

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

CROCUS SPECIOSUS BİEB. ALT TÜRLERİNİN *IN VİTRO* ÇOĞALTIMI,
MOLEKÜLER VE SİTOGENETİK ANALİZLERİ VE MADS-BOX GENLERİ
İFADELERİNİN BELİRLENMESİ

Parizad Allahverdikhan Vaziri

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Cengiz SANCAK

MART

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Parizad ALLAHVERDİKİHAN VAZİRİ

İmzası

Prof. Dr. Cengiz SANCAK danışmanlığında, Parizad Allahverdikhon Vaziri tarafından hazırlanan bu çalışma 19/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Cengiz SANCAK İmza:

Üye :Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR İmza:

Üye :Prof. Dr. Serkan URANBEY İmza:

Üye :Prof. Dr. Mustafa YILDIZ İmza:

Üye :Prof. Dr. Semra MİRİCİ İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Crocus speciosus Bieb. Alt Türlerinin *In vitro* Çoğaltımı, Moleküler ve Sitogenetik Analizleri ve MADS-box Genleri İfadelerinin Belirlenmesi

Parizad ALLAHVERDİKHAN VAZİRİ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Cengiz SANCAK

Süs bitkileri içinde gösterişli ve güzel çiçeklere sahip *Crocus speciosus* Bieb. Türü *Iridaceae* familyasına ait olup oldukça değerlidir. Endemik-tehlike altında bulunan *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *C. Speciosus* subsp. *xantholaimos* ve *C. Speciosus* subsp. *speciosus* alt türlerinden ilk kez bu çalışmayla *in vitro* kültürü ve yavru korm üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ¼ korm parçalarından en yüksek sürgün ya da direk yavru korm oluşturan eksplant oranı (% 100) ve en yüksek eksplant başına yavru korm sayısına (2.27 adet) ½ MS ve ½ MS+ Aktif kömür içeren ortamlarında elde edilmiştir. Olgunlaşmamış tohumlardan ise *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türünde 3.0 mg/l BAP ve 1mg/l NAA içeren MS ortamında, *speciosus* alt türünde 1.0 mg/l BAP + (0.0 ve 1.0 mg/l) NAA içeren MS ortamlarından, *xantholaimos* alt türünde ise 3.0 mg/l BAP+ (0.5 ve 1.0mg/l) NAA içeren MS ortamlarından elde edilmiştir. Çalışmada SSR lokus bölgelerine ait taksonomi tanımlamaları yapılarak bu alt türler koruma altına alınırken, ıslah çalışmalarında melezleme uyuşma/uyuşmazlıklarının göstergesi olan genom büyüklükleri ortaya çıkarılmıştır. SSR analizleri ile her bir alt türün farklı DNA kimlik verileri tespit edilirken, *C. speciosus* subsp. *ilgazensis* ve *C. speciosus* subsp. *xantholaimos* arasında daha yüksek bir benzerlik (%50) bulunmuştur. Genom büyüklüğüne yönelik flow sitometri değeri (2C) *C. speciosus* Subsp. *xantholaimos* alt türünde 8.8, *C. speciosus* subsp. *speciosus* ve *C. speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türlerinde ise daha küçük ve benzer olarak yaklaşık 4.8-5 arasında belirlenmiştir. Safrana ait MADS-box APETALA 1 geninin *Crocus speciosus* Bieb. türü ile kısmi homolojiler gösterdiği ve safrandan elde edilen 154 bç'lik gen bölgesinin üç alt türde de ifade olduğu Real-Time PCR analizleri ile belirlenmiştir.

2015, 137 sayfa

Anahtar kelimeler: *Crocus speciosus*, MADS-box, Real-Time PCR

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

In vitro Micropropagation, Molecular and Cytogenetic Analysis of *Crocus speciosus* Bieb. subspecies, and Expression of MADS-box Genes

Parizad ALLAHVERDIKHAN VAZIRI

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Cengiz SANCAK

Crocus speciosus Bieber. family Iridaceae belongs to group of extremely valuable endemic under-threat ornamental plants with showy and beautiful flowers. They have three subspecies namely *C. speciosus* subsp. *ilgazensis* Mathew, *C. speciosus* subsp. *xantholaimos* and *C. speciosus* subsp. *speciosus*. This study reports their *in vitro* plant tissue culture for the first time. Different organ explants of these sub species were cultured on different nutrient media and culture conditions. After 32 weeks, micro corm regeneration was developed using corm scales for three sub-species. The highest ratio of explant producing shoot or micro corm (100 %) and the highest number of micro corm per explant (2.27) were obtained from ¼ corm on ½ MS and ½ MS + active charcoal containing medium. Best regeneration on immature seeds of *C. speciosus* subsp *ilgazensis*, *C. speciosus* subsp *speciosus* and *C. speciosus* subsp *xantholaimos* were cultured on MS medium containing 3.0 mg / l BAP and 1 mg / l NAA; MS medium containing 1.0 mg / l BAP + (0.0 and 1.0 mg / l) NAA and MS medium containing 3.0 mg / l BAP + (0.5 and 1.0mg / l), NAA respectively. Also SSR loci were used in the taxonomic classification of these subspecies for helping in conservation by of these species for breeding work by matching hybridization match / mismatch of indicators for determining genome size. SSR analyses were performed using different DNA identification data that showed a higher similarity between *C. speciosus* subsp. *xantholaimos* (50%) and *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* was. SSR analyses were performed using different DNA identification data that showed a higher similarity (50%) between *C. speciosus* subsp *xantholaimos* and *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis*. The flow cytometry genome size value of (2C) *C. speciosus* subsp. *xantholaimos* had was 8.8; whereas, genome size of *C. speciosus* subsp. *speciosus* and *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* were identified as smaller and similar with genome size of 4.8-5. MADS-box APETAL 1 of Saffron *Crocus speciosus* Bieb. showed partial homology of gene with 3 species with 154 bp using Real-Time PCR analysis.

2015, 137 pages

Key Words: *Crocus speciosus*, MADS-box, Real-Time PCR

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimine başladığım ilk günden itibaren engin bilgi, birikim ve yardımlarıyla bana yol gösteren, eğitimimde unutulmaz katkıda bulunan çok değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Cengiz SANCAK' a özel teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren ve her zaman bilgi, destekte bulunan eş danışman hocam Prof. Dr. Ali ERGÜL'e, ayrıca çalışmalarım süresince önemli katkılarını gördüğüm değerli hocalarım: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR, Prof. Dr. Serkan URANBEY, Doç Dr. Arif İPEK, Prof. Dr. Mustafa YILDIZ ve arkadaşım Dr. Canan YÜKSEL 'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzun yıllar bana maddi ve manevi her türlü fedakarlığı gösteren, şefkatlerini benden esirgemeyeneşim, annem ve babama minnettarlığımı belirterek, bu başarıyı kendilerine armağan etmek isterim.

Bu doktora tez çalışması 1100373 kodlu TÜBİTAK (*Crocus speciosus* Bieb. türünün kültüre alınması, morfolojik karakterizasyonu ve üretim tekniklerinin geliştirilmesi) projesi ve 113Z396 kodlu TÜBİTAK (*Crocus speciosus* Bieb. (Çiğdem) Türlerinin Moleküler, Sitogenetik Tanımlamaları ve Çiçek MADS-box Genlerinin İfade Analizi) kapsamında desteklenmiştir.

Parizad ALLAHVERDIKHAN VAZIRI

Ankara, Mart2015

İÇİNDEKİLER

<u>ETİK BEYAN</u>	<u>i</u>
<u>ÖZET</u>	<u>iii</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>iv</u>
<u>ÖNSÖZ</u>	<u>v</u>
<u>İÇİNDEKİLER</u>	<u>vi</u>
<u>ŞEKİLLER DİZİNİ</u>	<u>x</u>
<u>ÇİZELGELER DİZİNİ</u>	<u>xiii</u>
<u>SİMGELER DİZİNİ</u>	<u>xvi</u>
<u>1.GİRİŞ</u>	<u>1</u>
<u>2.KURAMSAL TEMELLER</u>	<u>17</u>
2.1. Doku Kültürü.....	17
2.2.Moleküler Analiz Çalışmaları.....	29
2.3. Türkiye’ de <i>Crocus</i> Türlerindeki Moleküler Markör Çalışmalar.....	30
2.4 Sitolojik Çalışmalar.....	30
2.5 MADS-Box Genleriyle İlgili Çalışmalar.....	31
<u>3.GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>33</u>
<u>4.MATERYAL VE YÖNTEM</u>	<u>35</u>
4.1. Materyal.....	35
4.1.1.Doku Kültürü için Bitkisel Materyal Temini.....	35

4.1.2. Moleküler Çalışmaları için Bitkisel Materyal.....	36
4.2. Yöntem.....	37
4.2.1. Doku Kültürü Denemelerinde Besin Ortamı ve Kültür Koşulları	37
4.2.2. Eksplant Seçimi ve İzolasyonu	38
4.2.3. Eksplant Sterilizasyonu.....	38
4.3.3. Eksplantların Kültüre Alınması.....	42
4.3.5. Eksplantların Kültüre Alınması.....	43
5.3.6. <i>In vitro</i> 'da Üretilen Kormların Olgunlaştırılması ve Dış Şartlara Ağıştırılması	44
4.3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	44
4.3.7. SSR Analizleri	44
4.3.8. Sitolojik Analizler	47
4.3.9. Dizi Analizleri	47
4.3.10. Real Time PCR Analizleri	52
<u>5.ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>57</u>
5.1. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew, <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> , <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türlerine ait Olgunlaşmamış Tohumların Yüzey Sterilizasyonu.....	57
5.2. Olgun Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	57
5.3. Yaprakların Yüzey Sterilizasyonu	58
5.4. Korm Eksplantlarının Sterilizasyon Yöntemleri.....	58
5.4.1. NaClO ile sterilizasyon.....	58

5.4.2. Sıcak Su ile sterilizasyon	59
5.4.3. Fungusit Uygulaması.....	59
5.4.4. H ₂ O ₂ + Twin 20 ile sterilizasyon.....	59
5.4.5. H ₂ O ₂ +NaClO ile sterilizasyon.....	59
5.4.6. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ ile sterilizasyon	59
5.5. <i>İn vitro</i> Mikro çoğaltım	60
5.5.1. Olgunlaşmamış Tohumlarda <i>in vitro</i> Mikro korm rejenerasyonu	60
5.5.2. Korm bileşiklerin (AgNO ₃ ⁻ ,Aktif Kömür ve Gelrite) <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew ve <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> , <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> altürlerine ait kormlardan <i>in vitro</i> yavru korm rejenerasyonu üzerine etkileri.....	68
5.5.3. Farklı konsantrasyonda BAP ve NAA içeren besin ortamlarının <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew ve <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> , <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> altürlerine ait ¼ kormlardan <i>in vitro</i> korm rejenerasyonu üzerine etkileri	69
5.5.3. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew, <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> , <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türlerine ait olgun tohumların <i>in vitro</i> rejenerasyonu.....	84
5.5.4.Yaprak Eksplantlarının <i>İn vitro</i> Kültürü.....	90
5.5.5. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew, <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> , <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>Speciosus</i> alt türlerinde ¼ kormlardan ve olgun tohumlardan gelişen kormların, korm geliştirme ortamı (KGO), korm olgunlaştırma ortamı (KOO), köklendirme ortamına alınması ve aklimatizasyon Çalışmaları	91

5.6. DNA İzolasyonu	93
5.7. SSR Analizleri.....	94
5.7.1. Genetik Analizler	95
5.8. Sitolojik Analizler	97
5.9. Dizi Analizleri	99
5.9.1. Dizi Analizi Reaksiyonları	100
5.10. Real Time PCR Analizleri	105
5.10.1. RNA izolasyonu, miktar ve kalite tayini.....	105
5.10.2. cDNA Sentezi	106
5.10.3. Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri.....	106
5.10.4. Erime Eğrisi (melting curve)	108
<u>6.TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	<u>111</u>
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>117</u>
<u>EKLER</u>	<u>132</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>133</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Crocus</i> türlerinin dünyadaki yayılışı (11)	5
Şekil 1.2. <i>Crocus speciosus ilgazensis</i> alt türünün Türkiye üzerinde takson (Harita dağılımı)(17).....	8
Şekil 1.3. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türünün Türkiye üzerinde takson (HARİTA Dağılımı)(19)	9
Şekil 1.4. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türünün Türkiye üzerinde takson (harita Dağılımı)(21).....	10
Şekil 1.5. Model organizma Arabidopsis’de çiçek gelişimine yönelik ABC modeli ve yolakta yer alan genler MADS-box genleri (kare ile gösterilenler) (48).	16
Şekil 4.1. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew doğal yayılış gösterdiği alandan görüntü (İPEK. A).....	35
Şekil 4.2. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> Mathew doğal yayılış gösterdiği alandan görüntü (İPEK. A).....	35
Şekil 4.3. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> Mathew doğal yayılış gösterdiği alandan görüntü (İPEK. A).....	36
Şekil 4.4. Bitki materyalinin ayıklanması ve sınıflandırılması (İPEK. A).....	36
Şekil 4.5. Olgunlaşmamış tohumların yüzey sterilizasyonu ve kültüre alınması.....	39
Şekil 4.6. Olgun tohumların yüzey sterilizasyonu ve kültüre alınması.....	40
Şekil 4.7. Kormların sterilizasyonu ve besin ortamına aktarılması.....	41
Şekil 4.8. Yaprak eksplantlarının sterilizasyonu ve besin ortamına alınması	42
Şekil 4.9. Olgunlaşmamış tohumların mikroskop altındaki görüntüsü	43
Şekil 4.10. Safranda bazı MADS-Box genlerinin (CsAP1a, CsAP1b ve CsAP1) dizi çakışmaları (Multiple sequence alignment) ve çalışmada kullanılan ileri CSMBF (<i>Crocus</i> 300F; 5’-GCTGAAGCGGATCGAGAACAC-3’) ve geri CSMBR (CR-1R -AY337928; 5’-GGAGTATTCGGACAGCTTGC-3’) primer bölgeleri	48
Şekil 4.11. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> alt türüne ait 116 bç bölge.	54
Şekil 5.1. Olgunlaşmamış tohumların Yüzey Sterilizasyon, Eksplantları içeren petrilere alüminyumfolyo ile kapatılarak dormansinin kırılması için bekletilmesi	57
Şekil 5.2. Yaprak sterilizasyonu ve ortama alınması	58
Şekil 5.3. Kormlarda NaClO ile sterilizasyonu	59
Şekil 5.4. Korm sterilizasyonunda H ₂ O ₂ uygulaması.....	60

Şekil 5.5. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan (a) 8 hafta sonra (b) 16 hafta sonra (c) 24 hafta sonra üzerinde sürgün oluşumu.....	62
Şekil 5.6. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan 2 ay sonra korm ve sürgün oluşumu	67
Şekil 5.7. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan 4 ay sonra korm ve sürgün oluşumu	67
Şekil 5.8. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan 6-8 ay sonra korm ve sürgün oluşumu	67
Şekil 5.9. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan 8 ay sonra oluşan kormların köklenmesi.....	68
Şekil 5.10. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 2 ay sonra korm eksplantları üzerinde sürgün veya korm oluşumu.....	71
Şekil 5.11. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 4 ay sonra korm eksplantları üzerinde sürgün veya korm oluşumu.....	72
Şekil 5.12. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra korm eksplantları üzerinde sürgün veya korm oluşumu.....	72
Şekil 5.13. ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 2 ay sonra kallus veya sürgün gelişimi	78
Şekil 5.14. ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ve 8 ay sonra kallus veya sürgün gelişimi	79
Şekil 5.15. Farklı konsantrasyonlarda sitokin içeren ortamlarda <i>Crocusspeciosus</i> Bieb. alt türlere ait ¼ kormlardan in vitro korm rejenerasyonu.....	83
Şekil 5.16. Olgunlaşmış tohumların in vitro kültürü.....	90
Şekil 5.17. Yaprak eksplantların kültüre alınması	90
Şekil 5.18. Eksplantların köklendirilmesi	92
Şekil 5.19. DNA'ların agaroz jel (%1) görüntüsü.....	93
Şekil 5.20. CSMIC36 lokusuna ait homozigot pik profili.....	94
Şekil 5.21. ABRII/Cs 20 lokusuna ait homozigot pik profile	94
Şekil 5.22. CsatAP1/FULb lokusuna ait heterozigot pik profili	95
Şekil 5.23. Genotiplere ait genetik ilişki dendogramı	97
Şekil 5.24. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> ve internal kontrole (domates) ait histogram görüntüsü	97
Şekil 5.25. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> ve internal kontrole (domates) ait histogram görüntüsü	98

Şekil 5.26. <i>C. speciosus</i> subsp. <i>speciosus</i> ve internal kontrole (domates) ait histogram görüntüsü	98
Şekil 5.27. Değişik primer kombinasyonlarının (bkz. Çizelge 4.5.) PCR'da çoğaltılmış örnek agaroz jel görüntüleri (CSMB: Çalışmada kullanılan 154 bç bölgesi)	99
Şekil 5.28. 154 bç gen bölgesinin PCR temizleme sonrası iki alt türün agaroz jelde (%2) görünüşü	100
Şekil 5.29. <i>Crocusspeciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> genotipine ait dizi analizi sonrası örnek ham veri görüntüsü	100
Şekil 5.30. <i>Crocusspeciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> alt türü-safran CsAP1 homoloji bölgeleri (BLAST).....	102
Şekil 5.31. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türü-safran CsAP1 homoloji bölgeleri (BLAST).....	103
Şekil 5.32. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türü-safran CsAP1 homoloji bölgeleri (BLAST).....	104
Şekil 5.33. Soldan-sağa: 1- <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> ,2- <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> , 3- <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> 'e ait RNA'ların agaroz jel (% 1) görüntüsü	105
Şekil 5.34. Hedef gen (71 bç'lik) bölgesindeki 3 alt türün amplifikasyon eğrileri.....	106
Şekil 5.35. β -aktin gen bölgesindeki 3 alt türün amplifikasyon eğrileri	107
Şekil 5.36. Hedef gen (71 bç'lik) bölgesindeki3 alt türün erime eğrileri.....	109
Şekil 5.37. β -aktin primerinde 3 alt türün erime eğrileri.....	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bitki tiplerine göre Türkiye süs bitkileri ihracatı (1.000 ABD Doları)(4–6).....	2
Çizelge 1.2. 2015 Yılı Doğal Çiçek Soğanlarının İhracat Listesi(8)	4
Çizelge 1.3. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew, <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> Mathew ve <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türlerinin taksonomisi (13)	7
Çizelge 1.4. <i>Crocus speciosus ilgazensis</i> alt türünün özellikleri (14).....	8
Çizelge 1.5. <i>Crocus speciosus subsp. ilgazensis</i> alt türünün genel taksonomik özellikleri (15,16)	8
Çizelge 1.6. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türünün özellikleri(14)	9
Çizelge 1.7. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türünün genel taksonomi özellikleri(18)	9
Çizelge 1.8. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türünün özellikleri(20)	10
Çizelge 1.9. <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türünün genel taksonomi özellikleri(20)	10
Çizelge 4.1. MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonlar(133)	37
Çizelge 4.2. Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüleri ve saklama koşulları(134)....	38
Çizelge 4.3. PCR reaksiyonlarında kullanılan SSR primerlerine ait bilgiler	46
Çizelge 4.4. Safran MADS-Box (CsAP1a, CsAP1b ve CsAP1) genlerine ait bilgiler	47
Çizelge 4.5. Safran MADS-Box gen bölgelerine yönelik kullanılan primerler	48
Çizelge 4.6. Dizi Analizi PCR protokolü	51
Çizelge 4.7. RNA-Primer karışımının hazırlanması	53
Çizelge 4.8. Revers transkripsiyon karışımının hazırlanması	53
Çizelge 4.9. <i>Crocus</i> β -aktin için Real Time PCR optimizasyon koşulları (TM 60 °C)	54
Çizelge 4.10. Çiğdem AP1 için Real Time PCR optimizasyon koşulları (TM 60 °C)	55
Çizelge 4.11. Uygulanan Real Time PCR programı	55
Çizelge 5.1. Farklı ortamların olgunlaşmamış tohumlar üzerinde sürgün veya korm oluşturma etkisinin alt türler arasındaki duncen testi	61
Çizelge 5.2. <i>C. speciosus</i> subsp. <i>ilgazensis</i> alt türde 8 ay sonra Kallus veya sürgün oluşumu % ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)	64
Çizelge 5.3. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türde 8 ay sonra kallus veya sürgün oluşumu % ve eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)	65

Çizelge 5.4. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türde 8 ay sonra Kallus veya sürgün oluşumu % ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)	66
Çizelge 5.5. STS ve Aktif kömürün fenolik bileşiklerin azaltması ve yavru korm ve/veya sürgün oluşumu üzerinde etkisi	69
Çizelge 5.6. <i>C. speciosus</i> subsp. <i>ilgazensis</i> alt türde farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün ve/veya korm oluşturma etkisi	73
Çizelge 5.7. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türde farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün ve/veya korm oluşturma etkisi	74
Çizelge 5.8. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türde farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün ve/veya korm oluşturma etkisi	75
Çizelge 5.9. <i>C. speciosus</i> subsp. <i>ilgazensis</i> alt türde ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ay sonra korm ve/veya sürgün gelişimi (%) ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama).....	76
Çizelge 5.10. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türde ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ay sonra korm ve/veya sürgün gelişimi (%) ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama).....	77
Çizelge 5.11. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türde ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ay sonra korm ve/veya sürgün gelişimi (%) ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama).....	77
Çizelge 5.12. Farklı besin ortamlarında <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew alt türüne ait ¼ kormlardan <i>in vitro</i> korm rejenerasyonu	81
Çizelge 5.13. Farklı Besin ortamlarında <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türüne ait ¼ kormlardan <i>in vitro</i> korm rejenerasyonu	82
Çizelge 5.14. Farklı besin ortamlarında <i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türüne ait ¼ kormlardan <i>in vitro</i> korm rejenerasyonu	83
Çizelge 5.15. Farklı besin ortamlarında <i>C. speciosus</i> Bieb. alt türlerine ait Olgunlaşmış tohumların <i>in vitro</i> korm rejenerasyonu üzerine etkileri	84
Çizelge 5.16. <i>C. speciosus</i> subsp. <i>ilgazensis</i> alt türünde Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün veya korm oluşturma etkisi	87
Çizelge 5.17. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> alt türünde Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün veya korm oluşturma etkisi	88
Çizelge 5.18. <i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> alt türünde Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün veya korm oluşturma etkisi	89

Çizelge 5.19. KOO’nda alındıktan sonra aklimatize edilen yavru kormların canlı kalma oranı	93
Çizelge 5.20. İzole edilen DNA’ların spektrofotometrik (ND-1000) değerleri	93
Çizelge 5.21. Lokuslara ait allel verileri (1-C. <i>speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> , 2-C. <i>speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> , 3-C. <i>speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>).....	95
Çizelge 5.22. Çalışılan lokuslardaki allel sayıları (N), beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho), tespit olasılığı (PI) değeri ve sessiz (null) allel frekansı(r).	96
Çizelge 5.23. Genotiplere ait benzerlik oranı indeksi (%)	96
Çizelge 5.24. Genotiplere ait DNA içerikleri (1pg DNA = 978 Mbp, (142)	98
Çizelge 5.25. 154 bç gen bölgesinin PCR temizleme sonrası alt türlerde spektrofotometrik (ND-1000) değerleri	99
Çizelge 5.26. Çiğdem alt türlerinde AP1 gen dizileri	101
Çizelge 5.27. RNA’lara ait spektrofotometrik ölçüm değerleri	105
Çizelge 5.28. Alt türlere ait cDNA’ların spektrofotometrik ölçüm değerleri	106
Çizelge 5.29. Hedef gen (71 bç’lik) bölgesindeki 3 alt türün teknik tekrarı (Ct değerleri)	107
Çizelge 5.30. β -aktin gen bölgesindeki 3 alt türün teknik tekrarı (Ct değerleri).....	108

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
°C	Santigrat
1 N	1 normal
2,4-D	2,4- Dichlorodphenoxyacetic acid
2C	çekirdek DNA içerikleri
2-ip	2-isopentenyladenine
AFLP	Amplified Fragment Length Polimorphism
ANOVA	Analysis of variance
BAP	6-benzylamino-purine
bp	Baz çifti
cDNA	Complementary DNA
Ct	Cycle Threshold
dk	dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoxyribonucleotide
EN	Endangered (Tehlikede)
g	Gram
GA ₄	Gibberellic acid
H ₂ O ₂	Hidrojen perolsit
HCl	Hidroklorik asit
He	beklenen heterozigotluk
Ho	gözlenen heterozigotluk
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
IBA	indole-3-butyric acid
ISSR	inter-simple sequence repeat
IUCN	Nesli Tükenme Tehlikesi Altında Olan Türlerin Kırmızı Listesi
IUPAC	N-(trichloromethyl thio) cyclochox-4 ene-1, 2-dicarboximide
KIN	Kinetin
L	Litre
M	Molar

Mg	Milligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MS	Murashie and Skog Basal Medium
n	lokuslardaki allel sayıları
NAA	α Naphthaleneacetic acid
NaClO	Sodium hypochlorite
NaOH	Sodyum hidroksit
ND	Nanodrop
ng	Nanogram
NT	Near thretened (Tehdit altına girebilir)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilenglikol
PI	tespit olasılığı
pmol	Pikomol
r	allel frekansı
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Real Time PCR
SH	Schenk and Hildebrandt Temel Besin Ortamı
SLS	Sample Loading Solution
SSR	Simple Sequence Repeat=Basit Dizi Tekrarları
STS	Sodium tiosulfat
TDZ	Thidiazuron
TE Buffer	Tris EDTA Buffer
V	Volt
Z	Zeatin
PPM	Plant Presevation Mixture

1. GİRİŞ

Türkiye Akdeniz, Avrupa-Sibirya ve İran-Turan'ın kesiştiği noktasında bulunduğundan dolayı bitki türlerinin çeşitliliği bakımından dünyadaki zengin ülkelerinden biri olarak bilinmektedir (1). Türkiye'nin zengin su kaynakları, orman, kumul, bozkır, bataklık-sulak alanlarına sahip olması, gibi farklı habitatlara sahip olduğundan dolayı çeşitliliğin artması için önemli rol teşkil etmektedir. Türkiye'de toplam 11014 adet bitki taksonun yaklaşık üçte biri endemik bitkiler oluşturmaktadır (2). Geofitler önemli bitki gruplarından biri olarak, yıllardır yurt dışındaki insanların ilgisini çekmektedir. Son derlemelere göre Türkiye'de yetişen yaklaşık 10 bin tür çiçekli bitkilerden 900 adet geofitlerdir (3) ve bu rakam ülkenin florasının %6'dan fazlasını teşkil etmektedir (3). Geofit grubu içerisinde süs ve tıbbi bitkileri dikkat çekmektedir. Avrupa ülkelerindeki endemik türlerin toplamı 2750 iken, Türkiye'de bu sayı 3000 civarında olarak tespit edilmiştir (% 30 endemizm oranına sahip olmaktadır (2). Geofitlerin depo organları genel olarak yer altında görülür ve büyük bir kısmı *Iridaceae*, *Liliaceae* ve *Amaryllidaceae* familyalarına dahildir (3). Geofitler alkaloidler içerme ve güzel çiçeklere sahip olduklarından dolayı ilaç ve parfümeri sanayinde önemli bir role sahiptir. Son yıllarda doğal çoğalması yavaş olan bu soğanlı süs bitkilerine olan ilginin artması sonucu ve bu çiçeklerin ticari değer kazanması, ayrıca yılın sadece belli dönemlerinde kısa bir süre ile çiçek açan bu narin bitkilerin, tüccarlar tarafından kökleri ile birlikte bilinçsizce doğadan sökülmesi, geleceklerinin tehlike altına girmesine sebep olmaktadır (4-6).

Çizelge 1.1'de de görüldüğü gibi yıllara göre değişmekle birlikte Türkiye'de soğanlı rizomlu bitkiler, kesme çiçek, iç mekan bitkiler ve dış mekan bitki üretim alanlarında artışı görülmektedir. 2013 yılında 2 milyon dolar çiçek soğanları, 40 milyon dolar canlı bitkiler, 28 milyon dolar kesme çiçekler ve yaklaşık 6.9 milyon dolar civarında yosunlar ve ağaç dalları ihracatı yapılmıştır. Bu çizelgenin vurguladığı önemli noktalarından biri, yaklaşık 2 milyar dolar, geofit ihracatının yapılmasıdır. Ayrıca yıllara göre küçüğe olsa artışlar görülmektedir.

Çizelge 1.1.Bitki tiplerinegöre Türkiye süs bitkileri ihracatı (1.000 ABD Doları)(4–6)

Bitki tipi	2010	2011	2012	2013
Çiçek Soğanları	1.813.337	2.2.287.778	2.138.675	2.001.191
Canlı Bitkiler	21.773.957	40.317.500	34.045.992 1	39.908.862
Kesme Çiçekler	26.664.023	27.275.764	30.280.124	28.356.043
Yosunlar ve Ağaç Dalları	5.938.057	6.441.405	6.689.640	6.826.367
Toplam	56.189.374	76.322.447	73.154.431	77.092.464 14

Geofitlerin denetimsiz ve bilinçsizce sökülmeye başlanmasına karşı Türkiye’de bazı sivil toplum örgütleri, bilim adamları, Tarım Bakanlığı ve uluslararası çevre kurumları 1980’lerden bu yana çalışmaktadır. Uluslararası CITES (Nesli Tehlikede Olan Doğal Bitki ve Hayvan Türlerinin Uluslararası Ticaretine ait anlaşma) kapsamında geofitlerin sökümü ve ihracatı mevzuata bağlanmış ve her sene toplanan bilimsel bir kurul durum tespit etmektedir (7).

TÜBİTAK’ta 1981-84 yılları arasında yürütülen iki projenin sonuçlanmasından sonra bazı türlerin ihracatı yasaklanmış; bazı türlerde de üretime geçilmiştir. 1974–1989 arasında ynetmeliksizin, 1989 yılında ise birynetmeliğın çıkarılması, Doğal Çiçek Soğancıları Derneği’nin kurulması ile bu bitkilerin koruma önlemleri arttırılmış, ihracatına sınırlamalar getirilmiştir. Bugün ihraç edilen doğal çiçek soğanları 14 cins ve 18 tür ile sınırlandırılmıştır. Bu cins ve türler ihracat miktarları ile birlikte Çizelge 1.2’de verilmiştir. Bu arada dış ülkelerdeki çevre örgütlerinin girişimleri ile CITES heyetlerinin Türkiye’de yaptıkları incelemeler de etkili olmuştur. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı tarafından 1989 yılında çıkarılan yönetmelik 1991, 1995 ve 2005 yıllarında yeniden düzenlenerek yayınlanmıştır. Bu yönetmelikle Trkiyeflorasının korunması, çiçek soğanlarının tahrip edilmeden ve tüketilmeden doğadan toplanması, üretilmesi, depolanması ve ihracatı konuları disiplin altına alınmıştır (7).

Türkiye Cumhuriyeti Hükümeti CITES'e 1996 yılında taraf olmuştur. Ancak daha önce Türk bilim adamlarının girişimi ile *Galanthus*, *Cyclamen* ve *Eranthis* cinslerine giren türler CITES Ek II listesine alınmıştır (7).

2005'te geliştirilerek ve daha kapsamlı hale getirilen yeni yönetmeliğe göre Tarım ve Köyişleri Bakanlığı nezdinde oluşturan teknik komite her yıl ihracatı yapılan çiçek soğanlarının cins, tür, miktar, doğa kontenjanı, söküm takvimini belirlemekte ve hazırlanan doğal çiçek soğanı ihracat listesi de her yıl Ekim-Kasım aylarında Resmi Gazete'de yayınlanmaktadır. Bu listenin dışında teknik komitenin izni olmadan doğadan ticari amaçlarla çiçek soğanı toplayıp ihraç etmek yasaktır. Doğal Çiçek Soğanlarının 2015 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ (Tebliğ No: 2009 /55) ise resmi gazetede yayınlanmıştır (Çizelge 1.2). Çizelge 1.2'de görüldüğü gibi Türkiye'de *Crocus* (çiğdem) türlerinin tamamının doğadan toplanarak ihracatı yasaktır. Çok sayıda türü süs bitkisi olarak değerlendirilen *Crocus* cinsi de dünyada 80 kadar tür ile temsil edilmekte Bu listeye göre, ihracat yasağı veya izni olan türler dikkate alınarak 3 grupta oluşturulmuştur (Çizelge 1.2)(7). Bunlar şu şekilde sıralanabilir;

- 1- Doğadan toplanarak ihracatı yasak olan doğal çiçek soğanları
- 2- İhracatı kotayla veya başka herhangi bir kayıtle sınırlandırılan çiçek soğanları
- 3- İhracatı üretimden serbest olan çiçek soğanları.

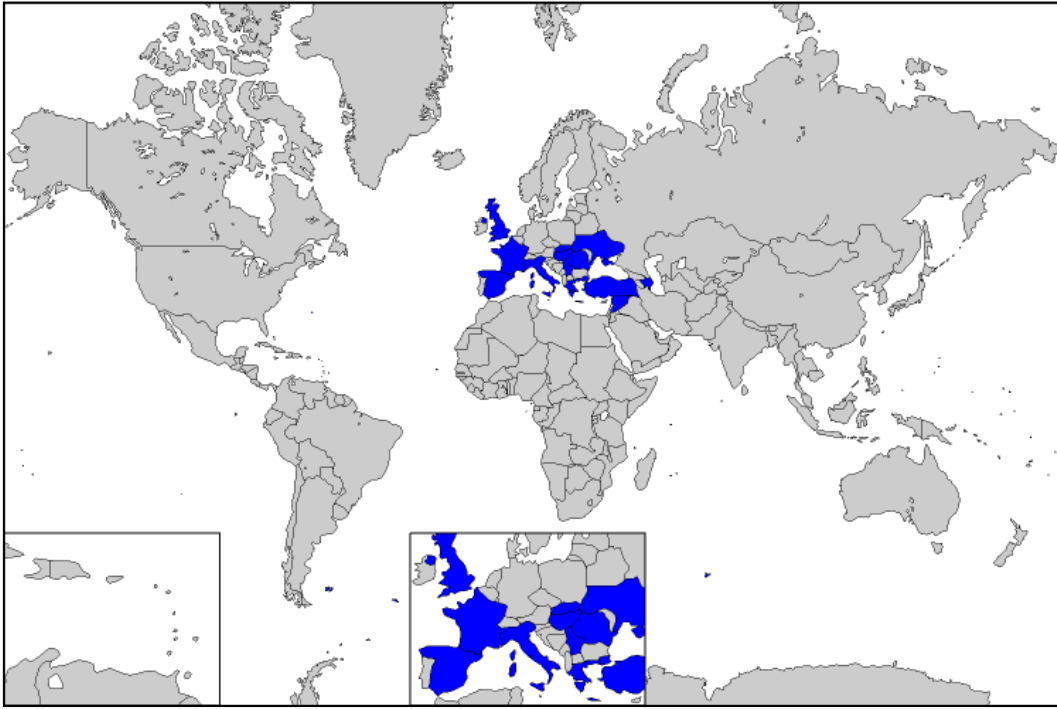
Çizelge 1.2. 2015 Yılı Doğal Çiçek Soğanlarının İhracat Listesi(8)

(I) Doğadan Toplanarak İhracatı Yasak Olan Çiçek Soğanları	(II) İhracatı Kotayla veya Başka Herhangi Bir Kayıtlı Sınırlandırılan Çiçek Soğanları			(III) İhracatı Üretimden Serbest Olan Çiçek Soğanları	
	Tür İsmi	Tür İsmi	Yıllık Limit (Adet)		
Doğa			Üretim	Çevre Uzunluğu (cm)	Tür İsmi
1. <i>Allium</i> (Yabani soğan) türlerinin hepsi 2. Crocus (Çiğdem) türlerinin hepsi 3. <i>Fritillaria</i> türleri (<i>F. persica</i> , <i>F. imperialis</i> hariç) 4. <i>Lilium</i> (Zambak) türleri (<i>L. candidum</i> ve <i>L. martagon</i> hariç) 5. <i>Muscari</i> (Muskari) türlerinin hepsi 6. <i>Sternbergia</i> (Kara çiğdem) türleri (<i>S. lutea</i> hariç) 7. <i>Tulipa</i> (Lale) türlerinin hepsi 8. <i>Eminium</i> türlerinin hepsi 9. <i>Biarum</i> türlerinin hepsi 10. <i>Nymphaeaceae</i> (Nilüfer) türlerinin hepsi 11. <i>Orchidaceae</i> (Salep) türlerinin hepsi 12. <i>Arum</i> (Yılan yastığı) türlerinin hepsi (<i>Arum italicum</i> , <i>Arum dioscorides</i> hariç) 13. <i>Pancreatium maritimum</i> (Kum zambağı) 14. <i>Hyacinthus orientalis</i> (Şark sümbülü) 15. <i>Gentiana lutea</i> (Censiyan) 16. <i>Cyclamen</i> (Sıklamen) türleri (<i>C. coum</i> , <i>C. cilicium</i> ve <i>C. bederefolium</i> hariç) 17. <i>Galanthus</i> (Kardelen) türleri (<i>G. elwesii</i> ve <i>G. woronowii</i> hariç) 18. <i>Iris</i> (Süsen) türleri 19. <i>Paeonia</i> (Şakayık) Türleri 20. Diğer yumru ve soğanlı türler	1. <i>Anemone blanda</i> (Yoğurt çiçeği)	4.000.000	2.000.000	4+	1. <i>Lilium candidum</i> (Miszambağı) 2. <i>Iris tuberosum</i> (Süsen)* (Karaçiğdem) 3. <i>Calla aethiopica</i> (Kalla)* 4. <i>Polygonatum tuberosum</i> (Sümbülteber)* 5. <i>Fritillaria persica</i> (Adyaman lalesi)
	2. <i>Arum italicum</i> (Yılan yastığı)	50.000	300.000	6+	
	<i>Arum dioscorides</i>	50.000	200.000	6+	
	3. <i>Cyclamen cilicium</i> (Sıklamen)	200.000	300.000	8+	
	<i>Cyclamen coum</i> (Sıklamen)	700.000	250.000	8+	
	<i>Cyclamen bederefolium</i> (Sıklamen)	-	3.000.000	10+	
	4. <i>Dracunculus vulgaris</i> (Yılan bıçağı)	50.000	300.000	10+	
	5. <i>Eranthis byemalis</i> (Sarı kar çiçeği)	3.000.000	-	3,5+	
	6. <i>Galanthus elwesii</i> (Toros kardeleni)	4.000.000	3.000.000	4+	
	<i>Galanthus woronowii</i> (Karadeniz kardeleni)	3.000.000	2.000.000	4+	
	7. <i>Leucojum aestivum</i> (Göl soğanı)	-	6.000.000	7,5+	
	8. <i>Urginea maritima</i> (Ada soğanı)	20.000	10.000	20+	
9. <i>Geranium tuberosum</i> (Deve tabanı)	500.000	400.000	5+		
10. <i>Fritillaria imperialis</i> (Ters lale)	-	50.000	10+		
11. <i>Lilium martagon</i> (Türk zambağı)	-	2.500	10+		
12. <i>Sternbergia lutea</i> (Karaçiğdem)	-	400.000	6+		

Kaybolma tehlikesi yaşayan türlerin korunması ve çoğaltımı zor olan türlerin üretiminde bitki doku kültürü uygulanmaktadır. Bitki doku kültürü tekniğinde kullanılan yöntemler bitki rejenerasyonu ayrıca kültürü yapılan hücrelerin özelliklerine göre farklı şekillerde değerlendirilmektedir(9). Bunlar; 1) organize meristematik hücreler içerensomatik doku rejenerasyonu, 2) meristematik olmayan somatik hücre rejenerasyonu, 3) mayoz bölünme geçiren gametik hücre rejenerasyonudur.

