

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



SARI KAR LALESİ (*Fritillaria minima* RIX)'NİN
DOKU KÜLTÜRÜYLE ÇOĞALTILMASI

Ayşegül ÇELİK

Yüksek Lisans Tezi
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Danışman: Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU

ELAZIĞ-2017

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SARI KAR LALESİ (*Fritillaria minima* RİX)'NİN DOKU KÜLTÜRÜYLE
ÇOĞALTILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ayşegül ÇELİK
141132103

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 14.08.2017

Tezin Savunulduğu Tarih: 05.09.2017

Üye: Doç. Dr. M. Şaban TANYILDIZI (Fırat Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. A. Kadri ÇETİN (Fırat Üniversitesi)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Murat KÜRŞAT (Bitlis Eren Üniversitesi)

AĞUSTOS-2017

ÖNSÖZ

Bu tez konusu TÜBİTAK tarafından 2210-C programı ile desteklenmiştir. Deneysel çalışmalar FÜBAP M.F.15.38 nolu proje ile yürütülmüştür.

Yüksek Lisans tez çalışma konumun belirlenmesi, çalışma materyallerinin temini, laboratuvar çalışmalarının yürütülmesi ve tezimin yazılması aşamasında her türlü katkılarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU'na teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca Tez çalışmam boyunca özellikle çalışma materyali temininde yardımlarını esirgemeyen Bitlis Eren Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat KURŞAT'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Kübra KOÇAK ve Yunus Emre ÖZ'e teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatımın ve eğitimimin her aşamasında maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme de sonsuz teşekkür ederim.

Not: Tezimi Enstitüye teslim ettikten sonra sayın hocam Ömer MUNZUROĞLU vefat ettiğinden dolayı tez savunma sınavına katılamamıştır.

Ayşegül ÇELİK
ELAZIĞ-2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SİMGELER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Dünyada Geofit Üretimi ve Ticareti	4
2.1.1. Dünyada Geofit Üretimi	4
2.1.2. Dünya Çiçek Soğanı Ticareti	5
2.2. Türkiye’de Geofit Üretimi ve Ticareti	7
2.2.1. Türkiye’de Geofit Üretimi	7
2.2.2. Türkiye’de Geofit Ticareti	8
2.3. Liliaceae Familyası	12
2.4. <i>Fritillaria</i> Cinsi.....	14
2.4.1. <i>Fritillaria</i> Cinsi’nin Taksonomik Tarihi.....	14
2.4.2. <i>Fritillaria</i> Cinsinin Genel Özellikleri	15
2.4.3. <i>Fritillaria</i> Cinsinin Doğal Yetiştirme Ortamları	16
2.4.4. <i>Fritillaria</i> Cinsinin Dünya Üzerinde Yayılışı.....	17
2.4.5. Türkiye’deki <i>Fritillaria</i> Türleri	19
2.4.5.1. <i>Fritillaria minima</i> ’nın Genel Özellikleri	22
2.5. <i>Fritillaria</i> Türlerinin Kullanımı ve Ekonomik Önemi.....	24
2.5.1. <i>Fritillaria</i> Türlerinin Peyzaj Uygulamalarında Kullanımı	24
2.5.2. <i>Fritillaria</i> Türlerinin Tıbbi Kullanımı	25
2.5.3. <i>Fritillaria</i> ’nın Gıda Olarak Kullanımı	26
2.5.4. <i>Fritillaria</i> Cinsinin Ekonomik Önemi	26
2.6. Geofitlerde Çoğaltma Yöntemleri.....	28
2.7. <i>Fritillaria</i> Türlerinin Çoğaltılması.....	30

2.7.1.	<i>Fritillaria</i> Türlerinin Generatif Yöntemle Çoğaltılması.....	30
2.7.2.	<i>Fritillaria</i> Türlerinin Vegetatif Yöntemle Çoğaltılması	30
2.7.2.1.	Yavru Soğanlar İle Üretim	31
2.7.2.2.	Soğan Pulları İle Üretim (Scaling).....	32
2.7.2.3.	Parçacık (Dilimlere Ayırma - Chipping) ve İkiz Pul (Twin-Scaling) İle Üretim	32
2.7.2.4.	Soğan Tabanının Kesilmesi İle Üretim.....	33
2.7.3.	<i>Fritillaria</i> Türlerinin Doku Kültürü Yöntemiyle Çoğaltımı	34
2.7.3.1.	Bitki Doku Kültürünün Tarihi Gelişimi.....	35
2.7.3.2.	Bitki Hücre ve Doku Kültürünün Temelleri	36
2.7.3.3.	Bitki Doku Kültürünün Uygulama Alanları	37
2.7.3.3.1.	Tarımda Doku Kültürü	37
2.7.3.3.2.	Germplazm Muhafazası	38
2.7.3.3.3.	Embriyo Kültürü	38
2.7.3.3.4.	Genetik Transformasyon	39
2.7.3.3.5.	Protoplast Füzyonu	40
2.7.3.3.6.	Haploid Üretimi	41
2.7.3.3.7.	Farmasotiklerde doku kültürü	41
2.7.3.4.	Bitki doku kültürünün mevcut ve gelecekteki durumu.....	43
2.7.3.5.	Bitki doku kültürü teknikleri.....	43
2.7.3.5.1.	Mikroçoğaltım.....	43
2.7.3.5.1.1.	Mikroçoğaltımı Etkileyen Faktörler.....	44
2.7.3.5.2.	Somatik embriyogenezis ve organogenezis	45
2.8.	Literatür Özeti	47
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	60
3.1.	Materyal	60
3.1.1.	Bitki Materyali	60
3.1.2.	Kimyasal Maddeler	61
3.1.3.	Sarf Malzemeler	62
3.2.	Yöntem.....	62
3.2.1.	Eksplantların Hazırlanması.....	62
3.2.1.1.	Soğanlardan Eksplant hazırlanması ve Yüzey Sterilizasyonu	62
3.2.1.2.	Çiçeklerin taç yapraklarından eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması ..	64

3.2.1.3.	Çiçek saplarından eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması.....	67
3.2.2.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stoklarının Hazırlanması	68
3.2.3.	Besi Ortamlarının Hazırlanması	69
3.2.4.	Köklendirme İşlemi	69
3.2.5.	Dış koşullara aktarma	70
3.3.	İstatistiksel Analiz.....	70
4.	BULGULAR.....	71
4.1.	Soğan Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular.....	71
4.2.	Çiçek Taç Yaprığı Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular.....	88
4.3.	Çiçek Sapı Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular.....	88
5.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	90
6.	ÖNERİLER	102
7.	KAYNAKLAR	103
	ÖZGEÇMİŞ.....	121

ÖZET

Bu çalışmada ülkemiz için endemik ve türü tehlike altındaki *Fritillaria minima* Rix'in *in vitro* çoğaltımı amaçlandı. Bitkinin soğan, açmamış çiçek tepalleri ve çiçek saplarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı deneylerde, besin ortamı olarak MS (vitaminli) ortamı kullanıldı. %3 ve %6 sükroz ile NAA, IAA ve BA gibi bitki büyüme düzenleyicileri (PGR) kullanılarak *Fritillaria minima*'nın farklı eksplantlarının kallus ve organogenezis oluşum oranları belirlendi. Yüzey sterilizasyonu işlemleri farklı konsantrasyonlarda 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, tüm soğan eksplantlarında görülen enfeksiyon oranı %6 seviyesinde tutulmuştur. Burada gelişme görülmeyen ve enfekte olan eksplantlar gelişmeyen eksplantlar kategorisinde değerlendirilmiştir. Buna bağlı olarak canlı kalan eksplant oranı %92.06 olarak belirlenmiştir. Canlı kalan eksplantlardan soğan eksplantlarının %25.43'ünde kallus oluşumu, %9.05 inde soğancık oluşumu görüldü. 120 günlük inkübasyon süresinin sonunda en iyi sonuç %3 sükroz içeren yüksek sitokininli ortam (1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA)'da alındı. Bu ortamda soğan eksplantlarının %94.29'sinde direkt veya endirekt organogenez, geriye kalan %5.71'inde sadece kallus oluşumu görüldü. PGR içermeyen temel besi ortamında sükroz bulunmadığı zaman %37.93 oranında kallus oluşumu görüldü. %3 sükroz içeren yüksek sitokinin ortamında indirekt organogenezle %40 oranında sürgün oluşumu meydana geldi. İndirekt organogenezle meydana gelen en yüksek soğancık oluşumu ise %3 sükroz içeren düşük sitokinin ortamında elde edildi (%35.29). %6 sükroz içeren yüksek sitokininli ortam direkt organogenezle sürgün oluşumunda en etkili ortam olarak belirlendi (%14.28). Direkt organogenezle soğancık oluşumunda ise en etkili ortamın %3 sükroz içeren düşük sitokininli ortam olduğu gözlemlendi (%23.52). Eksplant başına endirekt sürgün oluşumu en yüksek, %3 sükroz içeren yüksek sitokininli ortamda (13.1) , eksplant başına endirekt soğancık oluşumu en yüksek %3 sükroz içeren düşük sitokininli ortamda (14.1) elde edildi. Sürgün ve soğancık oluşumu görülen eksplantlar ½ MS + %0.6 agar + %3 sükroz + 5mg/l NAA + 0.5 mg/l BA içeren ortamda köklenmeye alındı. Köklenme ortamındaki ilk 30 günlük inkübasyon sonunda tüm eksplantların %45'inde, 60 günlük inkübasyonu sonunda tüm eksplantların %76.25'inde köklenme gerçekleşti. Soğan eksplantlarından *in vitro* şartlarda elde edilen tam bitkiciklerin dış ortama adaptasyonunda kayda değer bir sonuç elde edilemedi. Ayrıca açmamış çiçek petalleri ile çiçek saplarının eksplant olarak kullanıldığı deneylerde herhangi bir oluşum gözlemlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Biyoteknoloji, *Fritillaria minima*, Mikroçoğaltım, *İn vitro*

SUMMARY

Propagation of *Fritillaria minima* Via Plant Tissue Culture

In this study, the *in vitro* propagation of *Fritillaria minima* Rix which is endemic for our country and endangered was aimed. In experiments where the bulb, unopened flower hills and flower stalks were used as explant source, the MS (with vitamin) medium was used as the nutrient medium. Callus and organogenesis formation rates of different explants of *Fritillaria minima* were determined by using 3% and 6% sucrose and plant growth regulators (PGR) such as NAA, IAA and BA. Surface sterilization procedures were performed by using ethyl alcohol and sodium hypochlorite (NaOCl) at different concentrations. Explants were allowed to develop at 20 ± 1 °C. 8 hours dark and 16 hours light photoperiod are applied.

At the end of the first 30-day incubation, the infection rate in all bulb explants was kept at 6 %. Then, explants with no development and infections were evaluated in the category of explants that did not develop. As a result, the survival rate of the explants was determined as 92.06 %. Callus formation was observed in 25.43% of the bulb explants of the surviving explants, and bulblet formation was observed in 9.05%. At the end of the 120-day incubation period, the best results were obtained in high cytokinin medium (1 BA + 0.6 NAA + 0.4 IAA) containing 3% sucrose. Direct or indirect organogenesis was observed in 94.29% of the bulb explants whereas only callus formation was observed in the remaining 5.71% of the bulb explants. Callus formation was obtained in 37.93% when sucrose was not present in the PGR-free primary fattening medium. In the high cytokinin medium containing 3% sucrose, 40% shoot formation was observed by indirect organogenesis. The highest bulblet formation by indirect organogenesis was obtained in the low cytokinin medium containing 3% sucrose (35.29%). High cytokinin medium containing 6% sucrose was identified as the most effective medium for shoot formation by direct organogenesis (14.28%). On the other hand, it was observed that the most effective medium for the formation of the bulblet by direct organogenesis was a low cytokinin medium containing 3% sucrose (23.52%). Indirect shoot formation per explant was highest in the high cytokinin medium containing 3% sucrose (13.1), and indirect bulblet formation per explant was highest in the low cytokinin medium containing 3% sucrose (14.1). Explants with shoot and bulblet formation were rooted in medium containing $\frac{1}{2}$ MS + 0.6% agar + 3% sucrose + 5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA. At the end of the first 30-day incubation in rooting medium, 45% of all explants were rooted while 76.25% of all explants were rooted after 60 days of incubation. No significant results were obtained from the adaptation of the whole plantlets to outdoor environment obtained from the bulb explants *in vitro*. In addition, no formation was observed in the experiments where unopened flower petals and flower stalks were used as explants.

Key Words: Biotechnology, *Fritillaria minima*, micropropagation, *In vitro*

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Dünyada çiçek soğanı üretimi yapan ülkeler ve üretim alanları	5
Tablo 2.2. 2003/2004, 2004/2005 ve 2007/2008 yıllarında Hollanda tarafından yetiştirilen çiçek soğanları üretimi.....	6
Tablo 2.3. Hollanda'da Üretilen Süs Geofitlerinin Yıllara Göre İhraç Edildiği Ülkeler	7
Tablo 2.4. Türkiye'nin doğal çiçek soğanları ihracatı (ABD Doları)	8
Tablo 2.5. 2017 Yılı Doğal Çiçek Soğanlarının İhracat Listesi Tablosu.....	10
Tablo 2.6. 2013 Yılı Türlerle Göre Doğal Çiçek Soğanları İhracatı.....	11
Tablo 2.7. 2013 Yılı Türkiye’de Türlerle Göre Çiçek Soğanı İthalatı.....	12
Tablo 2.8. <i>Fritillaria</i> cinsinin tür sayısı açısından farklı bölgelerdeki ülkelerle karşılaştırılması.....	18
Tablo 2.9. TÜBİTAK-Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı’na göre Türkiye’de bulunan <i>Fritillaria</i> tür ve alttür taksonları.....	20
Tablo 2.10. İhracatı yapılan <i>Fritillaria</i> türlerinin 2000-2005 yılları arasındaki ihracat verileri.....	27
Tablo 2.11. Bitki doku kültürünün tarihi gelişimi	35
Tablo 2.12. Temel mikroçoğaltım aşamaları	43
Tablo 3.1. Sükroz (%), BA, IAA, NAA (mg/l) içeren kallus teşvik ortamları	69
Tablo 4.1. İlk 30 günde enfeksiyon görülen soğan eksplantları	71
Tablo 4.2. İlk 30 günde soğan eksplantlarındaki gelişmeyen ve canlı kalan eksplantlar ...	72
Tablo 4.3. İlk 30 günde soğan eksplantlarında görülen kallus ve soğancık oluşumu.....	72
Tablo 4.4. Magentalara Aktarılan Eksplantlarda Görülen Enfeksiyon Miktarları ve Canlı Kalan Eksplantlar.....	74
Tablo 4.5. Sükroz konsantrasyonlarının ilk 30 günde soğan eksplantlarının canlı kalma oranına etkisi.....	75
Tablo 4.6. Sükroz konsantrasyonlarının soğan eksplantlarında kallus oluşumu üzerine etkisi.....	75
Tablo 4.7. 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 veriler (Kallus oluşumu, İndirekt Organogenezis)	80

Tablo 4.8. 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 veriler (Direkt sürgün ve direkt soğancık oluşumu)	81
Tablo 4.9. Yüksek sitokinli ortamda farklı sükröz konsantrasyonlarının organogenez oluşturma oranlarına etkisi	82
Tablo 4.10. Farklı sükröz konsantrasyonlarının organogenez oluşturma oranlarına etkisi	83
Tablo 4.11. Farklı sükröz konsantrasyonlarının indirekt soğancık oluşumuna etkisi.....	83
Tablo 4.12. Farklı sükröz konsantrasyonlarının indirekt soğancık oluşumuna etkisi.....	83
Tablo 4.13. Farklı sükröz konsantrasyonlarının indirekt soğancık oluşumuna etkisi.....	83
Tablo 4.14. İndirekt organogenezis görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün ve soğancık miktarları	84
Tablo 4.15. Direkt organogenezis görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün ve soğancık miktarları	84
Tablo 4.16. Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda indirekt 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.....	86
Tablo 4.17. Kök ve sürgün oluşumu görülen bitkiciklerin dış ortama aktarıldıktan sonra, 60 gün boyunca her 10 günde tespit edilen gelişme oranları	88

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. <i>Fritillaria</i> cinsinin dünya üzerindeki yayılışı	18
Şekil 2.2. <i>Fritillaria</i> cinsinin Türkiye’deki yayılışı	21
Şekil 2.3. Sarı Kar lalesi (<i>Fritillaria minima</i> Rix)	22
Şekil 2.4. Sarı kar lalesinin (<i>Fritillaria minima</i> Rix) Türkiye’deki yayılış alanı.....	23
Şekil 2.5. Protoplast füzyonuyla hibrit bitki üretiminin şematik gösterimi	40
Şekil 3.1. <i>Fritillaria minima</i> Rix bitkisinin toplandığı lokaliteler	60
Şekil 3.2. Deney materyali olarak kullanılan <i>Fritillaria minima</i> bitkilerinin doğal ortamlarındaki görünüşleri	60
Şekil 3.3. Açmamış çiçek taşıyan <i>Fritillaria minima</i> bitkilerinin musluk suyu altında yıkandıktan sonraki görüntüsü	61
Şekil 3.4. Musluk suyu altında yıkanarak yüzey sterilizasyonu işlemine hazırlanan <i>Fritillaria minima</i> soğanları	62
Şekil 3.5. <i>Fritillaria minima</i> Rix’in soğanlarından elde edilen eksplantlar	63
Şekil 3.6. <i>Fritillaria minima</i> bitkisinin soğan eksplantlarının kültürü(Bar= 1cm)	64
Şekil 3.7. Çiçek taç yaprağı eksplantlarının elde edildiği <i>Fritillaria minima</i> bitkileri	65
Şekil 3.8. Musluk suyu altında yıkanarak yüzey sterilizasyonuna hazırlanan <i>Fritillaria minima</i> çiçekleri	65
Şekil 3.9. <i>Fritillaria minima</i> Rix bitkisinin açmamış yeşil çiçeklerinin ve açmaya yakın sarı-yeşil renkteki çiçeklerinin petallerinden elde edilen eksplantlar	66
Şekil 3.10. Kültüre alınan çiçek eksplantları	66
Şekil 3.11. <i>Fritillaria minima</i> Rix bitkisinin çiçek saplarından eksplant elde edilmesi	67
Şekil 3.12. Kültüre alınan çiçek sapı eksplantları	68
Şekil 4.1. İlk 30 günlük periyotta soğan eksplantlarında gözlemlenen kallus oluşumu (Bar = 1cm)	73
Şekil 4.2. 60 günde <i>Fritillaria minima</i> soğan eksplantlarında kallus gelişimi ve farklılaşması (Bar= 1cm)	76
Şekil 4.3. 60 günlük periyotta soğan eksplantlarından elde edilen kallusların farklılaşması; a) İndirekt sürgün oluşumu b) İndirekt soğancık oluşumu (Bar= 1 cm).....	76

Şekil 4.4. 90 günlük periyotta <i>Fritillaria minima</i> soğan eksplantlarında görülen direkt soğancık oluşumu (Bar= 1 cm)	77
Şekil 4.5. 90 günlük periyotta <i>Fritillaria minima</i> soğan eksplantlarında görülen indirekt soğancık oluşumu (Bar= 1 cm)	78
Şekil 4.6. 90 günlük periyotta <i>Fritillaria minima</i> soğan eksplantlarında görülen indirekt sürgün oluşumu (Bar= 1 cm)	78
Şekil 4.7. 90 günlük periyotta <i>Fritillaria minima</i> soğan eksplantlarında görülen; a) Direkt sürgün oluşumu, b) Direkt soğancık oluşumu (Bar= 1 cm)	82
Şekil 4.8. 120 günlük periyotta <i>Fritillaria minima</i> soğan eksplantlarında görülen indirekt soğancık ve sürgün oluşumu (Bar= 1 cm)	85
Şekil 4.9. Endirekt ve direkt organogenezle oluşan soğancıkların köklenme ortamına aktarıldıktan 60 gün sonra oluşturduğu kök yapıları (Bar= 1 cm)	87
Şekil 4.10. Köklendirilen <i>Fritillaria minima</i> soğancıkların dış ortama aktarılması (Bar= 1 cm)	87
Şekil 5.1. İlk 30 günde petrielerde görülen oluşumlar	93
Şekil 5.2. İlk 20. ve 30. günlerde petrielerde görülen kallus oluşumları (%)	94
Şekil 5.3. Magentalardaki 90. günde farklı besin ortamlarında kallus oluşumu ve farklılaşması (%)	95
Şekil 5.4. Magentalardaki 90. Günde Farklı Besin Ortamlarında Direkt Sürgün ve Soğancık Oluşumu (%)	96
Şekil 5.5. Kültürün başlangıcından itibaren 120. günde indirekt organogenezis görülen eksplant başına oluşum	99
Şekil 5.6. Kültürün başlangıcından itibaren 120. günde direkt organogenezis görülen eksplant başına oluşum	99

SİMGELER DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
BA	: Benzil aminopürin
cm³	: Santimetre küp
°C	: Derece santigrat
2,4-D	: 2,4-Dikloroasetikasit
EB	: Epibrassinolide
g/l	: Gram/litre
IAA	: Indol 3-asetik asit
KN	: Kinetin
LS	: Linsmaier and Skoog
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µmol m⁻²s⁻¹	: Mikro mol/metre kare.saniye
mg/L	: Miligram/litre
ml	: Mililitre
Mol	: Molar
MS	: Murashige and Skoog
N	: Normal
NAA	: Naftalen asetik asit
PEG	: Polietilen glikol
PGR	: Bitki Büyüme Düzenleyicisi
Ppm	: Milyonda bir kısım
TDZ	: Thidiazuron

1. GİRİŞ

Türkiye, oldukça zengin ve ilgi çekici bir bitki örtüsüne sahiptir. Bu durum, Türkiye'nin üç önemli bitki coğrafyasının birleşme noktasında olması, birçok bitki türünün çeşitlilik merkezi olması ve Avrupa ile Asya arasında köprü konumunda olmasından kaynaklanmaktadır. Son yapılan teşhislere göre ülkemizde 12.476 bitki taksonu bulunmaktadır (Avcı, 2005; Karagöz ve ark., 2016). Türkiye'nin bitki zenginliği, tür çeşitliliği ve yüksek sayıda endemik türe sahip olmasıyla ortaya çıkmaktadır. Türkiye'den 15 kat büyük olan Avrupa kıtasıyla karşılaştırıldığında, bu zenginliğimiz daha iyi anlaşılacaktır. Diğer Avrupa ülkelerindeki endemik taksonların toplamı 2750 kadar iken, ülkemizde bu sayı 4.080 (Davis, 1965, Özhatay ve Kültür, 2006; Yaylacı ve ark., 2013; Şahin ve ark., 2015)'dir. Ülkemizde endemik türler Güney ve Güneydoğu Anadolu'nun dağlık kesimlerinde baskın olmak üzere, ülke genelinde bazı alanlarda yoğunlaşmaktadır. En yüksek endemik bitki sayısı İran-Turan Bitki Coğrafya Bölgesi'nde ve Akdeniz Bölgesi'nde görülmektedir. Geofitler, ülkemizde bulunan bitki türlerinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Geofitler, toprak üstü organları büyüme mevsiminde gelişimini tamamladıktan sonra kuruyarak ölmesine rağmen, yaşamlarını toprak altında sürdürebilecek organlara sahip olan iki veya çok yıllık bitkilerdir. Geofitler genel olarak çiçek soğanları olarak adlandırılırlar. Türkiye Florası kayıtlarına göre, ülkemizde 1060 geofit taksonu bulunmaktadır (Özhatay ve ark., 2013).

Liliaceae, Amarylidaceae, Iridaceae, Orchidaceae ve Araceae başlıca geofit familyalarıdır. Liliaceae familyası yaklaşık olarak 280 cins ve 4000 türü içermektedir. Türkiye'de bulunan 430 Liliaceae türünün içinde *Fritillaria* türleri büyük bir öneme sahiptir. *Fritillaria* Türkiye'de doğal olarak dağılım gösteren 49 taksona sahiptir. *Fritillaria* cinsinin Türkiye'deki endemizm oranı ise %36,53'dir (Tekşen ve ark., 2011). Bu yüksek oran Türkiye florasının bu cinsin genetik çeşitliliğinin merkezi olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, *Fritillaria* cinsine ait türler tarımsal ve ekonomik açıdan yüksek öneme sahiptir (Tekşen ve ark., 2008; Türктаş 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 kullanılmaktadır (Tekşen ve ark., 2011). Bazı *Fritillaria* türleri geleneksel Çin tıbbında öksürük giderici ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadırlar (Wang ve ark., 2005). *Fritillaria* cinsine mensup bitkiler 1200–2000 m yükseklikler arasında yayılış göstermektedir. Ayrıca toplam biyokütle içeriğinin yaklaşık %80'i nişastadan oluşan bazı *Fritillaria* türleri, gıda olarak da özellikle Uzakdoğu'da kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2005).

Fritillaria türlerine olan talep katlanarak artmış ve bunun sonucu olarak da kozmopolit yayılış göstermeyen bazı türler yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmıştır. Ülkemiz ekonomisi için büyük değer taşıyan *Fritillaria* türlerinin zaman geciktirilmeden korunması gerektiği açıktır. Bu amaçla alınması gereken iki temel tedbir ortaya çıkmaktadır. Bunlardan birincisi *Fritillaria* türlerinin doğada korunmasıdır. Burada yapılması gereken soğanların toplanmasının tür bazında planlı ve bilinçli bir şekilde gerçekleştirilmesidir. İkincisi *Fritillaria* türlerinin generatif veya vejetatif yollarla çoğaltılma tekniklerinin araştırılmasıdır. Bu hem tehlike altındaki *Fritillaria* türlerinin korunmasına katkı sağlayacak hem de soğanların üretiminin daha hızlı ve yaygın şekilde gerçekleştirilmesine yönelik bir kısmı modifiye edilmiş alternatif yöntemler sunacaktır.

Ülkemizde endemik olarak bulunan ve nesli tükenme tehlikesi altında olan *Fritillaria* türlerinden biri *Fritillaria minima*'dır. *Fritillaria minima* ilk defa 1954 yılında Artos dağından toplanmış ve 1971 yılında "Sarı kar lalesi" olarak dünyaya tanıtılmıştır. Sarı kar lalesi Türkiye'nin endemik ters lale türlerinden biridir. Göz alıcı açık sarı renkli çiçekler açar. Gövde uzunluğu 10 cm civarındadır. *Fritillaria minima*, haziran-temmuz aylarında çiçeklenir. Soğanlarının çapları 1-1,5 cm arasında değişir. Van yöresinde yetişir. *Fritillaria minima*, yurdumuza özgü ve dar yayılışlı bir bitkidir. Yüksek rakımlarda yetişir ve habitatları zayıftır (Koyuncu, 2000).

Bu çalışmada bir geofit olan endemik Sarı kar ters lalesi (*Fritillaria minima*)'nin in vitroda doku kültürü ile çoğaltılması amaçlanmıştır. *Fritillaria minima* türüne ait soğan pul yaprağı parçaları kullanılarak direkt organogenesis, kallus oluşumu ve indirekt organogenesis gerçekleştirilmiştir. Sürgün ve kök oluşumunun en iyi gerçekleştiği koşullar tespit edilmiş ve bitkinin rejenere bitkicik potansiyelleri belirlenmiştir. Ayrıca bu ters lale türünün doku kültürüyle çoğaltılmasında en uygun eksplant tipi belirlenmiştir. Bunun için bitkinin açmamış çiçek, bu çiçeklerin sapları ve bitkinin gövdesinden elde edilen parçalar

eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu işlemlerinde en iyi sterilizasyonu sağlamak için, literatür bilgileri de göz önüne alınarak çeşitli ön protokolleri hazırlanmış ve farklı konsantrasyonlarda alkol, sodyum hipoklorit ve Tween 20 kullanılmıştır. Çalışmada besin ortamı olarak MS bileşimi ve değişik büyüme düzenleyicileri ve dozları (NAA, IAA, BA) kullanılmıştır. Ortam olarak MS bileşimi ve değişik büyüme düzenleyicileri ve dozları (NAA, IAA, BA) kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Dünyada Geofit Üretimi ve Ticareti

2.1.1. Dünyada Geofit Üretimi

Çiçek soğanı yetiştiriciliği, uzun yıllardan beri ılıman iklimde bulunan ülkelerde soğanı ön plandadır. Hollanda, 19. ve 20. yüzyıllar boyunca dünya çiçek soğanı ticaretine hakim olmuştur. 20. yüzyılın sonuna kadar da, ticaretin yaklaşık %92'sini elinde tutmuştur. Ancak bu durum günümüze kadar yavaş yavaş gerilemiştir. Bunun sebepleri şunlardır;

- 1) Hollanda nüfusu arttıkça konutların gelişimi ile soğan üretim alanları azalmış;
- 2) Taze topraklara olan ihtiyaç artmış;
- 3) Soğan üreticilerinin ve ihracatçıların konsolide edilmesi için üretim maliyetlerini ve özellikle emeği azaltma ihtiyacı ortaya çıkmış ve
- 4) Diğer ülkelerdeki yüksek kalitede çiçek soğanlarının üretimi (Kiplinger, 1967; Wallis ve ark., 1977; Moore, 1983; Schenk, 1984; Smith, 1985; Benschop ve ark., 2010) artmıştır.

1980 ve 2000 yılları arasında Hollanda'daki çiçek soğanları üretim alanı 14.350 ha'dan 22.543 ha'a yükselirken, 1999-2000 yılları arasında %1'lik gibi çok düşük bir azalış göstermiştir (Kamphuis ve ark., 2002). Hollanda, günümüzde dünyanın toplam çiçek soğanı üretim alanının %70'ini karşılamaktadır (Buschman, 2004) (Tablo 2. 1).

Dünyada çiçek soğanı ticareti yapan ülkeler arasında Hollanda'dan sonra Fransa, Çin ve İngiltere gelmektedir (Buschman, 2004). Dünyada en fazla yetiştirilen çiçek soğanı türleri ise lale (*Tulipa*) ve zambak (*Lilium*) olup tüm dünyadaki lale üretim alanlarının yaklaşık %87'si, zambak üretim alanlarının yaklaşık %77'si Hollanda'da bulunmaktadır (Buschman, 2004). Hollanda'da üretimi en fazla yapılan çiçek soğanı türleri ve yıllar itibarıyla üretim alanlarındaki değişimler incelendiğinde lale ve zambaktan sonra nergis, glayöl ve sümbül gibi diğer çiçek soğanı türlerinin de yetiştiriciliğinin önem kazandığı görülmektedir.

Tablo 2.1. Dünyada çiçek soğanı üretimi yapan ülkeler ve üretim alanları (URL-1, 2004)

Ülkeler	Üretim Alanı (Ha)	Üretilen Çiçek Soğanı Türü
Hollanda	20.921	Lale (<i>Tulipa</i>), Zambak (<i>Lilium</i>)
İngiltere	4.660	Nergis (<i>Narcissus</i>), Glayöl (<i>Gladiolus</i>), Lale (<i>Tulipa</i>)
Fransa	1.289	Zambak, Lale, Süsen (<i>İris</i>), Glayöl, Yıldız çiçeği (<i>Dahlia</i>)
Çin	1.281	Nergis, Lale, Glayöl, Zambak
A.B.D.	995	Nergis, Lale, Glayöl, Zambak, Süsen
Japonya	883	Zambak, Lale, Glayöl
İsrail	456	Nergis, Düğün çiçeği (<i>Ranunculus</i>)
Polonya	335	Lale, Zambak, Nergis, Glayöl, Yıldız çiçeği
Yeni Zelanda	228	Lale, Zambak, Kala (<i>Zantedeschia</i>), Süsen, Frezya (<i>Fressia</i>)
Şili	240	Lale, Zambak
Güney Afrika	200	Hippeastrum, Nerin (<i>Nerine</i>), Zambak, Lale
Brezilya	200	Glayöl, Hipeastrum
Almanya	190	Lale, Glayöl, Nergis, Çiğdem (<i>Crocus</i>)
Belçika	185	Zambak
Danimarka	60	Lale, Nergis
Arjantin	47	Glayöl, Lale
Toplam	32.153	

2.1.2. Dünya Çiçek Soğanı Ticareti

Dünya çapında, çiçek soğanı endüstrisinin değeri 1 milyar doların üzerindedir (De Hertogh ve ark., 1993; Buschman, 2004). Küresel kesme çiçek üretiminde, süs bitkisi soğanlarının çiçekleri ve ihracatı büyük bir yer tutmaktadır. 2005 yılında, önde gelen ülkeler, en popüler süs geofitlerini üretmek için 32.000 hektardan fazla alan kullanmışlardır (Tablo 2. 1).

Dünya genelinde lider çiçek soğanı üreticisi Hollanda'nın 2005 yılındaki üretim değeri 29.491 \$/hektar iken ihracat değeri 34.048 \$/hektar olarak kaydedilmiştir (AIPH 2004). Avrupa Birliği ülkelerinin toplam çiçek soğanı ihracatı 2005'te 837 milyon dolara ulaşırken, Hollanda'nın toplam çiçek soğanı ihracatı, 756 milyon doları bulmuştur. Bunun 406 milyon doları kesme çiçek ve 350 milyon doları soğan satışlarıdır (De Hertogh ve ark., 2012).

Hollanda 2.3 milyarı (%53) farklı ülkelerde kesme çiçek üretimi için ihraç edilen, 4 milyardan fazla lale soğanı üretmektedir. Lale soğanları, Japonya (300 ha), Fransa (293

ha), Polonya (200 ha), Almanya (155 ha) ve Yeni Zelanda'da (122 ha) üretilmektedir (Buschman, 2004).

Zambak soğanlarının küresel üretimi 10 ülkede gerçekleştirilmektedir. En büyük üretim bölgesi Hollanda'da 4808 ha (%77) alanda yapılmaktadır, bunu Fransa (401 ha), Şili (205 ha), ABD (200 ha), Japonya (189 ha) ve Yeni Zelanda (110 ha) izlemektedir (Buschman, 2005). Hollanda 2.21 milyar lilyum soğanı üretmekte olup, bu soğanlardan 2.11 milyarını AB'ye ve AB dışındaki ülkelere ihraç etmektedir. Hollanda'da 0.41 milyar zambak soğanı kesme çiçek olarak kullanılmaktadır.

Tablo 2.2. 2003/2004, 2004/2005 ve 2007/2008 yıllarında Hollanda tarafından yetiştirilen çiçek soğanları üretimi (PT/BKD 2008)

Tür	Alan (Ha)		
	2003/2004	2004/2005	2007/2008
Lale	10.982	10.034	9.885
Zambak	3.212	3.275	3.699
Nergis	1.796	1.721	1.687
Glayöl	1.151	1.060	1.019
Sümbül	1.121	1.140	854
Çiğdem	668	566	463
Süsen	481	464	360
Toplam	19.411	18.260	17.967

Günümüzde çiçek soğanları için, önde gelen ihracat pazarları arasında, AB ve ABD sayılabilir, ancak ülkelerin sıralamaları zamanla önemli ölçüde değişmiştir (Tablo 2. 1 ve Tablo 2. 2). Çiçek soğanları üretimi dünya savaşlarından, karantinalardan ve değişen pazarlardan etkilenmiştir. Blaauw ve arkadaşları (Hartsema, 1961) tarafından oluşturulan ilkeleri kullanarak Hollanda öncelikle lale, Hollanda süseni ve nergislerin kesme çiçekler olarak kullanılmasına odaklanmıştır. Buna karşılık, Amerika Birleşik Devletleri'nde, kesme çiçek soğanlarının birincil kullanımı, saksı çiçekleri olmuştur.

Dünya genelinde, çiçekçilik sektörü çok fazla değişiklikler yaşamıştır ve değişime uğramaya devam etmektedir. Geleneksel ülkelere (Tablo 2. 3) ek olarak, küreselleşme ve artan rekabet, yeni soğan ve çiçek üretim merkezlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Örneğin, Latin Amerika, Afrika ve Asya çiçek soğanlarındaki üretimi hızla arttırmakta ve

buna ek olarak Çin, Tayvan, Singapur, Hindistan, Malezya, Pakistan, Tayland, Sri Lanka ve Vietnam çiçek üreticileri olarak ortaya çıkmaktadır.

Tablo 2.3. Hollanda'da Üretilen Süs Geofitlerinin Yıllara Göre İhraç Edildiği Ülkeler (PT/BKD 2008)

Ülkeler	Milyon US Doları			Oran (Peyzaj/Kesme Çiçek)
	1996–1997	1999–2000	2005–2006	
ABD	115	147	179	2:1
Japonya	114	102	102	1:3
Almanya	95	90	104	2:1
UK	51	65	97	3:1
İtalya	53	61	56	1:4
Fransa	55	56	65	2:1
İsveç	24	24	28	1:2
Kanada	15	20	29	1:1

2.2. Türkiye’de Geofit Üretimi ve Ticareti

2.2.1. Türkiye’de Geofit Üretimi

Türkiye florasında üretildikten sonra ihracatı yapılan türler çoğunlukla (%80'in üzerinde) *Galanthus*, *Eranthis*, *Anemone*, *Leucojum* ve *Cyclamen* cinslerine aittir. Son yıllarda bu türler doğal çevrelerinde yoğunluklu bir şekilde toplanmış ve sayıları oldukça azalmıştır. Bu durum Türkiye’de birçok geofit bitkiyi yok olma tehlikesiyle karşı karşıya getirmiş ve bu türlerin çoğunun ihracatı yasaklanmıştır. Daha sonra yapılan düzenlemelerle birlikte bazı türlerin yetiştirilmesi şartıyla satışına izin verilmiştir (Zencirkiran ve ark., 1999, Zencirkiran, 2002). Bu yasal düzenlemeler sonucunda, 2004 yılında doğal çiçek soğanları için üretim alanları 226 ha'ya yükseltilmiştir. Doğal çiçek soğanları için üretim alanları Marmara, Akdeniz ve Ege bölgelerinde yoğunlaşmaktadır.

