T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEHLİKE ALTINDAKİ *Bellevalia edirnensis* ÖZHATAY & MATHEW'İN DOKU KÜLTÜRÜ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

EDA AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi SERGUN DAYAN

EDİRNE-2021

EDA AYDIN'ın hazırladığı "TEHLİKE ALTINDAKİ *Bellevalia edirnensis* ÖZHATAY & MATHEW'İN DOKU KÜLTÜRÜ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:	İmza
Prof. Dr. Yalçın KAYA	……
Dr. Öğr. Üyesi Sergun DAYAN	……
Dr. Öğr. Üyesi Orhan Onur AŞKIN	……

Tez Savunma Tarihi:
25/01/2021

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Sergun DAYAN
Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Doç. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

25 / 01 / 2021

Eda AYDIN

İmza

Yüksek Lisans Tezi

TEHLİKE ALTINDAKİ *Bellevalia edirnensis* ÖZHATAY & MATHEW'İN DOKU KÜLTÜRÜ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada *B. edirnensis* bitkisinin farklı eksplantları kullanılarak mikroçoğaltım ve tohumlardan çimlenme denemeleri gerçekleştirilmiştir. *B. edirnensis* tohumlarından yapılan çimlenme denemelerinde hormonsuz MS ortamı kullanılmıştır. Tohumların çimlenmelerinin desteklenmesi için sülfürik asit muamelesiyle skarifikasyon gerçekleştirilmiştir. 0, 10, 20 ve 30 dk olacak şekilde sülfürik asitte bekletilen tohumlarda 1 ay sonunda sırasıyla %0, %10, %46.6 ve %73.3 oranlarında çimlenme meydana gelmiştir. Soğan pul yaprakları kullanılarak kurulan kültür çalışmalarında eksplantlar başlangıç olarak K (hormonsuz), L (2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA), M (2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA) ve N (4 mg/l BAP + 1 mg/l NAA) içeren MS besin ortamlarına alınmıştır. 12 haftalık kültür sonucunda eksplantlardan kallus oluşumu en fazla %91.1 olarak N grubunda, soğancık oluşum yüzdeleri en fazla %97.3 ile M grubunda, son olarak eksplant başına oluşan soğancık sayısı en fazla 4.9 adet ile N grubunda gözlenmiştir. Oluşan soğancıklar köklenme ve gelişim için MS + 30 g/l sükroz, MS + 60 g/l sükroz, MS + 30 g/l sükroz + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP ve MS + 60 g/l sükroz + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP içeren besin ortamlarına aktarılmıştır. 1 ayın sonunda soğan çap artışı en fazla 0.45 cm'den 0.7 cm'ye 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP + 60 g/l sükroz içeren besin ortamında gerçekleşmiştir. Köklenme yüzdesi ve kök boyu %75.8 ve 5.0 cm ile en fazla 30 g/l sükroz içeren hormonsuz besin ortamında meydana gelmiştir. Besin ortamında elde edilen soğancıkların dış ortama alıştırılması işlemi sonucunda %70 oranında başarı sağlanmıştır. Embriyo kültürü için bitkinin olgunlaşmış embriyoları kullanılmıştır. Tohumlar şişirilerek içlerinden çıkarılan embriyolar A (1 mg/l NAA), B (2 mg/l NAA), C (4 mg/l NAA), D (1 mg/l 2,4-D), E (2 mg/l 2,4-D) ve F (4 mg/l 2,4-D) içeren MS ortamlarına alınmıştır. 6 ay süreyle takip edilen embriyolardan yalnızca A ve B

gruplarında sırasıyla %40 ve %7 oranında kallus gelişimi gözlenmiştir. Oluşan kalluslar 6.ayın sonunda kallus büyüme ortamına (KBO) (4 mg/l kin + 0.5 mg/l NAA) alınarak takipleri sürdürülmüştür. Ancak bu ortamda bulunan kalluslarda herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiştir.

Yıl : 2021
Sayfa Sayısı : 93
Anahtar Kelimeler : Mikroçoğaltım, Geofit, Bitki Büyüme Düzenleyicisi, *Bellevalia*

Master Thesis

Researches on Tissue Culture of Critically Endangered *Bellevalia edirnensis* Özhatay & Mathew.

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

In this study, the micropropagation and seed germination experiments using different plant explant of *B. edirnensis* was performed. MS medium without hormones was used in germination experiments of *B.edirnensis* seeds. Scarification was carried out with sulfuric acid application to support the germination of the seeds. Seeds kept in sulfuric acid for 0, 10, 20 and 30 minutes had germination at the rates of 0%, 10%, 46.6% and 73.3%, respectively, at the end of 1 month. Bulb cultures were initiated on MS basal medium including K (hormone-free), L (2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA), M (2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA) and N (4 mg/l BAP + 1 mg/l NAA). After 12 weeks of culture; the highest rate of 91.1% callus formation were recorded on MS medium containing 4 mg/l BAP + 1mg/l NAA, the highest rate of 97.3% bulblet formation on MS medium containing 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA and finally the highest number of 4.9 bulblets per explant from bulb on MS medium containing 4 mg/l BAP + 1 mg/l NAA. Bulblets were subcultured in MS + 60 g/l sucrose, MS + 30 g/l sucrose, MS + 30 g/l sucrose + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP and MS+ 60 g/L sucrose + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP media for rooting and growth. After 1 month of culture; the highest diameter increase of 0.45 cm to 0.7 cm was recorded on MS medium containing 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP + 60g/l sucrose. The highest rooting rate and root lenght of 75.8% and 5.0 cm on hormone-free MS medium containing of 30 g/l sucrose. Bulblets that is improved on *in vitro* micropropagation were transferred to soil after air drying. 70% of plantlets were survived with this method. Mature embryos of the plant were used for embryo culture. Embryo culture was initiated on MS basal medium including A (1 mg/l NAA), B (2 mg/l NAA), C (4 mg/l NAA), D (1 mg/l 2,4-

D), E (2 mg/l 2,4-D) and F (4mg/l 2,4-D). After 6 months of culture 40% and 7% callus formation was observed in A and B groups. The calluses formed were subcultured on the callus growth medium at the end of 6 months. However, no regeneration was observed from the calluses subcultured.

Year : 2021

Number of Pages : 93

Keywords : Micropropagation, Geophyt, Plant Growth Regulator, *Bellevalia*

TEŞEKKÜR

Tüm tez çalışmam süresince beni yönlendiren, destekleyen, ilgi ve bilgisini benimle paylaşan bunların yanı sıra materyal temini konusunda da yardımcı olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Sergun DAYAN'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca maddi manevi her türlü desteklerini hissettiğim sevgili aileme ve özellikle beni en iyi anlayanlardan biri olduğu için canım kardeşim Oğuzcan AYDIN'a, bu yolda ilerleme konusunda en çok örnek aldığım, kendisine hayranlık duyduğum ve beni en güzel şekilde yönlendiren sevgili teyzem Doç. Dr. Sennur ALAY AKSOY'a, tez yazım konusunda ve yaşadığım sıkıntılarda yanımda olduğunu bildiğim ve hissettiğim canım arkadaşım Öğr. Gör. Elif Gözde GÖKKAYA'ya ve yine tüm yüksek lisans eğitimim süresince manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili arkadaşlarım Hale Nur ŞAHİN ve İsmail DUĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını, 2017/156 Numaralı "Edirne Sümbülü (*Bellevalia edirnensis* Özhatay & Mathew)'nün *ex situ* Yöntemlerle Çoğaltılması ve Korunması" isimli proje ile destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER ix

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi

ŞEKİLLER DİZİNİ xiii

ÇİZELGELER DİZİNİ xv

BÖLÜM 1 1

GİRİŞ 1

1.1. Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (IUCN) 3

1.2. IUCN Kırmızı Liste Sınıfları 3

1.3. Geofit Bitkiler 6

1.4. Bitki Doku Kültürünün Tarihçesi 10

1.5. Bitki Doku Kültürü Teknikleri 10

1.6. Genel Bilgiler 16

1.6.1. Edirne Sümbülünün (*Bellevalia edirnensis)* Taksonomisi 16

1.6.2. Edirne Sümbülü (*Bellevalia edirnensis*)'nün Morfolojisi 20

1.6.3. Edirne Sümbülü (*Bellevalia edirnensis)'*nün Biyolojisi 23

BÖLÜM 2 28

LİTERATÜR ÖZETİ 28

BÖLÜM 3 36

MATERYAL METOD 36

3.1. Materyal 36

3.1.1. Materyalin Temini 36

3.1.2. Kimyasal Maddeler 36
3.1.3. Kullanılan Malzemeler 37
3.2. Yöntem 37
3.2.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması 37
3.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması ve İçeriği 37
3.2.3. Deneyde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu 41
3.2.4. Doku Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Soğanların ve Tohumların Sterilizasyonu 41
3.2.5. Soğan Eksplantlarının Hazırlanması 41
3.2.6. Embriyo Kültüründe Kullanılan Tohumların Hazırlanması 42
3.2.7. Çimlenmede Kullanılan Tohumların Hazırlanması 43
3.2.8. Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi 43
BÖLÜM 4 44
BULGULAR ve TARTIŞMA 44
4.1. Sterilizasyon Sonuçları 44
4.2. Embriyo Kültürü Sonuçları 47
4.3. Çimlenme Sonuçları 51
4.4. Soğan Pulu Kültürü Sonuçları 55
4.5. Soğancık Gelişimi ve Köklenme Sonuçları 59
4.6. Aklimatizasyon Sonuçları 62
BÖLÜM 5 67
SONUÇ VE ÖNERİLER 67
KAYNAKLAR 70
ÖZGEÇMİŞ 78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Santigrat derece

cm : Santimetre

g : Gram

l : Litre

mg : Miligram

ml : Mililitre

µM : Mikromolar

2,4-D : 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit

2-iP : (2-Isopentenyl)adenine

APG III: Angiosperm Phylogeny Group (Evrimsel Kapalı Tohumlu Gelişimi Topluluğu III)

BA : 6-Benzyladenine

BAP : 6-Benzylaminopurin

BBD : Bitki büyüme düzenleyicisi

CITES : The Convention on International Trade In Endangered Species of Wild Fauna and Flora

CR : Çok tehlikede

DD : Yetersiz

EB : 24-epibrassinolide

EN : Tehlikede

EW : Doğada tükenmiş

EX : Tükenmiş

GA_3 : Giberllik asit

HCl : Hidroklorik asit

IAA : İndol-3-asetik asit

IBA : İndol 3-bütirik asit

IUCN : Uluslararası Doğayı Koruma Birliği

JA : Jasmonik asit

KIN : Kinetin

KNAA: *Potasyum tuzlu Naftalin asetik asit*

LR : Az tehdit altında

MS : Murashige and Skoog

NAA : Naftalin asetik asit

NaClO : Sodyum hipoklorit

NaOH : Sodyum Hidroksit

NE : Değerlendirilemeyen

PBA : Tetrahidropiranilbenzil Adenin

TDZ : Thidiazuron

VU : Zarar görebilir

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mikroçoğaltım metodları. 15
Şekil 1.2. *Bellevalia edirnensis* çizimi. 19
Şekil 1.3. *B. edirnensis*: A. Toprakaltı kısımları; B. Yeni çiçeklenen bitkide yaprak yapısı; C. Yaprak kenarındaki belirgin silli yapı. 20
Şekil 1.4. *B. edirnensis*'de meyve gelişimi ve olgunlaşması. 21
Şekil 1.5. Edirne Sümbülü (*B. edirnensis*)'nün meyveli bitki ve tohumları. 22
Şekil 1.6. *Bellevalia edirnensis* 2n=24. A. Somatik hücre B. Karyotip. 23
Şekil 1.7. *B. edirnensis*'de çiçek kurulu. 24
Şekil 1.8. Edirne Sümbülü (*B. edirnensis*) 'nün fenolojisi. A. Soğan; B. Toprak üzerinde ilk yapraklar; C. Tomurcuklu birey; D. Çiçek durumu. 25
Şekil 1.9. Edirne Sümbülü'nün güncel lokasyonları. 26
Şekil 3.1. Kültüre alınan soğan eksplantları. 42
Şekil 4.1. Soğan pulu kültürü sırasında gözlenen kontaminasyon. 44
Şekil 4.2. Embriyo kültürü sırasında gözlenen kontaminasyon. 45
Şekil 4.3. 6 ay sonunda A ve B gruplarında oluşan kalluslar. 48
Şekil 4.4. K.B.O'ya aktarılan kallusların 1. ay sonundaki gelişimi. 50
Şekil 4.5. K.B.O'ya aktarılan kalluslar. 51
Şekil 4.6. 10 dk sülfürik asit muamelesine tutulan tohumlarda çimlenme 1.ay sonuçları. 53
Şekil 4.7. 20 dk sülfürik asit muamelesi gören tohumlarda çimlenme 1.ay sonuçları. 53
Şekil 4.8. 30 dk sülfürik asit muamelesine tabi tutulan tohumlarda çimlenmenin 1. ay sonuçları. 54
Şekil 4.9. M grubu (2 mg/l BAP + 2mg/l NAA) soğan başlangıç kültüründe 1 ayın sonunda soğancık oluşturan eksplantlar. 56
Şekil 4.10. 1 ay sonunda oluşan soğancıkların mikroskop altında görüntüsü. 56

Şekil 4.11. Gelişim ortamında büyüyüp köklenen ve dış ortamda kurumaya bırakılan soğanlar (kültür başlangıcından itibaren18. Ay). 62
Şekil 4.12. Aklimatizasyona alınmak için yıkanan soğanlar (kültür başlangıcından itibaren 18. Ay). 63
Şekil 4.13. Saksılara dikilen soğanların gelişim başlangıcı (kültür başlangıcından itibaren 22. Ay). 63
Şekil 4.14. Saksılardaki soğanların gelişim süreci, soldaki fotoğraf: kültür başlangıcından itibaren 23. Ay. Sağdaki fotoğraf: kültür başlangıcından itibaren 26. Ay. 64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. IUCN tehlike kategorileri. 4
Çizelge 1.2.Türkiye'de Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitki Türlerinin Kategorik Dağılımı. 6
Çizelge 1.3. Geofitlerin soğan ve yumrulu olarak sınıflandırılması. 8
Çizelge 1.4. *Bellevalia edirnensis* türünün APG III sistemine göre taksonomik durumu. 177
Çizelge 1.5. *Bellevalia* cinsinin filogenisi..... 18
Çizelge 1.6. Edirne sümbülü (*B. edirnensis*) 'nün fenolojisi 25
Çizelge 1.7. Edirne Sümbülü tehditleri ve tehdit düzeyleri. 27
Çizelge 3.1. Kullanılan MS ortamının bileşenleri..... 38
Çizelge 3.2. Embriyo kültüründe kullanılan BBD'leri ve konsantrasyonları. 39
Çizelge 3.3. Soğan pulu kültürü başlangıç besin ortamında kullanılan BBD'leri ve konsantrasyonları. 40
Çizelge 3.4. Soğancık gelişim ortamları (SGO) besin içerikleri..... 40
Çizelge 4.1. Embriyo kültüründe 6 ay sonundaki kallus oluşturan eksplant yüzdesi. 48
Çizelge 4.2. 1 aylık çimlenme sonuçları (%). 52
Çizelge 4.3. Farklı miktarlarda hormon kullanılarak oluşturulmuş besin ortamlarının kallus (%), soğancık (%), soğan/eksplant, ortalama soğancık çapı (cm) ve toplam soğancık sayısı üzerine olan etkilerine ait bulgular. 599
Çizelge 4.4. Soğancık gelişimi için kullanılan besin ortamları ve 1 aylık soğan çapı (cm) ve köklenme (cm) sonuçları. 611

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bitkiler ilk çağlardan bu yana insanların yaşamında önemli bir yere sahiptir. Ekosistemdeki döngülerde önemli roller almasının yanında ilaç ham maddesi elde edilmesi, beslenme, kozmetik kullanımı, barınma gibi pek çok alanda daha kullanılmaktadır. Tüm bunların yanı sıra sentezledikleri primer ve sekonder metabolitler ile de pek çok sanayi alanında hammadde ihtiyacını karşılamaktadır.

Günümüzde giderek artan nüfus ve tarım alanlarının yetersizliği sonucunda pek çok tür neslinin tükenmesi sorunuyla karşı karşıya kalmış ve hatta besin kaynaklarının yetersizliği gibi sorunlarla karşı karşıya kalınmıştır.

Türkiye üç farklı iklimin kesişim bölgesinde olması sebebiyle bitki çeşitliliği açısından oldukça zengin bir coğrafya olarak karşımıza çıkmaktadır. Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan fitocoğrafik bölgelerinin kesişimi olan bir konumdadır (Karagöz vd., 2003)**.** Toplam 7 milyon hektar alanda yaklaşık 10.000 farklı bitki türü bulundurmaktadır. Türkiye, ekonomik açıdan önemli birçok bitkiyle birlikte diğer bitkilerin köken ve çeşitliliğinin merkezidir. Yapılan araştırmalara bakılarak tarımın yaklaşık 10.000 yıl önce Anadolu'da gelişmeye başladığı görülmektedir (Harlan, 1992; Karagöz vd., 2003). Ayrıca Türkiye endemizm bakımından da oldukça zengin bir ülkedir. Yeryüzünün belirli bir coğrafik bölgesinde bulunan ve başka yerlerde bulunmayan bitki ve hayvan türleri ''endemik'' olarak adlandırılırken bu olaya ise ''endemizm'' adı verilmektedir. Yunanca ''endemos'' kelimesinden gelmektedir. Endemik türlerin yayılış alanlarında bir kesinlik mevcut değildir, çok dar veya geniş alanlara yayılabilirler. Birkaç metrekareden bir kıtaya kadar yayılış gösterebilmesine rağmen sadece bölgesel veya dar alanda bulunan bitkiler endemik olarak kabul edilmektedir.

Endemik bitkiler paleoendemikler ve neoendemikler olarak ikiye ayrılır;

Paleoendemikler: jeolojik devirlerde geniş yayılışa sahip olan ancak çevre koşullarının zaman içerisinde değişmesiyle dar bir alanda kalıntı olarak yayılış gösteren bitkilerdir (Akın, 2011).

Neoendemikler: dar bir sahada meydana gelip bağlı bulundukları gruptan çok küçük farklarla ayrılan yeni türlerdir (Akın, 2011).

Türkiye'de toplamda 9.222 adet bitki türünün bulunduğu (500'den fazlası soğanlı bitki (Özyavuz, 2012) ve alt türler ile varyeteler de eklendiğinde elde edilen sayının 11.014 taksona ulaştığı bilinmektedir. Bu bitki türlerinin üçte birini (3.708) endemik bitkiler oluşturmaktadır (Güner, Özhatay, Ekim, & Başer , 2000)

Tarihsel olarak Türkiye birçok medeniyet için bir geçiş yolu olmuş ve bu topluluk hareketleri de yabani bitkilerin tohumlarının transferine olanak sağlayarak genetik çeşitliliğin zenginleşmesine katkıda bulunmuştur. Ancak bitki genetik kaynaklarının soylarının tehtid altına girmesi nüfus artışıyla birlikte başlamıştır. Nüfusun artması sanayileşme, kentleşme, otoyol ve baraj inşası, ormancılık ve turizm faaliyetleri gibi pek çok etkinliğin gerçekleşmesine sebep olmuştur. Bu da endemik bitki türlerinin önemli bir kısmının tehlikede olmasına yol açmıştır.

Biyolojik çeşitliliği korumak için dünyada yaygın olarak kabul gören iki farklı yöntem bulunmaktadır. Bunlardan biri ‘’*in situ*’’koruma, diğeri ise ‘*’ex situ*’’ korumadır. *in situ* koruma bitkilerin kendi doğal büyüme alanlarının korunmasını amaçlayan bir yöntem iken *ex situ* koruma ise doğal yaşam alanının dışında biyolojik çeşitlilik özelliklerinin korunmasını amaçlamaktadır (Dilaver, 2013; Dokuzoğlu, 1990)

Bitki türlerinin büyük çoğunluğunun ekosistemlerinin dışındaki alanlarda *ex-situ* olarak korumak mümkün olsa da bitki türlerinin korumak için en önemli yol yaşadıkları habitatı korumaya çalışmaktır. Çünkü canlılar ekosistemde izole olarak değil birbirlerine bağlı olarak yaşamaktadır. Dolayısıyla *ex-situ* yöntemler, *in-situ* yöntemlere destekleyici olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra birçok bitki türünün birlikte görülmesini sağlayan botanik bahçeleri bilimsel araştırmalar açısından oldukça önemlidir ve gelişen biyoteknolojik yöntemler sayesinde de tohum ve doku bankaları da giderek önem kazanmaktadır (Dilaver, 2013; Kaynak, 2001)

1.1. Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (IUCN)

IUCN 1948 yılında kurulmuş olan ve amacı dünyanın doğal yaşam alanlarını ve canlı türlerini korumak olan bir kuruluştur. İlk 10 yıllık süreçte esas amacı insan faaliyetlerinin doğa üzerindeki etkilerini araştırmak olan kuruluş 1960 ve 1970'li yıllardan sonra çalışmalarını daha çok canlı türlerinin hayatta kalması ve hayatta kalmaları için gerekli habitatın korunması üzerine yoğunlaştırmıştır.

IUCN 1964 yılında türlerin küresel yok olma riski ile ilgili tehdit altındaki türler için kırmızı listesini oluşturmuş ve belirli aralıklarla bu listede güncellemeler yapmaktadır.

Bu kuruluş doğanın korunması için bazı önemli sözleşmelerin hazırlanmasında önemli rol oynamıştır (IUCN(b), 2019).

Ülkemiz de bu sözleşmelerden bazılarına imza atmıştır;

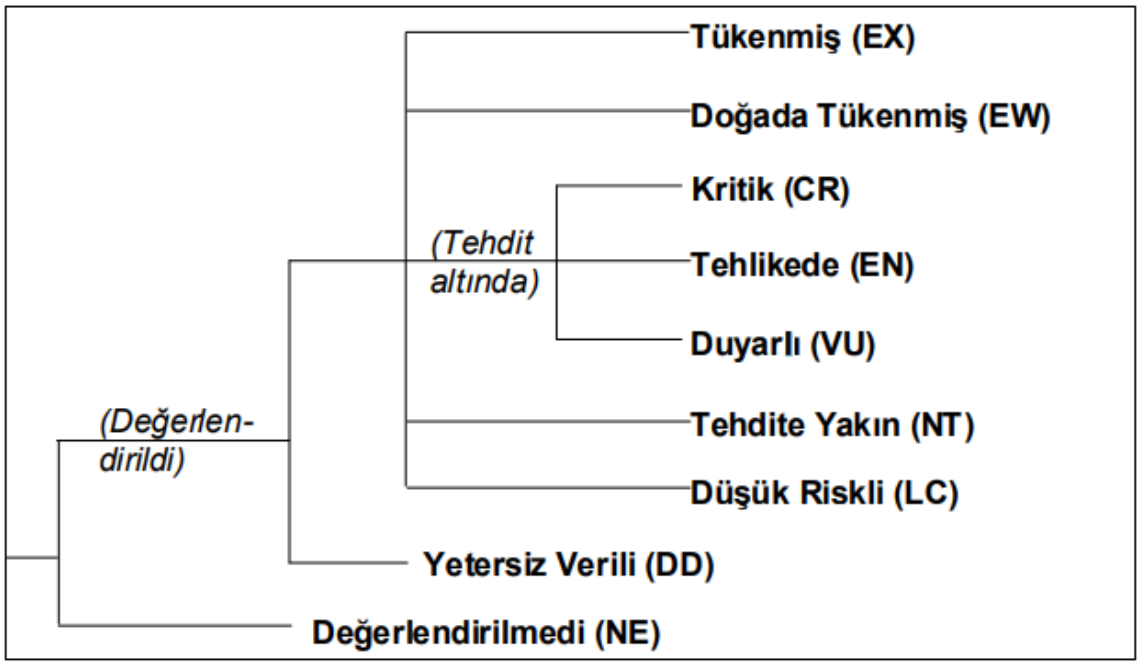
- Akdeniz'de Özel Koruma Alanları ve Biyolojik Çeşitliliğe İlişkin Protokol (1983)
- Bern kongresi (1984)
- Barselona kongresi (1988)
- Ramsar kongresi (Özellikle Su Kuşları Yaşama Alanı Olarak Uluslararası Öneme Sahip Sulak Alanlar Sözleşmesi) (1994)
- Bükreş kongresi (1994)
- CITES (Nesli Tehlike Altında Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme) (1996)
- Biyolojik çeşitliliğin korunması sözleşmesi (Rio Kongresi) (1997)
- Erozyonla mücadele sözleşmesi (1998)
- Avrupa peyzaj sözleşmesi (2000)
- Cartagena protokolü (2004)
- Kyoto protokolü (2009) (Karagöz vd., 2003)

1.2. IUCN Kırmızı Liste Sınıfları

IUCN kırmızı liste sınıfları (Çizelge 1.1) ve kriterleri küresel olarak tükenme riskiyle karşı karşıya olan türlerin kolaylıkla belirlenebilmesi için oluşturulmuş olan bir

sistemdir. Sistemin amacı farklı türleri tükenme risklerine göre sınıflandırmak olsa da koruma yöntemleri açısından önceliklerin belirlenmesi açısından tek yöntem değildir (IUCN(a), 2019).

