



FARKLI DOZLARDA PEG 6000 UYGULAMALARININ SAFRANDA İN VİTRO REJENERASYONA ETKİLERİ

Başar SEVİNDİK*

İzmir Demokrasi Üniversitesi Meslek Yüksekokulu, 35140 Karabağlar İzmir

*Sorumlu yazar: basar.sevindik@idu.edu.tr

Başar SEVİNDİK: <https://orcid.org/0000-0002-1448-6617>

Please cite this article as: Sevindik, B. (2021) Farklı dozlarda peg 6000 uygulamalarının safranda in vitro rejenerasyona etkileri, *Turkish Journal of Forest Science*, 5(2), 408-417

ESER BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Araştırma Makalesi / Research Article

Geliş 5 Mayıs 2021 / Received 5 May 2021

Düzeltilmelerin gelişi 21 Eylül 2021 / Received in revised form 21 September 2021

Kabul 26 Eylül 2021 / Accepted 26 September 2021

Yayımlanma 31 Ekim 2021 / Published online 31 October 2021

ÖZET: Safran olarak bilinen *Crocus sativus* L., eski çağlardan beri kuru stigmaları baharat olarak kullanılan önemli bir bitkidir. Son zamanlarda abiyotik stres bitkisel üretimde karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. Kuraklık stresi, bitkinin gelişimini farklı seviyelerde sınırlayan en önemli abiyotik stres olarak bilinmektedir. Kuraklık stresine dayanıklı bitkilerin seçilmesinde *in vitro* seleksiyon yöntemi oldukça önemli bir tekniktir. Polietilen glikol (PEG), toksik olmayan ve bitkiye tutunmayan bir kimyasaldır ve genelde bitkilerin kuraklığa gösterdiği tepkileri ölçmek adına yapılan kuraklık stresi çalışmalarında simülatör olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *Crocus sativus* L., bitkisinin kormları 30 g L⁻¹ sakkaroz, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 1 mg L⁻¹ 2iP, 7 g L⁻¹ agar ve 0, 5%, 10%, 20% PEG 6000 ile kombine edilmiş MS besi yerinde kültüre alınmıştır. En etkili *in vitro* rejenerasyonun PEG içermeyen MS besi yerinde olduğu belirlenmiştir. Rejenere olan eksplantlar, sürgün oluşumu elde etmek için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerine transfer edilmiştir. Meydana gelen embriyogenik yapıların farklı embriyo aşamalarında tutuklu kaldığı ve sürgün oluşmadığı gözlenmiştir. Aynı besi yerinde organogenez sonucu oluşan korm benzeri yapılarda da gelişim sınırlı kalmış ve bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir.

Anahtar kelimeler: *Crocus sativus* L., doku kültürü, MS, kuraklık, stres

EFFECT OF DIFFERENT DOSAGES OF PEG 6000 APPLICATION ON IN VITRO REGENERATION OF SAFFRON

ABSTRACT: *Crocus sativus* L., known as saffron, is an important crop that dried stigmas of the plant have been used as a spice for the ancient time. Recently, abiotic stress is one of the most important problems for crop production. Drought stress is known as one of the significant abiotic stresses that limit plant growth at different levels. To select the drought-resistant plant, *in vitro* selection is one of the important methods. Polyethylene glycol is non-toxic and non-penetrable chemical and it is commonly used as a drought stress simulator in

many research to observe the reaction of the plants. In this study, *Crocus sativus* L. corms were cultivated on MS medium including 30 g L⁻¹ sucrose, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 1 mg L⁻¹ 2iP, 7 g L⁻¹ agar and combined with 0, 5% 10%, 20% PEG 6000. Callus, embryogenic structure, and organogenic structure were observed at all medium combinations. Efficient *in vitro* regeneration was detected on MS medium without PEG 6000. Regenerated explants were transferred to the plant growth regulator-free MS medium to obtain shoot formations. Embryogenic structures were stuck into different embryogenic stages and shoot formation was not observed. Also, development was limited in the corm-like structures obtained via organogenesis from the same medium, and plantlets were not obtained.

