixture
EtOH	:Etil alkol
H ₂ O ₂	:Hidrojen peroksit
AgNO ₃	:Gümüş nitrat

1. GİRİŞ

1.1. Safran (*Crocus sativus* L.) Genel Bilgi

Tıbbi ve aromatik bitkiler özellikle son yıllarda dünyadaki tüm toplumlarda daha fazla önem kazanmaya ve kullanılmaya başlamıştır [1]. Bu bitkilerden biri de “Safran” (*Crocus sativus* L.)’dır [2]. Safran (*Crocus sativus* L.) tıbbi ve aromatik bir ürün olarak ekonomik değeri yüksek olan bir bitkidir ve bu bitki antik çağlardan beri bilinmekte, en az 3500 yıldır da baharat, boya, ilaç kaynağı olarak kullanılmakta ve dünyanın pek çok ülkesinde yetiştirilmektedir [3, 4, 5, 6, 7].

Safran (*Crocus sativus* L.) “sarı” anlamına gelen Arapça “za-faran” kelimesinden türetilmiştir [8]. Bu altın değerindeki baharat Sanskritçe’de “Kum Kum” ve “Kesar”, Keşmirce’de “Koung” olarak geçmektedir [9].

Safranın kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Safran aynı zamanda öksürük, mide rahatsızlıkları, kolik, astım ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde de ilaç olarak kullanılmaktadır [10].

1.2. Safran (*Crocus sativus* L.) Bitkisinin Tarihçesi

Arkeolojik ve tarihi kayıtlar, bir bölgedeki safran bitkisinin varlığını kanıtlamak, başka yerlerde yayılımını izlemek ve son olarak da aynı bölgelerdeki safranın muhtemel geleceği hakkında belli bir sonuca varmak için oldukça önemlidir [11]. Koku verici, renklendirici ve tıbbi özelliklere sahip olan pahalı safran çiçeklerinin kurutulmuş stigmaları eski çağlardan beri çok değerli olmuştur [10].

Safranın tarihçesi M.Ö 3000’lere kadar uzanmaktadır [12]. Safranın kökeni tam olarak bilinmemekle beraber, bitkinin kökeninin Doğu Akdeniz muhtemelen de Anadolu ve İran’a kadar dayandığına inanılmaktadır [9, 10, 13]. Bazı kaynaklara göre, safranın Anadolu’ya Orta Asya’dan göç eden Türkler tarafından getirildiği bilinmektedir [14]. Safranın Küçük Asya’nın dağlık bölgelerinden Yunanistan’a, Batı Asya’ya, Mısır’a veya Keşmir’e kadar olan kökeni hakkında farklı fikirler de vardır [9].

Homeros ve Hipocrates, safran bitkisinin çağlar boyunca İran ve Hindistan'ın Keşmir Bölgesi'nde yetiştirildiğini kaydetmiştir. Moğollar, safranı Çin'e; Araplar, İspanya'ya ve Haçlılar ise, Batı Avrupa'ya tanıtmışlardır [11, 12]. Eski Yunan, Roma ve Mısır uygarlıklarında safran; boyama, parfüm, ilaç ve yemek pişirme gibi amaçlarla kullanılmıştır. Orta Doğu'da da en az 4000 yıldan beri aroma verici, tatlandırıcı, parfüm, boya, ilaç olarak kullanılmak üzere yetiştirilmiştir. Hatta, safran zaman zaman altın ile eşdeğer tutulmuştur [12].

Safran, Hititler döneminden beri Anadolu'da bilinen ve ilaç olarak kullanılan bir bitki olmuştur. Yunanlılar döneminde İzmir yöresinde yetiştirilmiştir. Bir zamanlar, İngiltere'nin Essex Bölgesi'nde küçük bir kasabada ticari olarak safran yetiştirilmiş ve bu kasabaya "Safran Walden" ismi verilmiştir. Osmanlılar döneminde de önemini korumuş ve 1858 yılında 9.705 kg safran İngiltere'ye satılmıştır. Tahminen 20.yy'a kadar hatta 20.yy'ın ilk çeyreğinde Anadolu'da safran tarımının yapıldığı bölge Safranbolu'dur [12]. Safranın doğada bulunan öncülü *Crocus cartwrightianus*'un kısır bir mutant formu olarak *Crocus sativus* Bronz Çağı'nda Girit'te ortaya çıkmıştır [12, 13]. Uzmanlara göre ise, safrandan bahseden ilk doküman M.Ö 7.yy'dan Asurlular döneminden kalma Asurbanipal tarafından toplatılan bir botanik kaynakçasıdır.

1.2.1. Doğu Akdeniz

M.Ö 1500-1600 arası Minos Uygarlığı zamanında safranın tedavi amaçlı kullanıldığını gösteren saray freskleri bulunmuştur. Mısırlı sağlıkçılar her türlü tedavi için safranı kullanmıştır. Safran, Sidan ve Tyre gibi şehirlerde de dokumacılıkta boyama amaçlı kullanılmıştır [12].

Resim 1. “Xeste 3” binasındaki freskten "Safran Toplayıcıları" [14]



1.2.2. Asya

Irak'ta 50000 yıllık tarih öncesi hayvan tasvirlerinde safran bazlı pigmentlere rastlanmıştır. Antik Persler, M.Ö 10.yy'da Derbera, İsfahan ve Horasan şehirlerinde Fars safranını (Hausknechtii) yetiştirmiştir. Keşmir ve Çin verilerine göre safran, 900 ile 2500 yıl önceki bir zamanda buralara ulaşmıştır [12].

1.2.3. Avrupa

Avrupa'da, Roma İmparatorluğu'nun çöküşünden sonra safran yetiştiriciliği azalmaya başlamıştır. Safran, Avrupa'ya Endülüslü'nün İspanya, Fransa ve İtalya'ya girmesiyle birlikte geri dönmüştür [12].

Safranın 19.yy sonlarına kadar en büyük üreticisi olan Türkiye'de, özellikle Viranşehir safranının en kaliteli safranlardan biri olduğu bilinmektedir. Bu durum, ülkemizin safran üretimi açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu da göstermektedir. Safran, tarihimizde Osmanlı'nın ilk dönemlerinden 19.yy'ın sonlarına kadar önde gelen tarımsal ürünlerden biri olmuştur. Osmanlı arşiv kayıtlarına göre, tarımın azalmaya başladığı 1858 yılında bile yalnızca İngiltere'ye 9705 kg safran ihraç edilmiştir. Bu dönemde safran Anadolu'da; Safranbolu, Adana, Şanlıurfa, Tokat ve İzmir illeri başta olmak üzere yaygın olarak yetiştirilmiştir. 1913 yılına gelindiğinde ise safran üretimi yalnızca Safranbolu ve Şanlıurfa'da yapılmış ve 794.500 kg safran elde edilmiştir [12].

1.3. Safran (*Crocus sativus* L.)' ın Taksonomisi

Safran (*Crocus sativus* L.), sonbaharda çiçek açan çok yıllık bir bitkidir [15, 16]. Safran bitkisinin taksonomisi incelenecek olursa; Magnoliophyta Bölümü, Liliopsida Sınıfı, Asparagales Takımı ve Iridaceae (Süsengiller) Ailesi'ne ait bir bitkidir [16, 17, 18, 19, 20].

Tablo 1. *Crocus sativus* L.'nin Bilimsel Sınıflandırılması [10]

ALEM	Plantae
BÖLÜM	Magnoliophyta
SINIF	Liliopsida
ALT SINIF	Liliidae
TAKIM	Asparagales
AİLE	Iridaceae
CİNS	Crocus
TÜR	<i>Crocus sativus</i> L.

Iridaceae (Süsengiller) ailesi, yaklaşık olarak 65 cins ve 2.025 türü kapsamaktadır. Bu aile içindeki bitkiler; rizom, korm ve soğanlıdır [21].

Crocus cinsi ise dünya genelinde 80 tür içermektedir. Bu 80 türün yaklaşık 32 tanesi Türkiye florasında bulunmaktadır. Bu 32 tür arasında safran (*Crocus sativus* L.) da bulunmaktadır [10]. *Crocus* cinsi Avrupa, Kuzey Afrika ve Batı Asya'nın kurak ülkelerinde yayılma göstermektedir [13].

1.4. Safran (*Crocus sativus* L.)'nın Morfolojisi

Crocus cinsi bitkiler, dolgun yer altı kormlara (soğan) sahiptir. Bu kormlar; genellikle simetriktir ve çeşitli şekillerde (lifli, zarlı) olup, sert bir tabaka ile kaplıdır. Çoğu *Crocus* türü yıllık yenilenen bu kormlar aracılığıyla çoğaltılır [1]. Safran (*Crocus sativus* L.)'da çok yıllık, otsu ve 3-5 cm çapında steril geofit bir bitkidir [9, 10].

Resim 2. Safran (*Crocus sativus* L.) soğanları [33]



Safran bitkisinin aktivasyonu yaklaşık olarak, gündüz sıcaklığının 25°C ve gece sıcaklığının 15°C'ye ulaştığı Eylül ayından itibaren başlamaktadır. Her bir korm, bazıları çiçek oluşumunu sağlayan 1-4 filiz üretir. Maksimum apikal tomurcuk boyutu elde etmek 1 yıl sürer ve her kormun tam kabuklu hale gelmesi için 1 yıl daha geçer. Bu sürecin tam ortasında bitki dormansi (bekleme) aşamasına girer. Kormlar, sonbaharda çiçeklendikten sonra kışı yapraklı geçirerek mayıs ayından itibaren toprak yüzeyine çıkan yaprakların kuruması ile dormansi aşamasına girer. İşte bu dormansi sırasında çiçekli ve bitkisel tomurcuklar ile kökler farklılaşmaya başlar. Yaz boyunca dormant halde kalan kormlar, sonbaharda tekrar çiçek açar ve yaprak çıkarır. Haziran ayı ortasında, kormlardaki % 67 seviyesindeki toplam kuru madde içinde nişasta konsantrasyonunda aşamalı bir azalma gözlemlenir. Nişasta; sukroz ve diğer çözünür şekerlere dönüştürülür ve bunlar, tomurcukları farklılaştırılmış ve geliştirilmiş dokulara yönlendirilir [9, 22].