Çizelge 1.1. IUCN tehlike kategorileri.



Tükenmiş (EX); taksonun mevcut dağılım alanında bilinen ve/veya tahmin edilen habitatta, uygun periyodik taramalar (günlük, mevsimlik, yıllık) sonucunda hiçbir bireyin kaydedilememesi, yaşayan son bireyin de öldüğüne dair hiçbir şüphe kalmadığında takson Tükenmiş sayılabilir.

Doğada Tükenmiş (EW); taksonun mevcut dağılım alanında bilinen ve/veya tahmin edilen habitatta, uygun taramalar sonucunda hiçbir bireyin kaydedilememesi durumunda, sadece tarımda, tutsak olarak (kafes) veya geniş dağılım alanının çok dışında yerleştirilmiş popülasyonlar halinde bulunduğu bilinen bir takson Doğada Tükenmiş sayılabilir.

Çok tehlikede (CR); Bir takson çok yakın gelecekte nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıyaysa bu kategoride ele alınır.

Tehlikede (EN); bir takson yüksek risk altında olup CR kategorisinde yer almıyorsa EN kategorisinde ele alınır.

Zarar Görebilir (VU); CR ve EN kategorilerinde olmayıp gelecekte tehdit altında olan taksonlar bu kategoride ele alınır.

Az Tehdit Altında (LR); CR, EN ve VU kateorilerinde yer almayan nispeten daha iyi durumdaki taksonların bulunduğu kategoridir. 3 alt kategorisi vardır.

- Korunma önlemi gerektiren (cd); 5 yıl içerisinde CR, EN ve VU kategorilerinden birine girebilir.
- Tehdit altına girebilir (nt); VU kategorisine girebilir.
- En az endişe verici (lc); tehdit altında olmayan taksonlar.

Veri Yetersiz (DD); bir taksonun dağılımı ve sayısı hakkınsa yeterli bilgiye sahip değilse bu kategoride ele alınır.

Değerlendirilemeyen (NE); herhangi bir kategoride bulunmayan taksonlardır (Ekim vd., 2000).

Türkiye'de CR, EN, VU kategorilerinde bulunan 1633 endemik bitki bulunmaktadır. Bunun yanı sıra LR kategorisinde 1586 ve yayılışları hakkında yeterli bilgi bulunmaması sebebiyle değerlendirmeye alınmayan 273 adet endemik takson bulunmaktadır (Çizelge 1.2) (Ekim, vd., 2000).

Çizelge 1.2.Türkiye'de Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitki Türlerinin Kategorik Dağılımı (Uzun vd., 2005).

IUCN Tehlike kategorileri	**Endemik**	**Nadir**	**Toplam**
Tükenmiş - Extinct (Ex)	8	4	12
Tehlikede - Endangered (E)	46	60	106
Zarar Görebilir - Vulnerable (V)	183	205	388
Nadir - Rare (R)	1701	1310	3010
Meçhul - Indeterminate (I)	49	78	127
Yetersizce Bilinenler - Insufficiently Known (K)	282	362	644
Tehlike Dışı - Out of Danger (O)	5	-	5
Nadir veya Tehdit Altında Olmayanlar – (nt)	798	-	798
Toplam	3072	2019	5091

1.3. Geofit Bitkiler

Ülkemizdeki biyolojik zenginliğin önemli bir bölümünü oluşturan ve büyük bir kısmı süs bitkisi ve şifalı bitki olarak ekonomik potansiyele sahip yaklaşık 850 civarında geofit tür bulunmaktadır (Kaya, 2014).

Geofit, yer anlamına gelen ''geo'' ile bitki anlamına gelen ''phyta'' kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuş ''yer bitkileri'' anlamına gelen latince bir kelimedir. Geofit bitkilerde gövde soğan, yumru, korm veya rizom şekillerinde ve toprak seviyesinin altında yer almaktadır (Alp, 2006)

Genel özellikleri;

- Yılın büyük bir bölümünü toprak altında geçirirler.
- Çiçek ve yaprak gelişimi aynı zamanda olabileceği gibi farklı zamanlarda da gerçekleşebilir.
- Çiçekleri dikkat çekici olmasına rağmen çiçeklenme süreleri kısadır.
- Toprak üstü organları büyümenin tamamlanmasından sonra kuruyarak ölürken toprak altında bulunan ve soğan benzeri depo organları yaşamaya devam eder (Özer & Akdemir, 2014).

- Geofitler tohumlu bitkiler (Spermatophyta) bölümü, kapalı tohumlu bitkiler (Angiospermae) alt bölümü, tek çenekliler (monocotyledoneae) ve çift çenekliler (dicotyledoneae) sınıfında yer almaktadır (De Hertogh & Le Nard, 1992).
- 42 tane familyanın üyesi olmalarına karşın büyük bir çoğunluğu Liliaceae, Amarylliadaceae ve İridaceae afmilyasında bulunmaktadır. (De Hertogh & Le Nard, 1992).
- Deniz seviyesinden yüksek rakımlı alanlara kadar pek çok iklim koşulunda yetişirler (Koyuncu, 1994).
- En çok ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde gelişme gösterirken yazın sıcak ve kurak aylarında ve kışın donlu ve karlı aylarında dormansi haline geçerler (Koyuncu, 1994).

Geofitlerin büyük bir çoğunluğu 23° kuzey ve 45° güney enlemlerinde yer almaktadır. Dünyadaki geofit sayısı yaklaşık olarak 4300 civarında olmakla birlikte 2000 kadarı Güney Afrika'dadır. Geofit çeşitliliği açısından zengin olan diğer ülkeler ise ABD, Avustralya ve Akdeniz ikliminin yaygın olduğu ülkelerdir. Ülkemiz de Akdeniz ülkelerinden biri olması sebebiyle geofitler açısından oldukça zengindir. (Dallman, 1998) Ülkemiz florasında yaklaşık 850 geofit türü vardır ve bunların 162 tanesi endemiktir (Kaya, 2014).

Geofitlerin soğan (bulb), korm, yumru ve rizom olmak üzere dört çeşit gövde metamorfozu bulunmaktadır (Çizelge 1.3).

- Soğan (Bulb); Kısa, etli, çoğunlukla dikey uran, tepesinde büyüme konisi veya çiçek taslağı bulunduran kalın etli pullarla kaplanmış özelleşmiş bir toprak altı gövdesidir (MEGEP, 2016).

- Korm (Corm, Sert Soğan, Soğanımsı Yumru); Olgunlaşmış bir soğanımsı gövdenin etrafını kuru pul benzeri yapraklar ile kaplanmış, kısa, kalın, besin depolu gövdelerdir. Boğumlar ve boğum araları iyice belirgin bütün bir gövde yapısındadır ve gövde etrafı incelmiş, ipliksi ''tunik'' adı verilen katmanla çevrilidir. Soğanımsı gövdenin tepesinde tepe sürün tomurcuğu yer alır (MEGEP, 2016).

- Yumru (Tuber, Tuberkül); Toprak altı gövesinin yedek besin maddelerinin depolanması ile irileşmiş olan uç kısmıdır. Etsi ve nişastadan zengindir. Koruma derisi bütün halinedir. Her yönden kök sürme yeteneğine sahiptir (MEGEP, 2016).

Rizom (Toprak Altı Gövdesi); Toprak altı veya toprak yüzeyinde büyüyebilen yatay gövdelerdir. Bitkinin ana eksenidir ve sürgün ile köklerin tamamı gövdeye dik konumda gelişir. Rizom uzun veya silindir formunda etkili bir yapıya sahiptir ve üzerinde boğum ve boğum araları bulunur. (MEGEP, 2016)

Çizelge 1.3. Geofitlerin soğan ve yumrulu olarak sınıflandırılması (De Hertogh ve Le Nard, 1992).

GRUP	TİP	ALT SINIF	TÜR
Soğanlılar grubu	**Gerçek soğanlar**	Dikotiledon	*Oxalis cernua*
		Monokotiledon	*Allium* türlerinin çoğu, *Amaryllis belladona, Camassia, Chionodoxia, Endymion, Eucharis, Eucomis, Fritillaria, Galanthus, Galtonia, Haemanthus, Hippeastrum, Hyacinthus, Hymenocallis, Iris hollandica, Iris reticulata, Iris xiphiodes, Ixiolirion, Lachenalia, Leucojum, Lycaris, Lilium* türlerinin çoğu, *Muscari, Narcissus, Nerine, Ornithogalum, Polianthes, Puschkinia, Scilla, Tulipa, Urgenia, Zephyranthes*
	Soğanımsı yumru (Corm)	Dikotiledon	*Liatris*
		Monokotiledon	*Acidanthera, Babiana, Colchicum, Crocosmia, Crocus, Erythranium, Freesia, Gladiolus, Ixia, Sparaxis, Tigrida, Triteleria*
Yumrulular grubu	**Yumru (Tuber)**	Dikotiledon	Bazı *Anemone* türleri, *Eranthis*
		Monokotiledon	*Caladium, Gloriosa, Zantedeschia* türlerinin çoğu.
	Yumrukök (Tuberous)	Dikotiledon	*Astilbe, Dahlia, Eremurus*, Bazı *Oxalis* türleri, *Ranunculus*
		Monokotiledon	*Hemerocallis*
	Rizom	Dikotiledon	*Achimenes*, bazı *Anemone* türleri, bazı *Oxalis* türleri.
		Monokotiledon	Bazı *Allium* türleri, *Agapanthus, Alstroemeria, Anigozanthus, Canna, Clivia, Convallaria,* Bazı *Iris* türleri, Bazı *Lilium* türleri, *Scadoxus, Zantedeschia aethiopica.*
	Genişletilmiş hipokotil	Dikotiledon	*Begonia* (yumrulu hibritler), *Cyclamen, Gloxinia*
		Monokotiledon	-

Colchicum autumnale, colchicin alkoloidinin elde edildiği otsu çok yıllık bir bitkidir. Colchisin alkoloidi gut hastalığı tedavisinde ve bitki ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır (Zeybek, 1985).

Galanthus bitkisi galanthamin alkoloidi içerir. İskelet adalelerini çalıştırıcı etkiye sahip bu alkoloid çocuk felci hastalığının tedavisinde kullanılan Nivalin ampul preparatı yapımında kullanılır (Zeybek, 1985).

Orchis (salep) yumruları nişasta, musilaj ve az miktarda eterik yağlar taşır ve ishal tedavisinde kullanılır (Zeybek, 1985).

Geofitler ayrıca peyzaj düzenlemelerinde de kullanılmaktadır. ABD'de geofitlerin 70'i, İsveç'te %67'si ev bahçelerinde, parklarda, arboretumlarda, çevre düzenlemelerinde, yol kenarları ve golf sahalarında kullanılmaktadır. Ülkemizde ise bazı *İris* türleri, *Pseudocrocus* ve *Orchis laxilora* bataklıklarda doğal olarak yetişmelerinin yanısıra havuz ve göletlerde süs bitkisi olarak kullanılabilmektedir (Baktır, Tezcan, & Kaynakçı, 1997).

Mis ve kaya zambağı ve süsen gibi geoitler ise parfüm sanayiinde hammadde olarak kullanılmaktadır (Baktır vd., 1997).

Geofitler, diğer tüm bitkilerde olduğu gibi, generatif (tohumla üretim) ve vejetatif olarak üretilirler. Generatif üretim tekniği elde edilen bitkilerin ana bitkiye benzerlik oranının düşük olması ve yeterince tohum üretilememesi gibi sebeplerle tercih edilmemektedir. Vejetatif üretim ise soğanlar, soğan pulları, soğan tabanının kesilmesi ve doku kültürü üretimleri ile gerçekleştirilebilmektedir (Ulus & Seyidoğlu, 2006).

Gelişmiş ocakların bölünmesiyle çoğaltım; Aynı yerde uzun yıllar boyunca kalan soğanlar yavru oluşturarak çoğalır. Bunun sonucunda yoğunlaşan ocaklar seyreltilerek elde edilen soğanlar başka alanlara dikilerek çoğaltım gerçekleştirilir.

Yavru soğanlarla çoğaltım; Soğanlı bitkilerin oluşturdukları yavru soğanların dormansi halindeyken sökülüp serin yerlerde muhafaza edilmesinden sonra uygun vakitte dikim işleminin gerçekleştirilmesiyle çoğaltım gerçekleştirilir.

Yavru kormlarla çoğaltım; Çiğdem ve gladioller gibi bitkiler bezelye boyutunda çok miktarda yavru korm oluştururlar. Bitkiler kışı geçirip yaprakları solmaya başladığında yavru kormlar ana kormdan ayrılır. Serin yerlerde muhafaza edildikten sonra dikilerek çoğaltım gerçekleştirilir.

Hava soğanları veya gövde soğanlarıyla çoğaltım; *Lilium* türlerinin bazılarında yaprak koltuk altları ve toprak altına gelen kısımlarda oluşan yavru soğanların direkt dikimleri yapılarak çoğaltım gerçekleştirilir.

Soğan pulları ile çoğaltım; *Lilium* ve *Fritillaria* türlerinde soğanlardaki etli pullar birbirlerinden ayrılarak her birinin taban kısmında bir veya birkaç yavru soğan oluşturulur ve bu oluşturulan soğanlar üretimde kullanılır.

Tohumdan çoğaltım; soğanlı bitkilerde çok kullanılan bir yöntem değildir. Bazı bitkiler tohum bağlayamaz, bağlayan bitkilerde ise tohumdan çiçek açması 3-6 yıl sürmektedir.

Çapraz kesim; *Fritillaria imperialis* gibi bitkilerde soğanlar büyüme noktasından çapraz olarak yarıya kadar kesilip dikim yerlerine dikilerek çoğaltım gerçekleştirilir (Karaoğlu, 2010).

1.4. Bitki Doku Kültürünün Tarihçesi

1838 yılında Schwann ve Schleiden'in totipotensi teorisi olan bitkiye ait olan her bir hücrenin tüm bitkiyi meydana getirme kapasitesi olduğunu ortaya atmalarıyla bitki doku kültürünün temelleri atılır. 1902 yılında Heberland izole edilmiş bitki hücresini kültüre almaya çalışmış ancak başarılı olamamış 1934 yılında *Lycopersicon esculentum*'da ilk kalıcı kök ve meristem kültürü geliştirilmiş ve yine aynı yıl Gautheret ve Nobecourt *Daucus carota*'da ilk kez kallus kültürünü başlatmışlardır (Pierik, 1997)**.** 1934 yılında Gautheret besi ortamına IAA (İndol-3-asetik asit) ve çeşitli vitaminler ekleyerek ilk alt kültür çalışmasını gerçekleştirmiştir. 1942 yılında yine Gautheret taraından yapılan çalışmada *Daucus carota*'da sekonder metabolit üretimi ilk defa gerçekleştirilmiştir. 1902 yılından itibaren doku kültüründe gerçekleştirilen bu gelişmeler ışığında olgun embriyoların kültüre alınması, oksin tanımlanması, laboratuvar ortamında kök ve sürgün ucu çoğaltımı gibi pek çok çalışma daha yapılarak *in vitro* kültür teknikleri 1000'den fazla farklı türe uygulanmıştır (Bigot, 1987)**.**

1.5. Bitki Doku Kültürü Teknikleri

Doku kültürü; aseptik şartlarda ve yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesi olarak tanımlanabilir (Babaoğlu & Gürel, 2001)

Bitki doku kültürü çalışmalarında uygulanan başlıca teknikler, organogenesis, somatik embriyogenesis, protoplast kültürü, haploid hücre kültürü, meristem kültürü, embriyo kültürü ve mikroçoğaltım olarak sayılabilir.

Bitkiler iki şekilde gelişim göstererek çoğalabilirler, seksüel veya aseksüel. Seksüel döngü ebeveyn gametlerinin birleşmesi sonucu oluşan zigotik embriyoların gelişmesiyle yeni bitkilerin oluşmasıdır. Genellikle gametlerin oluşumu (mayotik hücre bölünmesi) ve birleşmeleri boyunca birbirinden farklı gen kombinasyonları oluşacaktır ve bu sayede yeni döller çeşitlilik gösterecektir. Buna karşın vejetatif (aseksüel) döngüde ise çoğaltım seçilen herhangi bir bitkinin (ana bitki, stok bitki) genleri her bir bölünmede (mitotik bölünme) aynı şekilde devam ettirilir. Çoğu durumda bu yöntemle üretilen her bir bitki özgün bir somatik hücre hattının uzantısı olarak düşünülebilir. Doğal ortamda seksüel ve aseksüel üreme farklı bitki türlerinde evrim basamaklarına göre uygun seçilim avantajlarına sahiptir. İnsanlar tarafından seçilen ve kullanılan bitkilerin aynı zamanda tohumla ve vejetatif yollarla farklı üreme eğilimleri de vardır (George, Hall, & Klerk, 2008).

Tohumların bir üretim aracı olarak yaygın avantajları vardır.

- Genellikle çok sayıda üretilirler bu sayede rejenere edilen bitkiden daha ucuzdurlar.
- Birçoğu uzun zamanlar boyunca canlılığını kaybetmeden saklanabilir.
- Kolayca dağıtılırlar.
- Tohumdan en sık yetiştirilen bitkiler ebeveynlerini etkileyebilecek zararlı ve hastalıkların çoğunu içermeyebilir.

Tarımsal ve bahçecilik çalışmalarında hemen hemen özdeş olan bitki klonlarını veya popülasyonlarını yetiştirmek istenmesine rağmen birçok bitkinin tohumları genellikle genetik olarak farklılık gösteren bitkiler üretir ve tek tip yavrular verecek tohumları elde etmek pratik açıdan çok zor hatta imkansızdır (George vd., 2008).

Genetik olarak homojen bitki popülasyonları üç şekilde üretilmektedir;

- Kendi kendine döllenen türlerde elde edilen homozigot hatlardan. (Tütün, buğday, arpa, pirinç)

- İki homozigot ebeveyni geçerek üretilen F1 tohumlarından. Aynı olmalarının yanı sıra, F1 bitkileri hibrit özellik de gösterebilir. Süs bitkisi ve sebze üreten birçok çiçeğin F1 tohumları vardır ancak yüksek üretim maliyetlerini sahiptir.

- Apomiktik fidanları ile. Birkaç türde genotipik olarak ebeveynleriyle özdeş olan bitkiler apomiksis ile üretilirler. Tohumlar döllenmeden oluşturulur ve embriyolarının gelişimleri yeni bitkinin dişi ebeveynle özdeş genetik özelliklere sahip olmasını sağlayan birkaç aseksüel işlemden biriyle gerçekleştirilir (George vd., 2008).

Birçok önemli tarım bitkisi vejetatif olarak klonlar halinde çoğaltılır. Bitkisel üretimin yapılması için uygun yöntemler yüzyıllardır üzerinde çalışılan konular olmuştur. Bu konuda gerçekleştirilen çalışmalardan biri nispeten büyük bitkisel parçaların kullanıldığı makroçoğaltım yöntemleridir. Makroçoğaltım yöntemleri modern bahçecilik araştırmaları ile geliştirilmiştir. Makroçoğaltım yöntemlerini geliştirmeye yönelik çalışmalar hala devam etmesine rağmen son yıllarda bitki çoğaltımında doku kültürü tekniklerinin kullanımının artması bu çalışmaların hız kaybetmesine sebep olmuştur (George vd., 2008).

Organogenesis, hücre ve dokulara baskı uygulanarak bazı değişikliklere sebep olunup sürgün veya kök primordiyumu adı verilen tek kutuplu ve vasküler sistemi köken aldığı dokuya bağlı olan bir yapının meydana gelmesini sağlayan bir yöntemdir (Babaoğlu & Gürel, 2001).

Somatik embriyogenesis, vejetatif hücrelerden geliştirilen embriyoların bağımsız vasküler sistemi olan ve kök ile sürgün aksisini içeren iki kutuplu bir yapının oluşmasını sağlayan bir yöntemdir. Zigotik embriyolar döllenmiş embriyolardan elde edildiği için açılma gösterirken somatik embriyolardan oluşturulan bitkiler genetik olarak klon oluşturmaktadırlar (Babaoğlu & Gürel, 2001).

Protoplast kültürü, bir bitki hücresinin hücre duvarı uzaklaştırıldığında geriye kalan kısmına protoplast denilmektedir. Protoplast çalışmalarında esas amaç tek bir bitki hücresinden bitki elde edebilmektir. Protoplastların en önemli faydası eşeysel melezlemeye uygun olmayan bitkilerde somatik melezleme işleminin gerçekleştirilebilmesinin sağlanmasıdır (Babaoğlu & Gürel, 2001).

Haploid bitkiler ait olduğu bitki türünün gamet hücrelerinde mevcut olan kromozom sayısına sahip olan bitkilerdir. Her bir lokusta bulunan allelerden yalnızca birini içerir ve bu nedenle ıslah çalışmalarında oldukça önemli yer tutmaktadır. Haploid bitkilerde kromozom katlanması sayesinde %100 homozigot arı ırkların elde edilmesi mümkün hale gelmektedir. Erkek ve dişi gametlerden haploid bitki üretimi gerçekleştirilmektedir (Babaoğlu & Gürel, 2001).

Meristem kültüründe meristem hücreleri kullanılarak virüsten arı bitkilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Hastalıksız bitki üretiminde meristem kültürü oldukça önemli bir yer tutmuştur. Virüs eliminasyonu, mikroçoğaltım, germplazm muhafazası, genetik transformasyonlar, bitki materyallerinin uluslararası değişimi ve bakteri ve mantarlardan ari bitkilerin üretilmesi gibi çeşitli uygulama alanları mevcuttur (Bürün & Türkoğlu, 1996).

Embriyo kültürü, yüksek bitkilerin tohumlarından embriyolarının elde edilerek belirli ortamlarda kültürlenmesiyle gerçekleştirilen uygulamalardır. İki tip embriyo kültürü vardır; olgunlaşmış tohumdan embriyo kültürü ve olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyo kültürü. Olgunlaşmış embriyo kültüründe embriyonun büyümesi, dormansi ve çimlenmenin metabolik detaylarının analizi yapılabilmektedir ve oldukça başarılı sonuçlar veren bir yöntemdir. Olgunlaşmamış erken bölünme fazındaki proembriyoların kültüründe ise embriyoların farklılaşmasının sağlanması ya da besin ihtiyaçları üzerine yapılacak çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Rahavan, 1980).

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınmış olup tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip olan eksplantların yapay besin ortamı ve aseptik koşullarda yeni bitkileri oluşturması çalışmalarıdır (Hartmann & Kester , 1975).