Keywords: *Crocus sativus* L., tissue culture, MS, drought, stress

GİRİŞ

Crocus sativus L., Iridaceae familyasına ait çok yıllık geofittir. *Crocus* cinsi içerisinde safran olarak bilinen bu tür, kurutulmuş stigmalarının yemeklerde baharat olarak kullanılması ile ön plana çıkmaktadır (Plessner, 1990). En eski baharatlardan biri olarak bilinen safranın yapılan araştırmalarda M.Ö 1600-1700 kültürü yapıldığı ortaya çıkmıştır (Mzabri ve ark. 2019). Dünyanın en pahalı baharatı olarak bilinen bu bitki ayrıca boya, ilaç ve kozmetik sanayilerinde de kullanılmaktadır. Safranın kozmetik ve parfümeri alanında kullanılmasında, bu bitkiden elde edilmiş ekstraktların insan cildini ultraviyole ışıklardan koruması, cilt üzerinde oluşan lekelere karşı koruma sağlaması, deri zararlanmalarına karşı onarıcı etkileri gibi etkileri vardır. Ayrıca bu bitkinin antioksidan, antidepresan, antikarsinogenik, antispasmodik, anti-inflamatuvar, kandaki glukozu ve insülin seviyesini düzenleyici, etkileri olduğu belirtilmiştir (Murray ve Lopez 1997; Premkumar ve ark. 2003; Hill, 2004; Dwyer ve ark. 2011; Eghdami ve ark.2013; Suganya ve ark. 2016; Khazdair ve ark. 2019; Mzabri ve ark. 2019). Safranın belirtilen bu özelliklerinin temeli, bünyesinde yüksek oranda biyoaktif bileşenler bulundurmasından kaynaklanmaktadır. Safranda ön plana çıkan en önemli biyoaktif maddelerin safranın renk, koku ve aromasından sorumlu olan crocin, picrocrocin ve safranal olduğu belirtilmiştir (Guclu ve ark. 2020).

Crocus sativus L. toprak üstü gelişimi Ekim ve Nisan ayları arasında gerçekleşirken çiçekler sonbaharda meydana gelmektedir. *Crocus sativus* L. başta İran olmak üzere, Akdeniz havzası, Avrupa, Asya ve Ortadoğu'da birçok ülkede kültürü yapılan bir bitkidir. Safran, triploid (2n=3x=24) ve erkek steril bitki olması nedeniyle tohumla çoğaltımında sorun yaşanmaktadır. Safran kormları ana bitkiden meydana gelen yavru kormlar ile çoğaltılmaktadır. Bir dönemde sekiz adet yavru korm oluşumu gözlemlenebilmektedir. *Crocus sativus* L. bitkisi için alternatif çoğaltım yöntemlerinden biri de doku kültürü teknikleridir. Günümüzde safranın doku kültürü ile çoğaltımında çok sayıda protokol geliştirilmiştir (Chichiricco ve Grilli Caiola 1987; Homes ve ark. 1987; İlahi ve ark. 1987; Sano ve Himeno 1987; Plessner ve ark. 1990; Sarma ve ark. 1990; George ve ark. 1992; Ahuja ve ark. 1994; Igirashi ve Yuasa 1994; Milayeva ve ark. 1995; Bhagyalakshmi 1999; Luskutov ve ark. 1999; Piqueras ve ark. 1999; Ebrahimzadeh ve ark. 2000; Blazquez ve ark. 2003; Chen ve ark. 2003; Karamian 2004; Raja ve ark. 2007; Blazquez ve ark. 2009; Mir ve ark. 2010; Vatankhah ve ark. 2010; Devi ve ark. 2011; Ahouran ve ark. 2012; Yasmin ve Nehvi 2013; Parray ve ark. 2015; Sevindik ve Mendi 2016; Azadi ve ark. 2017; Wafai ve ark. 2017; Moradi ve ark. 2018; Kashtwari ve ark. 2018; Vellicce 2018; Firoozi ve ark. 2019; Kareem ve ark. 2019; Shilpi ve Jiyoti 2020; Taheri-Dehkordi ve ark. 2020). Doku kültürü ile

çoğaltımda başarıyı etkileyen faktörler; başlangıç materyali, besi yeri ve bitki büyüme düzenleyicileridir. Doku kültürü teknikleri içerisinde yer alan *in vitro* seleksiyon, bitkilerin abiyotik stres karşısında gösterdikleri tepkilerin *in vitro* koşullarda belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Günümüzde tarımsal üretimde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri de kuraklık stresidir. Bitkilerin kuraklığa maruz kalma süreleri bitkilerde morfolojik ve moleküler seviyelerde farklı etkiler gösterir. Kuraklığın en önemli etkisi bitkilerde çimlenme ve fide oluşumunu olumsuz etkilemektedir. Kuraklık stresi ile bitkilerde gelişimin yavaşlamasında, fotosentez, terleme, solunum, iyon alımı, besin metabolizması gibi fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde meydana gelen değişimlerin rol aldığı bilinmektedir (Farooq ve ark. 2008). Son dönemlerde bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda kuraklık stresi etkisi yaratan farklı kimyasallar kullanılmaktadır. Kuraklık stresi çalışmalarında ortamın su potansiyelini düşürerek bitkilerde kuraklık stresi etkilerinin ortaya çıkmasında yaygın olarak kullanılan en önemli kimyasallardan biri polietilen glikoldür (PEG). PEG'in toksik olmayan ve nüfuz etmeyen fakat su stresinde meydana gelen olayları taklit etmek için önemli bir kimyasal olduğu belirtilmiştir (Bressan, ve ark. 1981; Handa, ve ark. 1982; 1983). Safranda kuraklık stresi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı kalmakla birlikte kuraklık stresinin *in vitro* rejenerasyon üzerine etkileri incelenmemiştir.

