

Safran (*Crocus sativus* L.) Bitkisinde Biyoteknolojik Çalışmalar

Yonca SURGUN ACAR¹, Rabia İŞKİL², Betül BÜRÜN³

ÖZET: Iridaceae familyasına ait olan *Crocus sativus* L. triploid ($2n=3x=24$) bir bitkidir ve korm (corm)'ları aracılığı ile vejetatif olarak çoğaltılmaktadır. *Crocus sativus* çiçeklerinin stigmaları bitkinin ekonomik olarak en önemli kısmını oluşturmakta ve hem kuru stigmalarından elde edilen baharat hem de bitkinin adı safran olarak isimlendirilmektedir. Safran bitkisi kokusunu safranal, tadını pikrokrosin, rengini ise krosin adı verilen sekonder bileşiklerinden almakta olup bu metabolitleri stigmasında bulundurmaktadır. Safranın ekonomik değeri, boya, gıda ve kozmetik gibi çeşitli endüstri dallarında çok geniş kullanım alanının yanı sıra sekonder metabolitlerinin sahip olduğu anti-kanser özelliğinden ileri gelmektedir. Kormların çoğalma oranının yüksek olmaması ve patojenlerle bulaşık olma durumu safran üretimini kısıtlamakta ve kaliteyi düşürmektedir. Bu olumsuzluklar ve yetiştirme zorlukları nedeniyle yıllık safran üretiminin giderek azalması ve safran ihtiyacının karşılanamaması, araştırmaları safranın in vitro çoğaltımı üzerine yoğunlaştırmıştır. İn vitro kültür gibi biyoteknolojik yöntemler; safran bitkisi için kısa sürede büyük miktarlarda çoğaltım materyali elde etmeyi sağlamakta ayrıca, krosin, pikrokrosin ve safranal gibi ticari öneme sahip kimyasal maddelerin üretimi için de imkan sunmaktadır. Bu makalede, safranın başlıca sekonder metabolitleri ve in vitro kültürü üzerine yapılan bazı çalışmalar derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İn vitro kültür, krosin, pikrokrosin, safran, safranal

Biotechnological Studies in Saffron (*Crocus sativus* L.) Plant

ABSTRACT: A member of Iridaceae family, *Crocus sativus* L. is a triploid ($2n=3x=24$) plant and is reproduced vegetatively via its corms. Stigmas of *Crocus sativus* flowers constitutes economically the most important part of the plant and both the spice obtained from dry stigmas and the name of the plant is termed as saffron. Saffron gets odor from safranal, taste from picrocrocin, colour from crocin secondary metabolites and keeps these metabolites in its stigma. Economic value of saffron arises from extensive areas of usage in various industry branches such as dye, food and cosmetics as well as anti-cancer properties of secondary metabolites. Not having high reproduction rate of corms and infection with pathogens situation limit the production and reduces the quality of saffron. Because of these negativities and difficulties of growing, decrease of annual saffron production gradually and dissatisfaction of saffron need is concentrated the searches on in vitro production of saffron. Biotechnological methods as in vitro culture; provide for saffron plant to obtain vast amount of multiplication material in short times, also give the opportunity for production of commercially important chemicals such as crocin, picrocrocin and safranal. In this article, main secondary metabolites of saffron and some studies on in vitro culture were reviewed.

Keywords: Crocin, in vitro culture, picrocrocin, saffron, safranal

¹ Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın, Türkiye

² Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D., Bartın, Türkiye

³ Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Yonca SURGUN ACAR¹, yoncasurgun@gmail.com

GİRİŞ

Crocus sativus L. (safran), Iridaceae familyası (endemik türler bakımından oldukça zengin)'nin alt familyalarından en büyüğü olan Crocoideae familyasına ait ve ekonomik değeri en yüksek olan türdür (Açıkgöz, 2010). Triploid ($2n=3x=24$) olan bu tür asimetrik mayoz nedeniyle steril polenler üretmekte ve yalnızca kormları ile çoğaltılmaktadır (Parray et al., 2012). Safran kormları doğal koşullarda sadece bir sezon hayatta kalabilmekte, her ana kormdan 4-5 kormel (yavru korm) oluşmakta ve bunların olgunlaşım yavru kormları vermesi 3-4 yıl sürmektedir (Sharma and Piqueras, 2010; Parray et al., 2012). Safranın temel karakteristiği, yaz dönemi uzun bir dormansi dönemi geçirerek sonbaharda aktif büyüme periyoduna geçmesidir (Açıkgöz, 2010). Dünyanın en pahalı baharatı olan safran, *Crocus sativus* çiçeğinin koyu turuncu olan 2.5-3.2 cm uzunluğundaki stigmalarının el ile toplanması, kurutulması ve ardından toz haline getirilmesi sonucu elde edilir (Açıkgöz, 2010). Ortalama 160 kg safran çiçeğinden yaklaşık 1 kg kuru stigma elde edilmesi ve yetiştiriciliğinin zahmetli olması en pahalı baharatlardan biri olmasının başlıca sebepleridir (Sharifi et al., 2010).

Günümüzde safran yetiştiriciliği Avrupa ülkelerinin yanı sıra Türkiye, İsrail, Pakistan, Hindistan, İran, Mısır, Azerbaycan, Çin, Japonya ve Avustralya'da da yapılmaktadır (Ahmad et al., 2014). Ülkemizde Osmanlılar döneminde safran yetiştiriciliği İstanbul, İzmir, Adana, Tokat, Şanlıurfa ve Safranbolu'nun 40 kadar köyünde yapılmakta ve yurt dışına ihraç edilmekteyken günümüzde Safranbolu'nun sadece Davutobası, Yörük, Aşağıgüney, Geren, Yazıköy ve Değirmencik köylerinde yapılmaktadır (Ünaldı, 2007).

