

Mor Prens Lalesi Yaprak Eksplantlarının *In Vitro* Rejenerasyon Yeteneklerinin BelirlenmesiMeltem ERDEM^{1*}, Hüseyin UYSAL², Emre SEVİNDİK³¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji ABD, Çakmar, Aydın² Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Konyaaltı, Antalya³ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Çakmar, Aydın

Öz: Bu araştırma lale yaprak eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Araştırmada hem steril hale getirilen soğanların kültürü ile elde edilen steril yaprak eksplantları, hem de saksıda çimlendirilen soğanlardan elde edilen yaprakların steril hale getirilmesi ile elde edilen yaprak eksplantları kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada; 2.4-D (2 mg.l⁻¹), TDZ (2 mg.l⁻¹), Kinetin (2 mg.l⁻¹), NAA (2 mg.l⁻¹), 2.4-D+Kinetin (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ ve 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹), İAA+TDZ (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ ve 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹), İAA+BAP (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ ve 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹), NAA+Kinetin (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ ve 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹), NAA+TDZ (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ ve 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹) ve 2.4-D+TDZ (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ ve 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹) hormonlarını içeren MS besi ortamları kullanılmıştır. Yapılan alt kültürler neticesinde Mor Prens Lalesi soğanlarının *in vitro* ortamda çimlendirilmesinden meydana gelen yaprakların alt kültürlerinden 2.4-D (2 mg.l⁻¹) ve NAA (2 mg.l⁻¹) hormonu içeren MS besi ortamlarında %6 oranında kallus oluşumu tespit edilirken, en yüksek oranda rejenerasyon Kinetin (2 mg.l⁻¹) hormonu içeren besi ortamında %10 oranında kallus oluşumu şeklinde gerçekleşmiştir. Sonuç olarak alt kültür yapılan besi ortamları içerisinde sadece 2.4-D (2 mg.l⁻¹), NAA (2 mg.l⁻¹) ve Kinetin (2 mg.l⁻¹) hormonlarını içeren 3 farklı besi ortamında kallus rejenerasyonu tespit edilirken araştırmaya konu diğer besi ortamlarında herhangi bir rejenerasyon sağlanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Hormon, *in vitro*, lale, kallus, rejenerasyon

Determination of *In Vitro* Regeneration Capabilities of Purple Prince Tulip Leaf Explants

Abstract: This research was carried out to determine the *in vitro* regeneration abilities of tulip leaf explants. In the study, both sterile leaf explants obtained by culturing sterilized onions and leaf explants obtained by sterilizing leaves obtained from the onions germinated in pots were used. For this purpose MS medium containing 2.4-D (2 mg.l⁻¹), TDZ (2 mg.l⁻¹), Kinetin (2 mg.l⁻¹), NAA (2 mg.l⁻¹), 2.4-D+Kinetin (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ and 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹), İAA+TDZ (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ and 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹), İAA+BAP (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ and 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹), NAA+Kinetin (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ and 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹), NAA+TDZ (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ and 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹) and 2.4-D+TDZ (1 mg.l⁻¹ + 1 mg.l⁻¹ and 2 mg.l⁻¹ + 2 mg.l⁻¹) were used in the study. As a result of subcultures, 6% callus formation was detected in MS medium containing 2.4-D (2 mg.l⁻¹) and NAA (2 mg.l⁻¹) hormone, which is one of the subcultures of leaves formed from the *in vitro* germination of Purple Prince Tulip bulbs. The highest rate of regeneration was determined as 10% callus formation in the medium containing Kinetin (2 mg.l⁻¹). As a result, while callus regeneration was achieved in 3 different media containing 2.4-D (2 mg.l⁻¹), NAA (2 mg.l⁻¹) and Kinetin (2 mg.l⁻¹) hormones among subcultured media, no regeneration was achieved in the other mediums.

Keywords: Hormone, *in vitro*, tulip, callus, regeneration

GİRİŞ

Lale (*Tulipa gesneriana* L.), *Liliales* takımı, *Liliaceae* familyası *Tulipa* cinsine dahil olup, üretim bakımından dünyanın ilk 10 çiçeği arasında bulunmaktadır. Aynı zamanda, dünya üzerindeki soğanlı süs bitkileri içerisindeki en büyük grubu oluşturmaktadır (Nayeem ve Qayoom, 2015).

Lale cinsi içerisinde 100-150 tür bulunmakta ve bu cinsi sırasıyla nergis, iris, sümbül ve zambak bitkileri takip etmektedir (Nayeem ve Qayoom, 2015). Anavatanı Orta Asya olup Sibiryaya, Moğolistan, Çin, Kaşmir, Hindistan, Afganistan, İran, Kafkasya ve Türkiye’de yayılış göstermektedir (Polat, 2018). Soğanlı bitki olmalarından dolayı lale bitkisi aynı zamanda geofit olarak da adlandırılmaktadır. Üretim şekli hem soğan ile hem tohum ile olabilmektedir. Fakat tohum ile üretimi için 4-5 yıl gibi uzun bir gençlik dönemi gerektirmesi nedeni ile çok fazla tercih edilmemektedir (Maşlanka ve Bach, 2014). Ayrıca heterozigot ile genetik yapıda meydana gelen değişiklikler

de tohumla çoğaltımın bir diğer dezavantajını oluşturmaktadır. Ancak soğanların taşınması ve muhafazasının zor olması, çok fazla alana ihtiyaç duyulması ve hastalık etmenlerinin ana taşıyıcısı olmasından dolayı özellikle doku kültürü çalışmalarında büyük oranda risk oluşturabilmektedir.