Bu çalışmada Mersin Çamlıyayla'dan toplanmış olan *Crocus sativus* L. (safran) bitkisinin kormları kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* rejenerasyon denemelerinde, besi yerlerine farklı konsantrasyonlarda PEG 6000 uygulamalarının rejenerasyona etkileri incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitkisel Materyal

In vitro rejenerasyon çalışmalarında kullanılan bir yıllık *Crocus sativus* L. kormları Mersin ili Çamlıyayla ilçesi Namrun yaylasından (Enlem: 37,17 K; Boylam: 34.59 D) temin edilmiştir. Kormlar, bir önceki hasat döneminden sonra (Nisan 2019) sökülmüş ve karton kutular içerisinde karanlıkta (Ortalama 20°C sıcaklıkta) *in vitro* rejenerasyon denemeleri kuruluncaya kadar saklanmıştır. Çapları 2-2,5 cm arasında değişen safran kormları saksılarda kültüre alınmadan İzmir Demokrasi Üniversitesi Bitki doku kültürü laboratuvarında *in vitro* şartlarda kültüre alınmıştır.

***Crocus sativus* L. Kormlarının Yüzey Sterilizasyonu**

C. sativus L. kormları, zarları soyulduktan sonra akan musluk suyu altında 20 dakika bekletilmiştir. Musluk suyu altında bekletilen kormlar magenta kapları içerisinde laminar flow kabin içerisine alınmıştır. Burada steril pens yardımı ile steril beherlere aktarılan kormlar %70'lik EtOH' de 1-2 dakika bekletildikten sonra steril distile su ile durulanmıştır. Daha sonra içerisine 1-2 damla Tween 20 damlatılmış %20'lik sodyum hipoklorit'de (NaClO) 20 dakika bekletildikten sonra steril saf su ile 3-4 defa üzerinde sodyum hipoklorit köpüklerinin tamamı kaybolana kadar durulanmıştır. Denemede kullanılan besi yerleri, filtre kağıtları, saf su, pens, bistüri ve cam malzemeler otoklavda (121°C'de 15 dakika 1.05 atm basınçta) steril edilmiştir.

Eksplantların Hazırlanması *In vitro* Rejenerasyon Denemeleri ve Kültür Şartları

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş olan ve üzerinde apikal tomurcukları bulunduran safran kormları steril filtre kağıtları üzerinde steril pens ve bistüri yardımı ile küp şeklinde (0.5cm x 0.5cm x 0.3 cm) kesilerek besi yerlerine yerleştirilmiştir.

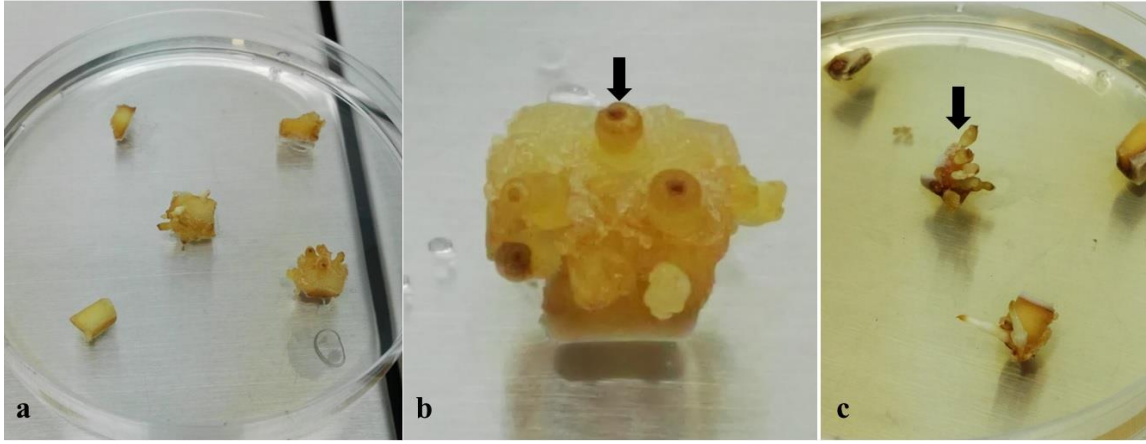
Denemelerde daha önce ve safranda *in vitro* rejenerasyonda etkili olduğu Sevindik ve Mendi (2016) tarafından belirtilen 30 g L⁻¹ sakkaroz, 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 1 mg L⁻¹ 2iP ve 7 g L⁻¹ agar içeren MS besi yeri kullanılmıştır. MS besi yerine 0, %5, %10, %20'lik PEG 6000 eklenmiştir. PEG 6000 uygulaması besi yerleri otoklavdan çıkarılıp 60-70°C'ye kadar soğutulduktan sonra 22 µm nanoporlara sahip filtrelerden geçirilip soğuk sterilizasyon yapıldıktan sonra besi yerine eklenmiştir. Eksplantlar kültüre alındıktan sonra kallus, embriyojenik veya organojenik yapılar oluşmaya başlayıncaya kadar oda sıcaklığında (25±2°C) 6 hafta boyunca karanlıkta kültüre alınmıştır. Embriyojenik ve organojenik yapılar oluşmaya başladıktan sonra eksplantlar hormon içermeyen, 30 g L⁻¹ sakkaroz, 7 g L⁻¹ agar içeren MS besi yerinde oda sıcaklığında (25°C±2°C) 16 saat fotoperiyot (40 µmol m⁻²s ışık şiddeti) gösteren büyütme kabini içinde kültüre alınmıştır. Sürgün gelişimleri gözlenen eksplantlar aynı besi yerinde alt kültüre alınmıştır.