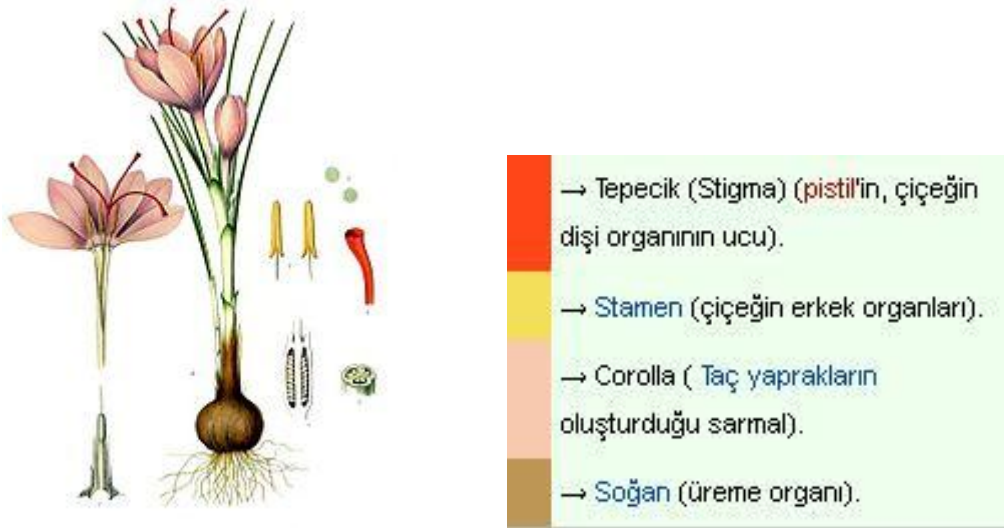
Bitkisel faz; çiçeklenme bittikten hemen sonra Kasım ayında başlar. Genç filizler, kardeş kormlara dönüşür ve genç kormlar için alan bırakan anne kormların katkısıyla fotosentezle gelişmeye başlar [9].

Safran (*Crocus sativus* L.) bitkisinin toprak üstü kısmı tek yıllık, toprak altı kısmı ise çok yıllıktır. Toprak üstündeki kısmında şerit şeklinde, ince uzun yaprakları vardır. Toprak altındaki kısmı olan kormlar ise, bir tabaka ile çevrilmiş olup düğüm oluşturur ve bu sayede içten nişasta içeren parankima hücreleri oluşur [10]. Bu kormlar çapı yaklaşık 5 cm, üstten ve alttan hafif basık düz bir tabana sahip çevresi kahverengi kabuklarla örtülmüş kürelerdir [2, 22]. Her bir korm 6-9 yaprak üretir [1, 10].

Safran kormları iki farklı yapısal ve fonksiyonel kök modu üretir. Bunlar fibröz kökler ve kontraktıl köklerdir. Fibröz kökler; kormların tabanında tek bir halkadan çıkan, düz ve ince köklerdir (çapı yaklaşık 1 mm). Kontraktıl kökler ise; başta tomurcuk olarak adlandırılan çok geniş ve beyazımsı bir yumru organı görünümündedir [1, 13].

Çiçeklenme, Ekim ayının 3. ya da 4. haftasından başlayarak Kasım ayının ortalarına kadar sürmektedir. Korm çevre uzunluğu 8 cm'den büyüktür ve ortalama olarak her bitkiden 7-8 adet çiçek alınmaktadır. Bitki boyu, ortalama 20-25 cm'den 50 cm'ye kadar çıkabilmektedir. Çiçekler lale büyüklüğünde ve zambağa benzemektedir [14, 22]. Her bir bitki üç adet çanak yaprak (sepal) ve üç adet taç yaprağı (tepal) sahiptir; ancak hem çanak yaprak hem de taç yaprak mor renkte olduğu için birbirinden ayırt etmek oldukça zordur [13]. Her çiçekte üç adet sarı renkte erkek organ (stamen) bulunmaktadır. Çiçeğin asıl önemli organı ise dişi organ (pistil)'dir. Bir adet olan dişi organ yumurtalık (ovaryum), yumurta borusu (stilus) ve tepcecik (stigma)'ten oluşmaktadır [13, 14]. Pistil, turuncu-kırmızı renktedir ve boru şeklindeki ovaryumun merkezidir. Stigma ise soluk sarı renktedir [10].

Resim 3. Safran bitkisi morfolojisi [34]



1.5. Safran (*Crocus sativus* L.) Yetiştirme şartları

Safran düşük rakımlı bölgelerden 2000 m yükseltiye kadar uyum sağlayabilen bir bitki olmakla birlikte, farklı yükseltilerde de başarıyla yetiştirilebilmiştir [22]. Safranın çoğaltımı insan yardımına bağlıdır; soğuk kış aylarından etkilenmez hatta çiçeklenmeden hemen önce kısa süreli kar yağışı safran verimini de arttırmaktadır. Sürekli nemli ve sıcak koşullar ise bitkiye zarar vermektedir [19].

Safran bitkisinin büyüme süresi yaklaşık 220 gündür. Sonbaharda yağış, ılık yazlar ve ılık kışlar safran için yüksek verim sağlayan iklim koşullarıdır. Safran su ihtiyacı düşüktür [1, 10, 20]. Safran (*Crocus sativus* L.), düşük yoğunluklu, iyi drenajlı kil ve yüksek organik içeriğe sahip kireçli topraklarda yetişir [19]. Toprak; kuru, killi veya kalkerli (kireçli), havalandırılmış, düz ve ağačsız olmalıdır. *Crocus sativus* L. ekilecek toprağın organik karbon ve kalsiyum karbonat içeriği yaklaşık % 0.35 ve % 4,61 olmalıdır. Toprağın pH değeri 6,3 ile 8,3 arasında, elektrik iletkenliği 0.09 dsm⁻¹ ile 0,30 dsm⁻¹ arasında hafif alkali olmalıdır [9].

Resim 4. Çiçeklenmiş safran bitkisi [35]



Erozyon riskini önlemek için toprak organik malzeme ile dengelenmeli, suyun tahliye edilmesine izin verilmeli ve kormların hasar görmemesi için uygun derinlik sağlanmalıdır [5]. Ana kormlar derine ekildiğinde daha kaliteli safran elde edilir. Ekim; Haziran-Temmuz aylarında gerçekteştirilir. Kormlar yaklaşık olarak, en fazla 20 cm derinliğe yerleştirilmeli ve kormlar arasındaki mesafe de 10 cm olmalıdır [5]. İlk ekimde tercih edilen korm iriliği 4-6 gr'dan küçük olmamalıdır [22].

Hem kormların ekimi ve hem de safran çiçeklerinin toplanması oldukça zordur; çünkü çiçekler hızla solar, stigmalar renk ve aromasını kaybeder. Bu nedenle çiçekler şafak vakti ile sabah saat 10'a kadar toplanmalıdır. Ayrıca, safran stigmaları yüksek nem seviyesine sahiptir; onları en iyi şekilde muhafaza etmek için kurutmak gerekir [5].

1.6. Safran (*Crocus sativus* L.) Baharatının Elde Edilişi

Safran adı yaygın olarak hem baharat hem de bitkinin kendisini ifade etmek için kullanılmıştır [10, 20]. Safran (*Crocus sativus* L.) dünyadaki en pahalı baharat türlerinden biridir [20]. Safran baharatı, *Crocus sativus* 'un kurutulmuş stigmalarından elde edilir [3, 20, 23].

Resim 5. Safran bitkisinin toplanması ve stigmaların ayrılması [36, 37]





Crocus çiçeklerinin toplanması, stigmalarının ayıklanması çok yoğun bir el emeği gerektirdiği için, safran baharatının elde edilişi çok zahmetli bir süreçtir ve bu nedenle de pahalı bir baharattır. Safran stigmaları yüksek nem seviyesine sahip olduğundan, onları çok iyi muhafaza etmek için kurutmak gerekir. Kurutma işleminden sonra, safran stigmaları orijinal boyutunun 1/5 ine iner. Bu da, 1 kg ham stigmadan tüketime hazır 200 g safran baharatı elde edilebilir demektir [5].

1 kg safran baharatı üretmek için 150.000 çiçek stigması gereklidir [1]. Safran yetiştiriciliğinde ortalama 80-120 bin çiçekten 5 kg yaş tepecik bundan da 1 kg kuru ürün alınmaktadır [22].

1.7. Safran (*Crocus sativus* L.)'ın Kimyasal Yapısı

Safranın ticari değerinin önemli olması, baharat kaynağı olarak kullanılan stigmalarından ileri gelmektedir. Eşsiz aroma, renk, tat ve tıbbi özellikleri ile tanınmaktadır [24]. Safran; antioksidan, hastalık önleyici özelliklere sahip olduğu bilinen birçok bitki türevli bileşik içermektedir [5]. Safran çiçeklerinin kurutulmuş stigmaları yalnızca yiyeceklerin tatlandırılması, renklendirilmesi için bir baharat kaynağı olarak değil, ayrıca 150'den fazla uçucu ve aromatik bileşik ile birçok uçucu olmayan aktif bileşen de içermektedir [5, 13, 14, 16]. Bunlar; karotenoid, zeaksantin, likopen ve birçok farklı karotendir [13].

Safran baharatının ayrıntılı kimyasal analizi yapıldığında, ana bileşenlerinin karotenoid olan krosetin (α -krosetin veya krosetin-I olarak da adlandırılır.), glikosidik formları; digentiobiosid (krosin), gentiobiosid, glukozid, gentioglukozit ve diglukozid, β -krosetin (monometil ester), γ -krosetin (dimetil ester), trans krosetin izomer, 13-cis-krosetin izomer; A-karoten, β -karoten, likopen, zeaksantin ve bir ksantan-karotenoid glikosidik konjugat olan mangiksin olduğu ortaya konmuştur. Safrana renklendirici özelliği veren bileşen, suda çözünür karotenoid olan krosinlerdir (krosetinin cis ve trans glukozil esterleri). Monoterpen aldehytler, pikrokrosin ve onun glikotlanmış türevi safranal (dehidro- β -sikloital) sırasıyla acı, lezzet ve aromadan sorumludur ve safranin en önemli komponentleri pikrokrosinin hidrolizi ile elde edilmiştir [1]. Koku (safranal), tat (pikrokrosin), renk verici pigment (krosin) komponentleri *Crocus sativus* çiçeklerinin kırmızı stigmatik bölgelerinde lokalizedir [1, 16].