Ülkemiz, endemik bitkiler bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir ve Türkiye'deki endemik bitkilerin sayısı yaklaşık 3000 civarındadır. Türkiye'de yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalan türlerin sayısı ise, floradaki toplam bitki türü sayısının %23'ünü oluşturmaktadır (Ünaldı, 2007). Tehdit altındaki bu bitkilerden biri olan safranın sahip olduğu sekonder metabolitlerin farklı kanser türleri üzerindeki inhibe edici etkileri son yıllarda yaygın olarak araştırılmaktadır (Ahmad et al., 2014). Fakat safranın dar genetik tabanı ve autotriploid

doğası, geleneksel ıslah yöntemleriyle iyileştirilmesi çalışmalarını zor hale getirmektedir. Kültüre alınan safran gerekli şartlar sağlandığında in vitro ortamda büyük ölçekte ve hastaliksız olarak üretilebilmekte ve sekonder metabolitler sentezleyebilmektedir. Bu makalede, yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan, giderek ekimi ve üretimi azalan safranın başlıca sekonder metabolitleri ve in vitro çoğaltımı (direkt ve indirekt organogenesis ile somatik embriyogenesis) üzerine yapılan çalışmalar derlenmiştir.

SAFRANIN BAŞLICA SEKONDER METABOLİTLERİ

Safran 150'den fazla uçucu ve aroma verici bileşik içermektedir. Bunların çoğu zeaksantin, likopen ve değişik α ile β karoten içeren karotenoidlerdir (Abdullaev, 2002).

Safranın içerdiği sekonder metabolitler arasında en önemlileri ve bilinenleri stigmada bulunan ve safrana özgü rengi veren krosin ($C_{44}H_{64}O_{24}$), acı tadından sorumlu olan pikrokrosin ($C_{16}H_{26}O_7$) ve koku veren safranal ($C_{10}H_{14}O$)'dır (Abdullaev, 2002). Kuru safran kütesinin %10'undan fazlasını oluşturan krosin, suda çözünabilirliği ve büyüme üzerine inhibe edici etkisi nedeniyle son yıllarda yapılan çalışmalarda kemotörpötik ajan olarak kullanılmaktadır (Escribano et al., 1995). Krosinin, kanserin başlama ve ilerleme aşamalarında dikkate değer inhibisyon etki gösterdiği ayrıca, meme kanser hücrelerinde, pankreas kanser hücrelerinde, insan rabdomiyosarkom hücrelerinin de bulunduğu birçok tümör hücresinde hücre büyümesini engellediği ya da hücreyi ölüme yönlendirdiği tespit edilmiştir (Chen et al., 2015). Zeaksantin karotenoidinin oksidatif parçalanma ile kısalmış hali olan pikrokrosin, kuru safran stigmalarının %4'ünü oluşturmaktadır (Açıkgöz, 2010). Safranal, safranın uçucu bileşenlerinin %70'ini oluşturur ve safranın hasatından sonra depolama süresince sıcaklığında etkisiyle pikrokrosinin hidroliziyle oluşur. Safrana aroma veren diğer bir ana bileşik ise HTCC (2-hidroksi-4,4,6-trimetil-2,5-sikloheksadien-1-on)'dir. Safranala oranla daha az bulunmakta ve pikrokrosinden ısı ya da enzimatik yolla üretilmektedir (Aliakbarzadeh et al., 2016).

SAFRANIN İN VİTRO KÜLTÜRÜ

Safranın geleneksel yöntemlerle üretiminin talebi tam olarak karşılayamaması, yetiştiriciliğinin zor olması, hastalık etmeni problemleri gibi nedenlerden dolayı doğal üretim tekniklerine alternatif olarak laboratuvar şartlarında in vitro kültür teknikleriyle çoğaltımı üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu araştırmaların hedefi, safranın büyük ölçekte ve hastaliksız olarak üretimi için gerekli koşulların optimize edilmesi ve in vitro sekonder metabolit üretimi olmuştur (Sharma and Piqueras, 2010; Gantait and Vahedi, 2015).

Safranın Direkt Organogenesis, İndirekt Organogenesis ve Somatik Embriyogenesis Yoluyla Çoğaltımı Üzerine Bazı Araştırmalar

Bilindiği gibi eksplanttan kallus oluşturmaksızın adventif sürgün ya da diğer organların doğrudan oluşumu direkt organogenesis olarak tanımlanmakta ve indirekt organogenesis (kallusdan rejenerasyona) oranla bitkinin klonal çoğaltımında daha avantajlı bir metot olarak görülmektedir (Gantait and Vahedi, 2015). Yüksek çoğalma oranı, indirekt yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç alınması ve genetik uniformluk, safran genetik kaynaklarının ex situ korunmasında, direkt organogenesisi uygun bir yöntem haline getirmektedir (Renau-Morata et al., 2013). Safranın direkt organogenesis yoluyla in vitro klonal çoğaltımına ilişkin çalışmalardan bazı örnekler Çizelge 1’de verilmiştir.

İn vitro kültür teknikleriyle kısa sürede çok sayıda mikrokorm üretilmesi safranın mikro çoğaltımını ideal hale getirmektedir. Ayrıca mikrokormların boyutlarının küçük olması, kolay taşınması, düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesi ve germplazm kaynağı olarak kullanılması bakımından avantaj sağlamaktadır (Sharma and Piqueras, 2010).