In vitro teknikleri bitki materyalinin kısa bir sürede hızlı çoğaltılmasında uygun bir metot olarak, çok kısa sürede soğanlı bitkiler örneğin *crocus*lardan çok sayıda bitki üretim imkanı görülmektedir. Geofitin *in vitro* çalışmaları genelde mikro üretim, sekonder metabolit üretimi ve hastalık kontrolü (örneğin virüssüz materyalüretimi) amacıyla kullanılmaktadır. Geofitlerin çoğalma hızlarının çok yavaş olması, kültüre alınmasında en önemli sorunlardan biri olarak bilinmektedir. Diğer taraftan, *in vitro* teknikleri kullanarak çok sayıda soğancık üretimi kısa bir sürede mümkün olabilmektedir.

Çok sayıda türü süs bitkisi olarak değerlendirilen *Crocus* cinsi dünyada 80 kadar tür ile temsil edilmekte olup, *Iridaceae* familyasına aittir. Çiçekleri sonbahar ve ilkbaharda açan *Crocus*lar güzel ve hoş kokulu olduklarından dolayı değerli süs bitkileri grubunda yer almaktadır (10). *Crocus*ların orijinülkeleri Şekil 1.1’de görülmektedir.



Şekil 1.1. *Crocus* türlerinin dünyadaki yayılışı (11)

Crocus genusun birçoğunu endemik türlerinden olarak tohumdan çiçek açabilme ve bir korm boyutuna ulaşabilmesi için 4-5 yıl hatta daha uzun bir süreye gerek duymaktadır. Ayrıca bir kısmının da tohum oluşturamaması nedeniyle sadece vejetatif olarak çoğalabilmektedir. Bu yüzden alternatif üretim ve hızlı çoğaltım teknikleri bu bitkiler için geliştirilmelidir. Son yıllarda alınan birçok tedbirler sayesinde doğadan bazı tıbbi ve süs bitkileri ile birlikte özellikle çiçek soğanlarının sökülüp ticaretinin yapılması kontrol altına

alınmış olsa dahi, endemik olan bazı türlerin doğal yetiştirme alanlarında korunması ve çoğalmasının sağlanması yanında bu bitkilerin hızlı bir şekilde kültüre alınma ve başarılabilirdiği halde, doku kültürü teknikleriyle hızlı çoğaltım çalışmalarının da yapılması gerekmektedir.

Ayrıca bu türlersekonder bileşikleri içerdiği için tıbbi özelliklerinin ortaya konmasında büyük önem arz etmektedir. *C. antalyensis* ve *Crocus speciosus*'un yaprak ekstralarında yapılan çalışmada yeni bir flavonol glikozit olan kaempferolu (3-O- α -(2,3-di-O- β -glucopyranosyl) bulunmuştur (12).

Çizelge 1.2'de görüldüğü gibi Türkiye'de *Crocus* türlerinin hepsinin doğadan toplanıp ihrac edilmesi yasaktır. Türkiye'de bulunan 35 *Crocus* türünün 19'u endemik olmak bilinmektedir. Bazı türlerde ise 2 ile 10 arasında değişen alt türler görülmektedir. Anadolu'da çiğdem veya gözenek (sonbaharda çiçek açanlar) olarak isimlendirilen *Crocus* türlerinin bazılarında kormları çiğ olarak veya çiğdem pilavı yapılarak yemek olarak kullanılmaktadır (10).

Güzel ve gösterişli çiçeklere sahip olan *C. speciosus* Bieb. türünü Türkiye florasında bulunan üç alt türü ile ayrıca kaybolma tehlikesi yüksek olan en önemli türlerden biri olarak tanımlanmıştır.

1) *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew

2) *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew

3) *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus*

Genel olarak bu üç alt türün taksonomisi Çizelge 1.3'de özetlenebilir:

Çizelge 1.3. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türlerinin taksonomisi (13)

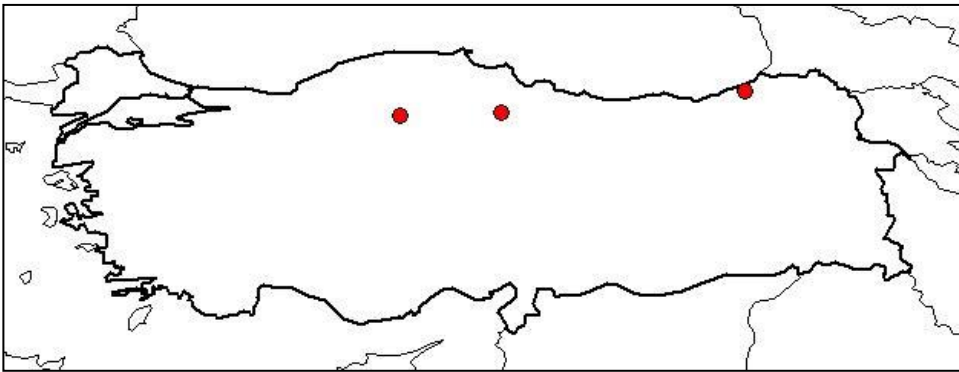
Taksonomik bilgiler			
Alem	Plantae	Plantae	Plantae
Alt alem	Tracheobionta	Tracheobionta	Tracheobionta
Sınıf	Liliopsida	Liliopsida	Liliopsida
Alt sınıf	Liliidae	Liliidae	Liliidae
Takım	Liliales	Liliales	Liliales
Familyası	Iridaceae	Iridaceae	Iridaceae
Cinsi	<i>Crocus</i>	<i>Crocus</i>	<i>Crocus</i>
Tür Adı	<i>C.speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i> ,	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>
Türkçe Adı	Çiğdem, Çayır çiğdemi	Çiğdem, Çayır çiğdemi	Çiğdem, Çayır çiğdemi
İngilizce Adı	<i>C.ilgazensis</i>	<i>C.speciosus</i>	<i>C.xantholaimos</i>
Yöresel Adları	Çökülce, Sakarca, Sarıklık (Çarşamba-Samsun), Gökdedem, Gökkız (Dinar- Afyon) veya Kesercik.	Çökülce, Sakarca, Sarıklık (Çarşamba-Samsun), Gökdedem, Gökkız (Dinar- Afyon) veya Kesercik.	Çökülce, Sakarca, Sarıklık (Çarşamba-Samsun), Gökdedem, Gökkız (Dinar- Afyon) veya Kesercik.
Morfolojik Bilgi	Çok yıllık, yumrulu otsu bir bitkidir	Çok yıllık, yumrulu otsu bir bitkidir	Çok yıllık, yumrulu otsu bir bitkidir
Çiçeklenme Zamanı	Eylül-Ekim (9-10)	Eylül-Ekim (9-10)	Eylül-Ekim (9-10)
IUCN Kategorisi	EN	NT	NT
Endemizm Durumu	Endemik	Endemik	Endemik

Çizelge 1.4. *Crocus speciosus ilgazensis* alt türünün özellikleri (14)

<i>Crocus speciosus ilgazensis</i>	
Çiçeklenme zamanı	Sonbahar
Yayılm	Kuzey Türkiye
Yerli iklim	Kışları soğuk,yazları sıcak
Yabancı Habitat	Çim, taşlık yamaçlar, ormanlık alanlar, kireçtaşı üzerinde
Ayırt edici özellikleri	Çiçek lila, mavi, kısa tarzı genellikle altı dallı. Paralel liflerin içine corm tunik membranöz yarma
En yakın akrabalar	<i>Crocus speciosus subsp. speciosus</i> <i>Crocus speciosus subsp.xantholaimos</i>
Yetiştirme koşulları	Bahçe koşulları Toleranslı, azgüneş seven ve su basmasına hassas

Çizelge 1.5. *Crocus speciosus subsp. ilgazensis* alt türünün genel taksonomik özellikleri (15,16)

Ömür	Çok yıllık
Yapı	Ot
Çiçeklenme	9-10 aylar
Habitat	Alpin ve açıklık Abies ormanları
Yükseklik	1600-1750
Endemik	Endemik
Element	Avrupa-Sibirya
Türkiye dağılımı	K. Anadolu
Genel Dağılımı	Türkiye
Vilayetlere göre	Çankırı, Amasya, Bayburt
Kordinantlara göre	A4, A5, A8



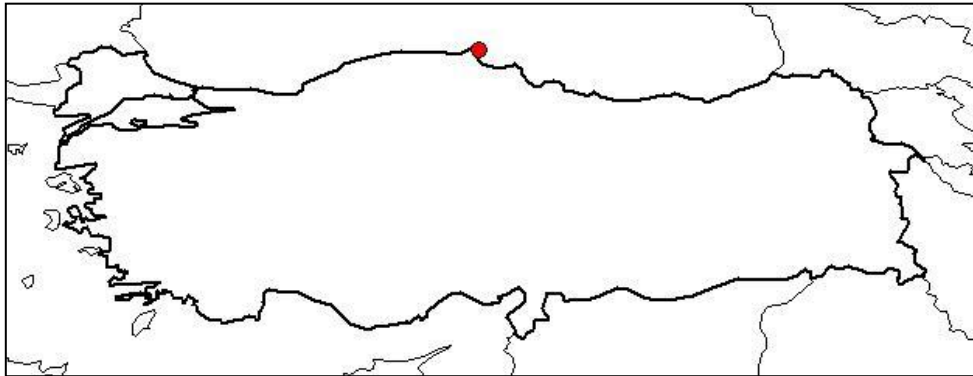
Şekil 1.2. *Crocus speciosus ilgazensis* alt türünün Türkiye üzerinde takson (Harita dağılımı)(17)

Çizelge 1.6. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünün özellikleri(14)

<i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i> Mathew	
Çiçeklenme zamanı	Sonbahar
Yayılm	Kuzey Turkey
İklim	Kışları soğuk, yazları sıcak
Yabani habitat	Ormanlık açıklık alan
Ayırt edici özellikleri	Çiçek lila, mavi, kısa tarzı genellikle altı dallı. Paralel liflerin içine corm tunik membranöz yarma.
En yakın akrabalar	<i>Crocus speciosus ilgazensis</i> <i>Crocus speciosus xantholaimos</i> <i>Crocus pulchellus</i>
Yetiştirme koşulları	Bahçe koşulları Toleranslı, az güneş seven ve su basmasına hassas

Çizelge 1.7. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünün genel taksonomi özellikleri(18)

Ömür	Çok yıllık
Yapı	Ot
Çiçeklenme	9-10 aylar
Habitat	Abies ve Rhododendron koru açıklıklar
Yükseklik	1600-1750
Endemik	Endemik
Element	Karadeniz
Türkiye dağılımı	K. Anadolu
Genel Dağılımı	Türkiye
Vilayetlere göre	Sinop
Koordinatlara göre	A5



Şekil 1.3. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünün Türkiye üzerinde takson (HARİTA Dağılımı)(19)

Çizelge 1.8. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünün özellikleri(20)

<i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	
Çiçeklenme zamanı	Son bahar
Yayılm	Kırım; Kafkasya; Kuzey İran; Kuzey Türkiye
Yerli iklim	Kar ile soğuk kış. Sıcak kurutucu yaz
Yabancı Habitat	Ormanlık, yaylalar, kısa dağ çim
Ayırt edici özellikleri	Çiçek lila, mavi, kısa tarzı genellikle altı dallı. Paralel liflerin içine corm tunik membranöz yarma.
En yakın akrabalar	<i>Crocus speciosus ilgazensis</i> <i>Crocus speciosus xantholaimos</i> <i>Crocus pulchellus</i>
Yetiştirme koşulları	Bahçe koşulları Toleranslı, azgüneşseven ve su basmasına hassas

Çizelge 1.9. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünün genel taksonomi özellikleri(20)

Ömür	Çok yıllık
Yapı	Ot
Çiçeklenme	9-11 aylar
Habitat	Korular, çayırıklar
Yükseklik	800-2350
Endemik	Endemik değil
Element	Bilinmiyor
Türkiye dağılımı	K.O. ve G. Anadolu
Genel Dağılımı	Kırım, Kafkasya, Kuzey İran
Vilayetlere göre	Bartın
Taksonun	Kare düzeyinde dağılımı bulunamadı

Şekil 1.4. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünün Türkiye üzerinde takson (harita Dağılımı)(21)

Crocus speciosus Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew alt türleri endemik ve yakın gelecekte tehdit altında olan ayrıca

doğada orta vadeli taksonlar grubuna giren türlerdir. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *Ilgazensis* Mathew alt türü ise tehdit altına olarak bilinmektedir (Near Threatened). *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew ise EN (Endangered) tehlike altında olan grubunda olmaktadır. Her iki alttür Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabında yer almaktadırlar (22). Türkiye’de *Crocus speciosus* Bieb. türleri genelde 800-2350 metreler arasında olan yerlerde yayılış göstermektedirler. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew alt türü Amasya (A5), Çankırı (A4), Gümüşhane (A8)’de, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew sadece Sinop (A5)’da, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* türü ise Gümüşhane (A7), Bolu, Zonguldak (A3), Niğde (B5), Konya (B3), Sivas (B6), Kayseri, Konya, Isparta (C3 karelerinde) illerinde yayılış göstermektedirler (23).

Crocus speciosus Bieb. türleri çok yıllık, çiçeklenmeleri ise Eylül-Kasım aylar arasında görülmektedir. Yaprak çıkışı daha sonra olmakla beraber yapraklar 3-4 adet olarak, yaprak enleri ise 4-5 mm olarak bilinmiştir. Taç yaprakları ise genel olarak mor-lila renklerinde görülmektedir. *xantholaimos* alt türünde taç yapraklarının dip kısmı sarı, diğer iki alt türde ise beyazdır (24). Meyvelerin olgunlaşması ise ilkbaharda olmakta, meyveler toprak içinde ve sadece uç kısımları toprak yüzeyinde görülmektedir. Türlerin yetişme alanları erozyona açık olan alanlar dahil olarak verimli, mineral maddelerce zengin topraklara ihtiyaç duymaması gözlemlenmiştir. Ele alınan bu alt türler kısa vadede düşünüldüğünde bitkilerin ciddi anlamda tehlike altına girebilmesi akla gelmese de yetiştiği yerlerde yol yapım ve hafriyatgibi çalışmalar, özellikle *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* türünün sınırlı bir lokalitede doğal olarak bulunduğu Ilgaz Kadınçayırı bölgesinde kayak tesisi yapımının planlanması bu türün önemli zarar görmesi hatta yok olma ihtimali söz konusu olmaktadır. Bu nedenle doku kültürü gibi çalışmaların yapıldığında yetişme alanları tehdit altında olduğunda bile bitkinin zarar görmesinin önüne geçilebilir.

Ticarileşme potansiyeli yüksek ve gösterişli çiçeklere sahip olan *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew alt türleri kültüre alınarak, ticari üretime yönelik ve alternatif pazar oluşturulması *Crocus* çeşitlerinin geliştirilmesi, düşük gelir seviyesine sahip olan bölge üreticisi için önem ahzedebilir. Bu taksonların çoğalma hızı doğada düşük olduğundan dolayı *in vitro* teknikler kullanılarak kısa sürede çok sayıda korm üretimi mümkün olabilmektedir.

Çizelge 1.2’de görüldüğü gibi Türkiye’de *Crocus* (çiğdem) türlerinin tamamının doğadan toplanarak ihracatı yasaktır. *Crocus* cinsi çok sayıda türü süs bitkisi olarak değerlendirilen bu türdünyada yaklaşık 80 türü bulunmaktadır. Bu cins *Iridaceae* familyasına aittir. Türkiye’de ise 19’u endemik olmak üzere 35 *Crocus* türü mevcuttur. Bazı türlerin; sayıları 2 ile 10 arasında değişen alt türü de bulunmaktadır. *Crocus* türlerinin bir kısmı sonbaharda bir kısmı da ilkbaharda çiçek açmaktadır. Bundan dolayı 30 kadar tür süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir.

Endemik ve süs bitkisi olarak önemli potansiyele sahip olan ve endemik-tehlike altında bulunan *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alttürleri ile *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünde ilk kez olarak *in vitro* kültürü ve korm üretim çalışması yapılmıştır. Bu amaç için doğal floradan toplanan *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos*, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türlerine ait çeşitli organ eksplantları, farklı besin ortamlarında ve kültür koşullarında *in vitro* korm üretimi çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen bitkiler ise dış şartlara alıştırılıp toprağa aktarılmıştır. Süs bitkisi olarak ekonomik potansiyeli bulunan *Crocus speciosus* türüne ait bu üç alt türün kültüre alınmasıyla, doğal yetiştirme alanlarında yapılan sökümlerin önüne geçilebilecek, yok olmalarına yönelik tehditlerini ortadan kalkabilecek ve Türkiye ekonomisi ve germplazmasının korunmasına katkı sağlanabilecektir.

Ayrıca *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus*, *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* türlerin korunmasına yönelik SSR (Simple Sequence Repeats) markörlerle genetik tanısı, genom büyüklüğünün filowisitometrik yöntemlerle belirlenmesi, Safran (*Crocus sativa*) floral MADS-box gen bölgesi/bölgelerinin türler arası homolojilerinden yararlanılarak bu alt türlerde belirlenmesi ve alt türlere ait çiçekte ifade profillerinin belirlenmesi konu edinilmiştir.

Moleküler tanımlama markörlerinden mikrosatelit veya SSR (Simple Sequence Repeat=Basit Dizi Tekrarları) yüksek tanımlama kabiliyeti, tekrarlanma oranının çok yüksek oluşu, üniversal veri tabanlarında kullanılabilmesi, ko-dominat oluşu vb. gibi özellikleri nedeni ile gerek dünyada gerekse Türkiye’de en yaygın kullanılan markörler arasındadır.

Mikrosatellitler, herhangi bir canlı organizma genomunda ardarda dizilmiş (tandem repeats), genellikle 2 ila 5 bp (baz çifti) uzunluğunda oluşmuş DNA tekrarlarıdır, bu tekrarlar genellikle 10 veya daha fazladır. Mikrosatellit tekrarlamaları tam tekrar, eksik tekrar (tekrarlanan diziler arasında tekrarlanmayan dizilerin bulunması) veya karışık tekrarlar (25) olarak bitki genomunda bulunmaktadır (26). Bitkilerde tanımlandığı hücre komponentlerine göre nSSR (nuclear=çekirdek SSR) ve cpSSR (kloroplast SSR)'lara ek olarak bitki genom projeleri çerçevesinde oluşturulan EST (Expressed Sequence Tag) verilerinin transkripsiyona giren ve girmeyen bölgelerden (UTR) tespit edilen EST kökenli SSR'ların katılımı ile birçok bitki türünde geniş bir SSR veri tabanı oluşmuştur (27,28). Ayrıca, günümüzde pek çok önemli kültür bitkisinin genetik haritalarının oluşturulmasında; fasulye (29), mısır (30), asma (31) yaygın olarak SSR markörler kullanılmaktadır. Genetik kimlik tanımlarını belirleyen tek markör özelliğine sahip SSR markörlerin uygulanması ise; genom boyunca tekrarlanan dizilerin iki yanından primerlerce PCR'da çoğaltılması ve jel ortamında görüntülenmesi veya kapiller elektroforez (otomatik dizi analizi sisteminde) büyüklüklerine göre sıralanması esasına dayanmaktadır. Sonuçların görüntülenmesi ise; otomatik dizi analizi sisteminde allel büyüklükleri, floresan işaretli primer yardımıyla, pikler şeklinde belirlenmesiyle gerçekleşmektedir.

Crocus speciosus Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew alt türlerine ait genetik tanımlamalarla ilgili çalışmalar son derece sınırlıdır. Bu türlerde SSR lokus bölgeleri tespit edilmemiştir. Bu amaçla tezkapsamının başka bir *Crocus*(*Crocus sativa*: safran)türünden (32) ve (33) tarafından geliştirilen SSR markörlerin türler arası transfere uygun olanları kullanılarak SSR analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylelikle türlerde, kaybolma tehlikesi ile karşı karşıya bulunan bu alt türlere ait bulunan allel verileri, gerek alt türlerin tanımlanması, gerekse ıslahı ve yetiştiriciliği hakkında ve ulusal veri paylaşımı sayesinde yakın *Crocus* türleri ile karşılaştırılmalarında etkin rol oynayacağı düşünülmektedir.

Gerek bitki gerekse hayvan hücrelerinde yapılan sitogenetik tanımlamalarda, günümüzde yaygın olarak kullanılan flow sitometri; verimli, güvenilir, hızlı ve yeni bir yöntem olup özellikle bitki hücrelerindeki DNA miktarının belirlenmesinde ve ploidi düzeyindeki varyasyon durumlarının araştırılmasında oldukça popülerdir (34). Yöntem temel olarak; süspansiyon içerisindeki boyanmış partiküllerin (hücre çekirdeği ya da DNA) bir floresans

mikroskobu aracılığıyla okunmasına dayanmaktadır. 1950'li yıllarda keşfedilmesine rağmen, bitki araştırmalarında kullanımı 1980'lere dayanmaktadır. Özellikle, DNA çekirdek içeriğinin belirlenmesi, DNA ploidi ve hücre döngüsü analizlerinin saptanmasında önemli bir teknoloji haline gelmiştir (35–38). Tezinüçüncük kısmını oluşturan flow sitometri analizleri sonucunda *Crocus* alt türlerine ait genom büyüklüğü net olarak belirlenmiş ve bu veriler SSR analizleri ile birleştirilerek alt türlere ait kesin taksonomi yakınlık dereceleri tayin edilmiştir.

Çiçek (floral) MADS-box genlerine ait kısmi dizilerin belirlenmesi ve çiçekteki ifade çalışmaları ise tezin diğer basamağını oluşturmaktadır. Gen ifadesi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Real Time PCR; sıcaklık döngülerini sağlayan cihazların, hassas ölçüm aletleri ile birleştirilmesi ile oluşmuş bir yöntemdir. Reaksiyon esnasında her bir PC döngüsü yeterli miktarda ürünün verdiği floresan ışımaya göre çalışmakta ve reaksiyonun her aşamasında, oluşan ürün kontrol edilmektedir. Reaksiyon için kullanılan diziye özgü proplar ve diziye özgün olmayan boyalar sayesinde rahatlıkla nicel ve nitel ölçümler yapılabilmektedir (39). Aletin içinde bulunan tarama amaçlı farklı sistemler sayesinde yayılan ışımaya miktarı ile doğru orantılı olan PCR ürün miktarının gözlemlenmesi sağlanmaktadır (40).

Real Time reaksiyonları Light Cycler 480 (Roche) aletinde yapılmış olup, uygulamada yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (SYBR) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmüştür. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber Green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (41). Ayrıca kısa sürede kantitatif sonuç verebilmesi, tüpler açılmadan reaksiyona gidildiği için kontaminasyon riskinin düşük olması ve elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmesi gibi birçok avantaja sahiptir.

Çiçek evriminin anlaşılması ve geliştirilmesi açısından önemli olan MADS-box genlerinin (42) bitkilerde, hayvanlarda ve funguslarda kökeni net olarak bilinmemektedir. MADS-box genleri ismini dört ayrı canlıdan elde edilen dört proteinin kısaltmasından almıştır. Bu proteinler sırasıyla; *Saccharomyces cerevisiae* mayasından MCM1 proteini (Mini chromosome Maintenance 1), *Arabidopsis thaliana*'dan AGAMOUS, *Antirrhinum*'dan

DEFICIENS ve insandan elde edilen SRF proteini (Serum Response Factor)'dir (43). Bu genler özellikle çiçek organ genlerinin homeotik fonksiyonları üzerinde etki göstermektedirler (44). Bununla birlikte, çiçeklenme zamanının belirlenmesi, tohum, meyve gelişimi gibi çeşitli gelişim aşamalarında da etkin rol oynadığı belirtilmektedir (45).

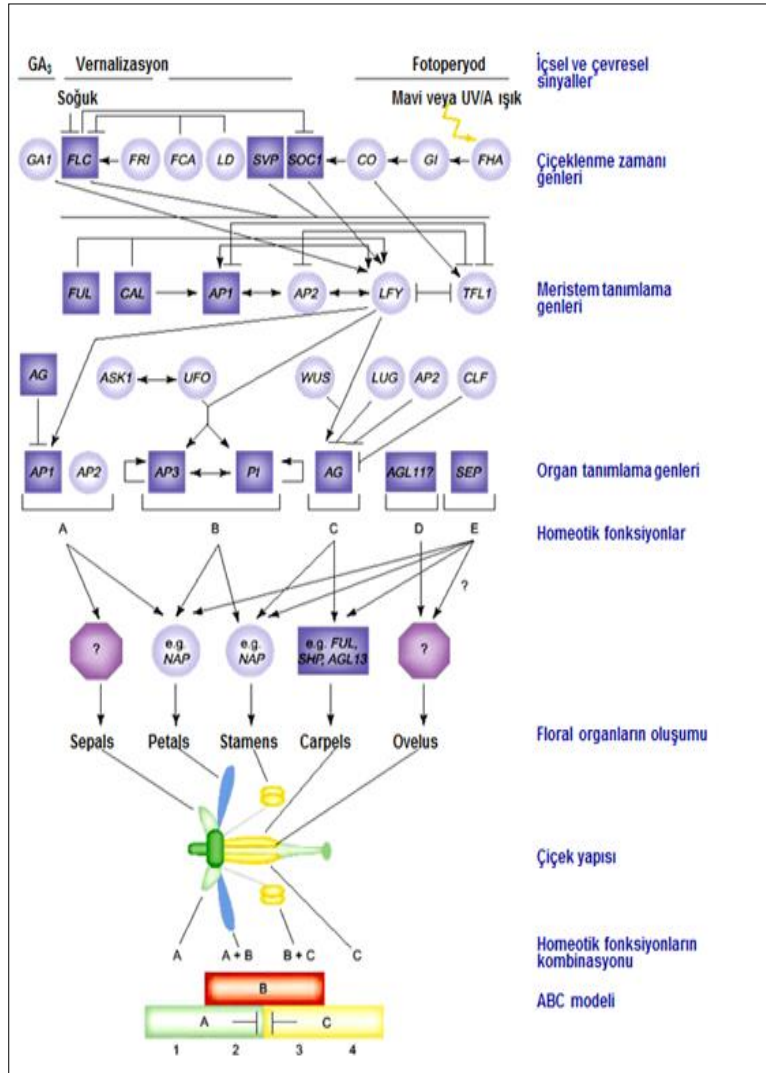
MADS-box genlerinin etkin olduğu çiçek organ genlerinin homeotik fonksiyonları A,B, C, D ve E olarak beş farklı sınıfta görülür. ABC genleri olarak da bilinen ve çiçek organ dizilişlerinin belirlenmesine ilişkin olan A,B,C,D ve E genleri bitkilerde monokotiledonlarda, dikotiledonlarda, bazal angiospermlerde, gimnospermlerde ve eğrelti otlarında farklı gen dizilişlerine sahiptir. Çiçek gelişiminin moleküler ve genetik düzenlemesi için ABC modeli ilk olarak model organizmalar, *Arabidopsis* ve *Antirrhinum*'da geliştirilmiş ve bu bitkilerde çiçek organ dizilişleri açıklanmaya çalışılmıştır. Buna göre A, B ve C'nin her biri bir ya da birden fazla genle ilişkilidir. İlk halkayı oluşturan A sepal gelişimini, 2. halkayı oluşturan A ve B petal oluşumunu, 3. halkayı oluşturan B ve C stamen oluşumunu ve 4. halkayı oluşturan C karpel oluşumunu göstermektedir (46). ABC modeline daha sonra ovul gelişimini ifade eden D ve tüm çiçek organlarının belirtildiği E eklenerek ABCDE modeli oluşturulmuştur (47).*Arabidopsis* ve *Antirrhinum*'da yapılan bu araştırmalarda çiçeklenme başlangıcı ve gelişiminin çeşitli fonksiyonları olan, transkripsiyon faktörlerini (*FLO/LEAFY*, *HB*, *MADS* ve *YABBY*) ve sinyal iletim genlerini (*CLAVATA1*, *CLAVATA3* ve *KAPP*) içeren pek çok ailenin birçok geni tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (48) (Şekil 1.10.).

Çiçeklenme, tohum, meyve gelişimi gibi çeşitli gelişim aşamalarında da etkin rol oynayan MADS-box genleriyle ilgili *Crocus* türlerinde yapılan çalışmalara bakıldığında; 2004-2011 yılları arasında *Crocus sativa* L.'da çiçek gelişimden sorumlu MADS-box genlerinden 3 APETALA 1 (CsAP1a, CsAP1b ve CsAP1c) (49),AGAMOUS1 (CsAG1) geni (50), APETALA3-like (AP3-like) geni (51), PISTILLATA/GLOBOSA-like (PI/GLO-like) MADS-box genleri (52), SEPALLATA3-like MADS-box genleri (53) genlerine ait cDNA'ler dizilenmiştir. Çalışmada konu alınan *Crocus* türlerinde ise gen düzeyinde bir çalışma yapılamamıştır.

Gerek çiçekte yapılacak genetik modifikasyonlara yönelik tüm genlerin klonlanmasında başlangıç oluşturacak, gerekse çiçeklenme yolağında (ABC) yer alan tohum-çiçek vs genlerinin ileriki dönemlere klonlanmasına ön bilgi oluşturabilmek amacı ile *C. sativa*'da

bilinen AP1 (*CsAP1a*, *CsAP1b* ve *CsAP1c*) gen bölgesi/bölgelerinin endüstriyel/süs bitkisi olarak kullanılan bu alt türlerde ilk olarak tespit edilmesi ve türler arası ifade analizlerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

Bu çalışmada, *C. speciosus* subsp. *speciosus*, *C. speciosus* subsp. *ilgazensis* Mathew ve *C. speciosus* subsp. *xantholaimos* üzerinde doku kültürleri yolu ile kısa sürede *in vitro* korm üretimi yapılmıştır. Ayrıca türlerin korunmasına yönelik SSR (Simple Sequence Repeats) markörlerle genetik tanısı, türde yürütülecek ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere genom büyüklüğünün flowsitometrik yöntemlerle belirlenmesi ve bazı MADS-box gen bölgelerinin tür içi homolojilerden yararlanılarak belirtilmiştir.



Şekil 1.5. Model organizma Arabidopsis’de çiçek gelişimine yönelik ABC modeli ve yolakta yer alan genler MADS-box genleri (kare ile gösterilenler) (48).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Doku Kùltürü

In vitro teknikleri bitkisel materyalin kısa sürede hızlı çoğaltılması için uygun bir metot olup, orkide gibi soğanlı bitkilerden çok kısa sürede çok sayıda bitki üretilebilmektedir. Geofitlerde *in vitro* çalışmalar genel olarak, mikro üretim, hastalık kontrolü (özellikle virüslerden ari materyal üretimi) ve sekonder metabolit üretimi amacıyla yapılmaktadır. Geofitlerin kültüre alınmasındaki en önemli sorun, çoğalma hızlarının son derece yavaş olmasıdır. Öte yandan, *in vitro* teknikler kullanılarak kısa sürede çok sayıda soğancık üretimi mümkün olabilmektedir.

Tulipa ve *Muscari botryoides* bitkilerinde yapılan çalışmada ise soğanların, değişik oranlarda GA₃' ün her iki türde de bitki morfolojisine ve gelişiminde etkisi olduğu tespit edilmiştir (54).

Muscari racemosum L.Mill. bitkisinde yapılan çalışmada eksplant olarak pul yaprakları kullanılıp, *in vitro* koşullarda karanlık ve aydınlıkta rejenerasyon kabiliyetini incelenmiştir. Karanlıkta ve MS besin ortamında %8 oranında adventif soğan oluşumu ve kök oluşumunda artış bulunmuştur. Bunun yanı sıra soğanlardan çıkan yaprak gelişimlerine bakıldığında ortamlar arasında farklılığı gözlenmiştir (55).

Blandfordia grandiflora bitkisinde yapılan çalışmada eksplant olarak sürgün uçları kullanarak farklı konsantrasyonda NAA, KIN, BAP, 2iP içeren MS besin ortamlarında kültüre alarak *in vitro* doku kültürünü başarmıştır (56).

Nergis bitkisinde yapılan çalışmada, sürgünlerden elde edilen soğancıklar bitki büyüme düzenleyici madde içermeyen, ayrıca aktif kömür ilave edilen ortamlarda 20°C' de aydınlık ve karanlıkta kültüre alınmıştır. Çeşitlere bağlı olarak %47.8 – 81.2 oranında rejenerasyon elde etmiştir (57).

Muscari botrides Mill. bitkisinde yapılan çalışmada, epidermal ve alt epidermal eksplantlar kullanılarak farklı konsantrasyonlarda IBA ve BAP içeren besin ortamlarında morfolojik değişiklikleri incelenmiştir. Rejenerasyon ve soğan sayısı bakımından en iyi

besin ortamını 0.2-2 mg/l IBA ve 1-2 mg/l BAP kombinasyonu olduğunu ve %56 rejenerasyon sağladığını bildirilmiştir (58).

Eucomis zambesiaca, *E. comasa*, *E. autumnalis*'in çift pul yapraklarını *in vitro*'da sürgün oluşumu için 4.4, 11.1 ve 22.2 µM BA ve 5.4 µM NAA içeren MS ortamlarında kültüre almışlardır ve yüksek oranda *in vitro* sürgün ve soğancık elde edilmiştir(59). Sarımsak (*Allium sativum* L.)'da 1 mm'lik gövde diskini LS besin ortamında kültüre alarak, mikro çoğaltım yöntemi geliştirilmiştir (60).

Orkide (*Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and Mc Cann) de yapılan çalışmada 1. ve 2. genç yaprakları 100 mg/l myo-inositol, %3 sukroz, 1 mg/l TDZ %0.8 agar içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır ve yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonunu elde edilmiştir. Meydana gelen sürgünlerin %2 phytigel, %3 sukroz, 2mg/l IBA içeren MS ortamında köklenmeyi bildirilmiştir (61).

Zambak (*Lilium longiflorum*)'da *in vitro* da elde edilen sürgünlerden, 2-3 nodlu ve 2-3 yapraklı 1cm'lik gövde parçaların kullanarak 30g/l sukroz, 2,3 µM BA, %0.8 agar içeren ½ MS besin ortamında kültüre almış ve meydana gelen sürgünleri ve soğancıkları 20 g/l sukroz, 1.1 µM NAA içeren ½ MS ortamında köklendirmiştir (62).

Süs bitkisi olarak tanınan *Crinum Ellen Bosanquet* bitkisinin doku kültürü ile çoğaltımı başarılmıştır. En iyi sonuç ise 22.2 µM BAP içeren MS besin ortamında elde edilmiştir(63). Kardelen (*Galanthus ikariae*Baker) bitkisinde soğan pul yaprakları %6 sukroz, 0.2 mg/l KNA, %7 agar, içeren MS besin ortamında kültüre almıştır ve adventif soğan rejenasyonu başarılmıştır (64).

Crinum lilies' bitkisinde üç yapraklı soğan diskleri kullanılarak, %6 sukroz, %7 agar, 35.5 µM BA içeren MS besin ortamında 4 hafta sonra soğan pul yapraklarında adventif sürgün rejenerasyonun elde edilmiştir(65). Yaprak ve meristematik uç eksplantları kullanarak organogenesis ve somatik embriyogenesis yoluyla *Muscari armeniacum*'da sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir (66).

Muscari armeniacum'da yapılan çalışmada, büyük, sarımsı ve nodular kallus oluşumu 4.5 µM 2,4-D, 54 mM NAA içeren ortamda başlatılmış, nodular kalluslar 0.44-44 µM IBA

içeren ortama transfer edildiğinde yüksek oranda sürgün oluşumu meydana geldiği bildirilmiştir. *Lilium nepalense*'de yapılan çalışmada olgunlaşmamış soğanlardan hazırlanan çift soğan pul yaprak eksplantları 20µM Zeatin içeren MS ortamında kültüre alınmış ve çok sayıda sürgün elde edilmiştir (66).

Lilium nepalense bitkisinde ikili veya üçlü soğan pul yapraklarını %3 sukroz, %8 agar, 20 µM Zeatin, içeren MS besin ortamında kültürel alınmıştır ve pul yaprak disklerinden adventif sürgün rejenasyonu bildirilmiştir (67). Dağ yıldızı (*Sternbergia candida*)'da yapılan çalışmada olgunlaşmamış embriyoları % 3 sukroz, % 7 agar, 4 mg/l BAP + 0.25 mg/l NAA, içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır ve adventif sürgün rejenerasyonunu başarmıştır. Meydana gelen soğanları 1 mg/ l NAA, % 0.5 aktif kömür 30 g/l sukroz içeren MS besin ortamında köklendirilmiştir (68).

In vitro hızlı çoğaltım için *Sternbergia candida* ve *S. fischeriana* türlerin öncelikle soğan pul yaprak eksplantları farklı oranlarda büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Soğancık oluşturan eksplant oranı (%75.99) ve eksplant başına soğancık sayısı (3.30 adet) birlikte düşünüldüğünde en yüksek soğancık oluşumu *S. candida* türünde 4 mg/l BAP ve 0.50 mg/l KNA içeren besin ortamında 2 pul yapraklı soğan eksplantlarından elde edilmiştir. *S. fischeriana*'da ise en yüksek soğancık oluşumu (% 76.67 ve 2.59 adet) 2 mg/l BAP ve 0.50 mg/l KNA içeren ortamda yine 2 pul yapraklı eksplantlardan üretilmiştir (68).

Miszambak (*Lilium candidum* L)' bitkisinde 0.5-1 cm soğan pul yapraklarını 0.30 ppm BA ve 0.03 ppm IBA içeren DMS besin ortamında kültüre almışlardır ve adventif soğan rejenerasyonunu başarmıştır (69). *Cryanthus spiralis* bitkisinde yapılan çalışmada *in vitro* koşullarında ikili pul yapraklarından en iyi adventif ve yan soğan oluşumu 5 g aktif kömür içeren sıvı besin ortamında, 6 hafta sonunda elde edilmiştir. En iyi sürgün gelişimi 1 mg/l NAA-2 mg/l BAP içeren ortamda tespit edilmiştir. Soğanlar %6 – 9 sukroz içeren ortamlara köklenme amacı ile aktarılması sonucunda ise %9 sukroz içeren besin ortamında gelişen soğanların hacim ve ağırlıklarının daha fazla olduğu gözlenmiştir (70).

Sternbergia clusiana'da Soğan pul yapraklarını %3 sukroz, %8 agar, 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, içeren MS besin ortamında kültüre almıştır ve adventif sürgün rejenerasyonunu başarmıştır. Elde edilen soğanların %8 agar, %3 sukroz 1mg/l NAA

içeren MS besin ortamında köklenmeleribildirilmiştir (71). *Lilium candidum* L. (Mis zambak) bitkisinde yapılan çalışmalar sonucunda yaprak eksplantlarından değişik konsantrasyonlarında BAP-IBA içeren MS besin ortamlarında, adventif soğan rejenerasyonu başarılıdır (72).

Muscari muscarimi bitkisinde olgunlaşmamış embriyoları %3 sukroz, %7 agar, 4 mg/l BAP + 0.5mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır ve adventif sürgün rejenerasyonunu başarılıdır, meydana gelen sürgünler ise MS besin ortamında köklendirilmiştir (72). *Lilium candidum* bitkisinin pul yapraklarının alt kısımları ve *in vitro*' da gelişen yapraklardan adventif soğan oluşumu elde edilmiştir. Besin ortamı ise 2.22 µM BAP ve 2.69 µM NAA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır (73).

Galanthus elwesii Hook. bitkisi üzerinde yapılan çalışmada olgunlaşmamış embriyolar kullanılarak *in vitro* çoğaltımı başarılıdır. En yüksek soğancık oluşumu ise 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir (74). *Ornithogalum oligophyllum* bitkisinde ikili pul yapraklarından adventif soğan oluşumu elde edilmiştir. En iyi sonuç ise 2 mg/l BAP 0.5 mg/l IBA içeren MS besin ortamında gözlenmiştir (75).