Safran altın sarısı-turuncu rengini α -krosine borçludur. Bu krosin trans-krosetin di-(β -D-gentiyo biyosit) ester'dir (sistemik (IUPAC) adı: 8,8-diapo-8,8-karotenoik asit). Yani safranin aromasının altında yatan karotenoid, krosetinin digentiobioz esteridir. Aynı zamanda krosetin bir konjuge polien dikarboksilik asittir, ayrıca hidrofobiktir ve dolayısıyla da yağda çözünür. Krosetin iki adet suda çözünen gentibioz ile birleşince ortaya çıkan ürün de suda çözünür. Ortaya çıkan α -krosin, kuru safran kütlesinin %10'undan fazlasını oluşturan bir karotenoid pigmentidir.

Bu iki esterleşmiş gentibioz, suda çözünür hale gelmiş olan α -krosini pirinç pilavı gibi su bazlı yemekleri renklendirmek için ideal bir ürün yapar [14].

Safranin keskin tadı pikrokrosinden ileri gelir [13]. Pikrokrosin (kimyasal formülü: $C_{60}H_{86}O_7$; sistemik adı: 4-(β -D-glukopiranosiloksi)-2,6,6-trimetilsikloheksa-1,3-dien-1-karboksaldehit) diye bilinen bir aldehit alt elemanı bir karbonhidratın bileşiminden oluşur. Böcek öldürücü özellikleri olan pikrokrosin kuru safranin %4 kadarını oluşturur. Özellikle pikrokrosin, zeaksantin karotenoit (oksidatif parçalanma ile) kısalmış bir şeklidir ve terpen aldehit olan safranalın bir glukozit türevidir. Safran, hasattan sonra kurutulduğunda sıcaklıkla birleşen enzim etkisi sonucunda pikrokrosin D-glukoz ve serbest bir safranal molekülüne ayrışır. Uçucu bir yağ olan safranal, safranin ayırt edici aromasının önemli bileşenlerinden biridir. Safranal, pikrokrosinden daha az keskindir ve bazı örneklemelerde kuru safranin uçucu bölümünün %70'ini oluşturur [14].

Tablo 2. Safranin Kimyasal Bileşimi [14]

İÇERİK	% KÜTLE
Karbonhidratlar	12.0-15.0
Su	9.0-14.0
Polipeptit	11.0-13.0
Selüloz	4.0-7.0
Lipidler	3.0-8.0
Çeşitli Nitrojen İçermeyen maddeler	40,0

1.8. Safran (*Crocus sativus* L.)’ın Ekonomik Önemi

Safran; yüzyıllardan beri boya, kozmetik, ilaç ve gıda sanayiinde kullanılmaktadır. Kendi ağırlığının 100 bin katı kadar suyu sarı renge boyamaktadır. Parlak sarı renk vermesi nedeniyle boyamacılıkta, kumaş ve halı ipliklerinin boyanmasında kullanılmıştır [14].

Safranin ekonomik önemi, dünyada çeşitli endüstri dallarında çok geniş kullanım alanı bulunmasından ileri gelmektedir [14]. Bugün dünya piyasalarında safranin gramı altının gramına eşdeğer tutulmaktadır [22].

Safran; dünyadaki en yüksek fiyatlı baharat olarak kabul edilmektedir [1]. Kaliteye bağlı olarak dünya pazarında 200 ila 1600 USD/kg arasında satılmaktadır [25]. Şu anda safran; İran, Hindistan, Yunanistan, Fas, İspanya, İtalya, Türkiye, Fransa, İsviçre, İsrail, Pakistan, Azerbaycan, Çin, Mısır, Birleşik Arap Emirlikleri, Japonya ve yakın geçmişte Avustralya’da (Tazmanya) az ya da çok yoğun bir şekilde yetiştirilmektedir [12, 14, 18, 22, 26].

Dünya safran üretiminin yılda 205 ton olduğu tahmin edilse de, İran’ın safran üretiminde 47200 hektar ekili alan ve toplam safran üretiminin %80’ini yani 160 tonunu üreten önde gelen ülke konumundadır [1, 2]. Başlıca İran’ın safran üretim alanları; Horasan, Fars ve Cermen illeridir. Horasan eyaleti tek başına 46000 hektar ve 137 ton üretim yapmaktadır [1]. İran’da yetiştirme alanı son 10 yılda yaklaşık olarak %22 artış göstermiştir. Bununla birlikte, yıllık üretim de yaklaşık %14 artmıştır [14].

Hindistan’ın Keşmir Bölgesi de, kendi ihtiyacına göre 8-10 ton safran üretimi yapmaktadır. Yunanistan’ın üretimi ise yaklaşık 4-6 tondur. Fas, 0,8-1 ton arasında üretim

yapmaktadır. Buna karşılık safran üretimi birçok ülkede de azalmıştır ve hatta İngiltere ile Almanya gibi ülkelerde artık yapılmamaktadır. Günümüzde, La Mancha ve Teruel alanlarında asırlardır 4184 hektarlık alan üzerinde safran üretimi yapılmaktadır. Diğer ülkelerdeki üretim miktarları; İtalya (Sardinia, Akila, Cascia)'nın 100 kg, Türkiye'nin (Safranbolu) 30 kg, Fransa (Gatinais, Quercy)'nın 4-5 kg ve İsviçre (Mund)'nin üretimi ise neredeyse önemsizdir [1]. İran; üretim miktarı ve kalite açısından önde gelen ülkedir [22].

Türkiye'nin bazı bölgeleri (Safranbolu, Tokat, İzmir, Adana ve Şanlıurfa) safranın orjini kabul edilmektedir [22].

Tablo 3. Türkiye'de Safranbolu'da Safran Bitkisinin Yıllara Göre Ekim Alanları [14]

YILLAR	İLÇE	ALAN (m ²)
1999	Yörük	500 m ²
2001	Aşağıgüney	500 m ²
2002	Davutobası, Geren	1200 m ²
2003	Aşağıgüney	310 m ²
2005	Aşağıgüney, Yazıköy, Değmencik	12000 m ²

Safran; geleneksel olarak 3 yılda bir Türkiye'den hasat edilir ve herhangi bir sınıflandırma olmaksızın nakledilir [18].

2014 verilerine göre, safranın 11 köyde 40 üretici tarafından 37 dekar alanda yetiştiriciliği yapılmakta olup, 1 da alandan optimum koşullarda 0,5 kg safran elde edilmektedir. Bu bitki Ülkemizde sadece Safranbolu'da (Aşağıgüney, Yazıköy, Düzce, Davutobası ve Geren köylerinde) yetiştirilmektedir [27].

1.9. Safran (*Crocus sativus* L.)'nın Yetiştirme Zorlukları

Safran; Iridaceae (Süsengiller) ailesinin monokotil bir üyesidir. Nispeten, soğanlı ve kormlu monokotiller zor invitro materyaller olarak kabul edilmektedir [1].

Safran; yıllık yenilenen soğanlar üreten ve yalnızca onlardan çoğalan steril geofittir [7, 20, 24, 28]. Yapılan çalışmalar safranın steril triploid ($2n=3x=24$) bir bitki olduğunu göstermektedir. Ototriploid olarak kabul edilmiş olmasına rağmen, yine de bir allopoloid ya da otoploid olup olmadığına dair de hipotezler vardır [10, 17]. Safran kormları aracılığıyla vejetatif olarak çoğaltılır [3, 24]. Çünkü safranın triploid doğası vejetatif çoğaltıma izin verir, düzenli eşeyli üremeye izin vermez [10].

Safran çiçekleri; sterildir ve canlı tohum üretmede başarısız olduğu için kormları tarafından çoğaltılır. Bir korm sadece bir sezon hayatta kalır ve sonunda “kormlet” adında yeni bitkiler üretir. Çoğalması insan faktörüne bağlıdır [2, 17].

Vejetatif olarak çoğalan safran kormları birçok böcek zararlısı ve patojeni barındırır. Sıhhi tedbirler ve meyve ıslahı bu patojenleri kontrol altına başarılı olamamıştır. Bakterisidler ve fungusitler bu patojenleri kontrol etmede kullanılabilir; ancak bu önlemler hem yüksek maliyetlidir hem de çevre kirliliğine neden olur.

Son yıllarda, dünyada safran yetiştirme alanı artmaktadır. Bununla birlikte, bir takım Avrupa ülkelerinde yüksek maliyet ve kırsal alanların şehirleşmesi nedeniyle çiçek üretimi azalmıştır. Hala, safran talebi üretimden çok daha yüksektir.

Safran için dünya çapında artan talep, biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması da dahil olmak üzere çoğaltım ile ilgili birçok araştırmayı da teşvik etmektedir. Safran da dahil olmak üzere farklı kültürler mikroçoğaltım tekniklerinin geliştirilmesine yönelik çeşitli biyoteknolojik araştırmalar yürütmektedir. İn vitro biyoteknoloji, safrandan moleküler patojenlerden arındırılmış ekim materyali elde etmenin yanı sıra, safranın moleküler genetik gelişiminde de gelecek ilerlemelerin sağlanmasının temeli olarak da görülüyor [4].

Doku kültürü ile safran bitkisinin çoğaltımı, patojen içermeyen yüksek kaliteli materyal üretmek için büyük bir potansiyel sunmaktadır. Safran kormlarına farklı patojen kaynakları saldırdığı için çürümeye, nekroza neden olurlar; büyümeyi önemli ölçüde düşürürler ve çiçek açmayı geciktirirler. Patojenlerin daha fazla işgali, çiçeklenmenin azalmasına ve dolayısıyla her yıl düşük verimliliğe neden olur. Bu nedenle, patojen bulaşmış kormların ekilmesinin yeni kurulan veya yeniden ekilen çiftliklerde belirgin verim düşüşüyle sonuçlanacağı açıktır. Patojensiz korm üretmek için uygun bir metot bulmak, onları hızlı-verimli bir şekilde uygulamak bu problemi azaltabilir, dolayısıyla bu durum verimi de arttırır. Doku kültürü teknikleri hızlıdır ve patojen içermeyen sağlıklı bitkilerin de geniş çapta çoğaltımını sağlar [28]. Bu nedenle mikroçoğaltım, kaliteli dikim materyali / tohum üretimi ile safranın geniş çapta çoğaltılması için çok iyi bir alternatiftir [17].