Diğer bitkilerde olduğu gibi safranda da, korm oluşumu için sükröz/karbonhidrat konsantrasyonu en kritik faktör olup yüksek sükröz konsantrasyonu (%6-9) mikrokorm oluşumunu, gelişimini ve biyokütle artışı teşvik etmektedir (Raja et al.,

2007). Safranda yapılan çalışmalarda, gibberellik asit uygulamaları korm oluşumunu ihbihe ederken, absisik asit uygulamalarının da senesens ile ilişkili olarak korm teşvikini engellediği ancak partenokarpik meyve gelişimine yol açtığı saptanmıştır (Sharma and Piqueras, 2010). Korm oluşumunu etkileyen bir diğer faktör ise eksplant tipi olup, tek sürgünden korm oluşumuna zayıf bir yanıt alınırken, iki veya üç dallı sürgünlerden fazla sayıda ve yüksek ağırlıkta mikrokorm gelişimi gözlenmiştir (Milyaeva et al., 1995).

İndirekt organogenesis, eksplanttan kallus aracılığı ile sürgün gelişiminin elde edilmesine dayanmakta ve bu durumu başta bitki büyüme düzenleyicileri olmak üzere birçok faktör etkilemektedir. İndirekt organogenesisde yani kallustan sürgün oluşumunda, öncelikle bitki hücre ve dokularının çoğalarak amorf dokulara dönüşmesi, ardından uygun kimyasal ve fiziksel koşullar altında bu kallus yapılarının organa dönüşmesidir (Gantait and Vahedi, 2015).

Safranın in vitro kültür çalışmalarında çoğunlukla korm eksplantının kullanılması ile yüksek verimin elde edilmesinde kormun bölünen meristematik hücrelerinin yeni primordiyal sürgün gelişim yeterliliğini taşıyor olmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir (Gantait and Vahedi, 2015). Safranda farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin ve konsantrasyonlarının kallus ve kallustan rejenerasyon üzerine etkilerinin belirtildiği bazı çalışmalar Çizelge 2’de özetlenmiştir.

Somatik embriyogenesis, tek veya bir grup hücrenin önce kallusa, ardından somatik embriyogenesis aracılığı ile tam bir bitkiye dönüşmesidir (Gantait and Vahedi, 2015).

Safranın somatik embriyogenesis yolu ile rejenerasyonuna ilişkin bazı çalışmalar Çizelge 2’de özetlenmiştir. Blazquez et al. (2004), geçici daldırma sistemini (TIS: Temporary Immersion System) kullanarak embriyonik kallus üretimini ve yarı-katı ortama nazaran yaş ağırlığı dört kat arttırmayı başarmışlardır.

Safranın *İn vitro* Kültüründe Sekonder Metabolitlerin Üretimi

Doku kültürü yöntemleri ile sekonder metabolitlerin üretimi için iki alternatif geliştirilmiştir. Bunlardan ilki, kallus veya hücre kültürlerinde sekonder bileşiklerin sentezlenmesidir. İlk zamanlarda yapılan çalışmalarda, safranın organize olmamış hücrelerinden elde edilen krosin ya da krosetin miktarının doğal stigma içeriğine kıyasla çok düşük konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiştir (Sharma and Piqueras, 2010).

Safran kallus kültürlerinde, sekonder metabolit üretiminin düşük miktarda olmasının yanı sıra kalluslarının rengin kahverengine döndüğü de belirtilmekte ve kahverengi olan kallusların ölü/kuru hücreler olup, bölünme veya sekonder metabolit üretme yeteneğini kayb ettikleri ortaya koyulmuştur (Sharma and Piqueras, 2010). Uygun konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri, besin ortamı bileşenleri, öncül kimyasallar ve ağır metaller gibi bazı faktörler *in vitro* kültürlerde sekonder metabolitlerin ve özellikle krosin sentezinin arttırılmasında önemli potansiyel sunmaktadır. Ayrıca, safranda son yıllarda yapılan çalışmalarda tek aşamalı kültür sistemi yerini iki aşamalı kültür sistemine bırakmıştır (Sharma and Piqueras, 2010).

Chen et al. (2003), hücre büyümesi ile krosin sentezinin ayrı süreçler olduğunu belirtmiş ve uyguladıkları iki aşamalı kültür sisteminde IAA (2 mg L^{-1}) ve BAP (0.5 mg L^{-1}) eklenmiş B5 besin ortamından maksimum miktarda krosin (0.43 g L^{-1}) elde etmişlerdir. Diğer bir araştırmada ise, La^{+3} , Ce^{+3} ve Nd^{+3} gibi nadir bulunan elementlerin, safran hücrelerinin büyümesi ve krosin üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. La^{+3} ve Ce^{+3} 'un tek başına ya da birlikte verildiğinde kallusların krosin üretimini arttırırken, bütün metal iyonların $100 \text{ }\mu\text{M}$ üstünde toksik olduğu belirtilmiştir (Chen et al., 2004). *İn vitro* ortamda oluşan safran stigmasına benzer yapılar, stigma-benzeri yapılar (SBY) (SLS: Stigma-Like Structures) veya doku kültürü stigmaları (DKS) (TCS: Tissue Culture Stigmas)

olarak adlandırılmaktadır (Sharma and Piqueras, 2010). *İn vitro* kültürde düşük konsantrasyonlarda NAA ve BA direkt SBY'ın rejenerasyonunu teşvik ederken, bu bitki büyüme düzenleyicilerinin yüksek konsantrasyonlarının indirekt rejenerasyonu indüklediği ortaya konulmuştur (Loskutov et al., 1999; Ebrahimzadeh et al., 2000a). Ayrıca, direkt rejenerasyonla elde edilen SBY'ın doğal stigmalara şekil, renk, boyut ve sekonder içeriği bakımından indirekt rejenerasyonla elde edilenlere göre daha çok benzediği belirtilmektedir (Sharma and Piqueras, 2010).