M.muscarimi, *M. macrocarpum*, *M.neglectum* ve *M.adilii* türlerinin *in vitro* çoğaltımı için yapılan çalışmada, *M. muscarimi*'de en fazla soğan 19 adet ile 4 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamında, *M. macrocarpum*'da en fazla soğan eksplant başına 6 adetle 2 mg/l KIN ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında, *M. neglectum*'da en fazla soğan 8.25 adetle 0.1 mg/l TDZ ve 2 mg/l NAA içeren MS ortamında, *M. adilii*'de ise, en çok soğan 15.75 adet ile 4 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir (76).

S. candida, *S. fischeriana*, *S. clusiana* ve *S. lutea* türlerinden yapılan çalışmada *S.candida*'nın *in vitro* koşullarda olgunlaşmamış embriyolar ve ikili soğan pul yapraklarından yüksek oranda soğancık elde edilmiştir. *S. fischeriana*'nın ikili soğan pul yapraklarından elde edilen en yüksek sonucu 1 mg/l BAP - 0.5mg/l NAA içeren MS besin ortamında, eksplant başına 10 adet soğancık, olgunlaşmamış embriyolarında ise en yükseksonuç 4 mg/l BAP - 1 mg/l NAA içeren MSbesin ortamında eksplant başına 2.9 adet soğancıklar olarak belirtilmiştir. *S. clusiana*'nın ikili soğan pul yapraklarından veolgunlaşmamış embriyolarında ise 2mg/l BAP ve 1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında en yüksek sonuç sırasıyla eksplant başına 2.1 ve 2.2 adet soğancık olarak

elde edilmiştir. *S. lutea*'nın ikili soğan pul yaprakları ise 4 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamından eksplant başına en fazla 15 adet soğancık elde edilmiştir (77).

Merry Widow lale çeşidinde yapılan çalışmada 1 mg/l NAA ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamında gövde eksplantlarından sürgün rejenerasyonu belirlenmiştir (78). Nergisinin *in vitro* çoğaltımında yapılan çalışmada transplantasyon safhaları araştırılmıştır. Alt kültüre alınan sürgünlerin oluşturduğu soğanlar büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamdan elde edilmiştir ve bu çalışmada kullanılmıştır. En yüksek rejenerasyon sonucu aktif karbon içeren ortamda elde edilmiştir. Transplantasyon başarı oranı %47.8 ile %81.2 arasında bildirilmiştir ve çapta çeşide bağlı olduğu tespit edilmiştir (57).

Leucojum aestivum L. ve *Lilium rhodopaeum Delip*'da doku kültürü çalışmalarında; 1 mg/l BAP ve 1mg/l kinetin içeren MS ile 0.5mg/l NAA ve 0.1mg/l kinetin içeren LS besin ortamında en iyi sonuç elde edilmiştir. Eksplant olarak *L. aestivum*'da yapraklar, *L. rhodopaeum*'da ise soğan bazal kısmının en yüksek rejenerasyon kabiliyetine sahip olduğu tespit edilmiştir (79). *Galanthus elwesii* ve *G. ikariae*'da yaptıkları doku kültürü çalışmasında soğan parçaları ve tek yada çift yapraklı soğan pul yaprakların doku kültürü için uygun eksplant olarak belirtilmiştir. *Galanthus* doku kültüründe Gamborg B5 ortamında soğancık oluşumunu arttırdığını ispatlanmıştır. Ayrıca %6 oranında kullanılan sakkaroz ile en yüksek sayıda soğancık elde edilmiştir (80).

Eucomis zambesiaca, *E. comasa*, *E. autumnalis*'da yapılan çalışmada 4.4, 11.1 ve 22.2 µM BA ile 5.4 µM NAA içeren MS ortamlarında çift pulyapraklarından *in vitro* sürgün oluşumu başarılmıştır. Elde edilen sürgünler 0,2.7, 5.4 ve 10.8 µM NAA içeren ortamlarda köklendirmeye alınıp, *Eucomis zambesiaca*'da %95, *E. comasa*'da %98 ve *E. autumnalis*'da %100 başarıyla elde edilmiştir (59). *Bowiea volubilis*'de yaptıkları çalışmada 10 mm uzunluğunda çiçek saplarını kültüre alınarak, 30g/l sukroz, 10g/l agar, 1 mg/l 2.4-D ve BAP içeren MS besin ortamında sürgün ve soğan oluşumu gözlemlenmiştir. Köklenme ise 4-5 hafta içerisinde gerçekleştirilmiştir ve eksplant başına 4.6 adet bitki elde edilmiştir (81).

Zambağın genetik materyal olarak korunması için yapılan çalışmada *in vitro*'da rejenere olan 10 zambak genotipinin soğanlarını 1/4 × MS veya 1 × MS ortamı, %9 veya %6 sukroz içeren ortamlarında 28 ay -2°C ve 25°C de saklayarak filizlenme ve soğancık gelişimi gözlemlenmiştir. En iyi sonuç ise %9 sukroz içeren 1/4 × MS ortamda 25°C de elde edilmiştir

(82). Sarımsak (*Allium sativum L.*)’de yapılan çalışmada doku kültürü için en uygun eksplant olarak gövde disklerinin olduğunu rapor edilmiştir. Ortam olarak iki ortam kullanılmıştır: büyüme düzenleyici içermeyen LS ortamı ve 0.1 mg/l NAA ve 0.1 mg/l BA içeren LS ortamı. Eksplantlar kültüre alındıktan 2 hafta sonra çok sayıda sürgün ucu geliştiği gözlenmiştir. Ayrıca büyüme düzenleyici içermeyen ortamdan, büyüme düzenleyici içeren ortama göre daha fazla sürgün elde edildiği (bir eksplantta 15’den fazla) tespit edilmiştir. Sürgünlerin %90 üstünde bir oranda soğan oluşumu ve rejenerasyon çalışmasından önce soğanların 4°C de yaklaşık 8 hafta ön muamele yapılması suretinde sürgün ve soğan oluşumunun arttığı bildirilmiştir (60).

Crocus sativus L.’da ovaryumeksplantından adventif sürgün rejenerasyonu için enyüksek kallus oluşumu 5.7 µM NAA ve 4.4 µM BAP içeren MS ortamında karanlıkta 20°C de inkübe edildiği zaman elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, eksplant başına 1.5 adet sürgün elde edildiği gözlenmiştir (83). *Narcissus confusus*’da yapılan çalışmada bu bitkinin iki hattının olgunlaşmış tohumlarının alkaloid üretimi kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Hatların olgunlaşmış embriyo eksplantlarında kallus oluşumu, somatik embriyogenesiz ve organogenesiz kapasiteleri incelenmiştir. Alkaloid içeriği HPLC ile belirlenmiştir. Belirli kallusların az miktarda galantamin ürettiği ve galantamin miktarının doku farklılaşmasının derecesiyle arttığı bildirilmiştir. Rejenere olan bütün bitkilerin morfolojik karakterler bakımından normal olduğu saptanmıştır (84).

Lachenalia cinsinin üç varyetesinde yaptıkları in vitro çalışmasında yaprak eksplantlarından sürgünlerin 4- 15°C’ de 2 haftada soğan oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, soğan oluşumu için adventif sürgünlerin yaşının önemli olduğunu gözlenmiştir. 4 mm den küçük sürgünlerin soğan oluşturmadığı ve soğan oluşumu için %3 ile %6 sukroz içeren ortamlar karşılaştırılarak %6’nın daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Soğanların toprakta yaşama şanslarının soğan boyutları ile doğrudan bağlantılı olduğu bildirilmiştir (85).

12 süs bitkisinde yapılan in vitro çalışmasında soğan oluşumu karşılaştırılmıştır. Araştırmacı 9 türde kallus oluşmadan direkt gövde dokusundan, 5 türde ovaryumdan, 4 türde ise yaprak dokusundan bitki gelişimi gözlenmiştir. *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Muscari*, *Ornithogalum* ve *Scilla*’da büyüme düzenleyici eklenmeyen MS ortamına bitkicik oluşumu görülmüştür. *Hippeastrum*, *Schizosylis*, *Sparaxis* ve *Ipheion* türlerinde ise ortama oksin eklenerek sonuç elde edilmiştir. *Freesia*, *Tulipa* ve *Narcissus*’da ise direkt eksplant

üzerinden bitki gelişimi gözlemlenmiştir. *Tulipa* ve *Hippeastrum* dışındaki bitkilerde kallus elde edilmiştir. *Gladiolus*, *Sparaxis* ve *Schizostylis* dışındaki türlerde ise kallustan bitki oluşumu elde edilmiştir (86).

Endemik Iris'te kallus, süspansiyon ve protoplast kültürlerinden somatik embriyogenesis elde edilmiştir. Kallusların alt kültürü için karanlıkta kullanılan ortam 4.5 µM 2,4-D, 0.5 µM Kinetin, 4.5 µM NAA ve 300 mg/l prolin kullanılmıştır. Kullanılan rejenerasyon ortamı BA, Zeatin ve TDZ (sırasıyla; 0, 4, 5, 9 ve 13.5 µM konsantrasyonlarında)'nin 0.49 µM IBA ve 0.45 µM 2,4-D ile kombinasyonu ile hazırlanmıştır. En yüksek embriyogenesis 4.5 µM BA'da elde edilmiştir. Zeatin ve TDZ'nin embriyogenesisde etkisi olmadığı ispatlanmıştır. Ayrıca 0.2 M sukroz, glukoz ve fruktoz ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu görülmüştür. 4.5 µM 2,4-D içeren ortamda 4 hafta içinde süspansiyon kültüründen gelişen hücreler 0.2 M sukroz, 4.5 µM BA içeren ortama transfer edilmiştir ve iyi sonuçlar (3568 embriyo/g hücre) görülmüştür. Bütün çalışma sonucunda gelişen embriyoların % 90'ı köklendikten sonra tam bir bitki haline gelmişlerdir. Üretilen bitkilerin %95'i dış koşullara aktarılmıştır (87).

Soğanlı ve yumru bitkilerde yapılan *in vitro* çalışmalar araştırılmıştır. Besin ortamı olarak en fazla kullanılan ortam MS besin ortamı, büyüme düzenleyicilerin istenen somatik embriyogenesis, organogenesis ve direkt organogenesis BAP, Kinetin, 2,4-D gibi büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının kullanıldığı, 2,4-D'nin daha çok kallus oluşturmada, düşük oksin yüksek sitokin kombinasyonunun sürgün oluşturmada, yüksek oksin düşük sitokin veya sadece oksinin ise köklendirmede kullanıldığı bildirilmiştir (88). *Allium*, *Dichelostemma*, *Eucrosia*, *Gladiolus*, *Haemanthus*, *Hyacinthus*, *Narcissus*, *Nerine* ve *Ornithagalum* cinslerine ait soğanlarla yapılan çalışmada, çiçek, soğan pul yaprakları ve kormlardan alınan apical meristem uçlarının rejenerasyon kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Genel olarak çiçekten alınan eksplantların soğan ve korm eksplantlarından daha başarılı olduğu belirtilmiştir (89).

Narcissus pseudonarcissus "Golden Harvest" çeşidinde yapılan çalışmada yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu ve soğan eksplantlarından somatik embriyo elde edilmiştir. Denemelerde somatik embriyogenesis için yaprak laminası, yaprak tabanı ve soğan pul yaprakları gibi eksplantlar kullanılmıştır. Somatik embriyogenesis için 5 µM 2,4-D ve 0.5 µM 2,4-D veya 5 µM BAP içeren ortamların başarılı olduğu ve çiçek sapı eksplantının diğer eksplantlardan daha erken somatik embriyogenesis oluşturduğu

bildirilmiştir. Ayrıca, yaprak eksplantlarında 2,4-D'nin etkili olduğunu picloramin ise etkisiz olduğunu tespit edilmiştir. Somatik embriyolar 4°C' de 4.9 µM IBA içeren ortamda bitkiciklere dönüştürülmüş ve bu bitkiler ex vitro koşullara aktarılmıştır (90).

Endemik *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker türünde eksplantolarak serada yetiştirilen bitki yaprakları 3 mg/l 2,4-D ve 0.25 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Oluşan kalluslardan gelişen soğancıklar 0.1 mg/l NAA, 170 mg/l NaH₂PO₄ ve 1 g/l aktif karbon içeren MS besin ortamında köklendirmeye alınmıştır. Elde edilen bitkilerin %98'i dış koşullara adapte olduğu gözlemlenmiştir (91). Nepal zambağı (*Lilium nepalense* D. Don) için hızlı çoğaltım protokolü geliştirilmiştir. Eksplant olarak olgunlaşmamış soğanlardan çift soğan pul yapraklı kullanılmıştır ve 20 µM Zeatin içeren MS ortamında sürgünler elde edilmiştir. Köklendirmede ise ½ MS ortamında MS ortamına göre daha iyi sonuç elde edilmiştir (67).

Fritillaria thunbergii' de yapılan çalışmada soğan pul yapraklarından rejenerasyon çalışmasından elde edilen en iyi sonuç olarak 1.62 µM NAA ve 4.65 µM Kinetin içeren MS ortamından (%13,7) elde edilmiştir. Soğanlar kültür sonunda 5 °C de beş hafta bekletilip kompost, vermikulit ve perlit (1:1:1) içeren ortama aktarılmıştır. 10 mm çapındaki soğanların %100 oranında sürgün verdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, rejenerasyon çalışmasına başlamadan önce soğanların 6 hafta 10 °C' de bekletmek rejenerasyonuna olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir (92).

Galanthus ikariae'nin soğan pul yapraklarından *in vitro* adventif soğancık oluşumunda yapılan çalışmada köklendirme ve dış koşullara aktarılması araştırılmıştır. Köklendirme için, soğancıklar farklı konsantrasyonlarda sukroz (30, 60 g/l), aktif kömür (%0.2, 0.5 ve 1.0), NAA (0, 0.01, 0.1 ve 0.5 mg/l) içeren tam, 1/2, 1/4, 1/8 değiştirilmiş Murashige ve Skoog (DMS) ortamlarında kültüre alınmışlardır. Eksplantlar 23°C de 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot da iklim dolabında 16 hafta boyu inkübe edilmiştir. En yüksek köklenme 0.5 mg/l NAA içeren ortamlarında görülmüştür. Dış koşullara aktarmada ise 1/8 DMS, 0.5 mg/l NAA, % 0.5 aktif kömür ve 60 g/l sukroz içeren ortam ile 1/2 DMS, 0.5 NAA, % 0.5 aktif kömür ve 30 g/l sukroz içeren ortamlarda köklendirilmiş soğancıklar direkt olarak veya 8 hafta 4°C' de inkübe edildikten sonra %2 sukroz ve gibberelik asitin (GA3) değişik dozlarını (10 ve 50 mg/l) içeren DMS ortamında 4 hafta inkübe edilip toprağa aktarılmıştır. En yüksek yaşam oranı 1/2 DMS, 0.5 NAA, % 0.5 aktif kömür ve 30

g/l sukroz içeren ortamda köklendirilip direkt toprağa aktarılan soğancıklarda % 28 olarak saptanmıştır (93).

Sternbergia candida ve *S. fischeriana* türlerinin soğan pul yapraklarının *in vitro* hızlı çoğaltımı araştırılmıştır. *S.candida*'da en yüksek soğancık üretimi 4 mg/l BAP ve 0.50 mg/l KNA içeren besin ortamında 2 pul yapraklı soğan eksplantlarında görülmüştür.*S.fischeriana*'da ise en yüksek soğancık oluşumu (% 76.67 ve 2.59 adet) 2 mg/l BAP ve 0.50 mg/l KNA içeren ortamda ve 2 pul yapraklı eksplantlardan elde edilmiştir. Ayrıca *S. candida*'nın olgunlaşmamış zigotik embriyoları 6 mg/l pikloram içeren besin ortamında kültüre alınıp 1.5yılsonunda eksplant başına ortalama 80 adet soğancık üretimi görülmüştür. Üretilen soğancıklar 5 hafta boyu 5°C' da bekletildikten sonra toprağa aktarılmıştır (68).

Göl soğanı bitkisinde yapılan *in vitro* hızlı çoğaltım çalışmasında soğan pul yaprakları ve olgunlaşmamış embriyo eksplantları değişik BAP ve NAA içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. 2 ve 4 pul yapraklı soğan eksplantlarında en fazla soğancık oluşumu 1 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA ile 2 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamında sırasıyla 6.67 ve 5.83 adet olarak bildirilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolarda ise 0.5 mg/l BAP ve 4 mg/l NAA içeren MS besin ortamında en fazla soğancık (2.27 adet olarak) görülmüştür. Elde edilen soğancıklar 1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında köklendirilip, dış koşullara başarılı olarak aktarılmıştır (94).

Sternbergia clusiana'da yapılan çalışmada sterilizasyonaşamasında soğanlar 70% ethanol'de 1 dakika, 1 ml 6.5% NaOCl ile 2-3 damla Tween 80 içeren 100 ml'lik çözeltide 30 dk.karıştırıcıda tutulmuştur ve 3 kez saf sudan geçirilmiştir. Büyüme düzenleyici olarak değişik konsantrasyonlarda IBA (0, 1, 5, 10 ve 20 µM) ve BAP (0, 1, 5, 10 ve 20 µM) kullanılmıştır. Eksplant başına en yüksek soğancık sayısı 0.73 adet olarak tek pul yapraklı eksplantlarda 20 µM BA içeren MS besin ortamında ve 10 µM BA ile 1 µM IBA içeren MS besin ortamı içeren 2 pul yapraklı eksplantlarda elde edilmiştir (95).

Ornithogalum virens bitkisinde eksplant olarak soğan pul yapraklarında kallus oluşumu ve indirekt organogenesis saptanmıştır. Sürgün oluşumu 1 mg/l NAA + 2 mg/l BA içeren ortamda görülmüştür. Kallus kültürü 2 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında elde edilmiştir ve en iyi sürgün rejenerasyonu 2 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren ortamda bildirilmiştir. içine uygun köklendirme MS ortamından elde edilmiştir. Direkt soğancık

oluşumu 1 mg/l NAA, 2 mg/l BA ve 60 g/l sukroz içeren ortamda soğan pul yaprağından elde edilmiştir. Soğan büyüklüğü ise $\frac{1}{2} \times$ MS ortamda ise soğan büyüklüğü arttırılmıştır (96).

Allium porrum bitkisinde yapılan *in vitro* çalışmasında fidelerde sürgün ucu eksplantlarından somatik embriyo oluşumu için modifiye edilmiş B5 besin ortamları araştırılmıştır. Somatik embriyo elde etmek için 2,4-D'nin besin ortamına eklenmesinin gerektiği bildirilmiştir(97). *Fritillaria meleagris* L.' de yapılan doku kültürü çalışmasında eksplant olarak pul yaprağı ve tüm soğancık eksplantlardan *in vitro* koşullarda adventif soğancık oluşumu gözlenmiştir. En yüksek soğancık oluşumu, 1.0 mg/l NAA ve 2.0 mg/l BA içeren MS ortamında bildirilmiştir (98).

Fritillaria ussuriensis türünde, *in vitro* çalışmasından elde edilen yaprakları karanlıkta MS ortamında kültüre alınmıştır ve bir ay içerisinde açık sarı renkli kallus gelişimi gözlenmiştir. 2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l Kinetin ve 500 mg/l kazeinhidrolizat içeren MS ortamında, kalluslar üzerinde somatik embriyoların oluşumu tespit edilmiştir. Oluşan embriyolar 0.5 mg/l Kinetin ve 100 mg/l kazeinhidrolizat bulunduran N6 ortamına aktarılmıştır. Eksplantlar daha sonra 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamına aktarılmıştır ve 2 hafta içerisinde bitkicik oluşumu gözlemlenmiştir (99).

Fritillaria taipaiensis bitkisinde doku kültürü çalışmasında MS ortamına 1 mg/l NAA + 3mg/l BA kullanılan ortamda %93 oranında kallus ve soğancık oluşumu saptanmıştır (100).

Fritillaria' da yapılan bitki doku kültürü çalışmasında, eksplant tipi ve yaşı, kültür ortamı bileşiminin (değişik oksin, sitokinin ve sukroz kombinasyonlarına sahip MS ortamları) mikro çoğaltım üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Soğanlar kuru depolarda +4°C'de 2-4 hafta veya nemli depolarda 10°C'de 4-6 hafta bekletilip sonra soğan pul yaprakları eksplant olarak *in vitro* koşullarda soğancık oluşumu için kullanılmıştır. Boğumlardaki tomurcuklar veya gövde segmentleri pul yapraklarına göre daha iyi soğancık oluşumunu sağlamışlardır. Kinetinin etkinliği ise BA'e göre daha yüksek olarak bildirilmiştir. Optimum Kinetin dozu 1-5 mg/l arasında görünmüştür, bu dozlar eksplant tipine göre farklılık göstermektedir. Genç gövde eksplantların soğancık oluşturma kapasitesi yaşlı segmentlere göre daha iyi sonuç elde edilmiştir. En yüksek çoğalma oranı gövde segmentlerinden elde edilmiştir (101).

Geofitlerde yapılan araştırmada endodormansi, paradormansi ve ekodormansi gibi tüm tip dormansilere sahip oldukları bildirilmiştir. Dormansinin başlama ve devamında absisik asitin, dormansiyi kırdığında ise giberellilerin rolü bilinmektedir. Bazı çalışmalarda etilenin benzer rolünü desteklemektedir. Moleküler düzeyde Geofitlerdeki dormansi mekanizması çok az düzeyde bilinmektedir (102).

Ornithogalum ulophyllum Hent.-Mazz. da yapılan *in vitro* doku kùltürü çalışmasında eksplant olarak iki pul yaprak kullanarak 2 mg /l BAP, 0.5 mg/l NAA and 2 mg /l BAP , 1mg/l NAA içeren MS besin ortamında en iyi sonuç elde edilmiştir. Üretilen soğancıklar 1 mg /l NAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir (103).

Galanthus elwesii Hook. bitkisinde yapılan *in vitro* alışmasında eksplant olarak olgunlaşmamış embriyolar kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu için eksplantlar %80'lik ticari sodyum hipokloritte 20 dk. bekletilip ve üç kez steril saf su ile durulanmıştır. Besin ortamı ise 1-4 mg/l 6- benzilaminopurin (BA) ve 0.5 mg/l α - naftalin asetik asit (NAA) içeren Murashige-Skoog (MS) ortamı kullanılmıştır. En yüksek soğancık oluşumu 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında belirlenmiştir, elde edilen soğancık sayısı eksplant başına 7.7 adet olarak bildirilmiştir (74).

Anemone türlerinde yaptıkları *in vitro* alışmasında anter kùltürü için Nitsch ve Nitsch ortamına aktif kömür eklendiğinde embriyo oluşumunun arttığını rapor etmişler (104).

Muscari azureum bitkisinde yapılan *in vitro* mikro çoğaltım çalışmasında eksplant olarak olgunlaşmamış embriyolar kullanılmıştır. Besin ortamı olarak 400 g/l casein + 40 g/l sucrose + 2 mg/l L-proline, 2 mg/l 2,4-D and 2 g/l gelrite içeren N6 mineral tuzlar ve vitaminli ortam olarak bildirilmiştir. Oluşan kalluslar ise farklı konsantrasyonlarda BAP, KIN, TGB, zeatin, IAA, NAA, 30 g/l sukroz ve 7 g/l agar içeren MS mineral tuzlar ve vitaminli ortama aktarılmıştır. Soğan oluşumu eksplantların kùltüre alındıktan 5-6 ay sonra elde edilmiştir (105).

Safran'da yapılan doku kùltürü çalışmasında korm gelişimi 6 ay kùltüre alındıktan sonra 2mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında bildirilmiştir. Oluşan kormlar ise 5 hafta boyunca 5°C' de tutulduktan sonra toprağa aktarılmıştır (106).

Muscari macrocarpum' de yapılan doku kùltürü çalışmasında 2 pul yapraklı eksplantlar farklı konsantrasyonlar içeren 1,2,4 mg/l Kinetin ve 0.5, 1, 2 mg/l NAA içeren MS

ortamında kültüre alınmıştır. En iyi sonuç ise 2 mg l/1 kinetin + 0.5 mg l/1 NAA ve 1 mg l/1 kinetin + 2 mg l/1 NAA içeren MS ortamında görünmüştür. Eksplantlar başarıyla MS ortamında köklenmiştir (107).*Crocus*, *C. sativus*, *C. cancellatus*, *C. michelsonii* and *C. caspius* üzerinde yapılan Somatik embriyogenesis çalışmasında 4 mg / l NAA, 4 mg / l BA veya 1 mg / L ihtiva eden 2 LS ortamına filiz meristem kültürü kullanılarak mikro çoğaltımı başarılmıştır. Somatik embriyoların gelişmesi için 1mg/l absisik asit içeren ½ MS ortamına transfer edildiği belirlenmiştir (108).

Crocus cancellatus'da yapılan *in vitro* çalışmasında korm oluşumu için kullanılan en iyi ortam % 3 sukroz + 2 mg/1 NAA + 1 mg/1BAP içeren MS ortamı olarak bildirilmiştir. Oluşan kormlar 1 ay boyunca 4°C'de bekletildikten sonra toprağa aktarılmıştır(109).*Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt.,*E. comosa* (Houtt.) Wehrh., and *E. zambesiaca* Bak. üzerinde yapılan doku kültürü çalışmasında 0.0, 4.4, 11.1 ve 22.2 mM BA + 0.0 ve 5.4 mM NAA içeren MS ortamı kullanılmıştır. Sürgün gelişimi 4.4, 11.1 ve 22.2 mM BA + 0.0 ve 5.4 mM NAA içeren MS ortamda gerçekleştirilmiştir. Köklenme ortamı ise 0.0, 2.7, 5.4 ve 10.8 mM NAA içeren MS ortamı olarak bildirilmiştir ve % 95,% 98 ve %100 olarak sırayla *E. autumnalis*, *E.comosa* ve *E. zambesiaca* türlerinde gözlenmiştir (59).

Crocus sativus L.' da yapılan doku kültürü çalışmasında 2,4-D (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 v 8 mg /1) ve BAP (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mg/1)'ın farklı konsantrasyonları incelenmiştir. Tüm muameleler 24±2°C' de karanlıkta bekletilmişlerdir. En iyi sonuç ise 2.0 mg/1 2,4-D + 1.0 mg/1 BAP içeren ortamda bildirilmiştir (110). Safran doku kültürü için protokol geliştirme çalışmalarında somatik embriyogenesis için beş farklı eksplant (tomurcukların terminal veya aksiller,kormların üst ve alt kısımları ve kormların 2 hafta boyunca 4°C'da önmuamele gören terminal gözleri kullanılarak, farklı konsantrasyonda TDZ (0, 0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l) denenmiştir. Sonuç olarak somatik embriyogenesis için TDZ konsantrasyonları arasında önemli herhangi bir etki gözlenmemiştir. TDZ konsantrasyonların arasında embriyogenesis için en etkili sonuç 0.5 mg/l'de gözlenmiştir.Olgun embriyolar ½ MS ortamına aktarılmışlardır (111).

Crocus sativus L. bitkisinde yapılan *in vitro* mikro çoğaltım çalışmasında direkt organogenesis elde edilen meristematik bölgeleri kullanarak üç farklı deneme yapılmıştır. İlk denemede beş farklı sterilizasyon yöntemi araştırılmıştır. İkinci denemede steril edilmiş meristematik bölgeler ½ MS + farklı dozda BAP ortamına aktarılmıştır. Bu

denemeye göre en iyi sonuç MS+6 mg/l BAP ortamında görülmüştür. Üçüncü denemede ise elde edilen kormlar IBA ve IAA içeren MS besin ortamına aktarılmıştır. En iyi sonuç ise MS+1 mg/l IAA ortamında elde edilmiştir. Kök oluşan eksplant başına köklendirme oranı ise (%46.7) ve kök sayısı (1.5 kök / kök oluşan eksplant) 120 gün içinde 2 mg / l IBA içeren MS ortamında elde edilmiştir (112).

Safran (*Crocus sativus* L.) *in vitro* doku kültürü araştırmalarında kallus gelişimi için en iyi ortam olarak 100 mg/l askorbik asit, 0.25 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BAP ve %3 şeker içeren MS besin ortamının olduğunu görünmüştür. Korm ve kök gelişimi için ise 1mg/l IBA içeren ortam en iyi sonuç için bildirilmiştir. %64 köklenme ve %33 korm oluşumu indirekt organogenesiste elde edilmiştir (113).

Safran (*Crocus sativus*) doku kültürü için geliştirilen protokolde apikal tomurcukları, küçük kormlar ve *in vitro*'da gelişen tek sürgünlerden çoklu sürgün elde edilmiştir. Sürgünler (ikili – üçlü) 3 mg/l BA ve 80 g/l sukroz içeren $\frac{1}{2} \times$ MS ortamında geliştirilmişler ve her sürgünden 1.89 korm gelişimi gözlenmiştir. Ayrıca korm gelişimi için sukrozun önemli olduğu ispatlanmıştır. Elde edilen kormlar 12 mg/l IBA, 3 mg/l IBA ve 30 g/l sukroz içeren MS ortamında apikal ve yan tomurcuklarından filizlendirilmiştir (114).

Crocus vernus'da *in vitro* microkorm rejenerasyonu için etkili bir yöntem geliştirilmiştir. 0.5-1.0 cm uzunluğunda dilimlenmiş korm parçaları 0.5, 1.0, 2.0 ya da 4.0 mg/l 2-ip, BA ve kinetin +0.5 ve 1.0 mg/l NAA içeren SH ortamına kültüre alınmışlardır. Sürgün oluşumu için denilmiş 3 farklı sitokininden BA'nın en etkili olduğu görülmüştür. En fazla sürgün oluşumu için BA+ 0.5 mg/l NAA içeren ortamlar uygun olarak tespit edilmiştir. Eksplant başına en yüksek korm oluşumu (6.1 adet) ise 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA + %6.0 (ağırlık/hacim) sukroz içeren SH ortamında gözlenmiştir (115).

2.2. Moleküler Analiz Çalışmaları

Crocus taksonomisi morfolojik özellik ve kromozom sayılarına göre belirlenmiş olmasına rağmen (116), ayırt edici morfolojik özelliklerinin olmamasından dolayı ve sitolojik verilerdeki heterojenlikten dolayı taksonomisi oldukça karışıktır (117). *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew *Crocus* alt türlerine ait morfolojik çalışmalara bakıldığında; (118), yaptığı çalışmada; ikisi endemik olan *Crocus speciosus*'un üç alt türüne (*Crocus speciosus* bieb. subsp. *speciosus*, *Crocus speciosus* bieb. subsp.

ilgazensis mathew, *Crocus speciosus* bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew) ait morfolojik, anatomik ve ekolojik özellikler belirlenmiş ayrıca bu alt türlere ait korm, yaprak, çiçek, meyve ve tohumlarının morfolojik yapılarını fotoğraf ve çizimler ile göstermiştir.

Crocus Ancyrensis (Herbert) Maw (Ankara Çiğdemi) ile *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew' ne ait bazı önemli fenolojik ve morfolojik özellikler ve tohum ve korm çimlendirilmesi yöntemi araştırılmıştır (119). Morfolojik özelliklerin çevresel koşullardan etkilenmesi, incelemeyi yapan araştırmacıya göre farklılık gösterebilmesi, tanımlama kullanılan kriterlerin azlığı gibi nedenlerden dolayı artık taksonomik araştırmalarda kesin sonuç veren DNA temelli molekülerin kullanılması yaygın hale gelmiştir. Dünyada *Crocus* türlerine ait moleküler çalışmalarına bakıldığında; RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)(32,120), AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) (121) ve SSR (Simple Sequence Repeat) (32,33,122) markörlere ait çalışmalar bulunmaktadır.

2.3. Türkiye' de *Crocus* Türlerindeki Moleküler Markör Çalışmalar

Crocus taksonları arasındaki genetik çeşitlilik üzerine yaptığı çalışmada; Anadolu'da yayılış gösteren 19 *Crocus* taksonunu temsil eden 56 genotipte RAPD ve ISSR markörler kullanılarak genetik tanımlama yapmıştır. Analiz sonucu genotipler arası genetik benzerlik oranlarının % 6-52 arasında değiştiği belirtilen çalışmada; morfolojik veriler ile moleküler markör verileri arasında uyum bulunamamıştır. Bu nedenle taksonomik çalışmalarda DNA' ya dayalı moleküler markörlerin ön planda olması gerekliliğini vurgulamıştır (123).

Güneydoğu Anadolu'ya ait *Crocus antalyensis* b.mathew ve bazı alt türlerin genetik çeşitliliği araştırılmasına dayanan başka bir çalışmada ise 22 adet AFLP markörler kullanılmış, bireyler arasında genetik benzerlik oranları %44-69 arasında değişmiştir. Çalışmada *Crocus antalyensis* b. Mathew genotipleri arasındaki ve alt türler arasındaki genetik çeşitliliğin yüksek seviyede olduğu gözlemlenmiştir. *C. antalyensis*'in alt türlerinin akrabası olan *Crocus flavus* haw.subsp. ile genetik olarak farklı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Türkiye' de *C. antalyensi*' in b. Mathew yeni bir alt türü tanımlanmıştır (124).

2.4 Sitolojik Çalışmalar

Çekirdekdeki DNA miktarı bitkinin hücreleri arasında, hem de aynı türün farklı bireyleri arasında değişmeden sabit kalmakta ve bu nedenle türlere özel olmaktadır (36). Türler arasında ise çekirdek DNA içeriği bakımından farklılıklar gözlenmekte olup bu nedenle,

çekirdek DNA içeriği bilgisi taksonomik çalışmalar için son derece önemli bir yer tutmaktadır (125).

Flow sitometri yönteminin genom büyüklüklerini tanımlama çalışmalarında *Crocus* türlerinde kesin sonuç verdiğini açıklamıştır. Yapılan bir çalışmada, triploid *Crocus sativus* ve diploid *C. cartwrightianus* ile *C. thomasii* genotiplerinde flow sitometri sonucunda, *C. cartwrightianus* ile *C. thomasii* düşük düzeyde farklılık bulunurken, *Crocus sativus* ile diğer diploid genotipler arasında da yine düşük düzeyde farklılık bulunmuştur (126).

2.5 MADS-Box Genleriyle İlgili Çalışmalar

Çiçek gelişiminin moleküler ve genetik düzenlemesi için ABC modeli ilk olarak model organizmalar, *Arabidopsis* ve *Antirrhinum*'da geliştirilmiş ve bu bitkilerde çiçek organ dizilişleri açıklanmaya çalışılmıştır. Buna göre A, B ve C'nin her biri bir ya da birden fazla genle ilişkilidir. İlk halkayı oluşturan A sepal gelişimini, 2. halkayı oluşturan A ve B petal oluşumunu, 3. halkayı oluşturan B ve C stamen oluşumunu ve 4. halkayı oluşturan C karpel oluşumunu göstermektedir (46). ABC modeline daha sonra ovul gelişimini ifade eden D ve tüm çiçek organlarının belirtildiği E eklenerek ABCDE modeli oluşturulmuştur (47). *Arabidopsis* ve *Antirrhinum*'da yapılan bu araştırmalarda çiçeklenme başlangıcı ve gelişiminin çeşitli fonksiyonları olan, transkripsiyon faktörlerini (*FLO/LEAFY*, *HB*, *MADS* ve *YABBY*) ve sinyal iletim genlerini (*CLAVATA1*, *CLAVATA3* ve *KAPP*) içeren pek çok ailenin birçok geni tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (48).

Süs bitkilerinde çiçek özelliklerinin (rengi, çiçeklenme başlangıcı ve sonu) iyileştirilmesinde klasik ıslah yöntemlerinin yetersizlikleri, bu türlerde genetik modifikasyonlar için moleküler çalışmaların ön plana çıkmasına sebep oluşturmaktadır. ABC modelinde bu amaçla kullanılan genlerin başında ise MADS-box genleri gelmektedir. MADS-box genleri, çiçek organlarının özelleşmesi, vejetatif büyüme, çiçeklenme süreci ve tohum gelişiminde önemli düzenleyici rol oynamaktadırlar (127). *Arabidopsis*'te çiçeklenme zamanına ilişkin genleri de içine alan MADS-box genleri çiçek promotörü olarak görev alabildiği gibi baskılayıcı olarak da çalışmaktadır (128). MADS-box transkripsiyon faktörlerinden ve çiçek homeotik genlerinden olan APETALA1 (AP1) *Arabidopsis*'te çiçek gelişim düzenleyicileri için oldukça önemlidir (129). Bir diğer MADS-box transkripsiyon faktörü olan ve etkisini çiçek organ yapıları üzerinde gösteren APETALA2 (AP2)'nin aktivitesinin transkripsiyon sonrasında baskılanmasının belirli

miRNA'lar tarafından yapıldığı bilinmektedir. MIR172 üzerinde yapılan ve APETALA2 (AP2) transkripsiyon faktörünü kodlayan çalışmada bu miRNA'nın çiçek meristemi, çiçek organ yapıları ve çiçeklenme zamanının kontrolünde önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir (130,131). İlk çalışılan MADS-box cDNA geni bir orkide çeşidinde gerçekleştirilmiştir (132). Ayrıca mısır, pirinç, buğday, zambak gibi bitkilerde MADS-box genleriyle ilgili bazı araştırmalar yapılmıştır. *Crocus sativus* L.'da ise çiçek gelişimden sorumlu MADS-box genlerinden 3'ü (*CsAP1a*, *CsAP1b* ve *CsAP1c*) klonlanmıştır(49).

Süs bitkilerinde çiçek özelliklerinin (rengi, çiçeklenme başlangıcı ve sonu) iyileştirilmesinde klasik ıslah yöntemlerinin yetersizlikleri, bu türlerde genetik modifikasyonlar için moleküler çalışmaların ön plana çıkmasına sebep oluşturmaktadır.ABC modelinde bu amaçla kullanılan genlerin başında ise MADS-box genleri gelmektedir.MADS-box genleri, çiçek organlarının özelleşmesi, vejetatif büyüme, çiçeklenme süreci ve tohum gelişiminde önemli düzenleyici rol oynamaktadırlar (127).

İlk çalışılan MADS-box cDNA geni bir orkide çeşidinde gerçekleştirilmiştir (132).*Arabidopsis*'te yapılan çalışmada ise, çiçeklenme zamanına ilişkin genleri de içine alan MADS-box genlerinin çiçek promotörü olarak görev alabildiği gibi baskılayıcı olarak da çalışmakta olduğu bildirilmiştir (128). Ayrıca yine *Arabidopsis*'te MADS-box transkripsiyon faktörlerinden ve çiçek homeotik (MADS-box) genlerinden olan APETALA1 (AP1) genlerinin çiçek gelişim düzenleyicileri için oldukça önemli olduğu açıklanmıştır (129). Bir diğer MADS-box transkripsiyon faktörü olan ve etkisini çiçek organ yapıları üzerinde gösteren APETALA2 (AP2)'nin aktivitesinin transkripsiyon sonrasında baskılanmasının belirli miRNA'lar tarafından yapıldığı bilinmektedir (130,131).