1.10. Önceki Çalışmalar

Safran kormları %70-80 EtOH ile muamele edildikten sonra 2-3 defa steril saf sudan geçirilmiştir. Ardından Tween-20 ilave edilmiş çeşitli seyreltmelerle %5 bazik madde ihtiva eden NaOCI çözeltisinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra % 0,7-0,8 agar, farklı oranlarda sukroz (30, 60, 90 g/l) ve farklı konsantrasyonlarda BAP, 2,4-D ve KİN içeren, pH'ı 5.6-5.8'e sabitlenmiş katı besi ortamına ekilmiştir. Yapılan ekimler kültür şartlarının 21°C %70-80 nem düzeyine sahip olduğu ekim odalarına kaldırılmıştır [1]. Başka bir çalışmada, iki farklı safran (*Crocus sativus* L.) genotipinin in-vitro koşullarda mikroçoğaltımı yapılmıştır. Safranbolu ve Horasan elde edilen safran kormları, ilk olarak 4 farklı konsantrasyonda hazırlanmış Thidiazuron (TDZ) içeren ortamda MS + 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA + 0.1 mg/l GA₃ sürgün oluşumunu teşvik etmek için kültüre alınmıştır. İkinci alt kültür ortamında 4 farklı Paclobutrazol (PAC) konsantrasyonu içeren MS + 0.5, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/l PAC + 0.5 mg/l NAA'da mikrokorm oluşumu teşvik edilmiştir. Elde edilen eksplantlar 4 farklı Indol-3-bütirik asit (IBA) MS + 0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l IBA + 0.1 mg/l Gibberellik asit (GA₃) içeren köklendirme ortamında kök oluşumu incelenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, sürgün oluşturmada Safranbolu genotipi için 4.0 mg/l TDZ ve Horasan genotipi için 3.0 mg/l TDZ ortamlarının başarılı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Safranbolu sürgün üretiminde Horasan genotipinden daha başarılı görülmüştür. Mikrokorm üretimi için 2.0 mg/l PAC içeren ortam her iki farklı genotip için başarılı bulunmuştur. Horasan genotipi Safranbolu genotipinden daha başarılı olsa da iki genotip arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Köklenme ortamında da 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l IBA içeren ortamlar arasında önemli fark görülmemiş ve her iki ortamın da kök oluşumu için uygun olduğu tespit edilmiştir. İki farklı genotip karşılaştırılırsa, Horasan genotipi daha yüksek oranda köklenme ortalamasına sahiptir [13].

Başka bir çalışmada, çalışmanın amacı doğrudan ve dolaylı organogenez kullanarak safranın (*Crocus sativus* L.) in vitro mikro yayılımı ayrıca, bitki büyüme düzenleyicilerinin ex-vitro koşullarda, korm üretimi, filizlenme süresi ve çimlenme oranı gibi büyüme parametreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Safranın in vitro rejenerasyonu için başlangıçta 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) ve BAP (6-benzilaminopurin) etkileri test edilmiştir. Direkt organogenez için 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP kombinasyonu uygun iken, 0,25 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP kombinasyonunun dolaylı organogenez için daha uygun olduğu

gözlemlenmiştir. Direkt organogenez deneylerinin geliştirilmesi sırasında, 2,4-D olmadan BAP (1 mg/l), daha fazla sürgün gelişimi sağlanmıştır. Adventif korm ve kök indüksiyonu için NAA ve BAP kombinasyonları incelenmiştir. Birkaç korm oluşmasına rağmen, bu uygulamalarla kök gelişimi gözlenmemiştir. 1 mg/l IBA ile desteklenen kültür ortamında yapılan diğer deneyler ve % 5 sukroz, kontraktıl kök oluşumu ve korm sayısının artmasında etkili olmuştur. Sonuçta, toplam verimlilik, kontraktıl kök oluşumu için % 59.26, korm oluşumu için % 35.19 ve sürgün gelişiminde % 100 olarak hesaplanmıştır [10]. Yapılan başka bir çalışmada da, çiçekli parçalar ve korm parçaları de dahil olmak üzere çeşitli eksplantlar, farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ile takviye edilen farklı besi ortamları üzerinde kültüre alınmıştır. 6 aylık kültürden sonra 2 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA ile desteklenmiş MS besi ortamı üzerinde yeni kormlar üretilmiştir. Rejenere edilen kormlar 5 °C'de 5 hafta tutulduktan sonra bir saksıya aktarılmıştır [15].

Son olarak yapılan başka bir çalışmada ise, safranın in vitro rejenerasyonu için başlangıçta 2,4-D ve BAP etkileri test edilmiştir. Doğrudan organogenez için 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP kombinasyonunun, 0,25 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP kombinasyonunun ise dolaylı organogenezde daha başarılı olduğu gözlenmiştir. İn vitro indirekt organogenez ile rejenerasyon frekansının çok düşük olduğu belirlenmiştir. Kallus indüksiyon oranının %5 olarak hesaplanmıştır. Dahası, tüm parçalar embriyojenik kallus üretmemiş, ayrıca çoğu embriyo gelişimi de başarısız olmuştur. En iyi sonuç direkt organogenez ile elde edilmiştir [6].

2. MATERYAL-METOT

2.1. Materyal

Bu alışmada, Karabük ili, Safranbolu ilçesi, Yukarı iftlik köyü (41°17'51.36" K, 32° 43' 22.44" D)'ünden toplanan safran (*Crocus sativus* L.) kormları kullanıldı.

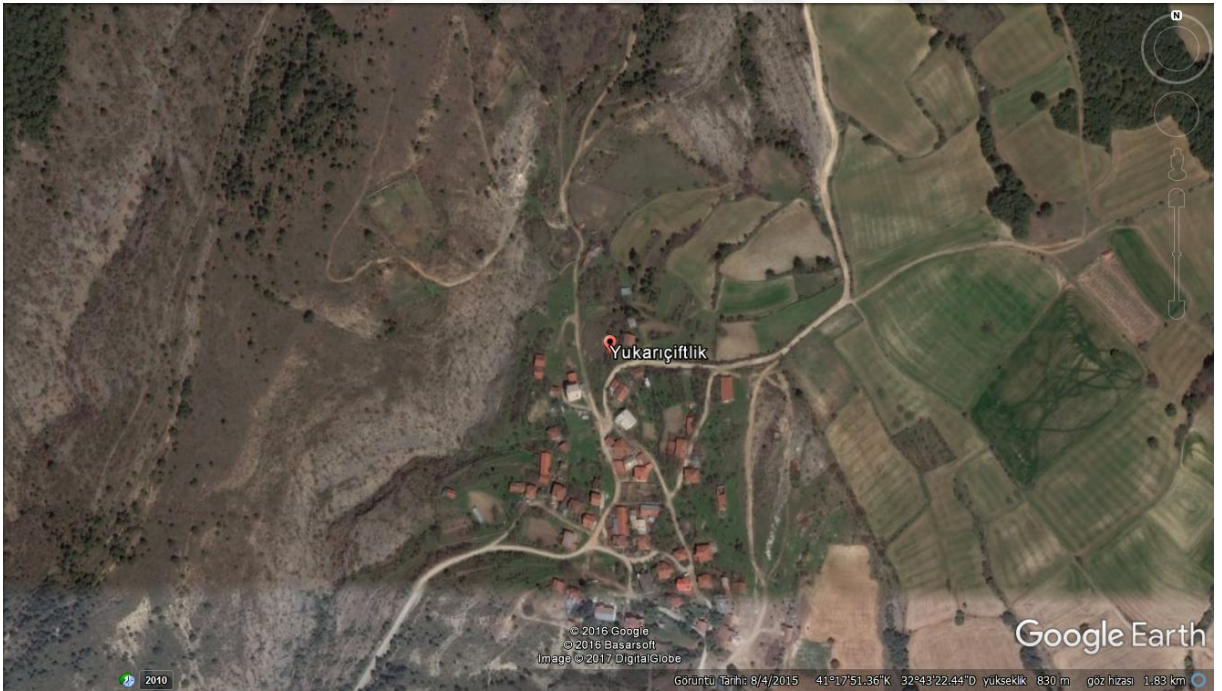
Fotoğraf 1. Safran (*Crocus sativus* L.) kormları



Fotoğraf 2. Dış kabuğu soyulmuş haldeki safran kormu



Resim 6. Safran (*Crocus sativus* L.) kormlarının temin edildiği Karabük ili, Safranbolu ilçesi, Yukarı çiftlik köyü uydu görüntüsü



Araştırma hedeflenen amaca göre birbirini izleyen 2 farklı aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada doku kültürü ile canlı ve yeni bir bitkiyi üretebilen kormlardan sürgünler elde edildi. İkinci aşamada elde edilen bu sürgünlerin uç kısımları somatik embriyo üretmek için, yeni alt kültür ortamlarına alındı.

2.2. Metot

2.2.1. Kullanılan MS Besi Ortamı ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Besiyerinin hazırlanması için, karbon kaynağı olarak sukroz (Carlo Erba), MS (Duchefa), jelleştirici olarak; plant agar (Duchefa) kullanıldı. Bitki büyüme düzenleyicilerinden ise; BAP (Roth), NAA (Caisson), IAA (Merck), IBA (Merck), 2,4-D (Acros) ve P (Duchefa)'dan kullanılmak üzere besiyer ortamı için stok solüsyonları hazırlandı.

