

***Colchicum speciosum*'da Somatik Embriyogenesis Yöntemi ile Rejenerasyonun Araştırılması**

Aslıhan AĞAR ÖZKAYA^{1*}, Senem UĞUR², Muhammet Şamil ÖZDEMİR³, Neslihan Yeşim YALÇIN MENDİ⁴

¹Çukurova Üniversitesi, Pozantı Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim, Pozantı/Adana; ORCID: 0009-0004-0874-1636

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana; ORCID: 0000-0003-2826-4123

³Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana; ORCID: 0000-0003-4142-7302

⁴Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana; ORCID: 0000-0002-4587-5156

Gönderilme Tarihi: 6 Kasım 2024

Kabul Tarihi: 28 Kasım 2024

ÖZ

Bu çalışmada, *Colchicum speciosum*'un somatik embriyogenesis yöntemi ile rejenerasyonu ve sentetik tohum üretim protokolleri araştırılmıştır. Somatik embriyogenesis'in araştırıldığı deneyler kapsamında eksplant kaynağı olarak bitkinin kormları kullanılmıştır. Yapılan rejenerasyon araştırılmasında 30 farklı konsantrasyon ve kombinasyonda BA (0, 0.1 ve 0.5 mg.l⁻¹) 2İP (0, 0.1 ve 0.5 mg.l⁻¹), NAA (0, 0.5, 1 ve 2 mg.l⁻¹) ve 2,4-D (0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg.l⁻¹) bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besiyeri denenmiştir. Yapılan uygulamalarda 2 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyerinde (%46,66) en fazla embriyojenik kallus oluşumu, en yüksek embriyo oluşumu 2 mg.l⁻¹ 2,4-D ve 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP (%40) içeren MS besiyerinde gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak yapılan 2,4-D (2, 4 ve 6 mg.l⁻¹) ve 2İP (0.1 ve 0.5 mg.l⁻¹) içeren diğer çalışmada 2,4-D (6 mg.l⁻¹) içeren MS besiyerinde en yüksek embriyojenik kallus (%73,33) ve en yüksek somatik embriyo oluşumu (%40) meydana gelmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol uygulamasında herhangi bir gelişme olmamıştır. *C.speciosum* türünde 2,4-D (2 mg.l⁻¹) içeren MS besiyerinde bitkiciğ dönüşüm sağlanmıştır. Çalışma kapsamında elde edilmiş olan somatik embriyolar %3'lük Na alginat ile kaplanarak sentetik tohum elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Colchicum speciosum*, somatik embriyogenesis, *in vitro*, sentetik tohum

Investigation of Regeneration in *Colchicum speciosum* Using Somatic Embryogenesis Method

ABSTRACT

In this study, regeneration of *Colchicum speciosum* by somatic embryogenesis method and synthetic seed production protocols were investigated. In the experiments investigating somatic embryogenesis, plant corms were used as explant source. In the regeneration research, MS medium containing 2,4-D (0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg.l⁻¹), BA (0, 0.1 and 0.5 mg.l⁻¹), 2İP (0, 0.1 and 0.5 mg.l⁻¹) and NAA (0, 0.5, 1 and 2 mg.l⁻¹) plant growth regulators in 30 different concentrations and combinations were tested. In the applications, the highest embryogenic callus formation (46.66%) was observed in MS medium containing 2 mg.l⁻¹ 2,4-D and the highest embryo formation was observed in MS medium containing 2 mg.l⁻¹ 2,4-D and 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg.l⁻¹ 2İP (40%). In another study conducted parallel to this study containing 2,4-D (2, 4 and 6 mg.l⁻¹) and 2İP (0.1 and 0.5 mg.l⁻¹), the highest embryogenic callus (73.33%) and the highest somatic embryo formation (40%) occurred in 6 mg.l⁻¹ 2,4-D MS medium. There was no development in the control application not containing plant growth regulator. In *C.speciosum* species, transformation into plantlets was achieved in MS medium containing 2 mg.l⁻¹ 2,4-D. Synthetic seeds were obtained by coating the somatic embryos obtained within the scope of the study with 3% Na alginate.

Keywords: *Colchicum speciosum*, somatic embryogenesis, *in vitro*, synthetic seed

GİRİŞ

Colchicum, *Colchicaceae* familyası içerisinde yer almaktadır. Bahçecilik, süs bitkisi ve ilaç sanayi için metabolit üretimi açısından önemli bir yere sahiptir [1]. Türkiye, *Colchicum* türlerinin sayısı bakımından en zengin bölgelerden biridir ve gen merkezi olarak görülmektedir. Dünya çapında 99 türle temsil edilir.

Bu türlerin 47'si (49 takson) Türkiye'de yetişir ve bunların 35 tanesi endemiktir. Çiçeklenme zamanına göre ilkbahar ve sonbahar olarak 2'ye ayrılmaktadır. Türlerin yaklaşık %60'ı sonbaharda çiçek açan ve histerantus yapraklara sahip türlerdir [2, 3, 4].

Sentetik tohum *in vitro* çoğaltım yöntemlerinden biri olan somatik embriyogenesis'in kullanım alanları arasında yer almaktadır. Bundan dolayı *in vitro*

*Sorumlu yazar / Corresponding author: asliagar@gmail.com

koşullarda bitki elde edilmesi ve bitkinin muhafaza edilerek korunması açısından önemlidir. Sentetik tohum üretim yöntemi ile *in vitro* çalışmalar karşılaştırıldığında eksplantların canlı kalma yüzdesi büyük oranda arttırılabilmektedir. Somatik embriyolar ve embriyojenik kalluslar kullanılarak sentetik tohum elde edilmektedir. Elde edilen sentetik tohumlar, tohumla çoğaltılmaları zor olan bitkilerin çoğaltılması, nesli tükenme tehlikesi altında olan bitkilerin neslinin devam ettirilmesi açısından ve diğer yandan da ekonomik olarak büyük bir öneme sahiptir. Somatik embriyolar kullanılarak elde edilmiş olan sentetik tohumlardan klonal çoğaltım yapılmakta ve zigotik embriyolarda olduğu gibi genetik açılım görülmez. Doku kültürü çalışmalarından elde edilmiş olan somatik embriyolar kullanılarak oluşturulan sentetik tohumlar bitkilerin klonal çoğaltımında kullanılması, endemizm oranı oldukça yüksek olan *Colchicum* gibi çoğalma katsayısı düşük türlerin çoğaltılması için önemlidir. Bundan dolayı bu çalışmada *Colchicum speciosum*'da somatik embriyogenesis yöntemi ile rejenerasyonu araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Sonbahar döneminde çiçeklenen *Colchicum speciosum* Stev. (2n=38) ülkemizde Kuzey Anadolu bölgesinde yer alan illerin 700-2600 m yüksekliklerde yer alan orman ve kayalık bölgelerde bulunmaktadır [3].

Metot

Çalışma Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarında yapılmıştır. Bitkisel materyal Samsun, Atakum, Erikli köyü mevkiinden toplanmıştır (36°03'33,9"K; 41°21'39,9"D). Toplanan bitkilerin bir kısmı kök bölgeleri topraktan arındırıldıktan sonra kese kağıtları içerisine koyularak +4°C'de çalışma botunca muhafaza edilmiştir. Diğer bitkiler ise sera koşullarında torf:perlit:kum (1:1:1 v/v/v) karışımı içeren saksılara dikilmiştir.

•*Yüzey Sterilizasyonu:* *Colchicum speciosum* kormları *in vitro* çalışmalarda eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. *Colchicum speciosum* bitkisi araziden toplandıktan sonra *in vitro* çalışma yapılacak olan laboratuvara getirilerek yaprak ve çiçekler temizlenerek sadece kormların tek kalması sağlanarak temizleme ve ayıklama işlemi yapılmıştır. Çoğunlukla hastalık belirtisi bulunmayan bitkiler tercih edilmiştir. Bu işlemler yapıldıktan sonra

çalışmanın en önemli ve ilk aşaması olan yüzey sterilizasyonu yapılmıştır.