Ovaryum (Sano and Himeno, 1987; Loskutov et al., 1999), stigma (Koyama et al., 1988) ve petal (Zeng et al., 2003) eksplantlarından rejenerasyon sonucu elde edilmiş olan SBY'da krosin, pikrokrosin, safranal ve krosetin gibi başlıca sekonder metabolitlerin varlığının tespitine ilişkin de birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, 4 sekonder metabolit arasından, anti-kanser özelliğinden dolayı en çok krosin üretimi üzerine yoğunlaşmıştır (Chen et al., 2015). Sano and Himeno (1987) çalışmalarında, doğal *Crocus sativus* bitkilerinin genç stigma ve yarım ovaryumlarını sitokin, oksin ve sitokin-oksine kombinasyonunu içeren LS besin ortamında kültüre almışlardır. Kültür sonunda elde ettikleri SBY'da sekonder metabolitlerin sentezlendiğini tespit etmişler fakat *in vivo* ortamdaki stigma içeriğine nazaran daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Sarma et al. (1991), NAA ve BA içeren MS besin ortamında kültüre aldıkları ovaryum eksplantlarından SBY üretmiş ve ürettikleri SBY'ın sekonder metabolit içeriğinin doğal safran stigmasına kıyasla 6-11 kat daha az olduğunu belirlemişlerdir. Loskutov et al. (1999), *C. sativus*'un yarım ovaryum eksplantlarını $54 \text{ }\mu\text{M}$ NAA, $44.4 \text{ }\mu\text{M}$ BAP, %0.05 kazein ve $11 \text{ }\mu\text{M}$ L-alanin içeren B5 ortamında kısa aralıklarla alt kültürlerle almışlar ve 9-10 aylık bir periyotta elde ettikleri SBY'da, HPLC analizi ile krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranal miktarlarını belirlemişlerdir. Sekonder metabolit miktarlarının doğal safranda bulunan miktarlara benzer olduğunu tespit etmişlerdir.

Çizelge 1. *Crocus sativus*'un direkt organogenesis aracılığı ile in vitro klonal çoğaltımına ilişkin bazı çalışmalar

Eksplant tipi	Besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicisi	Yanıt	Kaynak
Yarım ovaryum, stigma	LS	1 mg L ⁻¹ Kn + 10mg L ⁻¹ NAA 1mg L ⁻¹ BAP + 20mg L ⁻¹ IBA 5 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ IAA	Stigma-benzeri yapı	Sano and Himeno, 1987
Stigma, stil	LS	30 µM BAP + 50 µM NAA 10 µM BAP + 10 µM NAA 10 µM BAP + 50 µM NAA 1 µM BAP + 50 µM NAA	Stigma-benzeri yapı	Koyama et al., 1988
Apikal tomurcuk	MS	3 mg L ⁻¹ ZEA	Korm	Plessner et al., 1990
Stigma	MS	10 mg L ⁻¹ NAA + 1mg L ⁻¹ BAP	Stigma-benzeri yapı	Sarma et al., 1990
Yarım ovaryum, stigma, anter, petal	White	4 mg L ⁻¹ NAA + 4 mg L ⁻¹ ZEA	Stigma-benzeri yapı	Fakhrai and Evans, 1990
Anter Ovaryum (stigmadahil) Ovaryum (stigma hariç)	MS	54 µM NAA + 4.4µM BAP 27 µM NAA + 44 µM BAP 54 µM NAA + 4.4µM BAP	Stigma-benzeri yapı	Sarma et al., 1991
Petal, stil	MS	5 mg L ⁻¹ Kn + 4 mg L ⁻¹ NAA 6 mg L ⁻¹ BAP + 9 mg L ⁻¹ NAA	Stigma-benzeri yapı	Lu et al., 1992
Ovaryum	MS	26.9 µM NAA + 4.4 µM BAP	Çoklu Sürgün	Bhagyalakshmi, 1999
Yarım ovaryum	B5	5.4 µM NAA + 44.4 µM BAP + %0.05 kazein + 11 µM L-alanin	Stigma-benzeri yapı	Loskutov et al., 1999
Stil	MS	5 mg L ⁻¹ Kn + 5 mg L ⁻¹ NAA	Stigma-benzeri yapı	Ebrahimzadeh et al., 2000a
Stamen	MS	5 mg L ⁻¹ NAA + 6 mg L ⁻¹ BAP	Stigma-benzeri yapı	Zhao et al., 2001
Petal, stigma, stil	MS	5 mg L ⁻¹ Kn + 4 mg L ⁻¹ NAA + 1 mM SA	Stigma-benzeri yapı	Zeng et al., 2003
Stil	MS	26.8 µM NAA + 31.1µM BAP	Çiçek	Jun et al., 2007

(Çizelge 1'in devamı)