Tablo 4. Murashige Skoog (MS) Bileşenleri

Bileşenler	mg/L
Amonyum nitrat	1,650.0
Borik asit	6.20
Kalsiyum klorit (anhidrit)	332.20
Kobalt klorit	0.0250
Bakır sülfat pentahidrat	0.0250
Disodyum EDTA dihidrat	37.260
Demir sülfat heptahidrat	27.80
Glisin	2.0
Magnezyum sülfat (anhidrit)	180.70
Manganez sülfat monohidrat	16.90
Myo-inositol	100.0
Nikotinik asit	0.50
Potasyum iyodür	0.830
Potasyum nitrat	1,900.0
Potasyum fosfat monobazık	170.0
Pridoksin hidroklorit	0.50
Sodyum molibdat dihidrat	0.250
Tiamin diklorit	0.10
Çinko sülfat heptahidrat	8.60

2.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması:

Besiyeri hazırlanırken, ilk olarak; 1 litrelik ortam için, % 3 sukroz ve 4,4 gr MS hassas terazi (SHIMADZU TXB622L)'de tartıldı ve manyetik karıştırıcı (JEIO TECH TM-14S ve ISOLAB MS-010)'da karıştırılarak iyice çözünmesi sağlandı. Ardından pH-metre (THERMO SCIENTIFIC ORION STAR A111) vasıtasıyla pH ölçümü yapılarak, pH; 1N

HCl veya 1N NaOH ile 5.7-5.8'e ayarlandı. pH ölçümünün ardından 1 litre besi ortamı için % 0,8'lik plant agar tartıldı. Sadece MS'li besi ortamı kormlardan sürgün çoğaltımı için hazırlandı.

Sürgünlerden somatik embriyo çoğaltımı için ise, MS'li besi ortamına plant agar eklendikten sonra son olarak farklı konsantrasyonlarda BAP, NAA, IAA, IBA, 2,4-D ve Picloram olmak üzere 6 farklı bitki büyüme düzenleyicisi uygun mikropipetler (BRAND) aracılığıyla eklendi.

Tablo 5. Sürgünden somatik embriyo rejenerasyonu için besi ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları

Bitki Büyüme Düzenleyici	BAP (1 mg/l)	BAP (0,5 mg/l)
2,4-D	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
IBA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
IAA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
NAA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
Picloram	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l

Bitki büyüme düzenleyicileri de eklendikten sonra besi ortamları 121°C'de 15 dk otoklavlandı (JEIO TECH ST-85G). Otoklavlanan besi ortamları Laminer Flow kabin (THERMO SCIENTIFIC S2020 1.2)'e koyularak katılaşması için beklenildi.

2.2.3. Sterilizasyon İşlemleri

In vitro doku kültüründe en önemli nokta sterilizasyon işlemleridir. Böylelikle çalışmada istenmeyen bakteriyal veya fungal kontaminantların engellenmesi amaçlandı.

2.2.3.1. Ekim Esnasında Kullanılacak Malzemelerin Sterilizasyonu

Ekim esnasında ön sterilizasyon işleminden sonra Laminer Flow kabinde yapılacak olan yüzey sterilizasyonu ve ekim işlemi için gerekli olan; beher, bistüri, pens, fayans (materyallerin kesimi için) gibi malzemelerin sterilizasyonu 200°C’de Kuru Hava Sterilizatörü (JEIO TECH ON-21E)’nde yapıldı.

2.2.3.2. Ön Sterilizasyon İşlemi

Ön sterilizasyon işleminde safran kormları 2-2,5 saat akan musluk suyu altında bekletildi.

2.2.3.3. Safran Kormlarının Yüzey Sterilizasyonu:

Safran bitkisi kormlarının yüzey sterilizasyonu için birçok farklı sterilizasyon protokolü uygulandı. Bunlar arasında sterilizasyonun en yüksek düzeyde sağlandığı protokol belirlenmeye çalışıldı.

Tablo 6. Uygulanan Sterilizasyon Protokolleri ve Teknikleri

Sterilizasyon Protokolü	Sterilizasyon Tekniği
1	➤ 15 dk %70’lik EtOH ➤ 20 dk %30’luk Ticari NaOCl+2-3 damla Tween-80
2	➤ 15 dk %70’lik EtOH ➤ 10 dk %30’luk H₂O₂
3	➤ 10 dk %70’lik EtOH ➤ 15 dk %30’luk H₂O₂
4	➤ 2 dk %70’lik EtOH ➤ 5-10-20 dk %0.5 ve %1’lik AgNO₃

5	➤ PPM (1 mg/L)
6	➤ 5 dk %70'lik EtOH ➤ 10 dk %30'luk H ₂ O ₂ ➤ PPM (1 mg/L)
7	➤ 7 dk %70'lik EtOH ➤ 20 dk DOMESTOS+Tween-80 (2-3 damla)

6.protokolün safran kormlarının yüzey sterilizasyonunda ve somatik embriyo gelişiminde en iyi sonuç veren sterilizasyon protokolü olduğu gözlemlendi.

2.2.4. Safran Kormlarının Kültüre Alınması

Safran kormlarının kültüre alınması iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşama BBD'siz MS Besi Ortamında Sürgün Rejenerasyonu, ikinci aşama ise elde edilen sürgün uçlarından Somatik Embriyo Rejenerasyonu

2.2.4.1. BBD'siz MS Besi Ortamında Sürgün Rejenerasyonu

Doku kültürü çalışmalarına temel eksplant kaynağı temini için sterilize edilen kormlar korm boyutuna göre tüm (çap uzunluğu 0,3 cm-1,5 cm) ya da 4 eşit parçaya (çap uzunluğu 1,5 cm ve üstü) ayrılarak MS besi ortamı bulunan magenta kaplarında, 24 (±2) °C sıcaklık ve 3000 lux ışık şiddeti kültür koşullarında kültüre alındı. Uygun sürgün uzunluğu (2,5 cm - 12 cm) elde edilene kadar bu besi ortamında kültüre devam edildi.

2.2.4.2. Sürgün Uçlarından Somatik Embriyo Rejenerasyonu

Uygun sürgün uzunluğu (2,5 cm – 12 cm) elde edildikten sonra sürgünlerin uç kısımlarından alınan eksplantlar Tablo 5'deki BBD konsantrasyonlarını içeren besi ortamında sürgün uçlarından somatik embriyo rejenerasyonu için magenta kaplarında 24 (±2) °C sıcaklık ve 3000 lux ışık şiddeti kültür koşullarında kültüre alındı.

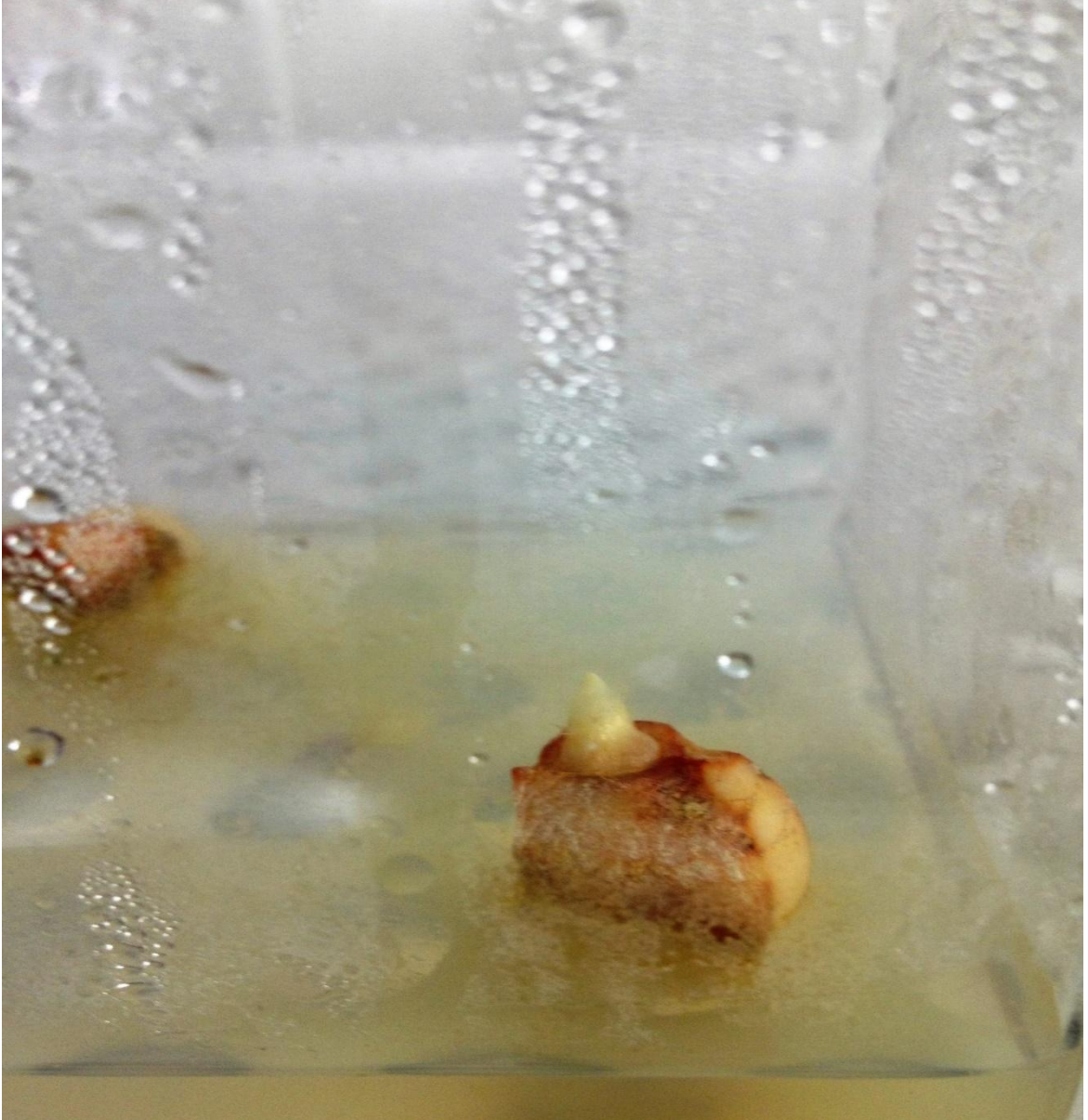
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. SONUÇLAR

3.1.1. Safran Kormlarından Sürgün Rejenerasyonu

BBD içermeyen MS besisi ortamında kültüre alınan safran kormlarından Fotoğraf 3’de görüldüğü gibi sürgün rejenerasyonunun başlatılması sağlandı. Bu aşamada ekimin 1. haftası sonunda yaklaşık olarak sürgün boyları 1 cm - 1,5 cm olarak kaydedildi.