Crocus türlerine ait MADS-box genleriyle ilgili çalışmalara bakıldığında; 2004 yılında *Crocus sativus* L.'da çiçek gelişimden sorumlu MADS-box genlerinden 3'ü (*CsAP1a*, *CsAP1b* ve *CsAP1c*) klonlanmıştır(49). Sonraki yıllarda ise; çiçek gelişimi ile ilgili AGAMOUS1 (*CsAG1*) geni (50), B sınıfına ait APETALA3 -like (AP3-like) geni (51), PISTILLATA/GLOBOSA-like (PI/GLO-like) MADS-box genleri (52), safranın yabani ve mutant formlarında ise, E-class SEPALLATA3-like MADS-box genleri (53)klonlanarak karakterize edilmiştir. Ayrıca, MADS-box transkripsiyon faktör proteinlerine ait bazı cDNA'lar klonlanarak karakterize edilmiştir (52).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Crocus türleri içinde kaybolma tehlikesi yüksek olan ve güzel ve gösterişli çiçekleri ile en önemli tür olan *Crocus speciosus* Bieb. türünün Türkiye florasında bulunan üç alt türü *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew alt türlerden *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew endemik ve doğada orta vadeli ve yakın gelecekte tehdit altında olan taksonlar grubuna giren türlerdir. *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew alt türü tehdit altına girebilir (near threatened) diğer alt tür *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew ise tehlike altındaki (endangered) grubunda olup, her iki alttür de Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabında yer almaktadır (24).

Bu çalışmanın amacı, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus*, *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* üzerinde doku kültürü çalışmaları ile *in vitro* hızlı çoğaltım olanaklarının araştırılması, doku kültürleri yolu ile yüksek frekansta ve kısa sürede *in vitro* soğancık üretiminin geliştirilmesi ve türlerin korunmasına yönelik SSR (Simple Sequence Repeats) markörlerle genetik tanısı, türde yürütülecek ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere genom büyüklüğünün flowsitometrik yöntemlerle belirlenmesi ve bazı MADS-box gen bölgelerinin tür içi homolojilerden yararlanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tezin biyoteknoloji alanına katkısı ise ekonomik öneme sahip ve potansiyeli bulunan bitki türlerinin *in vitro* hızlı çoğaltımı, morfolojik ve moleküler karakterizasyonlarının yapılması, tarımsal özelliklerine (çiçek tipi vb) yönelik genetik mekanizmaların açığa çıkarılması ve ıslah amaçlı kullanılmasında (melezlemelerdeki uyuşma oranlarının belirlenmesi vb) genom büyüklüklerinin tanımlanması çeşit geliştirilmesi açısından son derecede önemlidir. Tez kapsamında, farklı bölgelerden toplanan *C. speciosus* Bieb alt tür moleküler olarak DNA seviyesinde tanımlanmış, popülasyonlar arasındaki akrabalık ilişkileri belirlenmiştir. Bu tip çalışmalar doğal kaynakların korunması ve kayıt altına alınması ve kullanılması konusunda birçok kolaylıklar sağlayacaktır. Ayrıca türlerde genom büyüklüklerinin belirlenmesi ve çiçek mekanizmasında yer alan genlerin ifade analizleri türde hem ıslah çalışmalarına hem de süs bitkisi özelliklerinin artırılmasına katkılar sağlayacaktır. Bu çalışmanın sonuçları ileride çeşit geliştirme çalışmalarına da

yardımcı olacaktır ayrıca hem tarımsal hem de genom çalışmaları açısından üstün özellikli çeşit geliştirilmesi bakımından ürüne yönelik bir biyoteknolojik çalışmadır.

Son yıllarda alınan birçok tedbirler sayesinde doğadan bazı tıbbi ve süs bitkileri ile birlikte özellikle çiçek soğanlarının sökülüp ticaretinin yapılması kontrol altına alınmış olsa dahi, endemik olan bazı türlerin doğal yetişme alanlarında korunması ve çoğalmasının sağlanması yanında bu bitkilerin hızlı bir şekilde kültüre alınma ve başarılabilirse doku kültürü teknikleriyle hızlı çoğaltım çalışmalarının da yapılması gerekmektedir. Çalışmada endemik ve tehlike altında olan *Crocus in vitro* hızlı çoğaltım yapılarak genetik materyalin saklanması ve türlerin kültüre alınması ile genetik kaynakların korunması amaçlanmaktadır. Ele alınan türün genetik kimlikleri SSR markörler düzeyinde belirlenerek kayıt altına alınarak bu veriler hem türün korunmasında hemde çeşit geliştirme çalışmalarında hibrit bitki tanısında kullanılabilir. Flow sitometri çalışmaları ile 3 adet *Crocus* türünde belirlenecek genom büyüklükleri kromozom sayılarını dolayısıyla melezleme çalışmalarında uyuma/uyumsuzluk ortaya çıkarırken, diğer sitogenetik çalışmalara ışık tutacaktır. Türler ait çiçeklerde genetik modifikasyon çalışmalarına temel oluşturmak üzere, çiçek gelişiminden rol oynayan MADS-box gen bölgelerinin belirlenmesi ve türler arası ifade analizleri bu genlerin ileride klonlanmasına ve çiçek özellikleri ile ilgili modifikasyonda kullanılmasında büyük öneme sahip olacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1.Doku Kültürü için Bitkisel Materyal Temini

Bu çalışmada materyal olarak *Crocus speciosus* Bieb. türünün *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, Çankırı, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew Sinop ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* Bartın illerinden Ekim-Kasım ve Nisan-Mayıs aylarında alınarak, *C. speciosus* subsp. *ilgazensis*, *C. speciosus* subsp. *xantholaimos* ve *C. speciosus* subsp. *speciosus* alt türlerine ait doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew doğal yayılış gösterdiği alandan görüntü (İPEK. A)



Şekil 4.2. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* Mathew doğal yayılış gösterdiği alandan görüntü (İPEK. A)



Şekil 4.3. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* Mathew doğal yayılış gösterdiği alandan görüntü (İPEK. A)



Şekil 4.4. Bitki materyalinin ayıklanması ve sınıflandırılması (İPEK. A)

4.1.2. Moleküler Çalışmaları için Bitkisel Materyal

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden sağlanan *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis*, *C. speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* ve *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türlerine ait örnekler ayrı ayrı saksılara ekilerek, 3 yapraklı döneminde taze çiçekler alınarak sıvı azot yardımı ile porselen havanlarda ezilmiş ve deney aşamalarına kadar -80°C de muhafaza edilmiştir.

4.2. Yöntem

4.2.1. Doku Kültürü Denemelerinde Besin Ortamı ve Kültür Koşulları

Denemelerde temel besin ortamı olarak MS ortamı (133), (Çizelge 4.1) ve farklı oranlarda büyümeyi düzenleyiciler (oksin ve sitokininler), şekerler, vitaminler ve katılaştırıcılar ilave edildikten sonra besin ortamının pH'ı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.7 ± 0.1 'ye ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C 'de 20dk tutularak steril edilmiştir. Tüm kültürler 21°C ve 15°C 'de beyaz floresan ışığında 10 saat ışık ve 14 saatlik karanlık fotoperiyotta tutulmuştur.

Çizelge 4.1. MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonlar(133)

Ortamda bulunan maddeler		mg/l
Makro besin elementleri	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	KH_2PO_4	170
Mikro besin elementleri	KI	0.83
	H_3BO_3	6.2
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
Vitaminler	Inositol	100
	Nicotinic Acid	0.5
	Pyridoxine-HCl	0.5
	Thiamine-HCl	0.1
	Glycine	2

Çizelge 4.2. Kullanılan büyüme düzenleyicileri, çözücüler ve saklama koşulları(134)

Büyüme Düzenleyicileri Oksinler ve Sitokinler	Çözücü	Saklama koşulları (°C)
Sitokinler		
BAP	1 N NaOH	+ 4
Kinetin	1 N NaOH	0
TDZ	Etanol	+ 4
Zeatin	1 N NaOH	+ 4
Oksinler		
NAA	1 N NaOH	+ 4
2,4-D	Su	+ 4
IBA	EtOH/1N NaOH	0

4.2.2. Eksplant Seçimi ve İzolasyonu

Denemelerde farklı eksplantlar (kormlar, tohumlar, olgunlaşmamış embriyolar) kullanılmıştır. Eksplantlar doğal alanlardan toplandıktan sonra Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne ait deneme tarlasından temin edilmiştir. Bitki materyalinin alınması sırasında kullanılacak olan eksplantın fizyolojik döneminin *in vitro* kültüre uygunluğuna dikkat edilmiştir. Tarladan sökülen kormlarından dormansisini kırmak amacıyla 4°C’de 2 ay kadar bekletilmiştir.

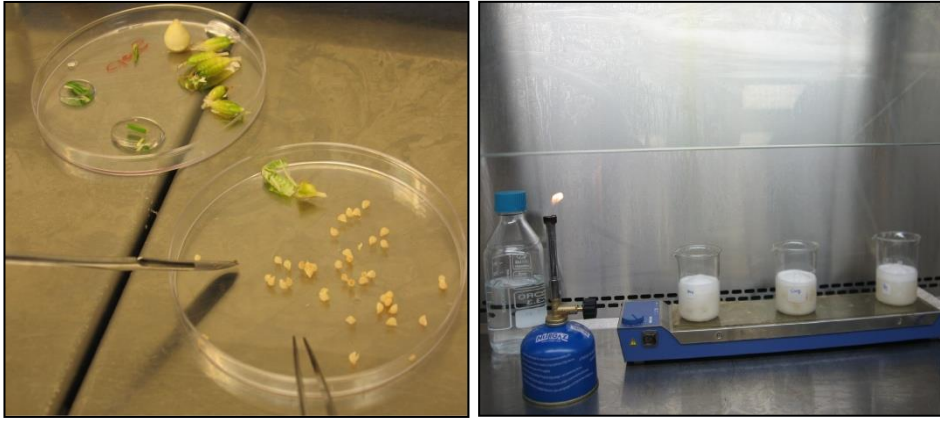
4.2.3. Eksplant Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonunda kullanılan dezenfektanın konsantrasyonu ve sterilizasyon süresi, eksplantın canlılığını ve rejenerasyon kapasitesini önemli derecede etkilemektedir. Geofitlerin özellikle toprak altı organları (soğan pul yaprakları, korm, tuber, rizom) eksplant olarak kullanıldığından, bulaşıklık riski çok yüksektir.

4.2.3.1. Olgunlaşmamış Tohumların Yüzey Sterilizasyonu Yöntemleri

Olgunlaşmamış tohumların yüzey sterilizasyonu için %50'lik H₂O₂ iki farklı sürede denenmiştir.

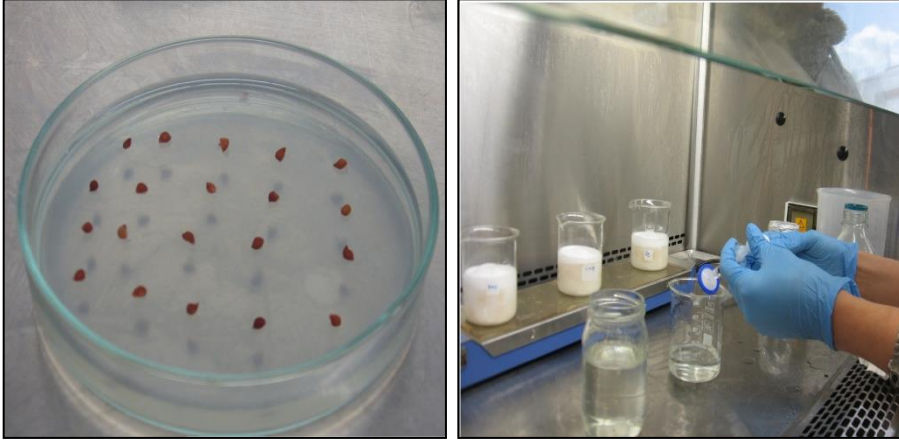
Olgunlaşmamış tohumları içeren meyveler 2dk antibakteriyel sıvı sabun veya bulaşık deterjanı ile yıkandıktan sonra %50'lik H₂O₂ ile 15 ve 30dk süreyle manyetik karıştırıcı yardımı ile steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra steril saf su ile 5dk durulanmış ve 30 dk 50 mg/l Askorbik asit ile manyetik karıştırıcıda sterilizasyona tabi tutulmuştur ve 3×5dk steril saf su ile durulanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Olgunlaşmamış tohumların yüzey sterilizasyonu ve kültüre alınması

4.2.3.2. Olgunlaşmış Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Olgun tohumlar için ise 2dk bulaşık deterjanı ile yıkanıp kurutulduktan sonra 15dk%50'lik H₂O₂ ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulup, daha sonra 3 kez 5'er dk steril saf su ile durulanmıştır. Ortama aktarıldıktan sonraüzzerleri alüminyum folyo ile kapatılmıştır ve 3 ay boyunca 15±1°C'da karanlıkta bekletilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Olgun tohumların yüzey sterilizasyonu ve kültüre alınması

4.2.3.3. Korm Sterilizasyon Yöntemleri

Korm eksplantlarının sterilizasyonu için kullanılan yöntemler aşağıda verilmiştir.

NaClO ile sterilizasyon: kormlar 1 ay $+4^{\circ}\text{C}$ da bekletilmiştir. Alt türlerin dış kabukları soyulduktan sonra deterjan {Gold hand [%15-30(aniyotik ve koruyucu madde)]} ile 2dk yıkadıktan sonra kurutma kağıtında kurutulmuştur. 2dk %96 lık etanolde (50ml) ön sterilizasyonu amacıyla daldırılmıştır. Kormlar %40-100 NaClO(ACE) 30, 45 ve 60 dk sürelerde muamele edilmiştir (150 ml). 3×5 dk steril saf suyla durulanmıştır. İklim dolabı sıcaklığı $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve 10 saat ışık fotoperiyoda inkübe edilmiştir. 0.5-1cm çapında olan kormlar 4'e bölünerek ve 0.5 cm çapından daha küçük olan kormlar tam olarak, her petride 10 eksplant olarak yerleştirilmiştir.

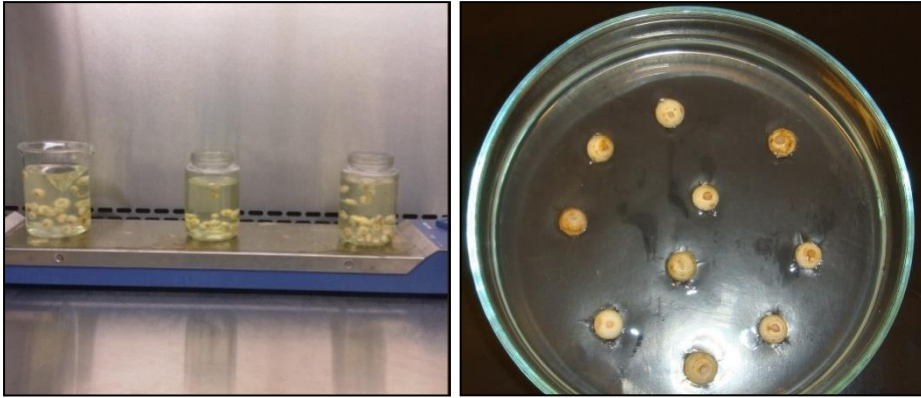
Sıcak su uygulaması: Kormlar 42.5°C ve 45°C sıcaklıktaki suda 10dk bekletilmiştir ve kültüre alınmıştır.

Fungisit uygulaması: Her 3 alt türden 50şer adet korm alınmıştır. Eksplantların dış kabuklar soyulduktan sonra 25 adet korm kuru şekilde fungusit (Can kaptan 50WP) ile karıştırılmıştır, ve 25 adet korm ıslatılarak fungusit ile karıştırılmıştır ve kurutma kağıt üzerinde kuru ve ıslak şeklinde ayrı ayrı 2 ve 3 gün bekletilmiştir. 2.gün ve 3.gün sonunda steril kabin içinde %50 H_2O_2 + 100 μl Twin 20 ile 30dk sterili edildikten sonra, 3×5 dk steril saf suyu ile eksplantlar durulanmıştır. Eksplantlar $\frac{1}{4}$ şeklindekültüre alınmıştır.

H₂O₂ + Twin 20 uygulaması: ¼Kormlar %50 H₂O₂ + 100µl Twin 20 ile 30 dk manyetik karıştırıcıda steril edilip, 30dk askorbik asit 'de 30dk bekletilmiştir ve 3×5dk durulanmış ve kültüre alınmıştır.

H₂O₂+ NaClO uygulanması: Kormların kabukları soyulduktan sonra 2dk bulaşık deterjanı ile yıkanmışlardır ve steril kabin içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 2dk %96'lık etanolla muamele edilmiştir. 5dk steril saf suyu ile çalkalandıktan sonra 15 dk H₂O₂ ile steril edilip 20 dk %90'lık NaClO ile steril edilmiştir. Daha sonra, 3×5 kere steril saf suyu ile durulanmıştır ve kültüre alınmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ uygulaması: Çiçek toprağı sterilizasyonu (2.5 saat 160 °C da) yapılmıştır. Bir ay boyunca +4°C' da bekletilen kormlar temizlenmiştir ve kormlar 20dk Sunlight cif deterjanı ile yıkadıktan sonra kurutulmuştur. Bu kormların steril toprağı aktarılmıştır ve +4°C da 15 gün bekletilmiştir. Kormlar 60 günden sonra dış kabukları soyulmuştur. 2dk bulaşık deterjanı ile yıkanmıştır. Steril kabin içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 2dk %99.5 etil alkole tabi tutulmuştur. 30dk süresi ile %60, %70 ve %80'lık H₂O₂ ile steril edilmiştir. 3×5 kere steril saf su ile durulanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kormların sterilizasyonu ve besin ortamına aktarılması

4.2.3.4. Yaprak Sterilizasyonu Yöntemleri

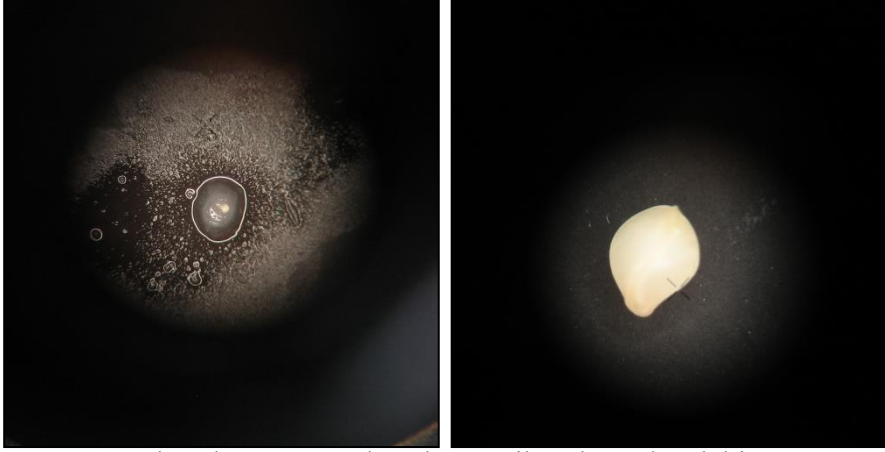
Yaprak eksplantları %50 H₂O₂ kullanarak 15dk steril edip, 3×5 kere steril saf su ile durulanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Yaprak eksplantlarının sterilizasyonu ve besin ortamına alınması

4.3.3. Eksplantların Kültüre Alınması

Çiçeklenme döneminde doğal florasından toplanarak laboratuvara getirilen meyveler ile tarla veya serada yetiştirilen bitkinin çiçeklendiği dönemden hemen sonra, kırmızı renkte ve orta irilikte tohumlar içeren meyveler (tozlaşmadan yaklaşık 18-20 gün sonra) hasat edilerek yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra kültüre alınmıştır. Yüzey sterilizasyona tabi tutulan meyvelerden olgunlaşmamış embriyolar üzerinde araştırma yapmak için tohumların çok küçük olduğu için ayrıca süt aşamasında embriyo ve endosperm karışık oldukları için izole edilmeden tohum şeklinde kullanılmıştır (Şekil 4.9). Farklı oranlardaki büyüme düzenleyici içeren MS ortamında 10 saat aydınlık ve 14 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmışlardır. Her petri kutusuna 10 adet zarar görmemiş tohum kültüre alınmıştır. Eksplantlar 4 haftada bir aynı ortamda alt kültüre alınarak gelişimleri gözlenmiştir. Eksplantlar 2 ay sonra farklı besin ortamlarına aktarılarak +4°C’de yaklaşık 4 ay dormansinin kırılması için bekletilmiştir. Daha sonra 16°C’de çıkarılarak korm gelişimleri gözlenmiştir. Olgunlaşmamış ve olgun tohumların kültürü için temel besin ortamı olarak, MS besin ortamı, %2–6 oranında sukroz ve %0.6’lık agar kullanılmıştır.



Şekil 4.9. Olgunlaşmamış tohumların mikroskop altındaki görüntüsü

Kormlar iseçaplarına göre gruplandırılmış ve gövde çapı 0.5-1.0 cm olan kormlar 4'e bölünerek kültüre alınmıştır. Korm oluşumunu teşvik etmek için MS besin ortamına 2,4-D, casein hydrolysate ve mannitol gibi kimyasallar da ilave edilmiştir.

4.3.4. Korm eksplantlarında fenolik bileşikler ile ilgi çalışmalar

Fenolik bileşiklerin etkisini azaltmak için STS ve aktif kömür içeren ortamlar hazırlanıp, eksplantlar yüzey sterilizasyondan sonra bu ortamlara aktarılmıştır.

4.3.5. Eksplantların Kültüre Alınması

Korm eksplantları yüzey sterilizasyonundan sonra steril kabin içerisinde büyüklüklerine göre ayrılıp, $\frac{1}{4}$ veya tam olarak kullanılmıştır. Tohum eksplantları ise çiçeklenme döneminde doğal florasından toplanarak laboratuvara getirilen meyveler ile tarla veya serada yetiştirilen bitkinin çiçeklendiği dönemden hemen sonra, kırmızı renkte ve orta irilikte tohumlar içeren meyveler (tozlaşmadan yaklaşık 18-20 gün sonra) hasat edilerek yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra kültüre alınmıştır. Olgunlaşmamış ve olgun tohumların kültürü için temel besin ortamı olarak, MS besin ortamı, %2-6 oranında sukroz ve %0.6'lık agar kullanılmıştır.

Korm oluşumunu teşvik etmek için MS besin ortamına 2,4-D ve casein hydrolysate gibi kimyasallar da ilave edilmiştir.

5.3.6. *In vitro*'da Üretilen Kormların Olgunlaştırılması ve Dış Şartlara Alıştırılması

Elde edilen kormlar, 30g/l sukroz + MS + 1.0mg/l IBA + 6.5g/l agariçeren besin ortamında köklendirilecektir. Her magentaya 5 adet korm, olgunlaşmamış tohum veya olgun tohum yerleştirilecektir. Burada köklenen sürgünler daha sonra iklim odasında farklı oranlarda kompost, vermikulit ve perlit karışımı içeren küçük saksılara alınacaktır. Ancak, toprağa aktarılmadan önce soğancıklar 4°C'de 4-6 hafta ön üşütmeye tabi tutulacaktır. Daha sonra, birkaç gün yüksek nemde (% 90) tutularak bitkiciklerin hem şartlara uyumu hem de kök sisteminin gelişmesi beklenecektir. Daha sonra, nem oranı kademeli olarak azaltılacak iklim dolaplarında yüksek nem oranında ve uygun sıcaklıklarda dış şartlara alıştırılacak, sera ve tarlaya dikilecektir.

4.3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Laboratuvar denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Doku kültürü çalışmalarında genel olarak, her muamele içerisinde 10 eksplantın bulunduğu 3 ya da 4 tekerrürlü 10×10 cm'lik petri kutularından, oluşmuştur. Elde edilen verilere (135) tarafından bildirildiği şekilde varyans analizi ve Duncan testi uygulanmıştır. Yüzde değerler istatistiki analizden önce açı değerlerine dönüştürülerek (136) ve tüm istatistiki analizler, “SPSS for Windows” bilgisayar programında yapılmıştır.

4.3.7. SSR Analizleri

4.3.7.1. DNA İzolasyonu

Alt türlere ait DNA izolasyonu için, “DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)” kullanılmıştır. İzolasyon sonrasında elde edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre (ND-1000) ile belirlenmiş ve DNA' lar %1'lik agaroz jelde de görsel olarak kontrol edilmiştir. İzole edilen DNA'lar SSR ve dizi analizleri için kullanılmıştır.

4.3.7.2. SSR Reaksiyonları

4.3.7.2.1. SSR Allel Bölgelerinin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Çoğaltılması

PCR ile SSR bölgelerinin çoğaltılması; 15–200 ng DNA, 5 pmol ileri (forward) primer, 5 pmol floresan işaretlemiş ters (revers) primer, 0.5 mM toplam dNTP, 0.5 ünite Go Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI) (1,5 mM MgCl₂ içermekte), 3 µl buffer (5X Buffer) olmak üzere 10 µl PCR karışımı ile gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı ise:

- 94 °C' de 3 dk,
- 94 °C' de 1 dk
- 48 – 66 °C'de 1 dk (Primerin optimize edilen bağlanma sıcaklığına göre)
- 72 °C' de 2 dk
- 72 °C' de 10 dk (2-4. basamaklar 34 tekrar olmak üzere toplam 35 döngü)

PCR sonrası SSR lokuslarına ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, amplifikasyonu gerçekleşmiş örneklerde kapilleri elektroforez aşaması gerçekleştirilmiştir.

4.3.7.2.2. SSR lokuslarına ait primerler

SSR reaksiyonlarında, ABR1/Cs 8, ABR1/Cs 20, CSMIC25, CSMIC36, CsatAP1/FULb ve CastAP3b olmak üzere toplam 6 SSR primerinin amplifikasyonlarında iyi sonuç alınmış bu nedenle kapiller elektroforezde 3 alt türe ait allel profillerinin belirlenmesinde bu primerler kullanılmıştır. Bu SSR primerlerine ait her ileri (forward) primer D4 (mavi), D3 (yeşil) ve D2 (siyah) renklerde floresan işaretlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. PCR reaksiyonlarında kullanılan SSR primerlerine ait bilgiler

Primerler	İleri dizisi (5'.....3')	Geri dizisi (5'.....3')	Uzunluğu (bp)
ABRII/Cs 8	f: gtgtaatgaatgggatatatggc	r: cctccaactgtgaaataattcc	150–205
ABRII/Cs 20	f: caatctttacatagtgagge	r: gtattctggtcagttcagtg	200–250
CSMIC25	f: gtctccttcgctatctccttga	r: acctcaagaagatcagcaat	134
CSMIC36	f: gctagcagaatcacatgatcca	r: agtgcattcatctcacctctca	292
CsatAP1/FULb	f: gcacaccacaatccaaatctctggt	r: ttcgagaaggtagctggcggttga	173
CastAP3b	f: tctctttatattcccactccactcc	r: cagaggacggtgagctccttggc	209

4.3.7.2.3. PCR Ürünlerinin Kapiller Elektrofrez

Amplifikasyonu gerçekleştiren SSR lokuslarına ait PCR ürünleri işaretlemeye kullanılan floresan boyalar (Proligo, Wellred, Fransa) esas alınarak uygun oranlarda (20µl) SLS (Sample Loading Solution) ile seyreltikten sonra üzerlerine, Genomelab DNA Size Standard Kit-400 (0. 4µl) eklenmiştir. Örnekler için karışımlar CEQ™ 8800 Genetik Analiz Sistemi'nde elektroforez edilmiştir. SSR lokuslarına ait pik büyüklükleri sisteme ait fragment analizi yazılımları ile belirlenerek, her bir lokusa ait pikler; tipleri ve renkleri göz önüne alınarak heterozigot ve homozigot olarak görüntülenmiştir ve araştırmada her bir reaksiyon 3 kez koşturulmuştur.

4.3.7.2.4. Allel Verilerine Ait Genetik Analizler ve Genetik Parametreler

Araştırmada, genetik parametreler olarak; allel sayısı (n), allel frekansı, beklenen (H_e) ve gözlenen heterozigotluk (H_o), tahmin edilen sessiz allel (null) frekansı (r) ve tespit olasılığı (PI) değerleri belirlenmiştir. Beklenen heterozigotluk $1 - \sum p_i^2$ şeklinde hesaplanarak genetik farklılık ölçümü yapılmış, buradaki p_i değeri, çalışılan örnekteki "i" ninci allelin frekansını göstermektedir (137). Gözlenen heterozigotluk ise, heterozigot genotiplerle analiz edilen toplam genotip arasındaki orandır. Null allel varlığının tahmini, $(H_e - H_o)/(1 + H_e)$ şeklinde hesaplanmıştır (Brookfield, 1996). Tespit olasılığı (PI) iki rastgele seçilmiş bireylerin aynı SSR profile sahip olma olasılığını ifade etmektedir (138) ve değer, $\sum p_i^4 + \sum \Sigma (2p_i p_j)^2$ şeklinde hesaplanmış olup, buradaki p_i ve p_j , sırasıyla "i" ve "j" allellerinin frekansını göstermektedir. Sonraki basamak olarak ise, genotipler arası benzerlik indeksleri belirlenerek, genetik ilişki dendogramı oluşturulması olmuştur. İncelenen parametrelere göre SSR analizlerinde kullanılan programlar ise şu şekilde sıralanabilir:

Her lokusa ait allel sayısı, allel frekansı, beklenen ve gözlenen heterozigotluk oranı, sessiz (null) allel frekansı ve tespit olasılığı (PI, Probability of Identity) IDENTITY 1.0 (139)programı ile, benzerlik oranı indeksi: microsat (140) programı ile, dendogram ise UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means) kullanılarak NTSYS (versiyon 2.02g, Exeter Software, Setauket, NY) programı (141) ile belirlenmiştir.

4.3.8. Sitolojik Analizler

Crocus speciosus Bieb.türünün seçilen 3 alt türünde, hücre çekirdeğindeki DNA içeriğini analiz etmek için flow sitometri analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.9. Dizi Analizleri

Her bir safran genine (Çizelge 4.4.) ve üç genin homoloji gösterdiği bölgelere yönelik (Şekil 4.10.) değişik primer kombinasyonları oluşturularak PCR' da çoğaltılmış (Çizelge 4.5.), bu primerlerden CSMBF (*Crocus* 300F; 5'-GCTGAAGCGGATCGAGAACAC-3') ve CSMBR (CR-1R-AY337928; 5'-GGAGTATTCGGACAGCTTGC-3') olarak adlandırılan ve üç alt türde homoloji gösteren bölgelere bağlanan primer çiftinden başarılı sonuçlar alınmıştır. Çalışmada daha sonraki aşamalarında 3 alt türde yürütülen dizileme çalışmalarında bu primer çifti (CSMBF/CSMBR) kullanılmıştır.

Çizelge 4.4. Safran MADS-Box (CsAP1a, CsAP1b ve CsAP1) genlerine ait bilgiler

No	MADS-Box geni	Uzunluk (bç)	Gen bank accession number
1	CsAP1a	1281	AY337928
2	CsAP1b	1164	AY337929
3	CsAP1c	1257	AY337930

gi 33355660 gb AY337928.1	TCCCATAATATCTGGAGAGAGAGACGAAGATTAATTACTTCCTTACTGCA	148
gi 33391152 gb AY337929.1	-----AGAGAGAGAGAGAGAG-----A	86
gi 33355664 gb AY337930.1	-----CCGAGTT---TTCCTTTCTTTCTATT	88
	**	
	İleri primer bölgesi	
gi 33355660 gb AY337928.1	CACAGCGAATCCATCCAGATATGGGCAGAGGACGAGTCCA	198
gi 33391152 gb AY337929.1	GAGAGAGAGATCAGTCAGATATGGGTAGGGGACGAGTGA	136
gi 33355664 gb AY337930.1	TTGGCGA-TTCGATCG--ATGGAAGGGGTAGGTACA	134
	* * * * *	
gi 33355660 gb AY337928.1	ATCGAGAACACGATCAACCGCCAGGTCACCTTCTCCAAGCGCCGCGCGG	248
gi 33391152 gb AY337929.1	ATCGAGAACACGATCAACCGCCAGGTCACCTTCTCGAAGCGCCGCGCGG	186
gi 33355664 gb AY337930.1	ATCGAGAACACATAAACCGACAGGTCACCTTCTCGAAGCGCCGTGGCGG	184
	***** ** ***** ***** ***** * **	
gi 33355660 gb AY337928.1	CCTCCTCAAGAAAGCCAAACGAGATATCCGTA	298
gi 33391152 gb AY337929.1	CCTCCTCAAGAAAGCCAAACGAGATATCCGTA	236
gi 33355664 gb AY337930.1	ACTGCTGAAGAAAGCCAAACGAGATATCCGTA	234
	** ** ***** ***** ***** ** * ** * *	
	Ters primer bölgesi	
gi 33355660 gb AY337928.1	CTTCATCATTTTCTCCACCAAGGCAAGCTGTCCGAATACTCC	348
gi 33391152 gb AY337929.1	CTATCATCATTTTCTCCACCAAGGCAAGCTGTCCGAATACTCC	286
gi 33355664 gb AY337930.1	CACTCATCATTTTCTCCACCAAGGCAAGCTGTCCGAGTACTCC	284
	* ***** ***** ***** ***** ** **	
gi 33355660 gb AY337928.1	GCCAGAATGGAAAGCATTCTTGAGCGCTACGACCGATATTCCTTGCTGA	398
gi 33391152 gb AY337929.1	GCCAGAATGGAAAGCATTCTTGAAACGCTACGATCGATATTCCTTGCTGA	336
gi 33355664 gb AY337930.1	GCGAGAATGGAAACTATTCTTGAAACGCTACGAGCGATATTCCTTGCTGA	334
	** ***** ***** ***** ***** *****	
gi 33355660 gb AY337928.1	GAGGGCGATCGTGGCCCTGATCCTGACTCACAGGAAAGCTGGCGAGATG	448
gi 33391152 gb AY337929.1	GAGAGACATCGTGGCCCTGATCCTGACTCACAGGAAAGCTGGAGAGATG	386
gi 33355664 gb AY337930.1	GAGCGGATTGCACTACCAGAGGCTGAATCACAGGAAAGCTGGCTTAATG	384
	*** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

Şekil 4.10. Safranda bazı MADS-Box genlerinin (CsAP1a, CsAP1b ve CsAP1) dizi çakışmaları (Multiple sequence alignment) ve çalışmada kullanılan ileri CSMBF (*Crocus* 300F; 5'-GCTGAAGCGGATCGAGAACAC-3') ve geri CSMBR (CR-1R -AY337928; 5'-GGAGTATTCGGACAGCTTGC-3') primer bölgeleri

Çizelge 4.5. Safran MADS-Box gen bölgelerine yönelik kullanılan primerler

Primer adı	Genlere yönelik primer dizileri (5'...3')
CR-1F-AY337928	tccagatatgggcagaggac
CR-1R - AY337928	ggagtattcggacagcttgc***
CR-2F -AY337928	tggtctatcgcgaattcaa
CR-2R- AY337928	gctccatacatgaccttgg
CR-1F -AY337929	actgacgccagaatggaaag
CR-1R-	tcttggcactcagcatgtc

AY337929	
CR-2F -AY337929	cctcggatattccagcaaaa
CR-2R- AY337929	atagggcgggaaaagagaga
CR-1F- AY337930	gactgctgaagaaggccaac
CR-1R- AY337930	taagccagcttcctgtgat
CR-2F -AY337930	gtgcaacgatctctggtt
CR-2R- AY337930	aagtcagcttcagcaaaa
Primer adı	Genlerin homoloji gösterdiği bölgelere yönelik primer dizileri(5'..3')
<i>Crocus</i> 128F	cgaccgatattcctctgctg
<i>Crocus</i> 128R	atgagatgcctctgactcgt
<i>Crocus</i> 300F	gctgaagcggatcgagaacac***
<i>Crocus</i> 300R	agcttagctttgagcctacca
Primer adı	MADS-box gen bölgesine yönelik dejenere primer dizisi
MAD150D-F	atcsagatmaaragrathgaa
MADS150D-R	catcttgccagwrytagmraarat

***Gri işaretli iki primerden başarılı sonuçlar alınmıştır.

4.3.9.1. CSMBF/CSMBRPrimerleri ile Çiğdem AP1Gen Bölgesinin PCR'da Çoğaltılması

3 safran geninin homoloji gösterdiği bölgeden dizayn edilen (CSMBF: 5'-GCTGAAGCGGATCGAGAACAC-3' ve CSMBR: 5'-GGAGTATTCGGACAGCTTGC-3') primerlerle çiğdemde 154 bç bölgenin çoğaltılması için PCR koşulları aşağıdaki gibi dizayn edilmiştir.

- 95 °C'de 3 dk
- 94°C'de 1 dk
- 60-65°C'de 1 dk arasında tutulmuştur.
- 72°C'de 1-3 dk
- 72 °C'de 10 dk olarak toplam 35 döngü yapılmıştır.

4.3.9.2. PCR Ürünlerinin Jelde Görüntülenmesi

Elde edilen PCR ürünleri, %1,5 agaroz jel kullanılarak 100V'da yaklaşık 1 saat koşturularak, jeldeki bantlar görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmiştir.

4.3.9.3. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Jel pürifikasyonu için Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kiti kullanılmıştır. Protokol aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

1. 25 µl PCR ürünü %2'lik agaroz jelde 60-90 dk süreyle yürütülmüştür.
2. UV ışını altında istenilen bölge kesilip, ağırlıkları ölçülmüştür.
3. Üzerlerine 1,1 oranında (ağırlık: hacim) Membran Binding Solüsyonu eklenir ve 65 °C 'de eritilmiştir.
4. Klonlar temiz tüpe takılır ve üzerlerine örnekler yüklenip 1 dk bekletilmiştir.
5. 14000 rpm'de, oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj yapılmıştır.
6. Alt solüsyon uzaklaştırılır ve kolonlara 700 µl Membran Wash Solüsyonu eklenmiştir.
7. 14000 rpm'de, oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj yapılır ve alt solüsyon uzaklaştırılmıştır.
8. Membran Wash Solüsyonundan 500 µl eklenir ve 14000 rpm'de, oda sıcaklığında 5 dk. santrifüj yapılmıştır.
9. Kolonlar temiz tüplere takılır ve membrana değmeyecek şekilde kolonun ortasına 25 µl Nuclease Free su eklenip, 1 dk bekletilmiştir.
10. 14000 rpm'de, oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj yapılmıştır.
11. Elde edilen cDNA'ların miktar ve saflığı Nanodrop Spektrofotometrede (ND-1000) ölçülmüştür.

İstenilen miktar ve saflığa sahip pürifiye PCR'ların eldesinden sonra dizi analizi reaksiyonlarına geçilmiştir.

4.3.9.4. Gen bölgelerin dizi analizi

Dizi analizinde Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, (Beckman Coulter) kullanılarak Beckman CEQ 8800 Dizi analizi cihazı ile yapılmıştır. Dizi Analizi PCR protokolü aşağıdaki şekildedir (Çizelge 4.6);

Çizelge 4.6. Dizi Analizi PCR protokolü

Plasmid	5 µl (100-300 ng)
Sekans primeri (1.6 pmol/µL)	2.0 µl
**Sekans Premixi	11 µl
ddH2O	2 µl
Toplam	20.0 µl

**Premix (Dye Terminator Cycle Sequencing Kit)

Sekans için PCR programı ise; 96°C' de 3dk, 96°C'de 20 sn, 55°C 'de 20 sn ve 60°C'de 4 dk olmak üzere toplam 34 döngü olacak şekilde uygulanmıştır.

4.3.9.5. Sekans ürünlerinin temizlenmesi

Sekans ürünleri Agencourt Clean CEQ (Beckman Coulter) kit ile temizlenmiştir. Temizleme protokolü aşağıdaki gibidir;

- PCR'dan alınan örnekler 1500 rpm'de 2dk santrifüj edilmiştir.
- Seal açıldıktan sonra 20µl Agencourt Clean CEQ eklenmiştir.
- %85'lik etanolden 62µl eklenip ve 7-8 kez pipetaj yapılmıştır.
- SPRI plate üzerinde 10 dk üzerine bastırılarak beklenmiştir.
- SPRI plate üzerinde alkol uzaklaştırılmıştır.
- 100µl %85'lik alkolden eklenir. Bu kez 3 dk SPRI plate üzerinde, üzeri bastırılarak beklenilmiştir.
- SPRI plate üzerinde alkol uzaklaştırılmıştır.