Bitkilerin *in vitro* olarak çoğaltılması için kullanılan mevcut yöntemler büyük oranda geleneksel çoğaltma için önceden geliştirilenlerin bir uzantısıdır. *İn vitro* tekniklerin uygulanmasının bazı avantajları vardır;

- Kültüre çok küçük bitki parçaları (eksplant) ile başlanır ve küçük sürgün veya embriyolardan çoğaltımları gerçekleştirilir.
- Bitkileri geliştirmek ve çoğalmak için çok küçük alanlar yeterlidir ve aseptik koşullarda gerçekleştirilir.

- Kültüre başladıktan sonra hastalıktan dolayı kayıp olmaması için üretilen bitkicikler bakteri, mantar ve diğer mikroorganizmalardan arındırılır.

- Besin ve büyüme düzenleyicileri, ışık ve sıcaklık gibi bitkisel rejenerasyonu etkileyen faktörler bitki türüne spesifik olarak ayarlanır ve bu sayede çoğalma hızı makroçoğaltıma göre çok daha yüksek olur ve belirli bir süre içerisinde farklı pek çok bitki üretilebilir.

- Vejetatif olarak çoğaltılması çok zor hatta imkânsız olan bitki türlerinin klonlarının üretilmesi mümkün olabilir.

- Bitkilere mikroçoğaltım teknikleriyle yeni birtakım özellikler kazandırılabilir.

- Üretim mevsimsel değişimlerden etkilenmez yılın her mevsiminde bitkiler üretilebilir.

- Stok bitkilerin çoğaltımı ve korunması için daha düşük enerji ve alana ihtiyaç vardır.

- Bitki materyallerinin alt kültürleri arasında çok daha az bakıma ihtiyaç vardır. Geleneksel çaprazlama tekniklerinde sulama, yabani otlardan arındırma ve ilaçlama gibi gereksinimlerden dolayı işçilik ve malzeme ihtiyacı çoktur. Mikroçoğaltım bu yönüyle daha düşük maliyetlerden ötürü daha avantajlıdır (George vd., 2008).

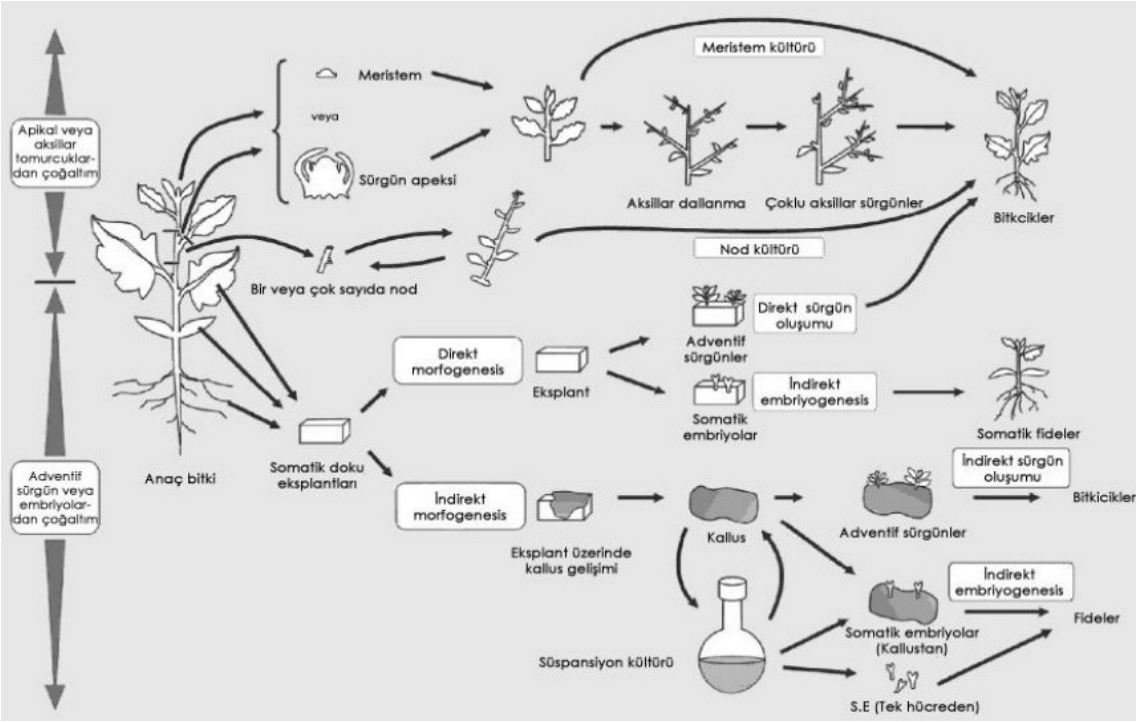
Fakat mikroçoğaltım tekniklerinin bazı dezavantajları da mevcuttur. Özel bir üretim tesisine ihtiyaç vardır. Ayrıca her bir tür için optimum sonuçların elde edilmesi için spesifik yöntemler gereklidir ve mevcut yöntemlerin optimize edilebilmesi için yoğun bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Dahası *in vitro* yöntemlerle çok sayıda üretim gerçekleşmesine rağmen başlangıçta üretilen bitkicikler çok küçüktür ve bazı zamanlar da istenmeyen özelliklere sahip olabilirler. *İn vitro* tekniklerde kültürdeki eksplantların hayatta kalabilmesi için sükroz veya başka bir karbon kaynağına ihtiyaçları vardır. Bu kültürlerde üretilen bitkiler başlangıçta kendi organik maddelerini fotosentez ile üretemezler. Bağımsız bir büyüme yapabilmeleri için bir geçiş döneminden geçmeleri gerekir. Ayrıca bitkiler cam veya plastik kültür kaplarında yüksek bağıl nemde büyütüldüklerinden ve genellikle fotosentetik olarak kendi kendilerine yeterli olmadıklarından genç bitkiler dış ortamda su kaybına karşı duyarlı haldedir. Bu nedenle

nem yavaş yavaş azaltılırken atmosfer ışığı da artırılarak dış ortama alıştırılmaları gereklidir. Genetik olarak anormal bitki üretilme ihtimali de artabilir (George vd., 2008).

Mikroçoğaltım genel hatlarıyla 5 aşamada ele alınmaktadır. Bu aşamalar;

- Hazırlık (Sterilizasyon ve anaç bitki seçimi gerçekleştirilir)
- Kültür başlangıcı
- Sürgünlerin çoğaltımı
- Sürgünlerin gelişimi ve köklendirilmesi
- Dış ortama alıştırma (Aklimatizasyon) (Debergh, 1993)

Mikroçoğaltım methodları Şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1. Mikroçoğaltım metodları (Acemi, 2011; George vd., 2008).

Mikroçoğaltım için geliştirilen bu teknikler *in vitro* morfogenez ve genetik stabilitenin daha iyi kavranmasıyla zamanla değişiklik gösterebilir.

in vitro kültürlerle çoğaltım sırasında bitkide birtakım değişiklikler meydana gelebilmektedir. Gözlenen bu değişikliklere somaklonal varyasyonlar denilmektedir.

Kalıtsaldır ve dölden döle aktarılmaktadır. Somaklonal varyasyonlara neden olduğu düşünülen bazı etkenler bulunmaktadır. Bu etkenler;

- *in vitro* rejenerasyon yöntemi: embriyojenik olmayan kallustan organogenesis sonucu rejenere olan bitkilerde büyük oranda somaklonal varyasyona rastlanmaktadır.
- Kullanılan eksplant: poliploid türlerdeki somaklonal varyasyon oranı diploid türlere göre daha fazladır.
- Besin ortamının değişimi: kültürde kullanılan besiyeri bileşimleri genetik stabiliteyi etkileyen faktörlerdendir.
- Alt kültür sayısı: alt kültür sayısı arttıkça ve kültür süresi uzadıkça somaklonal varyasyon oluşma riski de artmaktadır (Hatipoğlu, 1993).

1.6. Genel Bilgiler

1.6.1. Edirne Sümbülü'nün (*Bellevalia edirnensis)* Taksonomisi

Bu tez çalışmasında kullanılan *Bellevalia* cinsi morfolojik sınıflandırma sistemine göre ilk olarak *Liliaceae* (Zambakgiller) familyası içerisinde yer almıştır. İleriki zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda önce *Hyacinthaceae* (Sümbülgiller) familyasına sonrasında ise moleküler çalışmalar ışığında *Asparagaceae* (Kuşkonmazgiller) familyası içerisinde kabul edilmiştir (Çizelge 1.4) (APG III, 2009).

Çizelge 1.4. *Bellevalia edirnensis* türünün APG III sistemine göre taksonomik durumu (APG III, 2009).

Üstalem (Supperegnum)	Eukaryota
Alem (Regnum)	Plantae
Bölüm (Divisio)	Magnoliophyta (Angiospermae)
Sınıf (Class)	Liliopsida (Monocotyledoneae)
Ordo (Order)	Asparagales
Aile (Family)	Asparagaceae
Altaile (Subfamily)	Scilloideae
Oymak (Tribe)	Hyacintheae
Altoymak (Subtribe)	Hyacintheae
Cins (Genus)	*Bellevalia Lapeyr.*
Tür (Species)	*B.edirnensis* N. Özhatay et B. Mathew

Asparagaceae familyası dünyada yaklaşık olarak 130 cins ve 2.250 türe sahip olan ve oldukça geniş yayılım gösteren bir familyadır (Mabberley, 2008). Ülkemizde ise 19 cinsi vardır; *Agave, Anthericum, Asparagus, Bellevalia, Convallaria, Danae, Drimia, Fessia, Hyacinthella, Hyacinthus, Muscari, Ornithogalum, Polianthes, Polygonatum, Prospero, Puschkinia, Ruscus, Scilla* ve *Yucca* (Güner, Ekim, Vural, & Babaç, 2012).

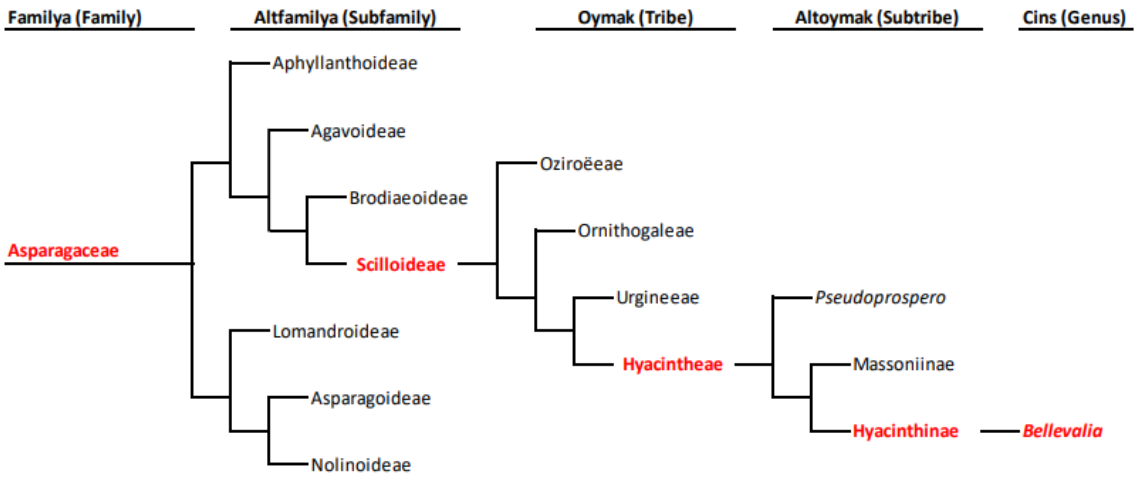
Asparagus cinsinin yeryüzünde yaklaşık 300 türü vardır ve Türkiye'de 3'ü endemik olan 12 türü bulunmaktadır. *Asparagus*'un bazı üyeleri gıda, süs bitkisi ve eczacılık açısından önemlidir (Güner vd., 2012).

Muscari cinsi Dünya'da yaklaşık 40 tür ve Türkiye'de 19'u endemik olan 30 türü bulunmaktadır. Bazı türleri gıda olarak tüketilmiştir ve tıbbi öneme sahiptir (Güner vd., 2012).

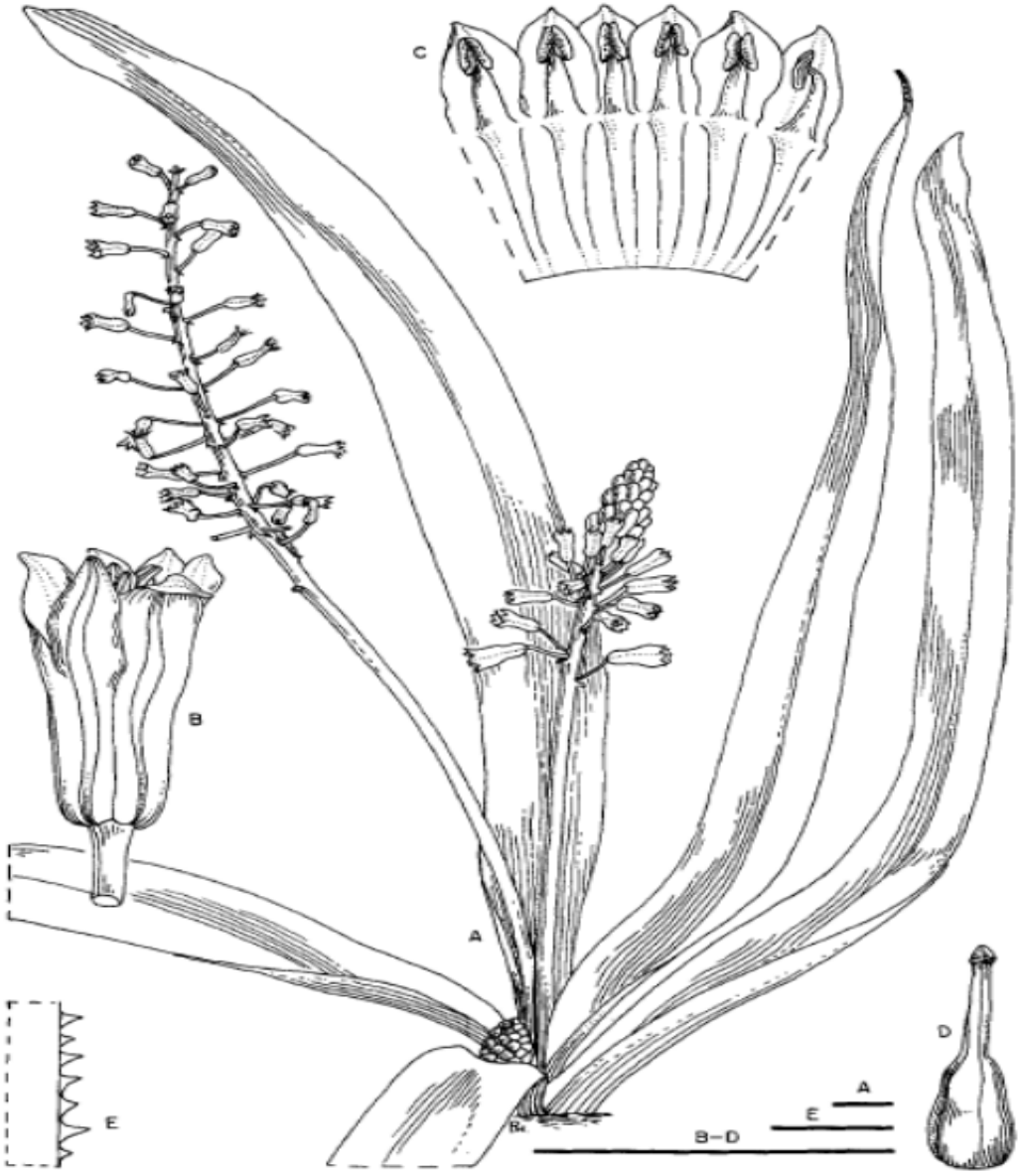
Ornithogalum cinsi Dünya'da yaklaşık 180 tür ve Türkiye'de 30'u endemik olmak üzere 61 türü bulunmaktadır. *Puschkinia* Dünya'da dört tür ile temsil edilmekte ve dördü de ülkemizde bulunmaktadır. *Scilla* Dünya'da yaklaşık 80 tür ve Türkiye'de biri melez ve sekiz tanesi endemik olan 19 tür ile temsil edilmektedir (Güner vd., 2012).

Bellevalia cinsi Dünya'da büyük çoğunluğu Akdeniz bölgesinde (Fas ve Cezayir'den Kafkasya ve İran'a kadar) yayılış gösteren yaklaşık 74 kadar türe sahiptir (Johnson, 2003). *Bellevalia* ile ilgili yapılan ilk monografi çalışmaları sonucunda dünya genelinde 44 (Feinbrun, 1940), Türkiye'de ise 8 tane türün varlığından söz edilmiş, sonrasında Türkiye Florası'nın yazımıyla Türkiye'de 7'si endemik olan 18 türün varlığından söz edilmiştir (Wendelbo ve Bothmer, 1981). 2012 yılında yayınlanmış olan son check-list çalışmasıyla *Bellevalia* cinsine yerli botanikçiler tarafından eklenen 12 yeni tür sonucunda Türkiye'deki *Bellevalia* cinsine ait olan tür sayısı 34, endemik olanlarının sayısı ise 23 olarak belirlenmiştir (Tugay, 2012). *Bellevalia* cinsinin filogenisi ise Çizelge 1.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.5. *Bellevalia* cinsinin filogenisi (Güler vd., 2018; Stevens, 2018).



Bellevalia edirnensis türü ilk kez Özhatay ve ark. Tarafından Edirne-Uzunköprü arasından, İbriktepe yol ayrımı 1.km (250m, 30.04.1988, G. Dalgıç 59752)'sinden toplanmıştır. Farklı olduğu anlaşılan tür Türkiye'deki 19. *Bellevalia* türü olmuştur. Özhatay ve Mathew 1989 yılında Delhi'de yapılan 6.OPTIMA toplantısında bildiri halinde tanıtılan yeni tür dünyaya tanıtılmıştır. 1991 yılında yayınladıkları makalelerinde bitkiye ait olan çizim Şekil 1.2'de verilmiştir (Güler vd., 2018).



Şekil 1.2. *Bellevalia edirnensis* ISTE 59752, Culcivated. A, Habit; B, Flower; C, Corolla opened out; D, gynoecium; E, portion o leaf apex. (Scale bars=1 cm) Edirne Sümbülü'nün Özhatay vd. (1991) tarafından Botanical Journal of the Linnean Society'de yer alan protoloğundaki çizimi (Güler vd., 2018).

1.6.2. Edirne Sümbülü (*Bellevalia edirnensis*)'nün Morfolojisi

Yaprakları 3-4(-5), 30-42 cm x 15-20 mm boyutunda, skapustan daha uzun ve undulat, kenarları zarsı ve kısa siliat yapılıdır (Şekil 1.3). Skapus 1-2, 18-33 cm boyutlarında. Rasemus elipsoitten silindiriğe kadar 50-60 çiçeklidir. Pediseller dik şekilde gelip daha sonra yay şeklinde kıvrılmaktadır ve 8-15 mm boyutlarındadır. Periant yeşilimsi-beyaz renkte, tubular – kampanulat, lobları tüpten bir miktar daha kısa eliptik-obovat şekillidir. Anterler sarı, rasemus meyvede silindirik yapılı, kapsül kapakları geniş ovat ve 9-10mm boyutlarındadır (Şekil 1.4). Tohumlar ise ovoid-elipsoid arasıdır (Şekil 1.5) (Dayan, Arda, Çolak, Güler, & Aytaç, 2012).



Şekil 1.3. *B. edirnensis*: A. Toprakaltı kısımları; B. Yeni çiçeklenen bitkide yaprak yapısı; C. Yaprak kenarındaki belirgin silli yapı (Güler vd., 2018).

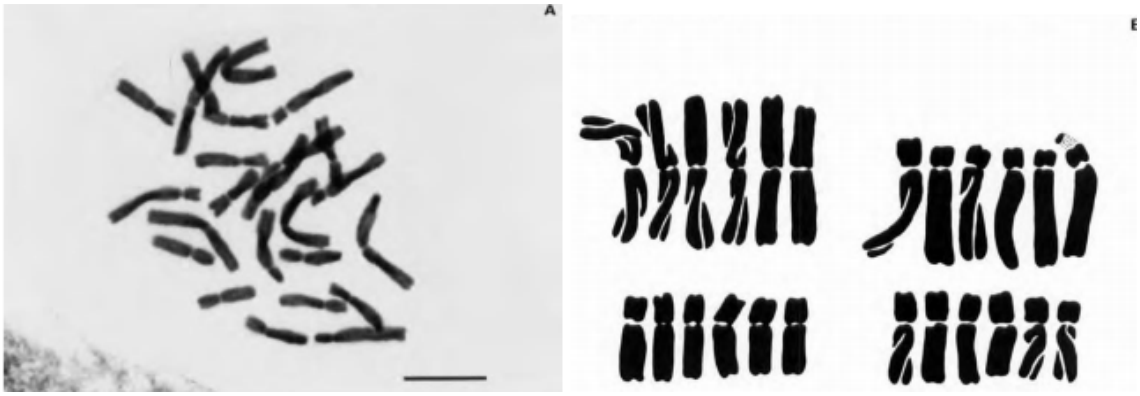


Şekil 1.4. *B. edirnensis*'de meyve gelişimi ve olgunlaşması (Güler vd., 2018).



Şekil 1.5. Edirne Sümbülü (*B. edirnensis*)'nün meyveli bitki ve tohumları (Güler vd., 2018).

Hekzaploid (2n=24) bir bitki olarak tanımlanmış olup Türkiye'de bulunan *Bellevalia* türleri arasında hekzaploid olan ilk türdür. Karyotip analzine göre (Şekil 1.6) ilk 6'lı set metasentrik, 2. Altılı set akrosentrik ve bu setteki son kromozomun kısa kolunda ise satallit gözlenmiştir. Ayrıca 3 ve 4. Altılı setler ise submetasentrik olarak tanımlanmıştır (Bareka, Phitos, & Kamari, 2008).



Şekil 1.6. *Bellevalia edirnensis* 2n=24. A. Somatik hücre (Bareka vd., 2008) B. Karyotip (Güler vd., 2018). Scale bar=10 µn.

1.6.3. Edirne Sümbülü (*Bellevalia edirnensis)*'nün Biyolojisi

Soğanlı geofitler arasında yer alan Edirne sümbülü toprak altında metamorfoza uğramış soğan (gömlekli bulb) şeklinde bir gövdeye sahiptir. İndirgenim disk şeklinde gövdeye sahip olan soğanlar birbirini örten etli depo yapraklara ve bunların dışında tunika adı verilen koruyucu ince yapraklara sahiptir. Havaların ısınmasıyla ilkbahar aylarında yeni sürgün veren soğanlar toprak üzerindeki yapraklarını Şubat ayında çıkaramaya başlar. Oluşan yapraklar Mart ayında belirginleşir ve ayın sonuna kadar yaprak gelişimi tamamlanmış olur. Yapraklar genellikle belirli bir açıyla yukarıya doğru yükselirken bazı bireylerde alt kısımdaki yaprakların toprak yüzeyine doğru uzadığı görülebilir. Üzerinde çiçek taşıyan skapus adı verilen sap gelişimi ise yaprakların gelişiminden sonra başlar. Çiçeklenme Nisan ayında başlayarak Mayıs ayının ortasına kadar devam eder. Çiçek kurulu bazı bireylerde bir, bazılarında 2-3 çiçek kurulu şeklindeyken çok ender olarak bazı bireylerde 4 çiçek kurulu gözlenebilir. En iyi çiçeklenme 15 Nisan-1 Mayıs arasında meydana gelmektedir. Renkleri genellikle sarımsı kahverengi veya yeşilimsi kahverengidir. Tomurcuk haldeyken yeşil dış kısmı mor olan çiçekler solduğunda kahverengimsi bir renk alır (Şekil 1.7) (Güler vd., 2018).



Şekil 1.7. *B. edirnensis*'de çiçek kurulu (Güler vd., 2018).