Sterilizasyon işleminde öncelikli olarak musluk suyu altında 20 dakika bekletilen *Colchicum* kormları, sonra antibakteriyel sıvı sabun ile yıkanan kormlar çeker ocak içinde Fungusit'te (%0.1'lik) 1 dakika ardından HgCl₂ (%0.2'lik) 20 dakika bekletilip ardından saf su yıkanmıştır. Bu uygulamalardan sonra laminar akımlı steril kabin içerisinde %70'lik EtOH 3 dakika, steril saf su ile durulama ve içerisinde 3 damla Tween 20 eklenmiş %30'luk Sodyum Hipoklorit (NaOH) 30 dakika, sonra 3 defa steril saf su ile durulama işlemi yapılarak yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

•*Embriyojenik Kallus ve Somatik Embriyo Geliştirme Ortamı:* Çalışmada optimum somatik embriyogenesis ortamını belirlemek amacıyla ½ MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel besi ortamı olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada embriyojenik Kallus ve somatik embriyo geliştirme için optimum ortam şartlarını belirlemek amacıyla rejenerasyon, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumu için büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D (0, 0.5, 1, 2 mg.l⁻¹), BA (0, 0.1, 0.5 mg.l⁻¹), 2İP (0, 0.5, 1, 2 mg.l⁻¹) ve NAA (0, 0.5, 1, 2 mg.l⁻¹) kombinasyonlarını içeren 30 farklı MS besi yeri kullanılmıştır. Kullanılan besi ortamlarına 2,2 mg.l⁻¹ MS, 0.5 g.l⁻¹ aktif karbon, 30 g.l⁻¹ sakaroz, 4 g.l⁻¹ gelrite eklenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda 2,4-D (2, 4, 6 mg.l⁻¹) ve 2İP (0.1, 0.5 mg.l⁻¹) farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Hazırlanan besi ortamları pH'ı 5,7'ye ayarlandıktan sonra sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu ve somatik embriyogenesis çalışmalarına başlamadan önce bütün alet ekipmanlar 15 dakika 121°C'de 1,05 atmosfer basınç koşullarında, otoklav içerisinde sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Çalışma süresince steril koşulların sağlanması için steril kabin içerisinde kullanılan aletler %96'lık etil alkolde 2 saniye bekletildikten sonra elektrikli sterilizatörde bekletilerek steril koşullar sağlandıktan sonra alt kültür ve transfer işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanan kormlar, 3-4 mm çapında kesilerek her petriye 5 adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Eksplantlar büyüme odasında 25±1°C karanlık koşullarda kültüre alınarak gelişmeleri gözlemlenmiştir. Eksplantların embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumları gözlemlenene kadar alt kültür işlemleri 4 haftada bir olacak şekilde yapılmıştır.

•*Çimlendirme Ortamı:* Elde edilen embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumları çimlendirilmek üzere içerisinde bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2 mg.l⁻¹ GA₃ + 0.1 mg.l⁻¹ BA, 1 mg.l⁻¹ prolin, 30 g.l⁻¹

sükroz ve 3.5 g.l⁻¹gelrite eklenmiş olan MS ortamında, diğer kısmı ise hormonsuz MS ortamında çimlendirilmek üzere 25±1°C büyüme odası koşullarında (16 fotoperiyodisite, beyaz floresan ışık) kültüre alınarak gelişimleri gözlemlenmiştir.

•*Sentetik Tohum Elde Edilmesi: Colchicum speciosum*'dan elde edilen embriyojenik yapılar enkapsüle edilmiştir. Sentetik tohum denemelerinde, iki ayrı kültür ortamı kullanılmıştır: ½ MS ve Rugini Olive Medium (ROM, Rugini, 1984). Her bir besi yerinde 1 g.l⁻¹prolin ve 0.05 g.l⁻¹ spermin olan ve olmayan besi ortamları kullanılmıştır. Enkapsülasyon denemelerinde kontrol olarak, içerisinde bitki büyüme düzenleyici olmayan MS ve ROM besi yerleri kullanılmıştır.

Kullanılacak olan embriyolar yakın benzerlikte olacak şekilde uygun sayıda seçilmiş ve %3 aljinat + MS-ROM çözeltisi (%3 Na-alginat+Ca içermeyen sıvı MS-ROM) içerisine atılmıştır. Çözelti içerisinde 30 dk 25°C'de bekletildikten sonra, pipet uçları kullanılarak aljinat ile kaplanmış embriyolar çekilerek yavaş bir şekilde 100 mM CaCl₂ içeren çözeltiye aktarılmıştır (sürekli çalkalama işlemi yapılarak sentetik tohumların birbirine yapışması engellenmiştir). Damlatma işleminin devamında 10 dakika CaCl₂ solüsyonunda bekledikten sonra dışı sertleşen ve şeffaf boncuk görünümünü alan sentetik tohumlar metal filtreye aktarılmıştır. Sentetik tohumların yüzeyindeki kalsiyum klorür çözeltisini bir filtreye koyup ve steril saf suyla birkaç kez durulayarak uzaklaştırıldıktan sonra sentetik tohumlar daha sonra kurumaları için steril kurutma kağıdı üzerine yerleştirilmiştir.

Elde edilen sentetik tohumların rejenerasyon yeteneklerini koruyup korumadıklarını belirlemek için 1 mg.l⁻¹ BA, 1 mg.l⁻¹ 2,4-D ve kombinasyonlarını içeren MS ve ROM besi yerlerine aktarılarak kültüre alınmıştır (25°C'de karanlıkta).

•*Histolojik Analizler:* Deneme sonucunda elde edilen embriyojenik kallus oluşum aşamalarını belirlemek için histolojik analizler yapılmıştır.

a) *Eksplantların Fiksasyon Solüsyonu İçerisine Alınması:* Eksplantlar (FPA:formaldehit: propiyonik asit: alkol) (900 ml %70'lik alkol + 50 ml propiyonik asit + 50 ml formaldehit) solüsyonu içerisine alınmıştır.

b) *Örneklerin Parafin Bloklar İçine Alınması:* Fiksasyon solüsyonundaki eksplantlar, parafin bloklar içerisine yerleştirilmeden önce sıra ile %70 (300 ml saf su + 500 ml %96'lık etil alkol+200 ml tersiyer bütül alkol), %85 (100 ml saf su+500 ml %96'lık etil alkol+350 ml tersiyer bütül alkol), %95(450 ml %96'lık etil alkol+550 ml tersiyer bütül alkol), %100 (200 ml %96'lık etil alkol+800 ml tersiyer bütül alkol) konsantrasyona sahip Johansen

çözeltisi içerisinde bekletilmiştir (Çizelge 1). Fiksasyon işleminden sonra örnekler, her bir alkol konsantrasyonunda 2 saat bekletilerek vakum altında 30-35 dakika süreyle vakumlama işlemi yapılmıştır. Daha sonra, tersiyer bütül alkol (TBA-1) sıvısı içerisinde 1 gece, TBA-2 ve TBA-3 sıvıları içerisinde 3'er saat bekletilmiş ve petri kapları içerisinde 60-65°C'de eritilen sıvı parafin içerisine konulmuştur. Etüvde 60-65°C'de 2-3 gün süreyle tutulduktan sonra, etüv dışına alınmış, buz üzerinde hızla soğumaya bırakılmış ve sertleşmesi sağlanmıştır.

c) *Parafin Bloklar İçerisindeki Örneklerin Kesitlerinin Alınması:* Rotasyon mikrotom kullanılarak, tahta bloklar üzerine alınan örneklerden 8 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Daha sonra, örneklerden alınan kesitler lamlara yerleştirildikten sonra 35-40°C sıcaklığındaki sıcak yüzey (hot plate) üzerine konulmuştur. Sıcak yüzey üzerindeki her bir lam'a bir damlalık yardımıyla saf su ilave edilmiştir. Bu işlemlerden sonra, lam üzerindeki kesitler bir gece boyunca 30-35°C'deki etüv içerisinde bekletilmiştir (Eti, 1987).

d) *Kesitlerden Alınan Örneklerin Boyanması:* Lamlar, lam taşıyıcıları üzerine yerleştirilmiş ve 10'ar dk. ksilol-1, ksilol-2'de bekletilmiş, parafinin erimesi ve örneklerden ayrılması sağlanmıştır. Bu aşamada örnekler, ilk olarak izopropil alkol-1 ve izopropil alkol-2'de 5'er dk., daha sonra %96'dan başlayarak sırasıyla %70, %40 ve %20 olacak şekilde dereceleri azalan alkol küvetlerinde ve son olarak da saf su içerisinde 3'er dk. bekletilmiştir.