Fotoğraf 3. Safran kormlarından sürgün rejenerasyonunun başlaması (1. hafta)



Ekimin 15. günde sürgün boyu yaklaşık olarak 4 cm - 5 cm olarak kaydedildi.

Fotoğraf 4. Safran kormlarından sürgün rejenerasyonu (15.gün)



Ekimin 29. gününde sürgün boyu yaklaşık olarak 9 cm – 11 cm arasında olarak kaydedildi.

Fotoğraf 5. Safran kormlarından sürgün rejenerasyonunda 29.gün



BBD içermeyen MS’li besi ortamında sürgün rejenerasyonu sağlanıp, uygun sürgün uzunlukları elde edildikten sonra sürgün uçlarından somatik embriyo rejenerasyonu için ikinci aşamaya geçildi.

3.1.2. Sürgün Uçlarından Somatik Embriyo Rejenerasyonu

Sürgün uçlarından somatik embriyo rejenerasyonu için, Tablo 5’de verilen BBD konsantrasyonları ilave edilerek 1 cm uzunluğunda kesilen sürgün uçları kültüre alındı ve gelişim süreci gözlemlendi.

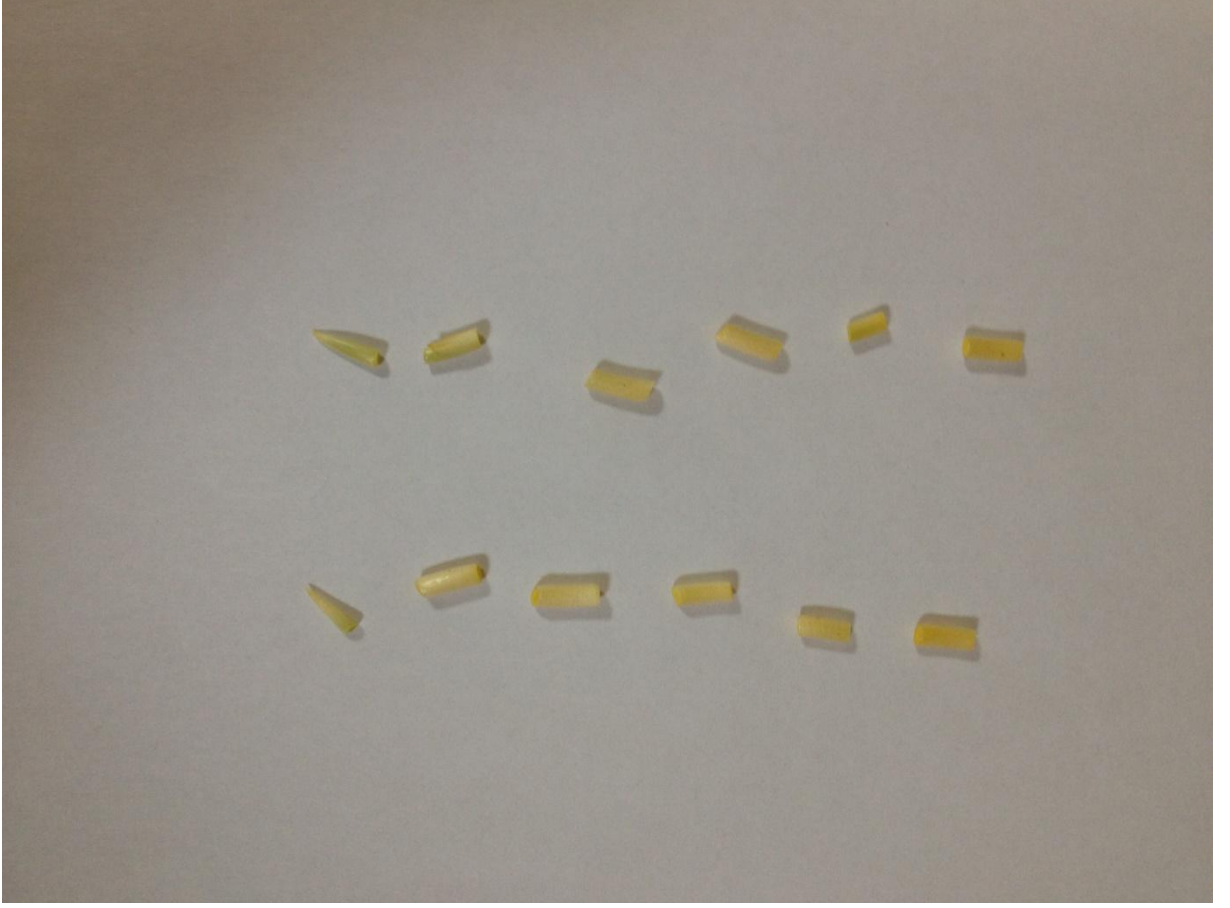
Safran kormlarından sürgün rejenerasyonu sağlandıktan ve sürgünler elde edildikten sonra sürgünler kormlardan bistüri yardımıyla kesilerek alındı.

Fotoğraf 6. Safran kormlarından kesilerek alınan sürgün uçları



Sürgünler kormlardan kesilip alındıktan sonra 1 cm'lik küçük parçalara bistüri yardımıyla kesildi.

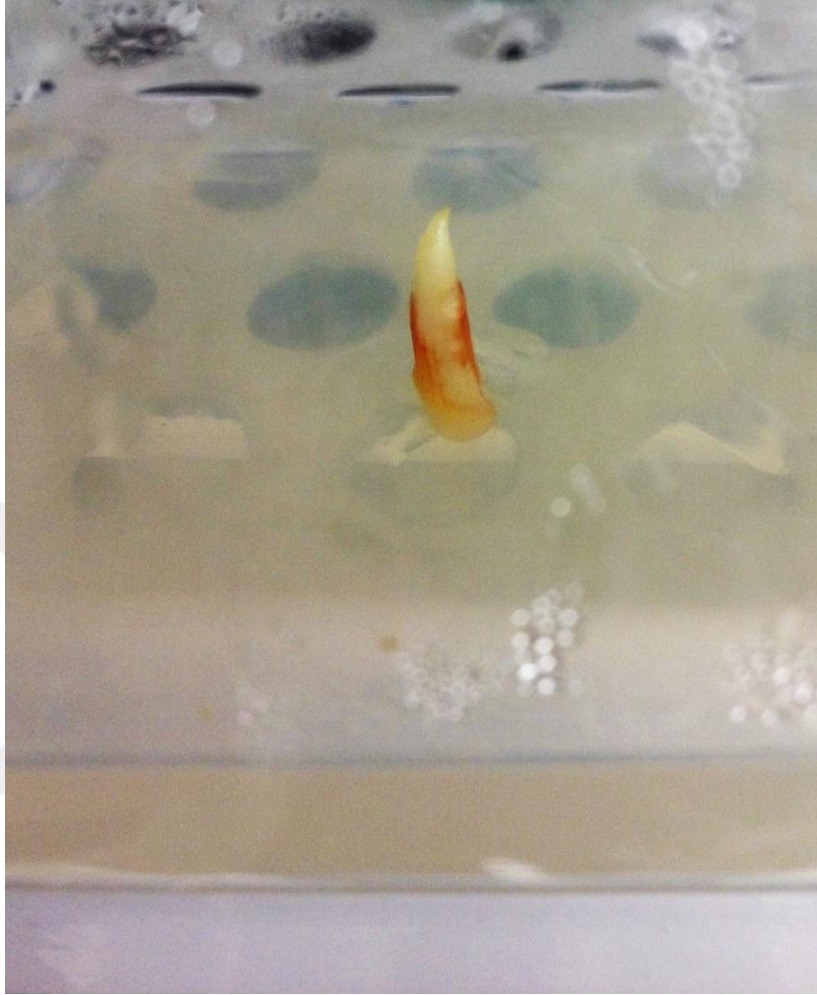
Fotoğraf 7. Küçük parçalara ayrılan sürgünler



1 cm'lik parçalar halinde kesilen sürgünler, Tablo 5'deki BBD kombinasyonları ve konsantrasyonlarını içeren besin ortamında ilk kültüre alındı.

Ekimin 1.haftasında sürgün uçlarında kalınlaşma ve boylarında uzama gözlemlendi.

Fotoğraf 8. Kalınlaşma gözlemlenen sürgün uçları (1.hafta)



Fotoğraf 9. Boyunda uzama görülen sürgün uçları (1.hafta)



Kültüre alınan sürgün uçları, Fotoğraf 8 ve Fotoğraf 9'daki değişimler gözlemlendikten 21 gün sonra alt kültüre alındı.

Alt kültürleme işleminden 43 gün sonra, kalınlaşmaya başlayan sürgün uçlarının alt kısımlarından somatik embriyo gelişimi gözlemlenmeye başladı.

Fotoğraf 10. Alt kültürleme işleminden sonra somatik embriyo gelişiminin başlangıcı



Fotoğraf 10'daki gibi ilk somatik embriyo oluşumu gözlemlendikten 15 gün sonra sonra ikinci kez bir alt kültürleme işlemi yapıldı.

Bu alt kültürleme işleminden sonra gelişim sürekli takip edildi. İkinci alt kültürleme işleminden 52 gün sonra somatik embriyoların daha fazla belirginleştiği gözlemlendi.

Fotoğraf 11. Belirginleşen somatik embriyolar (İkinci alt kültürlemeden sonraki 52.gün)



İkinci alt kültürleme işleminden 69 gün sonra, somatik embriyoların belirginleşmeye başlamasından itibaren yaklaşık 16 gün sonra somatik embriyoların daha fazla belirginleştiği gözlemlendi.

Fotoğraf 12. Belirginleşen somatik embriyolar (İkinci alt kültürlemeden sonraki 70.gün)



Safran kormlarından sürgün oluşumu ve ardından elde edilen sürgünlerden somatik embriyo rejenerasyonu uygun protokollere göre düzenli bir şekilde yapıldı.