2.2.2. Türkiye’de Geofit Ticareti

Doğal çiçek soğanlarının ihracatı 1875 yılından beri düzenli olarak yapılmakla birlikte, 1960’lardan itibaren ihracatı giderek artmış, 1984–1985 yıllarında 84 milyon adete kadar çıkmış; daha sonra azalarak günümüze kadar gelmiştir. Türkiye dünyada doğal çiçek soğanı ihracatına önemli bir yer tutmaktadır (Karagüzel ve ark., 2007). Türkiye florasında doğal olarak yetiştirilen geofitler öncelikle Hollanda ve Danimarka, İsviçre, Almanya, İtalya, İngiltere, Bulgaristan ve Fransa gibi ABD ülkelerine ve Japonya gibi diğer Avrupa ülkelerinde satılmaktadır (Zencirkiran ve ark., 1999, Zencirkiran, 2002). Bu ticaretin ekonomik değeri 2- 3 milyon dolar arasında değişmektedir (Tablo 2. 4). Hollanda bizden aldığı soğanların büyük kısmını ABD’ye ihraç etmektedir (Uluğ, 1997).

Tablo 2.4. Türkiye'nin doğal çiçek soğanları ihracatı (ABD Doları) (PT/BKD 2008)

Yıl	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Doğal Çiçek Soğanları İhracat Değeri	2.229.382	1.832.576	2.285.280	2.881.404	2.922.002	2.679.251

Türkiye’nin soğanlı, yumrulu ve rizomlu bitki türlerinin satın alınmasında tercih edilen ülkelerden birisi olmasının ana nedeni bu materyalin doğada hazır olarak bulunması ve ucuz bir şekilde elde edilmesidir. Bu olgunun yüzyılı aşkın bir geçmişe dayanması, doğada onarılması çok zor bir tahribata yol açmış ve tür azalmasının nedeni olmuştur. Nitekim salep yapımında kullanılan Orchidaceae familyasına dâhil türler sürekli olarak doğadan sökülmesinden dolayı kaybolma tehlikesi ile karşı karşıya kalmışlardır. 1981–1984 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 1996 yılında CITES'e 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 T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık 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. Resmi gazetede yayımlanan bu Yönetmeliğin amacı; doğal çiçek soğanı türlerinin korunması için tohum, soğan, yumru, rizom, korm veya diğerk aksamalarının doğadan toplanması, üretilmesi, hasadı, depolanması ve ihracatına yönelik usul ve esasları düzenlemektir. 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, izni ve ihracat yasağı olan türler dikkate alınarak 3 grupta oluşturulmuştur (Tablo 2.5).

Bunlar;

- a) Doğadan toplanmak suretiyle ihracatı yasak olan çiçek soğanları,
- b) İhracatı üretimden serbest olan çiçek soğanları,
- c) İhracatı kotaya tabi olan çiçek soğanlarının ihracat miktarları ve çevre ölçüleri.

Bu yönetmelik büyük oranda doğadan toplamaya bağılı olsa da diğerk son yıllarda doğal çiçek soğanlarının kültüre alınıp üretilmeleri önem kazanmaya başlamıştır. Bu konuda *Lilium*, *Leucojum*, *Fritillaria* ve *Stenbergia* gibi türler kültür arazilerinde üretilebilirken, Türkiye'nin önemli ihraç türlerini oluşturan *Galanthus*, *Eranthis*, *Anemone* ve *Cyclamen* ise doğal ortamlarında üretilebilmektedir.

Ülkemizde 2013 yılı verilerine göre 552,8 da alanda doğal çiçek soğanları üretimi yapılmakta olup toplam üretilen soğan miktarı 33 milyon 12 bin 46 adet olarak belirlenmiştir. Doğal çiçek soğanlarının yanı sıra ülkemizde kültür çiçek soğanlarının üretimi de son yıllarda teşvik edilmektedir. Tablo 2. 6'da 2013 yılı verilerine göre ihraç edilen soğan çeşitleri ve miktarları belirtilmektedir.

Cyclamen'in tohumdan, *Lilium candidum*'un pullarla üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. 1998 yılından sonra Konya'da 125 da'lık bir üretim alanında faaliyet gösteren özel bir firma 20 farklı lale, 7 farklı sümbül ve iki farklı iris çeşidi soğanın üretimi yapılmaktadır. Bu firma, soğanları yurt dışından ithal etmekte ve yıllık 10 milyon/adet lale soğanı üretim kapasitesiyle en büyük çiçek üretim alanlarından birine sahip olarak bulunmaktadır.

Tablo 2.5. 2017 Yılı Doğal Çiçek Soğanlarının İhracat Listesi Tablosu (Resmi Gazete, 2016)

(I)	(II)				(III)
Doğadan toplanmak suretiyle ihracatı yasak olan doğal çiçek soğanları	İhracatı kotaya tabi olan doğal çiçek soğanları				İhracatı üretimden serbest olan doğal çiçek soğanları
Tür İsmi	Tür İsmi	Yıllık Limit (Adet)		Çevre Uzunluğu (cm)	Tür İsmi
		Doğa	Üretim		
1. <i>Allium</i> (Yabani soğan) türlerinin hepsi	1. <i>Cyclamen cilicium</i> (Siklamen)	200 000	400 000	8+	1. <i>Lilium candidum</i> (Miszambağı)
2. <i>Abamone</i> (Yoğurt çiçeği) türlerinin hepsi	<i>Cyclamen coum</i> (Siklamen)	700 000	300 000	8+	2. <i>Lilium mariagon</i> (Türk zambağı)
3. <i>Crocus</i> (Çiğdem) türlerinin hepsi	<i>Cyclamen hederifolium</i> (Siklamen)	200 000	3 000 000	10+	3. <i>Iris tuberosum</i> (Süsen)*
4. <i>Fritillaria</i> türleri	2. <i>Galanthus elwesii</i> (Toros kardeleni)	4 000 000	3 000 000	4+	4. <i>Calla aethiopica</i> (Kalla)*
5. <i>Lilium</i> (Zambak) türleri (<i>L. candidum</i> ve <i>L. martagon</i> hariç)	<i>Galanthus woeonowii</i> (Karadeniz kardeleni)	3 000 000	2 000 000	4+	5. <i>Polyanthus tuberosa</i> (Sümbülteber)*
6. <i>Muscari</i> (Muskari) türlerinin hepsi	3. <i>Eranthis hyemalis</i> (Sarı kar çiçeği)	2 000 000	2 000 000	3,5+	6. <i>Fritillaria persica</i> (Adıyaman lalesi)
7. <i>Sternbergia</i> (Kara çiğdem) türleri	4. <i>Leucojum aestivum</i> (Göl soğanı)		6 000 000	7,5+	7. <i>Fritillaria imperialis</i> (Ters lale)
8. <i>Tulipa</i> (Lale) türlerinin hepsi	5. <i>Urginea maritima</i> (Ada soğanı)	200 000	50 000	20+	8. <i>Anamone blanda</i> (Yoğurt çiçeği)
9. <i>Eminium</i> türlerinin hepsi					9. <i>Geranium tuberosum</i> (Deve tabanı)
10. <i>Biarum</i> türlerinin hepsi					10. <i>Sternbergia lutea</i> (Kara çiğdem)
11. <i>Geranium tuberosum</i> (Deve tabanı)					11. <i>Dracunculus vulgaris</i> (Yılan bıçağı)
12. <i>Dracunculus vulgaris</i> (Yılan bıçağı)					12. <i>Arum italicum</i> (Yılan yastığı)
13. <i>Nympheaceae</i> (Nilüfer) türlerinin hepsi					13. <i>Arum dioscorides</i>
14. <i>Orchidaceae</i> (Salep) türlerinin hepsi					
15. <i>Arum</i> (Yılan yastığı) türleri					
16. <i>Panocratium maritimum</i> (Kum zambağı)					
17. <i>Hyacinthus orientalis</i> (Şark sümbülü)					
18. <i>Gentiana lutea</i> (Censiyan)					
19. <i>Cyclamen</i> (Siklamen) türleri (<i>C. coum</i> , <i>C. cilicium</i> ve <i>C. hederifolium</i> hariç)					
20. <i>Galanthus</i> (Kardelen) türleri (<i>G. elwesii</i> ve <i>G. woronowii</i> hariç)					
21. <i>Iris</i> (Süsen) türleri					
22. <i>Paeonia</i> (Şakayık) türleri					
23. Diğer yumrulu ve soğanlı türler					

Tablo 2.6. 2013 Yılı Türlerle Göre Doğal Çiçek Soğanları İhracatı (Anonim, 2013)

Türler	Miktar (adet)	Miktar (%)	Değer (€)	Değer (%)	Türler	Miktar (adet)	Miktar (%)	Değer (€)	Değer (%)
<i>Galanthus elwesii</i>	5.732.850	36,81	357.687	30,81	<i>Cyclamen</i>	148.150	0,95	22.310	1,92
<i>Galanthus woronowii</i>	3.198.650	20,54	131.636	11,34	<i>Dracunculus</i>	87.309	0,56	33.136	2,85
<i>Leucojum aestivum</i>	2.450.400	15,73	114.332	9,85	<i>Arum dioscorides</i>	42.700	0,27	6.009	0,52
<i>Eranthis hyemalis</i>	1.518.200	9,75	47.581	4,10	<i>Arum italicum</i>	20.768	0,13	2.510	0,22
<i>Cyclamen hederifolium</i>	992.535	6,37	206.178	17,76	<i>Urginea maritima</i>	5.965	0,04	1.474	0,13
<i>Cyclamen coum</i>	446.095	2,86	71.010	6,12	<i>Lilium candidum</i>	266.389	1,71	113.704	9,80
<i>Stenbergia lutea</i>	240.800	1,55	25.718	2,22	<i>Iris tuberosum</i>	67.000	0,43	2.637	0,23
<i>Geranium tuberosum</i>	162.740	1,04	5.432	0,47	<i>Fritillaria persica</i>	45.000	0,29	18.276	1,57
<i>Anemone blanda</i>	150.000	0,96	1.200	0,1	Toplam	15.575.851	100,0	1.160.829	100,0

Tablo 2.7’de görüldüğü gibi, çiçek soğanları arasında en fazla ithal edilen tür, yaklaşık 69 milyon adet ve yaklaşık 3.050 milyon dolar ile laledir. 2013 yılı verilerine göre, en fazla çiçek soğanı ithalatı yapılan ülkeler %94,41’lik pay ve 6 milyon 703 bin 380 dolar ile Hollanda’dır.

Doğal çiçek soğanlarının eskiden olduğu gibi günümüzde de izinsiz ve kaçak yollarla sökülmesi devam etmekte ve sökülen bu soğanlar kaçak yollarla yurt dışına gönderilmektedir. İzinsiz ve kaçak söküm, ağır cezai yaptırımlar uygulanarak önlenmelidir. Doğa tahribatının engellenmesi ve biyoçeşitliliğin korunması amacıyla, doğadan yapılan söküm yasaklanmalı ve soğanların kültür koşullarında üretimi teşvik edilmelidir. Ayrıca ülkemizde özellikle geofitlerin yaşam alanları, tarla açma, aşırı otlatma, sanayileşme, çorak ve bataklık alanların ıslahı, turizm faaliyetlerinin artması, orman yangınları, kara yollarının gelişimi gibi çeşitli nedenlerle her yıl yok edilme tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır.

Tablo 2.7. 2013 Yılı Türkiye’de Türlerle Göre Çiçek Soğanı İthalatı (Anonim, 2013)

Çiçek Soğanı	2013 yılı değerleri		
	Miktar(Adet)	Değer (\$)	Değer (%)
Lale	68.899.727	3.046.837	42,91
Sümbül	5.721.839	816.564	11,50
Glayöl	6.276.290	244.482	3,44
Nergis	2.875.200	213.031	3,00
Diğerleri	-	2.779.175	39,14
Toplam	83.773.056	7.100.089	100,0

Ülkemizde özellikle Ar-Ge ve ıslah çalışmalarına gereken destek verilmeli, bu çalışmalar, sektörün gerçekleri ve ihtiyaçlarına göre organize edilmeli ve bu konuda çalışacak araştırmacı sayısı artırılmalıdır.

2.3. Liliaceae Familyası

Liliaceae familyası, monkotiledonların en bilinen üyelerindendir. Soğan, korm veya rizomlu, çok yıllık bitkilerdir. Bu familya nadiren otsu veya dikenli, sıklıkla toprak altı yapıları bulundurmaktadır. Yaprakları, bir veya çok sayıda olmasına ve kıvrımlı veya düz olmasına göre değişkenlik göstermektedir. Yaprakları düz, doğrusal mızrak biçimli, kenar boşlukları boyunca dişsiz, çoğunlukla saplı ve genellikle paralel damarlıdır. Bazı Liliaceae üyeleri, genellikle trompet veya huni biçiminde, çiçekleri aşağı doğru eğik ve yoğun kokulu, gösterişli çiçekleriyle ünlüdür. Liliaceae familyasının çiçekleri hermafrodit, radyal olarak simetrik, petal ve sepals görünümünde hiçbir fark olmamakla birlikte, bu kısımları genellikle üçten fazla (Maianthemumda dört) bulunur. Çiçeğin yumurtalık tabanına yapışmış olan gösterişli kısmında genellikle altı ana bölüm vardır. Çiçekler, yapraksız bir sapın üstünde bir tane olabildiği gibi çok sayıda veya umbel soğanları içeren diğer çeşitli çiçek şekillerinde oluşabilir. Liliaceae çiçekleri böceklerle tozlaşır. Tahımları kapsül ya da meyve formundadır (Dahlgren ve ark., 1985).

Liliaceae familyası, içerdiği 288 cins ve 4950 ile en büyük çiçekli bitkiler ailelerinden biridir. Bu familya yaygın olarak, Kuzey Yarımküre’de, genellikle baharda çiçekli bitki örtüsü ve dağ çayırıları olan Himalaya’dan Çin’e büyük bir dağılım merkezi olan Güneybatı’da yaygın olarak bulunmaktadır. Liliaceae familyasına ait türlerin yaklaşık %12.8’i ülkemizde bulunmaktadır.

Zambakgiller ailesi ev ve bahçe süslemelerinde oldukça yoğun bir şekilde kullanılan değerli bitkilerdir. Bunların başında *Fritillaria*, *Tulipa*, *Lilium*, *Allium* cinsleri gelmektedir. Bu familya uzun yıllardan beri insanların ilgisini çekmektedir. Yunanistan bölgesine nadir bulunan ve Suriye'ye özgü olan Madonna zambağı (*Lilium candidum*), ilk uygarlıklar tarafından seramik ve mozaikler üzerine tasvir edilmiştir. En yaygın olarak yetiştirilen sera zambakları, Paskalya ve boru zambaklarıdır (*Lilium longiflorum*). Zambaklar eski zamanlardan beri Paskalya ile ilişkilendirilmektedir. Birçok zambağın üniform, parlak beyaz rengi bazı kültürlerde saflığı sembolize eder. Bununla birlikte, *lilyum*lar çeşitli renklerde olabilir. Birçok *lilyum* türü, parfümlerde kullanılmak üzere özütlenen büyüleyici kokulara sahiptir (URL-2, 2017).

Zambakgiller familyasının geniş dağılım gösteren üyelerinden biri de *Tulipa*'dır. Lale, Asya yarım küresinin batısında gösterdiği büyük çeşitliliğiyle Kuzey Yarımküreye özgü bir bitkidir. Batı Asya'da çoğunlukla *T. gesneriana* adı altında satılmaktadır, ancak yetiştirilen diğer türler de giderek pazardaki yerini almaktadır. Laleyi ilk kez Türkler yetiştirerek Avrupa'ya tanıtmışlardır. Avrupa'nın lale ile ilgili ilk yayını 1559'da çıkardığı bilinmektedir. Lale, lale devrinin Hollanda'yı kasıp kavurduğu on yedinci yüzyıla kadar popülerliğini yavaş yavaş arttırmıştır. Bu dönemde yeni ve daha nadir bulunan laleler yetiştirmek ve üretmek için histerik bir acele vardı. Bu dönemde lale için müthiş yatırımlar yapılmıştır. Hatta 1630'da nadir bulunan bir lale soğanının 10.000 dolara satıldığı bilinmektedir. Lale Devri, 1634- 1637 yılları arasında zirve noktasına ulaşmış ve Hollanda hükümetine girerek endüstriyi düzenlemeye zorlamıştır. Günümüzde de Japonya ve Washington önemli bir *Tulipa* üretimi yapmalarına rağmen, *Tulipa* üretim miktarlarıyla Hollanda'nın önüne geçememişlerdir (URL-2, 2017).

Ekonomik açıdan önemli olan *Allium* cinsi, güçlü kokusu ve lezzeti nedeniyle yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir. Bu bitki, kısa bir sapı çevreleyen dev bir tomurcuk olan soğanı ile karakterize edilir. Bu çiçeğin yaprakları oldukça etlidir ve sık bir şekilde dizilmiştir. Yaygın olarak bilinen soğan (*A. cepa*), sarımsak (*A. sativum*), pırasa (*A. porum*), arpacık (*A. ascalonicum*) ve chives (*A. schoenoprasum*) bu cinsin yetiştirilen üyeleri arasındadır. Teksas, New York ve California, Kuzey Amerika'da soğanı en çok üreten bölgelerdir (URL-2, 2017).

Zambakgiller ailesinin diğer üyeleri çeşitli nedenlerle ekonomik açıdan önem taşır. Ülkemizde Liliaceae familyası başlıca 5 cins ile temsil edilmektedir. Bunlar *Erythronium*, *Fritillaria*, *Gagea*, *Lilium* ve *Tulipa*'dır (Güner, 2012). *Fritillaria*, en popüler süs

bitkilerinden biridir. *Fritillaria*, aşağı doğru bakan, gösterişli çiçeklere sahiptir. Bu bitki Osmanlılar zamanında lale, sümbül ve nergis kadar popüler olmuş, 1570'li yıllarda kültüre alınmak üzere önemli ölçüde sökülülmüştür. *Fritillaria*'nın göz alıcı renklere sahip olan pek çok türü süs bitkisi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Orta ve güney Avrupa'da süs bitkisi olarak sıklıkla kullanılan *Fritillaria meleagris*, mor renk üzerine beyaz damalıdır, Türkiye'de de *Fritillaria aurea* sarı renkte ve damalı bir görünüme sahiptir. *Fritillaria* türlerinin birçoğu doğal ortamında kraliçe arısı tarafından tozlaştırılmaktadır (Norrish ve ark., 1961).

Hem süs bitkileri hem de tıbbi amaçlar için kullanılan *Fritillaria* türleri Türkiye için yüksek bir ekonomik önem taşımaktadır (Arslan ve ark., 2008). Gösterişli çiçekleri nedeniyle *Fritillaria imperialis*, *F. persica* ve *F. meleagris* türleri ticareti yapılan başlıca türlerdir. *F. imperialis* e *F. persica* türlerinin ticareti Türkiye'de önemlidir ve kültüre alınması koşuluyla ihraç edilmektedir (Arslan ve ark., 1999, Arslan ve ark., 2002). Süs bitkisi olmasının yanında, başta *F. cirrhosa* olmak üzere *F. unibracteata*, *F. przewalski* ve *F. delavani* gibi bazı *Fritillaria* türlerinin soğanları, geleneksel Çin tıbbında öksürmeye, yüksek tansiyona ve balgam söktürücüye karşı önemli bir ilaç olarak binlerce yıldır kullanılmaktadır (Arslan ve ark., 2008).

2.4. *Fritillaria* Cinsi

2.4.1. *Fritillaria* Cinsi'nin Taksonomik Tarihi

Fritillaria cinsinin 1753 yılında ilk tanımlanan türleri *F. pyrenaica*, *F. imperialis* L., *F. meleagris* L., ve *F. persica* L.'dir. Bunlardan *F. imperialis* ve *F. persica* Türkiye'de de yetişmektedir (Stearn, 1957).

Fritillaria cinsinin özellikleri ilk olarak 1754'te Linnaeus'un 'Genera Plantarum' adlı eserinde verilmiştir. Bu eserde *Linnaeus*, *Petilium* L. ve *Corona* Fisch et R. Grah cinsleri *Fritillaria*'nın sinonimi olarak belirtilmiştir (Linnaeus ve ark., 1960).

Fritillaria ile ilgili ilk önemli çalışma Baker'e aittir (Baker, 1874). Baker 1874 yılında *Petilium*, *Ambrilion* Rafin, *Imperialis* Adans, *Rhinopetalum* Fisch., *Tozzettia* Parl, *Theresia* K. Koch, *Eucrinium* Neuttall, *Sarana* Fisch., *Liliorhiza* Kellogg, *Monocodon* Salisb., *Lyperia* Salisb., *Notholirion* Wall ve *Korolkovia* Regel cinslerini *Fritillaria*'nın sinonimi olarak vermiş ve bu cinsi 10 altcinsine uyarlamıştır (Baker, 1874).

Boissier 1884 yılında Flora Orientalis’de *Petillium*, *Rhinopetallum* ve *Theresia* cinslerini *Fritillaria*’nın sinonimi olarak vermiş, seksiyon ve seriler şeklinde bir sınıflandırma yapmıştır (Boissier, 1888).

Fritillaria cinsini yazan A. Lozina Lozinskaya da *Amblirion*, *Corona*, *Imperialis* ve *Monocodon* cinslerini sinonim olarak belirlemiş *Korolkovia* ve *Rhinopetalum*’u ayrı cinsler olarak değerlendirerek sınıflandırmayı seksiyon ve seriler şeklinde yapmıştır (Komarov ve ark., 1968). Daha sonra Rix, *Fritillaria*’lar üzerinde 1975 ve 1979 yıllarında yoğun çalışmalar yapmış (Rix, 1975; Rix, 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, 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, 1991; Kosenko, 1992; Kosenko, 1999) ve Türkiye’de (Ozler ve ark., 2007) *Fritillaria* cinsinin polen özellikleri incelenmiştir. Bu cinsin çeşitli türlerinin karyolojisi üzerine çalışılmıştır (Zaharof, 1989; Zaharof, 1989; Kamari, 1991; Khaniki, 1995; Bakhshi, 1997; Bakhshi, 1998).

Fritillaria cinsi üzerinde özellikle Çin’de moleküler çalışmalar yapılmaktadır (Cai ve ark., 1999; Li ve ark., 2003; Li ve ark., 2009). Bei Mu adlı ilacın elde edildiği *Fritillaria* türlerinin soğanlarını kullanarak moleküler incelemeler yapılmıştır. Bazı türlerin içerdikleri alkaloidler (Şener ve ark., 1994; Bingöl ve ark., 1997; Li ve ark., 1999; Lin ve ark., 2001; Atta-ur-Rahman ve ark., 2002; Akhtar ve ark., 2003) ve tıbbi alanda kullanımları ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır.

2.4.2. *Fritillaria* Cinsinin Genel Özellikleri

Alem: Plantae (Bitkiler)

Altalem: Tracheobionta Tracheopyta (Damarlı Bitkiler)

Üstbölüm: Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler)

Bölüm: Magnoliophyta (Çiçekli Bitkiler)

Sınıf: Liliopsida Monocotyledonae (Tek çenekliler)

Altsınıf: Liliidae

Üstordo: Liliiflorae

Ordo: Liliales

Familya: Liliacea (Zambakgiller)

Altfamilya: 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, ovatlanseolat, 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 (Davis ve ark., 1988). Türkiye Florası'nda Liliaceae familyasının 23. cinsi olan *Fritillaria*, *Lilium*, *Tulipa* ve *Erythronium* L. cinsleriyle yakınlık göstermektedir.

2.4.3. *Fritillaria* Cinsinin Doğal Yetiştirme Ortamları

Fritillaria cinsine ait türler kalker kayalıklar, taşlık alanlar, tarlaiçi, tarla kenarları, taşlı tarlalar, çayırılık alanlar, sulu çayırlar, yol kenarları, *Pinus* 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 (URL-3, 2017).

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.

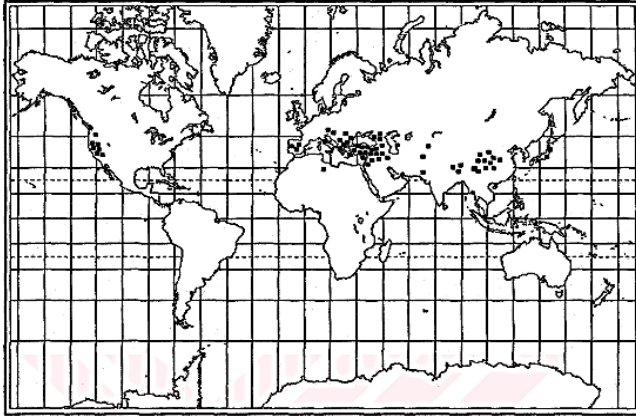
2.4.4. *Fritillaria* Cinsinin Dünya Üzerinde Yayılışı

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. 1). *Fritillaria* cinsinin tür sayısı açısından ülkemiz ve diğer bazı ülkelerle karşılaştırılması Tablo 2. 8'de verilmiştir (Komarov ve ark., 1968; Tutin, 1980; Pignatti, 1982; Feinbrun-Dothan, 1986; Donner, 1990; Rechinger, 1990; Dharmananda, 2004; Himes, 2004).

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;

- a) Birinci gen merkezi, Kaliforniya,
- b) İkinci gen merkezi, Yunanistan ve Türkiye,
- c) Üçüncü gen merkezi, Çin'dir.



Şekil 2.1. *Fritillaria* cinsinin dünya üzerindeki yayılışı (Tekşen, 2004)

Tablo 2.8. *Fritillaria* cinsinin tür sayısı açısından farklı bölgelerdeki ülkelerle karşılaştırılması (Tekşen, 2004)

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	-

Şekil 2. 1’de dünya haritası üzerinde *Fritillaria* cinsinin dağılımı gösterilmektedir. Bu haritaya göre *Fritillaria* cinsi dünyadaki yayılışı itibariyle Holoarktik aleme ait bir cinstir. Bu alemin Tetis alt aleminin Akdeniz ve İran- Turan, Boreal altalesinin Avrupa-Sibirya ve Doğu Asya, Madrean alt aleminin Madrean fitocoğrafik bölgelerinde yayılış gösterir.

Holoarktik alemin ılıman iklimi, özellikle Akdeniz iklimine sahip 30° ve 40° enlemleri arasında yayılış gösterdiği görülmektedir (Öztürk ve ark., 1992; Rix, 2001; Çelik ve ark., 2004).

2.4.5. 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 (Davis ve ark., 1988; Yıldırım, 1988; Güner ve ark., 2000).

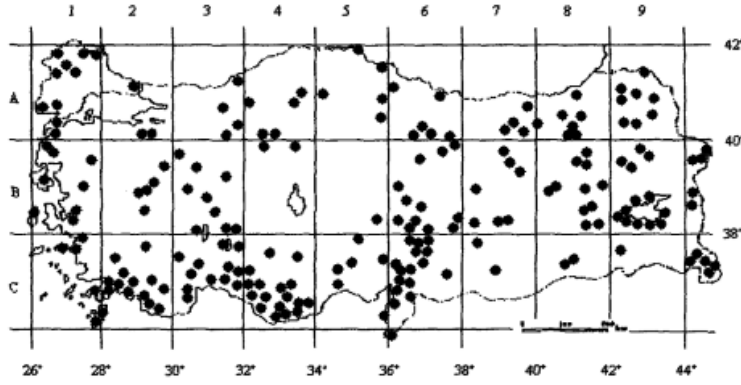
Fritillaria cinsinin Türkiye’deki yayılışı Şekil 2. 2’de verilmiştir (Davis ve ark.,1988; Güner ve ark., 2000). Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi içerdikleri tür sayısı bakımından *Fritillaria* cinsinin en yoğun olduğu bölgelerdir. En az tür Karadeniz, Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu bölgelerinde bulunmaktadır. 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.

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

Tablo 2.9. TÜBİTAK-Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı'na göre Türkiye'de bulunan *Fritillaria* tür ve alttür taksonları (Gürlek, 2011)

1. <i>F. acmopetala</i> Boiss.	22. <i>F. straussii</i> Bornm.
2. <i>F. acmopetala</i> Boiss. subsp. <i>acmopetala</i>	23. <i>F. stribrnyi</i> Velen.
3. * <i>F. acmopetala</i> Boiss. subsp. <i>wendelboi</i>	24. <i>F. uva-vulpis</i> Rix
4. * <i>F. alburyana</i> Rix	25. * <i>F. baskilensis</i> Behçet
5. <i>F. alfredae</i> Post	26. <i>F. bthynica</i> Baker
6. * <i>F. alfredae</i> Post subsp. <i>glaucoviridis</i>	27. * <i>F. byfieldii</i> N. Özhatay & Rix
7. <i>F. alfredae</i> Post subsp. <i>platyptera</i>	28. <i>F. carica</i> Rix
8. * <i>F. armena</i> Boiss.	29. <i>F. carica</i> Rix subsp. <i>carica</i>
9. <i>F. assyriaca</i> Baker	30. * <i>F. carica</i> Rix subsp. <i>serpenticola</i>
10. <i>F. assyriaca</i> Baker subsp. <i>assyriaca</i>	31. <i>F. caucasica</i> J. F. Adam
11. * <i>F. assyriaca</i> Baker subsp. <i>melananthera</i> Rix	32. <i>F. crassifolia</i> Boiss. & Huet
12. * <i>F. aurea</i> Schott	33. * <i>F. crassifolia</i> Boiss. & Huet subsp. <i>crassifolia</i>
13. * <i>F. elwesii</i> Boiss.	34. <i>F. crassifolia</i> Boiss. & Huet subsp. <i>hakkarensis</i>
14. * <i>F. fleischeriana</i> Steudel & Hochst ex Schultes & Schultes fil.	35. <i>F. crassifolia</i> Boiss. & Huet subsp. <i>kurdica</i>
15. * <i>F. forbesii</i> Baker	36. * <i>F. kittaniae</i> Sorger
16. <i>F. hermonis</i> Fenzl	37. <i>F. latakiensis</i> Rix
17. <i>F. hermonis</i> Fenzl subsp. <i>amana</i>	38. <i>F. latifolia</i> Wild.
18. <i>F. imperialis</i> Linnaeus	39. * <i>F. michailovskyi</i> Fomin
19. <i>F. sibthorpiana</i> (Sm.) Baker	40. * <i>F. minima</i> Rix
20. * <i>F. sibthorpiana</i> (Sm.) Baker subsp. <i>enginiana</i> Byfield & N. Özhatay	41. * <i>F. minuta</i> Boiss & Noe
21. * <i>F. sororum</i> Jim. Perss. & K.M. Perss.	42. <i>F. persica</i> Linnaeus
	43. <i>F. pinardii</i> Boiss.
	44. <i>F. pontica</i> Wahlenb.
	45. <i>F. rhodia</i> A. Hansen
	46. <i>F. viridiflora</i> Post
	47. * <i>F. whittallii</i> Baker
	48. * <i>F. zagrica</i> Stapf

(*) ile işaretli olanlar endemik taksonlardır.



Şekil 2.2. *Fritillaria* cinsinin Türkiye’deki yayılışı (Tekşen, 2004)

Fritillaria türleri arasında çiçekleri süs bitkisi olarak kullanılabilme potansiyeline sahip, yüksek ticari önemi bulunan iki türü *Fritillaria imperialis* ve *Fritillaria persica* yarı endemik türler olsa da, Türkiye’de çok fazla endemik türü 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 ihrac potansiyeli yüksek türlerdir.

Fritillaria imperialis, 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 (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 (Rix ve ark., 1981).

Fritillaria 400 yıl önce Türk bahçelerinin çok kıymetli bitkilerinden birisiydi ve I.Selim zamanında en çok sevilen bitki türlerindendi (Çiftçi, 2009). Zaman içerisinde

unutulan 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, 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 ark., 2002).

2.4.5.1. *Fritillaria minima*'nın Genel Özellikleri

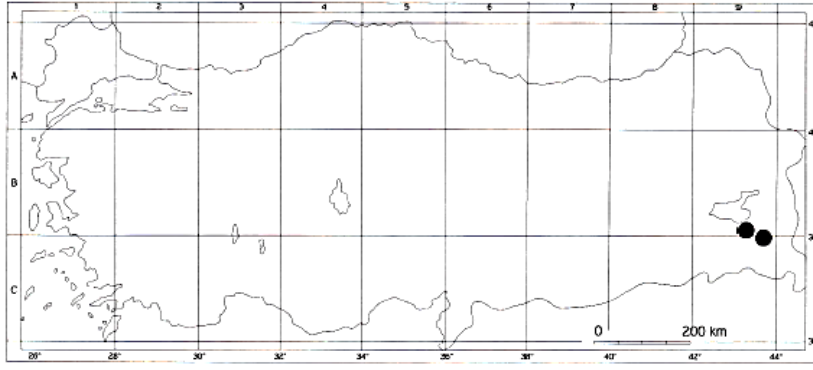
İlk örnekleri, 1954 yılında P.H. Davis & O. Polunin tarafından Van ilimizde Gevaş'ın üstündeki Artos (Çadır) Dağın'ndan toplanmıştır. Ancak bilim dünyasına 1971 yılında M. Rix tarafından tanıtılmış yurdumuza özgü (endemik) bir bitkidir. Erimekte olan kar kümelerinin hemen etrafında rastlanan bu bitkiye yörede “ sarı kar lalesi” adı verilir.

Soğanları en çok 1-5 cm çapında, çoğunlukla soğancıklıdır. Gövde 4-10 cm boyunda, yaprak tabanları etrafında sivilcelidir. Yapraklar 4-7 adet, almalı, parlak yeşil renkli, mızraksı, kenarları pürüzlü; en alttakiler 5-9 x 0,6- 1,5 cm. Çiçekler 1-2 adet, darca çingiraksı, 1-1,5 cm çapındadır (Koyuncu, 2000).

Tepaller sarı renkli, kuruyunca soluk kırmızı. 1,3-2 x 0,3-0,8 cm boyutlarında, uçları küt. Nektaryumlar 1 x 0,5 mm, kahverengi ve tepallerin tabanındadır. Filamentler 6-11 mm, sivilceli, sitilus 5-8 mm, ince sivilcelidir. Stigma 3 loplu, loplar 2 mm, geriye kıvrık. Meyva kanatsızdır. Çiçek açma zamanı Haziran-Temmuz ayları. Kromozom sayısı $2n=24$ 'tür (Koyuncu, 2000)..



Şekil 2.3. Sarı Kar lalesi (*Fritillaria minima* Rix)



Şekil 2.4. Sarı kar lalesinin (*Fritillaria minima* Rix) Türkiye’deki yayılış alanı (Koyuncu, 2000)

Fritillaria minima yurdumuzda Van çevresinde yetişen ve ülkemize özgü (endemik) bir türdür. B9 Van: Artos (Çadır) Dağı ve Müküs Dağı’nda yetişmektedir. Yani dar yayılışlı bir türdür. Bitki 2500-3300 m yükseklikler arası, taşlı, çakıllı yamaçlarda yetişir. Karın erimesi ile hemen çiçeklenir. Bazı ortamlarda *Fritillaria minuta* ve bazı ortamlarda *Puschkinia scilloides* Adams ve *Merendera kurdica* Bornm. ile birlikte bulunur ve bu bitkilerle aynı zamanda çiçek açar. Ancak habitatında çok yoğun değil oldukça seyrek olarak bulunur. Fakat koyu sarı renkli çiçekleri ile kolay fark edilen ve dikkat çeken bir bitkidir (Koyuncu, 2000).

Yurdumuza özgü (endemik) ve dar yayılışlı bir bitkidir. Yüksek rakımlarda yetişir ve görünüşe göre henüz bir tehlike yoktur. Ancak habitatları zayıftır; sadece 3 yerde bulundukları bilinmektedir ve yayılış alanı yaklaşık 900 km²’dir (ölçüt B ve B1). Bu nedenlerle, bu tür için önerilen tehlike kategorisi “tehlikede (EN)” dir (Koyuncu, 2000).

Fritillaria minima Rix endemik oluşu ile ülkemize özgü biyolojik bir zenginliktir. Güzel çiçekleri nedeniyle süs bitkisi olarak kullanılabilir. Düşük rakımlarda yetiştirilip yetiştirilmediği araştırılmış değildir. Botanik bahçeleri için çok fazla tercih edilen bir türdür. Süs bitkisi olarak kullanılmasının yanında medikal amaçla kullanılan *Fritillaria* cinsine ait bir tür olduğu için de medikal öneminin araştırılması gerekmektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı *Fritillaria minima* bitkisi ülkemiz için önemli bir değerdir. Ancak bu amaçla kullanmak için yetiştirmek gerekir.

2.5. *Fritillaria* Türlerinin Kullanımı ve Ekonomik Önemi

2.5.1. *Fritillaria* Türlerinin Peyzaj Uygulamalarında 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.

Canlı renkleri ve gösterişli duruşu ile erken ilkbaharda, baharın tüm coşkusunu ortaya koyan bir bitkidir. Bu yüzden amatör ve profesyonel yetiştiriciler tarafından süs bitkisi olarak oldukça fazla tercih edilmektedir. Bu bitkinin ilgi çekici hale gelmesinde iki önemli unsur ön plana çıkmaktadır;

1. Çiçek rengi ve şekli
2. Çarpıcı, görkemli (aristokrat) duruşu.