Eksplant tipi	Besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicisi	Yanıt	Kaynak
Apikal ve lateral tomurcuk	MS	5mg L ⁻¹ BAP, 1 mg L ⁻¹ 2İP	Çoklu sürgün	Majourhat et al., 2007
Korm	MS	0.5 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ BAP	Kormlet	Karaoğlu et al., 2007
*Korm Çoklu sürgün	MS ½ MS	14 mg L ⁻¹ BAP + 3 mg L ⁻¹ IBA 3 mg L ⁻¹ BAP	Çoklu sürgün Kormlet	Sharma et al., 2008
**Korm Çoklu sürgün	MS B5	4.54 µM TDZ 2.22 µM NAA + 2.68 µM BAP	Çoklu sürgün Bitki rejenerasyonu	Sharifi et al., 2010
Sürgün	MS	1 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ TDZ 1 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ Kn	Sürgün Kök	Vatankhah et al., 2010
Yarım ovaryum Apikal tomurcuk	B5 LS	27 µM NAA + 44.4 µM BAP 21.6 µM NAA + 22.2 µM BAP	Stigma-benzeri yapı Mikrokorm	Mir et al., 2010
Ovaryum, stil	MS	10 mg L ⁻¹ NAA + 10 mg L ⁻¹ BAP	Stigma-benzeri yapı	Namin et al., 2010
*Korm Çoklu sürgün	MS	26.64 µM BAP + 5 µM NAA 1.7 µM PAC	Çoklu sürgün Kormlet	Devi et al., 2011
Korm Apikal tomurcuk	½ MS	20 µM TDZ + 10 µM IAA 20 µM BAP + 20 µM NAA	Kormlet Kormlet	Parray et al., 2012
*Korm Çoklu sürgün	MS	0.1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 2 mg L ⁻¹ BAP 1 mg L ⁻¹ IBA	Çoklu sürgün Korm	Zeybek et al., 2012
*Korm	½ MS	5 mg L ⁻¹ BAP + 0.5 mg L ⁻¹ NAA 1 mg L ⁻¹ TDZ + 0.5mg L ⁻¹ NAA	Çoklu sürgün	Renau-Morata et al., 2013
Çoklu sürgün	½ MS	-	Korm	Simona et al., 2013
Apikal ve lateral tomurcuk	MS	1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ BAP	Çoklu sürgün	
*Korm Çoklu sürgün	MS	6 mg L ⁻¹ ZEA + 2 mg L ⁻¹ 2,4-D 0.2 ml L ⁻¹ CCC	Çoklu sürgün Kormlet	Salwee and Nehvi, 2014

*:Yapılan çalışmalarda önce kormlardan çoklu sürgün, sonrasında çoklu sürgünden kormlet ya da korm oluşumu gerçekleştirilmiştir

** :Yapılan çalışmalarda önce kormlardan çoklu sürgün, sonrasında çoklu sürgünden bitki rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir

2,4-D:2,4-Diklorofenoksiasetik asit, 2İP:İzopentiladenin, B5:Gamborg besin ortamı (Gamborg et al., 1968), BAP:6-benzilaminopürin, CCC:Chlorocholineklorid, IAA:İndol-3-asetik asit, IBA:İndol-3-butirik asit, Kn:Kinetin, LS:Linsmaier and Skoog (1965), MS:Murashige and Skoog (1962), NAA:Naftalen asetik asit, PAC:Paclotrazol, SA:Sodyum asetat, TDZ:Thidiazuron, White: White (1964), ZEA:Zeatin

Çizelge 2. *Crocus sativus*'un indirekt organogenesis ve somatik embriyogenesis aracılığı ile in vitro klonal çoğaltımına ilişkin bazı çalışmalar