- AB Gene Plate SPRI plate üzerinden alınmış ve ters çevrilerek 10 dk. oda koşullarında kurutma gerçekleştirilmiştir.
- 40µl Sample Loading Solution (SLS-Beckman Coulter) eklenmiştir.
- Kuyuların içi iyice temizlenene dek pipetaj yapılarak, örneğin çözünmesi sağlanmıştır.
- Çözünen örnekler AB Gene Plate' ten Beckman sample plate' e aktarılmıştır.
- Dizi analizi işlemi Beckman CEQ 8800 Otomatik Dizi Analizi sisteminde gerçekleştirilmiştir.

Dizi analizi sonucu elde edilen AP1 dizileri gen bankasındaki CsAP1a (1281 bp, GenBank accession number AY337928), CsAP1b (1164 bp, GenBank accession number AY337929) and CsAP1c (1257 bp, GenBank accession number AY337930) safran AP1 homolog genleriyle BLAST düzeyinde karşılaştırılmıştır (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

4.3.10. Real Time PCR Analizleri

4.3.10.1. RNA izolasyonu

Nucleospin RNA plant kit (Macherey Nagel-740949) kullanılmış olup, firmanın direktifleri doğrultusunda her alt türe ait 3' er bitkiden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların saflığı ve miktarı Nanodrop spektrofotometre (ND-1000) ile belirlenmiştir. Ayrıca RNA'lar %1'lik agaroz jelde de görsel olarak kontrol edilmiştir.

4.3.10.2. Total RNA'dan cDNA Sentezi

Real Time PCR'ın ilk aşaması olarak, örneklere ait cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için First Strand cDNA Sentez kiti (Roche, Cat no: 04897030001) kullanılmıştır.

RNA-Primer karışımının hazırlanması aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. RNA-Primer karışımının hazırlanması

İçerik	Hacim
RNA (2000ng)	Değişken
Oligo (dt) Primer (50pmol/µl)	0.5 µl
Su (PCR grade)	Değişken
Toplam	6.5 µl

Karışım, 65°C'de 10 dk denatüre edilip hemen buza alınmış, aşağıda verildiği şekilde hazırlanan Revers Transkripsiyon karışımı eklenerek, belirtilen reaksiyon koşullarında revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Revers transkripsiyon karışımının hazırlanması aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Revers transkripsiyon karışımının hazırlanması

İçerik	Hacim	Reaksiyon Koşulları
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction buffer (5X)	2 µl	65 °C 10 dk 55 °C 30 dk 85 °C 5 dk
RNase Inhibitör (40 ünite/µl)	0.25 µl	
DNTP mix (10 mM)	1 µl	
Transcriptor Reverse Transcriptase Enzimi (20 ünite/µl)	0.25 µl	
Toplam	3.5 µl	

cDNA sentezi sonrası Nanodrop ND-1000 spektrofotometre ile elde edilen cDNA miktarı ölçülerek miktar tayini yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar Real-Time PCR reaksiyonuna kadar -20°C' de saklanmıştır.

4.3.10.3. Real Time PCR Primerlerinin Oluşturulması

Üç safran geninin homolog bölgelerini çoğaltan CSMBF (5'-GCTGAAGCGGATCGAGAACAC-3') ve CSMBR (5'-GGAGTATTCGGACAGCTTGC-3') primerleri ile dizilenen 154 bç bölgeden, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* alt türüne ait 116 bç bölge aşağıda verildiği şekilde Real time PCR primerlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır.

Çizelge 4.10. Çiğdem AP1 için Real Time PCR optimizasyon koşulları (TM 60 °C)

cDNA (2000 ng)	1 µl
CSMBF-qRT (İleri primer) (10 pmol)	1 µl
CSMBR-qRT (Geri primer) (10 pmol)	1 µl
SYBR Green	5 µl
Nükleaz free su	2 µl
Toplam hacim	10 µl

Real Time PCR reaksiyonları her alt türde AP1 ve house keeping genleri için ayrı ayrı koşutularak 3 teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Uygulanan Real Time PCR programı

Program					
Program	Cycles		Analysis Mode		
Pre incubation	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
	None	1	00:10:00	4.8	
Amplification	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	Quantification
95 °C	None	45	00:00:10	4.8	
60 °C	None		00:00:10	2.5	
72 °C	Single		00:00:05	4.8	
Melting	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	Melting Curve
95 °C	None	1	00:00:30		
60 °C	None		00:00:30		
99 °C	Continuoues		-		
Cooling	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
40 °C	None	1	00:00:10	0.11	None

Real Time PCR işlemi sonrasında, house keeping ve hedef gen için, *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis*, *C. speciosus* subsp. *speciosus*, *C. speciosus* subsp. *xantholaimos* alt türlerde pik profilleri belirlenmiştir. Belirlenen pik profillerinden Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR analiz programı absolut kuantifikasyon (absolute quantification) analiz bölümü kullanılarak her alt tür ve gen için Ct (Cycle Threshold) değerleri belirlenmiştir.

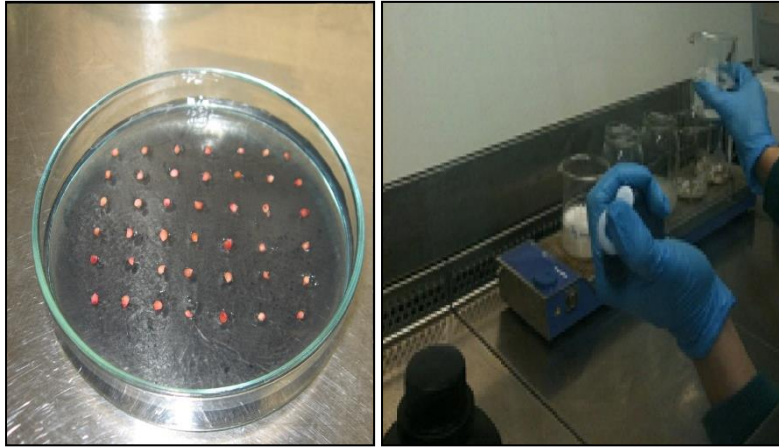
Ayrıca Roche LightCycler® 480 Real Time PCR erime eğrisi (melting curve) analiz bölümü kullanılarak primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan

amplifikasyon ürünlerinin tespiti analizleri gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR reaksiyonları toplamda 40 döngüde tamamlanmıştır. 35 döngünün üzerinde analizle hesaplanan Ct değerleri anlamlı olarak kabul edilmemektedir. Hem house keeping gen hem de hedef gen için program tarafından hesaplanan Ct değerleri 35'in altında bulunmuş ve gen ifadelerinin belirlenen istatistikî döngü sayılarına göre anlamlı olduğu görülmüştür.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos*, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türlerine ait Olgunlaşmamış Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Olgunlaşmamış tohumları içeren meyveler için denenen iki yöntem arasından seçilen yöntem: 2dk. antibakteriyel sıvı sabun veya bulaşık deterjanı ile yıkadıktan sonra %50'lik H₂O₂ ile 15dk süreyle manyetik karıştırıcı yardımı ile steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulup, steril saf su ile 5dk durulanmış ve 30dk 50 mg/l Askorbik asid ile manyetik karıştırıcıda sterilizasyona tabi tutulmuştur. 3×5dk steril saf su ile durulanmış olup,daha sonra steril edilmiş olgunlaşmamış tohumlar petri başına 10'er adet eksplant olarak aşağıda belirtilen ortamlara aktarıldıktan sonra 15±1°C'de 10 saat ışık fotoperiyodunda 4 hafta inkübe edilmiştir. Daha sonra eksplantları içeren petrileri alüminyum folyo ile kapatılmıştır ve 3 ay boyunca karanlıkta 15±1°C'da dormansinin kırılması için bekletilmiştir. (Şekil 5.1)



Şekil 5.1. Olgunlaşmamış tohumların Yüzey Sterilizasyon, Eksplantları içeren petrileri alüminyum folyo ile kapatılarak dormansinin kırılması için bekletilmesi

5.2. Olgun Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

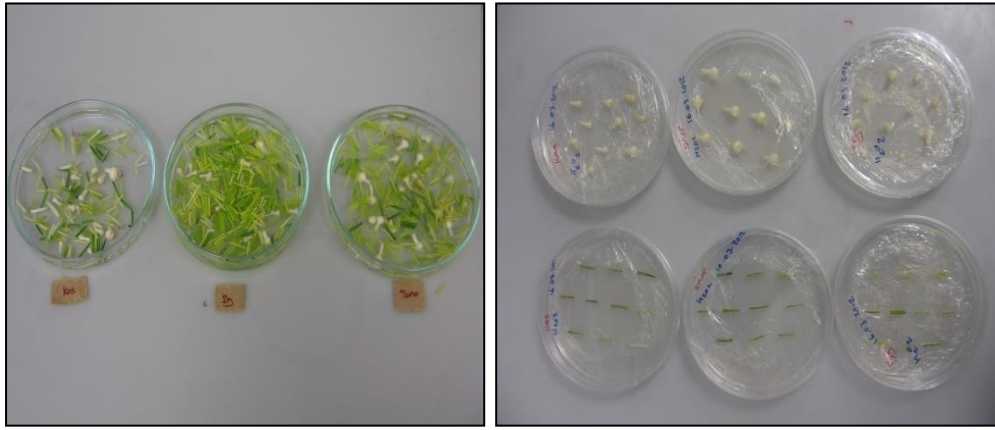
Olgun tohumlar 2 dk. bulaşık deterjanı ile yıkanıp kurutulduktan sonra 15dk. %50'lik H₂O₂ ile manyetik karıştırıcı yardımı ile steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulup, daha sonra 3 kez 5'er dk. steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra steril edilmiş

olgun tohumlar petri başına 10'er adet eksplant olarak aşağıda belirtilen ortamlara aktarıldıktan sonra $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 saat ışık fotoperiyodunda 4 hafta inkübe edilmiştir. Daha sonra eksplantları içeren petrileri alüminyum folyo ile kapatılmıştır ve 3 ay boyunca karanlıkta $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'da dormansinin kırılması için bekletilmiştir.

5.3. Yaprakların Yüzey Sterilizasyonu

5.3.1. %50 H₂O₂ ile Sterilizasyon

Yaprak örnekleri %50 H₂O₂ ile steril edip, 3 kere steril saf su ile durulandıktan MS besin ortamında kültüre alınmıştır.

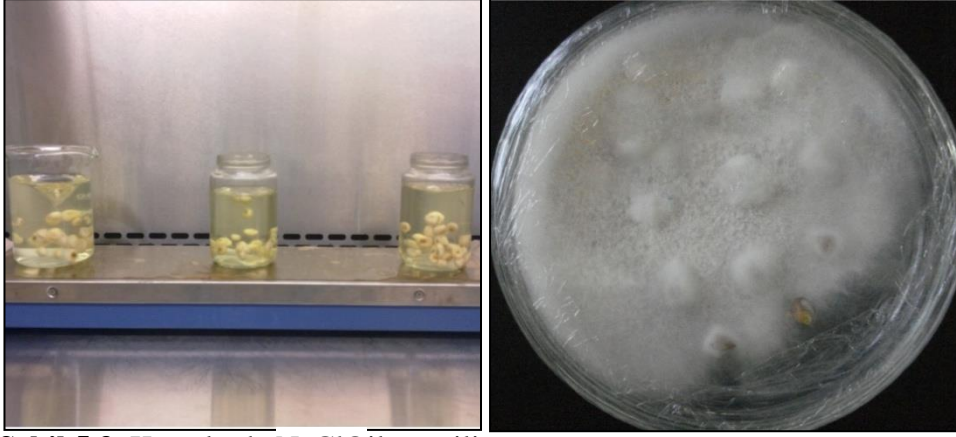


Şekil 5.2. Yaprak sterilizasyonu ve ortama alınması

5.4. Korm Eksplantlarının Sterilizasyon Yöntemleri

5.4.1. NaClO ile sterilizasyon

Yapılan denemede kontaminasyon oranı %100 olarak belirlenmiştir ve bu yöntemin korm eksplantları için uygun olmadığı ispatlanmıştır.



Şekil 5.3. Kormlarda NaClO ile sterilizasyonu

5.4.2. Sıcak Su ile sterilizasyon

Yapılan denemde 42.5°C ve 45°C sıcaklıktaki suda 10dk bekletilen korm eksplantlarında kontaminasyon oranı oldukça yüksek (%100) olarak belirlenmiştir.

5.4.3. Fungusit Uygulaması

Fungusit uygulaması sonucunda kuru ve ıslak şeklinde kullanımında kontaminasyon oranı %100 olarak görülmüştür.

5.4.4. H₂O₂ + Twin 20 ile sterilizasyon

Uygulama sonuçlarına göre kontaminasyon oranı yüksek (>80) ve bu nedenden dolayı bu yöntem uygun bulunmamıştır.

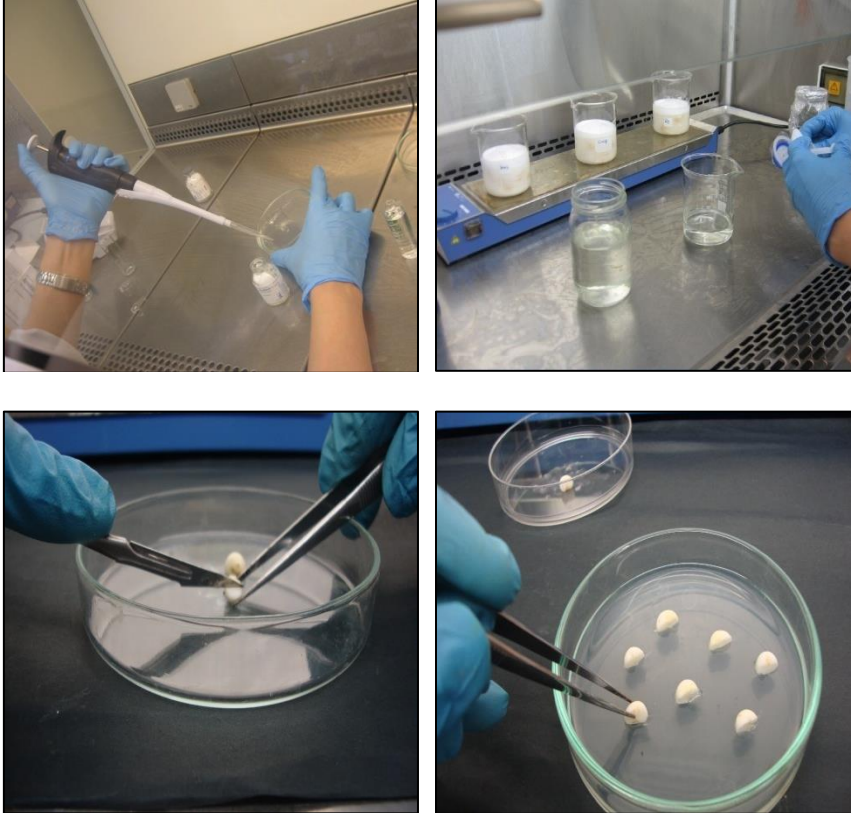
5.4.5. H₂O₂ +NaClO ile sterilizasyon

Uygulama sonuçlarına baktığımızda H₂O₂ +NaClO ile sterilizasyon edilen korm eksplantlarında kontaminasyon oranı yüksek (>85) olduğundan dolayı korm sterilizasyonunda bu yöntem uygun bulunmamıştır.

5.4.6. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ile sterilizasyon

Kormlar steril edilmiş çiçek toprağında(2.5 saat 160 °C da)+4°C' da 60 gün bekletilmiştir. Daha sonra dış pul yaprakları soyulmuştur. 2 dk. bulaşık deterjanı ile yıkanarak steril kabin

içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 30 dk. süresi ile %60, %70 ve %80 'lık H₂O₂ ile steril edilmiştir. 3×5 kere steril saf su ile durulanmıştır. Bu protokol ile steril edilen kormların ortamlarına 600 mg/l bakteriyostatik amoklavın eklenmiştir. kontaminasyon %sini düşürmek için hazırlanan ortamlara 1ml/l PPM eklenmiştir. Kontaminasyon oranlarına 15 gün sonra bakılmıştır. Korm sterilizasyonu için en iyi sonuç (%0) %70 H₂O₂ olarak elde edilmiştir. Ortama aktarıldıktan sonra kormlar 2 hafta +4°C' de bekletilip ve sonra +15°C' da alınmıştır.



Şekil 5.4. Korm sterilizasyonunda H₂O₂ uygulaması

5.5. *In vitro* Mikro çoğaltım

5.5.1. Olgunlaşmamış Tohumlarda *in vitro* Mikro korm rejenerasyonu

Yüzey sterilizasyona tabi tutulan meyvelerden olgunlaşmamış embriyolar üzerinde araştırma yapmak için tohumların çok küçük olduğu için ayrıca süt aşamasında embriyo ve endosperm karışık oldukları için izole edilmeden tohum şeklinde kullanılmıştır. Farklı oranlardaki büyüme düzenleyici içeren MS ortamında 10 saat aydınlık ve 14 saat karanlık fotoperiyotta kültüre alınmışlardır. Her petri kutusuna 10 adet zarar görmemiş

olgunlaşmamış tohum kültüre alınmıştır. Eksplantlar kültüre alındıktan 8 ay sonra yavru korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına yavru korm sayısı belirlenerek istatistiki analiz yapılmıştır. Kullanılan ortamlar ise aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5.1. Farklı ortamların olgunlaşmamış tohumlar üzerinde sürgün veya korm oluşturma etkisinin alt türler arasındaki duncen testi

Ortamlar	<i>C.speciosus</i> subsp. <i>ilgazensis</i>	<i>C.speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	<i>C.speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>
I ^a	13.33d*	3.33d*	10.00b*
II ^b	16.67c	13.33a	13.33a
III ^c	16.67c	6.67c	6.67c
IV ^c	23.33b	10.00b	13.33a
V ^d	40.00a	13.33a	3.33d

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

- I) ^a 30 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri + 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D + 2.2 g/l gelrite
- II) ^b 30 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri + 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D + 6.5 g/l agar
- III) ^c 30 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri + 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D + 1g/l aktif kömür+ 4g /l fitajel
- IV) ^d 30 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 2 mg/l 2,4-D + 600 mg/l Amoklavin + 6.5 g/l agar
- V) ^e 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri +200mg/l kazein + 5mg/l dikamba+ 25 mg/lAskorbik asit + 600 mg/l amoklavin +1gr/l aktif Kömür + 2.2 g/l gelrite

Çizelge 5.1 'da görüldüğü gibi *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türünde olgunlaşmamış tohum eksplantlarında korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı %13.3-40 arasında değişmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı %40 olarak 200 mg/l kazein ve 5 mg/l dikamba içeren gelrite ortamında, *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* ve *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türlerinde ise korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı %3.3-13.3

arasında değişmiştir. *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünde en yüksek rejenerasyon oranı %13.3 olarak 200mg/l kazein ve 5 mg/l dikamba içeren gelrite ortamı ve 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D içeren agar ortamında, *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünde ise en yüksek rejenerasyon oranı %13.3 olarak 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D içeren agar ortamı ve 5 mg/l STS + 2 mg/l 2,4-D içeren agar ortamında elde edilmiştir. En düşük rejenerasyon oranı ise *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* ve *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türlerinde sırayla %13.3 ve %3.3 olarak, 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D içeren gelrite ortamında, *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünde ise %3.3 olarak 200mg/l kazein ve 5 mg/l dikamba içeren gelrite ortamında elde edilmiştir.



Şekil 5.5. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan (a) 8 hafta sonra (b) 16 hafta sonra (c) 24 hafta sonra üzerinde sürgün oluşumu

Diğer bir denemede ise 5 mg/l STS, 25 mg/l Askorbik asit, 200mg/l yeast vefarklı konsantrasyonlarda BAP (1.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/l) ve NAA (0.0, 0.5, 1.0 mg/l) içeren ½ MS ortamı kullanılmıştır. Eksplantlar kültüre alındıktan 8 ay sonra yavru korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına yavru korm sayısı belirlenerek istatistiki analiz yapılmıştır. Kullanılan ortamlar ise;

- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA

- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 7.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 7.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 7.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA

Çizelge 5.2. *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türde 8 ay sonra Kallus veya sürgün oluşumu % ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)

BAP	NAA	Korm ve/veya sürgün oluşumu (%)	Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu (ortalama)
1.0	0.0	70.00c*	0.70
1.0	0.5	86.67b	0.86
1.0	1.0	73.33c	0.73
3.0	0.0	86.67b	0.53
3.0	0.5	53.33d	0.93
3.0	1.0	93.33a	0.20
5.0	0.0	20.00h	0.23
5.0	0.5	23.33g	0.23
5.0	1.0	23.33g	0.23
7.0	0.0	16.67i	0.16
7.0	0.5	40.00e	0.40
7.0	1.0	30.00f	0.30

* Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Çizelge 5.2' de görüldüğü gibi *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türünde korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı %16.67-93.3 arasında değişmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı %93.33 olarak 3.0mg/l BAP ve 1.0 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilirken, en düşük rejenerasyon oranı %16.67 olarak 7.0 mg/l BAP ve 0.0mg/l NAA içeren ortamda elde edilmiştir. Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 5.3. *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türde 8 ay sonra kallus veya sürgün oluşumu % ve eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)

BAP	NAA	Kallus ve/veya sürgün oluşumu (%)	Eksplant başına kallus ve/veya sürgün(ortalama)
1.0	0.0	53.33a*	0.53
1.0	0.5	30.00c	0.30
1.0	1.0	53.33a	0.53
3.0	0.0	13.33e	0.13
3.0	0.5	10.00f	0.10
3.0	1.0	50.00b	0.53
5.0	0.0	10.00f	0.23
5.0	0.5	6.67g	0.07
5.0	1.0	16.67e	0.17
7.0	0.0	26.67d	0.27
7.0	0.5	0.00h	0.0
7.0	1.0	0.00h	0.0

* Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

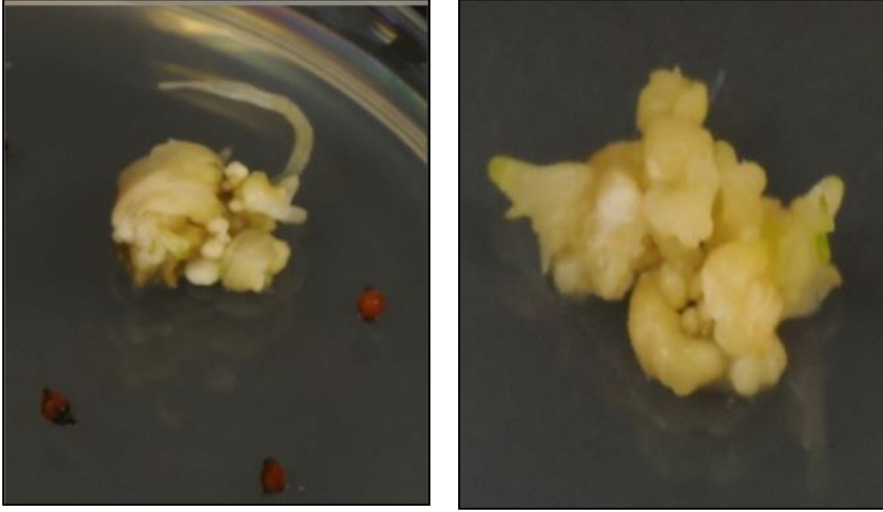
Çizelge 5.3' de görüldüğü gibi *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünde korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı %0-53.3 arasında değişmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı %53.33 olarak 1.0mg/l BAP + (0.0 ve 1.0) mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilirken, en düşük rejenerasyon oranı %0.0 olarak 7.0 mg/l BAP + (0.5 ve 1.0) mg/l NAA içeren ortamlarda elde edilmiştir. Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 5.4. *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türde 8 ay sonra Kallus veya sürgün oluşumu % ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)

BAP	NAA	Kallus ve/veya sürgün oluşumu %	Eksplant başına kallus ve/veya sürgün(ortalama)
1.0	0.0	40.00c*	0.40
1.0	0.5	40.00c	0.50
1.0	1.0	46.67b	0.47
3.0	0.0	43.33c	0.43
3.0	0.5	50.00a	0.53
3.0	1.0	50.00a	0.57
5.0	0.0	6.67f	0.07
5.0	0.5	6.67f	0.30
5.0	1.0	26.67d	0.17
7.0	0.0	16.67e	0.7
7.0	0.5	6.67f	0.07
7.0	1.0	23.33d	0.23

* Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

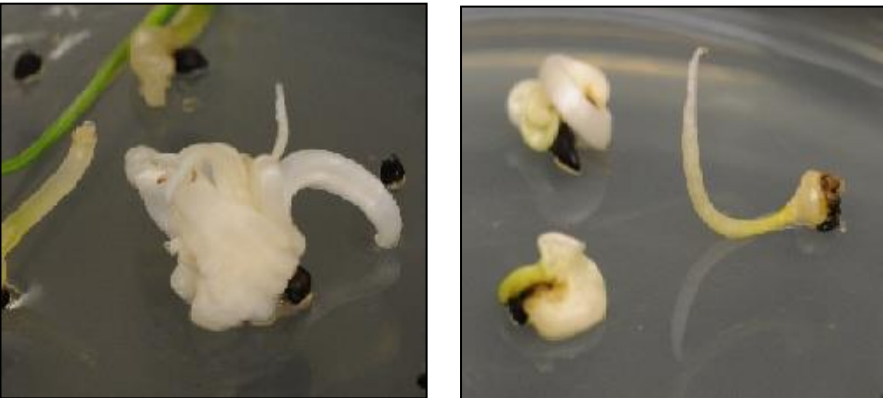
Çizelge 5.4' de görüldüğü gibi *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünde korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı %0-50 arasında değişmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı %50.0 olarak 3.0mg/l BAP + (0.5 ve 1.0) mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilirken, en düşük rejenerasyon oranı %0.0 olarak 5.0 mg/l BAP + (0.0 ve 0.5) mg/l NAA içeren ortamlarda elde edilmiştir. Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur.



Şekil 5.6. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan 2 ay sonra korm ve sürgün oluşumu



Şekil 5.7. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan 4 ay sonra korm ve sürgün oluşumu



Şekil 5.8. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan 6-8 ay sonra korm ve sürgün oluşumu



Şekil 5.9. Olgunlaşmamış tohumların kültüre alındıktan 8 ay sonra oluşan kormların köklenmesi

5.5.2. Korm bileşiklerin ($AgNO_3^-$, Aktif Kömür ve Gelrite) *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos*, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* altürlerine ait kormlardan *in vitro* yavru korm rejenerasyonu üzerine etkileri

Bilindiği gibi etilen meyvenin olgunlaşmasına yardımcı olan ve meyvelerin dokularında, kök, yaşlı yapraklarda ve çiçeklerde bulunan bitkisel hormondur. Salgılandığı bölgede etkili olup, bitkilere adventif sürgün rejenerasyonunu olumsuz etkilemektedir. Besin ortamlarında karşılaşılan problemlerden biri de, besi ortamının bir süre sonra kararması ve bitkilerin sararak ölümüdür. Besin ortamında etilen gazının fizyolojik aktivitesini engelleyen eden gümüş nitrat ($AgNO_3$) kullanılması doku kültürü çalışmalarında tavsiye edilmektedir. Ayrıca aktif kömürün toksik metabolitleri adsorbe ettiği ve eksplant kararmasını azalttığı bilinmektedir. Bu nedenle *Crocus* alt türlerinde rejenerasyon kapasitesini artırarak *in vitro* mikro korm üretimi artırmak amacı ile her üç alt türe ait kormlar çaplarına göre gruplandırılmış ve gövde çapı 0.5-1.0 cm olan kormlar, +4 °C’de 2 ay süreyle ön soğuk muamelesine tabi tutulmuştur. Yüze sterilizasyonundan sonra, kormlar dikey olarak 4’e bölünerek 16 °C’de aşağıdaki besin ortamlarında kültüre alınmıştır;

I) MS mineralleri ve vitaminleri, 30 g/L sukroz, 2 g/L gelrite (MSO)

II) MS mineralleri ve vitaminleri, 5mg/L $AgNO_3$, 30 g/L sukroz, 2 g/L gelrite ($AgNO_3^-$)

III) MS mineralleri ve vitaminleri, 5mg/L AgNO₃, 30 g/L sukroz, 1 g/L aktif kömür, 2 g/L gelrite (AgNO₃⁻+Aktif Kömür).

Çizelge 5.5. STS ve Aktif kömürün fenolik bileşiklerin azaltması ve yavru korm ve/veya sürgün oluşumu üzerinde etkisi

Türler	Yavru korm ve/veya sürgün oluşumu (%)		
	MS ortamı	STS içeren MS ortamı	STS + Aktif kömür içeren MS ortamı
<i>C.speciosus</i> subsp. <i>ilgazensis</i>	13.3c*	3.3c*	3.3b*
<i>C.speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	16.7b	6.7b	3.3b
<i>Crocusspeciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	46.7a	40.0a	36.7a

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Çizelge 5.5’de görüldüğü gibi *C.speciosus* subsp. *ilgazensis*, *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* ve *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türlerinde en yüksek yavru korm ve/veya sürgün oluşum oranı sırayla %13.3, %16.7 ve %46.7 olarak MS ortamında, görülmüştür. Her üç alt türde de STS ve aktif kömür içeren besin ortamlarının yavru korm ve/veya sürgün oluşumunda etkili olduğu söylenemez. Bu bileşiklerin kormların karararak ölmesini önlemekte, ancak rejenerasyonu olumlu etkilemediği düşünülmektedir.

5.5.3. Farklı konsantrasyonda BAP ve NAA içeren besin ortamlarının *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos*, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* altürlerine ait ¼ kormlardan in vitro korm rejenerasyonu üzerine etkileri

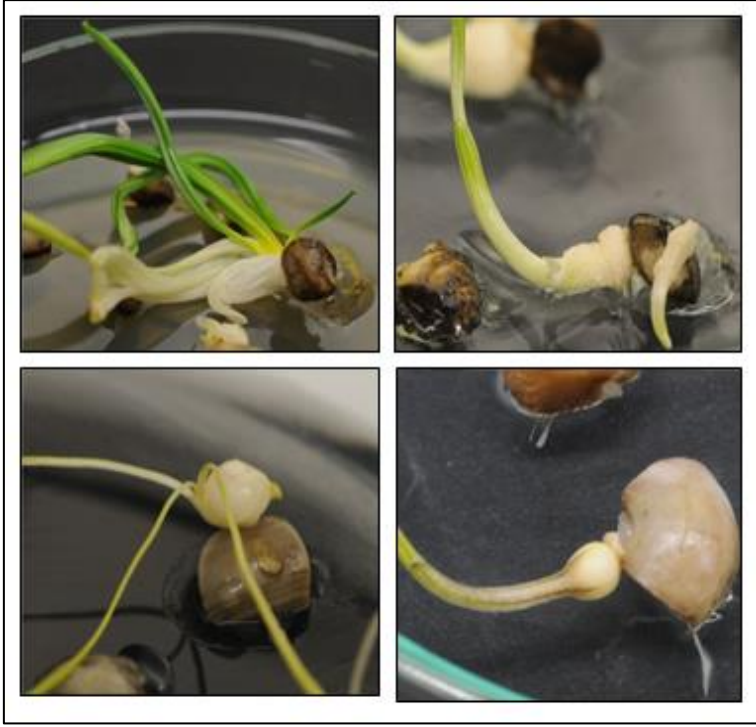
Eksplantlar yüzey sterilizasyonda sonra kormlar 4’e bölünerek farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS besin ortamına aktarılmıştır. Kullanılan ortamlar ise;

- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA

- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asid + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA



Şekil 5.10. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 2 ay sonra korm eksplantları üzerinde sürgün veya korm oluşumu



Şekil 5.11. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren 1/2 MS ortamların 4 ay sonra korm eksplantları üzerinde sürgün veya korm oluşumu



Şekil 5.12. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren 1/2 MS ortamların 8 ay sonra korm eksplantları üzerinde sürgün veya korm oluşumu

Çizelge 5.6. *C. speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türde farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün ve/veya korm oluşturma etkisi

BAP	NAA	Kallus ve/veya sürgün oluşümü %	Eksplant başına kallus ve/veya sürgün (ortalama)
1.0	0.0	36.67d*	0.37
1.0	0.5	70.00a	1.33
1.0	1.0	63.33b	0.90
3.0	0.0	33.33e	0.37
3.0	0.5	23.33f	0.50
3.0	1.0	56.67c	0.57
5.0	0.0	33.33e	0.37
5.0	0.5	0.00g	0.0
5.0	1.0	0.00g	0.0

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Çizelge 5.6'da görüldüğü gibi *C. speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türünde korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı %0-70 arasında değişmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı %70 olarak 1.0mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren besin ortamında saptanırken, en düşük rejenerasyon %0.0 olarak 5.0 mg/l BAP + (0.5 ve 1.0 mg/l) NAA içeren ortamlarda görülmüştür. Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 5.7. *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türde farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün ve/veya korm oluşturma etkisi

BAP	NAA	Kallus ve/veya sürgün oluşümü (%)	Eksplant başına kallus ve/veya sürgün(ortalama)
1.0	0.0	30.00b*	0.30
1.0	0.5	23.33c	0.23
1.0	1.0	3.33f	0.03
3.0	0.0	3.33f	0.03
3.0	0.5	43.33a	0.80
3.0	1.0	6.67e	0.06
5.0	0.0	0.00g	0.0
5.0	0.5	26.67c	0.30
5.0	1.0	20.00d	0.23

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Çizelge 5.7’de görüldüğü gibi *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünde korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı %0-43.3 arasında değişmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı %43.3 olarak 3.0mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren besin ortamında saptanırken, en düşük rejenerasyon %0.0 olarak 5.0 mg/l BAP ve 0.0 mg/l NAA içeren ortamda görülmüştür. Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 5.8. *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türde farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün ve/veya korm oluşturma etkisi

BAP	NAA	Kallus ve/veya sürgün oluşümü %	Eksplant başına kallus ve/veya sürgün(ortalama)
1.0	0.0	20.00d*	0.27
1.0	0.5	33.33b	0.53
1.0	1.0	40.00a	0.67
3.0	0.0	13.33f	0.33
3.0	0.5	10.00g	0.13
3.0	1.0	33.33c	0.60
5.0	0.0	23.33e	0.37
5.0	0.5	10.00g	0.10
5.0	1.0	26.67d	0.40

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Çizelge 5.8’ de görüldüğü gibi *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünde korm ve/veya sürgün oluşturan eksplant oranı %10-40 arasında değişmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı %40.0 olarak 1.0mg/l BAP ve 1.0 mg/l NAA içeren besin ortamında saptanırken, en düşük rejenerasyon %10.0 olarak (3.0 ve 5.0) mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren ortamlarda görülmüştür. Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur.

Korm eksplantlarının rejenerasyon çalışmalarının devamında üç farklı ortam denenmiştir ve eksplantlar kültüre alındıktan 4 ay sonra, gelişen yavru korm ve/veya sürgü sayısı (%) belirlenmiştir. Kullanılan ortamlar ise;

- I) MS+ 6.5mg/l agar (S0)
- II) 30 g/l sukroz+ 1/2 × MS+ 25 mg/l Askorbik asid+ 600 mg/l amoklavın + 2.2 gelrit (1/2 MS)
- III) 30 g/l sukroz+ 1/2 × MS+ 25 mg/l Askorbik asid+ 600 mg/l amoklavın + 1g/l Aktif kömür+2.2 gelrit (1/2 MS+ Aktif kömür)

Çizelge 5.9. *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türde 1/2 MS^{1/2}, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ay sonra korm ve/veya sürgün gelişimi (%) ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)

Ortamlar	Yavru korm veya sürgün oluşumu	Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu (ortalama)
1/2 MS	100.0	1.60a*
1/2 MS+ aktif kömür	100.0	1.43a
S0	100.0	0.2b

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Çizelge 5.9' da görüldüğü gibi *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türünde 1/2 MS^{1/2}, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ay sonra korm veya sürgün gelişimi %100 olarak saptanmıştır. Eksplant başına en yüksek korm ve/veya sürgün sayısı (1.6) 1/2 MS ortamında elde saptanırken, bunu 1/2 MS+ Aktif kömür içeren ortam (1.43) ve S0 ortamı (0.2) izlemiştir.

Çizelge 5.10. *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türde ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ay sonra korm ve/veya sürgün gelişimi (%) ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)

Ortamlar	Yavru korm veya sürgün oluşumu	Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu (ortalama)
½ MS	100.0	2.20a*
½ MS+ aktif kömür	100.0	1.73a
S0	100.0	0.53b

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Çizelge 5.10' da görüldüğü gibi *C.speciosus* subsp. *speciosus* alt türünde ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ay sonra korm veya sürgün gelişimi %100 olarak saptanmıştır. Eksplant başına en yüksek korm ve/veya sürgün sayısı (2.2) ½ MS ortamında elde saptanırken, bunu ½ MS+ Aktif kömür içeren ortam (1.73) ve S0 ortamı (0.53) izlemiştir.

Çizelge 5.11. *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türde ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ay sonra korm ve/veya sürgün gelişimi (%) ve Eksplant başına kallus veya sürgün(ortalama)

Ortamlar	Yavru korm veya sürgün oluşumu	Eksplant başına korm ve/veya sürgün oluşumu (ortalama)
½ MS	53.3	2.27a*
½ MS+ aktif kömür	40.0	2.27a
S0	100.0	1.10b

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.05 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Çizelge 5.11’ de görüldüğü gibi *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünde S0 ortamında %100 olarak saptanırken, sırasıyla bunu %53.3 ile $\frac{1}{2}$ MS ortamı ve %40 $\frac{1}{2}$ MS+ aktif kömür ortamı izlemiştir. Eksplant başına en yüksek korm ve/veya sürgün sayısı (2.27) $\frac{1}{2}$ MS ve $\frac{1}{2}$ MS+ Aktif kömür içeren ortamlarda saptanırken bunu S0 ortamı (1.1) izlemiştir.



Şekil 5.13. $\frac{1}{2}$ MS $\frac{1}{2}$, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 2 ay sonra kallus veya sürgün gelişimi



Şekil 5.14. ½ MS½, MS+ aktif kömür ve S0 ortamında 4 ve 8 ay sonra kallus veya sürgün gelişimi

Diğer bir denemede ise farklı konsantrasyonlarda sitokinin içeren MS besin ortamında korm üzerinde yavru korm ve/veya sürgün oluşturma etkisi incelenmiştir. Kullanılan ortamlar ise;

- 40 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri +100 mg/l kazein + 600 mg/l amoklavin +2 mg/l 2,4-D + 1mg/l PPM+ 6.5 g/l gelrite + (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) BAP
- 40 g/l sukroz + 4.3 g/l MS mineralleri ve vitaminleri +100 mg/l kazein + 600 mg/l amoklavin +2 mg/l 2,4-D + 1ml/l PPM+ 6.5 g/l gelrite + (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) kin

- 40 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri +100 mg/l kazein + 600 mg/l amoklavın +2 mg/l 2,4-D + 1ml/l PPM+ 6.5 g/l gelrite + (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l) Zeatin
- 40 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri +100 mg/l kazein + 600 mg/l amoklavın +2 mg/l 2,4-D + 1ml/l PPM+ 6.5 g/l gelrite + (0.05, 0.1, 0.25, 0.50 mg/l) TDz

Her üç alt türe kormlar yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra üç alt türe ait 0.5-1.0 cm çapındaki kormların, 4'e bölünmüş korm eksplantları 2 mg/L 2,4-D, 1000 mg/L kazein, 40 g/L sukroz, ve katılaştırıcı olarak da 7.5 g/L agar ve farklı sitokinin tipleri (BAP, KIN, Zeatin ve TDZ) içeren Sürgün ve Korm Teşvik Ortamı (SKTO) MS besin ortamında 16 °C'de 4 tekerrürlü olarak kültüre alınmıştır. Bu arada aynı deneme 0.5-1.0 cm çapına sahip tam kormlarda ise aynı besin ortamlarında denemeler yapılmaya başlanış, ancak, için yeteri kadar korm temin edilemediği için deneme tamamlanamadığından, sonuçlar sunulmamıştır.