Ters lale bitkisinin 60-90 cm’e ulaşan boyu, ilginç çiçeği ve yaprakları onu heybetli ve gösterişli yapmakta ve ona asil bir duruş kazandırmaktadır. Canlı sarı- turuncu renginden kırmızıya varan renk ve tonları, çan şeklindeki çiçeği ve üstünde dağınık bir şekilde duran parlak, yeşil yaprak demetiyle çiçekler bulunduğu alana dikkat çekici bir imaj kazandırmaktadır. Bu yüzden peyzaj düzenlemelerinde, çiçek tarhlarının, yol kenarlarının, kaya bahçelerininin, bina girişlerinin, beton çiçekliklerinin, balkonların ve pencere altlarının vazgeçilmez bir bitkisi olmuştur. Hoş olmayan kokusundan dolayı kesme çiçek olarak kullanımı çok uygun değildir. Saksılarda, sergilerde dekoratif amaçlı kullanılabilir.

Yurt dışında geniş kullanımı olan bu bitkinin yurdumuz içinde kullanımı pek yaygın değildir. Ancak bitkinin üretimi arttıkça ülkemizde de peyzaj düzenleme çalışmalarında diğer soğanlı bitkilerle beraber kullanımı artacaktır. Geofitlerin mevsim dışında, vaktinden önce çiçeklenmesi için bitkinin uyarılmaya ihtiyacı vardır. Buna soğuklama veya preparasyon denir. Soğuklama ihtiyacı karşılanmış soğanlar yılbaşından ilkbahara kadar renk verirler.

Ters lale bitkisi de soğuk ihtiyacı karşılanarak döneminden önce çiçek açtırılabilir. Ancak bu bitki daha çok saksılı bitki olarak kullanıldığı zaman soğuklatılır. Saksı yetiştiriciliği için soğanların hazırlanması gereklidir. Saksıların içinde yetiştirilen ters

laleler mekânların doldurulmasında kullanılabilen güzel bitkilerden bir tanesidir. Renklerindeki canlılıkla sıcak bir ortam sağlar.

Fritillaria cinsinin farklı renkleri, parlaklığı ve benekleri nedeniyle dikkatleri çeken türleri; birkaç cm'den bir metre yüksekliğe farklı boy uzunluklarına kadar büyüyebilir. Bazı türler tek bir çiçeğe sahip iken, bazılarının çiçek sayısı bir düzineye ulaşır. Türlerde, renk ve büyüklük özellikleriyle farklılaşma görülür. Ters lale türlerinin estetik duruşu, farklı çiçek yapısı ve renklerinin yanı sıra, erken ilkbaharda çiçeklenmesi de önemli bir özelliğidir. Bitkilerin taşınma kolaylığı; kolay ve çabuk üretimlerini sağlayan soğanlı yapıları; doğal ortamlarından farklı, çeşitli ortamlarda yetiştirilebilmeleri gibi özellikler de süs bitkisi olarak yaygınlık kazanmasını artırmaktadır.

2.5.2. *Fritillaria* Türlerinin Tıbbi Kullanımı

Çin tıbbi uzmanları, *Fritillaria*'nın kalp ve akciğer meridyenlerini veya vücudun enerji yollarını etkilediğine inanmakta ve astım, bronşit, tüberküloz ve her tür öksürük gibi çeşitli akciğer rahatsızlıklarının tedavisinde kullanmaktadır. Geleneksel Çin tıp sisteminde, *Fritillaria*'nın beyaz renginin, beyaz renk ile ilişkili olan akciğer rahatsızlıkları için kullanışlılığını belirttiği düşünülmektedir. *Fritillaria*'nın tıbbi özellikleri acı, tatlı ve hafif soğuk olarak kabul edilmektedir (URL-4, 2017).

Fritillaria birçok öksürük çeşidi, özellikle de kronik öksürük, zor balgam çıkarmalı öksürük ve kanlı damar tıkanıklığı ile karakterize öksürük için kullanılır. Çinli tıp uzmanları, kuru mukoza zarlarını nemlendirmek, balgam çözmek ve öksürüğü kontrol altına almak için *Fritillaria* soğanlarını reçete etmektedirler. İştah azalması ve göğüs veya üst abdomende boğucu bir his, düşük vücut ısısı veya bastırılmış vital enerjiyi belirten semptomların eşlik ettiği öksürüklerde çok etkili olduğu düşünülmektedir (URL-4, 2017).

Fritillaria sekonder kullanımı şişmeleri, nodülleri, fibrokistik göğüsleri, guatr ve şişmiş lenf bezlerini azaltmak için lenfatik bir dekonjestan olarak kullanılır. Çin'de tiroid ve akciğer kanseri için de kullanılır.

F. cirrhosa ve botanik akrabaları üzerine yapılan araştırmalar genellikle Çin'de yürütülmekte ve farmakolojik araştırmaları üzerinde durmaktadır. Bu çalışmalar, *F. cirrhosa* ve diğer ilgili türlerin, antitussif ve balgam söktürücü aktiviteye sahip olan bileşikleri içerdiğini, bronşiyal düz kasılmanın büzülmesini engellediğini ve mukus salgısını azalttığını göstermektedir. Batı kimyasında tanımlandığı üzere, bu aktiviteden

sorumlu bileşikler, birkaç biyoaktif izosteroid alkaloidleri (verticine, verticinone, isoverticine, imperialine, hupehenine, ebeiedine, ebeienine ve ebeediinone) ve iki nükleoziti (timidin ve adenosin) içerir (Xu ve ark., 1997).

Fritillaria soğanlarının, alkaloidler, saponin, terpenoidler, steroidler, süksinik asit, timidin ve adenosin gibi kimyasal bileşenleri kapsamlı olarak araştırılmıştır. 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 alkaloitler nedeniyle, kolinesteraz enzim inhibitörü olarak da önemli bir potansiyele sahiptir (Şener ve ark., 1994).

Fritillaria thunbergii türünde bulunan peimine ve peiminine alkaloidlerinin kan şekerini düşürmede yardımcı olduğu konusunda raporlar vardır (Paek ve ark., 2002). Ayrıca *Fritillaria* türlerinden *F. camschatcensis*, Hokkaido adasında yaşayan yerlilerin diyetinde yer alan önemli bir bitkidir.

2.5.3. *Fritillaria*'nın Gıda Olarak Kullanımı

Fritillaria türleri üzerinde yapılan araştırmada, alkaloitlerin dışında sterol, polisakkarit, nişasta, flavonoit, yağ asitleri, organik asitler ve uçucu yağların bulunduğu belirlenmiştir. *Fritillaria* soğanlarının ana bileşeni nişastadır. *Fritillaria* soğanlarında toplam biyokütlede yaklaşık %80 nişasta içeriği bulunmaktadır (Gao ve ark., 1999). Bu nedenle, bazı *Fritillaria* türleri, özellikle Uzakdoğu'da gıda olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2005).

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). Bütün bu bilgilerle birlikte *Fritillaria* türlerinin gıda olarak kullanılması araştırılması gereken bir konudur.

2.5.4. *Fritillaria* Cinsinin Ekonomik Önemi

Fritillaria cinsi estetik duruşu ve gösterişli çiçekleriyle park ve bahçelerde peyzaj düzenlemelerinde kullanılmasının yanında, içerdiği kimyasallar nedeniyle kozmetik ve ilaç endüstrilerinde ham madde olarak kullanılmaktadır. Yayılış alanı dar ve popülasyonu

sınırlı olduğu için doğadan bilinçsizce toplanması ya da habitatlarının tahrip edilmesi, bitkinin geleceğini tehlikeye atmıştır. *Fritillaria* cinsi Türkiye'nin de taraf olduğu CITES kurallarında ve Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı , "Doğal Çiçek Soğanlarının İhraç Listesi" hakkındaki tebliğlerinde doğadan toplanıp ihraç edilmesi yasaklanan doğal çiçek soğanları arasında bulunmaktadır. 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. 2005 yılına kadar ülkemizde ihracına izin verilen *Fritillaria imperialis* ve *Fritillaria persica* türlerinin ihraç rakamları Tablo 2. 10'da gösterilmektedir.

Tablo 2.10. İhracatı yapılan *Fritillaria* türlerinin 2000-2005 yılları arasındaki ihracat verileri (Dilik, 2006)

Yıllar	<i>Fritillaria imperialis</i>			<i>Fritillaria persica</i>		
	Verilen kota	İhracat miktarı	Gelir (Euro)	Verilen kota	İhracat miktarı	Gelir (Euro)
2000	Yasak	Yasak	Yasak	100 000	86 220	93 500*
2001	100 000	18 810	24 168*	250 000	200 995	180 414*
2002	200 000	53 960	18 297	250 000	225 089	84 734
2003	200 000	98 860	72 955	250 000	192 950	85 384
2004	60 000	22 890	13 439	150 000	127 985	48 521
2005	100 000	38 527**	-	150 000	149 122**	-

*: Hollanda Florini

** : Geçici Değerler

Fritillaria türleri bakımından dünyanın en zengin florasının ülkemizde 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 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 gerçekleşmesine yönelik bir kısmı modifiye edilmiş alternatif yöntemler sunacaktır.

2.6. Geofitlerde oęaltma Yöntemleri

Soğanlı bitkiler genel olarak üç yolla çoğaltılmaktadır;

1. Generatif (tohumla) oęaltma,
2. Vegetatif (büyüme ve gelişme organlarıyla) oęaltma,
3. Mikroçoğaltım yöntemiyle oęaltma.

Generatif üretim yöntemi; tohumla yapılan çoğaltma yöntemidir. Doğada bazı soğanlı bitkiler tohumla çoğalmakta ve yayılmaktadır. Ancak birçok soğanlı bitki türü uygun şartlarda bile generatif olarak oęalmazlar. Mutlaka dışarıdan bir müdahale gereklidir.

Geofitler tohumla üretildiği zaman bilinmesi ve göz önünde tutulması gereken durumlar vardır. Bunlar;

1. Tohumlar heterozigot yapıya sahip olabilir. Bu yüzden tohumdan oluşan bitkiler ana bitkiye benzemezler.
2. Tohumdan meydana gelecek soğanların çiçek verecek büyüklüğe ulaşması için uzun zaman gerekmektedir. Bu süre bitki türüne bağlı olmakla beraber 3- 6 yıl arasındadır.
3. Tohumun depolanmasında özel koşullar gerekmektedir.
4. Hasattan sonra tohumlarda dormansi (uyku dönemi) görülür. Tohumlardaki bu durumu ortadan kaldırmak için bazı uygulamalara ihtiyaç vardır.
5. Her türün tohumları farklı ve özel durumlarda imlenmektedir. Bu nedenle çimlenme fizyolojisinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Vegetatif üretim yöntemi (Soğandan Üretim): Soğan, yumru, rizom gibi besin depo eden toprak altı organlarıyla yapılan oğaltmadır. Bu üretim yönteminde soğanın yavru vermesi için dışarıdan müdahale edilebilir. Bunun için depo organının gövde tablası ya kesilir ya da çizilir.

Vegetatif üretim yönteminin generatif üretim yöntemine göre bazı avantajları vardır. Bunlar;

1. Üretilen yavru bitkiler kalıtım yönünden ana bitkinin aynı özelliklerini taşır ve onun tamamen benzeri olurlar. Böylece bitkinin kazanılmış olan olumlu özellikleri aynen korunmuş ve devamlılığı sağlanmış olur. Oysa tohumla üretimde yeni özellik kombinasyonları (değişimleri) ortaya çıkabilir. Bitkinin kalitesi düşebilir.

2. Vegetatif üreme tohumla üremeye göre daha az zaman isteyen bir üretim şeklidir. Yani yavru soğan, yumru ve rizomlardan çiçekli bitki elde etmek için en fazla 2-3 yıl beklemek yeterlidir. Çiçeklenme iriliğine ulaşmış soğanlar bu özelliklerini uzun süre devam ettirebilirler. Bu yöntem geliştirilen çeşitlerin özelliklerinin korunmasında büyük öneme sahiptir.

Generatif ve Vegetatif çoğaltıma alternatif olan bir diğer çoğaltım yöntemi ise in vitro çoğaltım yöntemidir. Bitkilerin in vivo klonal çoğaltımı uğraştırıcı, pahalı ve sıklıkla başarısız olur. Doku kültürü yoluyla in vitro klonal çoğaltım mikroçoğaltım olarak adlandırılır. Mikroçoğaltım için doku kültürü tekniğinin kullanılması ilk olarak orkide bitkisinin çoğaltımı için başlatılmış ve günümüze kadar birçok bitkiye uygulanmıştır (Bear ve ark., 1960).

Mikroçoğaltım yöntemi: Bitkilerin hızla çoğaltılması için kullanışlı bir tekniktir. İn vitro'da doku kültürüyle çoğaltımın avantajlarını şu şekilde özetleyebiliriz;

- 1) Yüksek Çoğalma Oranı: Mikroçoğaltım sayesinde çok kısa sürede bitki dokusundan çok sayıda bitki yetiştirilebilir. Bir başka avantaj da, mevsimsel değişikliklere bakılmaksızın, mikroçoğaltımın yıl boyunca yapılabilmesidir. Dahası, geleneksel yayılıma oldukça dirençli birçok bitki için, mikroçoğaltım uygun bir alternatiftir. Mikroçoğaltımla elde edilen küçük boyutlu bitkicikler uzun yıllar boyunca kolaylıkla depolanabilir (germplasm muhafazası) ve uluslararası sınırlar boyunca taşınabilir.
- 2) Hastalıksız Bitki Üretimi: Mikroçoğaltım yoluyla hastalıksız bitki üretmek mümkündür. Genellikle meristem ucu kültürleri, patojen içermeyen bitkiler geliştirmek için kullanılır.
- 3) Bazı ürünlerde tohum üretimi: Bazı bitkilerde, aksiller tomurcuk çoğaltma yöntemiyle mikroçoğaltım, tohum üretimi için uygundur. Bu, karnabahar, soğan gibi tohum üretimi sınırlı ve genetik korunma derecesi yüksek olan bitkiler için uygundur.
- 4) Süreç Maliyeti: Mikroçoğaltım küçük bir büyüme alanı gerektirir. Böylece, milyonlarca bitki türü, küçük bir odada kültür şişeleri içinde muhafaza edilebilir. Üretim maliyeti, özellikle iş gücü ve iş gücü masraflarının düşük olduğu gelişmekte olan ülkelerde (Hindistan vb.) nispeten daha düşüktür.
- 5) Otomatik Mikroçoğaltım: Çeşitli aşamalardaki mikroçoğaltımı otomatikleştirmek mümkün hale gelmiştir. Sürgünlerin ve soğanların büyük

çaplı üretimi için biyolojik reaktörler kurulmuştur. Bazı işçi robotlar mikroçoğaltımda (insan gücü yerine) kullanılmaktadır ve bu da bitkilerin üretim maliyetini düşürmektedir (URL-5, 2017).

2.7. *Fritillaria* Türlerinin Çoğaltılması

2.7.1. *Fritillaria* Türlerinin Generatif Yöntemle Çoğaltılması

Tohumla üretim tekniği *Fritillaria* türlerinin çoğaltılmasında da kullanılabilir. 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.

Ters lale meyve kapsülünde ortalama 100 adet tohum bulunur. Tohum yassı ve ince olup, koruyucu kabuğa sahip olmaması ve az besin dokusu taşıması nedeniyle uygun şartlarda depolanmadığı zaman canlılığını çabuk kaybeder. Uygun şartlarda tohum canlılığını uzun süre muhafaza eder.

Fritillaria tohumları yassı, deltoid şeklinde olduğundan rüzgârla doğada kolay yayılmaktadır. Tohumlar kapsülden ayrıldığında embriyo henüz gelişmesini tamamlamamış durumda bulunduğu tohumun çimlenebilmesi için embriyonun gelişmesini tamamlaması gerekmektedir. Ancak embriyonun büyümeye başlaması sadece tohum su alıp şişmeye başladığında gerçekleşmekte ve bu aşamada embriyonun büyüme oranı düşük sıcaklıklarda artmaktadır (Tamura, 1998). Tohumdan yetiştirilen bitkilerde, *Fritillaria* tohumlarının heterozigot olması nedeniyle genetik olarak geniş bir açılım gözlemlenir. Bu yüzden tohumla üretim daha çok yeni çeşitlerin elde edilmesinde ıslah amacıyla kullanılır.

2.7.2. *Fritillaria* Türlerinin Vegetatif Yöntemle Çoğaltılması

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 (Dilik, 2006).

Soğanın merkezinde ya vegetatif büyüme konisi veya uzamış bir çiçek sapı bulunur. Büyüme konileri gelişen pulların koltuğunda yavru soğancıklar oluşur. İlkbaharda çiçeklenen soğanlarda, gelişmenin negatif devresinde önce soğanın gelişmiş bazı pulların koltuğunda soğancık oluşumu meydana gelir ve bu oluşum soğanın iç kısmında olduğundan dışarıdan gözlenemez. *Fritillaria*'larda 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 (Zencirkiran, 2002).

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 (URL-6, 2017);

2.7.2.1. 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.

2.7.2.2. 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 *Scillalar*da da uygulanmaktadır (Rees 1992, Aksu ve ark., 2002, Zencirkiran, 2002).

2.7.2.3. 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 (URL-6, 2017).

Genellikle *Galanthus*, *Fritillaria*, *Leucojum*, *Narcissus*, *Chionodoxa*, *Nerine*, *Scilla*, *Sternbergia* gibi cinslerde uygulanmaktadır. Çiçeklenme büyüklüğündeki iyi bazal plaka oluşturan tercihen yuvarlak soğanlar materyal olarak seçilmelidir (URL-6, 2017).

2.7.2.4. 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 tabanın oyulması şeklinde iki farklı yöntemle yapılır.

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

a) Çapraz kesim:

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; Zencirkiran, 2002).

b) Soğanda merkez çıkarma ve soğan tabanın oyulması:

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.

2.7.3. *Fritillaria* Türlerinin Doku Kültürü Yöntemiyle Çoğaltımı

Doku kültürü, bitki hücre, doku, organlarının veya tüm bitkinin, bitki klonlarını üretmek amacıyla, kontrollü beslenme ve çevre koşulları altında in vitro aseptik kültürüdür (Thorpe 2007). Bitki doku kültüründe oluşturulan klon bitkiler, seçilen türün genotipinin aynısıdır. Kontrollü koşullar, kültürün büyümeleri ve çoğalmaları için uygun ortamı sağlar. Bu koşullar, besin maddeleri, ortamın pH'ı, uygun sıcaklık ve uygun gaz ve sıvı ortamının ayarlanmasıyla sağlanır.

Bitki doku kültürü teknolojisi, büyük ölçekli bitki üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki doku kültürü teknikleri, araştırma amacıyla kullanılmasının yanı sıra, son yıllarda bitki çoğaltımı, hastalıkların giderilmesi, bitki iyileştirme ve sekonder metabolitlerin üretimi alanında endüstriyel olarak da büyük bir öneme sahiptir. Küçük doku parçaları (eksplantlar) sürekli bir şekilde yüzlerce bitkiyi üretmek için kullanılabilir. Tek bir eksplant, mevsim ve hava koşullarından bağımsız olarak, kontrollü koşullar altında, 1 yılda binlerce bitki oluşturabilir (Idowu ve ark., 2009).

Nadir bulunan ve nesli tehlike altındaki bitki türleri, mikroçoğaltım yöntemiyle başarılı bir şekilde çoğaltılmakta ve korunmaktadır. Mikroçoğaltımın en büyük avantajları, yüksek çoğaltma katsayısı ve ihtiyaç duyulan anaç bitki sayısının az olmasıdır. Buna ek olarak, bitki doku kültürü, somaklonal ve gametoklonal varyantların üretimi ile bitki iyileştirmesi için en verimli teknolojidir. Mikroçoğaltım teknolojisi, yüksek hastalık direncine sahip, stres tolerans kapasiteleri yüksek varyantların izolasyonu ve üstün kalitede bitki üretimi için geniş bir potansiyele sahiptir (Brown ve ark., 1995). Belirli türlerde yapılan kallus kültürleri, ticari olarak çeşit geliştirilmesini sağlayan somoklonal varyasyonların ortaya çıkması olasılığının yüksek olması nedeniyle ana bitkiden farklı kalıtsal özelliklere sahip klonların oluşmasına neden olurlar (George ve ark., 1984). Mikroçoğaltım teknikleriyle bitkilerin ticari olarak üretimi, patojen bulaşmasına yol açan tohum, kesme, aşılama gibi geleneksel yöntemlere kıyasla birçok avantaja sahiptir (García-González ve ark., 2010).

2.7.3.1. Bitki Doku Kültürünün Tarihi Gelişimi

Bitki doku kültürü bilimi, hücrenin keşfinden ve hücre teorisinin öne çıkarılmasından köken almaktadır. Schleiden ve Schwann, 1838’de hücrenin tüm canlı organizmaların temel yapısal birimi olduğunu öne sürdü. Bu araştırmacılar, hücrenin yenilenmesi için gerekli ortam sağlanırsa, tüm bitkiyi oluşturma potansiyeli olduğunu gözler önüne serdi. Bu öncül temele dayanarak, 1902’de Alman fizyolog Gottlieb Haberlandt, şekerla zenginleştirilmiş bir tuz çözeltisinde yapraktan izole edilen tekli palizat hücrelerini kültür etmeye çalıştı. Hücreler yaklaşık 1 ay hayatta kaldı, boyutları büyüdü ancak çoğalmaları başarısız oldu. Haberlandt bu çalışmada başarısız olsa da bitki doku kültürü teknolojisinin temellerini attığı için bitki doku kültürünün babası sayılmaktadır. Bu çalışmadan sonra bitki doku kültüründe bazı önemli buluşlar gerçekleşti.

Tablo 2.11. Bitki doku kültürünün tarihi gelişimi

1902 - Haberlandt, in vitro hücre kültürü kavramını önerdi
1904 - Hannig, birkaç zakkum türünün embriyolarını yetiştirdi
1922 - Kolte ve Robbins sırasıyla kök ve kök uçlarını başarılı şekilde yetiştirdiler
1926 - İlk bitki büyüme hormonu keşfedildi –İndol Asetik Asit
1934 - White, domates kökü ucu için doku kültürü ortamına büyüme takviyesi olarak B vitaminini piyasaya sürdü
1939 - Gautheret, White ve Nobecourt, kallus kültürlerinin çok sayıda alt kültürde çoğalmasını sağlamıştır.
1941 - Overbeek, Datura’da hücre bölünmesini desteklemek için ilk olarak Hindistan cevizi sütü ekledi
1946 - Ball, sürgün ucu kültürü ile Lupinus’tan tam bitki yetiştirdi
1954 - Muir, kallus dokularını tek hücrelere böldü.
1955 - Skoog ve Miller, hücre bölünmesi hormonu olarak kinetini keşfettiler
1957 - Skoog ve Miller, organ oluşumunda hormonal kontrol kavramını (oksin: sitokinin) ortaya çıkarttı
1959 - Reinert ve Steward, kallus kümeleri ve havuç hücre süspansiyonundan (Daucuscarota) embriyoları üretildi
1960 - Cocking, hücre duvarını enzimatik yolla bozundurarak ilk protoplastı izole etti
1960 - Bergmann, hücre süspansiyonunu ve izole edilmiş tek hücreleri kaplama ile filtreledi
1960 - Kanta ve Maheshwari, test tüpü gübreleme tekniğini geliştirdi
1962 - Murashige ve Skoog, yüksek tuz konsantrasyonlu MS ortamı geliştirdi
1964 - Guha ve Maheshwari, Datura polen tanelerinden (Anther culture) ilk haploid bitkileri üretti.
1966 - Steward, domatesin tek hücrelerinden havuç bitkilerini yenileyerek totipotensi gösterdi.
1970 - Power ve ark., Protoplast füzyonunu başarıyla gerçekleştirdi
1971 - Takebe ve ark., Protoplastlardan ilk bitkileri rejenere etti üretti.
1972 - Carlson, protoplast füzyonuyla Nicotianatabacum’un ilk karışık hibridini üretti.
1978 - Melchers ve ark., Domates ve patatesin somatik hibridizasyonu ile pomato elde edildi
1981 - Larkin ve Scowcroft, somaklonal varyasyon terimini tanıttı
1983 - Pelletier ve arkadaşları, Turp ve üzümde iç genetik sitoplazmik hibritleşmeyi gösterdiler
1984 - Horshet ve ark., <i>Agrobacterium</i> ile transformasyon yoluyla geliştirilmiş transgenik tütünü üretti
1987 – Klien ve ark., Bitki rejenerasyonu için geliştirilmiş biyolistik gen transfer yöntemini tanıttı
2005 - Uluslararası Pirinç Genom Dizileme Projesi kapsamında pirinç genomunu dizilendi

2.7.3.2. Bitki Hücre ve Doku Kültürünün Temelleri

Bitki hücre kültüründe, bitki dokuları ve organları, yapay ortamda, aseptik ve kontrollü şartlarda in vitro olarak yetiştirilmektedir. Teknik esas olarak bitki hücrelerinin totipotansiyelliği kavramına bağlıdır (Vasil, 2008). Bu anlamda, bitki doku kültürü teknolojisi, tek bir hücrenin tam genomu hücre bölünmesiyle ifade edebilme yeteneğine değinmektedir. Bitki hücresinin totipotentlik potansiyeli ile hücrelerin metabolizma, büyüme ve gelişmesini değiştirme kapasiteleri de aynı derecede önemlidir. Tüm bitkiyi yeniden oluşturmak için bitkinin totipotentlik potansiyeli çok elzemdir (Thorpe, 2007). Bitki doku kültürü ortamı bitkilerin normal büyümesi ve gelişimi için gerekli tüm besin maddelerini içerir. Esas olarak makro besin maddeleri, mikro besin maddeleri, vitaminler, diğer organik bileşenler, bitki büyüme düzenleyicileri, karbon kaynağı ve katı madde olarak kullanılan bazı jelleştirici ajanlardan oluşur (Murashige ve Skoog, 1962). Murashige ve Skoog ortamı (MS), çoğu bitki türünün in vitro çoğaltımı için en yaygın olarak kullanılan ortamdır. Ortamın pH değeri, hem bitkilerin büyümesini hem de bitki büyüme düzenleyicilerinin etkinliğini etkilemektedir. Besin ortamı hazırlanırken pH 5.4 - 5.8 arasındaki değere ayarlanır. Kültürde besin ortamı olarak, hem katı hem de sıvı ortam kullanılabilir. Ortamın, özellikle bitki hormonlarının ve azot kaynağının bileşimi, başlangıç eksplantının tepkisi üzerinde büyük etkilere sahiptir.

Bitki büyüme düzenleyicileri (PGR), kültür ortamındaki bitki hücrelerinin ve dokuların gelişim yollarının belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Oksinler, sitokininler ve gibberellinler en sık kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir. Kullanılan hormonların türü ve konsantrasyonu temel olarak bitkinin, kültürlenene doku veya organın türüne ve deneyin amacına bağlıdır (Bisht ve ark., 2017). Oksinler ve sitokininler, bitki doku kültüründe en çok kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir ve bunların miktarı, kurulan veya yenilenen kültür türünü belirler. Yüksek oksin konsantrasyonu genel olarak kök oluşumunu desteklerken yüksek sitokinin konsantrasyonları sürgün oluşumunu teşvik eder. Hem oksin hem de sitokinin dengesi, kallus olarak bilinen farklılaşmamış hücre kütlelerinin gelişmesine yol açar.

Sitokininler genellikle hücre bölünmesini teşvik eder, sürgün oluşumu ve aksiller sürgün oluşumunu başlatır. Yüksek sitokinin/oksin oranına bağlı olarak filizlenme proliferasyonu yükselirken, yüksek oksin/sitokinin oranı kök oluşumuna neden olur

(Hussain ve ark., 2011). Gibberellinler, bitki büyümesi ve hücre uzamasını arttırmak için kullanılmaktadır.

2.7.3.3. Bitki Doku Kültürünün Uygulama Alanları

2.7.3.3.1. Tarımda Doku Kültürü

Ortaya çıkan yeni bir teknoloji olan bitki doku kültürü, giderek artan dünya talebini karşılamak amacıyla ihtiyaç duyulan bitkileri sağlayarak hem tarım hem de sanayide kendine büyük bir yer edinmiştir. Son yıllarda tarım bilimlerinin ilerlemesine önemli katkılar sağlamış ve günümüzde modern tarımda vazgeçilmez bir araç olmuştur (García-González ve ark., 2010).

Tarımsal uygulamalarda biyoteknolojiye büyük bir yer verilmektedir. Doku kültürü, genetik olarak homojen, hastaliksız bitki materyalinin üretilmesini ve çoğaltılmasını sağlar (Chatenet ve ark., 2001). İn vitro kültür, hücre ve dokularda, somaklonal varyasyonun indüksiyonu için yararlı bir araçtır (Marino ve Battistini 1989). Doku kültürü tarafından indüklenen genetik değişkenlikler yeni kararlı genotiplerin elde edilmesi için değişkenlik kaynağı olarak kullanılabilir. İn vitro rejenerasyon, kütle mikroçoğaltım teknikleri ve ağaç türlerinde gen transferi çalışmalarında biyoteknolojik yaklaşımlar için oldukça elverişlidir. Yetişkin ve/veya olgunlaşmamış zigotlu embriyoların in vitro kültürleri, verimli tohumlar üretmeyen çapraz jeneriklerden elde edilen bitkilerin iyileştirilmesi için uygulanır (Ahmadi ve ark.,2012) . Genetik mühendisliği, yüksek verim potansiyeli ve zararlılara karşı direnci yüksek olan ürün çeşitlerinin geliştirilmesine olanak sağlar. Genetik transformasyon teknolojisi, bitki doku kültürü ve moleküler biyolojinin teknik yönlerine dayanmaktadır. Bu teknoloji;

- Gelişmiş bitki çeşitlerinin üretimi,
- Hastaliksız bitki (virüs) üretimi,
- Genetik transformasyon,
- Sekonder metabolitlerin üretimi,
- Tuzluluk, kuraklık ve ısı streslerine karşı dayanıklı çeşitler üretilmesi vb. uygulamaları içermektedir.

2.7.3.3.2. Germplazm Muhafazası

İn vitro hücre ve organ kültürü nesli tükenmekte olan genotiplerin korunması için alternatif bir kaynak durumundadır (Sengar ve ark., 2010). Dünya üzerindeki gen kaynaklarının korunması, bitki türlerinin yok olma oranının giderek artması ve ülkelerin floristik mirasının korunması gereği nedeniyle zaman geçtikçe daha da önemli bir aktivite haline gelmektedir (Rech Filho ve ark., 2005). Doku kültürü protokolleri vejetatif dokuların korunması için tohum yerine klonların saklanması amaçladığından, bir mahsulün genetik yapısını korumak ve biyotik veya abiyotik stres veya doğal felaket gibi etkenlerden dolayı mirasın kaybolmasını önlemek için kullanılabilir (Harding, 2004). Tohum üretmeyen (steril bitkiler) veya uzun süre saklanamayan tohumları bulunan bitki türleri, gen bankalarında saklanmak için in vitro tekniklerle başarıyla çoğaltılabilir.

Kriyoprezervasyon, temel biyolojik materyalin ve genetik kaynakların uzun süre in vitro korunmasında hayati bir rol oynamaktadır. Bu uygulama, sıvı nitrojen içerisinde in vitro hücrelerin veya dokuların depolanmasını içerir; dokuların fiziksel ve kimyasal strese maruz kalması dondurmaya bağlı yaralanmalara neden olur. Başarılı kriyoprezervasyon genellikle hücre ve doku sağkalımı, rejenerasyon yeteneği veya totipotensiyelik potansiyeli ve yeni koloniler oluşturmaları ile saptanır (Tyagi ve ark., 2007). Kriyoprezervasyon sonrasında germplazm genetik bütünlüğünü değerlendirmek gerekmektedir (Day, 2004). Geri kazanılmış bitkilerin aslına uygunluğu fenotipik, histolojik, sitolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyelerde değerlendirilebilir, ancak genetik stabiliteyi değerlendirmek için kullanılan çeşitli yaklaşımların avantajları ve kısıtlamaları vardır (Harding ve ark., 2005). Kriyobiyonomik, kriyoprezerve bitki materyalinde genetik stabilitenin değerlendirilmesi için yeni bir yaklaşımdır (Harding, 2007). Embriyonik dokular gelecekte kullanılmak üzere veya germplazmanın korunması için dondurularak saklanabilir (Corredoira ve ark., 2004).

2.7.3.3.3. Embriyo Kültürü

Embriyo kültürü, besin ortamında tohumlardan ve ovulardan embriyolar yetiştirmek için kullanılan bir bitki doku kültürü yöntemidir. Embriyo kültüründe, bitki doğrudan embriyodan veya dolaylı olarak kallus oluşumu ve ardından sürgünlerin ve köklerin oluşumuyla gelişir. Bu teknik tohum dormansisini kırmak, tohumların canlılığını test etmek, nadir türlerin ve haploid bitkilerin üretimini test etmek için geliştirilmiştir (Burun

ve Poyrazoglu, 2002; Holeman, 2009). Oluşturulan embriyoların büyümesiyle bitkilerin ıslah döngüsünü kısaltmak için kullanılan etkili bir tekniktir ve tohumların uzun süre uyku halinin azaltılması ile sonuçlanır. Buna ek olarak, nesli tükenmekte olan türlerin korunması embriyo kültürü tekniğini uygulayarak da sağlanabilir. Bu teknik ormancılıkta, doğal nüfusun seçimi ve iyileştirilmesinin zor olduğu türlerin çoğaltılması için önemli bir uygulama alanını oluşturmaktadır (Hussain ve ark., 2012).

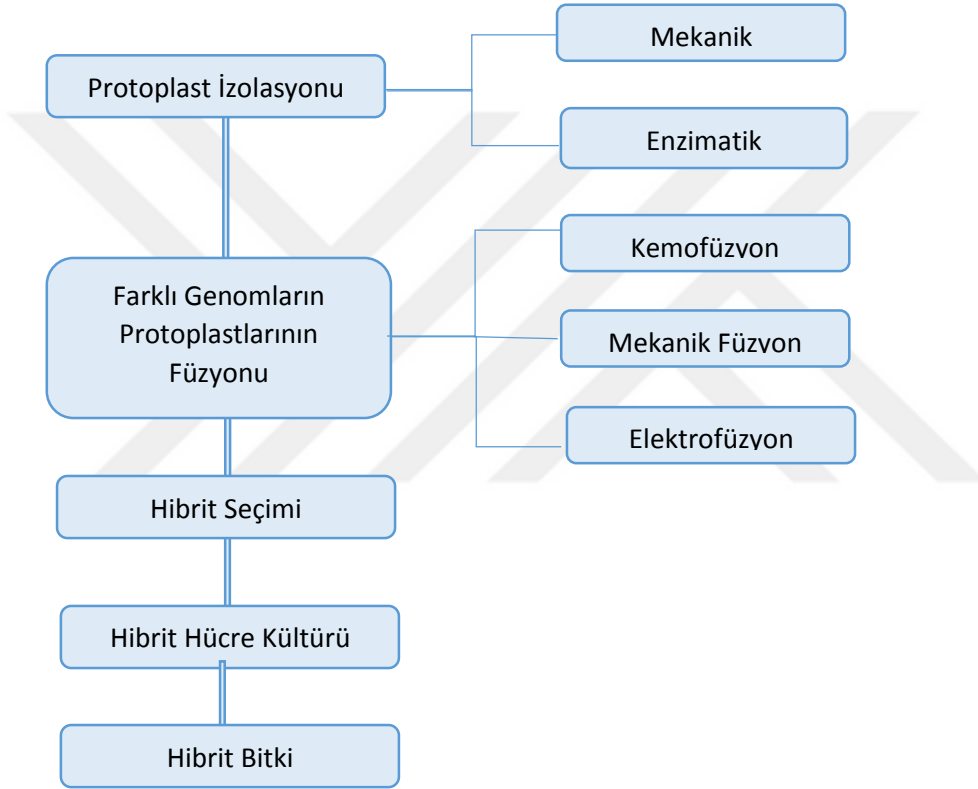
2.7.3.3.4. Genetik Transformasyon

Genetik transformasyon, bitki hücre ve doku kültürünün en son yönü olup, konukçu bitkilere istenen nitelikte genlerin transferi ve transgenik bitkilerin üretimi için olanak sağlar (Tabin, 2016). Teknik, bitki biyoteknolojisi ve yetiştirme programlarına entegre olarak çeşitli kültür bitkilerinin gen iyileştirmesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Yüksek verim, kalite ve zararlılara, hastalıklara karşı direnç geliştirme gibi tarımsal açıdan önemli niteliklerin artırılması için umut verici bir role sahiptir (Sinclair ve ark., 2004).

Bitkilerde genetik dönüşüm, vektör kullanılarak (indirekt gen transferi) veya vektör kullanılmadan (direkt gen transferi) yapılabilir (Sasson, 2000). Vektör kullanılan gen transferi yöntemlerinde, bitki hücrelerine yabancı genlerin ekspresyonu için *Agrobacterium* aracılı genetik transformasyon yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Virüs tabanlı vektörler, bitki hücrelerinde stabil ve hızlı protein ekspresyonu için alternatif bir yol oluşturmaktadır ve böylece büyük ölçekli rekombinant protein üretimi için etkili bir ortam sağlar (Chung ve ark.,2006). Bu teknoloji, tohumlarda zehirli maddelerin azaltılması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Misra ve ark., 1993). Böylece çeşitli sanayi sektörlerinde tohum kullanımının engellerini ortadan kaldırmaktadır. Hastalığa veya virüslere dirençli bitkilerin rejenerasyonu için genetik transformasyon tekniği başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Araştırmacılar, patates verimi için büyük bir tehdit olan patates virüsü Y'ye (PVY) dayanıklı transgenik patates bitkileri geliştirmeyi başardılar (Bukovinszki ve ark., 2007). Buna ek olarak, markörsüz transgenik *Petunia hbrida* bitkileri, çoklu otomatik transformasyon (MAT) vektör sistemi kullanılarak üretilmiş ve bu bitkiler, gri küf nedeni *Botrytis cinerea*'ya karşı yüksek direnç sergilemiştir (Khan ve ark., 2011).