İndirekt Organogenesis			
Eks-plant tipi	Besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicileri ve indirekt organogenesis aşamaları	Kaynak
Korm	½MS	0.5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L ⁻¹ BAP + %2 CM → Kallus → 0.1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L ⁻¹ BAP → Sürgün tomurcuğu 0.1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg L ⁻¹ BAP → Sürgün rejenerasyonu	Ilahi et al., 1987
Ovaryum	MS	5 mg L ⁻¹ BAP + 10 mg L ⁻¹ NAA → Kallus → 1 mg L ⁻¹ BA + 1 mg L ⁻¹ NAA → Stigma rejenerasyonu	Castellar and Iborra, 1997
Korm	MS	2 mg L ⁻¹ BA + 0.1 mg L ⁻¹ 2,4-D → Nodular kallus → 2 mg L ⁻¹ - 5 mg L ⁻¹ BAP + 0.5 mg L ⁻¹ imazalil → Sürgün rejenerasyonu	Piqueras et al., 1999
Apikal tomurcuk	LS	2 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ BAP → Embriyonik olmayan kallus, 1 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ BAP → Embriyonik kallus	Darvishi et al., 2006
Yaprak	MS	1 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ 2,4-D → Kallus → 2 mg L ⁻¹ BAP + 0.5 mg L ⁻¹ NAA → Sürgün rejenerasyonu	Raja et al., 2007
Korm	MS	1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 4 mg L ⁻¹ Kn → Embriyonik kallus	Sharifi et al., 2012
Korm	MS	0.25 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ BAP → Kallus → 1.5 mg L ⁻¹ BAP → Çoklu Sürgün → 1 mg L ⁻¹ IBA → Korm, kök	Zeybek et al., 2012
Korm	MS	2 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.1 mg L ⁻¹ BAP → Kallus → 0.1 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ NAA → Sürgün rejenerasyonu	Vahedi et al., 2014
Somatik embriyogenesis			
Eks-plant tipi	Besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicileri ve indirekt organogenesis aşamaları	Kaynak
Korm	MS	2 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L ⁻¹ Kn → Kallus → 2 mg L ⁻¹ IAA + 2 mg L ⁻¹ Kn + 100 mg L ⁻¹ askorbik asit → Somatik embriyo → ½ MS + 1 mg L ⁻¹ ABA → Embriyo farklılaşması → 2 mg L ⁻¹ IAA + 4 mg L ⁻¹ Kn → Çoklu sürgün → 2 mg L ⁻¹ IAA + 2 mg L ⁻¹ Kn + 100 mg L ⁻¹ askorbik asit → Bitkicik rejenerasyonu	George et al., 1992
Sürgün ucu	LS, ½ MS, MS	20 µM BAP + 20 µM NAA → Somatik embriyo → 25 mg L ⁻¹ GA ₃ → Embriyo farklılaşması → 50 µM BAP + 50 µM NAA → Bitkicik rejenerasyonu ve korm gelişimi	Ebrahimzadeh et al., 2000b
Sürgün	LS	4mg L ⁻¹ NAA + 4 mg L ⁻¹ BAP → Kallus → ½ MS + 1 mg L ⁻¹ ABA → Somatik embriyo → 25 mg L ⁻¹ GA ₃ Embriyo farklılaşması → ½ MS + 1 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ BAP → Bitkicik rejenerasyonu	Karamian, 2004
Yaprak	MS	1mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ 2,4-D → Embriyonik kallus → 2.25 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ 2,4-D → Somatik embriyo → ½ MS + 1.75 mg L ⁻¹ ABA + 0.5 mg L ⁻¹ BAP + 20 mg L ⁻¹ GA ₃ → Olgun embriyo ½ MS + 4 mg L ⁻¹ BAP + 0.5 mg L ⁻¹ NAA → Bitkicik rejenerasyonu ve mikrokorm gelişimi	Raja et al., 2007
Protoplast	MS	1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0.2 mg L ⁻¹ Kn → Kallus → 1 mg L ⁻¹ ABA → Somatik embriyo → 25 mg L ⁻¹ GA ₃ → Olgun embriyo → 1 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ BAP → Bitkicik rejenerasyonu	Chaloushi et al., 2007
Korm	MS	0.5 mg L ⁻¹ TDZ → Embriyonik kallus → 0.25 mg L ⁻¹ TDZ → Somatik embriyo → ½ MS → Mikrokorm	Sheibani et al., 2007
Korm	MS	0.1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ BAP → Embriyonik kallus → 0.05 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ BAP → Somatik embriyo	Blazquez et al., 2009
Korm	MS	1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ BAP → Kallus → 0.5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1 mg L ⁻¹ BAP → Somatik embriyo	Shahabzadeh et al., 2013
Yaprak, korm	MS	1 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ 2,4-D → Embriyogenik kallus → 1 mg L ⁻¹ BAP + 1 mg L ⁻¹ NAA Sürgün rejenerasyonu → 5 mg L ⁻¹ PAC → Mikrokorm	Zaffar et al., 2014
Yaprak	MS	2.5 µM TDZ + 1µM PIC → Somatik embriyo → 26.64 µM BAP + 1 µM NAA → Çoklu sürgün	Devi et al., 2014

2,4-D:2,4-Diklorofenoksi asetik asit, 2İP:İzopentiladenin, ABA:Absisik asit, B5:Gamborg besin ortamı (Gamborg et al., 1968), BAP:6-benzilamino pürin, CCC:Chlorocholine chloride, CM:Hindistan cevizi sütü, IAA:İndol-3-asetik asit, IBA:İndol-3-butirik asit, GA₃:Gibberellik asit, Kn:Kinetin, LS:Linsmaier and Skoog (1965), MS:Murashige and Skoog (1962), NAA:Naftalen asetik asit, PAC:Paclobutrazol, SA:Sodyum asetat, TDZ:Thidiazuron, ZEA:Zeatin

Zeng et al. (2003), Kn ve NAA içeren ortama sodyum asetat ve PVP (polyvinylpyrrolidone) gibi maddeler ekleyerek eksplant kaynağı petal olan stigma benzeri yapılarda krosin sentezini arttırdıklarını

belirtmişlerdir. Son yıllarda ise, Shahabzadeh et al. (2013), sodyum azid uygulaması ile in vitro ortamda krosin, pikrokrosin ve safranal üretimini arttırmayı başarmışlardır.

SONUÇ

Safranın da dahil olduğu birçok geofit bitkinin geleneksel yöntemlerle çoğaltılmasında elde edilen üretim materyali oldukça düşüktür. Klasik çoğaltım yöntemleri yanında, biyoteknolojik yöntemler de birçok önemli ve ekonomik bitkinin çoğaltımına katkıda bulunmaktadır. Safranın in vitro kültür yöntemleri ile çoğaltımı, bitkinin büyük ölçekli ve hastaliksız olarak üretiminin yanı sıra sekonder metabolitlerinin üretimi için de bir araçtır. Safranın in vitro kültüründe ticari kullanıma uygun kormların üretimi için yeni ve kullanışlı protokollere de ihtiyaç duyulmaktadır. Safranda, in vitro organogenesis (özellikle in vitro mikrokorm oluşumu ve stigma benzeri yapıların oluşumu) ve somatik embriyogenesis çalışmaları devam ederken alginat kapsüllü sentetik tohum üretimi, in vitro saklama ve koruma üzerine de çalışmaların