Deneme Deseni ve İstatistiksel Analizler

Denemede başlangıç materyallerinde genotip etkisi dikkate alınmamıştır. Deneme her uygulamada 6 tekrür (Petri) her tekrürde 5 eksplant olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Elde edilen veriler yüzde olarak değerlendirilmiş, elde edilen yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmıştır. Veriler JMP 8 paket programı ile analiz edilmiş çoklu karşılaştırmalı LSD testi ile uygulamalar arasındaki farkların önem seviyeleri belirlenmiştir (p< 0.01).

BULGULAR

Crocus sativus L. bitkisinde *in vitro* PEG uygulamaları sonucunda elde edilen rejenerasyon oranları Çizelge 1' de belirtilmiştir. Kontrol grubu ve PEG eklenmiş olan MS besi yerinde bütün konsantrasyonlarda rejenerasyon sağlanmıştır. Kallus gelişimi, somatik embriyo gelişimi ve organogenez oranlarında farklılıklar belirlenmiştir. Özellikle PEG içermeyen kontrol grubunda gelişim daha yüksek olmuştur (%90±4.47). Kontrol grubunun ardından, *in vitro* PEG denemelerinde en etkili kallus gelişimi 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 1 mg L⁻¹ 2iP + %10 PEG içeren MS besi yerinde elde edilmiştir (%80± 7.30). Bu besi yerini sırasıyla %20 PEG ve %5 PEG konsantrasyonlarını barındıran besi yerleri izlemiştir (Çizelge 1; Şekil 1). Kallusların somatik embriyoya dönüşüm oranları incelendiğinde farklı konsantrasyonlardaki PEG uygulamalarının istatistiksel olarak farklı olduğu belirlenmiştir. En yüksek somatik embriyo gelişimi, kallus gelişimine benzer olarak kontrol grubunda meydana gelmiş (%43.33± 9.54). PEG içeren besi yerlerinde ise en yüksek somatik embriyo gelişimi 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 1 mg L⁻¹ 2iP + %10 PEG içeren MS besi yerinde meydana gelmiştir (%33.33± 6.66). Somatik embriyo gelişiminde kallus gelişiminden farklı olarak %5 PEG içeren MS besi yerinde (%20± 8.94), %20 PEG içeren MS besi yerine (%13.33±6.66) göre daha yüksek oranda embriyojenik yapıların elde edildiği belirlenmiştir. *In vitro* PEG denemelerinde kontrol grubu dışında kalan ve PEG içeren MS besi yerlerinde organojenik oluşumların embriyojenik yapılara oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Crocus sativus* L. in vitro PEG 6000 uygulamaları sonucu meydana gelen yapılar, a) Rejenere olan eksplantlar (4. Hafta), b) Meydana gelen embriyojenik yapılar, C) Meydana gelen organojenik yapılar