2.7.3.3.5. Protoplast Füzyonu

Somatik hibridizasyon, türler arası ve cinsler arası melezlerin üretimi ile bitki yetiştiriciliğinde ve bitki gelişiminde önemli bir yöntemdir. Bu teknik, iki farklı genomun protoplastlarının füzyonunu ve bunu takiben istenen somatik hibrid hücrelerin seçilmesini ve melez bitkilerin rejenerasyonunu içerir (Bhojwani, 2012). Protoplast füzyonu, istenen özelliğe sahip bir türden diğerine etkili bir gen transferi anlamına gelir ve ürün gelişimi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (Brown ve Thorpe, 1995).



Şekil 2.5. Protoplast füzyonuyla hibrit bitki üretiminin şematik gösterimi (Hussain ve ark., 2012)

İn vitro protoplast füzyonu, sporofitik uyumsuzluk engellerini aşarak, melez bitki gelişimine etkili bir yöntemdir. Bu teknik, bahçecilik endüstrisinde yüksek meyve verimi ve hastalıklara karşı yüksek dayanıklılık taşıyan yeni melezler üretmek için uygulanabilir olmuştur. Turunçgillerden elde edilen protoplastlar, diğer ilgili *Citrinae* türleri ile kaynaştırıldığında, başarılı canlı melez bitkiler elde edilmiştir (Motomural ve ark., 1997). Önemli kültür bitkilerine somatik hibridizasyon potansiyeli, Brassicaceae familyası

(Toriyama ve ark.,1987) üyeleri arasında interjenerik melez bitkilerin üretimi ile gösterilmiştir. Kromozom kaybı ve rejenerasyon kapasitesinde azalma sorununu çözmek için alıcı olarak iki tip buğday protoplastı ve füzyon donörü olarak *Haynaldia villosa*'nın protoplastı kullanılarak somatik melez bitkilerin üretimi için başarılı bir protokol oluşturulmuştur. Bu yöntem buğday gelişimi için önemli bir gen kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Liu, 1988).

2.7.3.3.6. Haploid Üretimi

Doku kültürü teknikleri, kısa sürede homozigot bitkilerin üretilmesine olanak sağlar (Morrison ve Evans, 1988). Haploit bitkiler, kromozom dublikasyonu indüklemesiyle homozigot diploidlere dönüştürülebilen tek kromozom setine sahip steril bitkilerdir. Kromozomların iki katına çıkarılması, bitkilerin fertillliğini geri kazandırır (Basu ve ark., 2011). Androjenez terimi, döllenme olmadan genç polen hücrelerinden haploid bitkilerin üretimini ifade etmektedir. Sudherson ve ark. (Sudherson ve ark., 2008) primer eksplant olarak polen taneleri kullanarak, çöl bezelyesinden haploid bitki üretimini bildirmişlerdir. Haploit teknolojisi iç besleme hatlarının (Bajaj, 1990) üretimini hızlandırmak, tohum dormansisi ve cansız embriyo (Yeung ve Jensen, 1981) sorununu aşarak bitki yetiştirme programlarının ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Bu teknik, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere dirençli olan haploid bitkilerin üretilmesiyle genetik transformasyonda kayda değer bir kullanıma sahiptir.

2.7.3.3.7. Farmasotiklerde doku kültürü

Bitki hücre ve doku kültürleri, yararlı sekonder metabolitlerin çoğunun kontrollü üretimi için büyük olanak sağlamaktadır (Chandra ve Chandra, 2011). Bitki hücre kültürleri, değerli terapötik sekonder metabolitlerin üretimi için tüm bitki sistemlerinin mikrobiyal özelliklerini ve hayvansal hücre kültürlerinin özelliklerini birleştirir (Hellwig ve ark., 2004). Bitkilerden tıbbi bileşimlerin üretim alternatiflerine yönelik araştırmalarda, biyoteknolojik yaklaşımlar, özellikle bitki doku kültürleri, biyoaktif bitki metabolitlerinin endüstriyel üretiminde geleneksel tarımın bir tamamlayıcısı olarak gösterilmektedir (Rao ve Ravishankar, 2002). Son yıllarda çeşitli ülkelerdeki bir grup bitki bilimci ve

mikrobiyolog, çeşitli hücre kültürlerinin biyosentetik yeteneklerinin araştırılması üzerine çalışmalar yapmaktadır (Siahsar ve ark., 2011).

Hücre süspansiyon kültürü: Hücre süspansiyon kültür sistemleri, günümüzde sekonder metabolitlerin ekstrakte edilebildiği bitki hücrelerinin büyük ölçekli kültürlenmesi için kullanılmaktadır. Bir süspansiyon kültürü, kallus parçalarını uygun havalandırma, çalkalama, ışık, sıcaklık ve diğer fiziksel parametreler altında sıvı ortama aktararak geliştirilir (Chattopadhyay ve ark., 2002). Hücre kültürleri yalnızca büyük hacimlerde tanımlanmış standart fitokimyasallar üretmekle kalmaz, aynı zamanda tarla bitkilerinde tehdit unsuru olan bileşiklerin varlığını ortadan kaldırır (Bodas ve ark., 2012). Bu yöntemin avantajı, nihayetinde sürekli, güvenilir doğal bir kaynak temin edebilmesidir (Rao ve Ravishankar, 2002). Hücre kültürlerinin en büyük avantajı, iklim ve toprak koşullarından bağımsız olarak, kontrollü ortamda çalışan bioaktif sekonder metabolitlerin sentezlenebilmesidir (Karuppusamy, 2009). Bitki hücrelerinin büyük çapta kültürlenmesi için bir dizi farklı biyoreaktörler kullanılmıştır. Bitki hücrelerinin büyük ölçekli kültürünün ilk ticari uygulaması, 200 litre ve 750 litrelik karıştırmalı tank reaktörlerinde, *Lithospermum erythrorhizon*'un hücre kültürü ile şikonin üretmek için gerçekleştirildi (Chattopadhyay ve ark., 2002). *Catharanthus roseus*, *Dioscorea deltoidea*, *Digitalis lanata*, *Panax notoginseng*, *Taxus wallichiana* ve *Podophyllum hexandrum* hücreleri, çeşitli biyoreaktörlerde sekonder bitki ürünleri üretimi için kültürlenmiştir.

Bitki hücre ve dokularının çeşitli kültürlerinde tıbbi olarak önemli alkaloidler, antikanser ilaçları, rekombinant proteinler ve gıda katkı maddeleri üretilmektedir. Tıbbi bileşenlerin üretimi için hücre kültürü alanındaki ilerlemeler, alkaloidler, terpenoidler, steroidler, saponinler, fenolikler, flavanoidler ve amino asitler gibi çok çeşitli farmasötik ürünlerin üretimini mümkün kılmıştır (Yesil-Celiktas ve ark., 2010; Chandra ve Chandra, 2011). Bunlardan bazıları piyasada ticari olarak mevcuttur, örneğin şikonin ve paclitaxel (Taxol). Günümüze kadar antikorlar, enzimler, yenilebilir aşılar, büyüme faktörleri ve sitokinler dahil olmak üzere bitki hücre kültüründe 20 farklı rekombinant protein üretilmiştir (Hellwig ve ark., 2004). Ölçeklendirme yaklaşımlarındaki ilerlemeler ve immobilizasyon teknikleri, katma değeri yüksek bileşiklerin üretimi için bitki hücre kültürlerinin uygulama sayısındaki önemli artışa katkıda bulunmuştur.

2.7.3.4. Bitki doku kültürünün mevcut ve gelecekteki durumu

Son yıllarda, bitki biyoteknolojisinde, çok sayıda sekonder bitki metaboliti üretimine odaklanan biyoteknoloji alanında yeni bir döneme girildi. Geçen yüzyılın ikinci yarısında, genetik mühendisliği ve moleküler biyoloji tekniklerinin geliştirilmesi, dünya çapında birçok ülkede artan talebi karşılamak için gelişmiş ve yeni tarım ürünlerinin ortaya çıkmasına izin vermiştir (Vasil, 1994; Navarro, 2004; Christou ve ark., 2006; James, 2008). Bununla birlikte, genetik bilginin bitki hücrelerine girişi için araçlar sağlayan doku kültürü teknikleri bu gelişmelerin yaşanmasını mümkün kılmıştır (Pareek ve Swarnkar, 1997). Günümüzde, transgenik bitkilerin kullanımı protein, antikor ve aşı gibi tıbbi maddelerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmakta ve araştırılmaktadır (Ferrante ve Simpson, 2001). Transgenik bitkiler, fermantasyon esaslı üretim sistemlerine ekonomik bir alternatiftir. Bitkiler insan kaynaklı hastalıklardan arındırılmış olduğu için, bitkisel aşılar veya antikorlar (bitki gövdeleri) ilgi çekmektedir. Böylece viral ve bakteriyel toksinler için tarama maliyetleri azaltılmaktadır. 2008 yılında transgenik bitkileri, üretim sistemlerine dahil eden 13.3 milyon, 2007'de 11 milyon çiftçi vardır (James, 2008).

2.7.3.5. Bitki doku kültürü teknikleri

2.7.3.5.1. Mikroçoğaltım

Günümüzde mikroçoğaltım temel olarak 5 aşamada ifade edilmektedir. Mikroçoğaltım sağlıklı, kuvvetli bir ana bitkiden bitki dokularının (eksplant) seçilmesi ile başlar (Murashige, 1974). Bitkinin herhangi bir kısmı (yaprak, apikal meristem, tomurcuk ve kök) eksplant olarak kullanılabilir. Mikroçoğaltımın aşamaları Tablo 2. 12'de kısaca tarif edilmiştir.

Tablo 2.12. Temel mikroçoğaltım aşamaları (Hussain ve ark., 2012)

Aşama	Method
Başlangıç Aşaması	Başlangıç bitkisinin seçimi
1.aşama	Kültürün başlatılması
2.aşama	Sürgün çoğaltılması yada hızlı somatik embriyo formasyonu
3.aşama	Somatik embriyo ve/veya sürgün köklerinden in vitro germinasyon
4.aşama	Bitkiciklerin sera koşullarında steril toprağa transferi

Başlangıç Aşaması:

Bu aşama, mikroçoğaltımın ilk adımıdır ve kontrollü koşullar altında stok bitkilerinin seçimi ve yaklaşık 3 ay boyunca büyümesini içerir.

Hazırlık Aşaması:

Bu aşamada uygun kültür ortamının hazırlanması sağlanır. Uygun eksplantların seçilmesi önemlidir. En sık kullanılan eksplantlar organlar, sürgün uçları ve aksiller tomurcuklardır. Seçilen eksplant yüzey sterilizasyonuna tabi tutulur ve kullanılmadan önce yıkanır.

Sürgün Aşaması:

Bu aşamada, mikroçoğaltım tanımlanmış bir kültür ortamında gerçekleşir. Bu aşama ağırlıklı olarak sürgünlerin çoğalması veya eksplanttan hızlı embriyo oluşumunu içerir.

Köklendirme Aşaması:

Bu aşamada eksplantlar köklerin hızlı bir şekilde gelişimi için ortam içeriği farklı olan kültür kaplarına aktarılır. Bazen sürgünler kök geliştirmek için toprağa dikilebilir. Ancak sürgünlerin in vitro köklendirilmesi, aynı anda çok sayıda türün kullanımı sırasında tercih edilir.

Şartlandırma Aşaması:

Bu aşama, laboratuvar koşullarında üretilen bitkilerin toprağa aktarılmasını içerir. Bu aşamada, bir önceki aşamada elde edilen bitkilerin laboratuvar ortamından sera koşullarına aktarılması işlemi yapılır. Bazı bitki türleri için köklendirme aşaması atlanır ve köklü olmayan sürgünler saksılara veya uygun kompost karışıma ekilir.

2.7.3.5.1.1. Mikroçoğaltımı Etkileyen Faktörler

Başarılı bir in vitro klonal çoğaltım (mikroçoğaltım) için, çeşitli faktörlerin optimizasyonu gereklidir;

a) Bitkinin genotipi: Mikroçoğaltım için doğru genotipinin seçilmesi (tarama yoluyla) gereklidir. Çoğunlukla çimlenme ve dallanma kapasitesine sahip bitkiler, mikroçoğaltım için daha uygundur.

b) Eksplantların fizyolojik durumu: Genç bitkilerden alınan eksplantlar (bitki materyalleri) yaşlı bitkilerden alınan eksplantlara göre daha etkilidir. Çoğaltımı yapılacak

olan bitkinin gelişme aşaması ve mevsimsel etki hakkında bilgi edinilmesi gerekir. Bu eksplant seçiminde yarar sağlamaktadır.

c) Kültür ortamı: Standart bitki doku kültürü ortamı, I. aşama ve II. aşama sırasında mikroçoğaltım için uygun olmalıdır. Bununla birlikte, III. aşama için büyüme düzenleyicileri (oksinler ve sitokininler) ve mineral bileşimindeki değişiklikler gereklidir. Bu büyük oranda kültür türüne (meristem, tomurcuk, vb.) bağlıdır.

d) Kültür şartları:

Işık: Kültürlenen dokulardaki fotosentetik pigment, ışığı emer ve böylece mikroçoğaltımı etkiler. Işık kalitesinin, sürgünlerin in vitro büyümesini etkilediği bilinmektedir, örneğin tütün sürgünlerinde mavi ışık kaynaklı tomurcuk oluşumunu sağlar. Gün ışığındaki aydınlatma varyasyonları da mikroçoğaltımı etkiler. Genel olarak, 16 saatlik aydınlık ve 8 saatlik karanlık periyot uygulaması sürgün oluşumu için olumlu sonuçlar vermektedir.

Sıcaklık: Mikroçoğaltım kültürünün çoğunda optimum sıcaklık 25° C'dir. Bununla birlikte, bazı istisnalar vardır; Begonia X Cheimantha melez dokusu düşük sıcaklıkta (yaklaşık 18 °C) yetişmektedir.

Gaz fazının bileşimi: Kültür kaplarındaki gaz fazının oluşumu da mikroçoğaltımı etkiler. Hücrelerin büyümesi genelde etilen, O₂, CO₂ etanol ve asetaldehit ile sağlanır.

İn vitro köklenmeyi etkileyen faktörler: Mikroçoğaltmayı etkileyen faktörlerin, özellikle de sürgün çoğalmasıyla ilgili genel bir tanımlaması yukarıda verilmiştir. Mikroçoğaltım sırasında in vitro köklenme için, düşük tuz konsantrasyonu olumlu sonuçlar vermektedir. Köklerin indüksiyonu, uygun oksin (NAA veya IBA) varlığı ile de desteklenir.

2.7.3.5.2. Somatik embriyogenezis ve organogenezis

İn vitro bitki rejenerasyon yöntemi olan somatik embriyogenezis, sürekli klonal çoğaltım için önemli biyoteknolojik araç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Park ve ark., 1998). Somatik embriyogenezis, somatik hücreler veya dokuların farklılaşmış embriyolara dönüştüğü bir süreçtir. Bu somatik embriyolar, zigotik embriyoların yaptığı gibi, fertilizasyon sürecine girmeden tüm bitkiyi oluşturabilir. Somatik embriyogenez direkt olarak eksplantlardan başlatılabilir veya indirekt olarak kallus adı verilen organize olmamış hücre kütesinin oluşturulmasıyla başlatılabilir.

Somatik embriyogenez yoluyla bitki rejenerasyonu, tohum, yaprak veya gövde segmentinden embriyojenik kültürlerin indüksiyonu ve embriyoların hızla çoğaltılmasıyla oluşur. Olgun embriyolar daha sonra çimlenme ve bitki gelişimi için kültürlenir ve en sonunda toprağa aktarılır.

Farklı familyalara ait çok sayıda ağaç ve süs bitkilerini içeren çoğu bitki türünde somatik embriyogenez başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Birçok kaktüs türünde de somatik embriyogenez gerçekleştirilmiştir (Torres-Muñoz ve Rodriguez-Garay, 1996). Kültür hücrelerinde somatik embriyoların indüksiyonunu ve gelişimini etkileyen çeşitli faktörler vardır. Kültür ortamında somatik embriyogenez için alınan dokular sıvı ortamda kültürlendiğinde yeterince yüksek bitki rejenerasyonu gösterdiği yüksek verimli bir protokol bildirilmiştir (Jayasankar ve ark., 1999). Bitki büyüme düzenleyicileri, somatik embriyoların yenilenmesi ve proliferasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Birçok bitkide en yüksek embriyonik kallus verimliliği, bitki büyüme düzenleyicilerinin tek başına veya kombinasyon halinde kullanıldığı ortamda gerçekleştirilmiştir (Li ve ark., 2002). Bu embriyonik kallusun, yalnızca absisik asit (ABA) içeren ortamda yetiştirildiğinde somatik embriyoların yüksek çimlenme oranına sahip olduğunu gösterilmiştir. Somatik embriyogenez, yalnızca bitkilerin büyük çapta çoğaltımı için bir rejenerasyon türü değil aynı zamanda genetik manipülasyon için değerli bir araç olarak da kabul edilir. Bu süreç, ayrıca çeşitli streslere dirençli bitkileri (Bouquet ve Torregrosa, 2003) geliştirmek ve genleri genetik transformasyonla tanıtmak için kullanılabilir (Maynard ve ark.,1998).

Organogenez: Direkt olarak meristemden veya indirekt olarak ayrışmamış hücre kütlelerinden (kallus) oluşan bitki organlarının, yani köklerin, filizlerin ve yaprakların üretimini ifade eder. Organogenez yoluyla bitki rejenerasyonu, besin ortamında bitki büyüme hormonlarının konsantrasyonunu değiştirerek kallus üretimini ve adventif meristemlerin organlara farklılaşmasını içerir. Skok ve Muller tütün bitkisinde, yüksek sitokininin/oksin oranının sürgün rejenerasyonunu, yüksek oksin/sitokinin oranının kök rejenerasyonunu uyardığını gösteren ilk kişidir (Skoog ve Miller, 1957).

a) Direkt Organogenez: Yapraklardan, saplardan, köklerden ve çiçek petallerinden alınan dokular, doğrudan bitki organlarını üretmek üzere kültüre alınabilir. Direkt organogenezde, doku, bir kallus veya süspansiyon hücre kültürü aşamasına girmeden morfogenezi gerçekleştirir. Direkt adventif organ oluşumu terimi direkt organogenez için de kullanılır.

Doğrudan kök, yaprak ve çeşitli organlar üzerindeki adventif tomurcuklanma oluşumunun indüksiyonu bitki çoğaltımı için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yaklaşım özellikle otsu türler için yararlıdır. Kültür sisteminde uygun organogenez için ekzojen ek büyüme düzenleyicileri (Oksin ve sitokinin) gereklidir. Büyümeyi teşvik eden maddenin konsantrasyonu büyüme koşullarının yanı sıra eksplantın yaşı ve doğasına da bağlıdır.

b) İndirekt Organogenez: Organogenez kallus veya süspansiyon hücre kültürü oluşumu yoluyla gerçekleştiğinde indirekt organogenez olarak kabul edilir. Kallus büyümesi, sonraki organogenezise yönelik birçok eksplanttan (yapraklar, kökler, kotiledonlar, saplar, çiçek yaprakları vb.) oluşturulabilir.

Organogenez için eksplantlar, mitotik olarak olgunlaşmamış dokular olmalıdır. Genellikle, eksplant ne kadar büyük olursa, canlı kallus/hücre süspansiyon kültürleri elde etme şansı da o kadar iyi olur. Etkili bir indirekt organogenez için meristematik dokuları (sürgün ucu, yaprak ve yaprak sapı) seçmek daha avantajlıdır. Çünkü büyüme oranı ve hayatta kalma oranı çok daha yüksektir.

İndirekt organogenez için, kültürler sıvı ortamda veya katı ortamda yetiştirilebilir. Organogenezde kullanılan çok sayıda kültür ortamı (MS, B5 White vs.) vardır. Ortamdaki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonu organogenez için kritik öneme sahiptir.

- Oksinlerin ve sitokininlerin konsantrasyonlarını değiştirerek, in vitro organogenezasyon manipüle edilebilir:
- Düşük oksin ve düşük sitokinin konsantrasyonu kallus oluşumunu indükleyecektir.
- Düşük oksin ve yüksek sitokinin konsantrasyonu, indirekt organogenezisi teşvik eder.
- Yüksek oksin ve düşük sitokinin konsantrasyonu kök oluşumuna neden olur (Hussain ve ark., 2012).

2.8. Literatür Özeti

Süs bitkisi olma potansiyeli çok yüksek olan *Fritillaria* türleri, doğal koşullarda yetişebilen soğanlı bitkilerdir. Doku kültürüyle çoğaltım geleneksel çoğaltma yöntemleriyle karşılaştırıldığında, yeteri kadar bitkisel materyalin çoğaltımını mümkün kılacağı için, ticari anlamda soğan çoğaltımı için avantaj sağlayacaktır. Bununla birlikte bu

bitkilerin doku kültürü yöntemiyle çoğaltımı konusundaki çalışmalar oldukça azdır. *Fritillaria* türleriyle yapılan doku kültürü çalışmalarının büyük bir bölümü tıbbi olarak ön planda olan türlerin doğrudan veya kallus yoluyla morfogenezisi ile elde edilmesi biçimindedir.

Scanzoni (1971), *Fritillaria* türlerinin güneşli-yarı gölge alanlarda ve kireçli topraklarda yetiştirebildiğini, bitkinin Nisan-Mayıs aylarında turuncu renkte çiçek açıp yaklaşık 80 cm ulaşabildiğini, soğanlarının kışa dayanıklı çiçek soğanları grubuna girdiğini bildirmiştir. Araştırmacı ayrıca, *Fritillaria 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 belirtmektedir (Scanzoni, 1971).

Fritillaria thunbergii (Sun ve ark., 1977), *Fritillaria pallidiflora* (Hao ve ark., 1982) ve *Fritillaria ussuriensis* (Zhao ve ark., 1983) gibi medikal değeri yüksek olan türler *Fritillaria* türlerinde doku kültürü çalışmaları için atılan ilk adım olmuştur. İlerleyen yıllarda değişik araştırmacılar tarafından artan sayıda in vitro çoğaltım protokolleri içeren çalışmalar yayınlanmıştır (Kukulczanka ve ark., 1988; Sun ve Wang 1991; Wenyan ve ark., 1996; Gao ve ark., 1999; Paek ve Murthy, 2002; Marija ve ark., 2011).

1982'de Hao ve ark., *Fritillaria pallidiflora* soğan eksplantları kullanarak yaptıkları bir çalışmada 2,4- diklorofenolasetik asit ve kinetin (1.0 ve 0.1 mg/l) içeren ortamda kallus kültürü oluştuğunu bildirmişlerdir. Eksplantlar, MS ortamında kültüre alındıktan sonra %35 oranında kallus oluşumu gözlemlenmiştir (Hao ve ark., 1982).

Kukulczanka ve ark. (1988), *Fritillaria meleagris* L. pul yaprağı parçacıkları ve tüm soğancıkları eksplant olarak kullanmış, BA (0.5-4.0 ppm) ve NAA (1.0 ppm) içeren MS ortamında adventif soğancık oluşturmuşlardır. En yüksek soğancık oluşumu, 0.5-2.0 ppm BA içeren MS ortamında elde edilmiştir. 4.0 ppm BA uygulanması, soğancık üretiminin azalmasına neden olmuştur (Kukulczanka ve ark., 1988).

Wang ve ark. (1990), *Fritillaria pallidiflora* türünün in vitro kallus kültürünün alt kültürleri boyunca kromozom sayılarındaki değişimi incelemişlerdir. Alt kültürlerin sayısı arttıkça kromozom sayılarında değişebildiğini bildirmişlerdir. Bu değişimin en fazla 2,4-D bulunduran ortamlarda ortaya çıktığını, IAA içeren ortamların ikinci sırada yer aldığını ve NAA içeren ortamlarda ilerlemiş alt kültürlerde az da olsa kromozomal farklılıkların ortaya çıkabildiğini belirlemişlerdir (Wang ve ark., 1990) .

Yamagishi (1991), triploid *Fritillaria camtschaticensis* (L.) Ker-Gawl. bitkisinden in vitro koşullarda çoğaltım yaparak materyali hızlı çoğaltmayı amaçlamıştır. Eksplant

kaynağı olarak, soğan, yaprak ve gövde parçalarını kullanarak, bunları değişik bileşimlere sahip Linsmaier and Skoog ortamına aktarmışlardır. Bu ortamda soğan parçalarından gelişen in vitro soğancıklardan alınan yeni eksplantlar, 5 mg/l NAA ve 0.005 mg/l BA içeren LS ortamına alındıktan sonra soğancık sayısında büyük bir artış gözlemlenmiştir. 2 °C’de 100 gün bekletilen soğancıklar toprağa aktarılarak seraya alınmışlar; birkaç hafta sonra yaprak ve sürgün oluşturmaya başlamışlardır (Yamagishi, 1991).

Fritillaria ussuriensis türünde yapılan bir çalışmada, Tang ve Wu (1993) soğan pul yapraklarından oluşturdıkları eksplantları, makro elementleri MS, mikro elementleri N6 ortam kompozisyonuna uyacak şekilde hazırladıkları besin ortamlarına dikmişlerdir. Eksplantların %95’inde sadece kallus oluşumunu gözlemlerken, %1’lik bölümünden bitkicik oluşumunu gözlemişlerdir (Tang ve Wu, 1993).

Zhang ve ark. (1995), farklı oksin (2,4-D ve NAA) ve sitokininlerin (KIN ve BA) çeşitli kombinasyonlarını içeren MS ortamı üzerinde *Fritillaria sinics* genç köklerini eksplant kaynağı olarak kullanmış ve kallus formasyonunu gözlemlenmiştir. Soğancık oluşumu ve somatik embriyogenezin en iyi gerçekleştiği ortam; NAA ve BA (1.0 ve 0.5 mg/l) içeren MS ortamı olmuştur (Zhang ve ark., 1995).

Fritillaria ussuriensis türünde yapılan diğer bir çalışma da Tang ve ark.(1995) tarafından yapılmıştır. Tang ve ark. genç yapraklardan hazırladıkları eksplantları MS besin ortamında kültüre almışlardır. 2,4-D’nin tek başına kullanıldığı MS ortamında kallus gelişim oranı düşük bulunurken, kinetin ve BA’nın birlikte kullanıldığı ortamda kallus gelişimi daha iyi olmuştur. Ortamdaki kinetin oranı arttırıldığında kallus oluşumunun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. İçeriğinde 2,4-D, kinetin, BA ve kazeinhidrolizat bulunan ortamda, en yüksek oranda elde edilen kalluslar, BA, kinetin ve NAA içeren N6 ortamlarına aktarılmış, burada sekiz hafta içerisinde adventif soğancıklar meydana gelmiştir. Bu soğancıkların köklendirilmesi ise NAA içeren ortama aktarıldıktan sonra iki hafta içerisinde gerçekleşmiştir. 2,4-D’nin tek başına kullanılmasının, somatik embriyogenezis aşamasında engelleyici bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Tang ve ark., 1995).

Tang (1995), in vitro koşullarda *Fritillaria ussuriensis* türünden elde edilen yaprakları eksplant olarak kullanmıştır. Bu eksplantların MS ortamı üzerinde ve karanlık koşullarda kültüre alınmasıyla bir ay içerisinde açık sarı renkli kallus gelişimi gözlemlenmiştir. 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, 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 (Tang, 1995).

Zhang ve ark. (1995), 2,4-D, BA ve Kinetin içeren MS ortamında *Fritillaria sinica*'nın genç çiçek saplarını kültüre almış ve embriyojenik kallus ve soğancık üretimini sağlamışlardır. Elde edilen bu kallus kültürleri, organ rejenerasyonu ve somatik embriyogenez için 1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren MS ortamında 30-40 gün kültüre alınmıştır. *Fritillaria sinica*'dan elde edilen soğanlarda 3 şekilde oluşum gözlemlenmiştir;

- a) Eksplanttan oluşum,
- b) Adventif tomurcuktan üretim,
- c) Somatik embriyogenezis (Zhang ve ark., 1995).

1996'da Liu ve ark., *Fritillaria taipaiensis* bitkisinden elde ettikleri eksplantları 3.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre almış ve %93 oranında kallus ve soğancık oluşumu elde etmişlerdir (Liu ve ark., 1996).

Paek ve ark. (1996), farklı oksin ve sitokinin konsantrasyonları ile sükröz kombinasyonlarını içeren MS ortamında, tıbbi bitki olarak kullanılan *Fritillaria* türlerinin farklı kısımlarını kültüre alarak, eksplant tipi, yaşı ve kültür ortamı bileşiminin mikroçoğaltım üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Soğan pul yaprağı eksplantı alınacak olan soğanlar in vitro ortama aktarılmadan önce, kuru depolarda 4 °C'de 2-4 hafta ve nemli depolarda 4-6 hafta boyunca 10 °C'de tutuldu. Boğumlardaki tomurcuklar ve gövde segmentlerinin pul yaprağı eksplantlarına göre, daha iyi soğancık oluşturma kapasitesine sahip olduklarını belirlemişlerdir. Kinetin içeren ortam BA'e göre daha etkin bulunmuştur. En etkili kinetin oranı eksplant tipine göre değişiklik, göstermiş ve 1-5 mg/l arasında değişmiştir. İyi sonuç alınan gövde eksplantlarındaki rejenerasyon da eksplant yaşına göre değişiklik göstermiş ve genç gövde eksplantlarından daha iyi sonuç alındığı gözlemlenmiştir. En yüksek çoğalma katsayısı 20 olarak belirlenmiş ve bu oran gövde segmentlerinden elde edilmiştir (Paek ve ark., 1996).

Otani ve Shimada (1997), (0.1-5.0 mg/l) NAA, (0.1-1.0 mg/l) pikloram ve/veya (1.0 mg/l) BA içeren LS ortamı üzerinde *Fritillaria camtschatcensis* soğanları kültüre alınmıştır. Kültürden 40 gün sonra adventif soğancık oluşumu gözlemlenmiştir. Düşük konsantrasyonda NAA ve pikloram (0.5- 0.1 mg/l), soğancık üretimi açısından BA'ya göre daha yüksek bir etkiye sahiptir. Kontrol ortamında da soğancık gelişimi bildirilmiştir. LS

ortamında uygulanan şeker konsantrasyonu (%3, 6 ve 9) test edildi, ayrıca düşük konsantrasyonda (%3) şeker büyümede güçlü bir etki gösterdi. Soğancık oluşturan eksplantlar, hormonsuz LS ortamında, 20 °C'de 120 gün sonra mükemmel bir bitki (yaprak ve kök) oluşumu gerçekleştirdi (Otani ve Shimada, 1997).

Witomska ve ark. (1998), *Fritillaria Imperialis* L soğanları üzerinde belirli sterilizasyon yöntemleri uygulayarak bu yöntemlerin yaşama ve rejenerasyon oranları üzerindeki etkilerini incelemiştir. Soğanlar ya tek bir aşamalı bir şekilde kloramin çözeltisi (%2, %4 veya %6) içerisinde bekletilerek yada iki aşamalı olarak kloramin öncesinde %0.2'lik benomil çözeltisine daldırılarak steril edilmiştir. Benomil uygulaması, enfeksiyon oranını düşürmesine rağmen rejenerasyon hızını ve köklenme miktarını da düşürmüştür. En yüksek steril eksplant oranı, %0.2 benomilde batırıldıktan sonra %2'lik bir kloramin solüsyonu içinde sterilize edilen eksplantlardan elde edilmiştir (Witomska ve ark., 1998).

1999'da *Fritillaria unibracteata* Hisao ve K. C. Hsia türünde yapılan başka bir çalışma Gao ve ark.'na aittir. Araştırmacıların elde ettiği gözlemlere göre soğanlar, küçük parçalar haline getirilerek besin ortamına dikildiğinde çoğaltılabilmektedir. Araştırmacılar 50 günlük inkübasyon süresinden sonra soğanların geliştiğini gözlemlemiş ve soğan gelişimi için en uygun ortamın 4.44 µM BA ve 5.7 µM IAA içeren MS ortamı olduğunu belirtmişlerdir. Geleneksel çoğaltma yöntemlerine göre 3-50 kat daha fazla çoğalma katsayısı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, elde ettikleri soğancıkların içeriklerinin alkaloid ve diğer yararlı bileşikler bakımından, doğal ortamlarda yetişenlerden daha zengin olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle bitki türünün endüstriyel anlamda üretimi için önemli bir adım olduğundan bahsetmişlerdir (Gao ve ark., 1999).

Seon ve ark. (1999), *Fritillaria thunbergii*'nin soğan pul parçalarından adventif soğancık oluşumu için MS ortamına 3-5 mg/l kinetin eklemişlerdir. Soğan oluşumunu arttırmak amacıyla, eksplantların alınacağı ana soğanlar, ekimden önce 4-6 hafta boyunca 10 °C'de nemli ortamda tutulmuştur. Çiçek sapları, diğer tüm eksplant türlerine kıyasla, soğancık oluşturmakta en iyi sonuçları vermiş ve yüksek sükroz içeren MS ortamındaki bitki parçalarının gelişimi için iyi sonucu almışlardır. Bu ortamın içeriği ayrıca şu maddeleri de içermektedir; 10-100 mg/l süksinik asit, 2.2 mg/l dimetil hidrazit veya kloromequet. Uzun süreli soğuk uygulamasından sonra toğrağa aktarılan soğanlarda yaprak çıkışı hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Seon ve ark., 1997).

Ohkawa ve Nishino (1999), PEG ortamında *Fritillaria camtschatcensis* KR-Gawli'yi yetiştirmiş ve bunun için farklı şeker konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Çalışma, ortama

60 ve 120 g/l süktroz ilave edilerek değerdendirilmiş ve 60 g/l süktroz ilave edildiğinde yaprakların en yüksek üretime ulaştığı bildirildi. Şeker içermeyen PEG ortamında yaprak üretimi olmadı (Ohkawa ve Nishino, 1999).

Tan ve Gao (1999), ribavirin, jasmonik asitin metil esteri, brassinolid veya sodyum humat içeren besin ortamlarında *Fritillaria unibracteata* yavru soğanlarının kültüre alındığını bildirmişlerdir. Çalışmada özellikle 10 mg/l ribavirin maddesinin, soğancık oluşumunu önemli oranda artırdığı belirlenmiştir (Tan ve Gao, 1998).

Ohkawa ve ark., (1999), *Fritillaria camtschatcensis* soğan pul parçacıklarını kullanarak in vitro propagasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bitki büyüme düzenleyicisi içeren ve içermeyen MS ortamlarına, karanlık/ışık ve 15, 20 veya 25 °C inkübasyon sıcaklığı parametrelerini içeren inkübasyon koşullarını uygulamışlardır. Maksimum soğancık oluşumu 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l 24-epibrassinolid içeren MS ortamında, 20° C'de karanlık ortamda elde edilmiştir (Ohkawa ve ark., 1999).

Witomska ve Lukaszewska (2000) yaptıkları çalışmada *Fritillaria imperialis* L. bitkisinin farklı bitki kısımlarından aldıkları eksplantları kullanmışlardır. Soğan eksplantlarında %70- 90 oranında kontaminasyon gözlemlemişlerdir. Tüm eksplantları, 1 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, %3 süktroz, %0.7 agar içeren MS ortamında, 22° C sıcaklıktaki iklim odasında inkübe etmişlerdir. Karanlık ve ışık uygulamalarının etkisini araştırmışlardır. Sürgün gelişimi genel olarak aydınlık koşullarda daha hızlı olmakla birlikte, soğancık oluşturma oranı olarak karanlık inkübasyon daha verimli olmuştur (Witomska ve Lukaszewska, 2000).

Ohkawa ve Nishino (2000), *Fritillaria camtschatcensis* KR-Gawli'nin in vitro koşullarda çoğaltımını araştırmışlardır. %6 ve %1 süktroz içeren sıvı besin ortamında, yaprak eksplantından en iyi soğancık oluşumu elde edildi (Ohkawa ve Nishino, 2000).

Zaidi ve ark. (2000), soğanlı ve yumrulu bitkiler için yapılan in vitro araştırmaları derlemişlerdir. Verilen bilgilere göre; İstenen gelişim süreci (somatik embriyogenezis, organogenezis ve direkt organogenezis) için besin ortamı olarak çoğunlukla MS ortamı kullanılmıştır. Daha fazla kallus oluşturmak için BA ve kinetin, 2,4-D gibi büyüme regülatörleri ile farklı kombinasyonlar şeklinde kullanılmıştır. Ayrıca 2,4-D'nin daha çok kallus oluşturmada, düşük oksin yüksek sitokinin kombinasyonunun sürgün oluşturmada, yüksek oksin ve düşük sitokinin veya sadece oksinin ise köklendirmede kullanıldığını bildirmişlerdir (Zaidi ve ark., 2000).

Witomska ve ark. (2000) 8 hafta boyunca farklı sıcaklıklarda (4, 22, 30 ve 40 °C) saklanan *Fritillaria imperialis* L'nin soğanlarını kullanmıştır. Depolamadan sonra, ana soğan için en iyi saklama sıcaklığının 30 °C olduğunu ve inkübasyon sıcaklığının sürgün üretimi üzerinde önemli bir etkiye (15 ve 22 °C) sahip olduğunu gösterdi. MS ortamı, 0.5 ppm NAA ve 1 ppm BA ile birlikte hormonu içermektedir ya da hormonsuzdur ve 22 °C'de inkübe edilmiştir. Kullanılan MS ortamı bileşimleri ya hormonsuzdur ya da 0.5 ppm NAA ve 1 ppm BA ilavesiyle hazırlanarak ve 22 °C'de inkübe edilmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı MS+hormon içeren ortamda elde edilmiştir (Witomska ve ark., 1998).