•*Deneme Planı ve İstatistiksel Analizler:* Çalışma kapsamında somatik embriyogenesis denemeleri 3 tekerrür ve her tekerrürde 5 petri ve her petri içerisinde 5 eksplant olacak şekilde tesadüf parselleri deneme düzenine göre planlanmıştır. Kültüre alınan eksplantlar 4 haftada bir alt kültür yapılmıştır. Sentetik tohum denemeleri 3 tekerrür (3 tekerrür × 5 petri ×10 eksplant) olacak şekilde planlanmıştır. Elde edilen verilerin yüzde değerleri hesaplandıktan sonra açı transformasyonu uygulanmıştır. Verilerin analizinde JMP (versiyon 9) paket programı kullanılmıştır. LSD (P<0.01) testi yapılarak ortalamaların önem dereceleri karşılaştırılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yüzey Sterilizasyonu

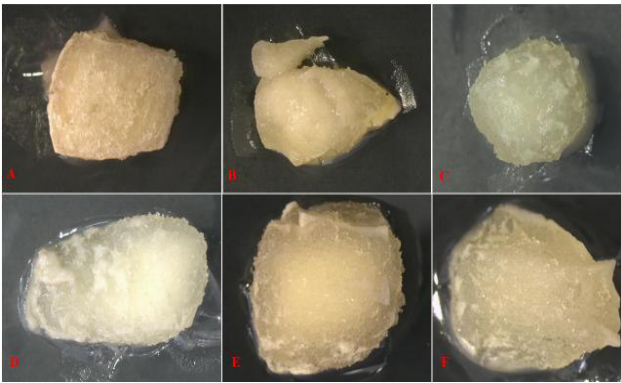
Çalışması kapsamında, *C.speciosum* türünün kormlarına uygulanan sterilizasyon yöntemi (musluk suyu; 20 dk., %0.1 fungusit; 1 dk., %0.2 HgCl₂; 20 dk., saf su ile durulama %70 EtOH; 3 dk., saf su ile durulama %30 NaOCl; 30 dk.) sonucunda somatik embriyogenesis denemesinde sonrasında %60 oranında başarı elde edilmiştir.

Somatik Embriyogenesis

Optimum somatik embriyogenesis protokollerini oluşturabilmek için; *C.speciosum* türünde 2,4-D (0, 0.5, 1, 2 mg.l⁻¹), BA (0, 0.5, 1, 2 mg.l⁻¹), 2İP (0, 0.5, 1, 2 mg.l⁻¹) ve NAA (0, 0.5, 1, 2 mg.l⁻¹)'nın farklı konsantrasyonlarda kombinasyonlarını içeren MS ortamı denenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda şişkinleşme, embriyojenik kallus, somatik embriyo verileri doğrultusunda 2,4-D (2, 4, 6 mg.l⁻¹) ve 2İP (0.1, 0.5 mg.l⁻¹) farklı konsantrasyonları kullanılarak yeni bir deneme kurulmuştur. Elde edilen embriyojenik yapıların bir kısmı çimlendirilmek üzere 2 mg.l⁻¹ GA₃ + 0.1 mg.l⁻¹ BA, 1 mg.l⁻¹ prolin, 30 g.l⁻¹ sükröz ve 3.5 g.l⁻¹ gelrite içeren MS ortamına ve hormonsuz MS ortamına aktarılmıştır. Embriyojenik yapıların diğer kısmı ise sentetik tohum elde etmek için enkapsüle edilmiştir. BBD içermeyen kontrol grubunda, NAA ve NAA + BA, NAA + 2İP kombinasyonlarında herhangi bir gelişme olmamıştır (Çizelge 1).

Şişkinleşme

C.speciosum türünde yapılan somatik embriyogenesis çalışmasında, deneme kurulduktan 5 hafta sonra şişkinleşme gelişimleri gözlemlenmiştir. Şişkinleşme oluşum oranlarına besi yerlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 1). Yapılan deneme sonucunda en yüksek şişkinleşme oranı %80 ile 2 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besi yerinde elde edilmiştir. En düşük şişkinleşme oranı %20 ile 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ BA, 0,5 mg.l⁻¹ 2,4-D ve 0,5 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP içeren MS besi yerinde elde edilmiştir.



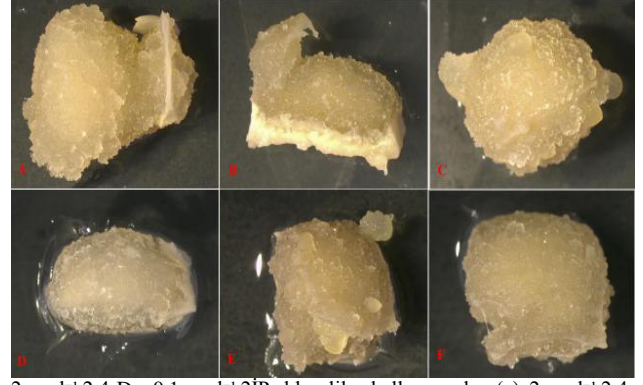
2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP elde edilen şişkinleşme yapıları (a), 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l⁻¹ 2İP elde edilen şişkinleşme yapıları (b), 2 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen şişkinleşme yapıları

Şekil 1. Eksplantlar kültürüne alındıktan 5 hafta sonra oluşan şişkinleşme yapıları

Kallus Oluşum

C.speciosum'da yapılan somatik embriyogenesis denemesinde 12. haftadan itibaren embriyojenik kallus oluşumu gözlemlenmeye başlanmıştır.

Embriyojenik kallus oluşumları yoğun olmamakla beraber açık kahverengi ve sarı renkte olup sert yapıda oldukları gözlemlenmiştir. Embriyojenik kallus oluşum oranlarına besi yerlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 2). En yüksek embriyojenik kallus oluşumu %46,66 oran ile 2 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyerinde elde edilmiştir. En düşük embriyojenik kallus oluşumu %20 ile 1 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besi yerinde meydana gelmiştir.