Yapılan ekimler sonucunda, safran kormlarından sürgün oluşumunu takiben elde edilen sürgünlerden somatik embriyo rejenerasyonuna kadar ki gelişmeler düzenli

aralıklarla takip edildi ve fotoğraflandı. Ekim çalışmaları sonucunda, ilk olarak safran kormlarından sürgün rejenerasyonu, elde edilen sürgünlerden somatik embriyo rejenerasyonu için ilk ekim, ilk ekim tarihinden itibaren yapılan alt kültürlemeler yaklaşık olarak 151 gün sürdü ve bu 151 gün sonunda istenilen somatik embriyolar elde edildi. Sürgünlerden somatik embriyo rejenerasyonunda Tablo 5’de verilen BBD kombinasyonları ve konsantrasyonları uygulandı. Her BBD kombinasyonu ve konsantrasyonundan 3 tekerrürlü olmak üzere tek seferde toplam 90 tane ekim yapıldı. Yapılan bu 90 tane ekimde somatik embriyo gelişim %’leri hesaplandı.

Tablo 7. Somatik embriyo oluşum %’leri

Bitki Büyüme Düzenleyiciler	Somatik Embriyo Oluşumu (%)			
	BAP (1 mg/l)		BAP (0,5 mg/l)	
2,4-D	1 mg/l	-	1 mg/l	-
	0,5 mg/l	-	0,5 mg/l	-
	0,25 mg/l	-	0,25 mg/l	-
IBA	1 mg/l	33,4	1 mg/l	-
	0,5 mg/l	-	0,5 mg/l	-
	0,25 mg/l	66,6	0,25 mg/l	66,6
IAA	1 mg/l	-	1 mg/l	-
	0,5 mg/l	-	0,5 mg/l	-
	0,25 mg/l	-	0,25 mg/l	-
NAA	1 mg/l	33,4	1 mg/l	-
	0,5 mg/l	100	0,5 mg/l	66,6
	0,25 mg/l	33,4	0,25 mg/l	-
P	1 mg/l	-	1 mg/l	-
	0,5 mg/l	66,6	0,5 mg/l	-
	0,25 mg/l	100	0,25 mg/l	33,4

Aşağıda verilen Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10’da NAA, IBA ve Pikloram BBD konsantrasyonlarının somatik embriyo gelişimi ve somatik embriyo sayısı üzerine etkisini incelemek amacıyla elde edilen verilerin analizi, SPSS programında ANOVA testi yardımıyla yapıldı.

Tablo 8. NAA’in somatik embriyo sayısı ve gelişimi üzerine etkisi

NAA (mg/l)	Eksplant sayısı	Somatik embriyo gelişimi (Mean $\pm$ SE)	Somatik embriyo sayısı	Somatik embriyo sayısı (Mean $\pm$ SE)
1	6	0,17 $\pm$ 0,167	16	4,67 $\pm$ 2,667
0,5	6	0,83 $\pm$ 0,167	104	15,83 $\pm$ 3,807
0,25	6	0,17 $\pm$ 0,167	11	1,83 $\pm$ 1,833

Tablo 8’de ANOVA testi yardımıyla NAA’in farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarında somatik embriyo gelişimi ve somatik embriyo sayısının ortalama (Mean) ve standart hata (SE) değerleri hesaplandı. Yaptığımız çalışma ve elde ettiğimiz değerlerin doğruluğu testin anlamlılık düzeyine (p) göre belirlendi ($p \leq 0,05$) NAA’in farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarına göre ayrı ayrı yapılan somatik embriyo gelişimi (NAA/somatik embriyo gelişimi) ve somatik embriyo sayısı (NAA/somatik embriyo sayısı)’na göre yapılan ANOVA testinde anlamlılık değerleri (p) sırasıyla 0,018 ve 0,006’dır. Test sonucuna göre $p \leq 0,05$ olacağından; elde ettiğimiz 0,018 ve 0,006 değerleri 0,05’den küçük olduğu için elde ettiğimiz sonuçlar anlamlıdır.

Tablo 9. IBA’in somatik embriyo sayısı ve gelişimi üzerine etkisi

IBA (mg/l)	Eksplant sayısı	Somatik embriyo gelişimi (Mean $\pm$ SE)	Somatik embriyo sayısı	Somatik embriyo sayısı (Mean $\pm$ SE)
1	6	0,17 $\pm$ 0,211	11	1,83 $\pm$ 1,833
0,5	6	0,00 $\pm$ 0,00	0	0,00 $\pm$ 0,00
0,25	6	0,67 $\pm$ 0,211	79	13,33 $\pm$ 4,318

Tablo 9’da ANOVA testi yardımıyla IBA’nın farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarında somatik embriyo gelişimi ve somatik embriyo sayısının ortalama (Mean) ve standart hata (SE) değerleri hesaplandı.

Yaptığımız çalışma ve elde ettiğimiz değerlerin doğruluğu testin anlamlılık düzeyine (p) göre belirlendi ($p \leq 0,05$). IBA'ın farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarına göre ayrı ayrı yapılan somatik embriyo gelişimi (IBA/somatik embriyo gelişimi) ve somatik embriyo sayısı (IBA/somatik embriyo sayısı)'na göre yapılan ANOVA testinde anlamlılık değerleri (p) sırasıyla 0,018 ve 0,007'dir. Test sonucuna göre $p \leq 0,05$ olacağından; elde ettiğimiz 0,022 ve 0,007 değerleri 0,05'den küçük olduğu için elde ettiğimiz sonuçlar anlamlıdır.

Tablo 10. P'in somatik embriyo sayısı ve gelişimi üzerine etkisi

P (mg/l)	Eksplant sayısı	Somatik embriyo gelişimi (Mean $\pm$ SE)	Somatik embriyo sayısı	Somatik embriyo sayısı (Mean $\pm$ SE)
1	6	0,00 $\pm$ 0,00	0	0,00 $\pm$ 0,00
0,5	6	0,33 $\pm$ 0,211	33	5,50 $\pm$ 3,538
0,25	6	0,67 $\pm$ 0,211	77	12,83 $\pm$ 4,549

Tablo 10'de ANOVA testi yardımıyla P'in farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarında somatik embriyo gelişimi ve somatik embriyo sayısının ortalama (Mean) ve standart hata (SE) değerleri hesaplandı. Yaptığımız çalışma ve elde ettiğimiz değerlerin doğruluğu testin anlamlılık düzeyine (p) göre belirlendi ($p \leq 0,05$) P'in farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarına göre ayrı ayrı yapılan somatik embriyo gelişimi (P/somatik embriyo gelişimi) ve somatik embriyo sayısı (P/somatik embriyo sayısı)'na göre yapılan ANOVA testinde anlamlılık değerleri (p) sırasıyla 0,048 ve 0,048'dir. Test sonucuna göre $p \leq 0,05$ olacağından; elde ettiğimiz 0,048 ve 0,048 değerleri 0,05'den küçük olduğu için elde ettiğimiz sonuçlar anlamlıdır.

Sonuç olarak; safran bitkisinin kormlarından sürgün rejenerasyonu ve ardından BBD içeren besi ortamında yapılan sürgünlerden somatik embriyo rejenerasyonunda en fazla verim alabildiğimiz BBD'nin NAA, IBA ve P olduğu gözlemlendi.

1 mg/l BAP içeren ortamlardan en iyi sonuçlar alınmış, IAA ve 2,4-D içeren ortamlarda somatik embriyo gelişimi gözlenmemiştir. Sürgünlerden somatik embriyo rejenerasyonunda en iyi sonuç veren BBD konsantrasyonu 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA olmuştur. Rejenere edilen somatik embriyo sayısı 104'tür. Bunun haricinde en iyi sonuç veren diğer iki BBD konsantrasyonları 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l P içeren ortam ve 1 mg/l

BAP + 0,25 mg/l IBA içeren ortamlar olmuştur. Bu iki ortamdan rejenere edilen somatik embriyo sayısı sırasıyla 77 ve 79'dur. Bunların haricinde somatik embriyo gelişimi gözlenen diğer BBD konsantrasyonları 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA, 0,5 mg/l BAP + 1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l NAA, 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l P ve 1 mg/l BAP + 1 mg/l IBA içeren ortamlar olmuştur.

Bunların dışında, 0,5 mg/l BAP içeren BBD içinde 0,5 mg/l BAP + 0,25 mg/l IBA, 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA ve 0,5 mg/l BAP + 0,25 mg/l P kombinasyonları hariç diğer hiçbir 0,5 mg/l BAP içeren BBD kombinasyon ve konsantrasyonlarında somatik embriyo gelişimi gözlenmedi.

3.2. TARTIŞMA

Safran kormlarından BBD içermeyen ortamda yaptığımız sürgün rejenerasyonu ardından farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda BAP, NAA, IBA, IAA, 2,4-D ve P BBD'ni içeren besi ortamında elde edilen sürgünlerden yapılan somatik embriyo rejenerasyonunda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda başarılı bir şekilde safrandan somatik embriyo rejenerasyonu yapıldı.

Tablo 7'de elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında; 2,4-D ve IAA'ın farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında somatik embriyo oluşumu gözlenmedi. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında, en iyi kallus büyümesinin 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l 2,4-D içeren ortamda [29], en etkili embriyogenik kallus üretiminin 1 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D içeren ortamda [30], globular embriyolar içeren nodular kallusların 4 mg/l KİN + 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda [31] ve yine en iyi embriyogenik kallus gelişiminin 1 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D içeren ortamdan [32] elde edildiği bildirilmiştir.