2000 yılında Shiau ve ark., tıbbi önemi olan *Fritillaria* türlerinden embriyogenik kallus eldesi ve bundan da soğancık oluşumu konusunda çalışmışlardır. Besin ortamına ilave edilen farklı hormon içeriklerinin etkilerini araştırmışlar ve köklenme aşamasında 4 mg/l NAA kullanımının yüksek oranda etkili olduğunu belirtmişlerdir (Shiau ve ark., 2000).

Çin tıbbında önemli bir yeri bulunan ve “Bei-mu” adıyla kullanılan *F. Hupahesis* Hsiaoet C. Hsia türünün doku kültürü üzerinde çalışan Chen ve ark.(2000), bu bitkinin mikro soğancıklarının elde edilebilmesi için önceden pek çok aşamasının kendileri tarafından optimize edildiğini bildirmektedir. Bu eserde de ışıklandırma ve besin ortamı bileşiminin soğancıkların köklenmesi ve aklimatizasyon üzerindeki etkilerini araştırdıklarını belirtmektedir. Doğadan toplanan soğanların, 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 süktroz, 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 kumdan oluşan (2:1:1) karışıma aktarılması halinde büyütme dolaplarında bir ay sonra %90'lık bir yaşama oranı sergilediklerini gözlemlemişlerdir (Chen ve ark., 2000).

Witomska (2001), yaz dinlenme döneminden sonra alınan *Fritillaria imperialis* L. soğanlarından alınan pul yaprağı eksplantlarının kültüre alınmasından yüksek bir rejenerasyon oranı elde edilebildiğini ve bu sırada soğanlardaki ABA miktarlarının en düşük seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca toplam karbonhidrat içeriği veya içsel sitokin aktivitesi ile rejenerasyon oranı arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığını belirlemişlerdir (Witomska, 2001).

Paek ve Murthy (2002), MS ortamında *Fritillaria thunbergii* Miq soğanları kültüre alınmış ve çalışma sıcaklığı, ortam ve ışık uygulamalarının yapısı üzerinde çalışmışlardır. Bu araştırmada soğancık, kök ve yaprak yayılımı incelenmiştir. En yüksek sayıda soğancık oluşumu için, 162 mM NAA ve 4.65 uM Kinetin içeren MS besin ortamı kullanılmış, soğancıklar 1.62 µM NAA veya 4.65 µM Kinetin içeren MS ortamında (%13,7) kök oluşumu ve filizlenmede en iyi sonuçları vermiştir. Soğancık üretimi için en uygun büyüme odası şartları 8 saat karanlık ve 16 saat beyaz floresan ışığı ($40 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$) periyodunda, sıcaklık 25 °C'de olmuştur. 5 hafta sonra, soğancıkları besin ortamından alıp, 5 °C'de vermikülit, turba yosunu ve perlit karışımı (1: 1: 1) içeren kaplara nakletmişlerdir. Oluşan soğancık çapı (%100) 10 mm kadar çıkmıştır (Paek ve Murthy, 2002).

2004 yılında Karaoğlu tarafından yapılan bir çalışmada, in vitro çoğaltım için eksplant kaynağı olarak soğan pulları kullanılmış ve BA ve NAA içeren ortamda embriyo gelişmemiştir. Soğanlar, 2 veya 4 parçaya bölünerek eksplant olarak kullanılmıştır. Maksimum soğancık gelişimi, sırasıyla 6.67 ve 5.83 adetle 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA ve 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamlarında gerçekleşmiştir. Olgunlaşmamış embriyolarda ise en fazla soğancık 2.27 adetle 0.5 mg/l BA ve 4 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. 1.0 mg/l NAA ilave edilmiş MS ortamında soğancıklardan kök üretimi gerçekleştirilmiştir. Köklenme sonrasında, soğancıklar dış koşullara başarılı bir şekilde aktarılmıştır (Karaoğlu, 2004).

Guang-lai (2004), kallus oluşumunu teşvik etmek için *Fritillaria hupehensis* soğanlarını kullanmış ve MS ortamına aktarmıştır. Veriler 20 °C'de kallus üretiminde 2.0 mg/l NAA+1.0 mg/l 6-BA içeren MS besin ortamı en uygun koşul olduğunu göstermiştir (Guang-Lai, 2004).

Gao ve ark. (2004), büyüme düzenleyicisi varlığı ve tipi, sıcaklık ve ışık gibi bazı koşullardan etkilenen in vitro kültürde farklı *Fritillaria* türlerinden kallus ve sürgün üretti. Düşük sıcaklık ve aydınlatma sağlandığında kahverengileşmenin azaldığını gözlemlemişlerdir. *Fritillaria* genotipi kallus oluşumu için küçük bir etkiye sahiptir. Hormon tipleri, kallus ve sürgün indüksiyonu için farklı genotiplerde farklı etkilere sahiptir. Sonuçlar, kallus indüksiyonu için en uygun koşulun 0.5 mg/l NAA+2.0 mg/l 6-BA içeren MS ortamı olduğunu göstermiştir. 0.1 mg/l 2,4-D+1.0 mg/l 6-BA içeren MS ortamı ise sürgün rejenerasyonu için en etkili ortam olarak gözlemlenmiştir (Gao ve Liang, 2004).

Dilik (2006), Şemdinli lalesi (*F. imperialis*) ve Adıyaman lalesi (*F. persica*)'nin in vitro soğancık üretiminde çiçek saplarından elde edilen eksplantların kullanıldığı denemelerde besin ortamı olarak MS temel besin ortamı bileşiminin etkili olduğu gözlemlenmiştir. 1.0 mg/l BA ile birlikte 0.5 mg/l KNA veya NAA kullanımı, farklı oranlarda soğancık ve kallus oluşumunu sağlamıştır. Besin ortamına 500 mg/l Augmentin ilavesi, enfeksiyonu önleme bakımından düşük bir oranda etkili olmuş ve gelişmeyi engelleyici bir etki göstermiştir. Soğancık oluşumu oranı bakımından 'A – NAA İMP (Augmentin bulundurmayan NAA içeren *F.imperialis*)' ve 'A – NAA PER (Augmentin bulundurmayan NAA içeren *F. persica*)' uygulamaları, etkinliği yüksek olarak gözlemlenmiştir. %6 fruktoz veya %6 glukoz un karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamlar, %6 süktroz içeriğine göre daha etkili olmuş vesoğancık oluşum oranı ve eksplant başına oluşan soğancık sayısını arttırmıştır (Dilik, 2006).

Mohammadi-Dehcheshmeh ve ark. (2008), in vitro da direkt soğancık rejenerasyonu için eksplant olarak *Fritillaria imperialis* çiçek tomurcuğu petallerini kullanmıştır. Araştırmacılar, farklı konsantrasyonlarda oksin (0.6 mg/l NAA+0.4 mg/l IAA) ve sitokinin (0.1 veya 1 mg/l BA) içeren MS ortamını besin ortamı olarak kullanmış ve eksplant kaynağı olarak da farklı gelişim aşamalarından gelen, kapalı çiçek tomurcuğu-yeşil yaprak (nektar salgılanmazken) ve kapalı çiçek tomurcuğu- kırmızı yaprak (nektar salgısının başlangıcı) kullanmışlardır. Sonuçlar, düşük sitokinin (0.6 mg/l NAA+ 0.4 mg/l IAA+ 0.1 mg/BA) konsantrasyonunun yeşil- kapalı çiçekten alınan eksplantlarda erken aşamada daha fazla soğancık oluştuğunu göstermektedir. Direkt soğancık üretimi, yeşil-kapalı çiçekten alınan eksplantlardan daha başarılı olmuştur (Mohammadi-Dehcheshmeh ve ark., 2008).

Feng ve ark. (2009), 0.1, 2.0 ve 1.0 mg/l gibi farklı konsantrasyonlarda 2, 4-D, IAA ve BA hormonu içeren ER (Eriksson 1965) ortamında *Fritillaria ussuriensis*'in kök ucu kültürü üzerinde çalıştı. Sonuçlar 0.1 ve 1.0 mg/l IAA ve BA ilave edilmiş ER ortamının, somatik embriyo, kallus oluşumu için uygun indüksiyona sahip olduğunu ve eksplantasyondan 40 gün sonra gerçek bitkiye alışabildiğini gösterdi (Feng ve ark., 2009).

Wang ve ark. (2010), *Fritillaria cirrhosa* bitkisinin, bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiş MS ortamı üzerinde in vitro çoğaltımı için çalışmışlardır. Soğan rejenerasyonu için büyüme odasının optimum sıcaklığı 20 ± 2 °C olarak belirlenmiştir. Maksimum soğancık sayısı, 2.0 mg/l 6-BA + 0,2 mg/l NAA ve 10 mg/l ribavirinin içeren ortamda gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2010).

Subotic ve ark (2010) yaptıkları bir çalışmada, *Fritillaria meleagris* yaprak tabanı kültüründen direkt somatik embriyo üretmek için 0-10.0 mg/l konsantrasyonlarında Kinetin veya 2,4-D ilave edilmiş MS ortamını kullanmışlardır. En iyi sonuçlar, 0.1 mg/l 2,4-D içeren ortamda kaydedilmiştir. Somatik embriyogenez (kallus formasyonu olmadan) 0.1 veya 0.5 mg/l kinetin içeren MS ortamında gerçekleşebilmektedir (Subotic ve ark., 2010).

Gürlek (2011), *Fritillaria imperialis* ve *Fritillaria persica* bitkilerinin in vitro çoğaltımı için farklı konsantrasyonlarda oksin ve sitokinin içeren MS ortamında kültüre almıştır. Bu çalışma *Fritillaria* türlerinin rejenerasyona ve aklimatizasyona uygun olduğunu göstermiştir. Yaprak sapları, 0.5 mg/l TDZ ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. İlk ekimden 14 ay sonra eksplant başına soğancık miktarı *Fritillaria imperialis* bitkisinde daha yüksek olmuştur. Bu parametre *Fritillaria imperialis*'te ortalama 30.85 ve *Fritillaria persica* bitkisinde ise ortalama 7.22 olarak ölçülmüştür. *Fritillaria persica* bitkisinde eksplant başına soğancık miktarı en yüksek 12.62 olarak, 2.0 mg/l kinetin içeren MS ortamında kaydedilmiştir. Karanlık ortamda toplam 23.70 soğancık elde edilmiş, farklı hormon konsantrasyonları eklendiğinde ölçülen bu değer değişmiştir. Aklimatizasyon aşaması için, oluşturulan soğancıklar farklı konsantrasyonlarda NaCl, KCl ve CaCl₂ ile muamele edilmiş ve seraya aktararak 15 gün boyunca izlenmiştir. Sonuç olarak, 10 g/l NaCl uygulamasının iklimlendirme için daha uygun olduğu bildirilmiştir (Gürlek, 2011).

Marija ve ark. (2011), *Fritillaria meleagris* L.'den zigotik embriyo izole etmiş ve %0.7 agar, %3 süktroz, 250 mg/l L-prolin, 250 mg/l kazein hidrolizat, 80 mg/l adenin sülfat ve 1.0 mg/l 2,4-D veya thidiazuron (TDZ) içeren ortamda 4 hafta sonra tüm zigotik embriyolarda, embriyogenez için kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Embriyonik kallus yüzeyi, soğancık ve sürgün oluşumunun ilk aşamasında üretilen somatik embriyolar, soğanın pul kısmında üretildi ve 0,05 ila 2,0 mg/l TDZ ve 0.1 ila 10,0 mg/l 2,4-D'yi içeren aynı ortamda kültüre alınmış ve soğan pullarından soğancık ve somatik embriyolar üretilmiştir (Marija ve ark., 2011).

Kızıl ve ark. (2013)'da *Fritillaria imperialis* ve *Fritillaria persica* üzerine çalışmıştır. Bu çalışmada sürgün ucu, alt ve orta kısmı eksplant olarak kullanıldı. Karanlık koşullarda, 4°C sıcaklıkta tohum çimlenmesi gözlemlenmiştir. Her iki tür de BA ve NAA ilave edilmiş MS ortamında rejenere edilmiştir. Her iki bitkinin yaprak kısmından kallus

elde edilmiştir. 1.0 mg/l BA–0.1 mg/l NAA içeren ortamda kültüre alınan yaprak alt bölümünden soğancık elde edilmiştir (Kızıl ve ark., 2008).

Kızıl ve Khawar (2013), 0.5-2.5 mg/l GA3 ve farklı sükroz (10, 20, 30, 40, 50 g/l) kombinasyonları ilave edilmiş MS ortamında *Fritillaria imperialis* tohumlarını çimlendirmişlerdir. Bu çalışma, 20 g/l sükroz içeren MS ortamında tohum büyümesini göstermiştir. Sükroz (10, 30, 40 g/l) içeren MS ortamında %100 oranında kök oluşumu gerçekleşmiştir. 20 ve 30 g/l sükroz ve 0.5-2.5 mg/l GA3 içeren MS ortamlarında soğancık oluşumu gözlemlenmiştir. Soğancıklar 30 g/l sükroz ve 2.5 mg/l GA3 içeren MS ortamında köklendirilmiştir (Kızıl ve ark., 2013).

Rahimi ve ark. (2013), *Fritillaria imperialis* bitkisinden in vitro koşullarda indirekt organogenezis ve kallus oluşumu için soğan eksplantlarını kullanmışlardır. Araştırmacılar, Rastgele blok tasarımı için 3 tekrar ve 12 yöntem uygulamışlardır. Ayrıca bitkinin farklı kısımlarını ve farklı ortamları kullanmışlardır. Petal, soğan pulu ve yaprak primordiyumu olmak üzere üç eksplant tipi kullanmışlardır. MS ortamına 0.5, 1.0 mg/l NAA ve 0.5, 1.0 mg/l IBA ilave etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, 1.0 mg/l NAA içeren ortamda 6 hafta sonunda maksimum kallus oluşumu gerçekleştiğini ve 2.1 g ağırlığında soğan oluştuğunu göstermiştir. 0.5 veya 1.0 mg/l IBA içeren ortamlardan elde edilen kallus sarımsı renkte oluşmuştur. Eksplant başına oluşan maksimum soğancık sayısı, 1.0 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IAA içeren ortamda 6 hafta sonra 3,24 olarak ölçülmüştür (Rahimi ve ark., 2013).

Petric ve ark. (2014), *Fritillaria meleagris*'in soğan pullarını eksplant olarak kullanarak, 1.0 mg/l TDZ içeren besin ortamında in vitro çoğalttıklarını bildirmişlerdir. Eksplantlar ilk 6 hafta standart sıcaklıkta (24 °C), düşük sıcaklıkta (4 °C) veya düşük sükroz konsantrasyonunda (%4,5) tutulmuştur. Sonuçlar, 24 °C'de bekletilen tüm soğancıkların 2,4-D, Kinetin veya TDZ hormonlarının 1.0 mg/l konsantrasyonlarda bulunduğu ortamda geliştiğini göstermiştir (Petric ve ark., 2014).

Rahimi ve ark. (2014), in vitro *Fritillaria imperialis* ile çalışmış ve rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. En yüksek sürgün sayısı 0.5 mg/l TDZ ve 30 g/l sükroz içeren MS ortamına aktarılan soğan pullarından elde edilmiştir. En fazla kök oluşum oranı, 0.2 mg/l NAA ve 30 g/l sükroz içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Soğan çapı, in vitro aşamada en yükseğe ulaşmıştır. Bitkilerin büyük bir kısmı, sera koşullarında başarılı bir şekilde iklimlendirilmiştir (Rahimi ve ark., 2014).

Chamani ve ark. (2014)'nın yaptığı araştırmanın amacı, kallustan protoplast izolasyonu ve *Fritillaria imperialis* L.'nin protoplasttan rejenerasyonuydu. Sonuç olarak daha canlı protoplast üreten 0.4 g kallus elde edilmiş ve protoplast sayısı $1,12 \times 10^5$ protoplast/g FW olarak ölçülmüştür. *Fritillaria imperialis*'te protoplast izolasyonu için en yüksek etki %9 mannitol içeren %2 selüloz ve %0.1 pektinaz'lı ortamda 8 saat sonra gözlemlenmiştir. Protoplast bölünmesi ve yüksek koloni yüzdesi için 2,4-D ve BA kullanılmıştır. Veriler sıvı ortamın hücre duvarı ve koloni oluşumu için yarı katı ortamdan daha iyi olduğunu ortaya koymuştur. En yüksek kallus oluşumu, 0.5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BA ve 200 mg/l kazein hidrolizat ile desteklenmiş ortamda en yüksek çoğalma verimliliğine sahip olarak gözlemlenmiştir (g FW başına 1.26×10^6). Bir ay sonra mikro kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Kallusdan rejenera edilen bitkilerin çoğu, yeni ortama transfer edildi ve en fazla sayıda bitki rejenerasyonu (%100), 0.5 mg/l NAA, 1.5 mg/l BA ile takviye edilmiş ortamda meydana geldi (Chamani ve Tahami, 2014).

Kızıl ve Khawar (2014), tohum dormansisinin nasıl kıldığını ve *Fritillaria persica* L.'nin in vitro kültüre alınıp, tohumdan rejenerasyonunu kaydetti. Tohum dormansisini kırmak için BA ve IBA içeren ve IBA içermeyen MS ortamına tohumları eksplante etmişlerdir. İnkübasyon koşulları 4 °C ve karanlıktır. Tohum dormansisinin kırılmasının en yüksek frekansı (80.00 ± 0.14), 2.0 mg/l BA ve 1.0 mg/l IBA içeren MS ortamında kaydedilmiştir. 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l IBA içeren ortamda maksimum soğancık sayısı (40.0 ± 0.71) elde edilmiştir. Ayrıca, tohumlar 4 °C ve 10 °C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Sonuçlar, 4 °C'de 30 gün inkübe edilen soğancıkların 50 mg/l süktroz içeren MS ortamında 4 °C'de 30 gün inkübasyon periyodundan sonra maksimum etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen *Fritillaria* soğanlarının köklendirilmesi için 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamı kullanılmıştır (Kızıl ve Khawar, 2014).

Wang ve ark. (2014), *Fritillaria cirrhosa*'nın fide yapraklarını kültüre almış ve NAA, 6-BA, 2, 4-D ve Kinetin gibi farklı büyüme düzenleyicileri kullanılarak in vitroda çoğaltmışlardır. NAA (1.0 mg/l) + BA (2.0 mg/l) + KIN (1.0 mg/l) ile takviye edilmiş ortamlar, kültüre alınan fide yaprakları üzerinde farklı etkiler göstermişlerdir. %83.37 oranda soğan üretimi gerçekleşmiş ve soğandan alkaloid üretim indüksiyonu %0.389 olarak belirlenmiştir (Wang ve ark., 2014).

Kulkhanova ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada *Fritillaria sonnikova*'yı kullanmışlardır. Bu çalışmada soğan pulları in vitro rejenerasyon için ana eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Araştırmanın amacı, BA (5µM) ve NAA (2µM) gibi büyüme

düzenleyicileri ile desteklenmiş ve hormonsuz içermeyen besin ortamı üzerinde sürgün oluşumunu gerçekleştirmekti. Sonuçlar, eksplant başına rejenere sürgün sayılarının hormon içerikleriyle çok fazla değişmediğini göstermektedir (Kulkhanova ve ark., 2015).

Petric ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *Fritillaria meleagris*'in soğan pullarını, düşük sükröz içeren (%4.5) ortamda 30 gün süreyle 4 °C'de yetiştirmiştir. Bu ön-muameleden sonra, soğan pulları, 2,4-D ve kinetin (KIN) veya TDZ'nin farklı konsantrasyonlarını içeren besin ortamı üzerinde kültüre alındı. Bulgular, soğancık oluşumu ve somatik embriyogenezin en yüksek frekansının 1.0 mg/l 2,4-D ve KIN ile desteklenmiş ortamda elde edildiğini ve morfogenezin ise 0.5 ve 1.0 mg/l TDZ içeren ortamda daha fazla olduğunu göstermektedir (Petrić ve ark., 2015).

Fritillaria türlerinde yapılan doku kültürü çalışmaları dünya genelinde iki temel bölümde ilerlemektedir. Büyük 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 morfogenezisi 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 belli oranlarda soğancık ve kallus oluşumu sağlanabilmiştir (Dilik, 2006).

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 ülkemizde 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.

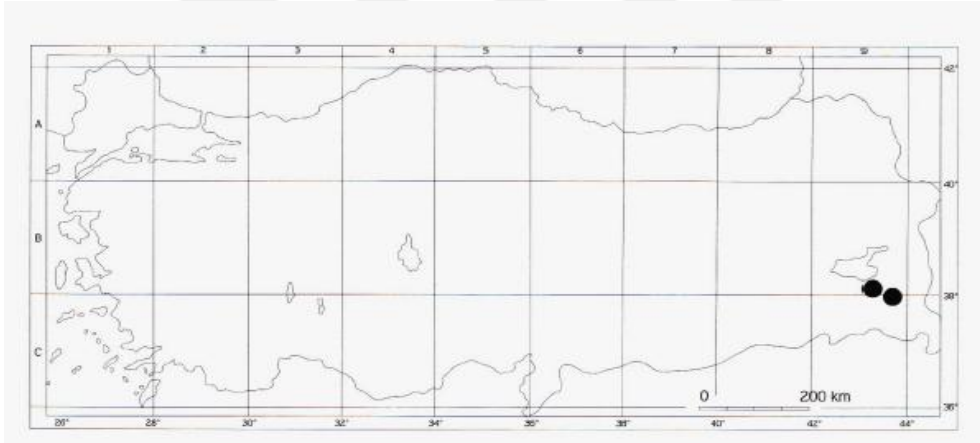
3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma 2014-2017 yılları arasında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölüm'üne ait Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Araştırmada bitkisel materyal olarak yurdumuza endemik ve dar yayılışlı bir tür olan *Fritillaria minima* Rix kullanılmıştır. Bu türe ait bitki materyalleri, 2015 yılı Mayıs-Haziran aylarında Van ilimizde Gevaş'ın üstündeki Artos (Çadır) Dağı'ndan toplanmıştır.



Şekil 3.1. *Fritillaria minima* Rix bitkisinin toplandığı lokaliteler



Şekil 3.2. Deney materyali olarak kullanılan *Fritillaria minima* bitkilerinin doğal ortamlarındaki görünüşleri

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 ($30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 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.



Şekil 3.3. Açmamış çiçek taşıyan *Fritillaria minima* bitkilerinin musluk suyu altında yıkandıktan sonraki görüntüsü

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

3.1.2. Kimyasal Maddeler

1. Etanol,
2. Murashige and Skoog Basal Medium (MS) ,
3. Sükroz,
4. Plant Agar,
5. α 6-Benzil amino pürin (BA),
6. 1-Naftalen asetik asit (NAA),
7. indol 3 asetik asit,
8. Sodyum hipoklorit (NaClO),
9. Hidrojen klorür,
10. Sodyum hidroksit,
11. Perlit

3.1.3. Sarf Malzemeler

Çalışmamızda sarf malzeme olarak; petri kapları, magenta kapları, otoklavlanabilir cam şişeler, piset, mezür, pens, bistüri, fayans, kurutma kağıdı, alüminyum folyo, streç film, beher, mikropipet uçları, eldiven kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Eksplantların Hazırlanması

3.2.1.1. Soğanlardan Eksplant hazırlanması ve Yüzey Sterilizasyonu

Soğan eksplantları doğal ortamlarından toplanan bitkilerin çapları 0,6 ile 1,2 cm arasında değişen soğanlarından elde edildi. Bitkilerden alınan soğanlar 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.

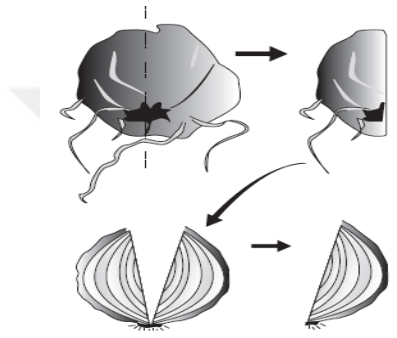


Şekil 3.4. Musluk suyu altında yıkanarak yüzey sterilizasyonu işlemine hazırlanan *Fritillaria minima* soğanları

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 sonucunda tüm soğan eksplantları için şu protokol kullanıldı;

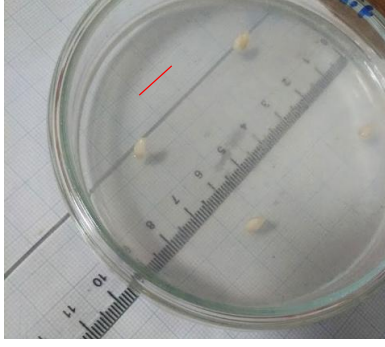
- 1) Soğanlar 4 saat süreyle musluk suyu altında yıkanarak dış kabuğundan ve köklerinden arındırıldı
- 2) Bu soğanlar, %70 etanolde 1 dakika tutuldu
- 3) Sonra birkaç damla Twenn 20 damlatılmış %30 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 30 dakika bekletildi
- 4) Son olarak 4 defa 5'er dakika duble distile su (ddH₂O)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

Yüzey sterilizasyon işleminden sonra soğanlar Laminar flow kabin içinde aşağıdaki şekilde verildiği gibi steril bisturi ve pensler yardımıyla dört parçaya bölündü.



Şekil 3.5. *Fritillaria minima* Rix'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 9 petri (90 x 15 mm) hazırlandı ve 24 eksplant gelişmeye bırakıldı. Farklı sükroz ve bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren 7 farklı besin ortamı hazırlandı. Eksplantlar besi ortamlarına ekildikten sonra petrilerin kapakları kapatıldı. Streç film ile tamamen sarılan petriler 20±1 °C'de 16 saat beyaz floresan ışık (30 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) ve 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanarak kültüre alındı.



Şekil 3.6. *Fritillaria minima* bitkisinin soğan eksplantlarının kültürü(Bar= 1cm)

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 parametre ölçüldü.

3.2.1.2. Çiçeklerin taç yapraklarından eksplant elde edilmesi ve kültüre alınması

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

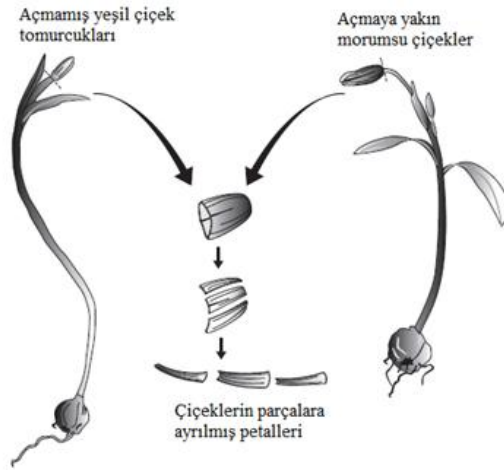


Şekil 3.7. Çiçek taç yaprağı eksplantlarının elde edildiği *Fritillaria minima* bitkileri



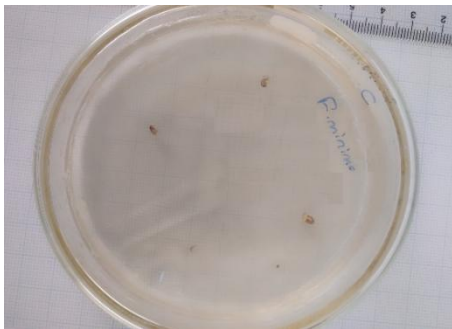
Şekil 3.8. Musluk suyu altında yıkanarak yüzey sterilizasyonuna hazırlanan *Fritillaria minima* çiçekleri

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 (ddH_2O) 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-sarı renkteki petalleri aşağıdaki şekilde verildiği gibi kesilerek steril bir pens çifti yardımıyla besi ortamlarına alındı.



Şekil 3.9. *Fritillaria minima* Rix bitkisinin açmamış yeşil çiçeklerinin ve açmaya yakın sarı-yeşil renkteki çiçeklerinin petallerinden elde edilen eksplantlar

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 7 farklı besi ortamı, çiçek eksplantlarının kültüründe de kullanıldı. Her bir besi ortamı protokolü için 9 petri (90 x 15 mm) hazırlandı ve 24 eksplant gelişmeye bırakıldı. Eksplantlar besi ortamlarına ekildikten sonra petrilerin kapakları kapatıldı. Streç film ile tamamen sarılan petriler 20 ± 1 °C’de sürekli ışık altında ışık ($30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) gelişmeye bırakıldı.



Şekil 3.10. Kültüre alınan çiçek eksplantları

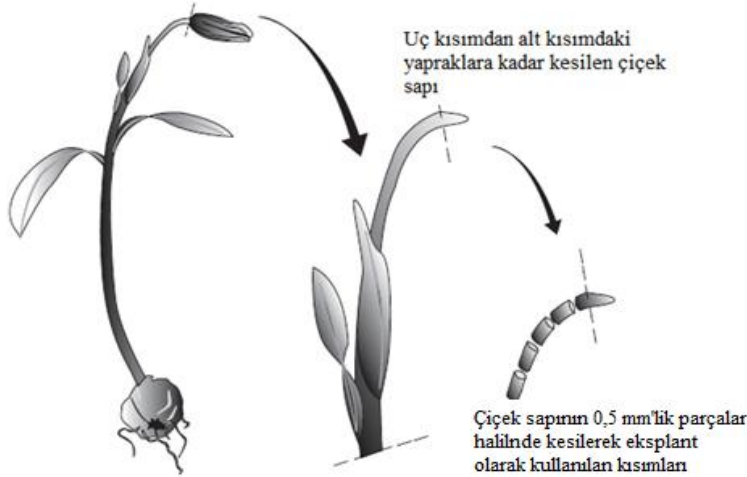
30 gün boyunca gelişimleri izlenen çiçek eksplantları, bu sürenin sonunda ilk kültüre alındıkları besi ortamının aynısını içeren petrilere aktarıldı. Aktarılma işlemi flow kabin

içinde yapıldı. Petrilerdeki besi ortamlarını yenileme ve eksplantları aktarma işlemleri her 30 günde bir tekrarlandı. Bu süre içinde eksplant gelişimi devamlı olarak izlendi.

3.2.1.3. 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 flow 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.

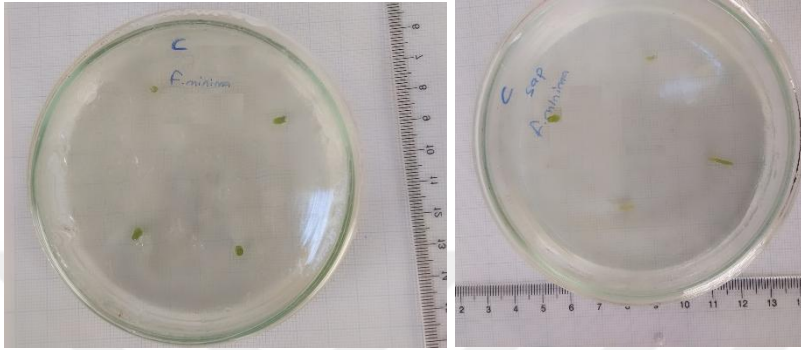


Şekil 3.11. *Fritillaria minima* Rix bitkisinin çiçek saplarından eksplant elde edilmesi

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 9 petri (90 x 15 mm) ve 9 x 4 = 36 eksplant hazırlandı. Streç film ile tamamen sarılan petriler 20 ± 1 °C’de sürekli ışık altında ışık ($30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 30 gün süreyle gelişmeye bırakıldı.



Şekil 3.12. Kültüre alınan çiçek sapı eksplantları

30 gün boyunca gelişimleri izlenen çiçek 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.

3.2.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stoklarının Hazırlanması

Bitki büyüme düzenleyicilerinden sentetik olarak kullanılan oksinlerden indol 3-asetik asit (IAA) ve 1-naftalen asetik asit (NAA), sitokininlerden 6-benzilaminopürin (BA) kullanılmıştır. Bu bitki büyüme düzenleyicileri stok solüsyon halinde hazırlanarak kullanılmışlardır. Stok solüsyon hazırlanırken 1 mg/ml olacak şekilde bu bitki büyüme düzenleyicilerinin çözücüler ve saf su ile hazırlanmıştır. BA’nın ve NAA’nın çözücüsü NaOH, IAA’nın ise etanoldür. Hazırlanan stoklar, solüsyon miktarı genellikle 5 ml ya da 10 ml olarak hazırlanmıştır.

3.2.3. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Kullanılan bütün eksplantlar, Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında kültüre alınmışlardır. Hazır MS temel besi ortamının (Murashige and Skoog 1962) yanı sıra, karbon kaynağı olarak sükroz ve ortam yarı katılaştırıcı olarak plant agar (%0.7) kullanılmıştır. Ortamın pH'sı otoklavlamadan önce 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5.75 – 5.80 olarak ayarlanmıştır ve bu ayarlardan sonra ortama agar ilave edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri besi ortamına otoklavlamadan önce ilave edilmiştir. Çalışmada *Fritillaria minima* Rix'nin farklı eksplantları kültüre alınmıştır. Farklı konsantrasyonlarda sükroz ve bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamların, kültüre alınan eksplantlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Tablo 3.1'de verilen farklı konsantrasyonlarda sükroz, IAA, NAA ve BA içeren MS besi ortamları mikroçoğaltım için teşvik ortamı olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Sükroz (%), BA, IAA, NAA (mg/l) içeren kallus teşvik ortamları

Ortam No	Sükroz (%)	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)
1	-	-	-	-
2	3	-	-	-
3	3	1	0.6	0.4
4	3	0.1	0.6	0.4
5	6	-	-	-
6	6	1	0.6	0.4
7	6	0.1	0.6	0.4

3.2.4. Köklendirme İşlemi

Magentalardaki yaklaşık 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda indirekt 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 (Chen ve ark., 2000) 1/2 MS (Murashige and Skoog) + 0.6 g/l agar + %3 sükroz + 5 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 indirekt 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 ± 1 °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.

3.2.5. Dış koşullara aktarma

Köklendirme ortamındaki 60 günlük sürenin sonunda sürgün ve kök oluşturmuş bitkicikler içinde eşit miktarlarda (175 g) torf bulunan 350 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 ± 1 °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.

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel yorumu IBM SPSS Statistics 21.0 paket programında “ki- kare testi” yapılarak yorumlandı.

4. BULGULAR

4.1. Soğan Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular

İlk bir ay boyunca, besi ortamındaki *F. minima* Rix bitkisinin soğan eksplantlarında meydana gelen değişimler gözlemlenmiş ve 10 günde bir kayıt altına alınmıştır. Kaydedilen parametreler; enfekte olan ve olmayan eksplantların sayısı, canlı kalan eksplantların sayısı, üzerinde kallus oluşumu veya soğancık oluşumu görülen eksplantların sayısı olmak üzere sınıflandırılmıştır. Gözlemlerden elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 4.1, Tablo 4.2). Gelişmeyen eksplantlar, kararan veya koyu kahverengi renk alarak büzüşen eksplantları ifade etmektedir.

Tablo 4.1. İlk 30 günde enfeksiyon görülen soğan eksplantları

Ortam içeriği				Enfekte olan eksplantlar					
Sükroz (%)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BA (mg/l)	10.gün		20.gün		30.gün	
				Eksplant	(%)	Eksplant	(%)	Eksplant	(%)
-	-	-	-	2	5.55	3	8.33	3	8.33
3	-	-	-	1	2.77	2	5.55	2	5.55
3	0.6	0.4	1	1	2.77	1	2.77	1	2.77
3	0.6	0.4	0.2	0	0	1	2.77	1	2.77
6	-	-	-	2	5.55	3	8.33	3	8.33
6	0.6	0.4	1	1	2.77	1	2.77	2	5.55
6	0.6	0.4	0.1	2	5.55	2	5.55	3	8.33

İlk bir ayda soğan eksplantlarını incelediğimizde enfeksiyon oranının %2.77 ile %8.33 arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu bir aylık sürenin sonunda tüm besi ortamlarındaki eksplantlarda ortalama %5.95 oranında enfeksiyon görülmüştür. Ayrıca bu bir aylık sürenin sonunda soğan eksplantlarının %3.57'sinde enfeksiyon görülmediği halde gelişme olmamıştır. Bu parametre tüm eksplantlar (252) için incelendiğinde enfeksiyon görülen ve gelişme göstermeyen eksplantların oranı %7.93 olarak gözlemlenmiştir. İlk bir aylık gözlem süresinin sonunda %92.07 oranındaki canlı eksplantlar içinde, kallus oluşumu görülen eksplant oranı %25.43 soğancık oluşumu görülen eksplant oranı %9.05 olarak ölçülmüştür.