yoğunlaştırılması araştırmacılar tarafından önerilmektedir. Hücre kültürlerindeki krosin sentezinin artırılması üzerine yapılan çalışmaların standart protokoller haline gelmesi ile hücre süspansiyonlarından safran metabolitlerinin ticari üretimi için biyoreaktör temelli sistemlerin gelişmesine olanak sağlanacaktır. In vitro kültürde pratik protokollerin geliştirilmesi ve standart hale getirilmesi sadece hastaliksız klonların büyük miktarlarda çoğaltılmasına yardımcı olmamakta aynı zamanda rekombinant DNA teknolojisi uygulamalarıyla transgenik safranların geliştirilmesi için yeni bakış açıları da kazandırmaktadır. Gelecek yıllarda genetik mühendisliği üzerine çalışmaların artması ve uygun transformasyon protokolleri ile düşük maliyetli, hastalıklara dayanıklı ve yüksek miktarda krosin sentezleyen transgenik safran bitkilerinin üretilmesi umut edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdullaev FI, 2002. Cancer chemo preventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Experimental Biology and Medicine*, 227:20-25.
- Açıkgöz ÖA, 2010. Safran bitkisinin (*Crocus sativus* L.) yetiştirilmesi, kalitesi ve ticari önemi. Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 111s.
- Ahmad M, Zaffar G, Habib M, Arshid A, Dar NA, Dar ZA. 2014. Saffron (*Crocus sativus* L.) in the light of biotechnological approaches: A review. *Scientific Research and Essays*, 9 (2):2348-2353.
- Aliakbarzadeh G, Sereshti H, Parastar H, 2016. Pattern recognition analysis of chromatographic fingerprints of *Crocus sativus* L. secondary metabolites towards source identification and quality control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(12): 3295-3307.
- Bhagyalakshmi N, 1999. Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explants of saffron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58: 205-211.
- Blazquez S, Piqueras A, Serna M, Casa JL, Fernandez JA, 2004. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.): optimisation through temporary immersion and polyamine metabolism. *Acta Horticulturae*, 650:259-276.
- Blazquez S, Olmos E, Hernandez JA, Fernandez-Garcia N, Fernandez JA, 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.
- Castellar MR, Iborra JL, 1997. Callus induction from explants of *Crocus sativus*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 6: 97-100.
- Chaloushi B, Zarghami R, Abd-Mishani C, Omid M, Agayev YM, Pakdaman Sardood B, 2007. Effects of different hormonal treatments on the callus production and plantlet regeneration in saffron (*Crocus sativus* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 1625-1631.
- Chen S, Wang X, Zhao B, Yuan X, Wang Y, 2003. Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. *Biotechnology Letters*, 25:1235-1238.
- Chen S, Zhao B, Wang X, Yuan X, Wang Y, 2004. Promotion of the growth of *Crocus sativus* cells and the production of crocin by rare elements. *Biotechnology Letters*, 26:27-30.
- Chen S, Zhao S, Wang X, Zhang L, Jiang E, Gu Y, Shanguan JA, Zhao H, Lv T, Yu Z, 2015. Crocin inhibits cell proliferation and enhances cisplatin and pemetrexed chemosensitivity in lung cancer cells. *Translational Lung Cancer Research*, 4 (6): 775-783.
- Darvishi E, Zarghami R, Mishani CA, Omid M, Sarkhosh A, 2006. In vitro production of pathogen free plantlets via meristem culture in saffron (*Crocus sativus* L.). *Biotechnology*, 5:292-295.
- Devi K, Sharma M, Singh M, Ahuja PS, 2011. In vitro cormlet production and growth evaluation under greenhouse conditions in saffron (*Crocus sativus* L.) – A commercially important crop. *Engineering in Life Sciences*, 11 (2):189-194.