2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP elde edilen kallus yapıları (a), 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l⁻¹ 2İP elde edilen kallus yapıları (b), 2 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen kallus yapıları (c), 4 mg.l⁻¹ 2,4-D' de ortamında elde edilen kallus yapıları (d), 6 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen kallus yapıları (e), 1 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen kallus yapıları (f)

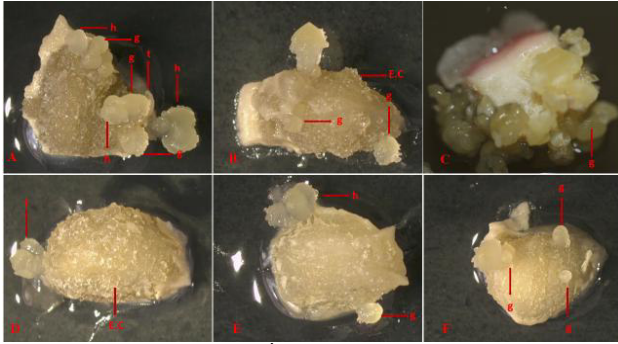
Şekil 2. Eksplantlar kültürüne alındıktan 12 hafta sonra oluşan embriyojenik kallus yapıları

Embriyo Oluşumu

C.speciosum'da elde edilen kalluslar üzerinden 21. Haftadan itibaren somatik embriyolar oluşmaya başlamıştır. Elde edilen embriyojenik yapılar, açık sarı renkli ve kompakt yapıdadır (Şekil 3). Somatik embriyo oluşum oranlarına besi yerlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Somatik embriyo oluşum değerleri incelendiğinde, en yüksek embriyo oluşumu, %40 oran ile 2 mg.l⁻¹ 2,4-D ve 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP içeren MS besiyerinde, elde edilmiştir. En düşük embriyo oluşumu ise %11,66 oran ile 1 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP içeren MS besiyerinde elde edilmiştir.

Optimum somatik embriyogenesis protokolünü belirlemek için yapılan ilk denemede embriyo oluşumu en yüksek olan 2 mg.l⁻¹ 2,4-D+0,1 mg.l⁻¹ 2İP, 2 mg.l⁻¹ 2,4-D+0,5 mg.l⁻¹ 2İP ve 2 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyerlerinde, ayrıca 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarında (4-6 mg.l⁻¹) 2. kez aynı bölgeden çiçeklenme döneminde toplanmış olan *C.speciosum*'a ait genotiplerde yeni deneme kurulmuştur (Çizelge 2). *Colchicum speciosum* türünde yapılan bu deneme sonucunda besi yerlerinin şişkinleşme, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumlarına etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır, Bitki büyüme düzenleyicisi

içermeyen kontrol grubunda herhangi bir gelişme olmamıştır.



2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP elde edilen globular, kalp ve torpedo aşamadaki embriyolar (a), 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l⁻¹ 2İP elde edilen globular aşamadaki embriyo ve embriyojenik kallus (b), 2 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen globular aşamadaki somatik embriyolar (c), 4 mg.l⁻¹ 2,4-D'de ortamında elde edilen torpedo aşamadaki somatik embriyo (d), 6 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen globular, kalp aşamasındaki somatik embriyolar (e), 1 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen globular aşamadaki somatik embriyolar (f), (g:globular, h:heart, t:torpedo, c:cotyledon, EC:embriyojenik callus)

Şekil 3. Eksplantlar kültüre alındıktan 21 hafta sonra oluşan somatik embriyolar

Eksplantlar kültüre alındıktan sonra 4. haftadan itibaren şişkinleşme meydana gelmiştir. Elde edilen verilere göre en yüksek şişkinleşme %100 oran ile 4 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyerinde en düşük şişkinleşme oranı %60,00 ile 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP içeren MS besiyerinde olduğu belirlenmiştir.

Embriyojenik kallus oluşumları eksplantlar kültüre alındıktan 8 hafta sonra oluşmaya başlamıştır. En yüksek embriyojenik kallus %73,33 oranı ile 6 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyerinde olduğu belirlenmiştir. En düşük embriyojenik kallus oluşumu ise %60 oran ile 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP içeren MS besiyerinde meydana gelmiştir.

Bu denemede somatik embriyolar eksplantlar kültüre alındıktan 16 hafta sonra oluşmaya başlamıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda en yüksek somatik embriyo %40 oran ile 6 mg.l⁻¹ 2,4-D MS besiyerinde en düşük somatik embriyo %13,33 oranı ile 2 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyerinde elde edilmiştir.

Denemede kullanılan MS besiyerlerinde 21. haftada somatik embriyolar oluşmaya başlarken diğer yandan eş zamanlı olarak kullanılan farklı genotip eksplantından bitkicik oluşmaya başlamıştır Yapılan çalışmada ön denemede 2 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS besiyerinde 21. haftada bitkicik gelişim aşamaları oluşmaya başlamış ve 3 haftalık süre içerisinde tam bir bitki elde edilmiştir. İlk önce üst aksam meydana gelmeye başlamış ardından kök yapısı ve yeşil aksam oluşmuştur. Elde edilen bitkicik organojenik yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Yeşil aksamı oluşan bitkicikte aklimatizasyon işlemi yapılmıştır (Şekil 4).

Çizelge 1. *Colchicum speciosum* türünde farklı MS besiyerlerinin şişkinleşme, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşum oranları (%)

<i>Colchicum speciosum</i>			
Besiyeri	Şişkinleşme (%)	Embriyojenik Kallus (%)	Somatik Embriyo (%)
Kontrol	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
1 mg.l ⁻¹ 2,4-D	60 b (50,77)	33,33 bc (35,26)	31,66 b (34,24)
1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0 mg.l ⁻¹ BA	80 a (63,44)	46,66 a (43,09)	40 a (39,23)
2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l ⁻¹ BA	20 d (26,57)	0	0
2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0 mg.l ⁻¹ 2İP	20 d (26,57)	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l ⁻¹ 2İP	20 d (26,57)	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l ⁻¹ 2İP	26,66 cd (31,09)	0	0
1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l ⁻¹ 2İP	33,33 c (35,26)	40 ab (39,23)	11,66 c (19,97)
1 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l ⁻¹ 2İP	33,33 c (35,26)	28,33 cd (32,16)	13,33 c (21,41)
2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l ⁻¹ 2İP	33,33 c (35,26)	33,33 bc (35,26)	40 a (39,23)
2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l ⁻¹ 2İP	26,66 cd (31,09)	23,33 de (28,88)	30 b (33,21)
0,5 mg.l ⁻¹ NAA + 0,1 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ NAA + 0,5 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
1 mg.l ⁻¹ NAA + 0,1 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
1 mg.l ⁻¹ NAA + 0,5 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
2 mg.l ⁻¹ NAA + 0,1 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
2 mg.l ⁻¹ NAA + 0,5 mg.l ⁻¹ BA	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ NAA + 0 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ NAA + 0,1 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0
0,5 mg.l ⁻¹ NAA + 0,5 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0
1 mg.l ⁻¹ NAA + 0 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0
1 mg.l ⁻¹ NAA + 0,1 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0
1 mg.l ⁻¹ NAA + 0,5 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0
2 mg.l ⁻¹ NAA + 0 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0
2 mg.l ⁻¹ NAA + 0,1 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0
2 mg.l ⁻¹ NAA + 0,5 mg.l ⁻¹ 2İP	0	0	0

LSD(0,05) Rejenerasyon=3,01, LSD(0,05) Kallus=2,24, LSD (0,05) Embriyo=1,73

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

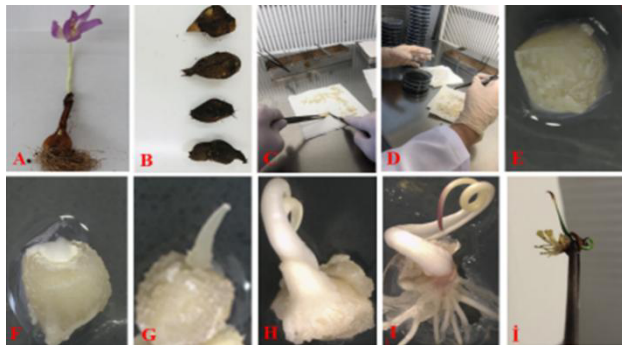
Çizelge 2. *Colchicum speciosum* türünde meydana gelen şişkinleşme, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oranı (%)

Besin Yeri	<i>Colchicum speciosum</i>		
	Şişkinleşme (%)	Embriyojenik Kallus (%)	Somatik Embriyo (%)
Kontrol	0	0	0
2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l ⁻¹ 2İP	60,00 b (50,77)	60,00 a (50,77)	30,00 ab (33,21)
2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l ⁻¹ 2İP	86,67 a (68,59)	66,67 a (54,74)	20,00 b (26,57)
2 mg.l ⁻¹ 2,4-D	93,33 a (75,03)	53,33 b (46,91)	13,33 bc (21,41)
4 mg.l ⁻¹ 2,4-D	100,00 a (90,00)	66,67 a (54,74)	26,67 ab (31,09)
6 mg.l ⁻¹ 2,4-D	86,67 a (68,59)	73,33 a (58,91)	40,00 a (39,23)

LSD_(0,05) Rejenerasyon=15,91, LSD_(0,05) Kallus=17,18, LSD_(0,05) Embriyo=14,52

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir.