Tablo 4.2. İlk 30 günde soğan eksplantlarındaki gelişmeyen ve canlı kalan eksplantlar

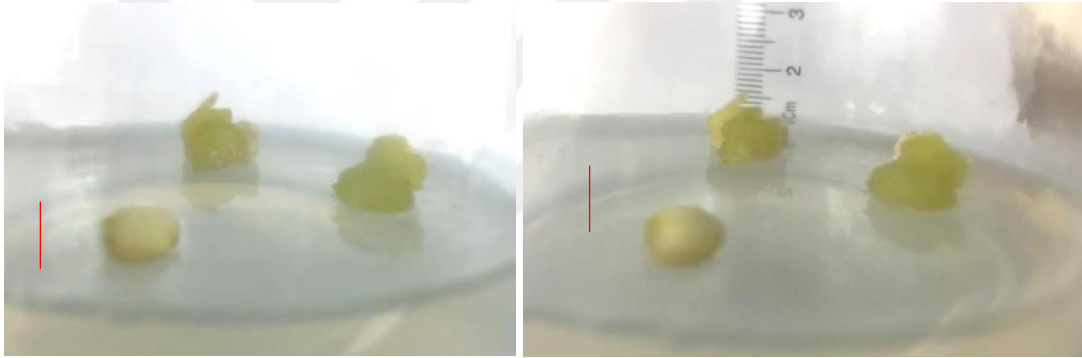
Ortam içeriği				Gelişmeyen eksplantlar (Enfekte + gelişmeyen)						Canlı kalan eksplantlar					
Sükroz (%)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BA (mg/l)	10.gün		20.gün		30.gün		10.gün		20.gün		30.gün	
				Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
-	-	-	-	2	5.55	5	13.88	5	13.88	34	94.44	31	86.11	31	86.11
3	-	-	-	1	2.77	3	8.33	3	8.33	35	97.22	33	91.66	33	91.66
3	0.6	0.4	1	1	2.77	1	2.77	1	2.77	35	97.22	35	95.83	35	97.22
3	0.6	0.4	0.1	0	0	1	2.77	2	5.55	36	100	35	97.22	34	94.44
6	-	-	-	2	5.55	4	11.08	4	11.11	34	94.44	32	88.88	32	88.88
6	0.6	0.4	1	1	2.77	1	2.77	1	2.77	35	97.22	35	97.22	35	97.22
6	0.6	0.4	0.1	2	5.55	3	8.33	4	11.11	34	94.44	33	91.66	32	88.88

Tablo 4.3. İlk 30 günde soğan eksplantlarında görülen kallus ve soğancık oluşumu

Ortam içeriği				Kallus oluşumu başlayan eksplantlar (Canlı eksplantlar içinde)						Soğancık oluşumu görülen eksplantlar (Canlı eksplantlar içinde)					
Sükroz (%)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	BA (mg/l)	10.gün		20.gün		30.gün		10.gün		20.gün		30.gün	
				Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
-	-	-	-	0	0.00	2	6.45	3	9.67	0	0.00	0	0.00	0	0
3	-	-	-	0	0.00	4	12.12	8	24.24	0	0.00	0	0.00	2	6.06
3	0.6	0.4	1	4	11.42	8	22.86	18	51.42	0	0.00	2	5.71	4	11.42
3	0.6	0.4	0.1	3	8.33	5	14.28	10	29.41	0	0.00	4	11.42	8	23.52
6	-	-	-	0	0.00	3	9.37	4	12.5	0	0.00	0	0.00	1	3.12
6	0.6	0.4	1	3	8.33	5	14.28	10	28.57	0	0.00	0	0.00	2	5.71
6	0.6	0.4	0.1	2	5.88	4	12.12	6	18.75	0	0.00	0	0.00	4	12.5

Kullanılan besi ortamının niteliği ve zaman değişkenleri, kallus ve soğancık oluşumunda önemli farklılıklar ortaya çıkarmıştır. Örneğin ilk 10 günde, sükroz ve bitki büyüme maddesi içermeyen besin ortamında; kallus ve soğancık oluşumu gerçekleşmemiştir. Bu ortamda, kallus oluşumu görülen eksplant oranı 20. ve 30. günlerde sırasıyla %6.45 ve %9.67 olarak ölçülmüştür ve soğancık oluşumu her iki zaman diliminde de gerçekleşmemiştir.

%6 sükroz içeren ve bitki büyüme maddesi içermeyen ortamda, ilk bir ayda alınan ölçümlere göre 10., 20. ve 30. günlerde canlı kalan eksplantlar içinde kallus oluşumu görülenlerin oranı sırasıyla %0.00, %9.37, %12.5; soğancık oluşumu görülenlerin oranı sırasıyla %0.00, %0.00 ve %3.12 olarak ölçülmüştür. Bu periyotlarda, %3 sükroz içeren ve bitki büyüme maddesi içermeyen ortamda kallus oluşumu sırasıyla %0.00, %12.12, %24.24 ve soğancık oluşumu sırasıyla %0.00, %0.00, %6.06 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.1. İlk 30 günlük periyotta soğan eksplantlarında gözlemlenen kallus oluşumu (Bar = 1cm)

İlk bir aylık periyotta, %6 sükroz ve yüksek oranda sitokinin içeren (1mg/l BA + 0.6 mg/l NAA+ 0.4 mg/l IAA) ortamda 10., 20., ve 30. günlerde canlı kalan eksplantlar içinde kallus oluşumu görülenlerin oranı sırasıyla %8.33, %14.28, %28.57; soğancık oluşumu görülenlerin oranı %0.00, %0.00 ve %5.71 olarak ölçülmüştür. Bu periyotlarda, %3 sükroz içeren ve yüksek oranda sitokinin içeren ortamda kallus oluşumu sırasıyla %11.42, %22.86, %51.42 ve soğancık oluşumu sırasıyla %0.00, %5.71, %11.42 olarak ölçülmüştür.

İlk bir aylık periyotta, %6 sükroz ve düşük oranda sitokinin içeren (0.1 mg/l BA + 0.6 mg/l NAA+ 0.4 mg/l IAA) ortamda 10., 20. ve 30. günlerde canlı kalan eksplantlar içinde kallus oluşumu görülenleri oranı sırasıyla %5.88, %12.12, %18.75; soğancık

Tablo 4.4. Magentalara Aktarılan Eksplantlarda Görülen Enfeksiyon Miktarları ve Canlı Kalan Eksplantlar

Ortam İçeriği	Enfekte Olan Eksplant						Canlı Kalan Eksplant					
	60. gün		90. gün		120. gün		60. gün		90. gün		120. gün	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar	1	3.22	0	0.00	0	0.00	29	93.54	18	58.06	13	41.93
%3 süzkroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	0	0.00	1	3.03	0	0.00	33	100.00	32	96.96	32	96.96
%3 süzkroz içeren Yüksek sitokininli ortam	0	0.00	0	0.00	0	0.00	35	100.00	35	100.00	35	100.00
%3 süzkroz içeren Düşük sitokininli ortam	0	0.00	0	0.00	0	0.00	34	100.00	34	100.00	34	100.00
%6 süzkroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	0	00.00	0	0.00	0	0.00	32	100.00	31	96.87	30	93.75
%6 süzkroz içeren Yüksek sitokininli ortam	0	0.00	0	0.00	0	0.00	35	100.00	35	100.00	35	100.00
%6 süzkroz içeren Düşük sitokininli ortam	0	0.00	0	0.00	0	0.00	32	100.00	32	100.00	32	100.00

oluşumu görülenlerin oranı %0.00, %0.00 ve %9.37 olarak ölçülmüştür. Bu periyotlarda, %3 sükroz içeren ve düşük oranda sitokin içeren ortamda kallus oluşumu sırasıyla %8.33 %14.28, %29.41 ve soğancık oluşumu sırasıyla %0.00, %5.71 , %23.52 olarak ölçülmüştür.

Tablo 4.5. Sükroz konsantrasyonlarının ilk 30 günde soğan eksplantlarının canlı kalma oranına etkisi

	Değer	df	Anlamlılık
Pearson ki kare	61,961	2	,000
Olasılık oranı	54,626	2	,000
Doğrusal bağlantı	37,357	1	,000

Sükroz içermeyen, %3 sükroz ve %6 sükroz içeren ortamların ilk 30 günde canlı kalma oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,01$). Bu 30 günlük kültür süresinin sonunda, petrilerdeki canlı kalan soğan eksplantları (kararma 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 90 gün boyunca magentalardaki eksplantların gelişimi gözlemlenmiştir. Bu 90 günlük periyotta, her 30 günde bir ölçümler yapılmıştır. Gözlemlenen parametreler ve elde edilen veriler tablolar oluşturularak verilmiştir.

Tablo 4.6. Sükroz konsantrasyonlarının soğan eksplantlarında kallus oluşumu üzerine etkisi

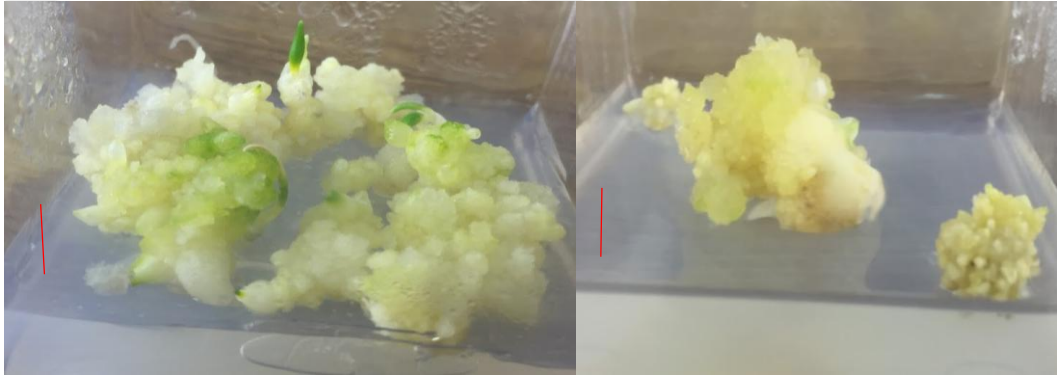
	Değer	df	Anlamlılık
Pearson ki kare	158,614	6	,000
Olasılık oranı	19,659	6	,003

Kallus oluşumu açısından kullanılan sükroz miktarları arasında bir farkın olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan Khi-kare testinde %99 ($p < 0,01$) güven sınırları içinde aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Bu da ilk 30 günde besiyeri içerisinde değişen sükroz konsantrasyonlarının kallus oluşumunu önemli derecede etkilediği anlamına gelmektedir.

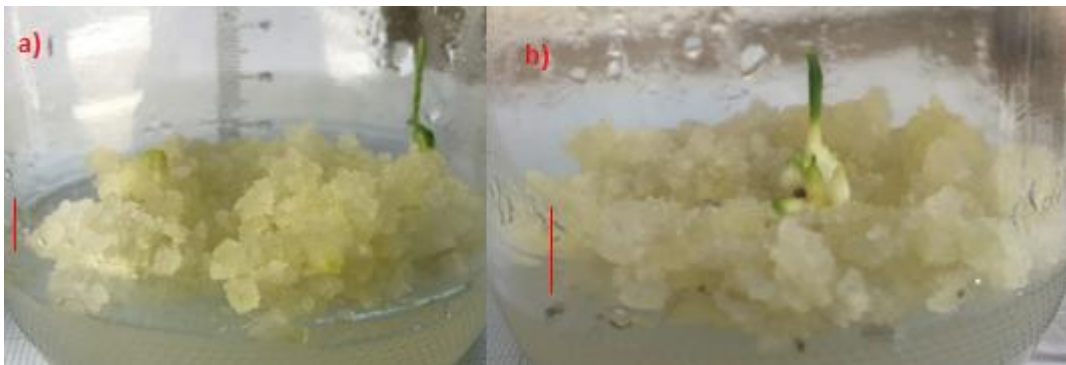
Magentalardaki 90 günlük kültür süresine, eksplantların ilk kültüre alındıkları 30 günlük süre de eklendiği için ölçüm yapılan aralıklar tablolarda 60. gün, 90. gün ve 120. gün şeklinde belirtilmiştir. Bu şekilde, eksplantların ilk besin ortamlarına aktarıldıkları günden itibaren gösterdikleri gelişmeler daha sağlıklı bir şekilde izlenebilmiştir. Bu tablolardaki her besin ortamı için verilen toplam eksplant sayısı, ilk kültüre alınan 36

eksplantın petrilerdeki 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. 4'te MS + %0.6 agar besi ortamı için verilen toplam eksplant, bu besi ortamının Tablo 4. 3'te verilen 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda canlı kalan 31 eksplanttır.

Magentalardaki soğan eksplantlarında enfeksiyon çoğunlukla ya hiç görülmemiş ya da çok düşük oranda ortaya çıkmıştır. İlk 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda canlı kalan toplam 232 eksplantta 120. günün sonunda sadece %0.86'sında enfeksiyon gelişmiştir. Bu bulaşma da, muhtemelen magentalardaki eksplantların yeni hazırlanan ortama aktarılmaları sırasında gerçekleşmiştir.



Şekil 4.2. 60 günde *Fritillaria minima* soğan eksplantlarında kallus gelişimi ve farklılaşması (Bar= 1cm)

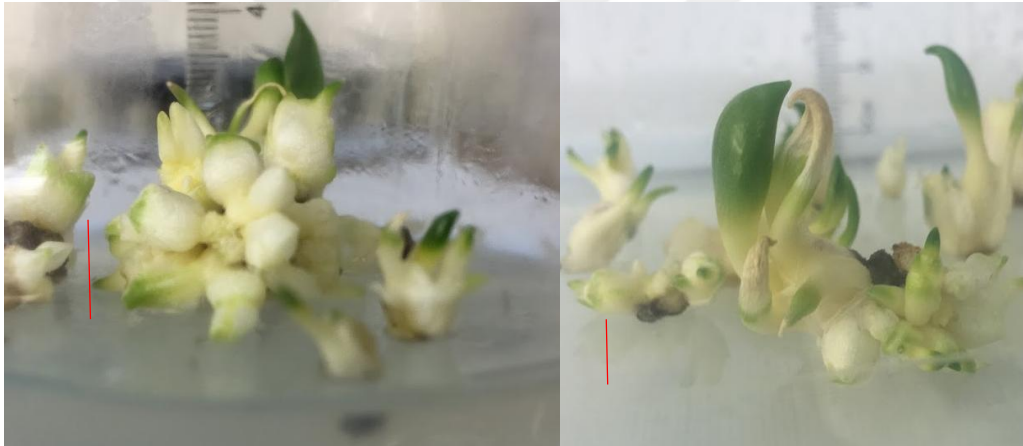


Şekil 4.3. 60 günlük periyotta soğan eksplantlarından elde edilen kallusların farklılaşması; a) İndirekt sürgün oluşumu b) İndirekt soğancık oluşumu (Bar= 1 cm)

Eksplantların magentalardaki besin ortamlarına aktarılmalarından itibaren (petrilerdeki 30. günden itibaren) 90 günlük inkübasyon süresi boyunca, besi ortamının

içeriğine göre, soğan eksplantlarının gelişme oranında ve niteliğinde önemli farklılıklar oluşmuştur. Örneğin sükroz ve bitki büyüme maddesi içermeyen besi ortamında magentalardaki 90 günlük inkübasyon sonunda toplam 31 eksplantın %41.93'ü canlı kalabilmiştir. Canlı kalan bu eksplantların %37.93'ünde sadece kallus gelişimi görülmüş, direkt veya indirekt organogenezis ile soğancık, sürgün veya kök oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 4. 7). Gelişmeyen eksplantlar, kararar veya koyu kahverengi renk alarak büzüşen eksplantları ifade etmektedir.

Magentalardaki 90 günlük sürenin sonunda, %6 sükroz içeren ve bitki büyüme maddesi içermeyen ortamda canlı kalan eksplant oranı %93.75 olarak ölçülmüştür. Bu canlı eksplantların %43.75'inde sadece kallus oluşumu, %9.67'sinde kallus + sürgün oluşumu, %16.12'sinde kallus + soğancık oluşumu (Tablo 4. 7), %6.44'sinde direkt sürgün oluşumu ve %3.22'sinde de direkt soğancık oluşumu (Tablo 4. 8) görülmüştür.

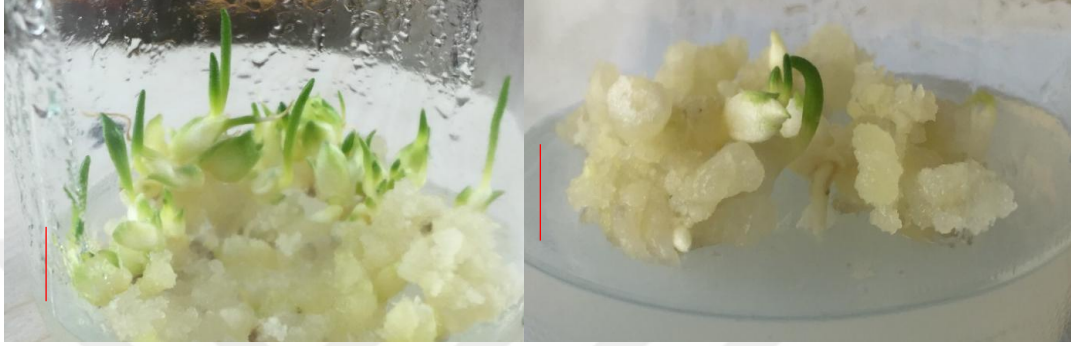


Şekil 4.4. 90 günlük periyotta *Fritillaria minima* soğan eksplantlarında görülen direkt soğancık oluşumu (Bar= 1 cm)

Bu periyotta, %3 sükroz içeren ve bitki büyüme maddesi içermeyen ortamda canlı kalan eksplant oranı %96.96, bu canlı kalan eksplantlarda kallus oluşum oranı %53.12, kallus + sürgün oluşum oranı %15.62, kallus + soğancık oluşum oranı %18.18 (Tablo 4. 7), direkt sürgün oluşum oranı %3.03, direkt soğancık oluşum oranı ise %9.09 (Tablo 4. 8) olarak ölçülmüştür.

Magentalardaki 90 günlük sürenin sonunda, %6 sükroz ve yüksek oranda sitokinin içeren ortamda canlı kalan eksplant oranı %100 olarak ölçülmüştür. Bu canlı eksplantların %20.00'sinde sadece kallus oluşumu, %34.28'inde kallus + sürgün oluşumu, %25.71'inde kallus + soğancık oluşumu (Tablo 4. 7), %14.28'inde direkt sürgün oluşumu ve

%5.71’inde direkt soğancık oluşumu (Tablo45. 8) görülmüştür. Bu periyotta, %3 süktroz ve düşük oranda sitokinin içeren ortamda canlı kalan eksplant oranı %100, bu canlı kalan eksplantlarda kallus oluşum oranı %5.71, kallus + sürgün oluşum oranı %40, kallus + soğancık oluşum oranı %28.57 (Tablo 4. 7), direkt sürgün oluşum oranı %11.42 ve direkt soğancık oluşum oranı %14.28 (Tablo 4. 8) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. 90 günlük periyotta *Fritillaria minima* soğan eksplantlarında görülen indirekt soğancık oluşumu (Bar= 1 cm)



Şekil 4.6. 90 günlük periyotta *Fritillaria minima* soğan eksplantlarında görülen indirekt sürgün oluşumu (Bar= 1 cm)

Magentalardaki 90 günlük sürenin sonunda, %6 süktroz ve düşük oranda sitokinin içeren ortamda canlı kalan eksplant oranı %100 olmuştur. Bu canlı eksplantların %9.37’sinde sadece kallus oluşumu, %15.62’sinde kallus + sürgün oluşumu, %31.25’sinde kallus + soğancık oluşumu (Tablo 4. 7), %9.37’sinde direkt sürgün oluşumu ve %15.62’sinde direkt soğancık oluşumu (Tablo 4.6) görülmüştür. Bu periyotta, %3 süktroz ve düşük oranda sitokinin içeren ortamda canlı kalan eksplant oranı %100, bu canlı kalan eksplantlarda kallus oluşum oranı %17.64, kallus + sürgün oluşum oranı %20.58, kallus +

soğancık oluşum oranı %35.29 (Tablo 4. 7), direkt sürgün oluşum oranı %5.88 ve direkt soğancık oluşum oranı %23.52 (Tablo 4. 8) olarak ölçülmüştür.

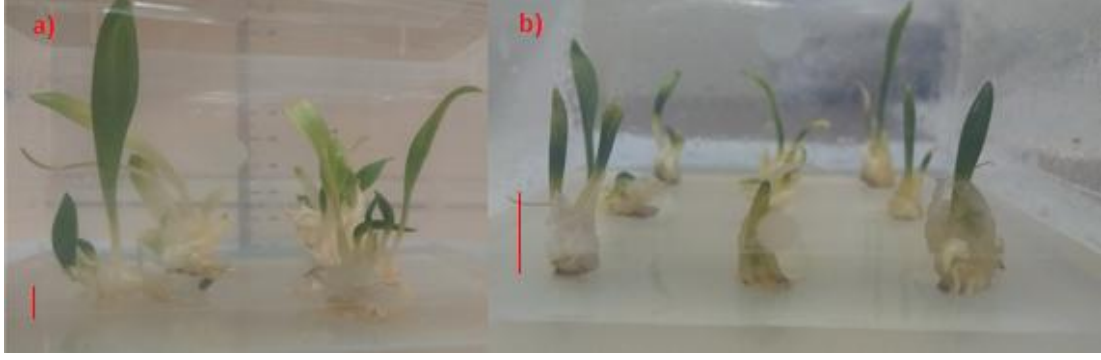


Tablo 4.7. Magentalardaki besi ortamlarına aktarıldıktan sonra (inkübasyonun ilk 30 gününden sonra) 90 gün boyunca gelişimleri izlenen soğan eksplantlarından her 30 günde bir çeşitli parametreler için yapılmış ölçümlerden elde edilen veriler (Kallus oluşumu, İndirekt Organogenezis)

Ortam İçeriği	Sadece Kallus Oluşumu						Kallus+ Sürgün						Kallus+ Soğancık					
	60.gün		90.gün		120.gün		60.gün		90.gün		120.gün		60.gün		90.gün		120.gün	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar	12	41.37	10	34.48	11	37.93	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
%3 süktroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	16	50	18	54.54	17	53.12	2	6.06	4	12.12	5	15.62	4	12.12	6	18.18	6	18.18
%3 süktroz içeren Yüksek sitokininli ortam	18	51.42	10	28.57	2	5.71	6	17.14	12	34.28	14	40.00	3	8.57	5	14.28	10	28.57
%3 süktroz içeren Düşük sitokininli ortam	14	41.17	11	32.35	6	17.64	5	14.70	6	17.64	7	20.58	5	14.70	7	20.58	12	35.29
%6 süktroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	10	31.25	16	50	17	43.75	1	3.22	3	9.67	3	9.67	2	9.67	5	16.12	5	16.12
%6 süktroz içeren Yüksek sitokininli ortam	15	42.85	11	31.42	7	20.00	7	20.00	9	25.71	12	34.28	4	11.42	6	17.14	9	25.71
%6 süktroz içeren Düşük sitokininli ortam	13	40.62	6	18.75	3	9.37	1	3.12	3	9.37	5	15.62	4	12.5	9	28.12	10	31.25

Tablo 4.8. 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 veriler (Direkt sürgün ve direkt soğancık oluşumu)

Ortam İçeriği	Direkt sürgün oluşumu görülen eksplant						Direkt soğancık olumu görülen eksplant					
	60. gün		90. gün		120. gün		60. gün		90. gün		120. gün	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar	0	0.00	0	0.00	0	0,00	0	0.00	0	0.00	0	0,00
%3 süktroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	0	0.00	1	3.03	1	3,03	2	6.06	2	6.06	3	9,09
%3 süktroz içeren Yüksek sitokininli ortam	1	2.85	2	5.71	4	11,42	4	11.42	4	11.42	5	14,28
%3 süktroz içeren Düşük sitokininli ortam	1	2.94	1	2.94	2	5,88	8	23.52	8	23.52	8	23,52
%6 süktroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	0	0.00	2	6.44	2	6,44	1	3.22	1	3.22	1	3,22
%6 süktroz içeren Yüksek sitokininli ortam	2	5.71	5	14.28	5	14,28	2	5.71	2	5.71	2	5,71
%6 süktroz içeren Düşük sitokininli ortam	0	0.00	3	9.37	3	9,37	4	12.5	5	15.62	5	15,62



Şekil 4.7. 90 günlük periyotta *Fritillaria minima* soğan eksplantlarında görülen; a) Direkt sürgün oluşumu, b) Direkt soğancık oluşumu (Bar= 1 cm)

İndirekt veya direkt organogenezle sürgün veya soğancık oluşumu görülen eksplantlarda, eksplant başına gelişen sürgün ve soğancık sayıları tablo 4. 14 ve tablo 4. 15’de verilmiştir. Bu tablolardan da görüleceği üzere eksplantların magentalardaki besin ortamlarına aktarılmalarından itibaren (petrilerdeki 30. günden itibaren) 90 günlük sürenin sonunda (120. günde) sükröz ve bitki büyüme maddesi içermeyen besin ortamlarında daha önce de belirttiğimiz gibi sürgün ve soğancık gelişimi gözlenmemiştir.

Hormon içermeyen ortamda sükrözün varlığı ve yokluğu ve yoğunluğu arasında organogenez oluşumu açısından önemli bir fark mevcuttur ($p<0,05$). Ayrıca bu ortamlar arasında kallus+sürgün oluşumu, kallus+soğancık oluşumu ve direkt soğan oluşumu açısından da istatistiksel olarak önemli derecede fark olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak direkt sürgün oluşumu açısından farklı sükröz konsantrasyonları arasında ki istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($p>0,01$).

Tablo 4.9. Yüksek sitokininli ortamda farklı sükröz konsantrasyonlarının organogenez oluşturma oranlarına etkisi

	Değer	df	Anlamlılık
Pearson ki kare	4,082	1	,043
Devamlılık Düzeltmesi	2,612	1	,106

Yüksek sitokinin içeren ortamda iki farklı sükröz konsantrasyonu arasında organogenez oluşturma oranları açısından istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0,05$).

Tablo 4.10. Farklı sükröz konsantrasyonlarının organogenez oluşturma oranlarına etkisi

	Değer	Df	Anlamlılık
Pearson ki kare	98,168 ^a	2	,000
Olasılık oranı	121,520	2	,000
Doğrusal bağlantı	41,694	1	,000

Sükröz içermeyen, %3 sükröz ve %6 sükröz içeren tüm ortamların organogenez meydana getirme oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$).

Tablo 4.11. Farklı sükröz konsantrasyonlarının indirekt soğancık oluşumuna etkisi

	Değer	df	Anlamlılık
Pearson ki kare	21,272 ^a	2	,000
Olasılık oranı	31,547	2	,000
Doğrusal bağlantı	7,338	1	,007

Kallus+soğancık oluşumu açısından sükröz içermeyen, %3 ve %6 sükröz içeren ortamlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($p<0,01$).

Tablo 4.12. Farklı sükröz konsantrasyonlarının indirekt soğancık oluşumuna etkisi

	Değer	Df	Anlamlılık (2 yönlü)
Pearson ki kare	19,416 ^a	2	,000
Olasılık oranı	28,748	2	,000
Doğrusal bağlantı	6,164	1	,013

Kallus+sürgün oluşumu açısından farklı sükröz konsantrasyonları değerlendirildiğinde 3 farklı sükröz konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($p<0,01$).

Tablo 4.13. Farklı sükröz konsantrasyonlarının indirekt soğancık oluşumuna etkisi

	Değer	Df	Anlamlılık (2 yönlü)
Pearson ki kare	27,366 ^a	2	,000
Olasılık oranı	26,428	2	,000
Doğrusal bağlantı	26,695	1	,000

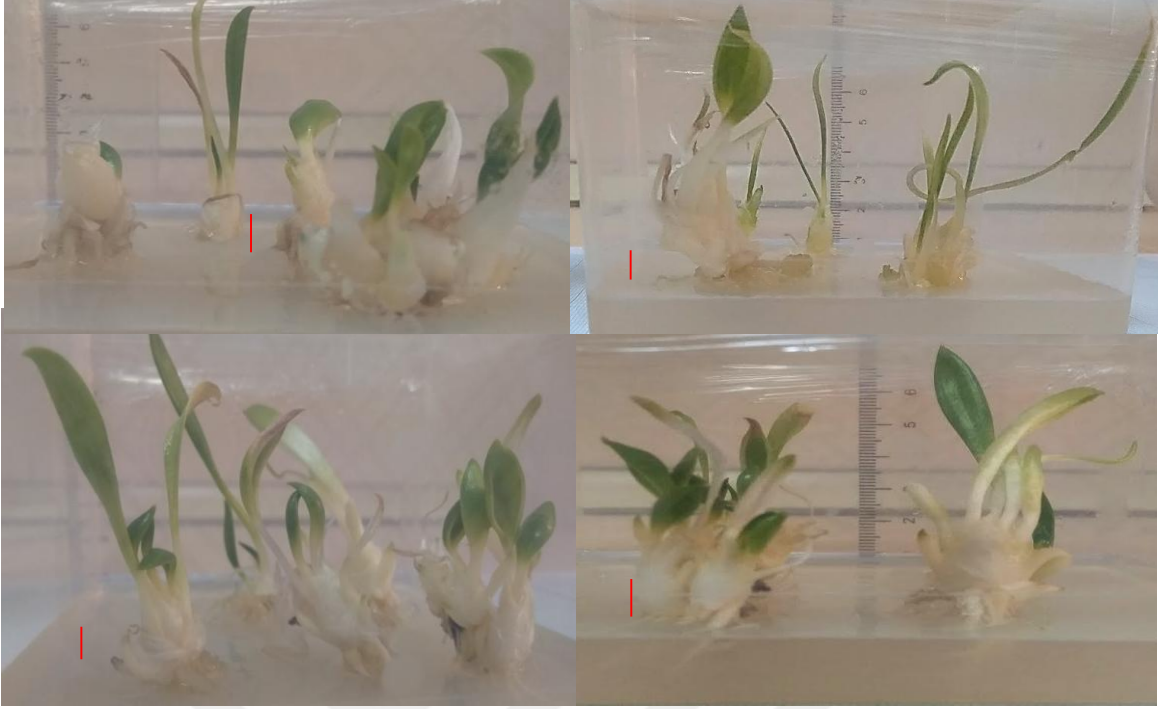
Kallus +sürgün oluşumu açısından farklı hormon kompozisyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($p<0,01$).

Tablo 4.14. İndirekt organogenezis görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün ve soğancık miktarları

Ortam İçeriği	Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı			Kallus + soğancık oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına soğancık		
	60. gün	90. gün	120. gün	60. gün	90. gün	120. gün
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar	-	-	-	-	-	-
%3 süktroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	5.2	7.6	8.2	5	5.8	6.2
%3 süktroz içeren Yüksek sitokininli ortam	5.8	10.45	13.1	6.2	6.5	7.3
%3 süktroz içeren Düşük sitokininli ortam	6.3	8.5	9	12.3	13.1	14.1
%6 süktroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	3.5	5	5.5	3	4.3	4.6
%6 süktroz içeren Yüksek sitokininli ortam	4.2	5.2	7.1	5.2	5.4	6.1
%6 süktroz içeren Düşük sitokininli ortam	4.6	5.2	6.4	4.8	5.9	8.3

Tablo 4.15. Direkt organogenezis görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün ve soğancık miktarları

Ortam İçeriği	Direkt sürgün oluşumu görülen eksplantlarda eksplant başına sürgün			Direkt soğancık olumu görülen eksplantlarda eksplant başına soğancık		
	60. gün	90. gün	120. gün	60. gün	90. gün	120. gün
Murashige and Skoog (MS) + %0, 6 agar	-	-	-	-	-	-
%3 süktroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	0	7.5	8	0	8.5	8.6
%3 süktroz içeren Yüksek sitokininli ortam	5	7.5	12.5	0	9	12
%3 süktroz içeren Düşük sitokininli ortam	8	9	9.6	5	7	15.3
%6 süktroz içeren, Bitki Büyüme maddesi içermeyen ortam	0	0	6	5	5.5	6.5
%6 süktroz içeren Yüksek sitokininli ortam	0	6	8.5	0	0	9
%6 süktroz içeren Düşük sitokininli ortam	0	0	7	6.5	8	11.2



Şekil 4.8. 120 günlük periyotta *Fritillaria minima* soğan eksplantlarında görülen indirekt soğancık ve sürgün oluşumu (Bar= 1 cm)

%6 süktroz içeren ve bitki büyüme maddesi içermeyen ortamda indirekt organogenezis ile sürgün veya soğancık oluşumu görülen eksplantlar içinde eksplant başına gelişen sürgün ve soğancık sayıları sırasıyla 5.5, 4.6; %6 süktroz ve yüksek sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 7.1, 6.1; %6 süktroz ve düşük sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 6.4 ve 8.3 olarak gözlemlenmiştir. Bu değerler %3 süktroz içeren ve bitki büyüme maddesi içermeyen ortamda sırasıyla, 8.2, 8.2; %3 süktroz ve yüksek sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 13.1, 7.3; %3 süktroz ve düşük sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 9 ve 14.1 olarak ölçülmüştür (Tablo 4. 14).

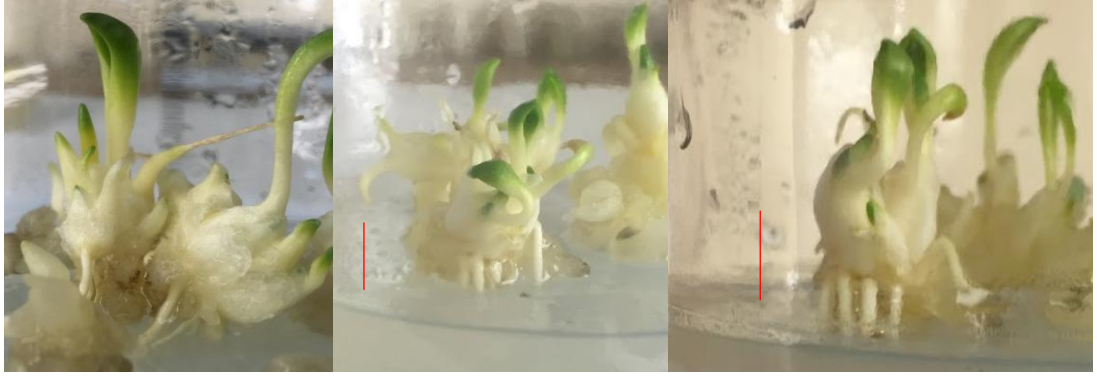
%6 süktroz içeren ve bitki büyüme maddesi içermeyen ortamda direkt organogenezis ile sürgün veya soğancık oluşumu görülen eksplantlar içinde eksplant başına gelişen sürgün ve soğancık sayıları sırasıyla 6, 6.5; %6 süktroz ve yüksek sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 8.5, 9; %6 süktroz ve düşük sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 7 ve 10.3 olmuştur Bu değerler %3 süktroz içeren ve bitki büyüme maddesi içermeyen ortamda sırasıyla, 8, 8.6; %3 süktroz ve yüksek sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 12.5, 12; %3 süktroz ve düşük sitokinin içeren ortamlarda sırasıyla, 9.6 ve 12.3 olarak ölçülmüştür (Tablo 4. 15).

Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda endirekt ve direkt organogenezle sürgün ve soğancık oluşumu görülen eksplantlar köklendirme amacıyla alındıkları ortamda 60 gün gözlemlenmiş ve bu sırada her 30 günde bir ölçümler alınarak tablo halinde listelenmiştir. Köklendirme amacıyla hazırlanmış magentalardaki besi ortamlarında inkübasyon süresinin 30. ve 60. günlerinde ölçülmüş köklenme oranları tablo şeklinde verilmiştir (Tablo 4. 10).

Tablo 4.16. Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda indirekt 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

	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	46	19	41.30	33	71.74
Direkt organogenezle oluşmuş sürgün taşıyan eksplant	17	7	41.17	14	82.35
Endirekt organogenezle oluşmuş birden fazla mikrosoğancık taşıyan eksplant	52	24	46.15	41	78.84
Direkt organogenezle oluşmuş birden fazla mikrosoğancık taşıyan eksplant	24	14	58.33	19	79.16
Endirekt organogenezle oluşmuş soğancık	205	112	54.63	175	85.36
Direkt organogenezle oluşmuş soğancık	132	61	51.69	98	74.24

Bu tablodaki verilerden de anlaşılacağı üzere toplam 139 eksplantın ilk 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda ortalama %46.04'ünde, 60 günlük inkübasyon süresinin sonunda %76.98'inde köklenme gerçekleşmiştir.



Şekil 4.9. Endirekt ve direkt organogenezle oluşan soğancıkların köklenme ortamına aktarıldıktan 60 gün sonra oluşturduğu kök yapıları (Bar= 1 cm)

İndirekt ve direkt organogenezle mikrosoğancık oluşturan eksplantların üzerinde köklenen soğancıkları incelediğimizde, endirekt organogenezle oluşan 205 soğancığın ilk 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda ortalama %54.63'ünde, 60 günlük inkübasyon süresinin sonunda %85.36'sında köklenme gerçekleşmiştir. Direkt organogenezle oluşan 132 soğancığın 30 gün sonunda %51.69'unda ve 60 gün sonunda %74.24'ünde köklenme görülmüştür.



Şekil 4.10. Köklendirilen *Fritillaria minima* soğancıkların dış ortama aktarılması (Bar= 1 cm)

Köklendirme ortamındaki 60 günlük inkübasyon süresinin sonunda kök ve sürgün oluşumu gerçekleşen 273 tam bitkiciğin saksılara ekildikten sonraki (dış ortama aktarıldıktan sonra) gelişme durumları Tablo 4. 17'de verilmiştir.

Tablodaki verilerden görüleceği üzere saksılara (aktarılan 273 tam bitkiciğin %63'ü ilk 10 gün içinde ölmüştür. Bu değer 20. günde %76.9, 30. günde 86.8 ölçülmüş ve 40.günün sonunda %97.8 gibi çok yüksek bir orana çıkmıştır.

Tablo 4.17. Kök ve sürgün oluşumu görülen bitkiciklerin dış ortama aktarıldıktan sonra, 60 gün boyunca her 10 günde tespit edilen gelişme oranları

Saksılara ekimden sonra geçen süre (gün)	Su kaybindan ölen bitkiler		Canlı kalan bitki		Ölen sürgünler yerine yeni sürgünler veren bitki	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
10	172	63.0	101	37.0	-	-
20	210	76.9	63	23.1	-	-
30	247	86.8	36	13.2	5	1.8
40	267	97.8	6	2.2	11	4.0
50	251	98.2	5	1.8	22	8.0
60	251	98.2	5	1.8	24	8.7

Sürgünleri ölen bitkicikler, bitkilerin dış ortama alınmalarının 30 gününden itibaren düşük oranlarda da olsa yeni sürgünler vermiştir. İlk sürgünlerini kaybedip yeni sürgün veren bitkilerin oranı 60. günün sonunda %8.7 olarak ölçülmüştür.