0.5-1.0 cm çapındaki sağlıklı ve canlı kormlarının dikey dörde bölünmesiyle yukarıdaki besin ortamlarında kültüre alınan kormlarda, 4-8 hafta içinde tepe sürgünlerinin geliştiği ve korm yüzeyindeki bazı gözlerden sürgün gelişiminin başladığı görülmüştür. Ancak tüm besin ortamlarda kültür süresi uzadıkça ya da kültürlerin yeni besin ortamlara aktarılması sırasında meydana gelebilecek kontaminasyonlar görülmüş, bazı ortamlara ait denemeler tekrarlamak zorunda kalmıştır. Bu ortamlarda canlı kalan eksplantlarda kültüre alındıktan 22 hafta sonra yavru korm oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına yavru korm sayısı belirlenerek istatistiki analiz yapılmıştır. BAP, KIN, TDZ ve ZEATİN içeren bütün besin ortamlarında korm eksplantlarında kültüre alındıktan yaklaşık 10-12 hafta sonra yapılan gözlemlerde, her üç alt türünde kormların kesim bölgelerinde çok düşük düzeyde kallus oluşturduğu gözlemlenmiştir. Kültür başlangıcından sonra 16-20 haftalık dönemde, her üç türde de canlılık oranları ile yavru korm oluşturan eksplant oranları büyük ölçüde paralellik göstermiştir. Bir başka deyişle, canlı kalan korm parçalarının tamamına yakınının yavru korm oluşturduğu görülmüştür. Farklı sitokinin tipleri içeren besin ortamlarının korm eksplantlarında *in vitro* yavru korm üretimi üzerine etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçlarına göre, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis*, *Crocus*

speciosus Bieb. subsp.*speciosus* ve *Crocus speciosus* Bieb. subsp.*xantholaimos* alt türlerinde yavru korm oluşturan eksplant oranı (%) ve ekplant başına ortalama yavru korm sayısı (sadece korm oluşturanlar içinde) üzerine besin ortamlarının etkisi 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çizelge 5.12’de görüldüğü gibi, *Crocus speciosus* Bieb. subsp.*ilgazensis* alt türünde en yüksek embriyonik kallus ya da direk yavru korm oluşturan eksplant oranı (% 85) 2.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamında saptanırken, sırasıyla bunu % 65 ile 1 mg/L Zeatin ve 1 mg/L Kinetin içeren MS besin ortamı izlemiştir. En yüksek eksplant başına yavru korm sayısına (1.32 adet) 2 mg/L BAP içeren MS besin ortamında ulaşıırken, özellikle uygulanan TDZ dozlarında ve Zeatinin bazı dozlarının yüksek oranda kallus oluşturmalarına rağmen yavru korm oluşumunu tetiklemediği buna karşılık, BAP ve Kinetinin bütün dozlarında yavru korm oluşumunu teşvik ettiği görülmüştür.

Çizelge 5.12. Farklı besin ortamlarında *C.speciosus* Bieb. subsp.*ilgazensis* Mathew alt türüne ait ¼ kormlardan *in vitro* korm rejenerasyonu

Sitokinin tipi	Konsantrasyonlar (mg/l)	Yavru korm ve/veya sürgün oluşturan Eksplant oranı (%)	Eksplant başına ortalama yavru korm sayısı (adet)
BAP	0.50	60.0 abc*	0.77 b*
	1.0	60.0 abc	0.35 d
	2.0	85.0 a	1.32 a
	4.0	50.0 bc	0.37 cd
Kinetin	0.50	35.0 bc	0.30 d
	1.0	25.0 bc	0.95 b
	2.0	55.0 abc	0.80 b
	4.0	45.0 bc	0.72 bc
Zeatin	0.50	20.0 bc	0.30 d
	1.0	65.0 ab	0.0 d
	2.0	20.0 bc	0.30 d
	4.0	30.0 bc	0.30 d
TDZ	0.05	60.0 abc	0.0 d
	0.1	35.0 bc	0.0 d
	0.25	15.0 c	0.27 d
	0.50	20.0 bc	0.0 d

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Crocus speciosus Bieb. subsp.*speciosus* alt türünde ise en yüksek yavru korm oluşturan eksplant oranı (% 65.0) 4 mg/L BAP 1 mg/L Kinetin ve 0.05 mg/L TDZ içeren MS besin

ortamında saptanmıştır (Çizelge 5.13.). Eksplant başına yavru korm sayısı (sadece korm oluşturanlar içinde) bakımından da farklı besin ortamları arasındaki fark istatistiki olarak 00.1 düzeyinde önemli bulunmuştur. En yüksek eksplant başına yavru korm sayısı (1.50 adet) 2 mg/L BAP içeren MS saptanırken, bunu 0.97 adet ile 1.0 mg/L ve 4.0 mg/L BAP içeren besin ortamı takip etmiştir.

Eksplant olarak kullanılan ana kormda gelişen direkt sürgün yada tek bir korm üzerinde geliştiği korm, yavru korm olarak sayılmamış olup, sürgün olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 5.13. Farklı Besin ortamlarında *Crocus speciosus* Bieb. subsp.*speciosus* alt türüne ait ¼ kormlardan *in vitro* korm rejenerasyonu

Sitokinin tipi	Konsantrasyonlar (mg/l)	Yavru korm ve/veya sürgün oluşturan Eksplant oranı (%)	Eksplant başına ortalama yavru korm sayısı (adet)
BAP	0.50	55.0 abc*	0.32 de*
	1.0	20.0 cd	0.97 b
	2.0	45.0 a-d	1.50 a
	4.0	15.0 d	0.97 b
Kinetin	0.50	25.0 bcd	0.27 e
	1.0	60.0 ab	0.70 bcd
	2.0	20.0 cd	0.22 e
	4.0	65.0 a	0.37 de
Zeatin	0.50	35.0 a-d	0.0 e
	1.0	65.0 a	0.30 de
	2.0	15.0 d	0.0 e
	4.0	45.0 a-d	0.85 bc
TDZ	0.05	65.0 a	0.50 cde
	0.1	40.0 a-d	0.25 e
	0.25	50.0 a-d	0.0 e
	0.50	45.0 a-d	0.50 cde

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir.

Crocus speciosus Bieb. subsp.*xantholaimos* alt türünde ise en yüksek yavru korm oluşturan eksplant oranı (%65.0) 0.25 mg/L TDZ içeren MS besin ortamında saptanırken bunu %55 ile 0.50 mg/L BAP içeren MS besin ortamı izlemiştir (Çizelge 5.14). En yüksek eksplant başına yavru korm sayısı (3.15 adet) 4 mg/L Kinetin içeren MS besin ortamında saptanırken bunu 2.95 adet ile 0.50 mg/L TDZ içeren MS besin ortamı takip etmiştir.

Çizelge 5.14. Farklı besin ortamlarında *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türüne ait ¼ kormlardan *in vitro* korm rejenerasyonu

Sitokinin tipi	Konsantrasyonlar (mg/l)	Yavru korm ve/veya sürgün oluşturan Eksplant oranı (%)	Eksplant başına ortalama yavru korm sayısı (adet)
BAP	0.50	55.0 ab*	1.92 a-d*
	1.0	45.0 abc	2.60 ab
	2.0	40.0 a-d	1.07 d
	4.0	15.0 de	2.90 a
Kinetin	0.50	20.0 cde	2.57 ab
	1.0	35.0 a-d	2.12 a-d
	2.0	45.0 abc	2.47 abc
	4.0	25.0 b-e	3.15 a
Zeatin	0.50	10.0 de	2.82 a
	1.0	5.0 e	2.25 a-d
	2.0	20.0 cde	1.37 bcd
	4.0	45.0 abc	2.12 a-d
TDZ	0.05	30.0 bcd	1.25 cd
	0.1	10.0 e	2.37 abc
	0.25	65.0 a	2.05 a-d
	0.50	35.0 a-d	2.95 a

*Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortamlar arasında Duncan testine göre 0.01 düzeyinde farklılık izlenmiştir.



Şekil 5.15. Farklı konsantrasyonlarda sitokinin içeren ortamlarda *Crocusspeciosus* Bieb. alt türlere ait ¼ kormlardan *in vitro* korm rejenerasyonu

5.5.3. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos*, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türlerine ait olgun tohumların *in vitro* rejenerasyonu

Her üç alt türde seradan toplanarak laboratuvara getirilen meyveler ile tarla veya serada yetiştirilen bitkinin ortalama nemi % 15 civarına düşmüş, orta irilikte siyah renkli tohumlar içeren meyveler hasat edilerek, % 50'lik H₂O₂ sıvısı içerisinde içinde 20 dak. steril edilmiş, tohumlar 3 defa steril su ile durulanarak temel besin ortamı olarak, MS mineral tuz ve vitaminleri, %2–6 oranında sukroz ve %0.6'lık agar kullanılmıştır. Korm oluşumunu teşvik etmek için MS besin ortamına 2,4-D ve casein hydrolysate gibi kimyasallar da ilave edilmiştir. Her petri kutusuna 10 adet zarar görmemiş tohum kültüre alınmıştır. Eksplantlar 4 haftada bir aynı ortamda alt kültüre alınarak gelişimleri gözlenmiştir.

Çizelge 5.15. Farklı besin ortamların *C. speciosus* Bieb. alt türlerine ait Olgunlaşmış tohumların *in vitro* korm rejenerasyonu üzerine etkileri

Türler	Eksplant üzerine yavru korm ve/veya sürgün oluşumu (%)				
	Ortamlar				
	I ^a	II ^b	III ^c	IV ^d	V ^e
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	6.7b	6.7a	0.0c	20.0a	6.7ba
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	13.3a	0.0c	16.7a	3.3c	6.7a
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	0.0c	3.3b	3.3b	6.7b	3.3b

*Aynı sütunda farklı harflarla gösterilen ortamlar arasında fark 0.05 düzeyinde önemlidir

I) ^a 30 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri + 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D + 2.2 g/l gelrite

II) ^b 30 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri + 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D + 6.5g/l agar

III) ^c 30 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri + 25 mg/l Askorbik asit + 2 mg/l 2,4-D + 1g/l aktif kömür+ 4g /l fitajel

IV) ^d 30 g/l sukroz + MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 2 mg/l 2,4-D + 600 mg/l Amoklavin + 6.5 g/l agar

V) ^e 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri +200mg/l kazein + 5mg/l dikamba+ 25 mg/lAskorbik asit + 600 mg/l amoklavin +1gr/l aktif Kömür + 2.2 g/l gelrite

Çizelge 5.15’de görüldüğü gibi farklı ortamlarda *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türünün olgun tohumlarından en yüksek sürgün ve/veya korm gelişim oranı %20 olarak 5mg/l STS ve 2mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamında ve en düşük rejenerasyon oranı ise %0 olarak 25 mg/l Askorbik asitve 2 mg/l 2,4-D içeren fitajel ortamında saptanırken ,*C. speciosus* Bieb. subsp. *speciosus*alt türünde en yüksek sürgün ve/veya korm gelişim oranı %16.7olarak 25 mg/l Askorbik asitve 2 mg/l 2,4-D içeren fitajel ortamındave en düşük rejenerasyon oranı ise %0 olarak 25 mg/l Askorbik asitve 2 mg/l 2,4-D içeren agar ortamındaelde edilmiştir.*C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünde ise en yüksek sürgün ve/veya korm gelişim oranı %6.7olarak 5mg/l STS ve 2mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamındave en düşük rejenerasyon oranı ise %0 olarak 25 mg/l Askorbik asitve 2 mg/l 2,4-D içeren gelrite ortamındaelde edilmiştir.

Yavru korm ve sürgün rejenerasyon yüzdesi düşük olduğundan dolayı kurulan diğer bir denemede farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren 1/2 MS besin ortamı kullanılmıştır. Eksplantlar aşağıda belirtilen besin ortamlarına aktarılarak 4°C’de yaklaşık 4 ay bekletilmiştir. Daha sonra buradan 16 °C’ye çıkarılarak korm gelişimleri gözlenmiştir.

- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 1.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA

- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 3.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 5.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 7.0 mg/l BAP + 0.0 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 7.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- 15 g/l sukroz + 1/2 × MS mineralleri ve vitaminleri + 5 mg/l STS + 25 mg/l Askorbik asit + 6.5 g/l agar + 200mg/l yeast + 7.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA

Olgun tohumlarda da 2 hafta sonra yapılan gözlemlerde de kontaminasyon oranının % 0 olduğu gözlemlenmiştir. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra bazı olgun tohumlarda zigotik sürgün ve embriyonik kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Yaklaşık 8 hafta sonra 1.0-1.5 cm uzunluğa ulaşan zigotik sürgünler kesilmiştir. 8. haftadan sonra da her üç alt türde de zigotik sürgünlerin oluştuğu görülmekle beraber, bu sürgünler uzadıkça kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. 8. haftadan sonra yapılan gözlemlerde her üç alt türde olgunlaşmamış tohumlara göre çok daha düşük oranda zigotik sürgün ve embriyonik kallus oluşumu

görülmüştür.

Kültür başlangıcından itibaren 16. haftanın sonundakullanılan tüm besin ortamlarında *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* alt türünde yavru korm ve/veya sürgün oluşumu % 0.0-3.3 arasında değişirken, Yüzde değerleri çok düşük olduğu için varyans analizi yapılmamıştır.

Çizelge 5.16. *C.speciosus* subsp. *ilgazensis* alt türünde Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün veya korm oluşturma etkisi

Büyüme düzenleyici		Ortalama
BAP	NAA	
1.0	0.0	0
1.0	0.5	3.3
1.0	1.0	0
3.0	0.0	0
3.0	0.5	3.3
3.0	1.0	0
5.0	0.0	3.3
5.0	0.5	3.3
5.0	1.0	0
7.0	0.0	0
7.0	0.5	0
7.0	1.0	3.3

Çizelge 5.17' de görüldüğü gibi *speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünde ise, farklı besin ortamlarında yavru korm ve/veya sürgün oluşumu % 0.0-10.0 arasında değişirken yüzde değerleri çok düşük olduğu için varyans analizi yapılmamıştır.

Çizelge 5.17. *C.speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünde Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün veya korm oluşturma etkisi

Büyüme düzenleyici		Ortalama
BAP	NAA	
1.0	0.0	0.0
1.0	0.5	6.7
1.0	1.0	10.0
3.0	0.0	0.0
3.0	0.5	3.3
3.0	1.0	3.3
5.0	0.0	6.7
5.0	0.5	6.7
5.0	1.0	3.3
7.0	0.0	0.0
7.0	0.5	6.7
7.0	1.0	0.0

Crocus speciosus Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünde ise farklı besin ortamlarında yavru kormve/veya sürgün oluşumu % 0.0-6.7 arasında değişirken,yüzde değerleri çok düşük olduğu için varyans analizi yapılmamıştır.

Çizelge 5.18. *C.speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türünde Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ½ MS ortamların 8 ay sonra kormlar üzerinde sürgün veya korm oluşturma etkisi

Büyüme düzenleyici		Ortalama
BAP	NAA	
1.0	0.0	0.0
1.0	0.5	0.0
1.0	1.0	0.0
3.0	0.0	0.0
3.0	0.5	0.0
3.0	1.0	0.0
5.0	0.0	3.3
5.0	0.5	3.3
5.0	1.0	6.7
7.0	0.0	0.0
7.0	0.5	0.0
7.0	1.0	0.0

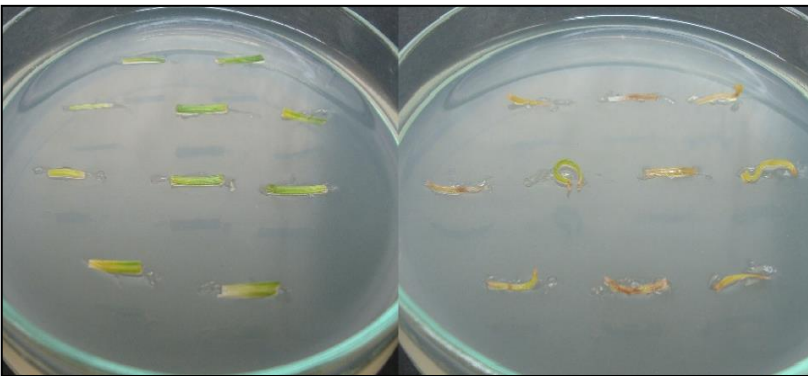
Her üç türde de olgunlaşmamış ve olgun tohumlarda elde edilen sonuçlar incelenecek olursa, olgunlaşmamış tohumların kallus oluşturma ve embriyonik kallus oluşturma kapasitelerinin olgun tohumlardan daha yüksektir. Ancak, her iki eksplant tipinde de embriyonik kalluslardan korm oluşumunun, mikroçoğaltım için uygun olmadığı düşünülmektedir. Ancak, korma parçalarında olduğu gibi, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* türünün rejenerasyon kapasitesinin daha iyi olduğu söylenebilir. Ancak gen transferi vb. çalışmalar için bu tür eksplantların kullanılabilme potansiyelinin olduğu görülmektedir.



Şekil 5.16. Olgunlaşmış tohumların in vitro kültürü

5.5.4.Yaprak Eksplantlarının *İn vitro* Kültürü

Yapraklar sterilizasyon aşamasından sonra kontaminasyon göstermemek ile birlikte, denenmiş olan ortamların hiç birinde kallus gelişimi gözlenmemiştir.



Şekil 5.17. Yaprak eksplantların kültüre alınması

5.5.5. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* Mathew, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos*, *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *Speciosus* alt türlerinde ¼ kormlardan ve olgun tohumlardan gelişen kormların, korm geliştirme ortamı (KGO), korm olgunlaştırma ortamı (KOO), köklendirme ortamına alınması ve aklimatizasyon Çalışmaları

Denemelerde farklı ortamlarda Kültüre alındıktan sonra yaklaşık 28-32 hafta sonra ¼'lük kormlardan ve olgun kormlardan gelişen yavru kormlar, 32. haftaya kadar Sürgün ve Korm Teşvik Ortamında (SKTO) bekletilmiştir. 32. haftadan itibaren her üç türün kormları üzerinde oluşan mikro kormlar, korm geliştirme (KGO) ortamlarına alınmaya başlamıştır.

Korm geliştirme ortamı (KGO)'na MS mineralleri ve vitaminleri, 40 g/l sukroz, 500 mg/l kazein, 40 g/l mannitol ve 7 g/l agar. KGO'nda 7-8 hafta aktarılan kormların hacimsel olarak büyüdüğü gözlenmiştir. Bu ortamda 2 haftada bir alt kültür yapılarak büyüyen kültürler parçalanarak ayrı kültür kaplarına dikilmiştir.

¼'lük kormlardan gelişen yavru kormlar, MS mineralleri ve vitaminleri, 20 g/l sukroz, 7 g/l agardan oluşan daha sonra Korm olgunlaştırma ortamı (KOO)'na aktarılmış, 6-6 hafta KOO'da kalan kormların hacimsel olarak büyüdüğü görülmüştür. Bu ortamda 6 hafta kaldıktan sonra korm yavruları birbirinden ayrılarak ve parçalanarak aynı ortamda alt kültüre alınmıştır. KOO 'nda 1 ya da 2'li parçalara ayrılan kormların dış yüzeyinde kahverengi kabuk oluşumunun başladığı görülmüştür (Şekil 5.18.).

KOO'nda gelişen kormlar, 0.5 mg/l NAA, % 0.7 g/l agar ile katılaştırılan ¼ MS besin ortamında köklendirilmeye alınmaya başlamış, yaklaşık 4-8 hafta içinde kormların besin ortamına değdiği dip kısmında kallus oluşumu görülmüştür, kallus oluşan bölgeler izole edilerek kormlar aynı ortama yerleştirilmiştir. Bu ilemden yaklaşık 3 hafta içinde bazı korm yavrularının köklenmeye başladığı görülmüştür. Köklenen kormların bazılarının ileriki gelişme dönemlerinde In vitro'da magenta kapları içerisinde çiçek sapı oluşturduğu ve çiçeklendiği görülmüştür. Her üç alt türde de oluşan mikro kormlar, korm olgunlaştırma ortamlarından (KOO) alınıp köklendirildikten sonra toprağa aktarılmadan önce 4 °C'de 4-6 hafta ön üşütmeye tabi tutulmuştur. Yaklaşık olarak kültüre aldıktan 40-48 hafta sonra tam ön üşütmesi yapılan gelişkin kormlar, iklim odasında kompost, torf ve içeren küçük saksılara alınmıştır. Birkaç gün yüksek nemde (% 70-90) tutularak bitkiciklerin iklim

şartlarına uyumu beklenmiştir. İklım dolabı ve odasında akımatize edilen bitkicikler seradaki saksılara alınmıştır.



şekil 5.18. Eksplantların köklendirilmesi

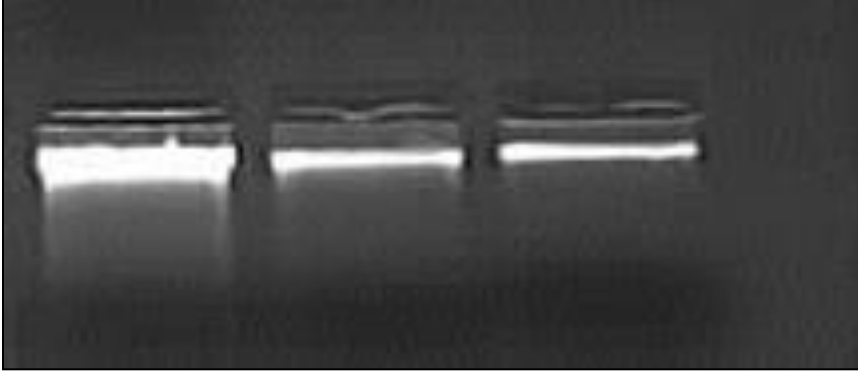
Çizelge 5.19. KOO’nda alındıktan sonra aklimatize edilen yavru kormların canlı kalma oranı

Alt türler	Aklimatizasyon sonrası ortalama canlı kalan bitki (yavru korm) oranı (%)
<i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i> Mathew	18
<i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	58
<i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	25

C. speciosus Bieb.subsp. *ilgazensis* alt türünde aklimatizasyon sonrası canlı kalan korm sayısı %18, *C. speciosus* Bieb.subsp. *xantholaimos* alt türünde %58 ve *C.speciosus* Bieb.subsp. *speciosus* alt türünde ise %25 olarak elde edilmiştir.

5.6. DNA İzolasyonu

Her bir alt türün çiçeğinden DNA izole edilmiş olup, DNA’ların agaroz jel (%1) görüntüsü ve Nanodrop (ND-1000) spektrofotometrik değerleri aşağıda verilmiştir (Şekil 5.19.,Çizelge 5.20.)



Şekil 5.19. DNA’ların agaroz jel (%1) görüntüsü

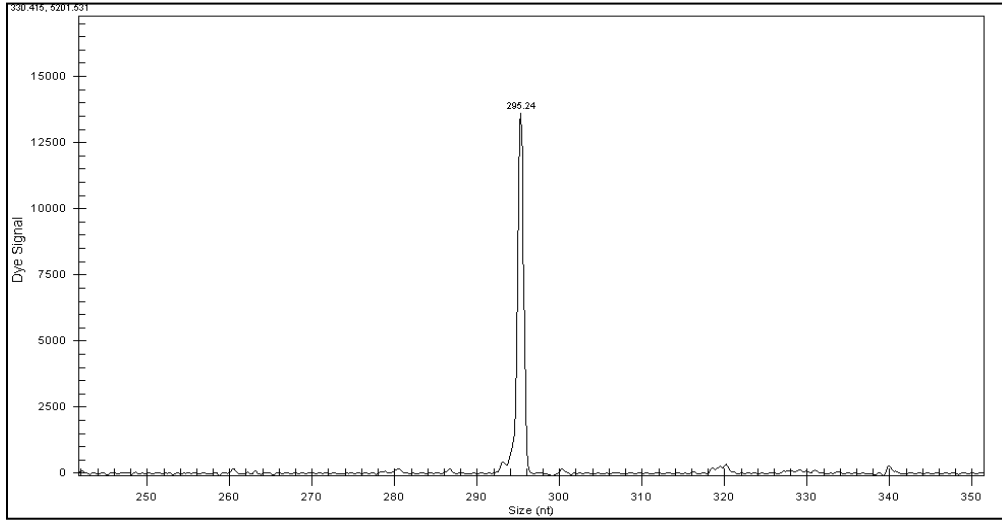
Çizelge 5.20. İzole edilen DNA’ların spektrofotometrik (ND-1000) değerleri

No	DNA	Miktar (ng/ µl)	A260/280	A 260/230
1	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	1498	1.77	0.86
2	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	2270	1.73	0.78
3	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	2247	1.83	0.74

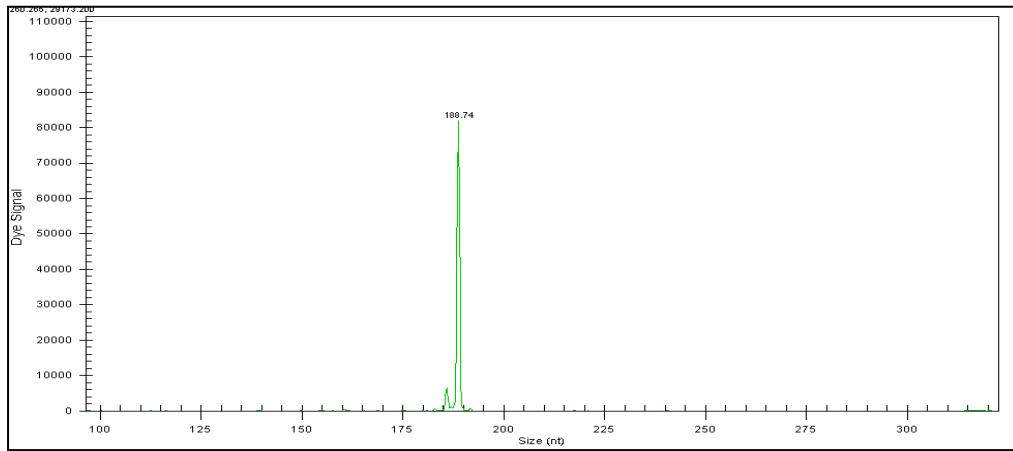
SSR amaçlı kullanılan DNA'lar da; saflık (A260/A280) oranının yaklaşık 1.7-2.0 olması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan DNA saflık oranları genel olarak bu sınırlar içerisinde yer alırken, jel görüntülerinde kırksız (smear) bir bant görüntüsü kaliteli DNA izolasyonunun göstergesidir.

5.7. SSR Analizleri

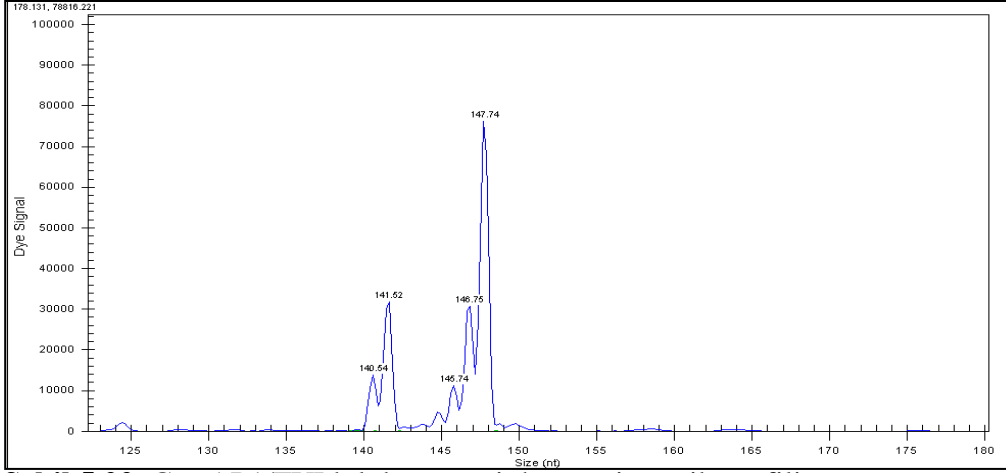
Her lokustaki allel büyüklükleri pik verisi olarak kapiller elektroforez aletinin fragment analiz programı ile belirlenmiştir. Lokus-allel profillerinin kapilleri elektroforezdeki farklı görünüşleri Şekil 5.20, Şekil 5.21, Şekil 5.22 'de sunulmuştur.



Şekil 5.20. CSMIC36 lokusuna ait homozigot pik profili



Şekil 5.21. ABRII/Cs 20 lokusuna ait homozigot pik profile



Şekil 5.22. CsatAP1/FULb lokusuna ait heterozigot pik profili

Kapiller elektroforez aletindeki net allel profil görüntüleri çalışmanın metot aşamalarında iyi optimizasyonların göstergesi olup, tüm lokuslardaki allel tiplerinin (homozigot/heterozigot) ve büyüklüklerinin başarılı bir şekilde tespit edilmesine olanak sağlamıştır.

5.7.1. Genetik Analizler

Araştırmada 6 SSR lokusu ait allel büyüklükleri baz çifti (bç) olarak çizelge 5.21’ de sunulmuştur. ABRII/Cs 20 lokusunda, *C. speciosus* subsp. *xantholaimos* alt türünde 3.ve 4. allellerin (sırasıyla 165 ve 175) varlığı saptanmıştır. Genetik ilişki analizlerinde; ABRII/Cs 20 lokusunda bu 4 allele ait, farklı ikili allel kombinasyonları denenmiş, farklı bir genetik ilişki gözlenmemiştir.

Çizelge 5.21. Lokuslara ait allel verileri (1-*C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos*, 2-*C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis*, 3-*C. speciosus* Bieb. subsp. *speciosus*)

DNA No	ABRII/Cs 20	CSMIC36	CsatAP1/F ULb	CastAP3b	CSMIC25	ABRII/Cs 8
1	155:165/175:191	295:295	125:127	187:199	134:134	124:148
2	189:189	295:295	141:147	191:199	134:134	124:150
3	157:171	293:293	117:127	187:197	118:134	124:148

SSR lokuslarındaki genetik parametreler; allel sayıları, beklenen ve gözlenen heterozigotluk oranları, tespit olasılığı değeri ve sessiz allel frekansı çizelge 5.22.’ de sunulmuştur.

Çizelge 5.22. Çalışılan lokuslardaki allel sayıları (N), beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho), tespit olasılığı (PI) değeri ve sessiz (null) allel frekansı(r)

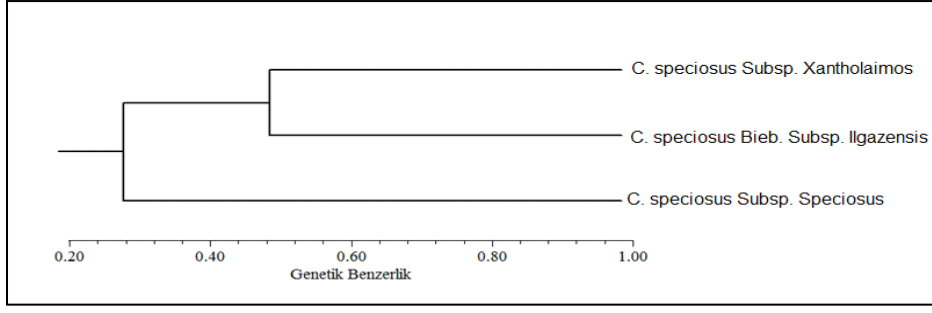
Lokuslar	N	He	Ho	PI	r
ABRII/Cs 20	5	0.777	0.666	0.151	0.062
CSMIC36	2	0.444	0.000	0.604	0.307
CsatAP1/FULb	5	0.777	1.000	0.151	-0.125
CastAP3b	4	0.722	1.000	0.229	-0.161
CSMIC25	2	0.277	0.333	0.637	-0.043
ABRII/Cs 8	3	0.611	1.000	0.378	-0.241
Toplam	21	3.608	3.999	-	-
Ortalama	3.5	0.601	0.666	-	-

SSR analizleri sonucunda, allel sayıları dikkate alındığında en yüksek allel; ABRII/Cs 20 (5 allel) ve CsatAP1/FULb (5 allel) lokuslarında elde edilmiştir. Bu lokusları, 4 allel ile CastAP3b lokusu ve 3 allel ile ABRII/Cs 8 lokusu izlemiştir. Tüm lokuslara ait toplam allel sayısı 21, ortalama allel sayısı ise 3.5 olarak bulunmuştur. Ortalama He ve Ho değeri sırası ile; 0.601 ve 0.666 olarak bulunurken, lokuslar itibari ile değer aralıkları He için; 0.277-0.777, Ho için 0.000-1.000 arasında tespit edilmiştir. Tespit olasılığı (PI) değerlerinin tamamı 0.05 eşik değerinin üzerinde bulunurken, null allel değerleri ise 4 lokusta negatif (CsatAP1/FULb, CastAP3b, CSMIC25, ABRII/Cs 8) olarak bulunmuştur. Pozitif çıkan lokuslarda ise, null allel değerleri sıfıra yakın olarak bulunmuş olup, bu durum tüm lokuslarda null allel olma olasılığının azlığını kanıtlamaktadır.

3 alt tür içerisinde; aynı genotip (isim ve SSR lokuslarındaki allel büyüklükleri aynı), sinonim (farklı isimle adlandırılan fakat lokusları birbiri ile aynı genotipler) ve homonim (aynı isimle adlandırılan fakat lokusları birbirinden farklı genotipler) durumlarına rastlanmamıştır. SSR allellerinin yakınlık oranlarına dayalı benzerlik indeksi ve ilişki dendogramı sırası ile çizelge 5.23. ve şekil 5.23.' de sunulmuştur.

Çizelge 5.23. Genotiplere ait benzerlik oranı indeksi (%)

		1	2	3
1	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	100	-	
2	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	50	100	-
3	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	41.7	16.7	100

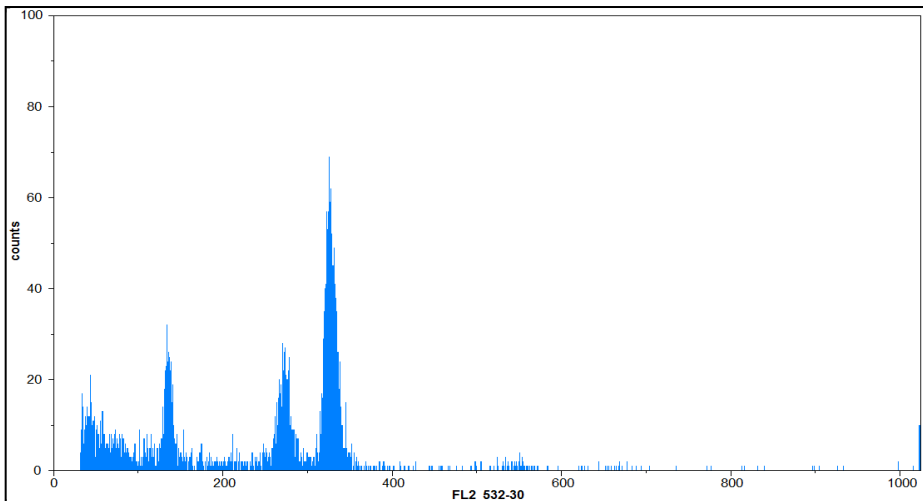


Şekil 5.23. Genotiplere ait genetik ilişki dendogramı

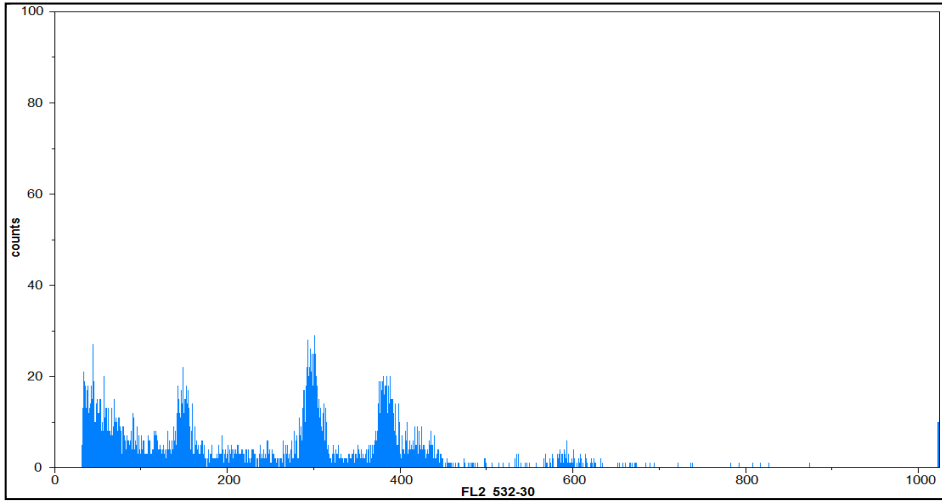
Çeşitlerde en yüksek benzerlik oranı; %50 ile *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* ile *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* arasında gözlemlenirken, bunu %41.7 oranı ile *C. speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* ile *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türleri izlemiştir. 3 alt tür arasında en düşük benzerlik oranı ise, *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* ile *C. speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* arasında %16.7 olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.23.).

5.8. Sitolojik Analizler

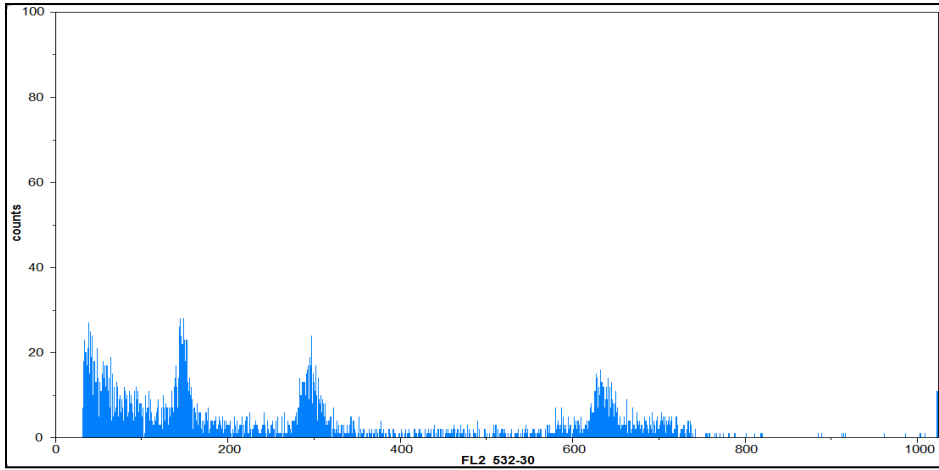
Crocus speciosus Bieb. türünün seçilen 3 alt türünde, hücre çekirdeğindeki DNA içeriğini analizleri için, her alt türe ait yapraklarda, CyStain PI (Propidium iodide) absolute P³nuclei extraction ve staining kit (Partec GmbH, Munster) kullanılarak 2C çekirdek DNA içerikleri belirlenmiştir (Şekil 5.24., Şekil 5.25. ve Şekil 5.26.). Analizlerde domates internal kontrol olarak kullanılmıştır. Partec CyFlow Space flow cytometer (Munster, Germany) aleti ile alt türlerde G1 pik ortalamalarına ve internal kontrole ait DNA içerikleri saptanmıştır (Çizelge 5.24.).