Ön deneme ve ana denemede kullanılan ortamların hormon ve ortam içeriğinin aynı konsantrasyonda olmasına rağmen elde edilen sonuçlar arasında farklılıklar vardır. Ayrıca ana denemede elde edilen şişkinleşme, embriyojenik kallus ve somatik embriyo oluşumlarının ön denemeye göre daha erken oluştuğu gözlemlenmiştir. Çalışmada genotip etkisinin ön plana çıktığı düşünülmektedir.

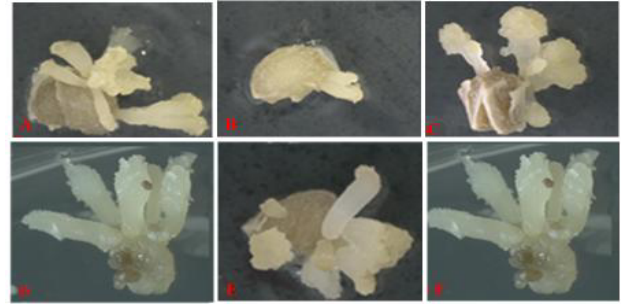


Yayıllık gösterdiği alandan toplanan bitki (a), Laboratuvar ortamındaki korm (b), Korm eksplantlarının küçük parçalara ayrılması (c), Korm eksplantlarının besin yerlerine aktarılması (d), Rejenerasyon aşamasındaki eksplant (e), Embriyojenik kallusun oluşması (f), Somatik embriyoların oluşması ve uzamaların meydana gelmesi (g), Uzama sonucu elde edilen Sürgün yapısı (h), Kök ve sürgün yapısına sahip bitkicik (i), Çimlendirme ortamına alındıktan sonra meydana gelen yeşil aksam (i)

Şekil 4. *Colchicum speciosum*'da bitkicik elde etme aşamaları

Çimlendirme

C.speciosum türünde somatik embriyogenesis denemeleri kapsamında elde edilen somatik embriyolar çimlendirilmek üzere ve elde edilen bitkicik ise gelişim göstermesi için 2 mg.l⁻¹ GA₃ + 0.1 mg.l⁻¹ BA, 1 g.l⁻¹ prolin, 30 g.l⁻¹ sükröz ve 3.5 g.l⁻¹ gelrite içeren MS besin yerinde kültüre alınmıştır. Oluşan somatik embriyolar çimlendirme ortamına aktarıldıktan 5 hafta sonra bu yapılarda sürgün benzeri uzamalar meydana gelmiştir (Şekil 5).

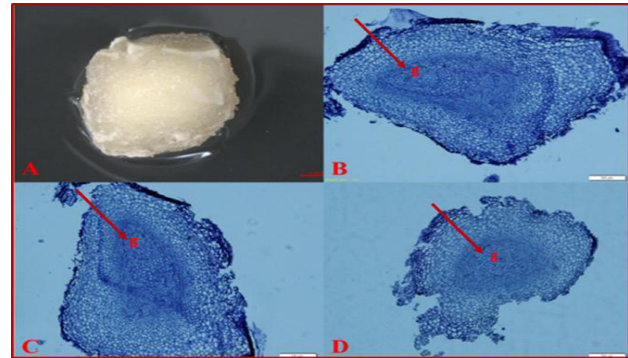


2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.l⁻¹ 2İP elde edilen sürgün benzeri uzamalar (a), 2 mg.l⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg.l⁻¹ 2İP elde edilen sürgün benzeri uzamalar (b), 2 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen sürgün benzeri uzamalar (c), 4 mg.l⁻¹ 2,4-D' de ortamında elde edilen sürgün benzeri uzamalar (d), 6 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen sürgün benzeri uzamalar (e), 1 mg.l⁻¹ 2,4-D elde edilen sürgün benzeri uzamalar (f)

Şekil 5. Çimlendirme ortamına elde edilen somatik embriyoların alınması

Histolojik Veriler

C.speciosum türünde somatik embriyogenesis denemesi kurulduktan 12 hafta sonra oluşan 2 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS ortamında elde edilen embriyojenik kalluslarda histolojik analiz çalışması gerçekleştirilmiştir. Eksplant üzerinde meydana gelen kallusun embriyojenik aşamaya geçip geçmediğinin araştırıldığı bu çalışma sonucunda, kallusun globüler embriyo safhasının ilk aşamasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6).

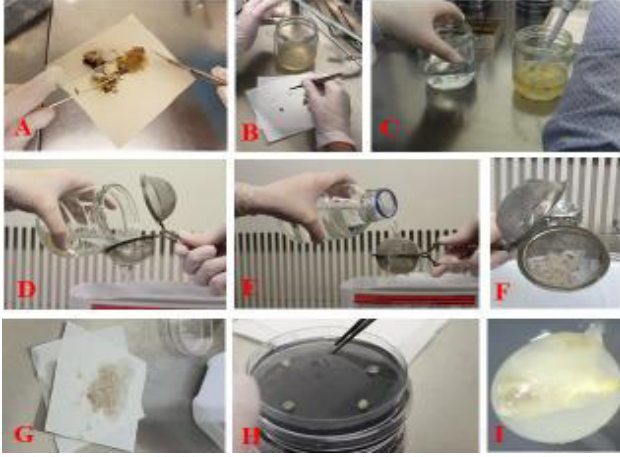


Şekil 6. *C.speciosum* türünde 2 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS ortamında meydana gelen embriyojenik kallusun görüntüsü (a), Histolojik analiz sonucunda, embriyojenik kallusun globüler embriyoya dönüşümünün ilk safhasının görüntüsü (b-d)

Sentetik Tohum

Sentetik tohum elde etmek için yapılan çalışmada %3'lük Na Alginat kullanılarak kaplanan çalışmada 2 farklı besin yeri (MS ve ROM) ve her besin yeri için 1 g.l⁻¹ prolin ve 0.05 g.l⁻¹ spermin olan ve olmayan besin yerleri kullanılmıştır. BA ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanılmıştır. Sentetik tohum denemeleri *C.speciosum* türlerine ait somatik embriyolar kullanılmıştır. Enkapsülasyon uygulamalarında bitki büyüme düzenleyici

içermeyen MS ve ROM besi yerleri kontrol olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda üretilmiş olan sentetik tohumlarda çimlenme meydana gelmemiştir (Şekil 7).