Bitkinin meyveleri Nisan ayının sonuna doğru görülmeye başlar ve bu meyveler lokulusit kapsül tipindedir. 3 odacıklı ovaryumun gelişmesiyle 3 odacıklı kapsül oluşur. Olgunlaşmış olan meyveler lokusların sırt kısımlarından açılarak toprağa düşer. Mayıs ayının ortasından sonra olgunlaşmaya başlayan meyveler Haziran ayının ortasına kadar görülebilir. *B. edirnensis* bitkisinin fenolojisi Çizelge 1.6'da ve Şekil 1.8'de verilmiştir. Genellikle böceklerle tozlaşan bu bitkinin tohumları bitkinin habitatında meydana gelen taşkınlarla da yayılabilmektedir (Güler vd., 2018).

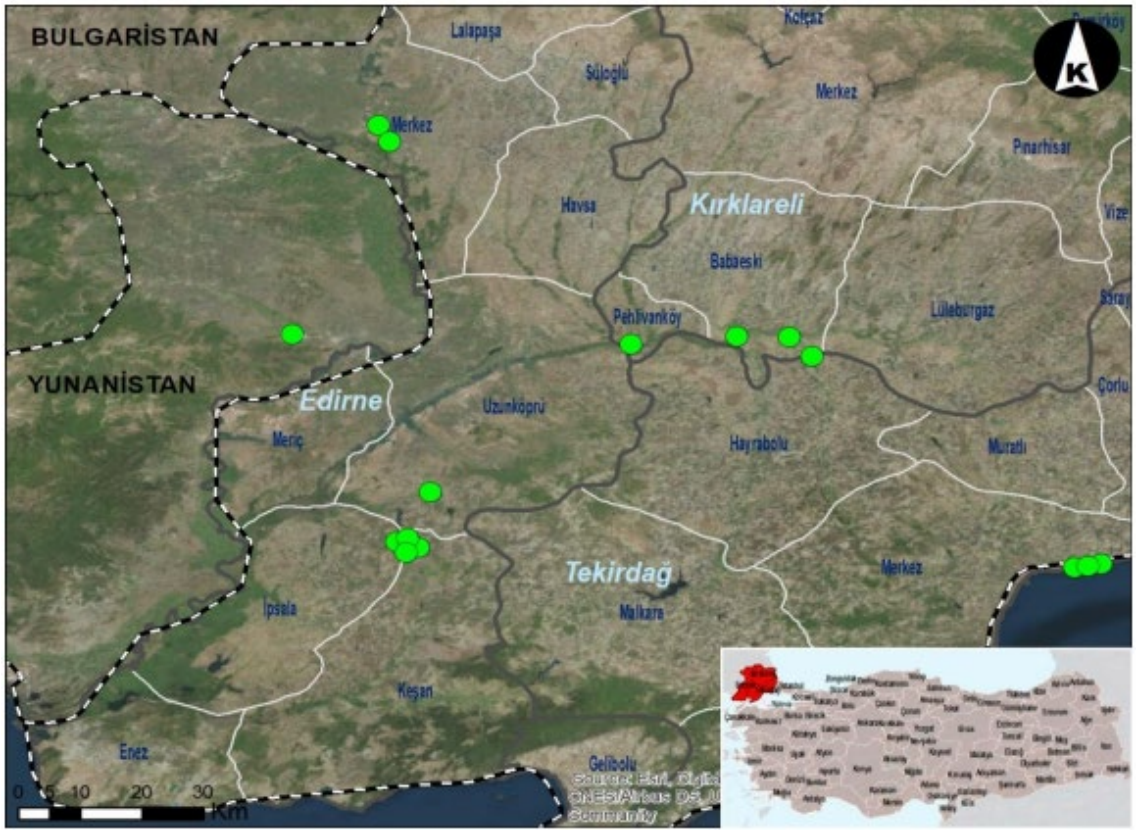
Çizelge 1.6. Edirne sümbülü (*B. edirnensis*) ‘nün fenolojisi (Güler vd., 2018)

FENOLOJİ	AYLAR		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Vejetatif Evre													
	Generatif Evre	Çiçeklenme												
		Meyve ve Tohum												



Şekil 1.8. Edirne Sümbülü (*B. edirnensis*) ‘nün fenolojisi. A. Soğan; B. Toprak üzerinde ilk yapraklar; C. Tomurcuklu birey; D. Çiçek durumu (Güler vd., 2018).

Güler vd. (2018) tür koruma eylem planı projesi kapsamında yaptıkları çalışmalarında önceden bilinen lokasyonlar baz alınarak bitkiyi bulundurma potansiyeli olan Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerinde benzer özellikli lokasyonlar belirlemişler ve arazi çalışmaları sonucunda türün yeni 3 lokasyonda daha bulunduğunu keşfetmişlerdir (Şekil 1.9). Türün varlık gösterdiği yeni bölgelerle birlikte mevcut tüm lokasyonlar; Büyükmandıra, Sinanlı, Küçükkarakarlı, Pehlivanköy merası, Tavuk ormanı ve Kozköy merası olarak sıralanmıştır.



Şekil 1.9. Edirne Sümbülü'nün güncel lokasyonları (Güler vd., 2018).

Edirne sümbülü yayılış alanlarındaki yoğun tarım faaliyetleri, otlatma, yabancı ot mücadelesi, mesire alanı olarak kullanım gibi sebeplerle nesli tehlike altında olduğu bilinmektedir (Çizelge 1.7).

Çizelge 1.7. Edirne Sümbülü tehditleri ve tehdit düzeyleri (Güler vd., 2018).

Tehditler	**Etkisi**	**Tehdit Düzeyi**
Yaşam alanlarının tarım arazisine dönüştürülmesi	Türün yayılış alanını ortadan kaldırır	Yüksek
Tarımsal faaliyetler	Popülasyonun genişlemesini engeller	Yüksek
Otlatma baskısı	Popülasyonun genişlemesini engeller	Yüksek
Uzun süreli su baskınları	Popülasyonun genişlemesini engeller	Düşük
Mantar enfeksiyonu	Popülasyonun genişlemesini engeller	Düşük
Ağaç kesimi	Türün habitatını bozar	Orta
Yöre halkı başta olmak üzere paydaşların türün önemi hakkında yeterince bilgi sahibi olmaması	Koruma çalışmalarında paydaşların katkısı olmayışı veya yetersizliği	Yüksek
Yaşam alanlarında yapılaşma	Türün yayılış alanını ortadan kaldırır	Yüksek
Anız yakma	Popülasyonun genişlemesini engeller	Yüksek
Yaşam alanlarında düzenlenen sosyal etkinlikler	Türün habitatını bozar	Yüksek

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETİ

Bu bölümde soğanlı bitkiler üzerine yapılan doku kültürü çalışmaları verilmiştir. Bu kapsamda çalışmalar familya düzenine göre verilmiş olup en sonda *Asparagaceae* familyası üyeleri ile ilgili olanlar sıralanmıştır. Literatür özeti *Bellevalia* cinsi üzerinde yapılan çalışmaların incelenmesi ile bitirilmiştir.

Aasım (2015) *Allium tuncelianum* bitkisinde yaptığı çalışmasında sarımsak dişlerinin en iyi soğancık oluşumunun MS besi ortamında 0,5mg/l BA ve 0,5 mg/l KNAA hormon konsantrasyonu kullanılan ortamda gerçekleştiğini göstermiştir.

Babashpour vd. (2016) *Galanthus transcaucasicus* bitkisinin soğan pul yapraklarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında modifiye edilmiş MS besin ortamına 30 g/l sükroz 8 g/l agar ve hormon konsantrasyonları olarak BAP (0, 0.5, 1, 1.5, 2 ve 2.5 mg/l) ve NAA (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, ve 0.5 mg/l) kombinasyonlarını kullanmışlar. Eksplant başına düşen soğancık sayısını, soğancık çapını ve taze soğancık ağırlığını ilk kültürden 5 ay sonra ölçebilmişler. En fazla sayıda soğancık ve en büyük çapa sahip soğancık oluşumunun 3 yapraklı olarak kullanılan eksplantların 0,2 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP içeren ortamda kültüre alınmasıyla meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Mirici vd. (2008) *Iris stenophylla* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmalarında soğanların çok küçük olması sebebiyle 2-4 pul yaprağı yerine ikiye bölerek kullanmışlardır. Bu çalışmada MS ortamına 1-2-4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA hormon konsantrasyonlarını kullanmışlar ve en başarılı sonuçların 1mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA kullanılan besin ortamında olduğunu bulmuşlardır. Oluşturulan soğanlar hormon içermeyen MS ortamında köklendirildikten sonra toprağa transfer etmişlerdir.

Mirici vd. (2008) *Muscari mirum Speta* bitkisinin soğan pul yapraklarında yaptıkları çalışmada 2 ve 4 soğan pul yapraklı eksplantlardan kurulan denemelerde 1-2-4 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA kullanmış ve 5 aylık kültür süresinde soğanların oldukça iyi geliştiğini ve köklenme ortamına transfer edilecek duruma geldiklerini belirtmiştir.

Bulut vd. (2019) Türkiye'de endemik ve tehlike altında olan bir tür olan *Hyacinthella micrantha* (BOISS.) ile doğal ortamında toplanmış soğan yapraklarının eksplant olarak kullanıldığı çalışmalarında MS, Orchimax ve Lindeman Orchid Medium gibi farklı bazal besiyerlerini ve bu ortamlarda hormon olarak sitokininin farklı tip ve konsantrasyonlarını (1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l ve 8 mg/l BAP, Zeatin ve 2-iP) kullanmışlar. On aylık kültür süresi sonucunda en yüksek eksplant başına soğancık oluşumunun (%87) 8 mg/l Zeatin ilave edilmiş Orchimax besin ortamında gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bunun yanı sıra çalışma öncesi 3 ay boyunca 4-6 ºC'de soğuk uygulamasına tabi tutulan soğanların yeni mini soğancık oluşumunda yaklaşık %15 artış meydana geldiği gözlenmiştir.

Burun ve Şahin (2013) *Lilium candidum* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmalarında MS besi ortamında 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l BA hormon konsantrasyonlarının en başarılı soğancık oluşumu sağladığını göstermişlerdir. Ayrıca en yüksek soğancık oluşumunun (soğan pul yapraklarının bazal, orta ve distal bölümleri) bazal ve orta bölümlere ait pul yapraklarında gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Daneshvar vd. (2014) *Lilium candidum* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları alışmada 0.2 mg/l NAA ve 0,6mg/l TDZ içeren MS besin ortamında kavanoz başına en fazla soğancık oluşumunun gerçekleştiğini ve aynı zamanda da eksplant başına soğancık gelişiminin de yine en çok bu besin ortamında olduğunu göstermişlerdir.

Doğan Kalyoncu (2007) *Tulipa sintenisii* ve *Tulipa armena* bbitkilerinin olgunlamamış embriyolarını kullanarak bu bitkilerin ilk kez *in vitro* soğancık üretimini gerçekleştirmiştir. Bunun için farklı oranlarda sitokinin ve oksin içeren MS (tek aşamalı) ve N_6 (çok aşamalı protokol) ortamlarını kullanmıştır. 16 aylık kültür süresinin sonunda çok aşamalı protokolde *T.sintensii* bitkisinde eksplant başına 22.67, *T.armena* bitkisinde ise eksplant başına 16.42 adet soğancık oluştuğunu tek aşamalı protokolde ise *T.sintensii* bitkisinde yalnızca 27.10 adet soğancık elde edildiğini belirtmiştir.

Fonnesbech vd. (1979) *Asparagus plumosus* bitkisiyle yaptıkları çalışmalarda sürgün kültürlerinin hayatta kalması ve büyümesi için iP ve zeatinin kinetin ve BA'den daha etkili sonuçlar verdiğini ancak PBA ile en iyi sonuçların elde edildiğini göstermişlerdir.

Ghanbari vd. (2018) *Lilium ledebourii* bitkisinin soğanlarını eksplant kaynağı olarak kullandıkları çalışmalarında MS besin ortamında 2,4-D ve kinetinin farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarını kullanmışlar. Kallus yüzdesinin en yüksek olduğu ortamın 3 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetinde olduğunu ayrıca en yüksek çap oranının da yine 3 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin içeren ortamda olduğunu belirtmişlerdir. Bunun dışında yaptıkları çalışmanın neticesinde oksin ve sitokininin karanlık ortamda hücre uzaması yoluyla uzun sürgün ve kök oluşumunu indükleyebileceğini belirtmişlerdir.

Karaoğlu (2004) *Leucojum aestivum* bitkisinin soğanlarını eksplant olarak kullandığı çalışmasında en başarılı sonuçların MS besin ortamında 1mg/l BAP ve 1 mg/l NAA hormon konsantrasyonlarıyla elde etmiş ve başarılı bir şekilde dış ortama aktarmıştır.

Naik ve Nayak (2005) *Ornithogalum virens* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmalarda sürgün gelişiminin en iyi 1 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP hormon konsantrasyonlarının kullanıldığı MS besin ortamında, sürgün köklendirmesinin ise hormon içermeyen MS besin ortamında gerçekleştiğini bulmuşlardır. Kallus oluşumunun en iyi 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında gerçekleştiğini, kallustan sürgün oluşumu için ise 2 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren MS besin ortamının uygun olduğunu bulmuşlardır. Soğan pul yaprakları üzerinden direkt soğan oluşumu için 1mg/l NAA, 2 mg/l BA ve 60 g/l şeker içeren ortamda gerçekleştiğini bulmuşlardır.

Ohkawa ve Kitajima (1998) *Fritillaria camtschatcensis* Ker-Gawl türünde yaptıkları çalışmada soğan pul yapraklarının çeşitli sıcaklık, ışık ve hormon konsantrasyonu parametrelerinde nasıl tepki verdiğini incelemişler ve soğancık oluşumunun 0.1 mg/l NAA – 0.1 mg/l 24-epibrassinolide (EB) hormon konsantrasyonunda 20°C'de ve karanlık ortamda inkübasyon sonucunda en başarılı olarak gerçekleştiğini, soğancık gelişimi ve köklenmede ise 0.01 ppm EB'nin etkili olduğunu göstermişlerdir.

Özdemir vd. (2017) endemik bir geofit bitki olan *Muscari aucheri* (Boiss.) Baker bitkisinin köklerinden aldıkları eksplantlar ile yaptıkları çalışmalarında çeşitli hormon kombinasyonlarının *in vitro* soğancık gelişimi üzerindeki etkilerini incelemişler. Kök eksplatnları 1, 3, 5 mg/l TDZ ve 0, 0.1, 0.2, 0.4 mg/l NAA kombinasyonlarının olduğu MS besin ortamına almışlar. Eksplant başına en yüksek soğancık oluşumunun 3 mg/l TDZ ve 0.4 mg/l NAA içeren MS besin ortamında, maksimum soğancık oluşumunun ise 5 mg/l TDZ ve 0.2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında olduğunu belirtmişlerdir. Rejenere edilmiş soğancıkları kök eksplantlarından izole ederek 40 g/l sükroz içeren MS besin ortamında tekrar kültüre almışlar ve böylece soğancıkların çap kazanmasını ve kök salmasını sağlamışlardır.

Özel vd. (2007) *Muscari macrocarpum* bitkisinin ikiz pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmada MS besin ortamında 2 mg/l BAP ve 05mg/l NAA hormon konsantrasyonlarının en başarılı soğancık gelişimini sağladığını, rejenere soğanların eksplant olarak kullanıldığı deneylerinde MS besin ortamında 1 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA hormon konsantrasyonlarının en başarılı aksillar soğancık gelişimini sağladığını ancak en büyük soğancık oluşumunun 1 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA içeren besin ortamında gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Salazar vd. (2019) Şili ulusal pazarında saksı ve bahçe bitkisi olarak büyük öneme sahip endemik ve nesli tükenmekte olan bir geofit olan *Rhodophiala pratensis* bitkisinin mikroçoğaltım protokolünü optimize edebilmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında bitkinin tohumunu eksplant kaynağı olarak kullanmışlar. Ortamdaki sükroz seviyelerinin (30, 60 ve 90 g/l) *in vitro* gelişim üzerindeki etkilerini test etmişler. Bunun yanı sıra 0.1, 1 ve 2 mg/l NAA ile 1, 2 ve 4 mg/l BAP hormon konsantrasyonlarının sürgün ve soğancık oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sekiz hafta sonunda düşük kontaminasyonlarla birlikte çimlenme %86 oranına çıktığını ve ortamdaki sükroz seviyesi arttıkça soğancık büyümesinin de arttığını; optimum sükroz konsantrasyonunun 90 mg/l olduğunu göstermişlerdir. Aklimatizasyon sonucunda ise bitki hayatta kalma oranının %63 ve ortalama soğan büyümesinin ise 0.5 cm olduğunu belirtmişlerdir.

Salehzadeh vd. (2008) *Hyacinthus orientalis* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmada 1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında en ağır kallus oluşumunun,

3 mg/l BAP ve 0.3 mg/l IBA hormon konsantrasyonlarının kullanıldığı MS besin ortamında ise en yüksek soğan oluşumunun gözlendiğini belirtmişlerdir.

Santos ve Salema (2000), *Narcissus triandrus* L. Bitkisiyle yaptıkları çalışmalarında daha önceden ikiz pul yaprakları kullanılarak BA ve NAA kullanılan MS besin ortamında elde edilen sürgün kültürlerini kullanmışlar, sürgünleri JA'nın *in vitro* soğan oluşumu üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için JA'nın 2-iP ve NAA kombinasyonları yanısıra tek başına JA içeren besin ortamlarında kültüre almışlardır. JA – NAA kombinasyonunda soğanların çapı 5mm'ye kadar ulaşırken JA – 2-iP kombinasyonunda bu boyutun daha da düşük olduğunu ancak en başarılı sonuçların yalnızca JA kullanılan besin ortamında elde edildiğini ve bu besin ortamında büyütülen hemen hemen tüm soğanların kök verdiğini göstermişlerdir.

Sesiz (2014) *Hyacinthua orientalis* bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarıyla yaptığı çalışmasında farklı konsantrayonlarda TDZ, TDZ + NAA, TDZ + KIN ve KIN + NAA içeren MS besi ortamını kullanmış. Burada çimlenme gözlenen embriyoların bazal yapraklarını farklı konsantrasyonlarda BAP + 0.1 mg/l NAA ve 30 g/l sükroz içeren MS besin ortamına almış ve burada kallus ve soğancık oluşumunu gözlemlemiş ve elde edilen soğancıklarda yaprak uzunluğu ve çap artışını sağlamak için önce modifiye MS besin ortamına ardından da 20 mg/l GA_3 ve 50 g/l sükroz içeren besin ortamına alarak soğancıklarda çap artışını sağlamıştır.

Taha vd. (2019a) *Iris tingitana* bitksinin mikroçoğaltım protokolünü optimize etmek amacıyla yaptıkları çalışmada soğan kısımlarını eksplant olarak kullanmışlar. MS besin ortamında BA ve 2-iP hormonlarının *in vitro* sürgün çoğaltımına etkilerini incelemişlerdir. Bunun yanı sıra altkültürlerde sürgün ve soğancık gelişimine etkilerini incelemek için farklı konsantrasyonlarda sükroz (30, 60, 90 ve 120 g/l) tek başına ve büyüme inhibitörü olan paclobutrazol ile birlikte (3 ve 6 mg/l) kullanmışlar. Sonuçta eksplant başına en çok sürgün 1 mg/l BA veya 2-iP'de gözlenmiş, 30 g/l sükroz ile desteklenmiş MS besin ortamı sürgün çoğaltımı için, 3mg/l paclobutrazol ile sükrozun 90 veya 120 g/l konsantrasyonlarının kullanıldığı besin ortamının ise en yüksek soğancık çapının oluşumunu sağladığını göstermişlerdir. Ayrıca paclobutrazol ve yüksek konsantrasyonlarda sükroz kullanımıyla 3 kez tekrarlanan alt kültür sonucunda soğancık sayısının artışına katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir.

Taha vd. (2019b) *Lilium orientalis* cv. bitkisinden elde edilen farklı eksplantları kullanarak yaptıkları çalışmalarında farklı hormon ve konsantrasyonlarının direkt ve indirekt rejenerasyona etkilerini incelemişler. Bunun yanı sıra tek başına veya büyüme inhibitörü ile sükrozun çeşitli konsantrasyonlarının tekrarlanan üç alt kültür sonrasında soğancık oluşumu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Direkt sürgün organogenezi için 0.5 mg/l TDZ ve 10 mg/l 2,4-D kombinasyonları MS kültür ortamında 1 ay sonunda en yüksek sürgün sayısının oluşumunu sağlamışlar. İndirekt mikroçoğaltım için 0.5 mg/l 2iP ve 5 mg/l pikloram eklenmiş MS besin ortamında geliştirilen kalluslar eklenerek 3 ay sonra embriyolara ve zayıf sürgünlere ayırmış ve daha fazla çoğaltma için farklı ortama alındıktan sonra en fazla sayıda sürgün, yaprak ve soğancık oranı 1 mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA takviyesi yapılmış MS besin ortamında gözlendiğini belirtmişlerdir. 60 g/l sükroz ve 3 veya 6 mg/l paclobutrazol kullanımıyla 3. Alt kültür sonucunda en fazla soğancık/eksplant elde edildiğini ve en yüksek soğancık çapının 120 g/l sükroz ve 3 veya 6 mg/l paclobutrazol ile elde edildiğini göstermişlerdir.

Wawrosh vd. (2001) *Lilium nepalense* D.Don bitkisinin olgun soğanlarının ikiz pul yapraklarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında MS besin ortamında 20 µM zeatin kullanarak 4 haftalık bir kültür döneminde yediden fazla sürgün elde etmişler ve köklendikten sonra bitkileri *ex vitro* koşullara başarılı bir şekilde aktarımı sağlamışlardır.

Yurieyna ve Vladimirovna (2019) *Tulipa kaumanniana* bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında farklı sıcaklıklarda (+4°C - 20°C) muhafaza edilmiş tohumların farklı hormon kombinasyon ve konsantrasyonlarına (BAP+NAA, TDZ+NAA) yanıtlarını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda +4°C'de muhafaza edilmiş tohumlarda daha başarılı sonular elde ettiklerini belirtmişlerdir. Hormon içeriği açısından ise TDZ içeren besin ortamında elde edilen sonuçlar (soğuklanmamış tohumlarda %0, soğuklanmış embriyolarda %48 soğancık oluşumu) BAP içeren besin ortamında elde edilen sonuçlardan (soğuklanmış embriyolarda %39 soğancık oluşumu) daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

Mirici vd. (2008) *Bellevalia tauri Feibrun* bitkisinin olgunlaşmamış zigotik embriyoları ile yaptıkları çalışmada eksplant başına en yüksek sürgün sayısının 1 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren besi ortamında olduğunu tespit etmişlerdir.

Nasırcılar vd. (2017) *Bellevalia tauri* bitkisinin olgunlaşmamış embriyolardan daha önceden doku kültürü yöntemleriyle elde edilmiş olan soğancıkları kullanarak yaptıkları çalışmalarında MS besin ortamında BAP - NAA kombinasyonu ve 2,4-D hormonlarını kullanmış, 2,4-D içeren MS ortamında yeni bir soğancık oluşumu gözlenmediğini en başarılı sonucun 1 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında eksplant başına 2.83 soğancık olduğunu göstermişlerdir.

Sedcenco vd. (2011) *Bellevalia sarmatica* bitkisiyle yaptıkları çalışmada soğan pul yapraklarını kullanarak kültür ortamında elde ettikleri soğancıkları köklendirmek ve hızlı gelişimlerini sağlamak için 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeriğine sahip MS ortamlarında 60 ve 90 g/l sükroz konsantrasyonlarını kullanmışlar.1mg/l BAP+ 1mg/l NAA ve 60 g/l sükroz içeren MS ortamında elde edilen 14-17 mm soğan çaplarının en başarılı sonuçlar olduğunu belirtmişlerdir.