Organogenez oranlarına bakıldığında en etkili gelişimin %10 PEG içeren MS besisi yerinde meydana geldiği tespit edilmiştir (%56.66± 9.54). Organojenik oluşumlarda bu besiyeri sırasıyla, %20 PEG, kontrol grubu ve %5 PEG içeren MS besiyeri izlenmiştir. Ayrıca bu çalışma kapsamında kullanılan 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 1 mg L⁻¹ 2iP konsantrasyonunu içeren MS besiyerinin Sevindik ve Mendi (2016) tarafından en etkili somatik embriyogenesis besiyeri olduğu belirtilmiştir. Oranlara bakıldığında PEG uygulamalarında gelişim sınırlı kalmıştır. Buna ek olarak, PEG konsantrasyonları kendi aralarında değerlendirildiğinde, %10 PEG uygulamasında somatik embriyo ve organogenez oluşumunun daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. PEG konsantrasyonu %20'ye çıkarıldığında ise somatik embriyo gelişimin olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Organogenez'de ise %5 PEG içeren MS besiyerinde gelişimin en az olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen embriyojenik ve organojenik yapıların ise hiç birinde sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Embriyolar farklı aşamalarda tutuklu kalmış organogenez sonucu oluşan yapılar ise sınırlı oranda korm benzeri yapılar oluşturmuştur. Meydana gelen yapılar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besiyerine alınmış fakat burada da sürgün veya sürgün benzeri yapılar elde edilememiştir.

Çizelge 1. *C. sativus* L. türünde in vitro PEG 6000 uygulamaları sonrasında rejenerasyon oranları

PEG Konsantrasyon	Kallus oluşumu (%)± Std dv	Somatik embriyogenez (%)± Std dv	Organogenez (%)± Std dv
(Kontrol)	90.0 a ±4.47 (76.72)	43.33 a ± 9.54 (40.96)	33.33 b ± 6.66 (34.82)
%5 PEG 6000	40.0 c ± 8.94 (39.04)	20.0 bc ± 8.94 (21.74)	26.66 b ± 4.21 (30.79)
%10 PEG 6000	80.0 ab ± 7.30 (68.07)	33.33ab ± 6.66 (34.82)	56.66 a ± 9.54 (49.03)
%20 PEG 6000	48.57 bc ± 13.08 (51.35)	13.33 c ±6.66 (15.39)	40.0 ab ± 7.30 (38.85)
LSD	21.60	18.86	12.96

Parantez içerisindeki değerler yüzde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış değerlerdir. Farklı harfler farklılıkları belirtmektedir. Std dv: Standart sapma

TARTIŞMA

Safranda kuraklık etkisini araştırmak için farklı kimyasallar kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Bu araştırmalarda GABA (Sharifi ve ark., 2020), salsilik asit (Aslezaem ve ark., 2018), ABA ve PEG (Vahedi ve ark. 2015) ön plana çıkmaktadır. Safranda ozmotik düzenleyicilerin etkisi genelde arazi koşullarında denenmiş ve *in vitro* PEG uygulamasının etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışmaya yer verilmiştir. Vahedi ve ark., (2015) safranda 2 mg L⁻¹ 2.4-D + 0.5 mg L⁻¹ Kinetin içeren MS besi yerinden elde edilen somatik embriyoların üzerine farklı ozmotik düzenleyicilerin etkisini araştırmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri embriyoları PEG, ABA ve Gelrite içeren MS besi yerinde kültüre almışlardır. PEG ve ABA içeren besi yerinin gelrite içeren besi yerine oranla somatik embriyo gelişimi üzerine olumlu etkileri olduğunu belirtmişlerdir. Sunulan bu çalışmada ise farklı PEG uygulamalarının somatik embriyo gelişimi üzerine engelleyici etkileri olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, doz artışı ile *in vitro* rejenerasyon arasında bir ilişkinin olmadığı tespit edilmiştir. Safranda *in vitro* PEG uygulaması ile yapılmış olan çalışma oldukça sınırlı olsa da, farklı bitkilerde kuraklık stresine karşı *in vitro* seleksiyona yönelik çalışmalarda farklı dozlarda PEG uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Piwowarczyk ve ark., (2014), *Lathyrus sativus* türünde farklı dozlarda (50, 100 ve 150 g L⁻¹) PEG 6000 uygulamasının tohum çimlenmesi, sürgün rejenerasyonu ve bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, PEG uygulamalarının tohum çimlenmesi üzerine etkisinin olmadığını fakat sürgünlerde çoğaltım katsayısını düşürdüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ozmotik stres altında prolin seviyesinin arttığını belirtmişlerdir. Tsago ve ark. (2014), 16 *Shorgum bicolor* genotipinde 5 farklı dozda (%0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0) PEG 6000 uygulaması ile kuraklık stresine karşı *in vitro* seleksiyon çalışması gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar genotip, uygulama ve her ikisinin etkileşiminin farklılıklar gösterdiğini ve artan PEG konsantrasyonlarının kallus ve bitki rejenerasyonunu dolaylı olarak etkilediğini belirlemişlerdir. Safranda yapılmış olan bu çalışmada ise başlangıç materyali olarak kormlar kullanılsa da Tsago ve ark., (2014) yapmış olduğu çalışmaya benzer olarak PEG uygulamalarının *in vitro* rejenerasyonu etkilediği belirlenmiştir. Biswas ve ark., (2002) beş farklı pirinç çeşidinde yapmış oldukları çalışmada tohumlardan elde ettikleri kallusları 2 mg L⁻¹ 2.4-D ve farklı konsantrasyonlarda PEG içeren MS besi yerinde kültüre almışlar ve kallus oluşumlarının artan PEG oranında azaldığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada Biswas ve ark., (2002)'nin yaptığı gibi kademeli bir düşüş söz konusu olmasa da PEG uygulamalarının kontrol grubuna oranla kallus gelişimini olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Saepudin ve ark., (2017) soya fasülyesi çeşitlerinde yapmış oldukları çalışmada yapılan bu çalışmaya benzer olarak *in vitro* PEG (0, 5, 10, 15 ve %20) uygulamalarının somatik embriyogenez üzerine etkilerini araştırmışlar ve yüksek oranda PEG konsantrasyonu içeren besi yerinde kallus ve embriyojenik kallus oluşum oranlarının bütün genotiplerde azaldığını belirlemişlerdir. Benzer olarak safranda *in vitro* PEG uygulamalarında ise en yüksek dozda en düşük oranda embriyojenik yapıların geliştiği belirlenmiştir. Turhan ve Başer (2004), *Helianthus annuus* türünde *in vitro* ve *in vivo* PEG uygulaması sonucunda kök sayıları hariç *in vitro* da ölçülen karakterlerin arazide ve saksıda yetiştirilen bitkiler için önemli ipucu verdiğini belirtmişlerdir. Aazami ve ark., (2010), dört farklı domates çeşidinde *in vitro* PEG 6000 uygulamaları sonucunda bütün genotiplerde gelişimin yavaşladığını ve kuru madde miktarının arttığını belirlemişlerdir. Safranda gerçekleştirilen bu çalışmaya benzer olarak gelişim yavaşladığı görülmüş ve meydana gelen organogenik ve embriyogenik yapıların sürgün oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmaların yanı sıra *Allium hirtifolium* (Ghassemi-Golezani ve ark. 2018), arpa (Wu ve ark., 2017), biber (Nath ve ark., 2005), buğday (Mahmood ve ark., 2012; Bouiamrine ve Diouri, 2012), *Daucus carota* (Fallon ve