Embriyoların steril filtre kağıtlar üzerinde kesilmesi (a), Embriyoların sodyum aljinat içine aktarılması (b), Embriyoların kalsiyum klorür içerisine mikropipet ile alınması (c), Sentetik tohumların steril saf su ile yıkanması (d-e), Polimerize olmuş sentetik tohumlar (f-g), Sentetik tohumların besi ortamlarına aktarılması (h), Kültür ortamına aktarılan sentetik tohumların 7. gündeki görüntüsü (ı)

Şekil 7. Sentetik tohum üretimi

Türkiye, coğrafi konumu sahip olduğu iklim, topografik özellikleri ve jeolojik yapısından dolayı Dünyanın en zengin biyolojik çeşitliliğini barındıran ülkelerden birisidir. Türkiye Akdeniz, Avrupa-Sibirya ve İran-Turan bölgelerini içinde yer alan sekiz biyoçeşitlilik merkezinin kesiştiği noktada yer almaktadır [5]. Türkiye bitki örtüsünde doğal olarak yayılış gösteren yaklaşık 12000 bitki türü bulunmakta ve bunların 3000'den fazlası endemik olarak yayılış göstermektedir [6]. Ülkemiz florası biyoçeşitlilik oldukça yüksek olup 500'den fazla soğanlı bitki türü yer almaktadır [7]. *Colchicum* türlerinin yumruları ve tohumları yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Diğer yandan Astım, kırmızı bağırsak ve romatizma tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir [8, 9, 10]. Somatik embriyogenesis Bitki biyoteknolojisi doku kültürü içerisinde yer alan, bitkilerin somatik hücre ve dokularından embriyo elde edilmesidir. Somatik embriyogenesis çalışmaları ile uygun eksplant kaynakları üretilerek genetik mühendisliği çalışmalarına kaynak oluşturmaktadır. Somatik embriyogenesis çalışmaları ülkemiz ve dünya için önemli olan endemik tür ve çeşitlerin *in vitro* muhafazası için önemlidir.

Günümüz modern tıbbında ise *Colchicum* yumru ve tohumlarından elde edilen kolhisin terapötik aktif alkaloid kaynağı olarak kullanılmaktadır [11]. Tıbbi aromatik bitkiler içerisinde yer alana acı çiğdem tek ya da çoklu çiçek yapısına sahip olmasından dolayı süs bitkisi potansiyelini ön plana çıkarmaktadır.

Colchicum türlerinin yeni keşfedilen türler arasında yer almakta ve bundan dolayı çeşit geliştirme çalışmalarını geciktirmektedir [3]. *Colchicum* türlerinde ana yumru yılda bir tane yavru yumru verdikten sonra kaybolmakta, tohumlarının çimlenme oranının düşük ve düzensiz olmasından dolayı çoğaltım kat sayısı düşüktür [12].

Yetiştigi doğal ortamından toplanmış olan *Colchicum speciosum* kormlarında %2'lik $HgCl_2$ ile yüzey sterilizasyonu başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Geofitler yaşamlarını toprak altında sürdürürken bazı mikroorganizmalar ve birçok hastalık etmeni ile bulaşık olmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalar içerisinde yer alan doku kültürü çalışmaları steril koşullarda yapılma zorunluluğu vardır. Doku kültürü çalışmalarında enfeksiyon çalışmanın başarı oranını olumsuz etkilemektedir. Yaşamlarını toprak altı organlarıyla devam ettiren geofitlerle yapılan *in vitro* çalışmalarda karşılaşılan en büyük sorun yüzey sterilizasyonudur ve çalışmalarda ortaya çıkan enfeksiyonların çoğunluğunun endojen kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Toprak altı organlarına uygulanan yoğun sterilizasyon aşamalarına rağmen bulaşıklık çalışma süresince çıkmaktadır. Bundan dolayı yapılacak olan sterilizasyon yöntemi, eksplant kaynağına göre farklılık göstermektedir. Kullanılan eksplant kaynağı toprak altı organ ise yüksek konsantrasyonda solüsyonların kullanılması gerekmektedir [13]. *In vitro* çalışmalarda önemli olan bu enfeksiyonların önüne geçmek amacıyla etil alkol, sodyum, kalsiyum hipoklorit kullanılabileceği gibi civa klorür, gümüş nitrat ve hidrojen peroksit gibi kimyasalların farklı konsantrasyon ve süreleri de kullanılabileceği gibi, aynı zamanda sıcaklık uygulamaları, fungusit, bakterisit ve antibiyotiklerle beraber kullanılması önerilmektedir. *Crocus sativus* mikrokormlarının yüzey sterilizasyonunu %0.2'lik civa klorürde 20 dk bekleterek yapmıştır [14]. *Colchicum chalcedonicum* türünün kormları kullanarak yapılan bir çalışmada %0.25'lik civa klorür ($HgCl_2$)'de kullanılarak yüzey sterilizasyonu yapmışlardır [15]. *Sternbergia clusiana* türünün soğanları kullanılarak yapılan bir çalışmada %6.5'lük $NaOCl$ ile 30 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonunu sağlamışlardır [16]. *Colchicum luteum* türünün kormları kullanarak yapılan çalışmada %0.15'lik $HgCl_2$ 'de 10 dakika bekleterek yüzey sterilizasyonu sağlandığını belirtmişlerdir [17]. *Crocus sativus* türünde yapılan bir çalışmada *Crocus* soğanlarında %0.15'lik $HgCl_2$ kullanarak yüzey sterilizasyonu sağlamışlardır [18, 19]. Son dönemlerde yüzey sterilizasyonu çalışmalarında ağır metal yerine farklı kimyasallar kullanılmaya başlandığı görülmektedir. *Crocus sativus* türünde

yüzey sterilizasyonu için %1'lik Povidone-iodine solüsyonu kullanmışlardır [20].

Bu çalışmada ülkemiz bitki örtüsü içerisinde doğal olarak yetişen *C. speciosum* türünde doğadan toplanan kormları kullanılarak optimum somatik embriyogenesis ve sentetik tohum protokolü geliştirilmiştir. Çalışmada şişkinleşme, embriyojenik kallus ve somatik embriyolar elde edilmiştir. *C. coum* türünde 2,4-D içeren ortamlarda somatik embriyo elde etmişlerdir [21, 22]. Hayashi ve ark., (1988), *C. autumnale* türünde 2,4-D içeren MS besiyerlerinde beyaz renkli kalluslar elde edildiğini bildirmişlerdir [23]. Daradkeh vd. [25] *Colchicum hierosolyminum* türünde yaptıkları çalışmada 0,45 Mm 2,4-D içeren besiyerlerinde kallus oluşumlarını elde ettiklerini bildirmişlerdir [24]. Karamian vd. [26] *Crocus sativus* L. türünde kinetin ve 2,4-D içeren MS besi yerinde embriyojenik kallus ve somatik embriyo elde etmiştir [25]. Karlık vd. [16] tarafından yapılan çalışmada 2,4-D (2 mg.l⁻¹) + 2İP (0.5 mg.l⁻¹) bitki büyüme düzenleyici içeren MS besi yerinde *Colchicum* türünde kallus elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada genel olarak 2,4-D içeren MS besi yerlerinde embriyojenik kallus ve somatik embriyolar elde edilmiştir [15]. Somatik embriyo oluşumunu en fazla teşvik eden besin ortamına eklenen oksin grubu bitkisel hormonlardır. Embriyogenesis oluşumunda en fazla kullanılan oksin 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) olup besin ortamlarında 0.5-2 mg.l⁻¹ oranında eklenmektedir. Ayrıca embriyogenesis çalışmalarında NAA (naftalenasetik asit), pikloram ve dikamba gibi oksinler de ya tek başlarına ya da 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadırlar [26]. *Crocus sativus* türünde yapılan bir çalışmada 0.1 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ BAP içeren MS besi yerlerinde embriyonik kallus, 0.05 mg.l⁻¹ NAA+ 2 mg.l⁻¹ BAP içeren MS besiyerlerinde Somatik embriyo elde etmişlerdir [27]. Yapılan başka bir çalışmada *Crocus sativus* türünün kormlarında 1 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında embriyojenik kallus, 1 mg.l⁻¹ 2,4-D + 1 mg.l⁻¹ BAP MS besi ortamında ise somatik embriyo elde etmişlerdir [28]. *Crocus oliveri* ssp. türünün korm eksplantlarında 4 mg.l⁻¹ TDZ + 4 mg.l⁻¹ NAA içeren MS ortamında %100 oranında kallus uyartımı sağlamışlardır. Elde ettikleri globular aşamasındaki embriyoları 2 mg.l⁻¹ IAA + 2 mg.l⁻¹ TDZ + 100 mg.l⁻¹ ABA içeren MS ortamına aktararak 8-12 hafta sonra kotiledon aşamasında embriyolar elde etmişlerdir. Meydana gelen embriyolar ise 2 mg.l⁻¹ IAA + 2 mg.l⁻¹ TDZ + 2 mg.l⁻¹ BAP MS ortamına aktararak %70 oranında sürgün gelişimi sağladıklarını bildirmişlerdir [29].