Bellevalia romana ile ilgili yapılan bir çalışmada kök, kotiledon ve mezokotil eksplantları ile çalışılmıştır. Kallus başlatımı, kök ve sürgün oluşumu ile somatik embriyogenesis üzerine bazı hormon kombinasyonlarının etkisinin incelendiği çalışmada NAA ve BAP birlikte kullanıldığında, mezokotik eksplantlarından kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerinde oldukça etkili bulunmuştur. Diğer taraftan 2,4-D uygulaması ise sürgün tomurcuğu oluşumunu baskılamıştır. Kotiledon ve kök eksplantlarından elde dilen kalluslarda gelişme oldukça düşük oranda kalmış ve sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir. Bitkicik oluşturan somatik embriyo farklılaşması ise 2,4-D içeren süspansiyon kültürlerinde gerçekleşmiştir (Lupi, Bennici, & Gennai, 1985).

Bellevalia romana bitkisinin doku kültüründe elde edilmiş kallus ve rejenerantları üzerinde yapılan sitolojik bir başka çalışmada, kallus hücrelerinin büyük çoğunluğunun diploid olduğu fakat diğer hücrelerin anöploid, tetraploid veya haploid çekirdekler taşıdığı rapor edilmiştir. Anöploid ve poliploid nukleus içeren hücrelerin frekansının 2,4-D içeren ortamda elde edilen kalluslarda, NAA ve BAP içeren ortamda elde edilen kalluslardan daha çok olduğu gözlenmiştir. Bu tip nukleusların sayılarının kültür süresi uzadıkça arttığı belirtilmiştir. Ayrıca kalluslardan rejenere edilmiş bitkiciklerin kök uçlarında miksoploidi ve anösomati gözlenmiştir (Cavallini, Cremonini, Lupi, & Bennici, 1986).

Süspansiyon kültürü ile elde edilen *Bellevalia romana* somatik embriyolarında farklı gelişim aşamasında yapılan sitolojik gözlemler sonucunda, embriyo gelişimi sırasında miksoploid ve anösmatik koşullar gözlenmiştir. Sadece globüler proembriyoların diploid olduğu rapor edilmiştir (Cavallini, Lupi, Cremonini, & Bennici, 1987).

Bu tez çalışmasının amacı kritik derecede tehlike altında olan *B. edirnensis'*in soğan ve olgunlaşmış embriyo eksplantlarından çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerin yardımı ile *in vitro* soğancık üretiminin teşvik edilmesi, elde edilen soğancıkların dış ortama aktarılması ve böylece bir mikroçoğaltım prosedürü geliştirilmesidir.

BÖLÜM 3

MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Materyalin Temini

Bellevalia edirnensis soğanları 2018 Mart-Nisan aylarında Tavuk ormanı (Edirne), Küçükkarakarlı köyü merası (Tekirdağ) mevkiilerinden vejetasyon döneminde sökülmüş ve topraklarından arındırılarak doku kültürü denemelerine kadar geçen sürede kurutma kağıdına sarılmış halde buzdolabında karanlık ortamda bekletilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Etanol (Sigma Aldrich, Katalog numarası E7023)
- Murashige and Skoog Basal Medium (MS) with minimal organics (Sigma Aldrich, Katalog numarası M0404)
- Sükroz (Duchefa, Katalog numarası S0809.1000)
- Plant Agar (Duchefa, Katalog numarası P1001.1000)
- Naphthaleneacetic acid (NAA) (Sigma Aldrich, Katalog numarası N0640)
- 6-Benzylamino pürine (BAP) (Sigma Aldrich, Katalog numarası B3408)
- 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) (Sigma Aldrich, Katalog numarası D7299)
- Sodyum hipoklorit (NaClO) (Ticari çamaşır suyu Domestos)
- HCl

- NaOH

3.1.3. Kullanılan Malzemeler

Cam ve plastik petri kapları, magenta, beher, piset, mezür, erlen mayer, pens, bisturi, diseksiyon makası, kurutma kağıdı, alüminyum folyo, mikropipet ve uçları, pastör pipeti, vida kapaklı şişeler, steril eldiven, maske, pamuk, gazlı bez.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Hazırlanması

Bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) olarak sentetik oksin olan Naftalenasetik asit (NAA) ve sentetik sitokinin olan 6-benzilaminopürin kullanılmıştır. Kullanılan BBD'leri stok solüsyon şeklinde hazırlanmış ve en geç 3 ay içinde kullanılmıştır. Stok solüsyonlar 1mg/ml yoğunlukta hazırlanmıştır.

3.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması ve İçeriği

Deneysel çalışmalarda besin ortamı olarak Murashige & Skoog (MS) bazal medyum kullanılmıştır (Murashige & Skoog, 1962). Soğan pulu kültürü için kullanılan besin ortamında 30 g/l sükroz ve değişik kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) (Çizelge 3.1) distile suya eklenerek 1000 ml'lik çözeltiler hazırlanmış ve pH'ı 1N HCl ve 1N NaOH kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. Ardından 7 g/l agar ilave edilerek otoklava alınmış 121°C ve 1 atm basınç altında 15 dk sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan MS ortamının bileşenleri (Babaoğlu & Gürel, 2001).

Bileşenler	**Konsantrasyon (mg/l)**
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$MgSO_4.7H_2O$	370
$CaCl_2.2H_2O$	440
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.H_2O$	22.3
KI	0.83
H_3BO_3	6.2
$ZnSO4.7H_2O$	8.6
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Na_2EDTA	37.3
Nikotinik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1
Myo-inositol	100
Glisin	2
Sakkaroz	30 000

Hazırlanan ve sterilizasyonu tamamlanan besin ortamları laminar hava akışlı kabin içine alınarak steril petrilere 20'şer ml olacak şekilde dökülmüş, içerisinde hava kabarcığı kalmaması için tüm petriler bek alevinden geçirilmiştir ve katılaşmaya bırakılmıştır.

Tohumların çimlenmesinde kullanılacak olan besin ortamında bazal medyum olarak vitamin içeren MS, 30g/l sükroz ve 7 g/l agar kullanılmış ortama herhangi bir hormon ilavesi yapılmamıştır.

Olgunlaşmış embriyoların kültüründe vitamin içeren MS, 30 g/l sükroz ve 7g/l agar ile 1, 2 ve 4 mg/l NAA, 1, 2 ve 4 mg/l 2,4-D eklenerek embriyo kültürü başlangıç ortamları hazırlanmıştır. Daha sonraki aşamada kallus oluşumu gözlenen petrilerdeki eksplantlar 1 mg/l NAA+ mg/l BAP içeren Kallus büyüme ortamına (KBO) aktarılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Embriyo kültüründe kullanılan BBD'leri ve konsantrasyonları.

BESİN ORTAMI İÇERİĞİ						
GRUPLAR	**NAA (mg/l)**	**2,4-D (mg/l)**	**BAP (mg/l)**	**Kin (mg/l)**	**Sükroz (g/l)**	**Agar (g/l)**
A	1	-	-	-	30	7
B	2	-	-	-	30	7
C	4	-	-	-	30	7
D	-	1	-	-	30	7
E	-	2	-	-	30	7
F	-	4	-	-	30	7
K.B.O	1	-	-	4	30	7

Soğan pulu kültüründe başlangıç ortamı olarak K, L, M ve N olmak üzere toplam 4 grup hazırlanmıştır. Her grup 30 g/l sükroz ve 7g/l agar içerecek şekilde sırasıyla kontrol (hormon yok), 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA, 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA ve 4 mg/l BAP + 1 mg/l NAA hormon kombinasyonlarıyla hazırlanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Soğan pulu kültürü başlangıç besin ortamında kullanılan BBD'leri ve konsantrasyonları.

Besin Ortamı Adı	**Besin Ortamı İçeriği**			
	BAP (mg/l)	**NAA (mg/l)**	**Sükroz (g/l)**	**Agar (g/l)**
K	-	-	30	7
L	2	1	30	7
M	2	2	30	7
N	4	1	30	7

Soğancık oluşumu gerçekleştikten sonra oluşan soğancıkların gelişimi ve köklendirilmesi için soğancık gelişim ortamı (SGO) hazırlanmıştır. Hormonsuz 30 g/l (K1) ve 60 g/l (K2) sükroz içeren ve 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP hormon kombinasyonuna sahip 30 g/l (H1) ve 60 g/l (H2) sükroz içeren toplam 4 adet SGO hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Soğancık gelişim ortamları (SGO) besin içerikleri.

Grup adları	**Agar (g/l)**	**Sükroz (g/l)**	**NAA (mg/l)**	**BAP (mg/l)**
SGO K1	7	30	-	-
SGO K2	7	60	-	-
SGO H1	7	30	1	1
SGO H2	7	60	1	1

3.2.3. Deneyde Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Deneylerde kullanılan tüm malzemeler öncelikle deterjan ve ticari çamaşır suyu ile yıkanmış ve bu sayede organik maddelerden arındırılması sağlanmıştır. Kurumaya bırakılan malzemeler sonrasında alüminyum folyo ile kaplanarak otoklavda 121 °C 1 atm basınç altında 15 dk boyunca steril edilmiştir.

3.2.4. Doku Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Soğanların ve Tohumların Sterilizasyonu

Topraklarından arındırılmış ve kurutma kağıdına sarılarak buzdolabında karanlık ortamda 3 ay kadar bekletilen soğanlar öncelikle akan musluk suyu altında 1 saat yıkanmıştır. Yıkanan soğanlar distile su ile hazırlanan %20'lik ticari çamaşır suyu çözeltisinde 17 dk bekletilmiştir. Ardından yine distile edilmiş su ile hazırlanmış olan %70'lik etil alkol çözeltisi içerisinde 5 dk bekletilmiş ve distile su ile 5 defa çalkalanmıştır.

Embriyo kültürü ve çimlenme için kullanılacak tohumlar öncelikle hazırlanan %20'lik çamaşır suyu çözeltisinde 15 dk bekletilip ardından %70'lik etanol çözeltisinde 4 dk daha bekletilmiştir. Sonrasında tohumlar 3 defa 5'er dk distile suyla durulandıktan sonra çimlenme için hazırlanan besin ortamına, embriyo kültüründe kullanılacak tohumlar ise şişmeleri için steril distile suya bırakılmıştır.

3.2.5. Soğan Eksplantlarının Hazırlanması

Soğanlar yukarıda anlatıldığı şekilde steril edildikten sonra bistüri ve pens yardımıyla kaide kısmı üzerinde kalacak şekilde yaprak tabanlarından 2-4 yapraklı olacak biçimde parçalar kesilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kültüre alınan soğan eksplantları.

Soğan pul yapraklarından elde edilen eksplantlar hazırlanan petrilere her bir grup 10'ar tekrar ve her bir petride 6'şar eksplant olacak şekilde yerleştirilmiştir. Hazırlanan deneme grupları 25 ± 2 °C'de 12 saat ışıklı 12 saat karanlık fotoperyot koşullarında iklimlendirme kabinine aktarılmıştır.

Oluşturulan deneme gruplarının takibi haftalık olarak gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyongözlenen petrilerdeki kontaminasyonlu eksplant veya eksplantlar deneyden çıkarılıp kalan eksplantlar alt kültüre alınarak kurtarılmıştır.

3.2.6. Embriyo Kültüründe Kullanılan Tohumların Hazırlanması

Sterilizasyonun ardından şişmeleri için steril dH_2O'ya alınan tohumlar 72 saat suyun içerisinde bekletilmiştir. Ardından %96'lık etanol ile iyice silinmiş steril kabin içerisinde otoklavlanmış pensler yardımıyla içlerindeki embriyo kısımları çıkarılarak, hazırlanmış olan besin ortamlarına her bir petride 5 tane embriyo olacak şekilde ekimleri gerçekleştirilmiştir. Petriler 1 hafta karanlıkta 4°C'de soğuk uygulamasına tabi tutulmuş ve ardından iklimlendirme kabinine alınmıştır. 1 ay folyoya sarılmış şekilde karanlıkta tutulan petriler sonrasında 12/12 h ışık/karanlık fotoperyodunda 25±2°C'de tutulmuştur. 6 ay boyunca ayda bir alt kültürler yapılarak embriyolardan kallus oluşumları takip edilmiştir. Ardından kallus oluşumu gözlenen petrilerde elde edilen kallusların tamamı

parçalara ayrılarak aynı hormon içeriğine sahip kallus büyüme ortamına aktarılmış ve alt kültürler yapılarak gelişimleri takip edilmiştir.

3.2.7. Çimlenmede Kullanılan Tohumların Hazırlanması

Bellevallia edirnensis bitkisinin çimlenme engeli olup olmadığını incelemek için hazırlanan deney düzeneğinde kullanılan tohumlar kontrol grubu (asit muamelesi yok), A grubu (10 dk H_2SO_4 muamelesi), B grubu (20 dk H_2SO_4 muamelesi) ve C grubu (30 dk H_2SO_4 muamelesi) olacak şekilde gruplandırılmıştır. Derişik sükfürik asit bahsi geçen sürelerde uygulandıktan sonra tohumlar 3 defa steril distile su ile durulanmış ve steril distile su içerisinde 2 gün boyunca şişmeye bırakılmıştır. Ardından hormon içermeyen MS besin ortamına transfer edilmiş ve her bir gruptan 3 tekrar, her bir magentada 10 tane tohum olacak şekilde iklim kabinine aktarılmıştır. İklim kabini koşulları yukarıda bahsedilen şartlar ile aynıdır. 1 ay boyunca izlenen kültürlerde çimlenen ve sağlıklı gelişen tohum sayıları kaydedilmiştir.

3.2.8. Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi

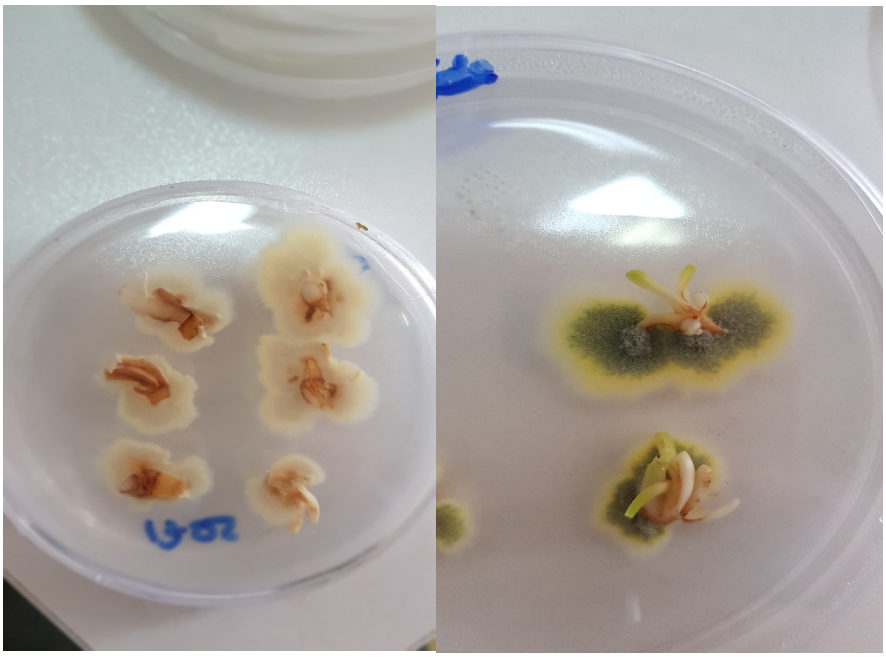
Soğan pulu kültürlerinden elde edilen veriler SPSS 15 paket programında analiz edilmiştir. Deney gruplarından elde edilen verilerin ortalamaları hesaplanarak gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar $p \leq 0,05$ önem düzeyinde student-t testi ile belirlenmiştir.

BÖLÜM 4

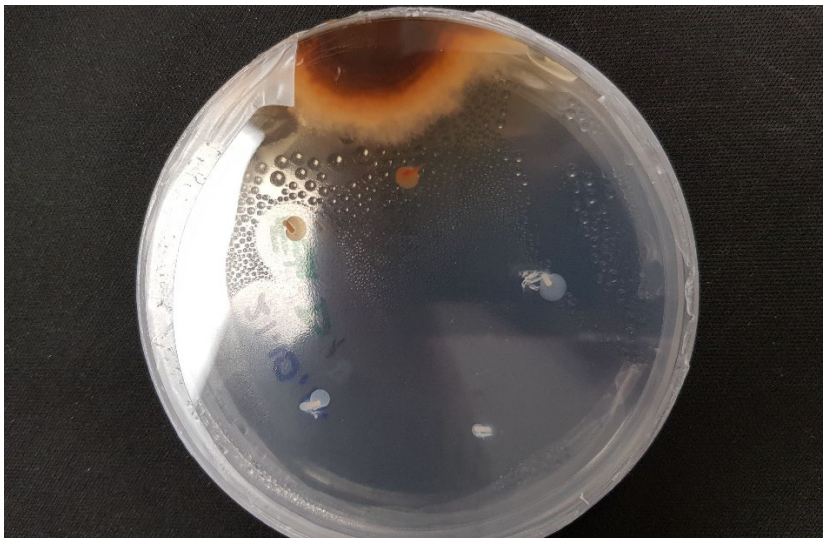
BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Sterilizasyon Sonuçları

Soğan pulu kültürlerinde kültürün birinci haftasından itibaren kontaminasyonlar gözlenmiştir. K, L, M ve N gruplarında sırasıyla %35.1, %40.3, %47.1 ve %45.6 oranında kontaminasyon gözlenmiştir. Tüm deney gruplarında soğan pulu kültürü başlangıç aşamasında ortalama %41.8 oranında kontaminasyon gözlenmiştir (Şekil 4.1). Embriyo kültürlerinde gözlenen kontaminasyon oranı ise %12.5 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bu açıdan bakıldığında soğanların kontaminasyon oranları ile karşılaştırdığımızda tohum sterilizasyonu daha başarılı olmuştur.



Şekil 4.1. Soğan pulu kültürü sırasında gözlenen kontaminasyon.



Şekil 4.2. Embriyo kültürü sırasında gözlenen bir kontaminasyon.

Kontaminasyon gözlenen eksplantlar besiyerinden uzaklaştırılarak kontaminasyon olmayan eksplantlar altkültüre aktarılmıştır. Kontaminasyonlu eksplantlar 1dk süreyle %70'lik etil alkolle muamele edilmiş ve taze besiyerinde altkültüre aktarılmıştır. Bu şekildeki eksplantların %54'ü kurtarılmıştır. Nesli tehlike altındaki bitkiler ile çalışmanın en zor kısımlarından birisi sınırlı başlangıç materyali ile deneyleri sürdürme zorunluluğudur. Bu sebeple kontaminasyon oranının düşürülmesi veya kontamine olan eksplantarın geri kazanımı öne arz etmektedir.

Özdemir vd. (2016) *Pancratium maritimum* L. Bitkisinin soğanları ile yaptıkları çalışmalarında % 2-10 oranında sodyum hipoklorit çözeltisinde bekleme sürelerine göre kontaminasyon ve deformasyon oranlarını incelemişlerdir. %2 ve 3'lük sodyum hipoklorit çözeltisi sonucunda kontaminasyon oranının %100 olduğunu ancak deformasyon gözlenmediğini, en başarılı sonuçların ise %5-6 oranında NaOCl çözeltisinin 30-35 dk muamelesiyle elde edildiğini gözlemlemişlerdir.

Mirici vd. (2008), *Bellevalia tauri* bitkisinin soğanlarıyla yaptıkları çalışmalarında başlangıçta %20'lik NaOCl çözeltisi içerisinde 35 dk beklettikleri soğanlarda 3-4 gün içerisinde yoğun fungus kontaminasyonu gözlemişler %40 ve 80 olarak NaOCl çözeltisinin konsantrasyonu artırıldığında da aynı durumun gerçekleştiğini ardından soğanları 4'e bölerek sterilizasyon aşamalarını tekrarlamışlar. Bu yöntemle kontaminasyon gözlenmemiş ancak soğan dış pul yapraklarında canlılığın kaybolduğunu

belirtmişler. En etkili yöntemin ise kök ve dış kabuklar uzaklaştırıldıktan sonra akan musluk suyu altında deterjan ile birkaç defa yıkanan ve iyice durulanan soğanların %99'luk etanolde 3dk ardından %80'lik NaOCl çözeltisi içerisinde 30 dk bekletilip 3 defa 5'er dk saf suda durulanmasıyla elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Mirici vd. (2008) *Iris stenophylla*, ve *Muscari mirum* bitkisinin soğanlarıyla yaptıkları çalışmalarında akan musluk suyu altında deterjanla yıkanıp durulanan soğanların 3dk süreyle %99'luk etanolle muamelesinin ardından %20, 40 ve 80'lik NaOCl çözeltisi içerisinde 20 ve 30 dk bekletilip 3 defa 5'er dk saf suda durulayarak yaptıkları sterilizasyon sonucunda en etkili yöntemin %80'lik NaOCl çözeltisinde 30dk bekletilerek gerçekleştirildiğini belirtmişlerdir.

Mirici vd. (2008) *Galantus peshmenii*, *Muscari mirum* ve *Bellavalia tauri* bitkilerinin tohumlarını kullanarak yaptıkları deneylerinde %80'lik ticari çamaşır suyuyla hazırladıkları çözelti içerisinde 20 dk bekletmiş ve ardından 3 defa 5'er dk steril saf su ile durulamışlardır.

Erişen vd. (2009) *Astragalus* L. (*Leguminosae*) tohumları ile yaptıkları çalışmalarında %30 ve %20'lik çamaşır suyu çözeltilerini 15 ve 10 dk uygulayarak sterilizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Yapılan denemeler sonucunda kontaminasyona rastlamamışlardır. Gelişim açısından incelendiğinde ise düşük doz ve düşük uygulama süresinin en iyi sonucu verdiğini belirlemişlerdir.

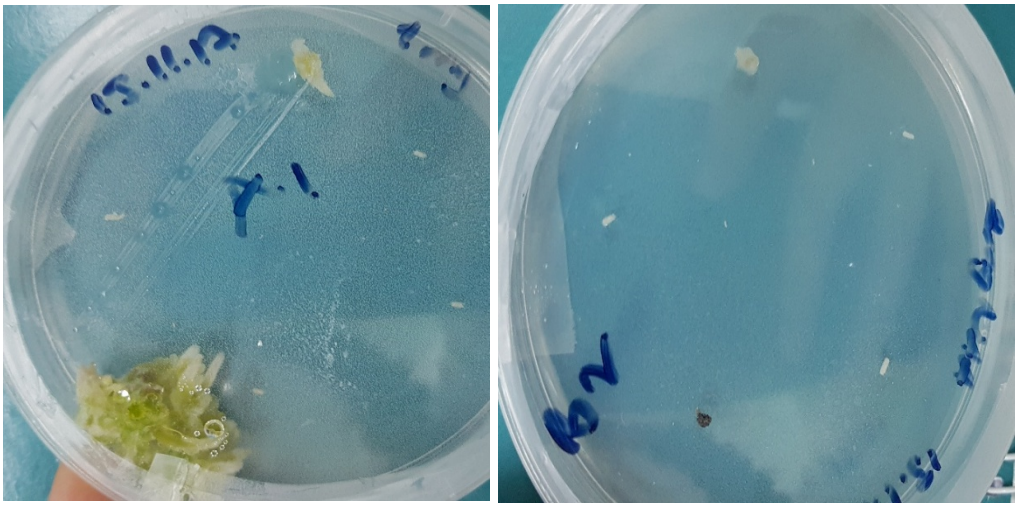
Mirici (2000) kolza tohumlarında yaptığı çalışmasında yüzey sterilizasyonu için %20, 60, 80 ve 100'lük ticari çamaşır suyu çözeltileri kullanmıştır. Ardından kültüre alınan tohumlardan en iyi çimlenme sonucunun (%100) %20'lik çamaşır suyu çözeltisinde elde edildiğini ve sterilizasyonun da yine %100 oranında sağlandığını ancak %80 ve %100'lük dozlarda tohumların çimlenmediğini dolayısıyla bu oranlardaki çamaşır sularının embriyoya zarar verdiğini belirtmiştir.