Şekil 5.24. *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* ve internal kontrole (domates) ait histogram görüntüsü



Şekil 5.25. *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* ve internal kontrole (domates) ait histogram görüntüsü



Şekil 5.26. *C. speciosus* subsp. *speciosus* ve internal kontrole (domates) ait histogram görüntüsü

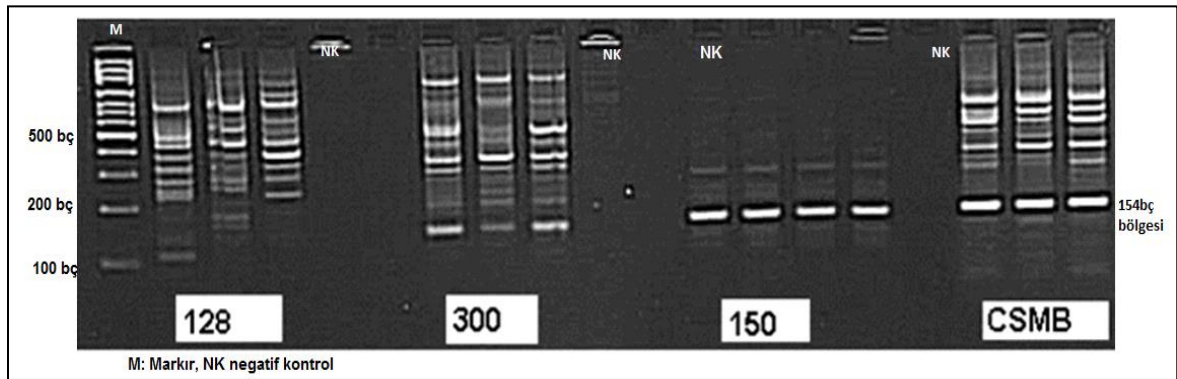
Çizelge 5.24. Genotiplere ait DNA içerikleri (1pg DNA = 978 Mbp, (142)

Genotipler	pg (\pm s.e) 2C**
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	8.77
	8.80
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	5.22
	5.14
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	4.99
	4.82

** : Analizler iki tekrarlı yapılmıştır.

5.9. Dizi Analizleri

3 safran genine yönelik değişik primer kombinasyonlarının örnek PCR ürünleri Şekil 5.27.' de sunulmuştur. CSMBF (*Crocus* 300F; 5'-GCTGAAGCGGATCGAGAACAC-3') ve CSMBR (CR-1R-AY337928; 5'-GGAGTATTCGGACAGCTTGC-3') primerleri ile çoğaltılan 154 bç bölgesi (düzenli tekrarlanabilen ve negatif kontrollerde bant kalıntılarına rastlanmayan) en iyi sonuçları vermiştir.

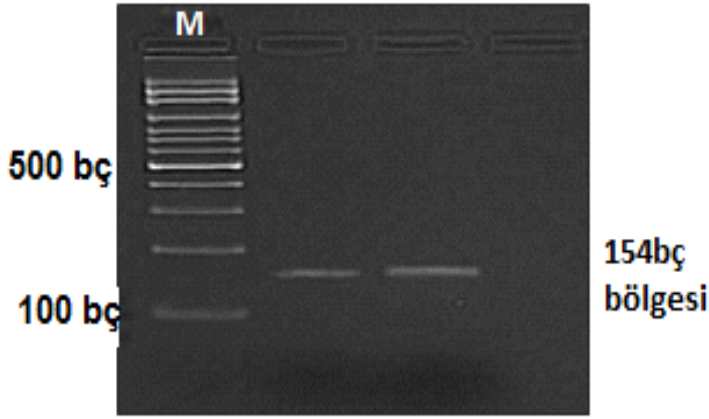


Şekil 5.27. Değişik primer kombinasyonlarının (bkz. Çizelge 4.5.) PCR'da çoğaltılmış örnek agaroz jel görüntüleri (CSMB: Çalışmada kullanılan 154 bç bölgesi)

CSMBF/CSMB primerleri ile çoğaltılan 154 bç çiğdem gen bölgesi PCR sonra temizlemelerde de klonlamaya veya direk dizilemeye uygun kalite ve miktarda amplifikasyon ürünü vermiştir. Wizard PCR Clean Up (Promega) kiti ile yapılan pürifikasyon sonrası Nanodrop (ND-1000) değerleri ve agaroz jel görüntüsü çizelge 5.25. ve Şekil 5.28.' de verilmiştir.

Çizelge 5.25. 154 bç gen bölgesinin PCR temizleme sonrası alt türlerde spektrofotometrik (ND-1000) değerleri

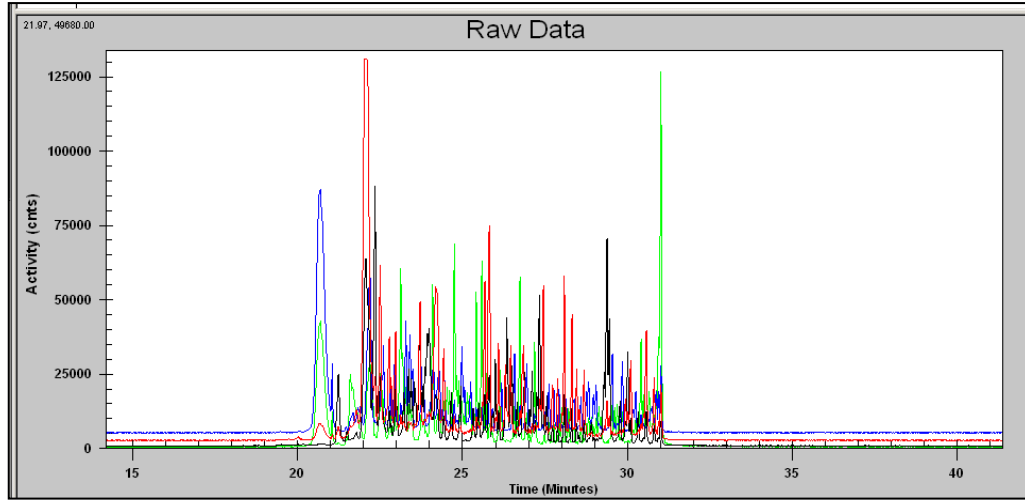
No	Pürifiye PCR ürünleri	Miktar (ng/μl)	A260/280
1	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	50	1.91
2	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	38	1.87
3	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	26	1.85



Şekil 5.28. 154 bç gen bölgesinin PCR temizleme sonrası iki alt türün agaroz jelde (%2) görünüşü

5.9.1. Dizi Analizi Reaksiyonları

CSMB ileri primeri kullanılarak alt türlerde yapılan dizi analizi çalışmalarında, okumaların %100 doğru olması için Quality-Based Trimming (Both Ends) uygulanmıştır (Şekil 5.29.).



Şekil 5.29. *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* genotipine ait dizi analizi sonrası örnek ham veri görüntüsü

Dizileme sonrası AP1 geninin çiğdem alt türlerindeki dizileri (Çizelge 5.26.) ve bu genin safran-çiğdem'de homoloji gösteren bölgeleri BLAST analizleri ile belirlenerek (Şekil 5.30, 5.31.,5.32.) sonuçların doğruluğu ortaya konmuştur.

Çizelge 5.26. Çiğdem alt türlerinde AP1 gen dizileri

	Alt tür	AP1 geni Safran-Çiğdem ortak dizisi
1	<i>Crocus speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	aggcaccttctcgaaagcgcgcgtgccgggactcctcaaga aagccaacgagatatccgtactgtgcgatgcggaggctcgtct catcatcttctccaccaaggcaagctgtcc
2	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>Speciosus</i>	gggcatctcctcaagaaagccaacgagatatcgcgtactggg gcgatgg
3	<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	ctcctcaagaaagccaacgagatatccgtactgtgcgatcgg aggctcgtctcatcatcttctcc

Alignments | Download | GenBank | Graphics | Statistics | Help | Home

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1a) mRNA, complete cds	167	167	100%	2e-38	93%	AY337928.1
Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1b) mRNA, complete cds	150	150	100%	2e-33	91%	AY337929.1

[Download](#) | [GenBank](#) | [Graphics](#)

Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1a) mRNA, complete cds
Sequence ID: [gb|AY337928.1](#) Length: 1281 Number of Matches: 1

Range 1: 221 to 333 [GenBank](#) | [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
167 bits(90)	2e-38	108/116(93%)	3/116(2%)	Plus/Plus

```

Query 1  AGGTCACCTTCTCGAAAGCGCGCGTGCCTCCTCAAGAAAGCCAACGAGATATCCG 60
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 221 AGGTCACCTTCTCGAAAGCGCGCGTGCCTCCTCAAGAAAGCCAACGAGATATCCG 277

Query 61  TACTGTGCGATGCGGAGGTCGCTCCTCATCATCTTCTCCACCAAGGCAAGCTGTCC 116
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 278 TACTGTGCGACGCGGAGGTCGCTCCTCATCATCTTCTCCACCAAGGCAAGCTGTCC 333

```

[Download](#) | [GenBank](#) | [Graphics](#)

Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1b) mRNA, complete cds
Sequence ID: [gb|AY337929.1](#) Length: 1175 Number of Matches: 1

Range 1: 159 to 271 [GenBank](#) | [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
150 bits(81)	2e-33	106/117(91%)	5/117(4%)	Plus/Plus

```

Query 1  AGGTCACCTTCTCGAAAGCGCGCGTGCCTCCTCAAGAAAGCCAACGAGATATCC 59
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 159 AGGTCACCTTCTCGAAAGCGCGCGTGCCTCCTCAAGAAAGCCAACGAGATATCC 214

Query 60  GTACTGTGCGATGCGGAGGTCGCTCCTCATCATCTTCTCCACCAAGGCAAGCTGTCC 116
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 215 GTACTGTGCGACGCGGAGGTCGCTCCTCATCATCTTCTCCACCAAGGCAAGCTGTCC 271

```

Şekil 5.30. *Crocusspeciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* alt türü-safran CsAP1 homoloji bölgeleri (BLAST)

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Crocus sativus</i> putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1b) mRNA, complete cds	52.0	52.0	52%	4e-04	100%	AY337928.1
<input type="checkbox"/> <i>Crocus sativus</i> putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1a) mRNA, complete cds	52.0	52.0	52%	4e-04	100%	AY337928.1

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1b) mRNA, complete cds
Sequence ID: [gb|AY337928.1](#) Length: 1175 Number of Matches: 1

Range 1: 188 to 213 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
52.0 bits(26)	4e-04	26/26(100%)	0/26(0%)	Plus/Plus

Query 7 CTCTCAAGAAAGCCACAGATATC 32
|||||
Subject 188 CTCTCAAGAAAGCCACAGATATC 213

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1a) mRNA, complete cds
Sequence ID: [gb|AY337928.1](#) Length: 1281 Number of Matches: 1

Range 1: 250 to 275 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
52.0 bits(26)	4e-04	26/26(100%)	0/26(0%)	Plus/Plus

Query 7 CTCTCAAGAAAGCCACAGATATC 32
|||||
Subject 250 CTCTCAAGAAAGCCACAGATATC 275

Şekil 5.31. *C. speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türü-safran CsAP1 homoloji bölgeleri (BLAST)

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1a) mRNA, complete cds	111	111	100%	5e-22	97%	AY337928.1
Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1b) mRNA, complete cds	100	100	100%	1e-18	94%	AY337929.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1a) mRNA, complete cds
Sequence ID: [gb|AY337928.1](#) Length: 1281 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 250 to 315 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
111 bits(60)	5e-22	64/66(97%)	0/66(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CTCCTCAAGAAAGCCACGAGATATCCGTACTGTGCGATGCCGAGGTCGCTCATCATC 60
          |||
Sbjct 250 CTCCTCAAGAAAGCCACGAGATATCCGTACTGTGCGACGCCGAGGTCGCTCATCAT 309

Query 61  TTCTCC 66
          |||||
Sbjct 310 TTCTCC 315

```

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Crocus sativus putative Apetala1-like MADS-box transcription factor (Kcap1b) mRNA, complete cds
Sequence ID: [gb|AY337929.1](#) Length: 1175 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 188 to 253 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
100 bits(54)	1e-18	62/66(94%)	0/66(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CTCCTCAAGAAAGCCACGAGATATCCGTACTGTGCGATGCCGAGGTCGCTCATCATC 60
          |||
Sbjct 188 CTCCTCAAGAAAGCCACGAGATATCCGTACTGTGCGACGCCGATGCGCTATCATCATC 247

Query 61  TTCTCC 66
          |||||
Sbjct 248 TTCTCC 253

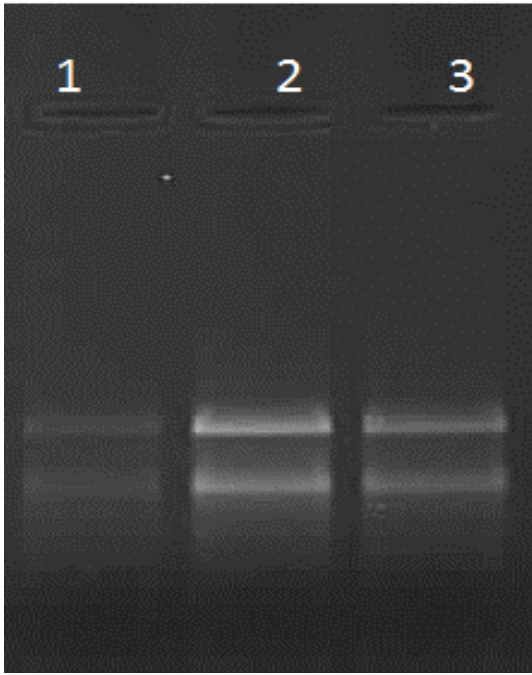
```

Şekil 5.32. *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türü-safran CsAP1 homoloji bölgeleri (BLAST)

5.10. Real Time PCR Analizleri

5.10.1. RNA izolasyonu, miktar ve kalite tayini

İzole edilen RNA örnekleri % 1'lik agarozda yürütülerek (Şekil 5.33.), Nanodrop ND-1000 cihazı ile spektrofotometrik ölçümleri (Çizelge 5.27.) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri ve spektrofotometrik veriler Real-Time PCR analizlerinde kullanılacak kadar miktar ve saflıkta RNA elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 5.33. Soldan-sağa: 1-*C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos*, 2-*C. speciosus* Bieb. subsp. *speciosus*, 3-*C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis*'e ait RNA'ların agaroz jel (% 1) görüntüsü

Çizelge 5.27. RNA'lara ait spektrofotometrik ölçüm değerleri

Alt tür	ng/ μ l	260/280	260/230
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	80.50	1.80	1.55
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	95.22	1.72	1.40
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	72.23	1.74	1.48

5.10.2. cDNA Sentezi

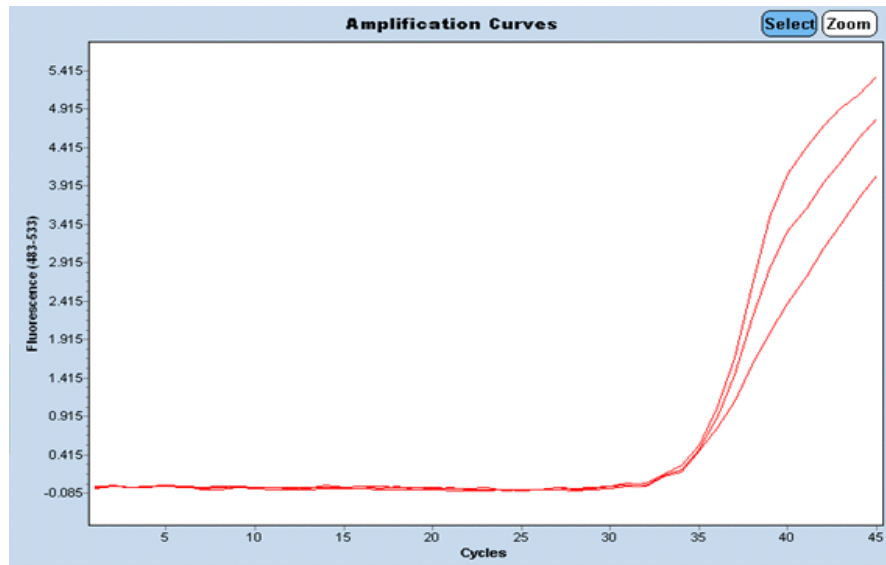
Örneklere ait cDNA'ların spektrofometrik ölçümleri çizelge 5.28.' de sunulmuştur. cDNA'ların saflıkları (260/280, 260/230) yeterli bulunurken, miktarları (ng/μl) beklenen oranlarda (yaklaşık 2000ng) elde edilmiştir.

Çizelge 5.28. Alt türlere ait cDNA'ların spektrofometrik ölçüm değerleri

Alt tür	ng/μl	260/280	260/230
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	1951.50	2.23	2.39
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	1900.00	2.22	2.36
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	1990.22	2.22	2.38

5.10.3. Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri

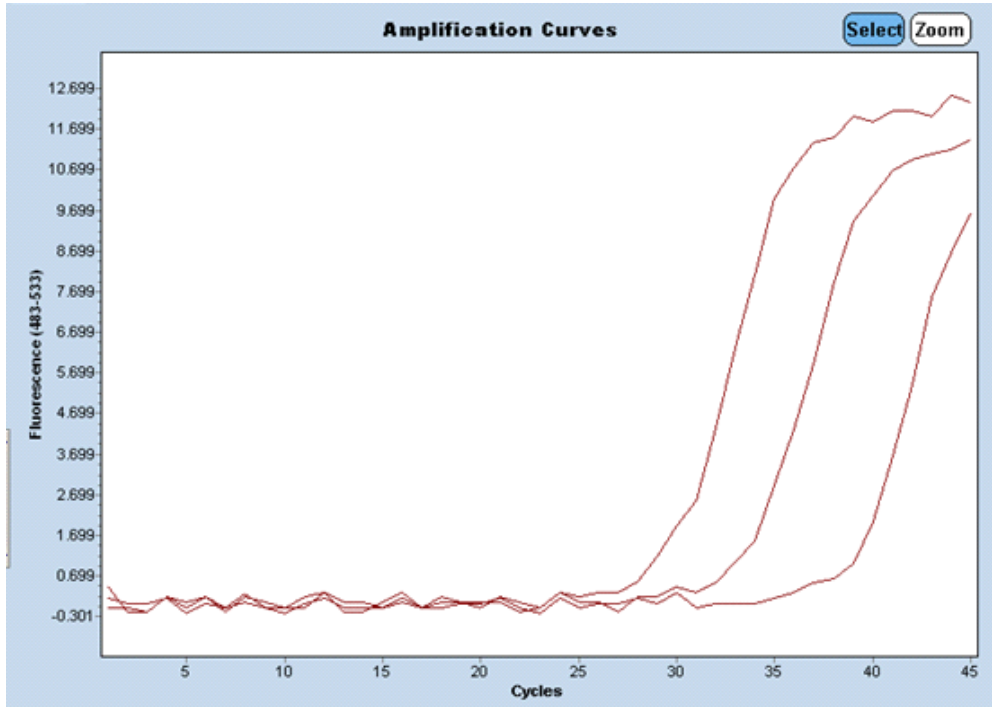
B-aktin ve 71 bç primerlerinde örneklere ait amplifikasyon eğrileri Şekil 5.34 ve Şekil 5.35.' de sunulmuştur. Amplifikasyon eğrilerinde Ct değerleri 20-35. döngüler arasında elde edilmiş (Çizelge 5.29. ve Çizelge 5.30.) ve 'Roche absolute kuantifikasyon' analiz bölümü ile bu Ct değerlerinin kullanılabilirliği belirlenmiştir.



Şekil 5.34. Hedef gen (71 bç'lik) bölgesindeki 3 alt türün amplifikasyon eğrileri

Çizelge 5.29. Hedef gen (71 bç'lik) bölgesindeki 3 alt türün teknik tekrarı (Ct değerleri)

Alt tür	Teknik tekrar	Ct değeri
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	1	34.65
	2	34.62
	3	34.67
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	1	34.54
	2	34.57
	3	34.59
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	1	34.33
	2	34.30
	3	34.31



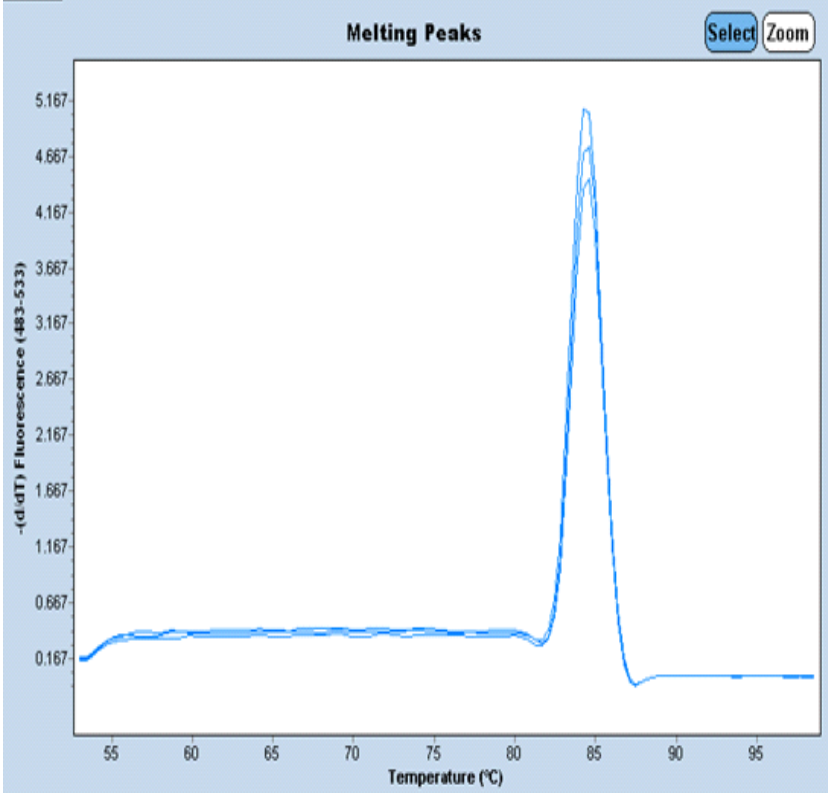
Şekil 5.35. β -aktin gen bölgesindeki 3 alt türün amplifikasyon eğrileri

Çizelge 5.30. β -aktin gen bölgesindeki 3 alt türün teknik tekrarı (Ct değerleri)

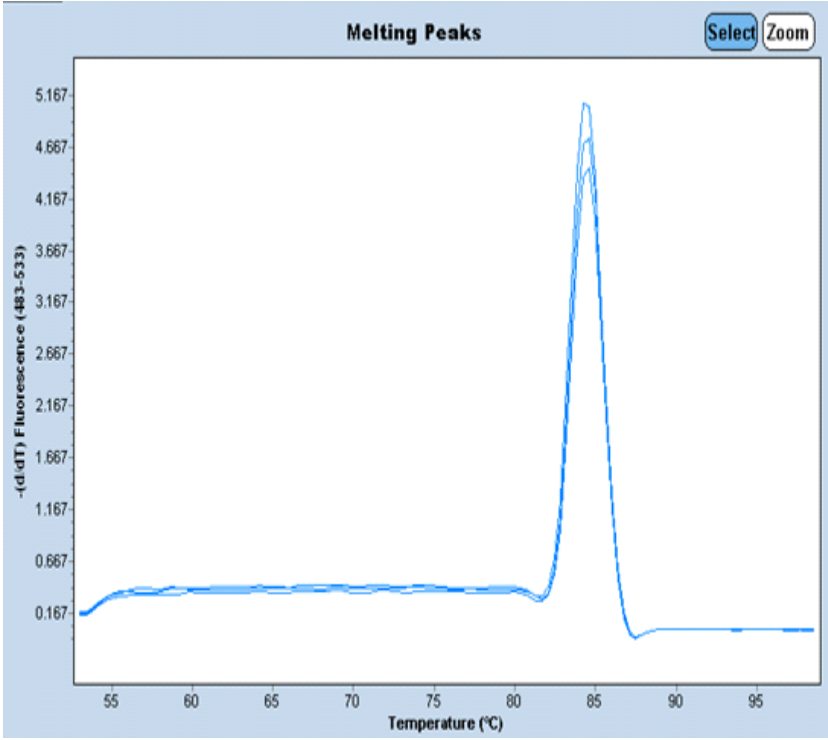
Alt tür	Teknik tekrar	Ct değeri
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>xantholaimos</i>	1	34.47
	2	34.45
	3	34.48
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>speciosus</i>	1	35.14
	2	35.13
	3	35.19
<i>C. speciosus</i> Bieb. subsp. <i>ilgazensis</i>	1	34.98
	2	34.96
	3	34.95

5.10.4. Erime Eğrisi (melting curve)

Real Time PCR analizlerinde, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespitinde erime eğrisi (melting curve) analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.36. ve Şekil 5.37.). Erime eğrisi analizlerinde üst üste çakışan tek pik görüntüleri elde edilmiş ve dimer varlığı saptanmamıştır.



Şekil 5.36. Hedef gen (71 bç'lik) bölgesindeki 3 alt türün erime eğrileri



Şekil 5.37. β -aktin primerinde 3 alt türün erime eğrileri

Ct verilerinde anlaşıldığı (Çizelge 5.29. ve Çizelge 5.30.) üzere hedef (71 bç'lik) gen bölgesi (housekeeping ifadesi ile birlikte) alt türlerde ifade olmuş ancak bir uygulama içermeyen (stres uygulaması vb) alt türlere ait çiçek örnekleri kullanıldığı için ifadeler birbirine benzerlik göstermiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doku kültürü çalışmalarında yüzey sterilizasyon için eksplantlara zarar vermeden en başarılı ve en düşük dozun belirlenmesi gerekmektedir. Elde edilen sonuçlarına göre yüzey sterilizasyonunda farklı ortamlar ve jelleştirici madde ve eksplantların büyüklüğü ile küçüklüğüne bağlı farklı sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla çıkan sonuçlarına göre yüzey sterilizasyon optimizasyonu için eksplantların seçim, sterilizasyon ortamın zamanı ve benzer unsurlara karşı çok dikkatli olunması gerekmektedir(143).

Doku kültürü çalışmalarının başarılı olması için uygun bir yüzey sterilizasyonu yapılmalıdır. Yüzey sterilizasyonunda kullanılan dezenfektanın konsantrasyonu ve sterilizasyon süresi, eksplantın canlılığını ve rejenerasyon kapasitesini önemli derecede etkilemektedir (144). Doku kültürü çalışmalarında, en kısa süre ve en düşük dezenfektan dozuyla en iyi yüzey sterilizasyonu hedeflenmektedir (143). Tohum ve eksplant sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat, antibiyotikler ve sodyum hipoklorit (ticari çamaşır suyu) dezenfektan olarak kullanılmaktadır (143).

Her bitki tohumununun bakteri, mantar ve benzeri mikro organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Bu nedenle, öncelikle doku kültürü çalışmasına konu olan bitkiye ait en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi gerekir (143).Yüksek konsantrasyon ve uzun süreli dezenfektan içerisinde bırakılan tohumlarda çimlenme düşüklüğü görülmekte, aynı şekilde yüzey sterilizasyonuna maruz bırakılan eksplantların dokuları zarar görerek rejenerasyon kapasitesi düşmekte, hatta eksplantlar ölmektedir (143).

Çalışmada kormları steril edilmiş çiçek toprağında (2.5 saat 160 °C da) +4°C' da 60 gün bekletilmiştir. Daha sonra dış pul yaprakları soyulmuştur. 2-3 dk. bulaşık deterjanı ile yıkanarak steril kabin içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 30 dk. süresi ile %70'lik H₂O₂ ile steril edilmiştir. 3×5 kere steril saf su ile durulanmıştır.Bu protokol ile steril edilen kormların ortamlarına 600 mg/l bakteriostatikamoklavin eklenmiştir.kontaminasyon %sini düşürmek için hazırlanan ortamlara1ml/l PPM eklenmiştir. Olgunlaşmamış tohumlar ve olgun tohumlar ise kullanılan en iyi sterilizasyon yönteminde ise eksplantlar 2 dk. bulaşık deterjanı ile yıkanıp 15 dk. %50'lik H₂O₂ ile manyetik karıştırıcı yardımı ile steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulup, 3×5dk. steril saf su ile durulanmıştır.

Farklı eksplantların steril edilmesi için farklı yöntemler kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarda Geofitler için yapılan çalışmada uygulanacak sterilizasyon yöntemi *in vitro* koşullarda kullanılacak bitki kısımlarına bağlıdır. Örneğin yapraklarda %20' lik çamaşır suyu yeterli iken soğanlarda bu oran %80' lere çıkmaktadır (145).

Bitki türleri ve kültürü yapılacak bitki kısımlarının seçimi adventif sürgün gelişmesi için son derece önemlidir. Doku kültürü çalışmalarda, bitkilerde düşük adventif sürgün rejenerasyonu karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. Doku kültüründe, uygun eksplant seçimi, rejenerasyonu etkileyen önemli faktörlerden olup, her organ ya da dokunun rejenerasyon kapasitesi farklıdır. Bitki büyüme düzenleyicileri *in vitro* kültürde bitki rejenerasyonunu en fazla etkileyen faktörlerin başında gelmekte olup oksin-sitokinin dengesi, yüksek oranda bitki rejenerasyonu için şarttır (143). Bunun için *C. speciosus* *Bieb.* Alt türlerinde korm, olgunlaşmamış tohum, olgun tohum ve yaprak eksplantları kullanılmıştır. Yapılan tez çalışmasında sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%100) en fazla 30 g/l sukroz+ 1/2 × MS ortamı + 25 mg/l Askorbik asid+ 600 mg/l amoklavın + 2.2 g/l gelrit 1/2 × MS içeren ortamı ve 30 g/l sukroz+ 1/2 × MS ortamı+ 25 mg/l Askorbik asid+ 600 mg/l amoklavın + 1g/l Aktif kömür+2.2 gelrit (1/2 MS+ Aktif kömür) içeren ortamlarda görülmüştür.

Genel olarak bakıldığında, olgunlaşmamış embriyoların son derece uygun embriyona kallus oluşturduğu ve bu kalluslar üzerinde somatik embryogenesis yoluyla çok sayıda sürgün ve soğancık meydana geldiği görülmüştür. Yüksek oranda *in vitro* soğancık üretimi için olgunlaşmamış embriyoların çok uygun eksplant olduğu söylenebilir. Benzer olarak, olgunlaşmamış embriyolar kullanılarak yüksek oranda bitki rejenerasyonu buğday (146), bezelye (147), Korunga (148) gibi birçok bitki türünde rutin olarak elde edilebilmektedir. *Sternbergia candida* ve *S. fischeriana* türlerinde tek bir olgunlaşmamış embriyo eksplantından 1 yıl içerisinde ortalama 80 adet soğancık üretimi gerçekleştirilebilmiştir (149,150).

Crocus sativa L.'de sürgün ve korm gelişimi için yapılan çalışmada 100 mg/l askorbik asit, 0.25 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l BAP içeren MS ortamında kallus gelişimi için en iyi ortam olarak belirtilmiştir. Ayrıca sürgün gelişimi için 100 mg/l Askorbik asit + 1 mg/l BAP içeren MS ortamı kullanılmıştır(113). *Crocus sativa* L.'de yapılan diğer bir çalışmada ise *in vitro* korm oluşumu için 3 mg/l BA ve 80 mg/l sukroz içeren MS ortamında en iyi sonuç elde edilmiştir(114).

Crocus sativa L.'de bir diğer çalışmada ise direktorganogenesis için 1 mg/l 2,4-D ve 1mg/l BAP içeren ortamda, ayrıca indirektorganogenesis için ise 0.25 mg/l 2,4-D ve 1mg/l BAP içeren MS ortamında en iyi sonuç elde edilmiştir(151).*Muscari aucheri* (Boiss.)' de en yüksek soğancık gelişimi ise 0.5 mg/l BAP + 0.2 mg/l IAA içeren MS besin ortamında saptanmıştır(152). Diğer bir çalışmada ise *M.aucheri*'de ise en yüksek eksplant başına soğancık sayısı (34.5 adet) iki pul yapraklı eksplantlardan 1 mg/l KIN içeren MS besim ortamından ele ederken, dört pul yapraklı eksplantlardan da ise en yüksek eksplant başına soğancık sayısı (41 adet) ise 2 mg/l KIN içeren MS besin ortamında elde etmişlerdir(153).

Birçok *Crocus* çeşitleri için başta SSR (32) olmak üzere, RAPD(154), RAPD (123,155,156), ISSR (32,123) ve AFLP (157) gibi birçok moleküler marker çalışması yapılmıştır. Ancak ülkemiz için endemik olan ve kaybolma tehlikesi yüksek *Crocus speciosus* Bieb. Subsp. *speciosus*, *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis*, *C. speciosus* Bieb. subsp. *xantholaimos* alt türlerine ait sadece taksonomik çalışmalar (118) yapılmış olup herhangi bir moleküler tanımlama çalışması gerçekleştirilmemiştir.

Çalışmada SSR analizlerinde kullanılan lokuslar (ABRII/Cs 8, ABRII/Cs 20, CSMIC25, CSMIC36, CsatAP1/FULb ve CastAP3b) belirli sayıda genotipleri tanımlamada yaygın kullanılan lokusların başında yer almaktadır (32,33,158). Araştırmamızda 6 SSR lokusu 3 alt türde başarı ile amplifiye edilmiş ve her lokusdan yeterli genetik ayrımı sağlayacak allel profilleri elde edilmiştir.

İran' nın farklı 10 coğrafik bölgesinden toplanan 66 *Crocus* spp. çeşitlerinde yapılan araştırmada (158) kullanılan 12 SSR lokusundan; CSMIC25, CSMIC36 lokusları 2 allel sayısı ile diğer lokuslara oranla daha düşük ayırım gücü göstermiştir. Benzer diğer bir çalışmada yine İran ve çevresinden alınan 67 *Crocus* spp. çeşitlerinde 24 SSR lokusu ile yapılan analizlerde de CSMIC25, CSMIC36 lokusları en düşük allel veren lokuslar (1 allel) olarak belirlenmiştir (33).Çalışmada 3 alt türde bu lokuslar en düşük allel (2 allel) veren lokuslar olarak gözlemlenmiştir. Ancak lokuslar araştırmada kullanılan diğer lokuslardan bağımsız olarak düşünüldüğünde, bu 3 birey sayısına göre 2 allel diğer çalışmalara göre oldukça yüksek bir ayırımdır. Aynı araştırmada (33) kullanılan ABRII/Cs 8 ve ABRII/Cs 20 lokusları ise sırası ile 3 ve 2 allel ile en polimorfik lokuslar arasında yer almış, çalışmada ise ABRII/Cs 20 lokusu 5 allel ile en polimorfik lokus olarak belirlenmiştir.

Allel sayısına göre ters oranda değişim gösteren tespit olasılığı (PI) değerleri ise 6 lokusta 0.151 (ABRII/Cs 20 ve CsatAP1/FULb) ile 0.637 (CSMIC25) arasında değişmekte olup, tüm lokuslarda, belirtildiği üzere 0.05 değerinden yüksek bulunmuştur. Bu durum, bu seçilen lokusların 3 alt türde yüksek derecede polimorfik olduklarını onaylamaktadır(159).

Heterozigotluk değerlerine bakıldığında; *He* (beklenen heterozigotluk) ve *Ho* (gözlenen heterozigotluk) ortalama değerleri sırası ile 0,601 ve 0,666 olarak tespit edilmiş ve *He* değerlerinin 2 lokus dışında (ABRII/Cs 20 ve CSMIC36) *Ho* değerlerine göre düşük olduğu belirlenmiştir. (158) tarafından yapılan çalışmadaki CSMIC25, CSMIC36 lokuslarına ait her bir beklenen (*He*) ve gözlenen (*Ho*) değerleri kıyaslandığında; *He* değerleri *Ho* değerlerine göre kısmen düşük bulunurken, (160) tarafından yapılan çalışmaya göre ise yüksek bulunmuştur. Bu durum nedeni ile bu lokuslardaki yüksek heterozigotluk oranının, popülasyondaki ayırım gücünü azalttığı düşünülmektedir. Aynı çalışmada kullanılan ABRII/Cs 8 ve ABRII/Cs 20 lokuslarında ise genotip sayısının yüksek olmasına rağmen *He* değerleri sırasıyla 0.57 ve 0.55 olarak bulunmuş olup, araştırma sonuçlarımızla kısmen benzerlik göstermektedir.

Ho'nun *He*'dan düşük olduğu durumlarda null allel frekansının pozitif olduğu görülmektedir. *Ho*'nun *He*'dan yüksek olmasına sebep olarak allel frekanslarının popülasyonda eşit dağılım göstermemesi, PI değerini etkileyerek, null allel frekansını değiştirmektedir. Ancak pozitif null allel değerleri gözlemlenen ABRII/Cs 20 ve CSMIC36 lokuslarında, null allel değerlerinin düşük olması (sıfıra yakın), null allel varlığı şüphesini gidermektedir (161).

Çekirdekdeki DNA miktarı bitkinin hücreleri arasında, hem de aynı türün farklı bireyleri arasında değişmeden sabit kalmakta ve türlere özel olmasından dolayı (162) flow sitometri araştırmaları önemli yer tutmaktadır (125). Tüm *Crocus* türlerinin diploid olmakla birlikte *Crocus sativus* triploid ($2n=3x=24$) ve 2C DNA içeriğinin yaklaşık 11.35 ± 0.04 olarak bildirilmektedir(157). Yapılan çalışmada, flow sitometri yönteminin genom büyüklüklerini tanımlama çalışmalarında *Crocus* türlerinde kesin sonuç verdiğini açıklamıştır. Çalışmasında, triploid *Crocus sativus* ve diploid *C. cartwrightianus* ile *C. thomasi* genotiplerinde flow sitometri sonucunda, *C. cartwrightianus* ile *C. thomasi* düşük düzeyde farklılık bulunurken, *Crocus sativus* ile diğer diploid genotipler arasında da yine düşük düzeyde farklılık bulunmuştur(126).

Çalışılan tezde yalnızca bir lokusta tetra-allelük gösteren *C. speciosus* Bieb. Subsp. *xantholaimos* alt türünün (SSR analizlerinde tetraploid kabul edilebilmesi için tüm lokuslarda veya lokusların çoğunluğunda 4'lü allel beklenirdi) SSR analizlerine göre tetraploid olmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca bu alt türün flow sitometri analizlerindeki yüksek DNA içeriğinin bulunmasına karşılık (8 civarı) bu oranın triploid *C. Sativus* oranından (11.35; (157))düşük olması türün poliploid olmadığını göstermektedir. *C. speciosus* Bieb. Subsp. *xantholaimos* alt türünde, ABRII/Cs 20 SSR lokusunda tetra-allelük gösterme durumu ise yaprak katmanlar arasında görülen (bitki poliploidi durumu olmayan)ve diğer bitki türlerinde de rastlanan kimerizme(163) dayandırılabilir. Ayrıca bu çalışmada bulunan flow sitometrik verilere (5-8) benzer genom büyüklüğü gösteren *Crocus* türlerinin diploid olarak değerlendirilmesi (157)Çalışmada yer alan türlerinde diploid olabileceğini göstermektedir.

Çalışmada safran MADS-box genleri dikkate alındığında üç geninde AP1 geninin homologu olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle üç genin (CsAP1a, CsAP1b, CsAP1c)homolog kısa bölgelerin yürütülen çalışmalar sonucu (genlerden birisi baz alınarak veya genler üzerinde daha uzun bölgelerde yürütülen çalışmalar tekrarlanmayan sonuçlar vermiştir) üç türde başarılı sonuçlar alınmıştır. Alt türler açısından düşünüldüğünde ise, BLAST analizleri sonucu çiğdemde üç alt türündeki AP1 gen bölgesinin (154 bp) safrandaki CsAP1a (AY337928) ve CsAP1b (AY337929) homologlarına daha çok benzediği görülmüştür.