Colchicum speciosum türünde yapılan bu çalışmada bitki büyüme düzenleyicisi olarak

kullanılan NAA ve kombinasyonlarında ayrıca 2,4-D'nin BA ile kombinasyonlarında somatik embriyo oluşumu gözlemlenmemiştir. Oksin ve sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicileri hücre döngüsünün düzenlenmesi ve bölünmesinde ayrıca protein sentezine yaygın bir şekilde katılım sağladıkları için embriyojenik yapıyı belirlemede kilit rol oynamaktadırlar [30].

Crocus sativus'da yapılan bir çalışmada korm dilimlerini kullanmışlardır. En yüksek kallus oluşumunun 1 mg.l⁻¹ 2,4-D + 2 mg.l⁻¹ BAP içeren MS besiyerinde meydana geldiğini bildirmişlerdir. En yüksek embriyo gelişiminin 0.15 mg.l⁻¹ NAA içeren MS besiyerinde olduğunu ayrıca bu ortamın embriyo çimlenmesi için uygun olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonunda korm elde etmişler ve en iyi korm şekillenmesinin ise 2 mg.l⁻¹ BAP içeren ortamda olduğunu bildirmişlerdir [19]. *Crocus sativus* L. türünde yapılan bir diğer çalışmada farklı büyüme kaplarının ve havuç suyunun kallus ve embriyo gelişiminde ki etkisini ortaya koymak için yaptıkları çalışma sonucunda 1 mg.l⁻¹ BAP ve 1 mg.l⁻¹ 2,4-D içeren MS ortamında 6 hafta sonra kallus ve 12 hafta sonra embriyo oluştuğu ve embriyoların ise globular aşamada olduğunu belirtmişlerdir [20]. *Crocus sativus* mikrokormlarından *in vitro* koşullarda optimum sürgün rejenerasyonu sağlamak amacıyla 2,4-D ve BAP farklı konsantrasyonlarını içeren ½ MS besi yerinde kullanmışlardır. BAP ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonlarının kallus indüklemesinde olumlu sonuçlar verdiğini ve 1 mg.l⁻¹ 2,4-D ve 1 mg.l⁻¹ BAP kombinasyonundan %85.42 oranında kallus, %50 oranında sürgün gelişimi olduğunu bildirmişlerdir. BBD içermeyen kontrol grubunda hiçbir gelişme olmadığını belirtmişlerdir [14]. *Crocus sativus* türünde yapılan başka bir çalışmada 2,4-D NAA BAP TDZ kombinasyonlarını kullanmışlardır. *Crocus* kormlarının alt ve üst meristematik dokuları arasındaki farklı ortaya koymak için yapılan çalışmada 4 ay sonunda 2 farklı yapıda kallus oluştuğunu bunların frible ve globular kallus olduğunu bildirmişlerdir. En iyi kallus oluşumunun 1 mg.l⁻¹ NAA ve 1 mg.l⁻¹ BAP içeren MS besiyerinde üst meristem dokularında olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettikleri kallus üzerinde tomurcuklar daha sonra ise adventif sürgün elde etmişlerdir [31].

Histolojik analiz sonucunda embriyoların hücrelerinin düzenli bir şekilde meydana geldiği, embriyoların merkezinde büyüme bölgelerinin olduğu saptanmıştır. Büyüme bölgelerindeki hücrelerin merkeze gidildikçe küçüldüğü ve düzensizleştiği görülmüştür. Sevindik [33], *Crocus sativus*'da yaptığı histolojik analizde büyüme bölgelerinin oluşumundan bahsetmiş ve bu bölgeleri görüntülemiştir [32]. Blazquez vd. [28], *Crocus*

sativus'da yaptıkları histolojik analiz neticesinde proembriyojenik tomurcukların globular safhaya geçişini tespit ettiklerini bildirmişlerdir [27].

Sentetik tohum oluşum aşamaları, 1) kallus, 2) pre-embriyoların oluşumu, 3) somatik embriyo, 4) olgunlaşma, 5) bitki rejenerasyonu şeklinde sıralanmaktadır. Sentetik tohum çalışmalarının amacı, somatik embriyoları korumak, saklamak ve taşınmasında kolaylık sağlamaktır [33]. Bu çalışmada 3'lük Na alginat ile kaplanan somatik embriyolardan sentetik üretilmiştir. *Cyclamen*'de %3'lik Na alginat ile sentetik tohum elde edilmesi için yapılan bir çalışmada MS, WPM ve ROM besiyeri kullanmıştır. Elde edilen sentetik tohumlardan somatik embriyolar meydana geldiğini fakat bitkiciğe dönüşüm olmadığını bildirmişlerdir [34]. Aycan (2020), MS besiyeri kullanarak sentetik tohum elde ettiği çalışmada *Cyclamen* türlerini kullanmıştır. Çalışmasında prolin ve sperminin çimlenme ve somatik embriyo elde etmesinde olumlu etkisi olduğunu belirtmiştir [35]. Winkelmann vd. [37] iki farklı yöntem kullanarak *Cyclamen* türünde sentetik tohum elde etmiştir. Sentetik tohumlarda çimlenme oranının klasik aljinat ile yaptığı kaplamada yüksek olduğunu belirtmiştir [36].

SONUÇ

Ülkemizde doğal olarak yetişen *Colchicum speciosum* türünün *in vitro* koşullarda çoğaltılması için somatik embriyogenesis protokolü geliştirilmiştir. Elde edilen embriyolardan sentetik tohum üretim denemeleri yapılmıştır. *Colchicum* türleri genellikle tıbbi açıdan önemli bir genetik kaynağı olup çoğunlukla ülkemizde yapılan çalışmalarda sekonder metabolit elde edilmek için kullanılmaktadır. Günümüze kadar süs bitkisi olarak değerlendirme ve çoğaltım çalışmaları bulunmamaktadır. Buda süs bitkisi olarak kullanılabilirliğinin ihmal edilmiş olduğunu göstermektedir. Dünya çağında yapılan çalışmalarda genellikle aynı doğrultudadır. Ülkemizde 45'ten fazla *Colchicum* türünün yaygın olduğu ve bu türlerin yarısının endemik olduğu dikkate alındığında, bu biyolojik çeşitliliğin korunması, gelecekte yeni türler geliştirmek ve ekonomik değeri yüksek ürünler üretmek açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışma *Colchicum* türlerinde yapılacak olan *in vitro* çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Elde edilen somatik embriyolar, kryopreservation ve enkapsüle edilmesiyle muhafaza edilebilecektir. Diğer yandan türlerin *in vitro* koşullarda çoğaltılmasına olanak sağlayacaktır. Böylelikle nesli tükenme tehlikesi altında olan *Colchicum* gibi türlerin devamı açısından son derece önemlidir. Geliştirilmiş

olan bu protokoller diğer türler için uygulanabilecek olmanın yanında ileride yapılacak olan genetik mühendisliği, mutasyon ıslahı ve sekonder metabolit üretimi çalışmalarında başarıyla kullanılabilir olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK-1001 imkânlarıyla yürütülen 116O265 numaralı projenin bir bölümüdür. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. "Bazı *Colchicum* Türlerinde Somatik Embriyogenesis ve Sentetik Tohum Üretim Protokollerinin Oluşturulması" başlıklı doktora tez çalışmasının bir kısmıdır.