4.2. Çiçek Taç Yaprakları Eksplantlarının Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Bulgular

Çiçek taç yapraklarından elde edilen ve magentalara aktarıldıktan sonra 90 gün boyunca gelişimleri izlenen eksplantlarda kayda değer bir gelişme olmamıştır. Açmamış çiçeklerin taç yapraklarından alınan ve besi ortamlarına aktarılan eksplantlarda ilk etapta minimum düzeyde bir büyüme ve hacim artışı görülmüş, fakat bu süreç devam etmemiş ilerleyen kültürlerde bu oluşumlar kararmıştır. Magentalardaki 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 magentalarda 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. Magentalardaki 90. günlük inkübasyon süresinin sonunda eksplantların tamamına yakını canlılığını kaybetmiştir.



5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Ülkemizde doğadan toplanan 347 adet türün ihracatı yapılmaktadır. Göz alıcı çiçekleriyle bilinen yumrulu ve soğanlı bitkiler (geofitler), bu tür zenginliği arasında önemli bir yer tutmakta ve ihraç edilen türlerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. *Fritillaria* cinsi de bu gruba giren önemli cinslerdendir. Farmasötik endüstride uzun yıllardan beri kullanılan *Fritillaria*'lar süs bitkisi olarak da önemli bir yere sahip tıbbi bitkilerdir (Wang ve ark., 2005).

Geofitlerin çoğunun tohumdan çiçek açabilecek bir soğan boyutuna ulaşabilmesi için 4-5 yıla, hatta daha uzun yıllara gereksinimleri vardır. Hatta bazı geofitler tohum oluşturmamaktadır. Bu nedenlerle geofitler çoğaltımı genellikle vejetatif olarak yapılmaktadır. Ancak vejetatif üretimlerinde (yılda 2-3 adet) düşük olması sebebiyle bu bitkiler için alternatif hızlı çoğaltım tekniklerinin geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Bu amaçla *Fritillaria minima*'ya ait soğan, petal ve çiçek sapı eksplantları farklı oranlarda BA, NAA, IAA ve sükroz içeren besin ortamlarında kültüre alınmıştır.

Fritillaria minima Rix soğanların %70 etanolde 1 dakika, sonra birkaç damla Tween 20 damlatılmış %30 sodyum hipoklorit (NaOCl)'te 30 dakika bekletilmesi ve son olarak 4 defa 5'er dakika duble distile su (ddH₂O) ile yıkanması enfeksiyon oranını %6'lar seviyesinde tutmuştur. Bu oran, kullandığımız sterilizasyon protokolünün, doku kültürü çalışmalarının en büyük sorunlarından biri olan enfeksiyon riskinin azaltılması ve ortadan kaldırılması bakımından öneminin ve benzer çalışmalarda kullanılabilirliğinin göstergesidir.

Bu tablodaki değerlerden çıkarılabilecek bir diğer sonuç 20 ± 1 °C'de gelişmeye bırakılan ve 16 saat ışık, 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanan *F. minima* Rix bitkisinin besi ortamındaki soğan eksplantlarında kallus gelişiminin en erken yaklaşık 2 hafta sonra, soğancık oluşumunu yine en erken yaklaşık 4 hafta sonra görülmesidir. Bitki doku kültüründe 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunun uygulanması birçok bitki türünün in vitro çoğaltımı için önemli etkiler göstermiştir. Kültür başlangıç aşamasında inkübasyon şartları belirlenirken önceden yapılan çalışmalar incelenmiş ve *Fritillaria* türlerinin doku kültürü yöntemiyle çoğaltılmasında en uygun inkübasyon şartları değerlendirilmiştir (Ohkawa and Kitajima 1998). Ohkawa ve Kitajima (1998), *F. camtschaticensis* 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 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sn}^{-1}$ ışık ve çoğunlukla beyaz floresan lambalar en iyi koşullar olarak kaydedilmiştir (Werbrouck and Debergh 1994, Mansuroğlu and Gürel 2001). Pehlivan ve ark., (2014) *Lilium Candidum* L. ile yaptıkları çalışmada 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunu kullanarak bu bitkinin başarılı bir şekilde çoğaltıldığını göstermişlerdir (Pehlivan ve ark., 2014). Yine Erdoğan, (2010) hazırladığı yüksek lisans tezinde *Silene sangaria* COODE&CULLEN bitkisinin mikroçoğaltımında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunu uygulamış ve başarılı sonuçlar almıştır (Erdoğan, 2010). Tıpırdamaz (2003)'da, *Galanthus ikariae*'nin soğan pul yaprağı eksplantlarının in vitro'da çoğaltımını yapmış ve 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyodunu kullanarak başarılı sonuçlar elde etmiştir (Tıpırdamaz, 2003).

Tablo 4. 3'deki veriler bazı önemli sonuçlar ortaya çıkmaktadır; kallus gelişimi ile soğancık oluşumunun besi ortamındaki sükrozun ve bitki büyüme düzenleyicilerin yoğunluğuna göre değişiklik göstermektedir. Buna göre, kallus oluşumu MS + %0.6 agardan ibaret, sükroz ve bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kültür ortamında hem çok yavaş olmakta hem de çok 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 sükroz ortamında kallus oluşumu görülen eksplant oranı sükroz içermeyen ortama göre %262, %6 sükroz içeren ortama göre %75.64 daha fazla olmuştur.

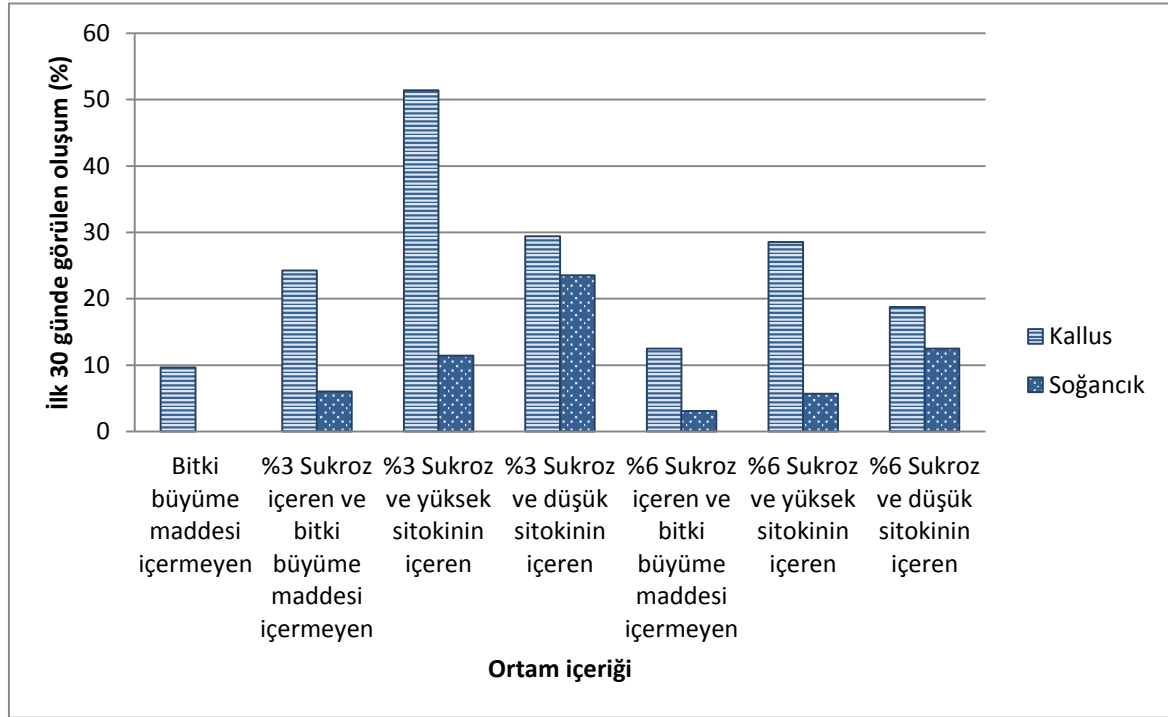
Karbon kaynağı olarak %3 ve %6 oranında sükroz konsantrasyonları, soğancık oluşumunu sağlamış ancak %3 sükroz konsantrasyonu bu anlamda daha başarılı sonuçlar vermiştir. Bu sonucu destekler nitelikte bir çalışma Rahimi ve ark. tarafından *Fritillaria imperialis* bitkisi ile yapılmıştır (Rahimi ve ark., 2014). Bu çalışmada da en yüksek rejenere bitkicik sayısı 30 mg/l sükroz içeren MS ortamında gerçekleşmiştir. Yapılan bu çalışmada ayrıca köklenme için de %3 oranında sükroz kullanılan ortamda başarılı olunmuştur. Otani ve Shimada (1997) tarafından yapılan bir çalışmada *F. Camtschatcensis* soğan eksplantları kullanılmış ve Farklı sükroz konsantrasyonlarının (%3, 6 ve 9) büyüme

oranı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları da %3 süktroz içeriğinin büyüme oranı üzerine daha yüksek etkisi olduğunu göstermiştir (Otani ve Shimada,1997). *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, süktrozlu ortamlarda gelişenlere göre daha fazla olmuştur (Dilik 2006). Yine Samaneh ve ark., *Mentha piperita* L hücre süspansiyon kültüründe kallus oluşum oranı açısından ortamda bulunan %3 süktrozun etkin olduğunu bildirmiştir (Mohammadinejad, Karimi ve ark., 2016). Süktrozun soğancık oluşumu üzerinde olumlu etkileri Bach ve Pawlowska (1993), Gerrits and De Klerk (1992) tarafından rapor edildiği gibi, Witomska and Lukaszewska (2000) tarafından da vurgulanmaktadır (Gerrits ve Klerk, 1992; Bach ve Pawlowska, 1993; Witomska ve Łukaszewska, 2000).

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 %13.66, %6 süktroz içeren ortamda yaklaşık %7.11 düzeyinde mikro soğancık oluşumu gözlenmiştir.

MS + %0.6 agar ortamında süktroza ilave olarak bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunması kallus ve soğancık oluşumunu arttırmıştır. %3 süktroz bulunan yüksek sitokin (0,1 BA + 0,6 NAA + 0.4 IAA)'li ortamda 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda kallus oluşumu görülen eksplant oranı bitki büyüme düzenleyicisi ve süktroz içermeyen ortama göre %431, bitki büyüme düzenleyicinin bulunmadığı %6 süktroz içeren ortama göre %311, yüksek sitokin (1 BA + 0,6 NAA + 0,4 IAA)'in bulunduğu %6 süktroz içeren

ortama göre %79.98, düşük sitokinin (0,1 BA + 0,6 NAA + 0,4 IAA)'in bulunduğu %6 süktroz içeren ortama göre %174.2, bitki büyüme düzenleyicinin bulunmadığı %3 süktroz içeren ortama göre %112.1, düşük sitokinin (0,1 BA + 0,6 NAA + 0,4 IAA)'in bulunduğu %3 süktroz içeren ortama göre %74.83 daha fazla olmuştur. Bütün bunlar şunu göstermektedir; %3 süktroz özellikle kallus olumunu artırmakta, bu yüksek sitokininli (1 BA + 0,6 NAA + 0.4 IAA) besi ortamında daha fazla olmaktadır. Soğan eksplantlarının petrilerdeki 30. gününde ölçülen veriler Şekil 5.1'de ki grafikte gösterilmiştir.

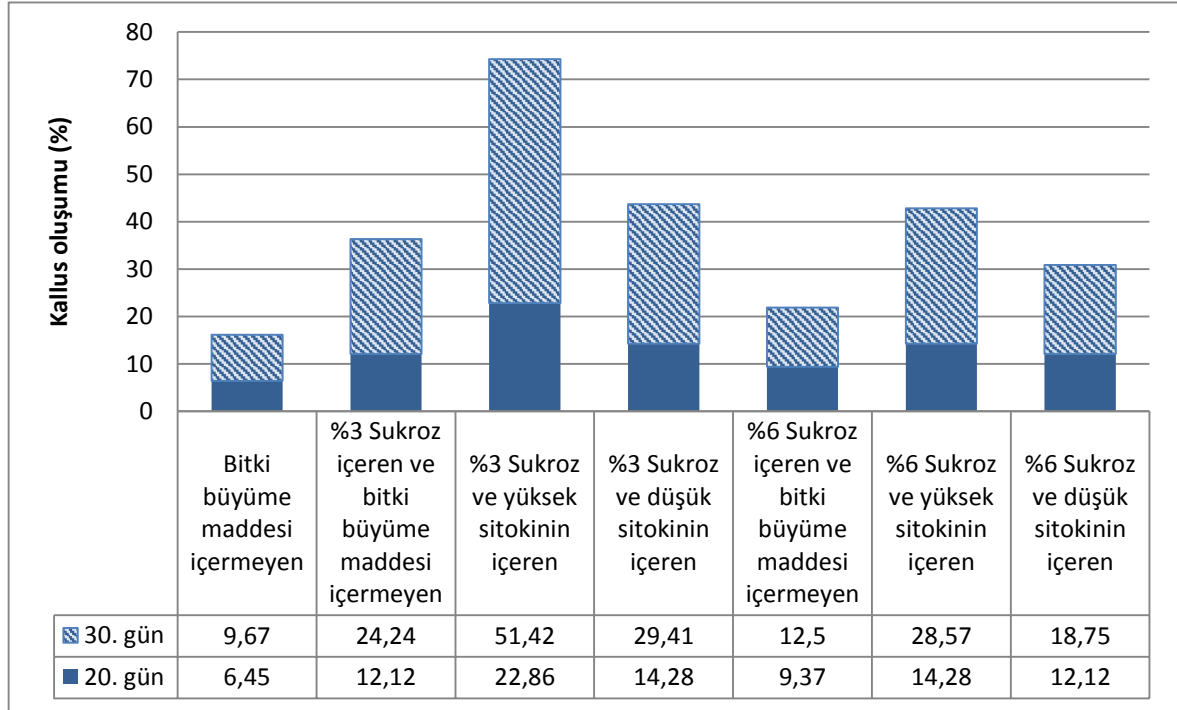


Şekil 5.1. İlk 30 günde petrilerde görülen oluşumlar

Burada ilginç bir husus da %3 süktroz içeren ortamlarda kallus oluşumun daha hızlı gerçekleşmesidir. Örneğin bir aylık inkübasyon süresinin 20. gününde yapılan ölçümlerde, %3 süktroz bulunan yüksek sitokinin (1 BA + 0,6 NAA + 0.4 IAA)'li ortamdaki kallus oluşumu süktroz oranı %6 olan aynı ortamdaki kallus oluşumuna göre %60, keza %3 süktroz bulunan yüksek sitokinin (0.1 BA + 0,6 NAA + 0.4 IAA)'li ortamdaki kallus oluşumu süktroz oranı %6 olan aynı ortamdaki kallus oluşumuna göre %17.82, %3 süktroz bulunan ve bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamdaki kallus oluşumu süktroz oranı %6 olan aynı ortamdaki kallus oluşumuna göre %29.35 daha fazla olmuştur.

Petrilerde soğan eksplantlarının soğan oluşum hızları iki periyotta değerlendirildiğinde de, %3 süktroz ve yüksek sitokinin içeren ortamda bulunan soğan

eksplantlarının, diğer ortamda bulunanlara göre 30. günde oluşturduğu kallus oranının 20. günden çok daha yüksek olduğu Şekil 5. 2’de açıkça görülmektedir.

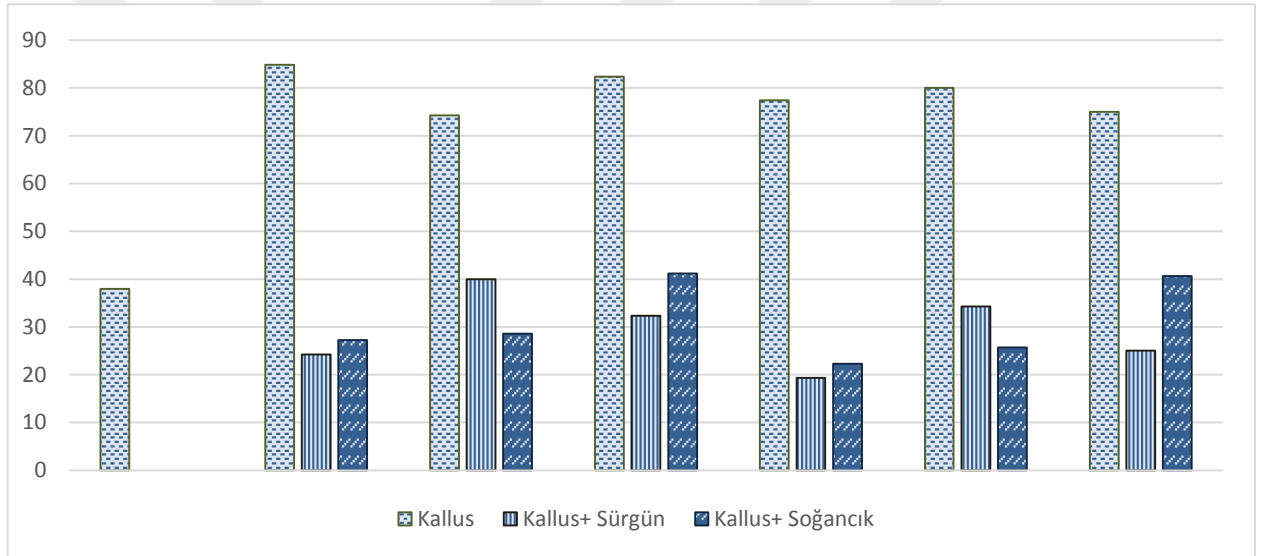


Şekil 5.2. İlk 20. ve 30. günlerde petrilerde görülen kallus oluşumları (%)

Tablo 4. 4, tablo 4. 7 ve tablo 4. 8 ’da verilen. 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 %3.4, sükroz bulunmayan ortama göre %131 daha fazla olmuştur (Tablo 4. 2).

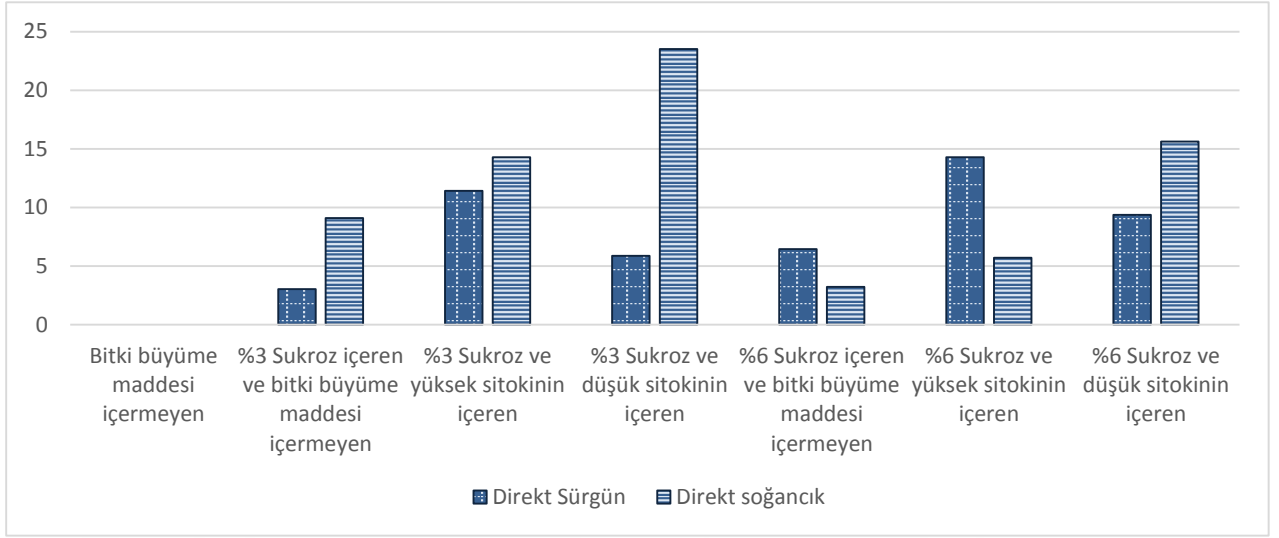
Hormonsuz temel besi ortamının (MS + %0.6 agar) sükroz içermeyenlerinde canlı kalan eksplantların %37.93’ünde kallus oluşumu gözlenmiş fakat herhangi bir doku ve organ farklılaşması, yani direkt veya endirekt organogenezis gerçekleşmemiştir (Tablo 4. 7 ve Tablo 4. 8). Oluşan kallusların açık sarı renkte ve büyük bir kısmının sert ve kompakt yapıda olduğu görülmüştür. Bununla birlikte az bir kısmı da yumuşak ve dağılabilir nitelikte olmuştur.

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 %74.51'sinde direkt veya endirekt organogenez, geriye kalan %25.49'unda sadece kallus oluşumu görülmüştür (Tablo 4. 7). Hormon bulunmayan %6 sükroz içeren ortamda canlı kalan eksplantlar içinde organogenezin görüldüğü eksplant oranı yaklaşık %56.25 olarak ölçülmüşken, sadece kallus oluşumu gözlenen eksplantların oranı %43.75 olmuştur. Bu besi ortamı için organogenezin görüldüğü eksplantlar incelendiğinde %3 sükroz ortamında %6 sükroz içeren ortama göre kallus + sürgün oluşumu %25.33, kallus + soğancık oluşumu %12.78, direkt soğan oluşumu %182.3 daha fazla olmuştur (Tablo 4. 7 ve Tablo 4. 8).



Şekil 5.3. Magentalardaki 90. günde farklı besin ortamlarında kallus oluşumu ve farklılaşması (%)

Burada sadece direkt sürgün oluşumunda bir sapma görülmüş, %6'lık sükroz ortamında %3'lük sükroz ortamına göre direkt sürgün oluşumu %112.54 daha fazla gerçekleşmiştir (Tablo 4. 8).



Şekil 5.4. Magentalardaki 90. Günde Farklı Besin Ortamlarında Direkt Sürgün ve Soğancık Oluşumu (%)

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 %94.29'unda direkt veya endirekt organogenez, geriye kalan %5.71'inde sadece kallus oluşumu görülmüştür (Tablo 4. 7). Bu besi ortamının %6 sükroz içereninde organogenezin görüldüğü eksplant oranı %80, sadece kallus oluşumu gözlenen eksplantların oranı %20 olarak ölçülmüştür. (Tablo 4. 7). Yani yüksek sitokinin ve %3 sükroz içeren besi ortamında organogenez yüksek sitokinin ve %6 sükroz içeren besi ortamına göre %17.86, hormon içermeyen %3'lük sükroz ortamına göre %101.13, hormon içermeyen %6'lık sükroz ortamına göre %67.62 daha fazla olmuştur.

Bu besi ortamı için organogenezin görüldüğü eksplantlar incelendiğinde %3 sükroz ortamında %6 sükroz içeren ortama göre kallus + sürgün oluşumu %27.91, kallus + soğancık oluşumu %8.15, direkt soğan oluşumu %90.91 daha fazla olmuştur. Burada yine sadece direkt sürgün oluşumunda bir sapma görülmüş, %6'lık sükroz ortamında %3'lük sükroz ortamına göre direkt sürgün oluşumu %48 daha fazla gerçekleşmiştir (Tablo 4. 7 ve Tablo 4. 8).

Yüksek oranda direkt sürgün ve soğancık oluşumunun gözlemlendiği bir çalışma da Hannweg ve ark. (1996) tarafından, *Bowiea volubilis* bitkisi kullanılarak yapılmıştır (Gerrits ve Klerk, 1992) . Burda bitki büyüme ortamı olarak 30 mg/l sükroz, 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'ın 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, 2004).

MS + %0.6 agar + %3 süktroz 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 %82.36'sında direkt veya endirekt organogenez, geriye kalan %17.64'ünde sadece kallus oluşumu görülmüştür (Tablo 4. 7). Bu besi ortamının %6 süktroz içereninde organogenezin görüldüğü eksplant oranı %71.86, sadece kallus oluşumu gözlenen eksplantların oranı %9.37 olarak ölçülmüştür (Tablo 4. 7). Yani düşük sitokinin ve %3 süktroz içeren besi ortamında organogenez düşük sitokinin ve %6 süktroz içeren besi ortamına göre %14.61, hormon içermeyen %3'lük süktroz ortamına göre %75.68, hormon içermeyen %6'lık süktroz ortamına göre %46.42 daha fazla olmuştur.

Bu besi ortamı için organogenezin görüldüğü eksplantlar incelendiğinde %3 süktroz ortamında %6 süktroz içeren ortama göre kallus + sürgün oluşumu %31.75, kallus + soğancık oluşumu %12.92, direkt soğancık oluşumu %50.57 daha fazla olmuştur. Burada ise sadece direkt sürgün oluşumunda bir sapma görülmüş, %6'lık süktroz ortamında %3'lük süktroz ortamına göre direkt sürgün oluşumu %59.35 daha fazla gerçekleşmiştir (Tablo 4. 8).

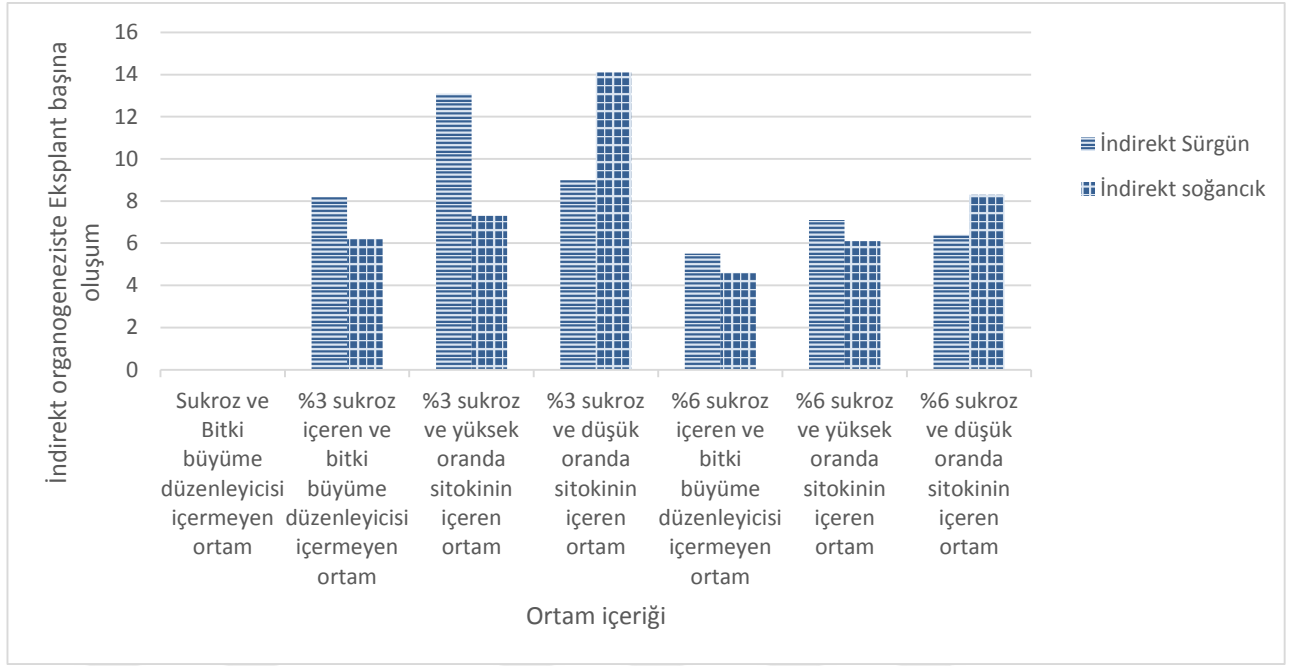
Temel besi ortamının sadece süktroz ve süktroz + bitki büyüme maddesi içerenlerinin hemen hepsinde belli oranlarda endirekt veya direkt organogenez görülmüştür. Magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda yapılan ölçümlerde direkt + endirekt organogenezin görüldüğü eksplant oranları %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda %94.29, %3 süktroz içeren düşük sitokininli ortamda %82.26, %6 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda %80 ve %6 süktroz içeren düşük sitokininli ortamda %71.86 olarak (Tablo 4. 7) gerçekleşmiştir. Yani organogenez, %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda %3 sitokinin içeren düşük sitokininli ortama göre %14.62, %6 süktroz içeren yüksek sitokininli ortama göre %17.86 ve %6 süktroz içeren düşük sitokininli ortama göre %31.21 daha yüksek olmuştur.

Diğer taraftan indirekt organogenez direkt organogeneze göre daha yüksek oranlarda gerçekleşmiştir. Bu ortamların tamamında, magentalardaki 90 günlük inkübasyon süresinin sonunda yapılan ölçümler sonucu canlı eksplantların ortalama %65.87'sinde organogenez gözlenmiştir. Canlı eksplantlar içinde endirekt organogenez ortalaması %46.44, direkt organogenezin ortalaması %19.43 olarak belirlenmiştir (Tablo 4. 7 ve Tablo 4. 8). Yani endirekt organogenez direkt organogeneze göre %139 daha fazla gerçekleşmiştir. Endirekt organogenez en fazla (%68.57) %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda görülmüştür. Bu değer %3 süktroz içeren düşük sitokininli ortama göre %22.73, %6 süktroz içeren yüksek sitokininli ortama göre %14, %6 süktroz içeren düşük sitokininli ortama göre %46.30, %3 süktroz içeren hormonsuz ortama göre %102.87 ve %6 süktroz içeren hormonsuz ortama göre %165.87 daha yüksektir.

Canlı eksplantlar içinde direkt organogenez en yüksek %3 süktroz içeren düşük sitokininli ortamda (%29.4) görülmüştür (Tablo 4. 8). Bunu %25.7 oranıyla %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortam izlemiştir (Tablo 4. 8). Direkt organogenez %3 süktroz içeren hormonsuz ortamda %12.12, %6 süktroz içeren hormonsuz ortamda %9.66, %6 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda %19.19 ve %6 süktroz içeren düşük sitokininli ortamda %24.99 olarak ölçülmüştür (Tablo 4. 8).

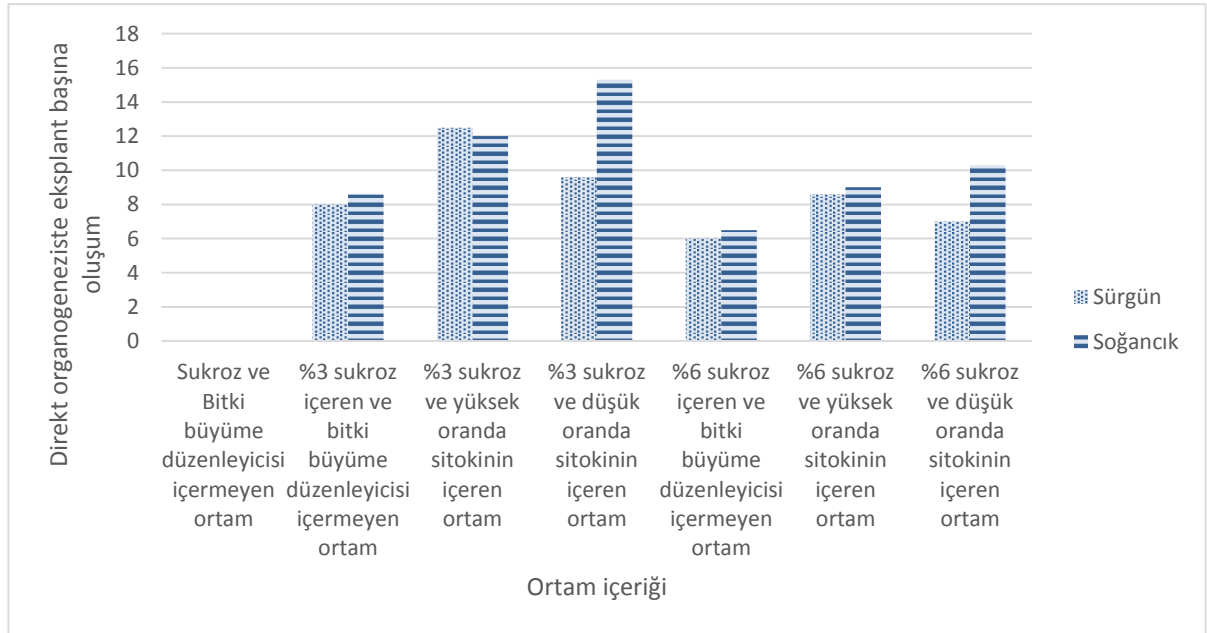
Kallus + sürgün oluşumu görülen eksplantlar arasında, eksplant başına sürgün sayısı en fazla %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortamda gözlenmiştir (Tablo 4. 14). Yani %3 süktroz içeren yüksek sitokininli ortam endirekt sürgün oluşumunu teşvik etmekle kalmamış, sürgün sayısında da önemli oranlarda artış sağlamıştır (Tablo 4. 14). Bu hususla ilgili bir başka veri endirekt sürgün oluşumunun teşvikinde %3 süktrozun %6 süktroz dan daha etkili olduğudur.

Tüm bu sonuçlar kullanılan MS ortamının *Fritillaria minima* Rix 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).



Şekil 5.5. Kültürün başlangıcından itibaren 120. günde indirekt organogenezis görülen eksplant başına oluşum

Tablo 4. 7 ve Tablo 4. 14'deki verilere bakıldığında %3 sükroz içeren sitokininli ortamlarda gerek endirekt sürgün oluşturan eksplant oranının gerekse eksplant başına sürgün sayısının %6 sükroz içeren hem yüksek hem de düşük sitokininli ortama göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Yani yüksek sitokinin oranı ve %3 sükroz indirekt organogenezisi hem hızlandırmakta hem de oranını yükseltmektedir.



Şekil 5.6. Kültürün başlangıcından itibaren 120. günde direkt organogenezis görülen eksplant başına oluşum

Tablo 4.14 incelendiğinde göze çarpan bir diğer husus da indirekt organogenezis ile oluşan soğancık miktarının %3 süktroz içeren ortamda %6 süktroz içeren ortama göre daha yüksek oluşudur. Ancak burada Şekil 5.6'da da gözlemlenebildiği gibi eksplant başına soğancık sayısı açısından, düşük sitokinin içeren ortamda daha yüksek oranda soğancık sayısı bulunmaktadır.

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 (Chen ve ark., 2000). Elde edilen soğancık ve sürgünlerden 1/2 MS (Murashige and Skoog) + 0.6 agar + %3 süktroz + 4 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren besi ortamı kullanılarak başarılı bir şekilde köklendirme elde edilmiştir. Bu çalışmada tıbbi değere sahip olan *F.hupahesis* Hsiao et C. Hsia türünün doku kültürü ile çoğaltılması sağlanmıştır. Araştırmacılar, in vitro koşullarda elde edilen soğancıkların köklendirilmesi aşamasında 2-4 mg/l NAA kullanılmasının köklenmeyi teşvik ettiğini ; 1/2 MS, %3 süktroz, 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 zambesiaceae*, *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 tamamlanmış köklenme elde edilmiştir (Ault, 1995).

Köklenme ortamlarındaki eksplantların, iki aylık inkübasyon sürecinin sonunda yaklaşık 2/3'ünde (%76.98) köklenme gözlenmiştir (Tablo 4. 10). Köklenme en fazla direkt organogenezle oluşmuş sürgün taşıyan eksplantlarda (%82.35), indirekt organogenezle oluşmuş sürgün taşıyan eksplantlarda köklenme en az (%71.74) olmuştur (Tablo 4. 10). Genel olarak soğancıklardaki köklenme (%79) sürgün taşıyan eksplantlardaki köklenme (%77.04)'ye göre %2.53 daha fazla olmuştur. Bu süre içinde herhangi bir enfeksiyon ortaya çıkmamıştır. Köklenmeyen eksplantların önemli bir kısmında, eksplantın canlılık özelliğini kaybetmeye başlaması (veya kaybetmesi) belirtileri olarak nitelendirdiğimiz kahverengileşme, kararma ve büzüşme görülmüştür.

Bitkileri dış ortama aktarılma sürecinden sonraki süreçte büyük sorun yaşanmıştır. *Fritillaria* türlerinde dokuların gevşek olması ve su kaybı bu sorunu tetiklemiştir. Zaten bu tip çalışmalarda temel sorunlardan biri budur (Gürlek, 2011). Dış ortama (saksılara)

aktarılan tam bitkiciklerin yarısından 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 %97.6 'sı ölmüştür. Geriye kalan %2.4 oranındaki bitkide büyüme ve gelişme gözlenmiştir. Toprak üstü sürgünlerini kaybeden bitkilerin bir kısmı yeni sürgünler vermeye başlamıştır (Tablo 4. 10). 60 günlük sürenin sonunda yeni sürgün veren bitkilerin oranı %8.7'ye çıkmıştır. Yeni sürgün veren bitkiler ve gelişme gösteren %2'lik bitki grubunun gelişmesi ilave 60 gün daha izlense de herhangi bir sonuç alınamamıştır. *Fritillaria* 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. Temel besi ortamında sükrozun da bulunmadığında kallus oluşumunu sağlamakta, fakat organogenez gerçekleştirilememektedir. Temel besin ortamında bitki büyüme maddesi bulunmadığında da besi ortamına sükrozun eklenmesi kallus oluşumunu arttırmakta ve düşük oranlarda da olsa organogenez sağlanabilmektedir. %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 endirekt organogenezle meydana gelen sürgün sayısını, %3 sükroz içeren düşük sitokininli ortam ise indirekt organogenezle meydana gelen soğancık sayısını arttırmaktadır.