Yukarıdaki literatür sonuçları incelendiğinde sterilizasyon aşamasının türden türe ve kullanılan eksplant tipine göre değişiklik gösterdiği, kullanılan sterilizantların konsantrasyon ve uygulama sürelerinin değişkenlik içerdiği görülmektedir. Bu tez çalışmasında soğan pulu kültürlerinde gözlenen kontaminasyon oranının (%41.8) embriyo kültürlerinde gözlenen toplam kontaminasyon oranından (%12.5) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebini, toprak altında bulunan soğanların bakteri ve mantarlar

tarafından daha fazla enfekte edilmesi, aynı zamanda soğan pullarının sterilizasyon süresinin soğanların rejenerasyon kabiliyetini etkilememek için kısa tutulması olduğu düşünülmektedir. Öte yandan tohumlar meyve içerisinde daha steril ortamda bulunmakta ve tohum kabuğunun koruyucu etkisinden dolayı sterilizasyon süresi uzun tutulabilmektedir. Bu sebeple tohumlara uygulanan sterilizasyon protokolü daha başarılı olmaktadır. Soğan kullanılarak yapılan diğer çalışmalar da incelendiğinde canlılığın korunması açısında düşük konsantrasyonlarda ve düşük sürelerde sterilizasyon gerçekleştirildiğinde kontaminasyon önlenememektedir. Kullanılan NaOCl konsantrasyonu ve muamele süresi artırıldığında ise canlılığa zarar verildiği görülmektedir. Bu sebeple soğan eksplantlarının sterilizasyonunda optimum süre ve konsantrasyonun bulunması amacı ile ön denemelerin yapılması başarı şansını arttıracak bir durum olacaktır. Fakat bu çalışmada geniş bir deneme deseni oluşturacak düzeyde başlangıç materyali bulunmadığı için literatür bilgileri ışığında bir protokol hazırlanmış ve takip edilmiştir.

4.2. Embriyo Kültürü Sonuçları

Embriyo kültüründe kullanılmak üzere kültüre alınan tohumlar 6 ay süreyle gözlenmiş ve her ay alt kültüre alınarak takipleri gerçekleştirilmiştir. 6 ayın sonunda **C** (4 mg/l NAA), **D** (1 mg/l 2,4-D), **E** (2 mg/l 2,4-D) ve **F** (4 mg/l 2,4-D) gruplarında herhangi bir gelişim gözlenmemiştir. **A** (1 mg/l NAA) ve **B** (2 mg/l NAA) gruplarında ise sırasıyla %40 ve %7 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.3). Elde edilen kallus yüzdeleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Oluşan kalluslardan (6. Ay sonunda toplam 7 adet) soğancık rejenerasyonu elde edilememiştir. Kallus büyümesi devam etmiş olduğu için her alt kültürde kalluslar birkaç parçaya bölünerek sayıca ve biyokütle olarak arttırılmıştır.



Şekil 4.3. 6 ay sonunda A ve B gruplarında oluşan kalluslar.

Çizelge 4.1. Embriyo kültüründe 6 ay sonundaki kallus oluşturan eksplant yüzdesi.

GRUPLAR	**Hormon konsantrasyonu (mg/l)**	**Kallus gelişimi %**
A	1 mg/l NAA	40
B	2 mg/l NAA	7
C	4 mg/l NAA	0
D	1 mg/l 2,4D	0
E	2 mg/l 2,4D	0
F	4 mg/l 2,4-D	0

Olgunlaşmış embriyolardan oluşan kalluslar 6 ayın sonunda KBO'ya alınarak 1 ay boyunca kallus gelişimlerinin takibi sağlanmıştır (Şekil 4.4). Bu ortamda bulunan kalluslarda herhangi bir rejenerasyon gözlenmemiş fakat büyümeleri devam etmiştir (Şekil 4.5). Herhangi bir kahverengileşme veya camlaşma gözlenmemiş olup yumuşak açık sarı renkli kalluslar oluşmuştur. KBO ortamına alınan kallusların (yaklaşık 120 adet kallustan rastgele seçilen 60 tanesi tartım denemeleri için kullanılmıştır) başlangıç yaş ve kuru ağırlık ortalaması sırasıyla 1.66 ve 0.15 g'dır. Birinci ay sonunda yaş ve kuru ağırlık ortalaması sırasıyla 2.23 ve 0.21 g'dır. Yaş ve kuru ağırlık ortalamasındaki 1 aylık artış sırasıyla %74.4 ve %71.4 olarak belirlenmiştir.

Doğan vd. (2020) *Hyacinthus orientalis* bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarıyla yaptıkları çalışmalarında farklı konsantrasyonlarda hormon ve sükroz kullanımlarının

bitkinin soğancık oluşumu ve köklenmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalar sonucunda eksplant başına oluşan soğancık sayısının en fazla 13.7 ile 1 mg/l JA + 0.25 mg/l 2iP içeren MS ortamında, en büyük çapa sahip soğancıkların 7.9 mm ile 2 mg/l JA içeren MS ortamında ve soğancık başına ortalama köklenmenin 17.9 adet ve %81.14 ile 1 mg/l IAA + 2 mg/l JA içeren MS ortamında elde edildiğini belirtmişlerdir. Sükroz konsantrasyonları açısından elde ettikleri sonuçlarda ise 12 haftalık kültür sürecinde ortalama soğan çapının 7.4 ve 7.2 mm ile en yüksek 60 g/l sükroz ve 90 g/l sükroz içeren 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA içeren MS ortamında, eksplant başına en yüksek soğancık sayısının 18.2 ve 16.9 ile 90 g/l sükroz ve 30 g/l sükroz içeren MS ortamında kaydedildiğini belirtmişlerdir.

Mirici vd. (2005) *Sternbergia fischeriana* bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarıyla yaptıkları çalışmalarında iki ayrı protokol uygulamışlardır. İlk uyguladıkları protokolde en başarılı sonuçların embriyo başına 81.2 soğancık oluşumuyla 4 mg/l BA + 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edildiğini belirtmişlerdir. İkinci protokolde aşamalı bir yöntem izlemişlerdir. Sonuçta embriyo başına oluşan soğancık miktarını 85.8 ile en başarılı yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

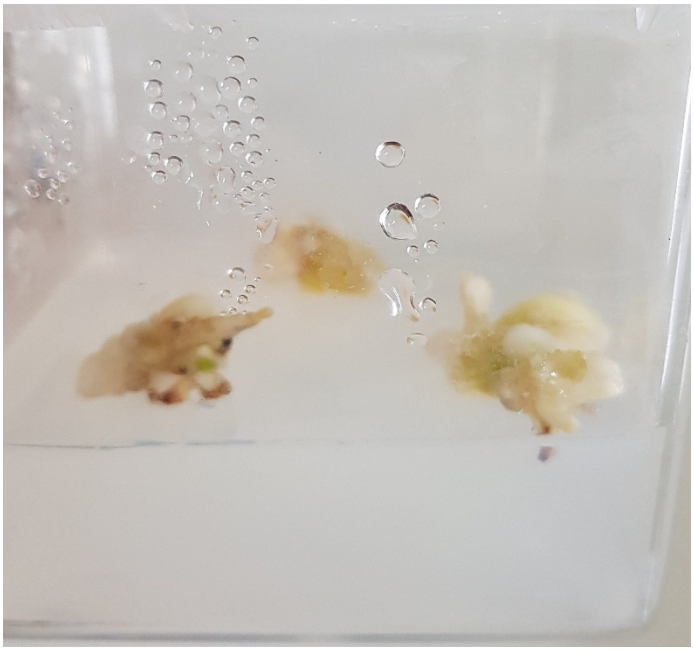
Doğan Kalyoncu (2007) *Tulipa sintenesii* ve *Tulipa armena* bitkilerinin olgunlaşmamış embriyolarıyla yaptığı çalışmasında farklı konsantrasyonlarda hormon kombinasyonları içeren MS (tek aşamalı protokol) ve N_6 (4 aşamalı protokol) ortamlarını kullanmıştır. 16 aylık kültür sürecinin sonunda 4 aşamalı protokolde *T. sintensii* bitkisinde eksplant başına 22.67, *T. armena* bitkisinde ise eksplant başına 16.42 adet soğancık oluştuğunu tek aşamalı protokolde ise *T. sintensii* bitkisinde yalnızca 27.10 adet soğancık elde edildiğini belirtmiştir.

Karaoğlu (2008) *Sternbergia fischeriana* ve *Sternbergia clusiana* bitkilerinin olgunlaşmamış embriyolarıyla yaptığı çalışmasında her bir bitki türü için ayrı bir protokol izlemiştir. *S. Fischeriana* bitkisinde en yüksek eksplant baına soğancık oluşumunu 2.9 adet ile 4 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamında elde ettiğini, *S. clusiana* bitkisinde en eksplant başına en yüksek soğancık oluşumunun 2.2 adet ile 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamında elde ettiğini belirtmiştir.

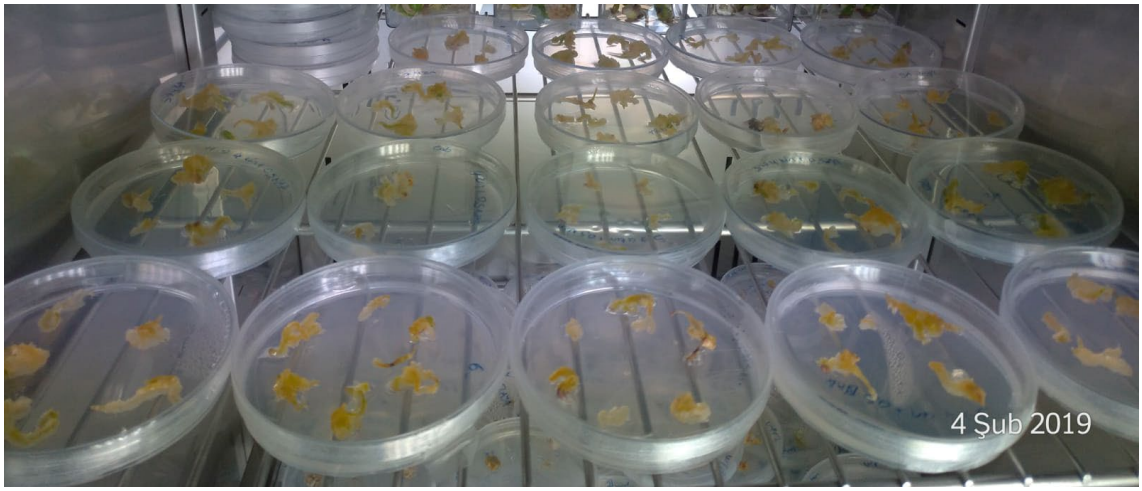
Uzun vd. (2014) *Muscari muscarimi* bitkisini olgunlaşmamış embriyolarıyla yaptıkları deneylerinde çeşitli BBD'lerinin farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını

kullanmışlar ve en başarılı sonuçların 1 yıllık kültür süreci sonunda eksplant başına 59 adet soğancık oluşumuyla 4 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Yurievna ve Vladimirovna. (2019) *Tulipa kaumanniana* bitkisinin olgunlaşmamış embriyolarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında farklı sıcaklıklarda muhafaza edilmiş tohumların farklı hormon konsantrasyonlarına yanıtlarını incelemişlerdir. 4°C'de muhafaza edilen tohumlardan elde edilen embriyoların en başarılı sonuçları verdiğini belirtmişlerdir. 0.5 mg/l BAP + 0.3 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kallus oluşturan eksplant yüzdesi %2.7, soğancık oluşumu %39 ve oluşan soğancık sayısı 3.73 adet olarak, 0.5 mg/l TDZ + 0.3 mg/l NAA içeren MS besin ortamında kallus oluşturan eksplant yüzdesi %5.5, soğancık oluşumu %48.02 ve oluşan soğancık sayısını ise 4.62 adet olarak belirtmişlerdir.



Şekil 4.4. K.B.O'ya aktarılan kallusların 1. ay sonundaki gelişimi.



Şekil 4.5. K.B.O'ya aktarılan kalluslar.

Yapılan bu tez çalışmasında, embriyo kültüründe rejenerasyon oranının düşük kaldığı gözlenmektedir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde embriyodan soğancık oluşumuna kadar geçen her safhada ayrı bir protokol uygulanması gerektiği ve bu sebeple çok basamaklı protokollerin embriyodan soğancık oluşumu için daha uygun olduğu görülmektedir. Bununla birlikte olgunlaşmamış embriyoların kullanımının olgunlaşmış embriyolara kıyasla daha başarılı rejenerasyon gösterdiği aşikardır. *B. edirnensis* bitkisinin birey sayılarının az olması ve doğadan oldukça sınırlı sayıda bitki örneği elde edilebilmesinden ötürü, embriyo kültürü denemelerinin düşük tekrarlı yapmak gerekmiştir. Ayrıca daha geniş bir hormon çeşitliliği yelpazesi kullanmak mümkün olmamıştır. Buna karşın düşük frekansta da olsa embriyolardan kallus kültürleri elde edilmiş ve bu kültürlerde biyokütle artışı sağlanmıştır. Embriyo kökenli kalluslardan bitki rejenerasyonu elde edilememiş olsa da tez çalışmasında elde edilen kallus kültürleri sürekli alt kültüre alınarak laboratuvarda *in vitro* ortamda muhafaza edilmektedir. Sürekli kültürlerin bu şekilde kullanımı türün *in vitro* korunmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca daha sonra yapılacak çalışmalarda kalluslardan rejenerasyon protokolü geliştirmenin önünü açacaktır. Bu bağlamda elde edilen sonuçların yararlı olduğu/olacağı düşünülmektedir.

4.3. Çimlenme Sonuçları

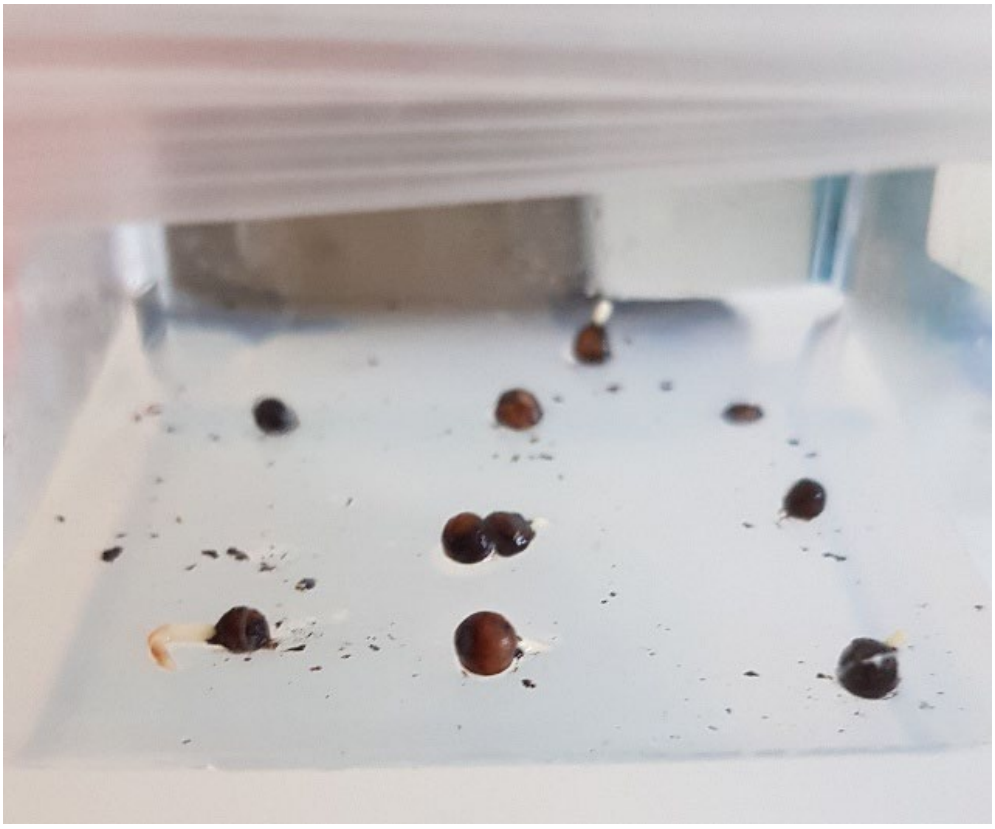
Çimlenme denemesinde kullanılan kontrol grubunda çimlenme yüzdesinin %0, 10 dk sülfürik asit muamelesi sonucunda çimlenmenin %10 (Şekil 4.6), 20 dk sülfürik asit

muamelesi sonucunda çimlenmenin %46,6 (Şekil 4.7) ve 30 dk sülfürik asit muamelesi sonucunda çimlenmenin ise %73,3 (Şekil 4.8) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Erken vd. (2017) *İris sari* bitkisinin tohumlarıyla yaptıkları çalışmalarında tohumları 17 farklı uygulamaya tabi tutmuşlardır. Bu çalışma da 30, 45 ve 60 dk H_2SO_4 muamelesi sonucunda tohumlarda 1.yılın sonunda sırasıyla %9, %9,5 ve %10,5 çimlenme elde edildiğini 2.yılın sonunda ise sırasıyla %14, %17 ve % 15,50 çimlenme elde edildiğini belirtmişlerdir. Bu verilere bakılarak H_2SO_4 muamelesinin skarifikasyon sırasında tohuma zarar verdiğini ve çimlenmenin olumsuz etkilendiğini, en başarılı sonucun ise 72 saat suda bekletme + kabuk soyma ile elde edildiğini ve birinci yılın sonunda çimlenmenin %39 ikinci yılın sonunda ise %55'e ulaştığını söylemişlerdir.

Çizelge 4.2. 1 aylık çimlenme sonuçları (%).

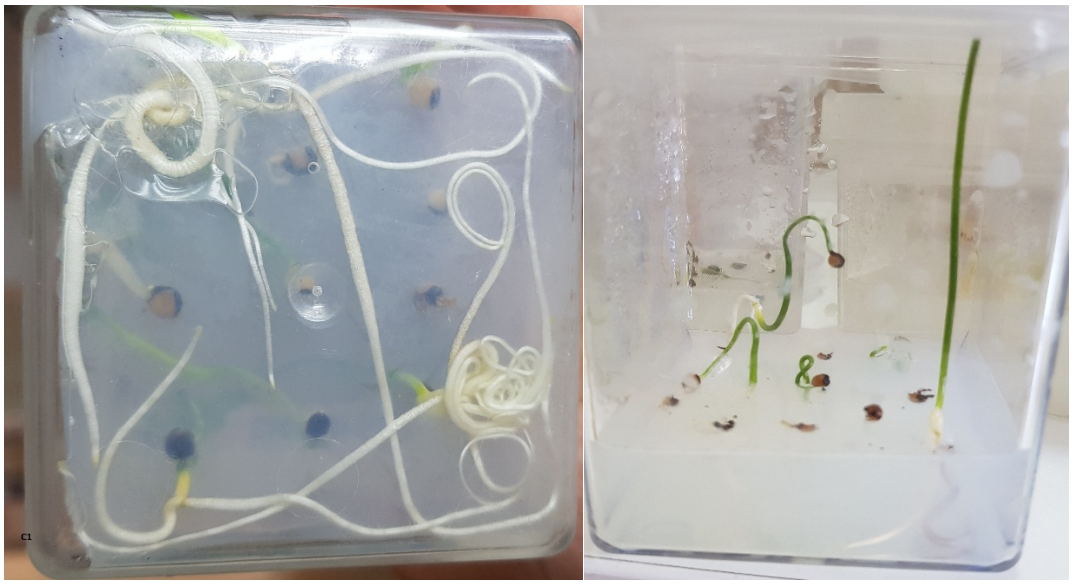
Kontrol	**A (10 dk H_2SO_4 muamelesi)**	**B (20 dk H_2SO_4 muamelesi)**	**C (30dk H_2SO_4 muamelesi)**
0	10	46.6	73.3



Şekil 4.6. 10 dk sülfürik asit muamelesine tutulan tohumlarda çimlenme 1. ay sonuçları.



Şekil 4.7. 20 dk sülfürik asit muamelesi gören tohumlarda çimlenme 1. ay sonuçları.



Şekil 4.8. 30 dk sülfürik asit muamelesine tabi tutulan tohumlarda çimlenmenin 1. ay sonuçları.

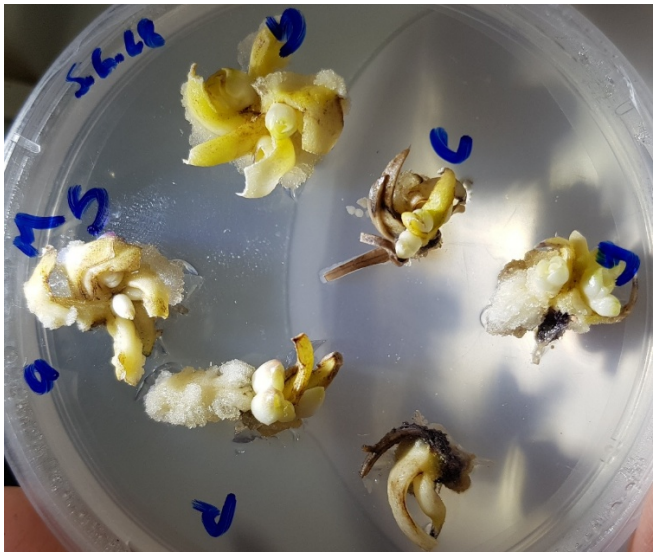
Tohum içerisinde bulunan canlı embriyonun çimlenmesini engelleyen dormansi iki şekilde gözlenebilmektedir. Birincisi fiziksel dormansi yani kabuk kalınlığı ve sertliği nedeniyle tohumun çimlenememesi, ikincisi ise fizyolojik dormansidir. Fizyolojik dormansi ise tohum kabuğu ve perikarpta nispeten yüksek oranlarda inhibitör bulunması ve geçirgen olmayan tohum kabuğundan bu inhibitörlerin dışarı çıkamaması sonucu çimlenmenin gerçekleşememesidir (Boyraz, Korkmaz, & Durmaz, 2019).

Bu çalışmada kullanılan *B. edirnensis* bitkisine ait olan tohumlar çimlenme denemelerinde öncelikle fiziksel dormansinin kırılması amacıyla sülfürik asit muamelesine tabi tutulmuş ve çimlenmeleri gözlenmiştir. Sülfürik asit ile tohum kabuğunda aşınma meydana getirilerek tohumun çimlenmesi sağlanmıştır. Bu çalışma sonucunda *B. edirnensis* bitkisinin tohumlarındaki dormansinin sebebinin fiziksel dormansi olduğu düşünülmektedir. Çimlenme oranının %100'e ulaşmamış olmasının bir sebebi olarak çimlenme sıcaklığı akla gelmektedir. *B. edirnensis* tohumlarının doğada çimlenme zamanı kış sonu ilkbahar başı olarak düşünülmektedir. Edirne ili 1981-2010 yılı ortalama sıcaklık verileri incelendiğinde şubat ve mart ayı ortalama sıcaklıkları sırasıyla 4.2 ve 7.5 ºC'dir. En yüksek ortalama sıcaklıklar sırasıyla 9.2 ve 13.2 ºC iken en

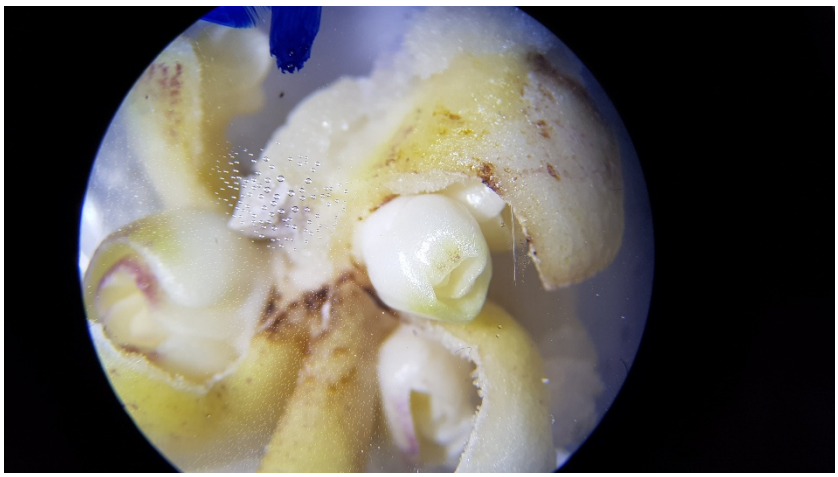
düşük ortalama sıcaklık ise yine sırasıyla 0.3 ve 2.8 ºC'dir. Bu veriler ışığında değerlendirildiğinde Edirne sümbülü tohumlarının optimum çimlenme sıcaklığının, bizim deneysel çalışmada kullandığımız 25 ºC'den daha düşük olması muhtemel görünmektedir. Ancak tohum sayısının azlığı sebebi ile farklı bir sıcaklık koşulunda deneme yapmak mümkün olmamıştır (Meteoroloji Genel Müdürlüğü, 2020).