KAYNAKLAR

1. Sahin, E.C., Kaya, E., Tuyel, U., Aydın, Y., Ozhatay, N., Uncuoglu, A.A. 2021. An assessment on the floristic variety of *Colchicum* genus of Turkey in terms of morphological characteristics. *Scientia Horticulturae*, 287, 110251.
2. Persson, K. 1999. The genus *Colchicum* in Turkey. II. Revision of the large-leaved autumnal species. *Edinburgh Journal of Botany* 56(1):103-142.
3. Kaya, E., 2009. *Colchicum* L., Türkiye'nin doğal süs bitkileri kataloğu. Editör: Kaya, E. Yalova, Tasarım Matbaacılık Hizmetleri.
4. Yalçın Mendi, N.Y., Özdemir, Ş., Uğur, S., Sevindik, B., İzgü, T., Kaya, E., Tütüncü, M. 2022. *In vitro* regeneration and synthetic seed production of *Colchicum cilicicum* grown naturally in Turkey.
5. Uzun, I., Bayır, A. 2009. Horticultural biodiversity in Turkey, *Bulletin UASVM Horticulture*, 66(2).
6. Dilaver, Z. 2013. Conservation of natural plants and their use in landscape architecture, advances in landscape architecture. Ed.:M.Ozyavuz, ISBN: 978-953-51-1167-2 InTech doi:10.5772/55767.
7. Özhatay, N., Byfield, A. 2005. Türkiye'nin 122 önemli bitki alanı, Doğal Hayatı Koruma Vakfı, İstanbul, s:1-24, 476.
8. Gökel, Y., Canataroğlu, A., Satar, S., Köseoğlu, Z. 2000. Colchicine toxicity: a patient with pneumopericardium, *Turk J Med Sci*, 30, 401-403.
9. Komjathyová, H., Franková, L., Bóka, K., Pšenák, M. 2000. Botanical and developmental aspects of *Colchicum autumnale* L. (autumn crocus), (in Slovak). *Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comenianae, Bot.* 40, pp:67-80.
10. Khan, H., Tariq, Ş.A., Khan, M.A. 2011. Biological and phytochemical studies on corms of

- Colchicum luteum* Baker, Journal of Medicinal Plants Research, 5(32):7031-7035.
11. Peter, O.J. 1995. Chromatographic determination of constituents of the genus *Colchicum* (Liliaceae), Chromatography A., 704, 351-356
 12. Ellington, E., Adserias, T., Coma, A., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. 1997. Effect of paclobutrazol on *in vitro* culture of *Colchicum autumnale* corms, Acta Hort. 447, 131-134.
 13. Eti, S. 1987. Über das Pollenschlauchwachstum und die Entwicklung der Samenanlagen in Beziehung zum Fruchtsatz und zur Fruchtqualität bei der Manderinensorte "Clementine" (*Citrus reticulata* Blanco). Dissertation Univ. Hohenheim, Germany. 127 p.
 14. Karaoğlu, C. 2010. Soğanlı bitkiler ve *in vitro* hızlı çoğaltım. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 19(1-2):24-29.
 15. Lagram K., El Caid M. B., El Aaouam S., Lachheb M., El Mousadik A., Serghini M.A. 2016. *In vitro* shoot regeneration and development of microcorms of Moroccan Saffron (*Crocus sativus* L.), Atlas Journal of Plant Biology, pp:50-55.
 16. Karlık, E., Değer, M., Üzen, E., Gözükırmızı, N. 2020. Pioneering *in vitro* studies for callus formation of *Colchicum chalconicum* Azn. Trakya University Journal of Natural Sciences, 21(2):131-137, 202.
 17. Oran, S., Fattash, I. 2005. *In vitro* propagation of an endangered medicinal bulbous plant *Sternbergia clusiana* Ker-Gawler (Amaryllidaceae). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 80, 399-402.
 18. Wagh, P.J., Patil, V.W., Kale, M.C. 2015. Effect of soluble chitosan application on *in vitro* germination and growth of dormant corms of *Colchicum luteum* Baker. International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology, 3:179-182.
 19. Sevindik, B., Mendi, N.Y.Y. 2016. Türkiye'de doğal olarak yetişen ve kültürü yapılan bazı *Crocus* türlerinde somatik embriyogenesis'in araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 34(4).
 20. Safarnejad, A., Alamdari, L.B.S., Darroudi, H., Dalir, M. 2016 The effect of different hormones on callus induction, regeneration and multiplication of Saffron (*Crocus sativus* L.) Corms. Saffron Agronomy & Technology, 4(2):143-154.
 21. Halim, R., Akyol, B., Gürel, A. 2018. *In vitro* callus induction of Saffron (*Crocus sativus* L.). International Journal of Innovative Science and Research Technology. 3(11).
 22. Prange, A.N.S., Bartsch, M., Serek, M., Winkelmann, T. 2010. Regeneration of different *Cyclamen* species via somatic embryogenesis from callus, suspension cultures and protoplasts. Sci. Hort., 125:442-450.
 23. Seyring, M., Hohe, A. 2005. Induction of desiccation-tolerance in somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 80(1):65-69.
 24. Hayashi, T., Yoshida, K., Sano, K. 1988. Formation of alkaloids in suspension-cultured *Colchicum autumnale*. Phytochem. 27:1371-1374.
 25. Daradkeh, N.M. 2012. Callus, cell suspension culture and colchicine production in (*Colchicum hierosolymitanum* fieb), M.Sc. Thesis. Jordan University of Science and Technology, Irbid, Jordan.
 26. Karamian, R. 2003. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus*. I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650.5.
 27. Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, E. 2002. Bitki biyoteknolojisi. 1. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374s.
 28. Blazquez S., Olmos E., Hernandez J.A., Fernandez-Garcia N., Fernandez J.A. 2009. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the anti-oxidant enzymatic system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 97:49-57.
 29. Shahabzadeh, Z., Heidari, B., Dadkhodaie, A. 2013. Regenerating salt tolerant Saffron (*Crocus sativus*) using tissue culture with increased pharmaceutical ingredients. J. Crop Sci. Biotech. 2013 (Sep) 16(3):209-217.
 30. Verma, S.K., Das, A.K., Cingoz, G.S., Uslu, E., Gürel, E. 2016. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish *Crocus* species. Biotechnology Reports, 10, 66-74.
 31. Francis, D., Sorrell, D.A. 2001. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: A mini review Plant Growth Regulation, 33(1):1-12.
 32. Lagram, K., Ben El Caid, M., Atyane, L.H., Salaka, L., El Boullani, R., El Mousadik, A., Serghini, M.A. 2016. *In vitro* shoots and microcorms formation through indirect organogenesis of Moroccan saffron (*Crocus sativus* L.). Acta Hort. 1184. ISHS 2017. doi:10.17660/actahortic.2017.1184.14.
 33. Sevindik, B. 2014. Türkiye'de doğal olarak yetişen ve kültürü yapılan bazı *Crocus* türlerinde

- somatik embriyogenesis'in araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 59s.
34. Baltacı, A.M., Arslan, M. 2019. Oğulotu (*Melissa officinalis*) bitkisinde meristem ve somatik embriyo kültürlerinden sentetik tohum elde etme olanakları. Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi, s:1-10.
35. Koçak, M. 2019. *Cyclamen coum*'da somatik embriyogenesis yöntemi ile rejenerasyonun araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 123s.
36. Alp, H.A. 2020. Türkiye'de yetişen bazı siklamen türlerinin yumrularında somatik embriyogenesis ve sentetik tohum üretimi araştırmaları, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, 218s.
37. Winkelmann, T., Meyer L., Serek, M. 2004. Germination of encapsulated somatic embryos of *Cyclamen persicum*, 39(5):1093-1097.