Real-Time PCR gen ifadesi analizlerinde çiğdemde belirlenen MADS-Box gen bölgesine yönelik primerler dizayn edilerek, bu bölgenin ifadesi 3 türde karşılaştırılmıştır.β-aktin geni optimizasyonu sağlanarak gen ifadesi farklılıklarının/Ct değeri farklılıklarının doğru olarak değerlendirilebilmesi sağlanmıştır. House keeping gen (β-aktin) Ct değerlerinin optimizasyonunda, alt türlerin aynı türe ait olması nedeni ile Ct değerlerinin yakın/benzer olması beklenmektedir. Sonuçta beklendiği şekilde β-aktin Ct değerlerinin her 3 alt türde oldukça yakın olduğu belirlenmiştir. Hedef gen ifadesinin göstergesi olan hedef gene ait Ct değerleri arasındaki farka bakıldığında da oldukça az farklar olduğu belirlenmiştir. AncakCt değerlerindeki bu küçük farklılıklar, alt türler arasında belirli oranda gen ifadesi farklılıkları olduğunu göstermektedir.*C. speciosus* Bieb. Subsp. *ilgazensis* en küçük Ct(34.33-34.30-34.31),*C. Speciosus*Bieb. Subsp. *xantholaimos* ise en yüksek Ct değerine (34.65-34.62-34.67) sahiptir. Bu ise küçük Ct değerinin erken/yüksek ifadeye karşılık

gelmesinden kaynaklanmakta dolayısıyla *C. speciosus* Bieb. subsp. *ilgazensis* ' tekiifadenin diğer alt türlere göre kısmen daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Çalışma sonuçlarından yürütülecek öneriler ise; çalışmanın her bulgusu Türkiye açısından önemli bu alt türlerde ileriye yönelik kullanılabilmesidir. Türde yürütülecek genetik tanımlama çalışmalarında SSR veri optimizasyonları önemli bir başlangıç bilgisini oluştururken, bulunan gen bölgesi çiçek genlerinde yürütülecek genetik modifikasyonlar için prob özelliği taşımaktadır. Sonuçların ıslah ve genetik alanlarına katkısı yanında, Real-Time PCR düzeyindeki optimizasyonlar fizyolojik, morfolojik özelliklerle ilgili araştırmalarda da morfoloji-gen ifadesi ilişkilendirmelerinde de örnek teşkil edebilecektir.

KAYNAKLAR

1. **Arslan Y, Kartar D, Güneyliöglu H, Subaşı İ, Şahin B, Bülbül AS.** Türkiye Florasındaki Yabani Carthamus L. Türleri ve Aspir (C. tinctorius L.) Islahında Değerlendirme Olanakları. *Tarla Bitk. Merk. Araştırma Enstitüsü Derg.* 2010;19(1-2):36–43.
2. **Emek Y, Erdağ B.** Kritik Tehlike Altındaki Endemik B itki Rhaponticoides mykalea (Hub . -Mor .) ’ nın In vitro Tohum Çimlenmesi Üzerine Araştırmalar Researchs on In vitro Seed Germination of The Critically Endangered Endemic Plant Rhaponticoides mykalea (Hub . -Mor .) Ab. 2012;2:46–59.
3. **Koyuncu M, Alp Ş.** New Geophyte Taxa Described From Turkey At Last Decade. 2014;24(1):101–110.
4. **Bay G.** *Süs Bbitkileri sektör raporu.*; 2011:0–9.
5. **Hekimoğlu B, Altındeğer M.** *Süs bitkileri(endüstrisi) sektör raporu.* Samsun; 2012.
6. **Anonim.** *Ortaklaşa Rekabet ve Sektör Birliklieliği Ortak Akıl Toplantısı.* Antalya; 2013.
7. **Gürlek D.** Fritillaria Imperialis L. ve Fritillaria Persica L. Türlerinde In vitro Soğanlık Üretimi Üzerine Araştırmalar. 2011:146.
8. **Anonim.** *Doğal çiçek soğanlarının 2015 yılı ihracat listesi.*; 2014:1–22.
9. **Deli Ö.** Rubia tinctorum L. (kök boya) bitkisinin kök dokularından kallus üretimi. 2004.
10. **İpek, Arif Arslan N, Sarıhan EO.** Farklı Dikim Derinliklerinin ve Soğan Boylarının Safranın (Crocus sativus L.) Verim ve Verim Kriterlerine Etkisi Effects of Different Planting Depth and Bulb Sizes on Yield and Yield Components of Saffron (Crocus sativus L.). 2009;15(1):38–46.
11. **Crocus Bank.** Available at: <http://crocusbank.uclm.es/GGALLERY.html>.

12. **Nørbæk R, Kondo T.** Further anthocyanins from flowers of *Crocus antalyensis* (Iridaceae). *Phytochemistry* 1999;50(5):325–328.
13. **Anonim.** *Crocus speciosus* taksonomi bilgileri. Available at: <http://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%87i%C4%9Fdem>.
14. **Anonim.** *Crocus speciosus ilgazensis* alt türünün özellikleri. Available at: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=9428.
15. **Anonim.** *Crocus speciosus ilgazensis* alt türünün genel taksonomi özellikleri. Available at: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=9428.
16. **Anonim.** *Crocus speciosus ilgazensis* alt türünün genel taksonomi özellikleri. Available at: <http://tehditalindabitkiler.org.tr/v2/index.php?sayfa=detay&id=OTQyOA==>.
17. **Anonim.** Tübives (Türkiye Bitkileri Veri Servisi). Available at: <http://www.tubives.com/>.
18. **Anonim.** *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *Xantholaimos* alt türünün genel taksonomi özellikleri. Available at: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=9429.
19. **Anonim.** *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *Xantholaimos* alt türünün Türkiye üzerinde takson (HARİTA Dağılımı). Available at: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=9429.
20. **Anonim.** *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *speciosus* alt türünün özellikleri. Available at: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=9427.
21. **Anonim.** *Crocus speciosus* Bieb. subsp. *Speciosus* alt türünün Türkiye üzerinde takson (harita Dağılımı). Available at: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=9427.
22. **Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N.** Türkiye bitkileri kırmızı kitabı. *Edinburgh J. Bot.* 2002;59(3):459–466.
23. **Davis P.** *Flora of Turkey, Volume 8.*; 1984:632.

24. **Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N.** *Türkiye bitkileri kırmızı kitabı.*; 2000.
25. **Hearne CM, Ghosh S, Todd JA.** Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* 1992;8(8):288–294.
26. **Huges CR, Queler DC.** hughes and queller 1993.pdf. 1993;2:131–137.
27. **Decroocq V, Favé MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S.** Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor. Appl. Genet.* 2003;106(5):912–22.
28. **Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto a., Arús P, Laigret F.** Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2002;105:127–138.
29. **Blair M. ., Pedraza F, Buendia H. ., Gaitán-Solís E, Beebe S., Gepts P, Tohme J.** Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2003;107(8):1362–74.
30. **Sharopova N, McMullen M., Schultz L, Schroeder S, Gardiner J, Bergstrom D, Houchins K, Melia- S, Musket T, Duru N, Polacco M, Edwards K, Ruff T, Register J., Brouwer C, Thompson R, Velasco R, Chin E, Lee M, Woodman-
clikeman W, Long MJ, Liscum E, Davis G, Coe E.** Development and mapping of SSR markers for maize. *plant Mol. Biol.* 2002;48:463–481.
31. **Adam-Blondon A., Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D, This P.** Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109(5):1017–27.
32. **Rubio-Moraga A, Castillo-López R, Gómez-Gómez L, Ahrazem O.** Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. *BMC Res. Notes* 2009;2:189.
33. **Nemati Z, Zeinalabedini M, Mardi M, Pirseyediand SM, Marashi SH, Khayam
Nekoui SM.** Isolation and characterization of a first set of polymorphic

- microsatellite markers in saffron, *Crocus sativus* (Iridaceae). *Am. J. Bot.* 2012;99(9):e340–3.
34. **Brummer E., Cazcarro P., Luth D.** Ploidy Determination of Alfalfa Germplasm Accessions Using Flow Cytometry. *Plant Genet. Resour.* 1999;(1977).
 35. **Galbraith D.** Cytometry and plant sciences: a personal retrospective. *Cytometry. A* 2004;58(1):37–44.
 36. **Bennett M. ., Leitch I. .** Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Ann. Bot.* 2005;95(1):45–90.
 37. **Sharma KD, Rathour R, Sharma R, Goel S, Sharma TR, Singh BM.** In vitro cormlet development in *Crocus sativus*. 1962;52(4):709–712.
 38. **Shapiro HM.** *Practical flow cytometry.*; 2005. doi:10.1002/0471722731.
 39. **Wittwer C., Mark G, Moss A, Rasmussen R.** BioFeature Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid. *Bio Tech.* 1997;22(1):130–138.
 40. **Todd R, Klein D.** Quantification using real-time PCR technology : applications and limitations. 2002;8(6):257–260.
 41. **Heid C a, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.** Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986–994.
 42. **Lawton-Rauh A, Alvarez-Buylla E, Purugganan M.** Molecular evolution of flower development. *Trends Ecol. Evol.* 2000;15(4):144–149.
 43. **Theissen G, Becker A, Rosa A., Kanno A, Kim J., Winter K, Saedler H.** A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 2000;42:115–149.
 44. **Becker A, Günter T.** The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2003;29(3):464–489.
 45. **Alvarez-buylla E., Liljegren S., Pelaz S, Gold S., Burgeff C, Ditta G., Vergara-silva F, Yanofsky F.** MADS-box gene evolution beyond [–]owers : expression in pollen , endosperm , guard cells , roots and trichomes. *Plant J.* 2000;24(4):457–466.

46. **Coen ES, Meyerowitz EM.** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 1991. doi:10.1038/353031a0.
47. **Pelaz S, Ditta, G S, Yanofsky, M F.** B and C⁻ oral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. 2000;405(May):9–12.
48. **Soltis D., Soltis P., Albert V., Claude W, Frohlich M., Schiller F.** Missing links : the genetic architecture of flower and floral Floral Genome Project Research Group. *TRENDS In Plant Sci.* 2002;7(1):22–31.
49. **Tsaftaris AS, Pasentsis K, Iliopoulos I, Polidoros AN.** Isolation of three homologous AP1-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.) and characterization of their expression. *Plant Sci.* 2004;166(5):1235–1243.
50. **Tsaftaris AS, Pasentsis K, Polidoros AN.** Isolation of a differentially spliced C-type flower specific AG⁻-like MADS-box gene from *Crocus sativus* and characterization of its expression. 2005;49(4):499–504.
51. **Tsaftaris AS, Polidoros AN, Pasentsis K, Kalivas A.** Tepal formation and expression pattern of B-class paleoAP3-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Sci.* 2006;170(2):238–246.
52. **Tsaftaris A, Polidoros AN, Pasentsis K, Kalivas A.** Cloning, Structural Characterization, and Phylogenetic Analysis of Flower MADS-Box Genes from Crocus (*Crocus sativus* L.). *TSW Dev. Embryol.* 2007;2:73–87.
53. **Tsaftaris A, Pasentsis K, Makris A, Darzentas N, Polidoros A, Kalivas A, Argiriou A.** The study of the E-class SEPALLATA3-like MADS-box genes in wild-type and mutant flowers of cultivated saffron crocus (*Crocus sativus* L.) and its putative progenitors. *J. Plant Physiol.* 2011;168(14):1675–84.
54. **Tymoszuk J, Saniewski M, Rudnicki R.** A Po. *Acta Hortic.* 1979.
55. **Kromer K.** the effect of light conditions on regeneration and level of endogenous growth regulators in muscari racemosum L. Mill. Bulb-scale sections cultured in vitro. *Acta Hortic.* 1989.

56. **Johnson K., Burchett M.** In vitro propagation of. *IOURNAL Horticular Sci.* 1991;66(4):389–394.
57. **Wendy M, Squiores FA, Langton FA, Fenlon JS.** factors influencing the transplantation success of micropropagated narcissus bulbils. *J. Clin. Periodontol.* 1991;66(6):661–671.
58. **Kromer K, Kukulczanka K.** Control of morphogenesis in thin cell layer explants of *Muscari botryoides* Mill. *Acta Hortic.* 1992.
59. **Ault JR.** In Vitro Propagation of *Eucomis autumnalis* , *E. comosa* , and *E. zambesiaca* by Twin-scaling. *HortScience* 1995;30(7):1441–1442.
60. **Ayabe M, Sumi S.** Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 1998;17(10):773–779.
61. **Nayak N, Patnaik S, Rath S.** Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Rep.* 1997:583–586.
62. **Nhut DT.** Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Rep.* 1998;17(12):913–916.
63. **Ulrich M., Davies Jr F., Cheong Koh Y, Duray S, Egilla J.** Micropropagation of *Crinum* ‘Ellen Bosanquet’ by tri-scales. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 1999;82(1-2):95–102.
64. **Tipirdamaz R.** Kardelenin (*Galanthus ikariae* Baker.) Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltım: Eksplant Tipi, Ortam pH’si ve Karbonhidrat Kaynağının Sıvı Soğutma ve Olufumuna Etkisi *. 1999;23:823–830.
65. **Ulrich M., Jr.F.T D, K.Y C, Duray S., Egilla J.** Micropropagation of *Crinum* ‘Ellen Bosanquet’ by tri-scales. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 1999;82(1-2):95–102.
66. **Suzuki S, Nakano M.** ORGANOGENESIS AND SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM CALLUS CULTURES IN *MUSCARI ARMENIACUM* LEICHTL. EX BAK. 2001;(June):382–387.

67. **Wawrosch C, Malla P., kopp B.** Clonal propagation of *Lilium nepalense* D.Don, a threatened medicinal plant of Nepal. *Plant Cell Rep.* 2001;20(4):285–288.
68. **Arslan N, Gürbüz B, Özcan S, Mirici S, Gümüşcü A, Parmaksız İ.** *Sternbergia Candida ve Sternbergia Fischeriana türlerinin Kültüre alınması ve çoğaltılması üzerine araştırmalar.*; 2003.
69. **DANESHVAR-ROYANDAZAGH S, PEHLİVAN EC, TEYKİN EE, ÇİFTÇİ HS.** *Lilium Candidum L.* ' da In Vitro Mikroçoğaltım ile Kozmetik Sanayisine Ham Madde Temini. *Turkish J. Agric. Nat. Sci.* 2014;(2):1911–1916.
70. **Moran G., Colque R, Viladomat F, Bastida J, Codina C.** Mass propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. *Sci. Horticulture* 2003;98:49–60.
71. **GÜNAYDIN S.** In vitro micropropagation of *sternbergia clusiana* (KER-GAWL) KER-GAWL. 2004:59.
72. **Khawar K., Cocu S, Parmaksız İ, Sarihan E., Özcan S.** Mass Proliferation of Madonna Lily (*Lilium Candidum L*) Under In vitro Condition. *pak.J. Bot* 2005;37(2):243–248.
73. **Sevimay CS, Khawar KM, Parmaksız I, Cocu S, Sancak C, Sarihan EO, Özcan S.** Prolific in vitro bulblet formation from bulb scales of meadow lily (*Lilium candidum L.*). *Period. Biol.* 2005;107(1):107–111.
74. **Nasırcılar A, Karagüzel Ö.** *Galanthus elwesii*. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg.* 2006;19(2):159–164.
75. **Ozel CA, Khawar KM.** In vitro Bulblet Regeneration of *Ornithogalum Oligophyllum* E. D. Clarke Using Twin Scale Bulb Explants. *Propag. Ornam. Plants* 2007;7:82–88.
76. **Ozel CA, Khawar KM, Unal F.** Factors affecting efficient in vitro micropropagation of *Muscari muscarimi* Medikus using twin bulb scale. *Saudi J. Biol. Sci.* 2015;22(2):132–138.

77. **Karaoğlu C.** Soğanlı Bitkiler ve in Vitro Hızlı Çoğaltım. *Tarla Bitk. Merk. Araştırma Enstitüsü Derg.* 2010;19(1-2):24–29.
78. **Taeb AG, Alderson PG.** Effect of low temperature and sucrose on bulb development and on the carbohydrate status of bulbing shoots of tulip in vitro. *J. Hortic. Sci.* 1990;65(2):193–197.
79. **Stanilova M, Ilcheva V, Zagorska N.** Morphogenetic potential and in vitro micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. *Plant Cell Rep.* 1994;13. doi:10.1007/BF00231965.
80. **Çakırlar H, Tıprdamaz R, Ellialtıoğlu Ş.** *Türkiye’de ticari değeri olan Galanthus (G. elwesii Hooker Fil. ve G. ikariae Baker.) Türlerinin doku kültürü yoluyla üretimi.*; 1994.
81. **Hannweg K, Watt MP, Berjak P.** A simple method for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants. 2001:213–217.
82. **Bonnier FJM, Van Tuyl JM.** Long term in vitro storage of lily: Effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 1997;49:81–87.
83. **Bhagyalakshmi N.** Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 1999;58:205–211.
84. **Sellés M, Viladomat F, Bastida J, Codina C.** Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: Correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Rep.* 1999;18:646–651.
85. **Slabbert MM, Niederwieser JG.** In vitro bulblet production of *Lachenalia*. *Plant Cell Rep.* 1999;18(June 1998):620–624.
86. **Hussey G.** Totipotency in Tissue Explants and Callus of Some Members of the Liliaceae , Iridaceae , and Amaryllidaceae. 1975;26(91):253–262.
87. **Shibli R., Ajlouni MM.** Somatic embryogenesis in the endemic black iris. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 2000;61:15–21.

88. **Zaidi N, Habib Khan N, Zafar F, Zafar S.** Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants in vitro. *Sci. Vis.* 2000;6(1):58–73.
89. **Ziv M, Lilien-Kipnis H.** Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes in vitro. *Plant Cell Rep.* 2000;19:845–850.
90. **Sage D., Lynn J, Hammatt N.** Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne. *Plant Sci.* 2000;150(2):209–216.
91. **Chen C, Chang-Tesrn C, Yu-Ching T, Wei-Chin C.** A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 2000;41:139–142.
92. **Paek K, Murthy H.** High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 2002:247–252.
93. **Tıprıdamaz R.** Rooting and Acclimatization of In Vitro Micropropagation Snowdrop (*Galanthus ikariae* BAKER .) Bulblets. 2003;16(2):121–126.
94. **Karaoğlu C.** Göl soğanı (*Leucojum aestivum*)`nın vitro koşullarında hızlı çoğaltımı / In vitro micropropagation of summer snowflake (*Leucojum aestivum*). 2004:38.
95. **ORAN SA, FATTASH IA.** In vitro propagation of an endangered medicinal bulbous plant *sternbergia clusiana* Ker-Gawler (*Amaryllidaceae*). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 80(4):399–402.
96. **Naik PK, Nayak S.** Different modes of plant regeneration and factors affecting in vitro bulblet production in *Ornithogalum virens*. 2005;31:409–414.
97. **Hong W, Debergh P.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 1995;43(1):21–28.
98. **Kukulczanka K, Kromer K, Czastka B.** Propagation of *Fritillaria meleagris* L. through tissue culture. *Acta Hortic.* 1989.
99. **Tang W.** Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaflets of *Fritillaria ussuriensis* M. *J. Northeast Agric. Univ. English Ed.* 1995;2(2):152–155.

100. **Yuhong L, Shanmin W, Zhaofang W, Shuqiang L.** Experiment on the rapid reproduction of *Fritillaria taipaiensis* P.Y. Li. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 1996;21(1):15–17.
101. **Paek K.** Several factors affecting bulblet regeneration from the culture of scale segment and.pdf. *Acta Hortic.* 1996;440:498–503.
102. **Borochoy A, Spiegelstein H, Philosoph-Hadas S.** Ethylene and flower petal senescence: Interrelationship with membrane lipid catabolism. *Physiol. Plant.* 1997;100(3):606–612.
103. **Ozel C., Khawar, K M, Karaman S, Ates M., Arslan O.** Efficient in vitro multiplication in *Ornithogalum ulophyllum* Hand.-Mazz. from twin scale explants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2008;116(1):109–112.
104. **Johnson L, Eriksson T.** Induced Embryo Formation in Anther Cultures of Several Anemone Species. *Physiol. Plant.* 1977;40(3):172–174.
105. **Uranbey S.** In vitro bulblet regeneration from immature embryos of endangered and endemic *Muscari azureum*. *Arch. Biol. Sci.* 2011;63(1):209–215.
106. **Karaoğlu C, Çöcü S, İ A, Parmaks İ.** In Vitro Micropropagation of Saffron. *Acta Hortic.* 2007:223–228.
107. **Ozel A., Khawar K., Arslan O, Unal F.** In vitro Macrocarpum, *Muscari* From, Sweet Scale, Twin. *Propag. Ornam. Plants* 2009;9(4):169–175.
108. **Karamian R.** Plantlet Regeneration via Somatic Embryogenesis in Four Species of *Crocus*. *Acta Hortic.* 2004:253–259.
109. **Ahouran M, Hosseini R, Zarghami R.** Regeneration of plantlet from protoplast of *Crocus sativus* L. *N. Biotechnol.* 2009;25(September):S296.
110. **Rajabpoor .Sh., Azghandi AV, Saboora A.** Effects of Different Concentrations of 2,4-D and BAP on Somatic Embryogenesis Induction in Saffron (*Crocus sativus* L.). *Pakistan J. Biol. Sci.* 2007;10(21):3927–3930.

111. **Sheibani M, Azghandi AV, Nemati SH.** Induction of Somatic Embryogenesis in Saffron Using Thidiazuron (TDZ). *Pakistan J. Biol. Sci.* 2007;10(20):3564–3570.
112. **Cavusoglu A, Sulusoglu M, Erkal S.** Plant regeneration and corm formation of saffron (*Crocus sativus* L .) in vitro. *Res. J. Biotechnol.* 2013;8(12):128–133.
113. **Zeybek E, Önde S, Kaya Z.** Improved in vitro micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron. *Cent. Eur. J. Biol.* 2012;7(1):138–145.
114. **Sharma KD, Rathour R, Sharma R, Goel S, Sharma TR, Singh BM.** In vitro cormlet development in *Crocus sativus*. *Biol. Plant.* 2008;52(4):709–712.
115. **Sivanesan I, Jana S, Jeong B.** In-vitro shoot regeneration and microcorm development in *Crocus vernus* (L.) hill. *Pak. J. Bot.* 2014;46(2):693–697.
116. **Mathew B.** *The Crocus: A Revision of the Genus Crocus (Iridaceae)*. Timber Press, Incorporated (January 1, 1982); 1982:224.
117. **Nørbæk R, Brandt K, Nielsen JK, Ørgaard M, Jacobsen N.** Flower pigment composition of *Crocus* species and cultivars used for a chemotaxonomic investigation. *Biochem. Syst. Ecol.* 2002;30(8):763–791.
118. **Özdemir C, Kiliç M.** Morphology and anatomy of three subsp. of *Crocus speciosus* Bieb. *Bangladesh J. Bot.* 2008;37(2):97–103.
119. **KRAVKEZ inci sevinç.** KASTAMONU YÖRESİNDEKİ *Crocus* spp.'NİN FENOLOJİK ÖZELLİKLERİ. 2008.
120. **Grilli Caiola M, Caputo P, Zanier R.** RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biol. Plant.* 2004;48(3):375–380.
121. **Zubor Á., Surányi G, Gy Z, Borbély G, Prokisch J.** Molecular Biological Approach of the Systematics of *Crocus sativus* L . and its Allies. 2004;(i):85–93.
122. **Frello S, Ørgaard M, Jacobsen N, Heslop-Harrison JS.** The genomic organization and evolutionary distribution of a tandemly repeated DNA sequence family in the genus *Crocus* (Iridaceae). *Hereditas* 2004;141(1):81–88.

123. **Sık L, Candan F, Soya S, Karamenderes C, Kesercioğlu T, Tanyolac B.** Genetic Variation Among *Crocus L.* Species from Western Turkey as Revealed by RAPD and ISSR Markers. *Appl. Biol. Sci.* 2008;2(2):73–78.
124. **Erol O, Şık L, Kaya HB, Tanyolac B, Küçüker O.** Genetic diversity of *Crocus antalyensis* B. Mathew (Iridaceae) and a new subspecies from southern Anatolia. *Plant Syst. Evol.* 2011;294(3-4):281–287.
125. **Ohri D.** Genome Size Variation and Plant Systematics. 1998;82(Table 1):75–83.
126. **Brandizzi F, Caiola M.** and Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (Iridaceae). *Plant Sci.* 1998;211:149–154.
127. **Theißen G.** Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001;4:75–85.
128. **Putterill J, Laurie R, Macknight R.** It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* 2004;26(4):363–73.
129. **Kaufmann K, Jose M M, Jauregui R, Airoidi C, Smaczniak C, Krajewski P, Angenent G.** Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the Arabidopsis flower. *PLoS Biol.* 2009;7(4):e1000090.
130. **Aukerman M., Sakai H.** Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes The Plant Cell. *Plant Cell* 2003;15(November):2730–2741.
131. **Chen X.** A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 2004;303(5666):2022–5.
132. **Lu Z-X, Wu M, Loh C-S, Yeong C-Y, Goh C-J.** Nucleotide sequence of a flower-specific MADS box cDNA clone from orchid. *Plant Mol. Biol.* 1993;23(4):901–904.
133. **Murashige T, Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473–497.

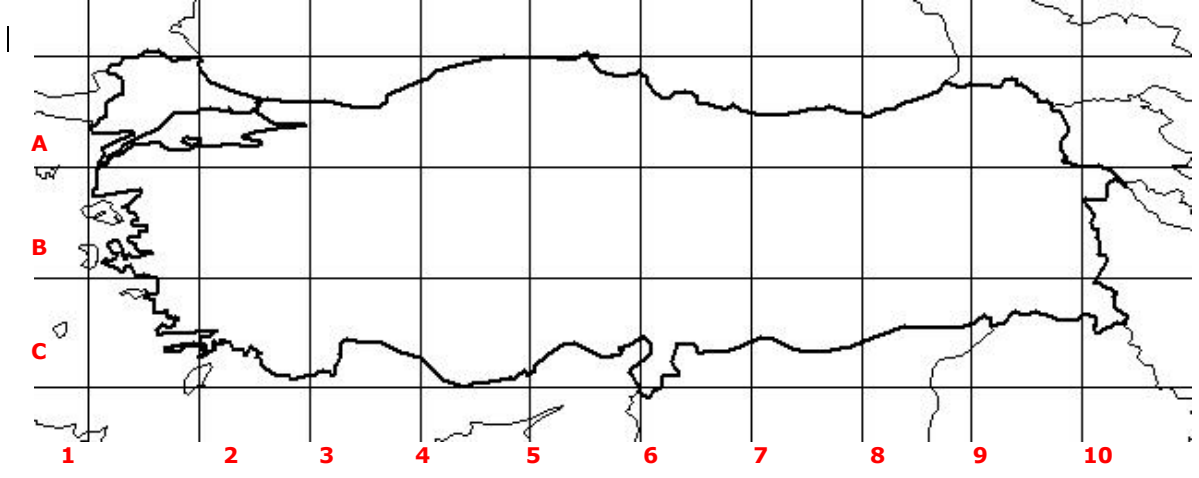
134. **Growth Regulators.** Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue-culture-protocols/growth-regulators.html>.
135. **DÜZGÜNEŞ O, KESİCİ T, GÜRB F.** *İstatistik Metodları 1.* ANKARA: Ankara Üniversitesi. Ziraat Fakültesi; 1983.
136. **SNEDECOR GW, COCHRAN WG.** *Statistical Methods.* Iowa: Iowa State University Press; 1967:593.
137. **Masatoshi N.** *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press; 1987:512.
138. **Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C.** Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 1995;4:347–354.
139. **Wagner HW, Sefc KM.** *Identity 1.0.*; 1999:1–5.
140. **Minch E, Ruiz-linares A, Goldstein D, Feldman M, Cavalli-sforza L.** MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on Microsatellite Allele Data. 1997. Available at: <http://65.54.113.26/Publication/3386604>.
141. **Rohlf FJ.** *NTSYSpc.* New York; 2004:44.
142. **Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J.** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. A* 2003;51(October 2002):127–128; author reply 129.
143. **Allahverdikhan vaziri P.** Endemik Muscari aucheri'nin in vitro klonal çoğaltımı üzerine araştırmalar. 2009:66.
144. **Allan E., Cresswell R, Stepan-Sarkissian G, Scragg A.** *Plant cell and tissue culture.* (Stafford A, Warren G, eds.). Uk: Open University Press; 1991.
145. **Karaoğlu C.** Soğanlı Bitkiler ve in vitro Hızlı Çoğaltımı. 2010;19:24–29.
146. **Vasil V, Srivastava V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK.** Rapid Production of Transgenic Wheat Plants by Direct Bombardment of Cultured Immature Embryos. *Nat. Biotechnol.* 1993;11:1553–1558.

147. **Özcan S, Barghchi M, Firek S, Draper J.** Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 1993;34:271–277.
148. **Ozcan S, Sevimay CS, Yddlz M, Sancak C, Ozgen M.** Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *Plant Cell Rep.* 1996;16:200–203.
149. **Mirici S, Parmaksız İ, Özcan S, Sancak C, Uranbey S, Sarıhan EO, Gümüştü A, Gürbüz B, Arslan N.** Efficient in vitro bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 2005;80(3):239–246.
150. **Arslan N, Gurbuz B, Gumuscu A, Ozcan S, Mirici S, Khawar KM.** Cultivation of *Sternbergia fischeriana* (Herbert) rupr., and a study on its morphological characteristics. *Pakistan J. Bot.* 2002;34:411–418.
151. **Simona L, Cerasela P, Florina F, Lazar A, Giancarla V, Danci M, Maria B.** In vitro regeneration of *Crocus sativus* L. *Hortic. For. Biotechnol.* 2013;17(2):244–247.
152. **Vazîrî PA.** Efficient in vitro Micropropagation for the Conservation of Endemic and Endangered aucher-elyo grape hyacinth [*Muscari Aucheri* (boiss .) Baker]. 2014;8(1):80–83.
153. **URANBEY S, Basalma D, Saruhan EO, İpek A, Çöçü S, Çalıskan M, Kaya D, Avcı S.** *Muscari azureum* ve *Muscari aucheri* ' nin kültüre alınması ve *In Vitro* hızlı çoğaltımı.; 2009:1–153.
154. **Alavi-Kia SS, Mohammadi S a., Aharizad S, Moghaddam M.** Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *Crocus* genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2008;22(14):795–800.
155. **Beiki AH, Keifi F, Mozafari J.** Genetic Differentiation of *Crucus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. *Genet. Eng. Biotechnol. J.* 2010;18:1–10.

156. **Keify F, Beiki AH.** Exploitation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for genetic diversity of saffron collection. *J. Med. Plants Res.* 2012;6(14):2761–2768.
157. **Erol O, Kaya HB, Şik L, Tuna M, Can L, Tanyolaç MB.** Te genus *Crocus*, series *Crocus* (Iridaceae) in Turkey and 2 East Aegean Islands: A genetic approach. *Turkish J. Biol.* 2014;38:48–62.
158. **Namayandeh A, Nemati Z, Kamelmanesh MM, Mokhtari M, Mardi M.** Genetic relationships among species of Iranian crocus (*Crocus* spp.). *Crop Breed. J.* 2013;3:61–67.
159. **Sefc KM, Lefort F, Grando MS, Scott KD, Steinkellner H, Thomas MR.** Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: Roubelakis-Angelakis KA, ed. *Molecular Biology & Biotechnology of Grapevine*. Kluwer Academic Publishers The Netherlands; 2001:1–30.
160. **Nemati Z, Mardi M, Majidian P, Zeinalabedini M, Pirseyedi SM, Bahadori M.** Saffron (*Crocus sativus* L.), a monomorphic or polymorphic species? *Spanish J. Agric. Res.* 2014;12(3):753–762.
161. **Oddou-Muratorio S, Vendramin GG, Buiteveld J, Fady B.** Population estimators or progeny tests: What is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? *Conserv. Genet.* 2009;10:1343–1347.
162. **Bennett M., Leitch IJ.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.* 1995;76:113–176.
163. **Hocquigny S, Pelsy F, Dumas V, Kindt S, Heloir M-C, Merdinoglu D.** Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome* 2004;47(3):579–589.

EKLER

Karelere göre sınıflandırmak



Crocus speciosus subsp. *ilgazensis* alt türünün kordinantlara göre yerleşimi: A4, A5, A8
Crocus speciosus Bieb. subsp. *xantholaimos* alttürünün kordinantlara göre yerleşimi: A5
Crocus speciosus Bieb. subsp. *speciosus* alt türünün kordinantlara göre yerleşimi: A7, A3, B5, B3, B6, C3

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Parizad ALLAHVERDİKHAN VAZİRİ

Doğum yeri :Tabriz, İran

Doğum Tarihi :11.03.1982

Medeni Hali :Evli

Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu :

Lise : Biyoloji bölümü, Tohid lisesi

Lisans :Tebriz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü

Doktora : Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü

Email: parizad_vaziri_82@yahoo.com

Diller:

İngilizce

Türkçe

Farsça

Arapça

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

Tebriz Üniversitesinin yürüttüğü aşağıdaki milli projelerle işbirliği (1999-2000) :

1. Protein markerları ve kantitatif özellikleriyle Korunga popuasyonlarının genetik değişimi.
2. Farklı bitki sıklığının Azerbaycan Korunga populasyonuna etkisi.
3. Yonca ve Korungada cinsler arası melezleme.
- 4.Soya fasulyesi ve Sorgum bitkilerinin ekolojisi

5.10 farklı sınırlı sulama şeklinin verim ve verim öğeleri yönünden karşılaştırması.

Biyoloji öğretmenliği (2002-2007)

Geoloji öğretmenliği (2003-2007)

İngilizce öğretmenliği (2003-2007)

Lisans seminar konusu: Physiological assessment of apetalous flower and arectophilepods on oilseed rate (*Brasicanapus*)

Yüksek lisans tez konusu:

Endemik *Muscari Aucheri*'nin *in vitro* Klonal Çoğaltımı Üzerine Araştırmalar

Doktora seminar konusu: Transformation studies and molecular characterization in ornamental and medicinal geophy tespecies

Doktora tez konusu:

Crocus speciosus Bieb. türlerinin *in vitro* çoğaltımı, moleküler ve sitogenetik analizleri ve MADS-box genleri ifadelerinin belirlenmesi

kurslar / sempozyumlara katılımı:

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ,Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünün 'Bitki Biyoteknolojileri Uygulamaları' Eğitim Programı(06-08 Ekim 2008)

I. Biyoteknoloji Araştırma ve Kariyer Günü (25 Mayıs 2009)

8. Ankara Biyoteknoloji Günleri(08-10 Kasım 2010) Türkiye Biyoteknoloji Politikaları ve Biyogüvenlik Konulu Konferanslar

Çankırı Tarım sempozyum (Prof. Dr. Selahattin İPTAŞ Anısına) 20-23 Nisan 2010 Çankırı

9. Ankara Biyoteknoloji Günleri (17-18 Kasım 2011) "Mikrobiyal Biyoteknoloji" konulu konferansları

Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu (TİBAS 2012) Tokat

V.Süs bitkiler kongresi (06-09 mayıs 2013)Yalova

Türkiye 10.Tarla Bitkileri Kongresi Konya 2013

Posterler:

Allahverdikhhan-Vaziri P. 2009 Endemik *Muscari aucheri*'nin *in vitro* klonal çoğaltımı (*In vitro* clonal micropropagation of endemic *Muscariaucheri*). 1. Araştırma ve Kariyer günler, Ankara Üniversitesi, BiyoteknolojiEnistitüsü

Allahverdikhhan-Vaziri P.,Afshar Pour Rezaeieh, K. 2012 Scopingthe Conserved Micro-RNAs and Their Target Transcripts in Eukaryotes Cells. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 5 (2): 96-98, ISSN: 1308-0040, E-ISSN: 2146-0132, www.nobel.gen.tr

Yayınlar:

Allahverdikhhan-Vaziri, P.,Uranbey, S., Khawar, Kh.,Sancak, C., 2012, Combination of modern micropropagation and traditional breeding methods of introduction for the conservation of endemic and endangered *Muscariaucheri*, 5th International Symposium Breeding Reserch on Medicinal and Aromatic Plants.

Afshar Pour Rezaeieh, K.,**Allahverdikhhan-Vaziri P.,** 2012 Enhanced Plantlet Induction from Cultured Segments of Saffron (*Crocus sativus* L.) through *In vitro* Micropropagation: Background and Prospects.Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 5 (2): 29-31, ISSN: 1308-0040, E-ISSN: 2146-0132, www.nobel.gen.tr

Derelli, E.,**Allahverdikhhan-Vaziri, P.,** Mırzapour, M., Yıldız, M.,2012, Dokudaki Su Eksikliğinin Neden Olduğu Stresin *in vitro* Şartlar Altında Keten (*LinumUsitatissimum*L.) Hipokotil Eksplantlarından Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkisi, [Water deficiency stress in tissues could effect regeneration from flax (*LinumUsitatissimum* L.) hypocotyl explants]Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi 5 (1): 153-156, ISSN: 1308-3945, E-ISSN: 1308-027X, www.nobel.gen.tr

Allahverdikhhan-Vaziri, P., Derelli, E., Geofitlerde *in vitro* mikroçoğaltım, [in vitro Micropropagation of geophytes] Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu (TİBAS 2012) Tokat

Allahverdikhhan-Vaziri,P., Daneshvar-Rouyandezagh,S., *Crocus speciosus* Bieb. Bitkisinde *in vitro* rejenerasyon çalışmaları,[*in vitro* regeneration from *Crocus speciosus* Bieb.]Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu (TİBAS 2012) Tokat

Daneshvar-Rouyandezagh,S.,**Allahverdikhhan-Vaziri, P.,**Khawar,KM., Türkiye meyankökü (*Glycyrrhizaglabra*)'nın *in vitro* çoğaltımı, [In vitro propagation of Turkish liquorice (*Glycyrrhizaglabra*)] Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu (TİBAS 2012) Tokat

Ebru Derelli, **Parizad Allahverdikhhan Vaziri,** Negar Ebrahim Pour Mokhtari *Crocus ancyrensis* (Ankara Çiğdemi) Türünün *in vitro* Mikroçoğaltımı. V.Sus bitkiler kongresi (06-09 mayis 2013) Yalova

Negar Ebrahim Pour Mokhtari, **Parizad Allahverdikhhan Vaziri,** Khalid Mahmood Khawar. Türkiye'de Ters Lale (*Fritillaria Imperialis*) Bitkisi Üzerinde Yapılan Doku Kültürü Çalışmaların İncelnemesi. V.Sus bitkiler kongresi (06-09 mayis 2013) Yalova

Ebru Derelli, **Parizad Allahverdikhhan Vaziri.** *Sternbergia* Cinsinde *in vitro* Rejenerasyon Çalışmaları. V.Sus bitkiler kongresi (06-09 mayis 2013) Yalova

Parizad Allahverdikhhan Vaziri, Negar Ebrahimpour Mokhtari, serkan Uranbey, Khalid Mahmood Khawar, cengiz Sancak. 2013, *Crocus speciosus* bieb Bitkisinde *in vitro* Regenerasyon Calismalari. Turkiye 10.Tarla Bitkileri Kongresi Konya

Negar Ebrahimpour Mokhtari, **Parizad Allahverdikhhan Vaziri,** Surendra Barpete, Khalid Mahmood Khawar, deniz Kom, 2013. ZnSO₄ Osmoprining Uygulamasinin Lathyrus sativa ev Gurbuz Tohumlarinin Cimlanme Hizi ve Gucu Uzerinde Olan Etkisi. Turkiye 10.Tarla Bitkileri Kongresi Konya

Allahverdikhhan-Vaziri, P., Uranbey, S.,Sancak, C., 2014 Efficient *In Vitro* Micropropagation For The Conservation Of Endemic And Endangered Aucher-Eloy Grape Hyacinth [*Muscari Aucheri* (Boiss.) Baker] .Journal of applied biological sciences8 (1): 80-83, 2014 ISSN: 1307-1130, E-ISSN: 2146-0108, www.nobel.gen.tr