Philips, 1989), *Dendrobium officinale* (Gao ve ark., 2020), *Fragaria × ananassa* Duch. (Yosefi ve ark. 2020), *Helianthus annuus* (Hassan ve ark., 2004), *Hordeum vulgare* L. (Hangbo ve ark., 2005), *Musa* sp. (Saeedavi ve ark., 2017), pirinç (Wani ve ark., 2010), *Populus canadensis* (Boris ve ark., 2016), *Prunus cerasus × P. canescens* (Sivritepe ve ark. 2008), *Rubus* (Orlikowska ve Kucharska, 2008), *Saccharum officinarum* (Patade ve ark. 2012; Rao ve Jabeen, 2013), *Sorghum bicolor* (Smith ve ark., 1985; Duncan ve ark., 1995), *Stevia rebaudiana* (Hajihashem ve Ehsanpour, 2014; Ahmad ve ark., 2020), *Thymus vulgaris* (Razavizade ve ark., 2019), üzüm (Dami ve Hughes, 1995; 1997), *Vigna aconitifolia* (Soni ve ark., 2011), gibi birçok farklı bitkide *in vitro* PEG uygulamaları ile bitkilerin kuraklık stresine karşı verdikleri tepkiler incelenmiştir. Yapılan bu çalışmaların tamamında PEG uygulamalarının kuraklık stresi açısından önemli bir simülasyon olduğu belirlenmiştir. Farklı bitkilerde yapılan PEG uygulamaları genelde *in vitro* seleksiyona yönelik yapılsa da bazı bitkilerde içerdikleri etken maddelerde meydana gelen değişikliklerde incelenmiştir. Ayrıca PEG uygulamaları sadece katı kültürde değil hücre süspanisyon kültürlerinde de kullanılmıştır. Safranda yapılan bu çalışmada ise farklı PEG uygulamaları sadece katı kültürde denenmiş ve korm eksplantlarından elde edilen yapılardan sürgün elde edilememiştir. Sevindik ve Mendi (2016), safranda somatik embriyo elde etmek için geliştirdikleri besi yerinde PEG uygulamaları sonucu somatik embriyo gelişimlerinin oldukça azaldığını belirlenmişlerdir.