6. ÖNERİLER

Çalışmamız, *Fritillaria minima* Rix türünün in vitro teknikleriyle çoğaltılması yönünde yapılan ilk çalışmadır. Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, dünya literatürü için özgün ve bu cinse ait türlerin çoğaltımı için ümit vericidir. Ayrıca yaptığımız çalışma, daha sonra diğer *Fritillaria* türlerinde de yapılacak olan çalışmalara yüzey sterilizasyon protokolü ve bitkicik gelişimi protokolü açısından kaynak sağlayabilecek niteliktedir. Ayrıca endemik *Fritillaria* türlerine de uygulanabilecek in vitro çoğaltım yöntemleriyle, bu değerli mirasımızın korunması da sağlanabilecektir.

Çalışmamızda *Fritillaria minima* soğan eksplantlarından kallus, indirekt organogenezis ve direkt organogenezis oluşumu gözlemlenmiştir. Ancak bitkileri dış ortama aktarılmalardan sonraki süreçte büyük sorun yaşanmıştır. *Fritillaria* türlerinde bitki dokularının gevşek olması ve su kaybederek canlılığını kaybetmesinden dolayı dış koşullara aktarımda büyük bir sorun oluşturmaktadır (Dilik., 2011). *Fritillaria* 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 ve gevşek bitki dokularının sıkılaştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmasının ve yöntemler geliştirilmesinin önemi açıktır.

7. KAYNAKLAR

- Ahmadi, A., (2012). "Study of inter-generic hybridization possibility between *Salix aegyptica* and *Populus caspica* to achieve new hybrids." International Journal of Plant Production 4(2): 143-148.
- AIPH, U. F., (2004). "International Statistics Flowers and Plants 2004 (52)." Institut fur Gartenbauokonomie der Universitat Hannover, Germany.
- Akhtar, M. N., (2003). "New class of steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis*." Phytochemistry 63(1): 115-122.
- Aksu, A. E.,(2002). "Persistent Holocene outflow from the Black Sea to the Eastern Mediterranean contradicts Noah's Flood hypothesis." GSA Today 12(5): 4-10.
- Anonim, 2013. International Statistics Flowers and Plants 2013 AIPH/Union Fleurs International Flower Trade Association Volume:61, Netherlands.
- Arslan, A.,(1999). "Carbon isotope discrimination as indicator of water- use efficiency of spring wheat as affected by salinity and gypsum addition." Communications in Soil Science & Plant Analysis 30(19-20): 2681-2693.
- Arslan, N. ve A. Gümüřçü (2002). "Türkiye'nin *Fritillaria* türleri ve bunların tarımı konusunda yapılan çalışmalar. II." Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, Antalya: s303-309.
- Arslan, N., (2002). Researches on cultivation of *Sternbergia candida* Mathew et. Baytop. Proceedings of 14th Meeting of Plant Originated Drugs.
- Arslan, N., (2008). "Farklı Soğan Kesme Yöntemlerinin *Fritillaria persica* L.'nin Bazı Özellikleri Üzerine Etkisi." Tarım Bilimleri Dergisi 14(3): 246-250.
- Atta-ur-Rahman, Z.-u.-H., Khalid, A., Anjum, S., Khan, M. R., Choudhary, M.I., (2002). "Pregnane-Type steroidal alkaloids of *Sarcococca saligna*: a new class of cholinesterase inhibitors." Helv Chim Acta 85: 678-688.
- Ault, J. R. (1995). "In vitro propagation of *Eucomis autumnalis*, *E. comosa*, and *E. zambesiaca* by twin-scaling." Hortscience 30(7): 1441-1442.
- Avcı, M. (2005). "Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü." İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi 13(1): 27-55.

- Bach, A. ve B. Pawlowska (1993). "Effect of type of carbohydrates in regeneration of *Hyacinthus orientalis* L. in long-term cultures." *Folia Horticulturae* 5(2).
- Bajaj, Y. (1990). In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Haploids in Crop Improvement I*, Springer: 3-44.
- Baker, J. G. (1874). "Revision of the Genera and Species of *Tulipeæ*." *Botanical Journal of the Linnean Society* 14(76): 211-310.
- Bakhshi Khaniki, G. (1997). "*Fritillaria chlororhabdota* (Liliaceae), a new species from Iran." *Herbertia* 52: 140-152.
- 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.
- Basu, S. K., (2011). "Haploid production technology in wheat and some selected higher plants." *Australian Journal of Crop Science* 5(9): 1087.
- Bear, L. M. ve S. W. Morel (1960). The geology and mineral resources of the Agros-Akrotiri area, authority of the government of Cyprus.
- Behçet, L. (1998). "A new species of *Fritillaria* L.(Liliaceae) from east anatolia Turkey." *Bull. Pure Appl. Sci. B* 17: 1-2.
- Benschop, M., (2010). "1 The Global Flower Bulb Industry: Production, Utilization, Research." *Horticultural Reviews* 36(1): 1-115.
- Bhojwani, S. S. (2012). *Plant tissue culture: applications and limitations*, Elsevier.
- Bingöl, F., (1997). "Steroidal Alkoloids of *Fritillaria persica*." *J.Fac. Pharm. Gazi* 14(2): 81-85.
- Bisht, S., (2017). "In-vitro Mutagenesis Induction to Improve Abiotic Stress in Tissue Cultured Plantlet of *Picrohiza kurroa* Royle ex." Benth: An Endangered Plant of Western Himalayas, India. *Med Aromat Plants (Los Angel)* 6(287): 2167-0412.1000287.
- Bodas, R., (2012). "Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites." *Animal Feed Science and Technology* 176(1): 78-93.
- Boissier, E. (1888). *Flora orientalis*, Рипол Классик.
- Bouquet, A. ve L. Torregrosa (2003). Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). *Micropropagation of woody trees and fruits*, Springer: 319-352.

- Brown, D. ve T. Thorpe (1995). "Crop improvement through tissue culture." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(4): 409-415.
- Bukovinszki, Á., (2007). "Engineering resistance to PVY in different potato cultivars in a marker-free transformation system using a 'shooter mutant' *A. tumefaciens*." *Plant Cell Reports* 26(4): 459-465.
- Burun, B. ve E. Poyrazoglu (2002). "Embyo culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Turk J.*" *Biol* 26: 175-180.
- Buschman, J. (2004). Globalisation-flower-flower bulbs-bulb flowers. IX International Symposium on Flower Bulbs 673.
- Buschman, J. (2004). Production of bulbs and bulb cut flowers in the world present ve future. IXth International Symposium on Flower Bulbs.
- Cai, Z., Li, P., Dong, T. T. X., Tsim, K. W.K., (1999). "Molecular diversity of 5S-rRNA spacer domain in *Fritillaria* species revealed by PCR analysis." *Planta medica* 65(04): 360-364.
- Chamani, E. ve S. K. Tahami (2014). "How to regenerate plantlets from protoplasts of *Fritillaria imperialis*." *Scientific Papers-Series B, Horticulture*(58): 301-309.
- Chandra, S. ve R. Chandra (2011). "Engineering secondary metabolite production in hairy roots." *Phytochemistry Reviews* 10(3): 371.
- Chatenet, M., Delage, C., Ripolles, M., (2001). "Detection of Sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture." *Plant Disease* 85(11): 1177-1180.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. K., Bisaria, V. S., (2002). "Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7(3): 138-149.
- Chen, U.C., Tai, C.D., Chen, C.C., Taay, T.S., (2000). "Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hisao et K. C. Hsia. IV. Influence of medium component and light treatment on in vitro rooting and acclimatization of bulblet." *Journal of Agricultural Research or China* 49(4): 39-47.
- Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J. A., Gatehouse, A. M. R., (2006). "Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops." *Trends in plant science* 11(6): 302-308.

- Chung, S. M., Vaidya, M., Tzfira, T., (2006). "Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria." Trends in plant science 11(1): 1-4.
- Corredoira, E., San-Jose, M. C., Ballester, A., Vieitez, A. M., (2004). "Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut." CryoLetters 25(1): 33-42.
- Çelik, A., Çiçek, M., Semiz, G., Karıncalı, M., (2004). "Taxonomical and ecological investigations on some geophytes growing around Denizli province (Turkey)." Turkish Journal of Botany 28(1-2): 205-211.
- Çiftçi, M. (2009). "Türkiye’de Orman Fakültelerindeki Öğrencilerin Öğretim Üyelerinden Sağladıkları Sosyal Fayda Düzeylerinin Atkinson Eşitsizlik Endeksi Yaklaşımıyla Ölçümü." Bartın Orman Fakültesi Dergisi 11(16).
- Dahlgren, R. ve K. Bremer (1985). "Major clades of the angiosperms." Cladistics 1(4): 349-368.
- Davis, P., et al. (1988). "Flora of Turkey and the East Aegean Islands,(Suppl.) Univ." Press, Edinburgh.
- Davis, P. H. (1965). "Flora of Turkey." Flora of Turkey.
- Day, J. G. (2004). "Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections." Nova Hedwigia 79(1-2): 191-205.
- De Hertogh, A. ve M. Le Nard (1993). Physiology of flower bulbs, Elsevier.
- De Hertogh, A., et al. (2012). "The Globalization of Flower Bulb Industry." Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production 1.
- Dharmananda, S. (2004). Chinese Medicine in Italy Integrated Into the Modern Medical System, ITM.
- Dilik, M. (2006). Şemdinli Lalesi (*Fritillaria imperialis* L.) ve Adıyaman Lalesi (*F. persica* L.)'nin Doku Kültürüyle Çoğaltılması, Ankara Üniversitesi.
- Donner, J. (1990). "Distribution maps to PH Davis, Flora of Turkey, 1-10." Linz. Biol. Beitr 22(2): 381-515.
- Erdoğan, U. (2010). "Tehlike altındaki *Silene sangaria* coode&cullen'nın mikroçoğaltımı."
- Feinbrun-Dothan, N. (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.
- Feng, Y., et al. (2009). "Establishment of in vitro somatic embryogenesis and plant regeneration system of wild *F. ussuriensis* Maxim." Seed 1: 32-36.
- Ferrante, E. ve D. Simpson (2001). "A review of the progression of transgenic plants used to produce plantibodies for human usage." J Young Investigators 4(1): 11pp.
- Gao, S., et al. (1999). "Organ culture of a precious Chinese medicinal plant—*Fritillaria unibracteata*." Plant cell, tissue and organ culture 59(3): 197-201.
- Gao, Y. ve Z.-S. Liang (2004). "Effect of Water on Root System Growth of Medicinal Plants and Accumulation of Effective Ingredient in Their Roots [J]." Research and Practice of Chinese medicines 3: 002.
- García-González, R., et al. (2010). "Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges." Ciencia e investigación agraria 37(3): 5-30.
- George, E. F. ve P. D. Sherrington (1984). Plant propagation by tissue culture, Exegetics Ltd.
- Gerrits, M. ve G. J. Klerk (1992). "Dry-matter partitioning between bulbs and leaves in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated in vitro." Plant Biology 41(4): 461-468.
- Guang-Lai, Z. (2004). "Study on the Induction Conditions of Callus of the Bulb of *Fritillaria Hupehensis* Hsiao et KC Hsian [J]." Journal of Hubei Institute For Nationalities 4: 013.
- Güner, A. (2012). Türkiye bitkileri listesi:(darımarlı bitkiler), ANG Vakfı.
- Güner, A., et al. (2000). "Flora of Turkey and the East Aegean Islands". Vol. 11. Second Supplement, Edinburgh.
- Gürlek, D. (2011). "*Fritillaria imperialis* L. ve *Fritillaria persica* L. Türlerinde in vitro Soğancık Üretimi Üzerine Arastırmalar", Ankara Üniversitesi. Doktora Tezi.
- Hao, Y., et al. (1982). "Callus induction and plant regeneration in tissue culture of *Fritillaria pallidiflora*." Acta Bot Bor-Occ Sin 2: 38-43.
- Harding, K. (2004). "Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review." CryoLetters 25(1): 3-22.

- Harding, K. (2007). Plant and algal cryopreservation: issues in genetic integrity, concepts in cryobionomics and current applications in cryobiology. Proceedings Asia Pacific Conference on Plant Tissue and Agribiotechnology (APaCPA).
- Harding, K., Johnston, J., Benson, E. E., (2005). "Plant and algal cell cryopreservation: issues in genetic integrity, concepts in 'Cryobionomics' and current European applications." Contributing to a sustainable future, Proceedings of the Australian branch of the IAPTC and B, Perth, Western Australia.
- Hartsema, A. M. (1961). "Influence of temperatures on flower formation and flowering of bulbous and tuberous plants." *Handbuch der Pflanzenphysiologie* 16: 123-167.
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M., Fischer, R., (2004). "Plant cell cultures for the production of recombinant proteins." *Nature Biotechnology* 22(11): 1415.
- Himes, D. M. (2004). "Powered surgical handpiece with integrated irrigator and suction application". Google Patents.
- Holeman, D. J. (2009). "Simple Embryo Culture for Plant Breeders A manual of technique for the extraction and in-vitro germination of mature plant embryos with emphasis on the rose". First Edition October 3, 2009.
- Hussain, A., Naz, S., Nazir, H., Shinwari, Z. K., (2011). "Tissue culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Pakistan." *Pak. J. Bot* 43(2): 1069-1078.
- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., Ullah, I., 2012. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (1).
- Idowu, P., Ibitoye, D.O., Ademoyegun, O. T., (2009). "Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops." *African Journal of Biotechnology* 8(16).
- James, C. (2008). "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops". ISAAA Brief No. 37. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Jayasankar, S., Gray, D. J., Litz, R. E., (1999). "High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine." *Plant Cell Reports* 18(7): 533-537.

- Kamari, G. (1991). "The genus *Fritillaria* L." Greece: taxonomy and karyology. Bot. Chronika 10: 253-270.
- Kamphuis, E., (2002). Organic Flower Bulbs from Holland: Outlook for the French Market, Community Research Center Economics, University of Groningen.
- Karagöz, A. ve C. O. Sabancı, (2016). "Türkiye'nin Bitkisel Biyolojik Çeşitliliğinin Korunması ve Sürdürülebilir Kullanımına İlişkin Sorunlar ve Çözüm Önerileri." Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi 25(1).
- Karagüzel, Ö., Aydınşakir, K., Kaya, A.S., (2007). "Dünyada Ve Türkiye'de Çiçek Soğanları Sektörünün Durumu." Derim 24(1): 1-10.
- Karaoğlu, C. (2004). Göl Soğanı (*Leucojum aestivum* L.)'nin In Vitro Koşullarında Hızlı Çoğaltımı. FenBilimleri Enstitüsü. Ankara, Ankara Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi
- Karuppusamy, S. (2009). "A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures." Journal of Medicinal Plants Research 3(13): 1222-1239.
- Khan, R. S., Alam, S., Munir, I., Azadi, P., Nakamura, I., Mii, M.,(2011). "Botrytis cinerea-resistant marker-free *Petunia hybrida* produced using the MAT vector system." Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 106(1): 11-20.
- Khaniki, G. B. (1995). "Meiotic studies on some Iranian *Centaurea* (Compositae)." Cytologia 60(4): 341-346.
- Kiplinger, D. C. (1967). Easter lilies: The culture, diseases, insects and economics of Easter lilies.
- Kizil, S. ve K. M. 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(3): 133-138.
- Kizil, S., Khawar, K. M., Sessiz, U., (2013). "Bulblets regeneration from in vitro improved leaf of *Fritillaria imperialis* L. and *F. persica* L." Current Opinion in Biotechnology(24): S39.
- Kizil, S., Kirici, S., Çakmak, Ö., Khawar, K. M., (2008). "Effects of sowing periods and P application rates on yield and oil composition of black cumin (*Nigella sativa* L.)." Journal Of Food Agriculture And Environment 6(2): 242.

- Komarov, I. ve S. Y. Slavyanov (1968). "The two Coulomb centres problem at large centre separation." *Journal of Physics B: Atomic and Molecular Physics* 1(6): 1066.
- Kosenko, V. (1991). "Pollen morphology of the genus *Fritillaria* (Liliaceae)." *Bot. Zh.(Leningrad)* 76: 1696-1706.
- Kosenko, V. (1992). "Pollen morphology and systematic problems of the Liliaceae family." *Bot. Zh., ross. Akad. Nauk* 77(3): 1-15.
- Kosenko, V. (1999). "Contributions to the pollen morphology and taxonomy of the Liliaceae." *Grana* 38(1): 20-30.
- Koyuncu, M. (2000). *Fritillaria minima* Rix (Liliaceae). [Kar lâlesi, Terslâle (*Fritillaria minima* Rix [Zambakgiller])]. *Karaca Arboretum Magazine* 5(4): 181-184.
- Kukulczanka, K., Kromer, K., Czastka, B., (1988). Propagation of *Fritillaria meleagris* L. through tissue culture. III International Symposium on Growth Regulators in Ornamental Horticulture 251.
- Kulkhanova, D., Erst, A. A., Novikova, T. I., (2015). "In vitro regeneration from bulbous scales of *Fritillaria sonnikovae*." *Russian journal of developmental biology* 46(4): 215-221.
- Li, K., Wu, W., Zheng, Y., Dai, Y., Xiang, L., Liao, K., (2009). "Genetic diversity of *Fritillaria* from Sichuan province based on ISSR." *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica* 34(17): 2149-2154.
- Li, S.-l., Chan, S., Li, P., Chiu, F. C., (1999). "Pre-column derivatization and gas chromatographic determination of alkaloids in bulbs of *Fritillaria*." *Journal of chromatography A* 859(2): 183-192.
- Li, X., et al. (2002). "Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*." *Journal of Plant Physiology* 159(3): 313-319.
- Li, Y., Li, Y. X., Lin, J., Xu, Y., Yan, F., Tang, L., Chen, F., (2003). "Identification of bulb from *Fritillaria cirrhosa* by PCR with specific primers." *Planta medica* 69(02): 186-188.
- Lin, G., Li, P., Li, S. L., Chan, S. W., (2001). "Chromatographic analysis of *Fritillaria* isosteroidal alkaloids, the active ingredients of Beimu, the

- antitussive traditional Chinese medicinal herb." *Journal of chromatography A* 935(1): 321-338.
- Linnaeus, C. ve W. T. Stearn (1960). *Genera plantarum*, Engelmann Weinheim.
- Liu, D. (1988). Transfer of *Haynaldia villosa* chromosomes into *Triticum aestivum*. *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp., IPSR*.
- Liu, Y., Wang, W., Li, Z., (1996). "Experiment on the rapid reproduction of *Fritillaria taipaiensis* PY Li." *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica* 21(1): 15-17, 63.
- Mansuroğlu, S. ve E. Gürel (2001). "Mikroçoğaltım." *Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S.(edt.) 374: 262-281.
- Marija, P., Subotić, A., Jevremović, S., Trifunović, M., (2011). "Somatic embryogenesis and bulblet regeneration in snakehead fritillary (*Fritillaria meleagris* L.)." *African Journal of Biotechnology* 10(72): 16181-16188.
- Marino, G. ve S. Battistini (1989). Leaf-callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*: effect of media pH. I International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 280.
- Maynard, C., Xing, Z., Bickel, S., Powell, W., (1998). "Using genetic engineering to help save the American chestnut: a progress report." *Journal of the American Chestnut Foundation* 12: 40-56.
- Misra, M. ve A. Misra (1993). Genetic transformation of grass pea. DAE Symposium on Photosynth. & Plant Molecular Biology, BRNS/DAE, Govt. of India.
- Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Sardari, M., Ebrahimie, E., (2008). "Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L." *Acta Physiologiae Plantarum* 30(3): 395-399.
- Mohammadinejad, R., Karimi, S., Iravani, S., Varma, R. S., (2016). "Plant-derived nanostructures: types and applications." *Green Chemistry* 18(1): 20-52.
- Moore, P. G. (1983). *The business of risk*, Cambridge University Press.
- Morrison, R. A. ve D. A. Evans (1988). "Haploid plants from tissue culture: new plant varieties in a shortened time frame." *Nature Biotechnology* 6(6): 684-690.

- Motomura, T., Hidaka, T., Akihama, T., Katagi, S., Berhow, M.A., Moriguchi, T., Omura, M., (1997). "Protoplast fusion for production of hybrid plants between Citrus and its related genera." *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 65(4): 685-692.
- Murashige, T. (1974). "Plant propagation through tissue cultures." *Annual review of plant physiology* 25(1): 135-166.
- Murashige, T. ve F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.
- Navarro Mastache, L. (2004). Large scale commercial micropropagation in Mexico. The experience of Agromod, SA de CV. II International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 748.
- Norrish, K. ve R. Taylor (1961). "The isomorphous replacement of iron by aluminium in soil goethites." *European Journal of Soil Science* 12(2): 294-306.
- Norton, H. H., Hunn, E. S., Martinsen, C. S., Keely, P. B., (1984). "Vegetable food products of the foraging economies of the Pacific Northwest." *Ecology of Food and Nutrition* 14(3): 219-228.
- Ohkawa, M. ve J. Kitajima (1998). "Studies on the Propagation of *Fritillaria camtschaticensis* Ker-Gawl. by in Vitro Culture: I 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* 67(2): 242-248.
- Ohkawa, M., Kitajima, J., Nishino, K., Ohkawa, N., (1999). "Studies on the Propagation of *Fritillaria camtschaticensis* Ker-Gawl. by In Vitro Culture II: Effect of Plant Hormones on the Growth, Leaf Emergence, and Rooting of Bulblets." *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 68(1): 184-188.
- 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* 37(4): 243-247.
- Ohkawa, M. ve K. Nishino (2000). "Effects of sucrose and polyethylene glycol on leaf emergence, rooting and bulblet growth of *Fritillaria camtschaticensis* Ker-Gawl." *Environmental Control in Biology* 38(2): 99-103.

- Otani, M. ve T. Shimada (1997). "Micropropagation of *Fritillaria camtschaticensis* (L.) Ker-Gawl." Bulletin of RIAR Ishikawa Agricultural College(5): 39-44.
- Ozhatay, N. ve A. Byfield (1995). "A new *Fritillaria* L.(Liliaceae) from south-west Turkey." Karaca Arbor. Mag 3(1): 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(2): 111-120.
- Özhatay, N. ve Ş. K. B. GÜRDAL (2013). "Check-list of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey VI." Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University 43(1): 33-83.
- Özhatay, N. ve Ş. K. B. (2006). "Check-list of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey III." Turkish Journal of Botany 30(4): 281-316.
- Öztürk, M. A. ve Ö. Seçmen (1992). "Bitki ekolojisi." Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları 141.
- Paek, K. ve H. Murthy (2002). "High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*." Plant cell, tissue and organ culture 68(3): 247-252.
- Paek, K. Y., Sung, N. S., Park, C. H., (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.
- Pareek, L. ve P. Swarnkar (1997). Trends in plant tissue culture and biotechnology, Agro Botanical Publishers.
- Park, Y., Barrett, J. D., Bonga, J. M., (1998). "Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 34(3): 231-239.
- Pehlivan, E. C., Daneshvarroyandazagh, S., Teykin, E. C., Çiftçi, H. S., (2014). "*Lilium Candidum* L.'da In Vitro Mikroçoğaltım ile Kozmetik Sanayisine Ham Madde Temini." Türk Tarım ve Doğa Bilimleri 7(7): 1911-1916.
- Persson, J. ve K. Persson (1998). "*Fritillaria sororum* (Liliaceae): a new species from Turkey." New Plantsman (United Kingdom).

- Petric, M., Jevremović, S., Trifunovic, M., Tadic, V., Milosevic, S., Subotić, A., (2014). "Activity of antioxidant enzymes during induction of morphogenesis of *Fritillaria meleagris* in bulb scale culture." Turkish Journal of Biology 38(3): 328-338.
- Petrić, M., Subotić, A., Jevremović, S., Trifunovic-Momcilov, M., Tadic, V., Grujic, M., Vujcic, Z., (2015). "Esterase and peroxidase isoforms in different stages of morphogenesis in *Fritillaria meleagris* L. in bulb-scale culture." Comptes rendus biologiques 338(12): 793-802.
- Pignatti, S. (1982). "Flora d'Italia. 3 vols." Bologna: Edagricole.
- PT/BKD. 2008. Bloembollen, Voorjaarsbloeiërs, heplante oppervlakten, seizoen 2007/2008.
- Rahimi, M., Daneshvar, M. H., Heidari, M., (2014). "Propagation and bulb formation of *Fritillaria* (*Fritillaria imperialis* L.) via in vitro culture." International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences 4(3): 707-710.
- Rahimi, M., Daneshvar, M. H., Heidari, M., Yari, F., (2013). "In vitro micropropagation of *Fritillaria imperialis* L. through induction of indirect organogenesis." International journal of agronomy and plant production 4(3): 418-424.
- Rao, S. R. ve G. Ravishankar (2002). "Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites." Biotechnology advances 20(2): 101-153.
- Rech Filho, A., Dal Vesco, L. L., Nodari, R. O., Lischka, R. W., Müller, C. V., Guerra, M. P., (2005). "Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest." Biodiversity & Conservation 14(8): 1799-1808.
- Rechinger, K. (1990). "Liliaceae II." Flora Iranica 165: 140-148.
- Rees, A. R. (1992). Ornamental bulbs, corms and tubers, CAB international.
- T.C. Resmi Gazete, Doğal Çiçek Soğanlarının 2017 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğ, (29921 mükerrer), 17.12.2016, Ek-1.
- Rix, E. (1975). "Notes on *Fritillaria* (Liliaceae) in the Eastern Mediterranean Region, III." Kew Bulletin: 153-162.
- Rix, E. (1979). "Notes on *Fritillaria* (Liliaceae) in the Eastern Mediterranean Region: IV." Kew Bulletin: 585-600.

- Rix, E. (2001). "*Fritillaria* L." A revised classification. The *Fritillaria* Group of the Alpine Garden Society, UK.
- Rix, M. ve R. 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.
- Sasson, A. (2000). "Biotechnology and food production: Relevance to developing countries." Food Biotechnology 14(3): 195-233.
- Scanzoni, E. (1971). "Blutenzauber aus Zwiebeln und Knollen."
- Schenk, P. (1984). De Bloementeelt van Lelies, Bloementeelt-Informatie.
- Sengar RS, Chaudhary R, Tyagi SK (2010) Present status and scope of floriculture developed through different biological tools. Res J. of Agri. Sci. 1(4): 306-314.
- Seon, J. H., Paek, K. Y., Gao, W. Y., Park, C. H., Sung, N. S., (1997)." Factors affecting micropropagation of pathogen-free stocks in *Fritillaria thunbergii*." II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 3: Agricultural Production, Post Harvest Techniques, Biotechnology 502.
- Shiau, Y. J., (2000). "Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hsia et K. C. Hsia I. The induction of bulb scale and embryogenic callus from different source explants." Journal of Agricultural Research of China 49: 29-38.
- Siahsar, B., Rahimi, M., Tavassoli, A., Raissi, A., (2011). "Application of biotechnology in production of medicinal plants." Am Eurasian J Agric Environ Sci 11(3): 439-444.
- Sinclair, T. R., Purcell, L. C., Sneller, C. H., (2004). "Crop transformation and the challenge to increase yield potential." Trends in plant science 9(2): 70-75.
- Skoog, F. ve C. Miller (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. Vitro, Symp. Soc. Exp. Biol.
- Smith, S. (1985). Measurement of the quality of apples: Recommendations of an EEC working group, Office for Official Publ. of the European Communities.
- Stearn, W. T. (1957). An introduction to the Species Plantarum and cognate botanical works of Carl Linnaeus.
- Subotić, A., Jevremović S., Trifunović, M., Petrić, M., (2010). "Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Fritillaria meleagris*." Biologia plantarum 54(3): 592-596.

- Sudharsan, C., Jibi Manuel, S., Al-Sabah, L., (2008). "Haploid plant production from pollen grains of Sturt's Desert Pea via Somatic Embryogenesis." American-Eurasian J Sci Res 3: 44-47.
- Sun, C. S., Chu, C. C., Wang, C. C., (1977). "Callus formation and organ regeneration in the tissue culture of *Fritillaria thunbergii* Miq." Chih wu hsueh pao.
- Sun, C. ve D. Wang (1991). *Fritillaria* spp.(Fritillary): in vitro culture and the regeneration of plants. Medicinal and Aromatic Plants III, Springer: 258-269.
- Şahin, U., Ekinci, M., Kiziloğlu, F. M., Yildirim, E., Turan, M., Kotan, R., Ors, S., (2015). "Ameliorative effects of plant growth promoting bacteria on water-yield relationships, growth, and nutrient uptake of lettuce plants under different irrigation levels." Hortscience 50(9): 1379-1386.
- Şener, E., Turgut, H., Yalçın, İ., Ören, İ., Türker, L., Çelebi, N., Akın, A., (1994). "Structure-activity relationships of some antimicrobial 5-substituted 2-(3-pyridyl) benzoxazoles using quantum-chemical calculations." international Journal of Pharmaceutics 110(2): 109-115.
- Tabin, S. (2016). "Novel Study On In Vitro Culture Of Medicinal Pla."
- Tamura, M. (1998). Liliaceae. Flowering Plants· Monocotyledons, Springer: 343-353.
- Tan, F. ve S. Gao (1998). "The effect of growth regulators on growth of cultured bulblets of *Fritillaria unibracteata* Hisao et KC Hsia." Journal of Plant Resources and Environment 8(1): 52-55.
- Tan, K. ve R. McBeath (1987). "Notes on some *Fritillaries* in cultivation." Herbertia (USA).
- Tang, W. (1995). " Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of *Fritillaria ussuriensis* M." Journal of Northeast Agricultural University English Edition 2: 152-155.
- Tang, W., (1995). "A study of morphogenesis in tissue cultures of *Fritillaria ussuriensis* Maxim. ." Research of Agricultural Modernization 16(4): 267-269.
- Tang, W. ve J. Y. Wu (1993). "Studies on somatic embryogenesis in *Fritillaria ussuriensis*." Acta Agronomica Sinica 19(2): 188-189.

- Tekşen, M., Aytaç, Z., (2004). "New *Fritillaria* L. taxa from Turkey." Israel Journal of Plant Sciences 52(4): 347-355.
- Tekşen, M. ve Z. Aytaç (2008). *Fritillaria mughlae* (Liliaceae), a new species from Turkey. Annales Botanici Fennici, BioOne. 45: 141–147.
- Tekşen, M. ve Z. Aytaç (2011). "The revision of the genus *Fritillaria* L.(Liliaceae) in the Mediterranean region (Turkey)." Turkish Journal of Botany 35(5): 447-478.
- Thorpe, T. A. (2007). "History of plant tissue culture." Molecular biotechnology 37(2): 169-180.
- Tıprıdamaz, R. (2003). "Rooting and acclimatization of in vitro micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.) bulblets." Mediterranean Agricultural Sciences 16(2): 121-126.
- Toriyama, K., Hinata, K., Kameya, T., Ishii, R., (1987). "Production of somatic hybrid plants, 'Brassicomoricaandia', through protoplast fusion between *Moricaandia arvensis* and *Brassica oleracea*." Plant Science 48(2): 123-128.
- Torres-Muñoz, L. ve B. Rodriguez-Garay (1996). "Somatic embryogenesis in the threatened cactus *Turbinicarpus pseudomacroeche* (Buxbaum & Backeberg)." J. PACD 1: 36-38.
- Tutin, T. G. (1980). Flora europaea, Cambridge University Press.
- 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(5): 552-560.
- Tyagi, R. K., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z., Tyagi, H., (2007). "Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers." In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 43(1): 51-58.
- Ulug, B. (1997). "Researches on the effect of different ecologies and propagation of persian lily bulbs (*Fritillaria persica* Linn.) with various vegetative methods."
- Ulus, A. ve N. Seyidoğlu (2006). "Bazı doğal geofitlerin doku kültürü ile üretimi." Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University| İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi 56(1): 71-80.
- URL-1, www.flowerbbsatalboutflowerbulbs.com Global Flower Bulb Production, Garden Value Outlet, 08.01.2017

- URL-2, <http://science.jrank.org/pages/3933/Lily-Family-Liliaceae.html> Lily Family (Liliaceae), 15.06.2017.
- URL-3, <http://www.terslaleler.com/medeniyet.html> Medeniyetlerin Gözdesi Ters Laleler, 12.06.2017
- URL-4, <http://www.chineseherbshealing.com/fritillaria-chuan-bei-mu/> Chinese Herbs Healing, 17.06.2017
- URL-5, <http://www.biologydiscussion.com/biotechnology/clonal-propagation/micro-propagation-technique-factors-applications-and-disadvantages/10732> Micro propagation: Technique, Factors, Applications and Disadvantages 17.06.2017
- URL-6, <http://dogalciceksoganlari.blogspot.com.tr/2012/04/2soganli-bitkilerde-uretim-cogaltma.html> Soğanlı Bitkilerde Üretim (Çoğaltma) Teknikleri 17.06.2017
- Vasil, I. K. (1994). "Molecular improvement of cereals." Plant Molecular Biology 25(6): 925-937.
- Vasil, I. K. (2008). "A short history of plant biotechnology." Phytochemistry Reviews 7(3): 387-394.
- Wallis, L. W. ve J. C. Mather (1977). Tulips Bulb Production. Fisheries and Food.
- Wang, D., Wang, S., Du, Q., Wang, N., Liu, S., Wang, X., Jiang, J., (2014). "Optimization of extraction and enrichment of steroidal alkaloids from Bulbs of cultivated *Fritillaria cirrhosa*." BioMed research international 2014.
- Wang, L. S., Ding, H. B., Wang, Y. F., Yang, H. M., Jia, T. Y. (1990). "Chromosomal variation in callus subcultures of *Fritillaria pallidiflora*." Acta Botanica Sinica 32(3): 241-244.
- Wang, S., Gao, W., Chen, H., Xiao, P., (2005). "New starches from *Fritillaria* species medicinal plants." Carbohydrate polymers 61(1): 111-114.
- Wang, Y. H., (2010). "Study on fast proliferation conditions of *Fritillaria cirrhosa* D. Don callus." South west China Journal of Agricultural Sciences 23(2): 183-186.
- Wenyuan, G., Zhiliang, L., Peigen, X., (1996). "A Summary of the Study in *Fritillaria thunbergii* Mig [J]." China Journal of Chinese materia medica 6.
- Werbrouck, S. P. ve P. C. Debergh (1994). "Applied aspects of plant regeneration." Plant Cell Culture: A Practical Approach. Second Editn, ed. by RA Dixon, RA Gonzales, IRL Oxford University Press Publ., Oxford, UK: 127-135.

- Witomska, M. (2001). "Levels of soluble carbohydrates, ABA and cytokinins in the initial material and the regeneration in vitro of *Fritillaria imperialis* L." Annals of Warsaw Agricultural University. Horticulture 22.
- 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): 21-28.
- Witomska, M., Wilk, T., Łukaszewska, A., (1998). "Effect of sterilization method on infection level and regeneration in vitro of explants from bulbs of *Fritillaria imperialis* L." Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach 5: 121-130.
- Xu, R. M., Liu, H. W., Lu, Y., Chen, Z. N., (1997). "Determination of Adenosine and Thymidine in *Fritillaria* Bulbs by Dual Wavelength Ultraviolet Spectrophotometry." ACTA PHARMACEUTICA SINICA; 32, 8; 617-619.
- 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. .
- Yaylacı, Ö., Özgişi, K., Sezer, O., Orhanoğlu, G., Öztürk, D., (2013). "Anatomical studies and conservation status of rare endemic *Hypericum sechmenii* Ocak & Koyuncu (Sect: *Adenosepalum*) from Eskişehir-Turkey." Journal of Selçuk University Natural and Applied Science 2(1): 1-11.
- Yesil-Celiktas, O., Gurel, A., Vardar-Sukan, F., (2010). "Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors." Transworld Research Network, Kerala: 1-54.
- Yeung, E. ve C. Jensen (1981). In vitro fertilization and embryo culture. Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture, Academic Press: 253-271.
- Yıldırım, Ş. (1988). "Türkiye'nin batı yarısı ve kuzeyindeki *Isatis* L." Cruciferae) cinsinin revizyonu. Doğa Türk Botanik Dergisi 12(3): 332-400.
- Zaharof, E. (1989). "Karyological studies of twelve *Fritillaria* species from Greece." Caryologia 42(2): 91-102.
- Zaharof, E. (1989). "Karyotype variation of *Fritillaria graeca* and *F. davisii* from Greece." Nordic journal of botany 9(4): 367-373.
- Zaidi, N., Khan, N.H., Zafar, F., Zafar, S.I., (2000). "Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro." Science Vision Vol 6(1).

- Zencirkiran, M. (2002). "Cold storage of *Freesia refracta* 'Cordula'." New Zealand Journal of crop and Horticultural science 30(3): 171-174.
- Zencirkiran, M. ve A. Mengüç (1999). "General situation of economically valuable flower bulbs native to Turkey." Chronica Hortic 39(2): 15-17.
- Zhang, H., Chen, H., Yang, H., (1995). "Organ regeneration and somatic embryogenesis from young stems of *Fritillaria sinica*." Hua xi yi ke da xue xue bao= Journal of West China University of Medical Sciences= Huaxi yike daxue xuebao/[bian ji zhe, Hua xi yi ke da xue xue bao bian wei hui] 26(1): 33-37.
- Zhao, G. F., Cao, Y., Wu, Y., Fan, F., Zhou, L.J., Yang, W.H., (1983). "Callus induction and organ regeneration in tissue culture of *Fritillaria ussuriensis* Maxim." Chin Bull Bot 1(2): 40-41.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşegül ÇELİK
Doğum Yeri : İstanbul/Eminönü
Doğum Tarihi : 22. 12. 1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İstanbul Kocasınan Lisesi (2006-2010)
Önlisans : Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Görüntüleme Teknikleri (2014-)
Lisans : Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü (2010-2014)
Yüksek Lisans : Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı (2014-2017)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

SAFA Tarım, Biyomühendis, Ar-Ge Uzmanı (07.2017-08.2017)

Sözlü Sunumlar

Çelik, A., Munzuroğlu, Ö., 2017. Studies on the In vitro Micropropagation of *Fritillaria minuta*. International Conference on Advances and Innovations in Engineering (ICAIE) May 10-12. Elazığ.