- Devi K, Sharma M, Ahuja PS, 2014. Direct somatic embryogenesis with high frequency plantlet regeneration and successive cormlet production in saffron (*Crocus sativus* L.). South African Journal of Botany, 93:207-216.
- Ebrahimzadeh H, Radjabian T, Karamian R, 2000a. In vitro production of floral buds and stigma-like structures on floral organs of *Crocus sativus* L. Pakistan Journal of Botany, 32: 141-150.
- Ebrahimzadeh H, Karamian R, Noori-Dalooi MR, 2000b. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron, *Crocus sativus* L. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran, 11:169-173.
- Escribano J, Alonso LG, Prados CM, Fernandez AJ, 1995. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. Cancer Letters, 100:23-90.
- Fakhrai F, Evans PK, 1990. Morphogenetical potential of cultured floral explants of *Crocus sativus* L. for the in vitro production of saffron. Journal of Experimental Botany, 41:47-52.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50:151-158.
- Gantait S, Vahedi M, 2015. In vitro regeneration of high value spice *Crocus sativus* L.: A concise appraisal. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2:124-133.
- George PS, Visvanath S, Ravishankar GA, Venkataraman LV, 1992. Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): somatic embryogenesis and shoot regeneration. Food biotechnology, 6:217-223.
- Ilahi I, Jabeen M, Firdous N, 1987. Morphogenesis with saffron tissue cultures. Journal of Plant Physiology, 128: 227-232.
- Jun Z, Xiaobin C, Fang C, 2007. Factors influencing in vitro flowering from styles of saffron. Acta Horticulturae, 739: 313-320.
- Karamian R, 2004. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in four species of *Crocus*. Acta Horticulturae, 650: 253-259.
- Karaoğlu C, Çöçü S, İpek A, Parmaksız İ, Uranbey S, Sarihan E, Arslan N, Kaya MD, Sancak C, Özcan S, Gürbüz B, Mirici S, Er C, Khawar KM, 2007. In vitro micropropagation of saffron. Acta Horticulturae (ISHS), 739:223-227.
- Koyama A, Ohmori Y, Fujioka N, Miyagawa H, Yamasaki K, Kohda H, 1988. Formation of stigma-like structures and pigments in cultured tissues of *Crocus sativus*. Planta Medica, 54: 375-376.
- Linsmaier EM, Skoog F, 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 8:100-127.
- Loskutov AV, Beninger CW, Ball TM, Hosfield GL, Nair M, Sink AC, 1999. Optimization of in vitro conditions for stigma-like-structure production from half-ovary explants of *Crocus sativus* L. In vitro Cellular & Developmental Biology, 35: 200-205.
- Lu WL, Tong XR, Zhang Q, Gao WW, 1992. Study on in vitro regeneration of style-stigma-like structure in *Crocus sativus* L. Acta Botanica Sinica, 34: 251-256.
- Majourhat K, Martinez-Gomez P, Piqueras A, Fernandez JA, 2007. Enhanced plantlet regeneration from cultured meristems in sprouting buds of saffron corms. Acta Horticulturae, 739: 275-278.
- Milyaeva EL, Azizbekova NS, Komarova EN, Akhundova DD, 1995. In vitro formation of regenerant corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.). Russian Journal of Plant Physiology, 42:112-119.
- Mir JI, Ahmed N, Wani SH, Rashid R, Mir H, Sheikh MA, 2010. In vitro development of microcorms and stigma like structures in saffron (*Crocus sativus* L.). Physiology and Molecular Biology, 16: 369-373.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-495.
- Namin MH, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, Radjabian T, Namin HH, 2010. Initiation and origin of stigma-like structures (SLS) on ovary and style explants of saffron in tissue culture. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 52: 55-60.
- Parray JA, Kamili AN, Hamid R, Husaini AM, 2012. In vitro cormlet production of saffron (*Crocus sativus* L. Kashmirianus) and their flowering response under greenhouse. GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, 3(4):289-295.
- Piqueras A, Han BH, Escribano J, Rubio C, Hellin E, Fernandez JA, 1999. Development of cormogenic nodules and microcorms by tissue culture, a new tool for the multiplication and genetic improvement of saffron. Agronomie, 19:603-610.
- Plessner O, Ziv M, Negbi M, 1990. In vitro corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 20: 89-94.
- Raja W, Zaffer G, Wani SA, 2007. In vitro microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Acta Horticulturae, 739:291-296.
- Renau-Morata B, Moya L, Nebauer SG, Segui-Simarro JM, Parra-Vega V, Gomez MD, Molina RV, 2013. The use of corms produced under storage at low temperatures as a source of explants for the in vitro propagation of saffron reduces contamination levels and increases multiplication rates. Industrial Crops and Products, 46: 97-104.
- Salwee Y, Nehvi FA, 2014. In vitro microcorm formation in saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Cell & Tissue Research, 14:4463-4470.
- Sano K, Himeno H, 1987. In vitro proliferation of saffron (*Crocus sativus* L.) stigma. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 11:159-166.
- Sarma KS, Maesato K, Hara T, Sonoda Y, 1990. In vitro production of stigma-like structures from stigma explants of *Crocus sativus* L. Journal of Experimental Botany, 41:745-748.
- Sarma KS, Sharada K, Maesato K, Hara T, Sonoda Y, 1991. Chemical and sensory analysis of saffron produced through tissue cultures of *Crocus sativus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 26:11-16.
- Shahabzadeh Z, Heidari B, Dadkhodaie A, 2013. Regenerating salt tolerant saffron (*Crocus sativus*) using tissue culture with increased pharmaceutical ingredients. Journal of Crop Science and Biotechnology, 16:209-217.

- Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, Karimi M, 2010. Globular embryo-like structures and highly efficient thidiazuron-induced multiple shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46: 274-280.
- Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, Gharechahi J, Vatankhah E, 2012. Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). *Proteome Science*, 10:3.
- Sharma KD, Singh BM, Sharma TR, Rathour R, Sharma R, Goel S, 2008. In vitro cormlet development in *Crocus sativus*. *Biologia Plantarum*, 52:709-712.
- Sharma KD, Piqueras A, 2010. Saffron (*Crocus sativus* L.) Tissue Culture: Micropropagation and Secondary Metabolite Production. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 4 (Special Issue 2):15-24.
- Sheibani M, Nemati SH, Davarinejad GH, Azghandi AV, Habashi AA, 2007. Induction of somatic embryogenesis in saffron using thidiazuron (TDZ). *Acta Horticulturae*, 739: 259-268.
- Simona L, Cerasela P, Florina F, Lazar A, Giancarla V, Danci M, Maria B, 2013. In vitro regeneration of *Crocus sativus* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 17: 244-247.
- Ünalđı EÜ, 2007. Tehdit ve tehlike altında bir kültür bitkisi:safran (*Crocus sativus* L.).*Fırat Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 4: 53-67.
- Vatankhah E, Niknam V, Ebrahimzadeh H, 2010. Activity of anti-oxidant enzyme during in vitro organogenesis in *Crocus sativus*.*Biologia Plantarum*,54:509-514.
- Vahedi M, Kalantari S, Salami SA, 2014. Factors affecting callus induction and organogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 24:1-9.
- White PR, 1964. The cultivation of animal and plant cells. *Soil Science*, 97:74.
- Zaffar G, Ahmad M, Shahida I, Razvi SM, Habib M, Ahmad A, 2014. Effect of paclobutrazol and sucrose on in vitro corm formation in saffron (*Crocus sativus*). *Journal of Cell and Tissue Research*, 14.1:4069-4072.
- Zeng Y, Yan F, Tang L, Chen F, 2003. Increased crocin production and induction frequency of stigma-like-structure from floral organs of *Crocus sativus* by precursor feeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72: 185-191.
- Zeybek E, Önde S, Kaya Z, 2012. Improved in vitro micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron. *Central European Journal of Biology*, 7.1:138-145.
- Zhao J, Chen F, Yan F, Tang L, Xu Y, 2001. In vitro regeneration of style-stigma-like structure from stamens of *Crocus sativus*. *Acta Botanica Sinica*, 43: 475-479.