4.4. Soğan Pulu Kültürü Sonuçları

Soğan pulu kültürünün 12. haftasında elde edilen kallus oluşturan eksplant oranı soğancık oluşturan eksplant oranı ve soğancık oluşturan eksplant başına oluşan soğancık sayısı verileri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Bu veriler kapsamında kontrol grubu olan ve hormon kullanılmadan hazırlanmış olan K besin ortamında kallus oluşumu %12.2, soğancık oluşumu %35.1 olup eksplant başına oluşmuş olan soğancık sayısı 1.4, soğancık çapı ortalaması 0.42 cm ve oluşan toplam soğancık sayısı 37 olarak gözlenmiştir. 2 mg/l BA ve 1mg/l NAA kullanılarak hazırlanmış olan L besin ortamında kallus oluşumu %82.4, soğancık oluşumu %79.4, eksplant başına oluşmuş olan soğancık sayısı 2.8, soğancık çapı ortalaması 0,43 cm ve oluşan soğancık sayısı ise 75 olarak tespit edilmiştir. 2mg/l BA 2mg/l NAA kullanılarak hazırlanmış olan M besin ortamında kallus oluşumu %89.2, soğancık oluşumu %97.3, eksplant başına oluşmuş olan soğancık sayısı 4, soğancık çapı ortalaması 0,44 cm ve oluşan soğancık sayısı 143'tür.Son olarak 4mg/l BA ve 1mg/l NAA kullanılarak hazırlanmış olan N besin ortamında kallus oluşumu %91.1, soğancık oluşumu %91.1, eksplant başına oluşmuş olan soğancık sayısı 4.9, soğancık çapı ortalaması 0.4 cm ve oluşan toplam soğancık sayısı ise 249 olarak belirlenmiştir. Elde edilen soğancıkların kültür ortamında ve stereo mikroskop altındaki görünümleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Sonuçlar toplu olarak Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.9. M grubu (2 mg/l BAP + 2mg/l NAA) soğan başlangıç kültüründe 1 ayın sonunda soğancık oluşturan eksplantlar.



Şekil 4.10. 1 ay sonunda oluşan soğancıkların mikroskop altında görüntüsü.

Deswiniyanti vd. (2020) *Lilium longilorum* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmada BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarını kullanmış ve büyüme yüzdesi, sürgün sayısı ve en iyi büyüme süresinin sonuçlarının 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamında elde edildiğini belirtmişlerdir.

Mirici vd. (2008) *Muscari mirum* Speta bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmalarında 1, 2 ve 4 mg/l BAP + 0.25 mg/l NAA, 1, 2 ve 4mg/l BAP + 0.5

mg/l NAA kullanarak en etkili hormon kombinasyonunun 2 pul yapraklı ekpslantlarda eksplant başına sürgün sayısı 10.63, 4 pul yapraklı eksplantlarda eksplant başına oluşan sürgün sayısını 10.73 olacak şekilde 2mg/l BAP + 0.25 mg/l NAA olduğunu belirtmişlerdir.

Karaoğlu (2008) *Sternbergia candida* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptığı çalışmasında 14 farklı hormon kombinasyonu kullanmış 6 ayın sonunda en fazla soğancık oluşum yüzdesinin %73.08 ile 4 mg/l kin + 0.5 mg/l NAA içeren besin ortamında elde edildiğini belirtmiştir. Ardından elde edilen soğancıkların gelişimi için farklı sükroz (15, 30, 45 ve 60) ve agar (7, 8 ve 10) konsantrasyonlarını kullanmış ve 60 g/l sükroz kullanımı sonucunda soğan çapların 0.950 cm'den 1.025 cm'ye yükseldiğini, ayrıca 10 g/l agar kullanımı sonucunda da soğan çaplarının 1.320 cm'den 1.360 cm'ye yükseldiğini belirtmiştir. Sonuçlara bakarak yüksek oranda agar ve sükroz içeriğine sahip besin ortamının daha büyük soğan çaplarının elde edilmesinde etkili olduğunu belirtmiştir.

Mir vd. (2012) *Lilium longilorum* bitkisinin soğan pul yapraklarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında MS besin ortamında NAA ve BAP'nin birlikte ve ayrı ayrı olacak şekilde farklı konsantrasyonlarını kullanmışlar. En yüksek soğancık oluşumunun %94, maksimum sürgün sayısının 22, maksimum sürgün uzunluğunun 12cm ve ortalama taze ağırlığın en fazla 365 mg olarak 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA ortamında elde edildiğini belirtmişlerdir. Elde edilmiş soğancıkları köklenmeleri için NAA veya BAP'nin farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanmış besin ortamına aktarmışlar. En başarılı sonuçların %93 köklenme yüzdesi ve 5.2 cm en yüksek kök uzunluğu olarak 2 mg/l NAA içeren MS ortamında elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Mirici vd. (2008) *Iris stenophylla* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmalarında 1, 2 ve 4mg/l BAP + 0.25 mg/l NAA kullanarak en etkili hormon kombinasyonunun eksplant başına 2.40 adet soğancık oluşumu ile 1 mg/l BAP + 0.25 mg/l NAA olduğunu belirtmişlerdir.

Babashpour vd. *Galanthus transcaucasicus* bitkisinin soğan pul yapraklarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında 0, 0.5, 1, 1.5, 2 ve 2.5 mg/l BAP ve 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, ve 0.5 mg/l NAA kombinasyonlarını kullanmışlar en etkili hormon kombinasyonunun 2 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA olduğunu belirtmişlerdir.

Özel vd. (2007) *Muscari macrocarpum* bitkisinin ikiz pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmada MS besin ortamında farklı BAP ve NAA hormon kombinasyonlarını kullanmışlar. 2 mg/l BAP ve 0.5mg/l NAA hormon konsantrasyonlarıyla eksplant başına 12.64 adet aksillar ve adventif soğancık elde edildiğini, ayrıca 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA hormon konsantrasyonlarıyla eksplant başına 3.33 adet aksillar soğancık elde edildiğildiğini ve bu sonuların en başarılı sonuçlar olduklarını belirtmişlerdir.

Doku kültürü çalışmalarında oksin genellikle farklılaşmış dokuların fizyolojik olarak kökten değişimini sağlayarak yeniden farklılaşma durumuna geçmesini ve bölünmeye başlamasını sağlamak amacıyla kullanılır. Loschiavo vd. (1989) yaptıkları çalışmalarında oksinlerin DNA'nın normalden daha fazla metilasyona uğramasına neden olduğunu keşfetmişlerdir. Bu durumun yeniden farklılaşma için önemli olabileceğini önermişlerdir (Loschiavo vd., 1989).

Sitokininler ise sürgün başlatılmasının teşvik edilmesinde oldukça etkilidir ve bu amaçla oksinler ile birlikte kullanılır. Sürgün rejenerasyonu için ortama ilave edilen sitokinin kallusların sürgün gelişimini teşvik etmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda sitokinin ve düşük konsantrasyonlarda oksinin birlikte kullanımı genellikle adventif sürgün oluşumunu sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında ve yukarıda verilen örneklerde de görüldüğü gibi yüksek konsantrasyonlarda BAP ve düşük konsantrasyonlarda NAA'nın birlikte kullanımı sonucunda soğan pul kültüründe kallus ve özellikle soğancık gelişimini etkilediği gözlenmiştir. 4 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamının kallus oluşumu, soğancık oluşturan eksplant sayısı, eksplant başına soğancık sayısı ve soğancık çapı ortalaması bakımından en iyi sonuçları verdiği gözlenmektedir. Kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli düzeyde farklı olan bu oranların, literatürdeki oranlar ile karşılaştırıldığında başarılı sonuçlar elde edildiği düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. Farklı miktarlarda hormon kullanılarak oluşturulmuş besin ortamlarının kallus (%), soğancık (%), soğan/eksplant, ortalama soğancık çapı (cm) ve toplam soğancık sayısı üzerine olan etkilerine ait bulgular.

Besin Ortamı Adı	Kallus (%)	Soğancık oluşturan eksplant (%)	Soğancık /Eksplant	Soğancık çapı ort. (cm)	Toplam soğancık sayısı
K (Hormonsuz)	12.2[a*]	35.1[a]	1.4[a]	0.42[a]	37
L (2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA)	82.4[b]	79.4[b]	2.8[b]	0.43[a]	75
M (2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA)	89.2[bc]	97.3[c]	4[c]	0.44[a]	143
N (4 mg/l BAP + 1 mg/l NAA)	91.1[c]	91.1[c]	4.9[d]	0.47[a]	249

*Aynı sütundaki farklı harfler değerlerin $p \leq 0,05$ önem düzeyinde student-t testi sonuçlarına göre istatistiki açıdan anlamlı olduğunu gösterir.

4.5. Soğancık Gelişimi ve Köklenme Sonuçları

Soğan pulu kültürüyle elde edilen soğancıklardan en iyi durumda olan 120 tanesi ile soğancık gelişimi için MS+30 g/l sükroz, MS + 60 g/l sükroz, MS + 30 g/l sükroz+ 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP ve son olarak MS+ 60 g/l sükroz+ 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP kombinasyonlarıyla hazırlanan 4 farklı ortama aktarılmıştır. 30 g/l sükroz içeren kontrol grubuna alınan soğanlarda başlangıç çapı 0.44 cm'den 0.52'ye çıkarken köklenme yüzdesi %75.8, kök boyu 5.0 cm ve ortalama oluşan kök sayısı 3.5 olarak tespit edilmiştir. 60 g/l sükroz içeren kontrol besin ortamında soğanların çapları 0.44 cm'den 0.52'ye çıkarken köklenme yüzdesi %53, kök boyu 3.7 ve ortalama oluşan kök sayısı 4.4'tür. 1 mg/l BA + 1 mg/l NAA ve 30 g/l sükroz içeren besin ortamında bulunan soğanların çapları 0.43 cm'den 0.62'ye çıkarken köklenme yüzdesi %8.8, kök boyu 0.5 cm ve oluşan ortalama kök sayısı 2.2 olarak bulunmuştur. Ve son olarak 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 60 g sükroz içeren besin ortamına alınan soğanların çapları ise 0.45 cm'den 0.77 cm'ye çıkarken köklenme yüzdesi %0 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakılarak 30 g/l sükroz içeren kontrol grubunda soğan çapı artışı %26.1, 60 g/l sükroz içeren kontrol grubunda soğan çapı artışı %19.0, 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 30 g/l sükroz içeren besin

ortamında soğan çapı artışı %45.0 ve 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA ve 60 g/l sükroz içeren besin ortamında soğan çapı artışı ise %71.0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Mirici vd. (2008) *Muscari mirum* Speta ve *Iris stenophylla* bitkilerinin soğan pul yapraklarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında kültür ortamında oluşturulup yeterli büyüklüğe ulaşan soğancıkları köklenmeleri için BBD içermeyen MS ortamına aktarmış ve bu şekilde köklenmelerinin sağlandığını belirtmişlerdir.

Han vd. (2005) *Lilium* hibriti ‘’Casablanca’’ soğanlarıyla yaptıkları deneylerinde kinetin, BA ve TDZ ieren besin ortamında kültüre alıp oluşturdukları soğanların çap artışını sağlamak için 60 g/l sükroz ve 2 g/l aktif kömür içeren besin ortamında alt kültüre almışlardır. 3 ayın sonunda soğan ağırlığının yaklaşık 11g’a çıktığını belirtmişlerdir.

Sedcenco vd. (2011) *Bellevalia sarmatica* bitkisiyle yaptıkları çalışmada soğan pul yapraklarını kullanarak kültür ortamında elde ettikleri soğancıkları köklendirmek ve hızlı gelişimlerini sağlamak için 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeriğine sahip MS ortamlarında 60 ve 90 g/l sükroz konsantrasyonlarını kullanmışlar.1 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA ve 60 g/l sükroz içeren MS ortamında elde edilen 14-17 mm soğan çaplarının en başarılı sonuçlar olduğunu belirtmişlerdir.

Özel vd. (2007) *Muscari macrocarpum* bitkisinin ikiz pul yapraklarıyla yaptığı çalışmalarında kültür ortamında elde ettikleri soğanları haftalık kültür süreci sonunda yeniden aynı ortamlarda alt kültüre almış ve soğan çaplarındaki gelişimi takip etmişler. Bunun sonucunda en yüksek soğan çap artışının 0.45 cm’lik artış ile 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA içeren MS ortamında kaydedildiğini belirtmişlerdir. Eksplant başına ortalama kök uzunluğu 3.14 cm ve köklenme sayısı 1.97 adet kök ile en yüksek olan ortamın 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamı olduğunu belirtmişlerdir.

Özel vd. (2015) *Muscari muscarimi* bitkisinin soğan pul yapraklarını kullanarak *in vitro* elde ettikleri soğancıkları geliştirmek için 8. Haftanın sonunda alt kültüre almışlar. Ortalama soğancık çapının 0.90-1.24 cm arasında değiştiğini, soğancıkların çapındaki maksimum artış (1.24cm) 4.44µM BAP + 5.37 µM NAA içeren besin ortamında gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Köklendirme için ise 4.9 µM IBA içeren MS ortamını kullanmışlardır. Köklenme yüzdesinin %33.33-100, eksplant başına ortalama oluşan kök sayısının 0.42-5.25 ve kök uzunluğunun 0.13-8.00 cm arasında değiştiğini

belirtmişlerdir. Ve sonuçlardan en başarılı olanların 4.44µM BAP + 5.37 µM NAA içeren MS besin ortamında indüklenen soğancıklardan elde edildiğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4.4. Soğancık gelişimi için kullanılan besin ortamları ve 1 aylık soğan çapı (cm) ve köklenme (cm) sonuçları.

Besiyeri MS	**Başlangıç Soğan Çapı (cm)**	**1. Ay Soğan Çapı (cm)**	**Kök %**	**Kök Boyu (cm)**	**Kök Sayısı ort.**	**Soğan Çap Artış Oranı %**
7 g/l agar+ 60 g/l Sükroz	0.44	0.52	53	3.7	4.4	19.0
7 g/l agar + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP + 60 g/l Sükroz	0.45	0.77	0.0	0.0	0.0	71.0
7 g/l agar + 30 g/l Sükroz	0.44	0.55	75.8	5.0	3.5	26.1
7 g/l agar + 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP + 30 g/l Sükroz	0.43	0.62	8.8	0.5	2.2	45.0

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde soğancık gelişimi için en uygun ortamın % 71.0 soğancık çap artışı oranıyla 1 mg/l NAA + 1mg/l BAP + 60 g/l sükroz içeren ortam olduğu belirlenmiştir. Ayrıca köklenme için en uygun olan ortamın %75.8 köklenme oranıyla 30 g/l sükroz içeren kontrol grubunda gerçekleştiği belirlenmiştir. BBD içermeyen ortamlarda sükroz miktarının soğan çap artışı üzerindeki etkisi sınırlı kalmış iken BBD içeren ortamlarda sükroz oranındaki artışın soğan çap gelişimini daha yüksek oranda etkilediği gözlenmiştir. Öte yandan 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP içeren ortamlardaki köklenme oranı BBD içermeyen ortamlara kıyasla önemli ölçüde baskılanmıştır. Bunun sebebinin bir sitokinin olan BAP'ın kök gelişimini baskılamış olması olduğu düşünülmektedir. Oksinler kök oluşumu üzerinde pozitif bir etkiye sahipken sitokininlerin baskılayıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda bu çalışmada karşılaşılan kök gelişimi sonuçları Mirici vd. (2008) ile Özel vd. (2015)'nin çalışmaları

ile örtüşmektedir. Çap artışı ve köklenme denemelerinde kullanılan soğanların aklimatizasyon öncesi görünümleri Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Gelişim ortamında büyüyüp köklenen ve dış ortamda kurumaya bırakılan soğanlar (Kültür başlangıcından itibaren18. ay).

4.6. Aklimatizasyon Sonuçları

Soğancık gelişimi denemesi sonunda besin ortamından çıkarılıp musluk suyunda yıkanan soğancıklar (Şekil 4.12), laboratuvarda oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve 3 hafta sonra buzdolabında +4 derecede muhafazaya alınmıştır. 3 ay süre ile buzdolabında bekleyen soğanlar bahçe toprağı içeren saksılara dikilmiş ve musluk suyu ile düzenli olarak sulanmıştır. 1 ay sonunda dikilen soğanların %70'i topraktan çıkmaya ve gelişmeye başlamıştır (Şekil 4.13, Şekil 4.14).



Şekil 4.12. Aklimatizasyona alınmak için yıkanan soğanlar (Kültür başlangıcından itibaren 18. ay).



Şekil 4.13. Saksılara dikilen soğanların gelişim başlangıcı (Kültür başlangıcından itibaren 22. ay).



Şekil 4.14. Saksılardaki soğanların gelişim süreci, soldaki fotoğraf: kültür başlangıcından itibaren 23. ay. Sağdaki fotoğraf: kültür başlangıcından itibaren 26. ay.

Naik ve Nayak (2005) *Ornithogalum virens* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmalarında elde ettikleri soğancıkları direkt saksı toprağına aktarmışlar ve %80'lik bir hayatta kalma oranı elde etmişlerdir. Ancak soğancıkların hayatta kalma oranlarının boyutlarına göre değişiklik gösterdiğini, küçük soğancıkların (2-3 mm çap) %40-50 oranında hayatta kaldıklarını, büyük soğancıkların (4-10 mm çap) ise %70-80 oranında hayatta kaldıklarını eklemişlerdir.

Mir vd. (2012) *Lilium longiflorum* bitkisinin soğan pul yapraklarıyla yaptıkları çalışmalarında *in vitro* elde ettikleri soğancıklar köklenme ortamında yeterince köklendirdikten sonra musluk suyu ile yıkamış ve % 0.2 bavistin ile 10 dk muamele işleminden geçirerek kokopeat veya toprak içeren saksılara aktarmış. Aktarılan bitkilerde yüksek nemi sağlayabilmek için de şeffaf polietilen torbalara koyarak 3-4 günde bir yarı güçlü MS tuz çözeltisiyle 2 hafta süreyle sulamışlardır. Polietilen torbaları 4 hata sonunda kademeli olarak delerek 8 hafta sonunda iklime alıştırılmış olan bitkileri başarılı bir şekilde seraya aktardıklarını belirtmişlerdir.

Karaoğlu (2008) *S.candida* bitkisinin olgunlaşmamış embriyo ve soğan pul yapraklarıyla yaptığı çalışmasında elde ettiği soğancıkların gelişimlerini ilk aylık süreçten sonra +15 °C sıcaklıkta muhafaza etmiş ardından çapı 1cm üzerinde olan soğancıkları köklü veya kökleri koparılmış halde torf-perlit-vermikülit (1:1:1) içeren saksılara aktararak +15°C ve %80 nem içeren iklimlendirme dolabında gelişimlerini devam ettirmiştir. Yaptığı 6 haftalık gözlemler sonucunda köksüz ve kökleri koparılmış olan soğanlarda kök oluşumu gerçekleşmiş ve canlılık oranları sırasıyla ortalama %55.5

ve %100 şeklinde olduğunu belirtmiştir. Köklü olan soğanlarda ise canlılık oranını %77.7 olarak belirtmiştir.

Aasım (2015) *Allium tuncelianum* bitkisinin soğan pul yapraklarını kullanarak yaptığı çalışmasında 16 haftalık kültür süresinin sonucunda elde ettiği soğancıkları öncelikle 60g/l sükroz içeren oksinsiz besin ortamına aktarmış ve 16 haftalık kültür sonucunda köklenmeleri ve soğancık boyutunda artış sağlamış, ardından köklenen soğancıkların kum ve organik madde içeren (1:1) saksılara aktarılarak 10 gün boyunca kontrollü ortam koşullarının sağlandığı iklimlendirme odasında bekletmiş ve ardında 6 hafta süreyle büyüme odasına aktardıktan sonra tarla koşullarına aktarımını sağlamış ve bu sayede tüm bitkilerin dış ortama alıştırılmasını başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir.

Özel vd. (2015) *Muscari muscarimi* bitkisinden *in vitro* olarak elde ettikleri soğancıkları köklendirdikten sonra dış ortama alıştırmak için magentalardan çıkardıkları soğancıkları 0.75 L turba yosunu içeren 1 L'lik kil kaplara aktarmışlardır. Gözenekli bir yapıya sahip ve su emilimine izin veren bu saksıları %80 bağıl nem içeren iklimlendirme odasında 16 saat ışık fotoperyodunda ve 24±2 °C sıcaklıkta inkübe etmişler ve nemi korumak için şeffaf polietilen torbalarla örtmüşlerdir. Büyüme sürecinde polietilen torbaları kademeli olarak bitkilerin dış ortama uyum sağlamaları için delmişler ve ilk hafta boyunca her gün 50 ml su ile sulamışlardır. Ardından saksıları hata boyunca 3-4 günde bir sulayarak bitkilerin büyüme ve sertleşmelerini sağlamışlardır. Bu yöntemle %80'in üzerinde başarı elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Yukarıda verilen literatürdeki çalışmalar incelendiğinde soğanlı bitkilerin doku kültürü sonrası elde edilen soğancıkların köklü veya köksüz biçimde taze olarak dış ortama alıştırıldıkları görülmektedir. Bu tez çalışmasında farklı bir yöntem izlenmiştir. Oluşan soğanlar önce 3 hafta oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmış ve ardından kışlama ihtiyacını karşılamak için +4 °C'de 3 hafta bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra bahçe toprağına dikilmiştir. % 70 gibi başarılı bir oranda canlılık elde edilmiş ve soğancıklar sağlıklı bir şekilde sürgün oluşturup gelişmişlerdir. Naik ve Nayak (2005) tarafından rapor edildiği üzere *Ornithogalum virens* bitkisinin doku kültüründen elde edilen soğancıklarının hayatta kalma oranı çapı geniş olanlarda daha yüksektir. Aynı olgu bu tez çalışmasındaki aklimatizasyon sırasında gözlenmiştir. % 30 civarındaki gelişmeyen soğancıklar elde edilen soğancıklar içindeki en küçük çap ortalamasına sahip

olanlardır. Sonuç olarak kültür ortamından elde edilen *B. edirnensis* soğancıklarının dış ortama alıştırılması ve sağlıklı fideler geliştirmesi aşamasının başarılı olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bu soğanlar sera ortamında gelişimlerini sürdürmektedirler ve zarar gören, az birey içeren *B. edirnensis* popülasyonlarının rehabilitasyonu için önemli potansiyel taşımaktadırlar.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında yaptığımız deneyler sonucunda sırasıyla sterilizasyon, embriyo kültürü, çimlendirme, soğan pulu kültürü, soğancık gelişimi, köklendirme ve aklimatizasyon aşamalarında elde edilen en başarılı sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Sterilizasyon için yapılan denemeler neticesinde, %20'lik ticari çamaşır suyunda 17 dk, ardından %70'lik etil alkol çözeltisinde 5 dk bekletme ve 3 defa 5'er dk distile suyla durulama sonucunda %41.8 kontaminasyon gözlenmiştir.

Tohum sterilizasyonu için uygulanan en başarılı sterilizasyon yöntemi %12.5 kontaminasyon oranıyla %20'lik ticari çamaşır suyunda 15dk bekletilip ardından %70'lik etil alkol çözeltisinde 4 dk bekletmek ve devamında 3 defa 5'er dk distile suyla durulma olduğu anlaşılmıştır.