SONUÇ

Safran farklı endüstrilerde kullanılan ekonomik önemi oldukça yüksek bir geofittir. Günümüzde dünyanın yüz yüze olduğu en büyük sorunların başında kuraklık gelmektedir. Kuraklık ile aynı etkiyi gösteren ve kuraklık simülasyonu olarak bilinen ve kuraklık stresi çalışmalarında yaygın şekilde kullanılan kimyasalların başında PEG gelmektedir. Farklı bitkilerde bu kimyasalın *in vitro* şartlarda etkileri gözlenmiş olsa da safranda *in vitro* PEG uygulamalarının etkileri ile ilgili çalışma gözlenmemiştir. Bu çalışma ile ilk defa safran bitkisine *in vitro* koşullarda PEG uygulanmış ve sonuç olarak PEG uygulamalarının farklı konsantrasyonlarda *in vitro* rejenerasyonu etkilediği belirlenmiştir. %15 PEG 6000 uygulamasının rejenerasyonu önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir. Özellikle embriyojenik gelişimlerin sınırlandırıldığı ve hem organogenez hem de somatik embriyogenez sonucu oluşan yapılarda sürgün gelişimlerinin gözlenmediği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Aazami, M. A., Torabi, M., & Jalili, E. (2010). In vitro response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. *African Journal of Biotechnology*, 9(26), 4014-4017.
- Ahmad, M. A., Javed, R., Adeel, M., Rizwan, M., & Yang, Y. (2020). PEG 6000-Stimulated Drought Stress Improves the Attributes of In Vitro Growth, Steviol Glycosides Production, and Antioxidant Activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plants*, 9(11), 1552.
- Aslezaem, F., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., & Sharifi, G. (2018). Comparative study of drought stress and salicylic acid effects on different accessions of saffron (*Crocus Sativus* L.), 554-569.

- Biswas, J., Chowdhury, B., Bhattacharya, A., & Mandal, A. B. (2002). In vitro screening for increased drought tolerance in rice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(5), 525-530.
- Boris, P. M., Dubravka, Š., Ružica, Ž. P., Bojana, B., & Vladislava, (2016) G. Antioxidative Response Of Poplar Tissue Culture Exposed To Peg. *22nd International Symposium on Analytical and Environmental Problems*, 267-269.
- Bouiamrine, E. H., & Diouri, M. (2012). Response of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) callus culture to osmosis-induced drought stress caused by polyethylene glycol (PEG). *Annals of Biological Research*, 3(9), 4555-4563.
- Dami, I., & Hughes, H. (1995). Leaf anatomy and water loss of in vitro PEG-treated 'Valiant' grape. *Plant cell, tissue and organ culture*, 42(2), 179-184.
- Dami, I., & Hughes, H. G. (1997). Effects of PEG-induced water stress on in vitro hardening of 'Valiant' grape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47(2), 97-101.
- Duncan, R. R., Waskom, R. M., & Nabors, M. W. (1995). In vitro screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) for soil stress tolerance. In *The Methodology of Plant Genetic Manipulation: Criteria for Decision Making* (pp. 373-380). Springer, Dordrecht.
- Dwyer, A., Hawrelak, J., Whitten, D. (2011). Herbal Medicines, other than St. John's Wort, in the treatment of Depression: A systematic Review. *Sci. Rev. Altern. Med.* 16, 40-49.
- Fallon, K. M., & Phillips, R. (1989). Responses to water stress in adapted and unadapted carrot cell suspension cultures. *Journal of Experimental Botany*, 40(6), 681-687.
- Farooq M, Basra S. M. A., Wahid A., Cheema Z. A., Cheema M. A., & Khaliq A. (2008). Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improve drought tolerance of fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *J. Agron. Crop Sci*, 194, 325-333.
- Gao, H., Xu, D., Zhang, H., Cheng, X., & Yang, Q. (2020). Effects of culture medium composition and PEG on hyperhydricity in *Dendrobium officinale*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56(2), 143-149.
- Ghassemi-Golezani, K., Farhadi, N., & Nikpour-Rashidabad, N. (2018). Responses of in vitro-cultured *Allium hirtifolium* to exogenous sodium nitroprusside under PEG-imposed drought stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 133(2), 237-248.
- Guclu, G., Kelebek, H., & Selli, S. (2020). Saffron (*Crocus sativus* L.): Its Aroma and Key Odorants. In *Saffron* (pp. 69-82). Academic Press.
- Hajihashemi, S., & Ehsanpour, A. A. (2014). Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* B. to polyethylene glycol and paclobutrazol treatments under in vitro culture. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(8), 4038-4052.
- Hill, T. (2004). The contemporary encyclopedia of herbs & spices: seasonings for the global kitchen. J. Wiley.
- Khazdair, M. R., Anaeigoudari, A., Hashemzahi, M., & Mohebbati, R. (2019). Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review. *Journal of traditional and complementary medicine*, 9(2), 98-105.
- Mahmood, I., Razzaq, A., Ashraf, M., Ahmad Hafiz, I., Kaleem, S., Qayyum, A., & Ahmad, M. (2012). In vitro selection of tissue culture induced somaclonal variants of wheat for drought tolerance. *Journal of Agricultural Research (03681157)*, 50(2).
- Murray, C. J., & Lopez, A. D. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *The lancet*, 349(9064), 1498-1504.