En iyi somatik embriyo gelişimi NAA, IBA ve P'ın farklı konsantrasyonlarını içeren 1 mg/l BAP içeren besi ortamlarında kaydedildi. Somatik embriyo gelişimi gözlenen IBA konsantrasyonları: 1 mg/l BAP + 1 mg/l IBA (%33,4), 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l IBA (%66,6) ve 0,5 mg/l BAP + 0,25 mg/l IBA (%66,6)'dır. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre, 1 mg/l BAP içeren konsantrasyonlarda daha yüksek, düşük konsantrasyonlarda IBA içeren ortamda daha yüksek düzeyde somatik embriyo oluşumu gözlemlendi. Buradan bu BBD

konsantrasyonları için şöyle bir çıkarımda bulunursak; yüksek konsantrasyonda sitokinin ve düşük konsantrasyonda çalışılan oksin değerleri somatik embriyo gelişimine olumlu etki yapabilir diyebiliriz. Literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında, en iyi sürgün gelişiminin 1,5 mg/l BAP'ta ve en iyi korm, sürgün ve kök gelişiminin ise 1 mg/l IBA'de gerçekleştiği çalışmada bildirilmiştir [29]. Somatik embriyo gelişimi gözlenen NAA konsantrasyonları: 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA (%33,4), 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA (%100), 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l NAA (%33,4) ve 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA (%66,6)'dir. Buradan elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında hemen hemen tüm NAA konsantrasyonlarında somatik embriyo gelişimi olmuştur. Başka bir çalışmada elde edilen sonuçlara baktığımızda, en yüksek somatik embriyo veriminin 1,1 mg/l BAP + 2,8 mg/l NAA içeren ortamda[15], başka bir çalışmada ise, non-embriyojenik kallus üretiminin 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA içeren ortamdan elde edildiği de bildirilmiştir [32]. En yüksek filizlenme ise 1,5 mg/l BAP + 0,50 mg/l NAA, 1,5 mg/l BAP + 0,75 mg/l NAA ve 1,5 mg/l BAP + 1 mg/l NAA 'da gerçekleştiği ise bir başka çalışmada bildirilmiştir [14]. Bu da NAA'in filizlenme ve somatik embriyo gelişiminde çok önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Son olarak somatik embriyo gelişimi gözlenen P konsantrasyonları: 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l P (%66,6), 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l P (%100), 1 ve 0,5 mg/l BAP + 0,25 mg/l P (%33,4)'dır. Yine burada da IBA'da olduğu gibi yüksek konsantrasyonda sitokinin ve düşük konsantrasyonda oksin değerleri somatik embriyo gelişimine olumlu etki yapabilir diyebiliriz. Literatürde P üzerine yapılan çalışma mevcut değildir. İlk olarak biz kendi çalışmamızda deneyerek somatik embriyo gelişimi gözlemledik ve P'nin somatik embriyo gelişiminde olumlu sonuçlar verdiğini yaptığımız çalışmalar sonucunda belirledik. Bunun dışında gelişen aynı BBD konsantrasyonlarında olmasına rağmen somatik embriyo gelişimi olmayan sürgün materyallerin de olduğunu gözlemledik. Bunun sebebi, belki de ekimi yapılan eksplantlarda canlı olan gelişme bölgelerinin olmayışından kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak; kullandığımız farklı konsantrasyonlarda altı farklı BBD'nin safran sürgünlerinden somatik embriyo rejenerasyonundaki etkilerini araştırdık ve yaptığımız araştırmalar, laboratuvar çalışmalarımız ve elde ettiğimiz veriler ile sonuçlar doğrultusunda başarılı bir şekilde somatik embriyo oluşumu gözlemledik. Böylece in vitro ortamda 151 günlük bir süreç içerisinde safran (*Crocus sativus* L.) bitkisinin sürgünlerinden somatik embriyolar elde edilerek safranin mikroçoğaltımını gerçekleştirmiş olduk. Bundan sonraki

aşamalarda ise bu somatik embriyolar farklı besi ortamlarında boyutları büyütölüp, filizlendirilerek toprağa aktarma aşamasına geçilebilir.



4. KAYNAKLAR

1. Fernández, José-Antonio. "Biology, biotechnology and biomedicine of saffron." *Recent Research Developments in Plant Science* (2004): 127-159.
2. Golmohammadi, Farhood. "Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics and various uses in South Khorasan Province-East of Iran." *International Journal of Farming and Allied Sciences* 3.5 (2014): 566-596.
3. Çavuşoğlu, Aysun, Emine İclal Erkel, and Melekber Sülüsoğlu. "Saffron (*Crocus sativus* L.) studies with two mother corm dimensions on yield and harvest period under greenhouse condition." *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3.2 (2009): 126-129.
4. Sh, Asadova S., and I. V. Azizov. "A New Approach to Biotechnology of Saffron (*Crocus Sativus* L.)." *Global Journal of Science Frontier Research* 15.6 (2016).
5. Hasan, Izharul, et al. "The incredible health benefits of saffron: A Review." *Journal of Pharmacy Research* 4.7 (2011): 2156-8.
6. Lapadatescu, S., et al. "In vitro regeneration of *Crocus sativus* L." *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 17.2 (2013): 244-247.
7. Ahmad, M., et al. "Micropropagation of saffron (*Crocus sativus* L.): a review." *Journal of Cell and Tissue Research* 14.1 (2014): 4073-4076.
8. Ahmad, Mushtaq, et al. "Saffron (*Crocus sativus* L.) strategies for enhancing productivity." *Res J Med Plant* 5.6 (2011): 630-649.
9. http://jkenvis.nic.in/newwebsite/pdf/newsletters/July_Sept_2016.pdf (Erişim Tarihi: 28.12.2016)
10. Yildirim, Evrim. Development of in vitro micropropagation techniques for saffron (*crocus sativus* l.). Diss. phd thesis, 2007.
11. Caiola, Maria Grilli, and Antonella Canini. "Looking for saffron's (*Crocus sativus* L.) parents." *Functional plant science and biotechnology* 4 (2010): 1-14.
12. Arslan, N., et al. "The effect of corm size and different harvesting times on saffron (*Crocus sativus* L.) regeneration." *Acta Horticulturae* 739 (2007): 113.

13. Alivandi, F., 2014 Farklı kökenli safran (*Crocus sativus* L.) genotiplerinde invitro mikrokorm ve sürgün rejenerasyonu üzerine bazı büyüme maddelerinin etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir
14. Özkul Açıkgöz, Aynur. Safran bitkisinin (*Crocus Sativus* L.) yetistirilmesi, kalitesi ve ticari önemi. MS thesis. Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
15. Karaoğlu, C., Çöcü, S., İpek, A., Parmaksız, İ., Uranbey, S., Sarihan, E. O., ... & Mirici, S. In Vitro Micropropagation of Saffron.
16. Yasmin, Salwee, F. A. Nehvi, and Shafiq A. Wani. "Tissue culture as an alternative for commercial corm production in saffron: A heritage crop of Kashmir." *African Journal of Biotechnology* 12.25 (2013).
17. Mir, Javid Iqbal, et al. "In vitro development of microcorms and stigma like structures in saffron (*Crocus sativus* L.)." *Physiology and Molecular Biology of Plants* 16.4 (2010): 369-373.
18. (*Crocus sativus* L.) regeneration." *Acta Horticulturae* 739 (2007): 113.
19. Jalal, J., Usma, M., Tanweer, A., Rukaya, A.C. and Raouf A.Mir., Callus induction and direct organogenesis in saffron callus by using plant extract as an alternative to phytohormones, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7.4 (2015): 90-92.
20. Ahmad, Mushtaq, et al. "Saffron (*Crocus sativus* L.) in the light of biotechnological approaches: A review." *Scientific Research and Essays* 9.2 (2014): 13-18.
21. Ascough, Glendon D., John E. Erwin, and Johannes van Staden. "Micropropagation of Iridaceae—a review." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 97.1 (2009): 1-1
22. Asil, H., 2015 Farklı hormon uygulamalarının ve soğan kesme yöntemlerinin safran (*Crocus sativus* L.) bitkisinde verim ve verim öğeleri üzerine etkisi, Doktora Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay
23. Zaffar, G., et al. "Effect of paclobutrazol and sucrose on in vitro corm formation in saffron (*Crocus sativus*)." *Cell Tissue Res* 14 (2014): 4069-4072.
24. Sharma, Kamal Dev, and Abel Piqueras. "Saffron (*Crocus sativus* L.) Tissue Culture: Micropropagation and secondary metabolite production." *Saffron. Functional Plant Science and Biotechnology* 4 (2010): 15-24.

25. Turhan, Hakan, et al. "The effects of different growing media on flowering and corm formation of saffron (*Crocus sativus* L.)." *African Journal of Biotechnology* 6.20 (2007).
26. Parray, Javid A., et al. "In vitro cormlet production of saffron (*Crocus sativus* L. Kashmirianus) and their flowering response under greenhouse." *GM crops & food* 3.4 (2012): 289-295.
27. <http://www.safranbolu.gov.tr/safranbolu-safrani-17-05-2014> (Erişim Tarihi: 25.06.2017)
28. Vahedi, Maryam, Siamak Kalantari, and Seyed Alireza Salami. "Factors affecting callus induction and organogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.)." *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 24.1 (2014): 1-9.
29. Zeybek, Evrim, Sertaç Önde, and Zeki Kaya. "Improved in vitro micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron." *Open Life Sciences* 7.1 (2012): 138-145.
30. Rajabpoor, S. H., A. V. Azghandi, and A. Saboor. "Effects of different concentrations of 2, 4-D and BAP on somatic embryogenesis induction in saffron (*Crocus sativus* L.)." *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 10.21 (2007): 3927-3930.
31. Sharifi, Golandam, et al. "Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.)." *Proteome science* 10.1 (2012): 3.
32. Darvishi, E., et al. "Effects of different hormone treatments on nonembryogenic and embryogenic callus induction and time-term enzyme treatments on number and viability of isolated protoplasts in saffron (*Crocus sativus* L.)." *II International Symposium on Saffron Biology and Technology* 739. 2006.
33. <http://www.safranbolusafran.com/wpcontent/uploads/2016/09/safranso%C4%9Fan%C4%B1-300x225.jpeg> (Erişim Tarihi: 28.07.2017)
34. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d6/Crocus_sativus_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-194.jpg/200px-Crocus_sativus_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-194.jpg (Erişim Tarihi: 28.07.2017)
35. http://3.bp.blogspot.com/_6HiwY3ccu2I/TGZIsxVHsiI/AAAAAAAAAAM/xnV_3iqRSUs/s1600/IMG_0817.jpg (Erişim Tarihi: 28.07.2017)

36. <http://i.sabah.com.tr/sbh/2015/10/26/1445875404471.jpg> (Erişim Tarihi: 28.07.2017)
37. http://www.ygeiaonline.gr/images/stories/Diatrofi/diatrofi_astheneia/saffron_02.jpg (Erişim Tarihi: 28.07.2017)



ÖZGEÇMİŞ

Ayça ŞAHİNALP 1991’de Elazığ’da doğdu; ilk ve orta öğrenimini de Elazığ’da tamamladı; Elazığ Mehmet Akif Lisesi’nden mezun olduktan sonra 2009 yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’ne girdi; 2013’de bölüm üçüncüsü olarak mezun olduktan sonra 2014 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans’a başladı; halen Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek lisans programını sürdürmektedir.