Embriyo kültürü denemelerinde olgunlaşmış embriyolardan kallus oluşumunun en fazla indüklendiği besin ortamı %40 kallus oluşumuyla 30g/l sükroz + 7 g/l agar + 1mg/l NAA içeren MS ortamı olarak belirlenmiştir. Ardından en başarılı sonuçlar % kallus oluşum oranıyla 30g/l sükroz + 7 g/l agar + 2 mg/l NAA içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir. Embriyo kültürü ile elde edilen kalluslar 6 ayın sonunda 4 mg/l kin + 0.5 mg/l NAA içeren ortamda rejenerasyon gözlenmemiş ancak yaş ağırlık artışı %74.4 ve kuru ağırlık artışı %71.4 olacak şekilde başarıyla artırılmıştır.

Bellevalia edirnensis bitkisinin çimlenmesinde dormansi büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Tohumların çimlenmesi için yalnızca soğuklanma yeterli olmamıştır. Bu nedenle sülfürik asit muamelesiyle tohum kabuğu inceltilerek fiziksel dormansi kırılmaya çalışılmıştır. Bu konuda en başarılı yöntem %73.3 çimlenme oranıyla

30 dk sülfürik asit muamelesi olarak belirlenmiştir. Bu oranı %46.6 çimlenmeyle 20 dk sülfürik asit muamelesi izlemiştir.

Soğan pulu kültüründe 2 ve 3 pul yapraklı olarak oluşturulan eksplantlar kültür ortamına alınmıştır. En başarılı kallus oluşum yüzdeleri N ve M gruplarında gözlenmiş sırasıyla %91.1 ve 89.2 olarak belirlenmiştir. Ayrıca soğancık oluşturan eksplant sayısı incelendiğinde M grubunda % 97.3 ve N grubunda % 91.1 ile en başarılı sonuçlar olduğu gözlenmiştir. Eksplant başına oluşan soğancık sayısı N grubunda 4.9 ve M grubunda 4 ile en yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Soğancık çapı ortalamaları incelendiğinde N grubunda 0.47 cm ile en büyük çap elde edildiği sonucunda varılmıştır. Ve son olarak toplam soğancık sayısı en fazla 249 adet ile N grubunda elde edilmiştir.

Soğan pulu kültüründe elde edilmiş olan soğancıklar çap artışı ve köklenme için farklı bir ortamda alt kültüre alınmıştır. 1 aylık gözlemin sonucunda soğan çaplarındaki en büyük artışın 0.45 cm'den 0.77 cm'ye %71.0 oranla 7 g/l agar+ 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP + 60 g/l sükroz içeren ortamda elde edildiği görülmüştür. Köklenme yüzdesi ve kök boyu açısından incelendiğinde %75.8 köklenme oranı ve 5.0 cm kök boyu ile 30 g/l sükroz içeren ortamın en başarılı sonucu verdiği belirlenmiştir. Ortalama kök sayısı 4.4 ile en fazla 60 g/l sükroz içeren ortamda elde edilmiştir.

Soğancık gelişimi sonucunda köklendirilmiş ve çap artışları sağlanmış olan soğancıklar öncelikle musluk suyu altında yıkanarak üzerlerindeki besin ortamı içeriğinden arındırılmış ve ardından laboratuvar ortamında kurumaya bırakılmıştır. 3 ay süreyle buzdolabında bekletilen soğancıklar bahçe toprağına dikilerek gelişimleri gözlenmiştir. Uygulanan protokol sonucunda dış ortama aktarılan soğancıkların %70'inde gelişim gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan *B.edirnensis* bitkisi endemik ve nesli tükenmek üzere olan bir bitkidir. Bu nedenle eksplant alınacak bitki sayısı oldukça kısıtlı olduğundan denemeler az tekrar ve eksplant sayısıyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bitkinin tohumlarında gözlenen çimlenme engeli nedeniyle doku kültürü teknikleriyle çoğaltıma ihtiyaç duyduğu ortadadır. Bu doğrultuda yaptığımız çalışmada kullanılan eksplant kaynağının doku kültürü başarısına büyük oranda etki ettiği belirlenmiştir. Eksplant kaynağı olarak soğan pul yapraklarının kullanılmasıyla oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir ve dış ortama başarılı bir şekilde aktarılarak uygun

olabilecek çoğaltım teknikleri elde edilmiştir. Ancak olgunlaşmış embriyolarla yapılan çalışmalarda tatmin edici sonuçlar elde edilememiştir. Bu konuda gelecekte yapılacak olan çalışmaların artırılarak en uygun çoğaltım tekniğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte embriyo kültürleri sonucunda elde edilen az miktarda kallus kültüründe başarılı bir şekilde biyokütle artışı elde edilmiştir. Bu kallus kültürleri altkültür yaparak *in vitro* sürekli kültürlere dönüşmüştür. *İn vitro* sürekli kültürler bir germpalsm muhafaza tekniğidir. Dolayısı ile bu kültürlerin tez çalışmasından sonra da devam etmesi ve kaybedilmemesi önem arz etmektedir. *B. edirnensis* ile ilgili yapılacak daha sonraki çalışmalara temel oluşturması ve doğadan materyal toplanmasının önüne geçilmesi açısından önemlidir.

Son olarak bu tez çalışmasında elde edilen ve sera ortamında gelişimini sürdüren soğancıkların zarar gören popülasyonların rehabilitasyonunda kullanılması yönünde büyük bir potansiyel oluşmuştur. İleriki yıllarda ilgili kuruluşların da (Örn. Doğa Koruma ve Milli Parklar) desteği ile bu yönde çalışmalar planlanması ve uygulanması önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

Aasım, M. (2015). Adventitous bulblet regeneration of endemic Ovacik garlic (*Allium tuncelianum* Kollman Özhatay. Mathew, Şiraneci) using wintered half clove explant. *Romanian Biotechnological Letters, 20*(5), 10845-10851.

Acemi, A. (2011). Farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinin *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)'in doku kültürü ile çoğaltılmasına olan etkilerinin araştırılması. *Yüksek lisans tezi*. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Akın, B. (2011). Bursa Uludağ'ın *Arabis drabiformis* Boiss. Aubrieta olympica Boiss. ve Erodium sibthorpianum Boiss. subsp. sibthorpianum endemik bitki türlerinin doku kültürü yöntemleri ile çoğaltılması. *Doktora tezi*, 134-139. Kütahya: Dumlupınar Üniversitesi.

Alp, Ş. (2006). *Doğal Çiçek Soğanları ve Ters Lale Koruma Önlemleri ve Yetiştiriciliği.* Yalova.

APG III. (2009). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the. *Botanical Journal of The Linnean Society, 161*(2), 105-121.

Babaoğlu, M., & Gürel, E. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi : Doku Kültürü ve Uygulamaları 1.* Konya: Selçuk Üniversitesi Yayınları.

Babashpour-As, M., Zakizadeh, H., Nazemiyeh, H., & Motallebi-Azar, A. (2016). *in vitro* micropropagation and alkaloid production of *Galanthus transcaucasicus* Fomin. *Pharmaceutical Sciences*(22), 267-271. doi:10.15171/PS.2016.41

Baktır, İ., Tezcan, Ö., & Kaynakçı, Z. (1997). Geofitlerin çevre açısından önemi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 408-413.

Bareka, P., Phitos, D., & Kamari, G. (2008). A karyosystematic study of the genus *Bellevalia* Lapeyr. (*Hyacinthaceae*) in Greece. *Botanical Journal of The Linnean Society, 4*(157), 723-739.

Bigot, C. (1987). *in vitro* manipulation of higher plants: Some achievements, problems and perspectives. *The International Association of Peacekeeping Training centres (IAPTC) French-British Meeting* (s. 5-17). France: The International Association of Peacekeeping Training Centres.

Boyraz, M., Korkmaz, H., & Durmaz, A. (2019). Tohumda dormansi ve çimlenme. *Black Sea Journal of Engineering and Science, 2*(3), 92-105.

Bulut, B., Uranbey, S., Ahmed, H., & Çalışkan, M. (2019). Efficient *in vitro* bulblet production of endangered *Hyacinthella micrantha* (BOISS.) chouard. *Journal of Animal and Plant Sciences, 4*(29), 1135-1140.

Bürün, B., & Şahin, O. (2013). Micropropagation of *Lilium candidum* L.: A rare and native bulbous flower of Turkey. *Bangladesh Journal of Botany, 42*(2), 185-187.

Bürün, B., & Türkoğlu, G. (1996). Meristem ve sürgün ucu kültürleri (II) Meristem ve sürgün ucu kültürü uygulamaları. *Yeni Yüzyıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 6*(3), 169-187.

Cavallini, A., Cremonini, R., Lupi, C., & Bennici, A. (1986). *in vitro* culture of *Bellevalia romana* (L.) Rchb. II. cytological study of somatic embryos. *Protoplasma, 132*, 58-63.

Cavallini, A., Lupi, C., Cremonini, R., & Bennici, A. (1987). *in vitro* culture of B*ellevalia romana* (L.) Rchb. III. cytological study of somatic embryos. *Protoplasma, 139*, 66-70.

Dallman, P. (1998). *Plant Life In The World's Mediterranean Climates.* Oxford, UK.

Daneshvar-Royandazagh, S., Pehlivan, E., Teykin, E., & Çiftçi, H. (2014). *Lilium candidum* L.'da *in vitro* mikroçoğaltım ile kozmetik sanayisine ham madde temini. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*(2), 1911-1916.

Dayan, S., Arda, H., Çolak, A., Güler, N., & Aytaç, A. (2012). *Endemik ve tehlike altındaki Bellevalia edirnensis'in in vitro çoğaltımı ve korunması.* TÜBAP-2012/192.

De Hertogh, A., & Le Nard, M. (1992). *The Physiology of flower bulbs : A comprehensive treatise on the physiology and utilization of ornamental flowering bulbous and tuberous plants.* Netherlands: Elsevier Science Publishers.

Debergh, P. (1993). Micropropagation - Technology and Application. P. Debergh, & P. Read içinde, *Micropropagation* (s. 1-15). Dordercht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Demir, İ., & Turgut, İ. (1999). *Genel Bitki Islahı.* İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.

Deswiniyanti, N., & Lestari, N. (2020). *in vitro* propagation of *Lilium longiflorum* bulbs using NAA and BAP plant growth regulator treatment. *The 2019 International Conference on Biotechnology and Life Sciences*, (s. 32-45). doi:10.18502/kls.v5i2.6437

Dilaver, Z. (2013). Conservation of Natural Plants and Their Use in Landscape Architecture. M. Özyavuz içinde, *Advances in Landscape Architecture.* (s. 885-904). Intech

Doğan Kalyoncu, D. (2007). Bazı yabani *Tulipa* türlerinde *in vitro* soğancık üretimi. *Doktora tezi*. Ankara: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü.

Doğan, S., Çağlar, G., & Bulunuz Palaz, E. (2020). The effect of different applications on *in vitro* bulb development of an endemic *Hyacinth* plant (*Hyacinthus orientalis* L. subsp. chionophyllus Wendelbo) grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food science and technology, 8*(8), 1713-1719.

Dokuzoğlu, M. (1990). *Bitki Genetik Kaynakları. Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri.* Ankara: Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayınları.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., & Adıgüzel, N. (2000). *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler)*. ANKARA: Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayını.

Erişen, S., Duran, A., Martin, E., Dinç, M., Yorgancılar, M., Atalay, E., & Babaoğlu, M. (2009). *Bazı endemik Astragalus L. (Leguminosae) türlerinin korunması ve tarımda kullanımı amacıyla doku kültürü ve sitogenetik çalışmalar.* Konya: TÜBİTAK.

Erken, K., Erken, S., Gülbağ, F., & Kaya, E. (2017). Farklı uygulamaların Türkiye doğal İris türlerinden *İris sari* tohumlarının çimlenmesine etkisi. *Alatarım, 16*(1), 52-58.

Feinbrun, N. (1940). A monographic study on the genus *Bellevalia* Lapeyr. *Palestine journal of botany 1*, 336-409.

Fonnesbech A., F. M. (1979). Influence of cytokinins and temprature on development of *Asparagus plumosus* shoot tips *in vitro*. *Physiology Plant, 45*(1), 73-76.

George, E., Hall, M., & Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (Cilt 1. The Background). Springer.

Ghabari, S., Fakheri, B. A., Naghavi, M. R., & Mahdinezhad, N. (2018). New protocol for the indirect regeneration of the *Lilium ledebourii* Bioss by using bulb explants. *Journal of Plant Biotechnology, 45*(2), 146-153. doi:https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.2.146

Güler, N., Dayan, S., Ersoy, H., Salık, V., Durukan Öçalan, Ö., & Germeç, E. (2018). *Edirne sümbülü (Bellevalia edirnensis N. Özhatay et B.Mathew) tür koruma eylem planı.* T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı I. Bölge Müdürlüğü Edirne Şubesi Müdürlüğü.

Güner, A., Ekim, S., Vural, T., & Babaç, M. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler).* İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., & Başer , K. (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2).* Edinburgh at the University Press.

Han, B., Yae, B., Yu, H., & Peak, K. (2005). Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium oriental* Hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. *Scientia Horticulturae, 103*(3), 351-359.

Harlan, J. (1992). Crops and Man. *American Society of Agronomy* . 10.2135/1992.cropsandman

Hartmann, H., & Kester , D. (1975). *Plant Propagation: Principles and Practices.* New Jersey: Prentice-Hall. Inc.

Hatipoğlu, R. (1993). Biyoteknolojiye Giriş. *Ders Notu*, 129. Adana: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi .

Holst-Jensen. (2009). *Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives.* (27). Elsevier.

IUCN(a). (2019, 12 25). *IUCN*. https://www.iucnredlist.org/resources/categories-and-criteria adresinden alındı

IUCN(b). (2019, 12 25). *IUCN*. https://www.iucn.org/about/iucn-a-brief-history adresinden alındı

Johnson, M. (2003). Polyploidy and karyotype variation in Turkish *Bellevalia* (Hyacinthaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society, 143*(1), 87-98.

Karagöz, A., Zencirci, N., Tan, A., Taşkın, T., Köksel, H., Sürek, M., . . . Özbek, K. (2003). Türkiye'de bitki genetik kaynaklarının korunması. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 155-177.

Karaoğlu, C. (2004). Göl Soğanı (*Leucojum aestivum* L.)'nin *in vitro* Koşullarında Hızlı Çoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Karaoğlu, C. (2008). Bazı *Sternbergia* türlerinde doku kültürleriyle soğancık üretimi ve dış koşullara alıştırılması. *Doktora Tezi*. Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Karaoğlu, C. (2010). Soğanlı bitkiler ve *in vitro* hızlı çoğaltım. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 19*(1-2), 24-29.

Kaya, E. (2014). *Türkiye Geofitleri* (Cilt 1). Yalova: Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü.

Kaynak, S. (2001). *Biyolojik Çeşitlilik ve Çevre Koruma Rehberi.* Ankara: Türkiye Tabiatını Koruma.

Koyuncu, M. (1994). Geofitler. *Bilim ve teknik, 27*(321), 72-82.

Loschiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti , G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., . . . Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics, 77*(3), 325-331.

Lupi, C., Bennici, A., & Gennai, D. (1985). *in vitro* culture of *Bellevalia romana* (L.) Rchb I. Cytological Study of Somatic Embryos. *Protoplasma, 125*, 185-189.

Mabberley, D. (2008). *Mabberley's plant-book : A Portable Dictionary of Plants, Their Classification and Uses.* Cambridge ; New York: Cambridge University Press.

MEGEP. (2016). *Soğanlı, Rizomlu, Yumrulu ve Stolonlu Bitkiler.* Ankara: Milli Eğitim Bakanlığı.

Meteoroloji Genel Müdürlüğü. (2020). 12 27, 2020 tarihinde https://mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?k=H adresinden alındı

Mir, J., Ahmed, N., Itoo, H., & Sheikh, M. (2012). *in vitro* propagation of *Lilium* (*Lilium longiflorum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences, 82*(5), 455-458.

Mirici, S. (2000, Nisan). Kolzada adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumeaciens* aracılığıyla gen aktarımı. *Doktora tezi*. Ankara: Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Mirici, S., Baktır, İ., Nasırcılar, A. G., Eren, Ö., & Karagüzel, Ö. (2008). *Ekonomik potansiyele sahip bazı endemik soğanlı bitkilerin in vitro koşullarda hızlı çoğaltımı.* Proje raporu, Ankara.

Mirici, S., Parmaksız, İ., Özcan, S., Sancak, C., Uranbey, S., Sarıhan, E., . . . Arslan, N. (2005). Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80*, 239-246.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*, 473-497.

Naik, P., & Nayak, S. (2005). Different modes of plant regeneration and factors affecting *in vitro* bulblet production in *Ornithogalum virens*. *Science Asia, 31*, 409-414.

Nasırcılar, A., Mirici, S., Karagüzel, Ö., Eren, Ö., & Baktır, İ. (2017). Usage of *in vitro* produced bulblets as an explant source for *Bellevalia tauri* an endemic plant of Turkey. *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity.* Minsk - Belarus.

Ohkawa, M., & Kitajima, J. (1998). Studies on the propagation of *Fritillaria camtschatcensis* Ker-Gawl. by *in vitro* culture. I. Characteristics o sprouting, leafiness, flowering and new bulb ormation from mother-bulb and bulblet formation rom samall globulescale. *Journal of Japanese Society or Horticultural Science, 67*(2), 242-248.

Özdemir, F. A., Yıldırım, M. U., & Kılıç, Ö. (2016). Farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde sodyum hipoklorid (NaOCl) uygulamasının *Pancratium maritimum* L. soğanlarının yüzey sterilizasyonu üzerine etkileri. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 5*(2), 156-163.

Özdemir, F., Kılıç, Ö., & Bağcı, E. (2017). *in vitro* bulb regeneration from stem explants of endemic geophyt *Muscari aucheri* (Boiss.) Baker. *International Journal of Secondary Metabolite (IJSM), 4*(3), 50-54.

Özel, Ç., Khawar , K., & Ünal, F. (2015). Factors affecting efficient *in vitro* micropropagation of *Muscari muscarimi* Medikus using twin bulb scale. *Saudi Journal of Biological Sciences, 22*(2), 132-138.

Özel, Ç., Khawar, K., & Ünal, F. (2007). *in vitro* axillary bulblet regeneration of Turkey yellow grape *Hyacinth*, (*Muscari macrocarpum* Sweet) from twin scale explants. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3*(6), 924-929.

Özer, A., & Akdemir, R. (2014). *Bazı önemli geofitlerin [(Fritillaria imperialis L. (Ağlayan gelin, Kraltacı, Şahtuğu), Eranthis hyemalisSallisb. (Sarı kokulu, Kış boynuzotu), Anemone blanda (L.), Sch.et. Kot. (Manisa lalesi) ve Crocus sativus L.(Safran)] İç Anadolu'da yetiştirilmesi.* Ankara: Orman Genel Müdürlüğü.

Özyavuz, M. (2012). Protected Areas. M. Özyavuz (Dü.) içinde, *Landscape Planning.* InTech. doi:10.5772/38987

Pierik, R. (1997). *in vitro* Culture of Higher Plants. *in vitro Culture of Higher Plants*. içinde Kluwer Academic Publishers. (s. 21-26)

Rahavan, V. (1980). Embriyo culture. In: Vasil IK (ed), perspectives in plant cell and tissue culture. *Academic Press*, 209-236.

Rivera, A., Gomez-Lim, M., Fernandez, F., & M. Loske, A. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* (Cilt 9, s. 308-345). içinde Elsevier.

Salahzadeh, S., Daneshvar, M., & Moallemi, N. (2008). Indirect organogenesis from scale, leaf primordia and immature floret explant of *Hyacinth* (*Hyacinthus*

orientalis L.). *American-Eurasian journal of agricultural and environmental sciences, 4*(5), 640-645.

Salazar, C., Landeros, F., Bustos, E., Bravo, P., Perez, C., Becerra, J., . . . Uribe, M. (2019). Propagation and bulblet enhancement of Rhodophiala pratensis from seeds germinated *in vitro*. *Ciencia e İnvestigacion Agraria, 1*(46), 12-22.

Santos I., S. R. (2000). Promotion by Jasmonic acid of bulb formation in shoot cultures of *Narcissus triandrus* L. *Plant Growth Regulation, 30*, 133-138.

Sedcenco, M., Ciorchina, N., Clapa, D., & Fira, A. (2011). The conservation of species *Bellevalia sarmatica* (Georgi) woronov by the vitro culture method. *Journal of Plant Developmant, 18*(1), 11-15.

Sesiz, U. (2014). Sümbül bitkisinin (*Hyacınthus orientalıs* L.) *in vitro* mikroçoğaltımı. *Yüksek Lisans Tezi*. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Stevens, P. (2018). *Angiosperm Phylogeny Website: Asparagales: Asparagaceae*. 03 11, 2020 tarihinde http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/asparagalesweb.htm#Aspar a adresinden alındı

Taha , L., Youssef, N., Shaaban, S., & Ghareeb, Z. (2019). *in vitro* bulb formation of direct and indirect regeneration of *Lilium orientalis* cv. "Starfighter" plants. *Bulletin of the National Research Centre, 43*(211), 2-9.

Taha, L., Youssef, N., Ibrahim, E., & Fawzia Ghareeb, Z. (2019). An adequate micropropagation protocol or *İris tingitana* bulblets production and chemical composition. *Plant archives, 19*(2), 2671-2676.

Tugay, O. (2012). *Bellevalia* Lapeyr. *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)* (s. 95-96). içinde İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.

Ulus, A., & Seyidoğlu, N. (2006). Bazı doğal geofitlerin doku kültürü ile üretimi. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 59*(1), 71-80.

Uzun, A., Palabaş, S., Terzioğlu, S., & Anşin , R. (2005). *Uluslararası doğa koruma birliği tehlike kategorileri ve Türkiye florası*. Isparta: Korunan Doğal Alanlar Sempozyumu.

Uzun, S., Parmaksız, İ., Uranbey, S., Mirici , S., Sarıhan, E. O., İpek, A., . . . Özcan, S. (2014). *in vitro* micropropagation from immature embryos of the endemic and endangered *Muscari muscarimi* Medik. *Turish Journal of Biology, 38*(1), 83-88. doi:10.3906/biy-1307-52

Wawrosh, C., Malla , P., & Kopp, B. (2001). Clonal propagation of *Lilium nepalense* D.Don, a threatened medicinal plant of Nepal. *Plant Cell Reports, 20*, 285-288.

Wendelbo, P., & Bothmer, R. (1981). Cytological and morphological variation in *Bellevalia*. *Nordic Journal of Botany 1, 1*(1), 4-11.

Yurievna, N. A., & Vladimirovna, G. L. (2019). The application of different reproduction techniques for rare species waterlily tulip (*Tulipa kaufmanniana* Regel.) propagation under *ex situ* conditions. *Ornamental Horticulture, 25*(4), 450-460.

Zeybek, N. (1985). *Farmasötik Botanik - Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematiği Ve Önemli Maddeleri.* İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad **:** Eda AYDIN

Doğum Tarihi **:** 13.11.1994

Doğum Yeri **:** İstanbul / Bakırköy

Uyruğu **:** TC

Eğitim Durumu

2012-2016 : Bartın Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik (Lisans)

2008-2012 : Kemal Hasoğlu Lisesi (Ortaöğretim)

Staj **:** Kültür Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı

Belgeler **:** XI. IUGEN International Molecular Biology and Genetics Students Winter School Certificate of Participation

Bilgisayar Programları: Microsoft Office

Projeler **:** T.Ü BAP Projesi - Edirne Sümbülü (*Bellevalia edirnensis* Özhatay & Mathew) nün *ex situ* yöntemlerle çoğaltılması ve korunması. Proje Yürütücüsü: Dr. Öğr. Üyesi Sergun DAYAN, Proje Araştırmacıları: Prof. Dr. Yalçın KAYA, Dr. Öğr. Üyesi Hayati ARDA, Moleküler Biyolog Eda AYDIN.

Yayınlar **:** Aydın E., Dayan S., Callus stimulation from mature embryos of *Bellevalia edirnensis*, International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 2018, s.569