- Mzabri, I., Addi, M., & Berrichi, A. (2019). Traditional and modern uses of saffron (*Crocus sativus*). *Cosmetics*, 6(4), 63.
- Nath, A. K., Kumari, S. U. M. A. N., & Sharma, D. R. (2005). In vitro selection and characterization of water stress tolerant cultures of bell pepper. *Indian Journal of Plant Physiology*, 10(1), 14.
- Orlikowska, T., Kucharska, D., & Horbowicz, M. (2008, September). The reaction of raspberry and blackberry cultivars to drought stress simulated in vitro by polyethylene glycol (PEG) 6000. In *I International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: Biotechfruit2008* 839 (pp. 337-342).
- Patade, V. Y., Bhargava, S., & Suprasanna, P. (2012). Effects of NaCl and iso-osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense in cultured sugarcane cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108(2), 279-286.
- Piwowarczyk, B., Kamińska, I., & Rybiński, W. (2014). Influence of PEG generated osmotic stress on shoot regeneration and some biochemical parameters in *Lathyrus* culture. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50(2), 77-83.
- Premkumar, K.; Abraham, S.K.; Santhiya, S.T.; Ramesh, A (2003). Protective effects of saffron (*Crocus sativus* L.) on genotoxinsinduced oxidative stress in Swiss albino mice. *Phytother. Res.*, 17, 614–617.
- Rao, S., & Jabeen, F. T. Z. (2013). In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 261-268.
- Saeedavi, L., Soleimani, A., & Amiri, M. E. (2017). Improvement of shoot-tip culture proliferation in banana using PEG 6000. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 7(3).
- Saepudin, A., Khumaida, N., Sopandie, D., & Ardie, S. W. (2017). In Vitro selection of four soybean genotypes using PEG for drought tolerance. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 45(1), 14-22.
- Sharifi, G., Niknam, V., Sedighi, F., & Seifi Kalhor, M. 2020. Investigation of GABA effect on drought stress tolerance improvement in cultivated saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Plant Process and Function*, vol. 9, no. 39.
- Sivritepe, N., Erturk, U., Yerlikaya, C., Turkan, I., Bor, M., & Ozdemir, F. (2008). Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro. *Biologia Plantarum*, 52(3), 573.
- Smith, R. H., Bhaskaran, S., & Miller, F. R. (1985). Screening for drought tolerance in sorghum using cell culture. *In Vitro Cellular amp; Developmental Biology*, 21(10), 541-545.
- Suganya, K., Preethi, P. S., Suganya, M., & Nanthini, A. U. R. (2016). Natural pigments in cosmetics-past to present. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Business*, 4, 07-14.
- Taheri-Dehkordi, A., Naderi, R., Martinelli, F., & Salami, S. A. (2020). A robust workflow for indirect somatic embryogenesis and cormlet production in saffron (*Crocus sativus* L.) and its wild allies; *C. caspius* and *C. speciosus*. *Heliyon*, 6(12), e05841.
- Tsago, Y., Andargie, M., & Takele, A. (2014). In vitro selection of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) for polyethylene glycol (PEG) induced drought stress. *Plant Science Today*, 1(2), 62-68.
- Turhan, H., & Baser, I. (2004). In vitro AND In vivo Water Stress In Sunflower (*Helianthus Annuus* L.)/Estrés Hídrico En Girasol (*Helianthus annuus* L.) En Las Condiciones In Vitro E In Vivo/Stress D'eau Du Tournesol (*Helianthus annus* L.) Dans Les Conditions In vitro Et In vivo. *Helia*, 27(40), 227-236.

- Vahedi, M., Kalantari, S., & Salami, S. A. (2015). Effects of osmolytic agents on somatic embryogenesis of saffron (*Crocus sativus* L.). *Notulae Scientia Biologicae*, 7(1), 57-61.
- Wani, S. H., Sofi, P. A., Gosal, S. S., & Singh, N. B. (2010). In vitro screening of rice (*Oryza sativa* L) callus for drought tolerance. *Communications in Biometry and Crop Science*, 5(2), 108-115.
- Wu, X., Zeng, F., & Zhang, G. (2017). PEG-simulated drought stress and spike in vitro culture are used to study the impact of water stress on barley malt quality. *Plant Growth Regulation*, 81(2), 243-252.