Lale soğanı tamamen pul şeklinde kabuklardan oluşur, bu kabuklar iki kısımdır ve üst üste 6 kat içerir. Bu pullar büyüyebilen yapraklar olup depo görevi görürler.

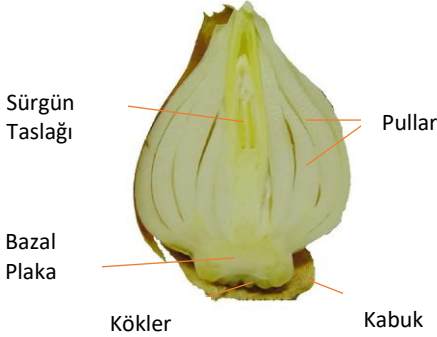
*Sorumlu Yazar: mhmeltemerdem@hotmail.com

Geliş Tarihi: 6 Haziran 2023

Kabul Tarihi: 12 Ekim 2023

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: ZRF-20037).

En dıştaki kuru ve kahverengi olan kabuk "tunik" olup soğanı hastalıktan ve yaralanmalardan korur. Temel katman soğanın kısa, etli gövdesidir (Le Nard ve De Hertogh, 1993a) (Şekil 1). Filizlenme ve köklenme bu gövde ile olur. Pul ve köklerden filize kadar olan damarlı yapıyı kapsar. Kardeş soğanlar pulların koltuk kısmında büyürler (Le Nard ve De Hertogh, 1993b) (Şekil 2).



Şekil 1. Lale soğanı yapısı (Hosier, 2011)



Şekil 2. Lale soğanının görünümü

Lale; kesme çiçek, saksılı süs bitkisi, park, bahçe ve peyzaj düzenlemelerinde tasarım bitkisi olarak kullanılmaktadır (Benschop ve ark., 2010). Farklı renkleri, çiçeklenme döneminin uzun olması ve kokusunun güzel olmasından dolayı ticari değeri yüksek olup Türkiye, Hollanda ve İran gibi üretimin yapıldığı çeşitli ülkeler tarafından üretilen Lale bitkisi milli çiçek olarak kabul edilmektedir (Mu ve ark., 2020). Lalelerin popülaritesinin yüksek olması, üretimi için de uygun olan farklı şekil ve renklerde yeni çeşitlerin oluşturulması ihtiyacını doğurduğundan popüler araştırma konusu haline gelmektedir (Li ve ark., 2022). Dünyada en önemli lale üreticisi ülke olan Hollanda'da lale üretim alanları, 2015 yılında 12,200 ha iken, 2020'de 14,900 ha'a ulaşmıştır. Türkiye'den Hollanda'ya gitmiş olmakla birlikte lale dünya ticaretinde Hollanda ile anılmaktadır (Van Gelder, 2021).

Türkiye'de 2021 yılında 1.7 milyar adet dolayında süs bitkisi üretimi yapılmış olup bunun 27.8 adeti ise lale üretimi olmuştur (TÜİK, 2021). 2021 yılında süs bitkileri toplam ithalat miktarımız 49,569,606 dolar olarak gerçekleşmiştir. Çiçek soğanlarına ait olan miktar ise 4,066,899 dolar olmuştur. Son yıllarda Türkiye'de çiçek soğanları üretimi artış göstermekle birlikte, ülkemizde süs bitkileri sektöründe kullanılan lale soğanlarının %94'ü Hollanda'dan ithal edilmektedir (Kazaz, 2021). Bu durum lale soğanı üretiminde tamamen dışa bağımlı olduğumuzu göstermektedir.

Lale geleneksel olarak daha çok ana soğanın yanında oluşan yavru soğancıklarla üretilmektedir. Bu teknik ana bitkinin aynı bitkilerin elde edilmesi ve yeni bitkilerin daha kısa sürede çiçeklenme olgunluğuna gelmesi açısından avantaj arz etmekte beraber üretim kat sayısının düşük olması ve sadece yılın belirli dönemlerinde çoğaltımın yapılabilmesi yönüyle üretimi sınırlandırmaktadır. Bu ve buna benzer çoğaltım kısıtlamalarının üstesinden gelebilecek teknik ise lale bitkilerinin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak çoğaltılmasıdır. Biyoteknolojik yöntemlerden olan klonal çoğaltım tekniği bitkinin herhangi bir parçasının eksplant kaynağı olarak kullanılması ile vejetatif çoğaltıma olanak veren bir mikro çoğaltım yöntemidir. Etkin bir protokol oluşturulduktan sonra tekniğin en önemli avantajları i) çok küçük bitki parçalarıyla üretim yapılabilmekte, ii) mevsime bağlı olmaksızın yıl boyu üretim yapılabilmekte, iii) ana bitkinin aynı bitkiler elde edilebilme ve iv) çok küçük bir alanda işlem gerçekleştirilebilme. Bitkilerde çeşitli klonal çoğaltım yöntemleri mevcut olmakla birlikte sentetik tohum da klonal çoğaltımın kullanım alanlarından biridir. Sentetik tohum üretimiyle tohumla üretimi zor olan bitkilerin çoğaltılabilmesi sağlanabilmektedir. Ancak sentetik tohum oluşturulabilmesi için canlı yapıda kallus ve somatik embriyolara ihtiyaç duyulmaktadır. Somatik embriyo oluşumu somatik embriyogenesis yöntemi kullanılarak oluşturulmaktadır. Bu yöntemle oluşturulan somatik embriyoların kaplanmasıyla oluşan yapı sentetik tohumdur. Bu çalışmada soğanla çoğaltımı yapılan lale bitkilerinin yaprakları eksplant kaynağı olarak kullanılıp farklı oksin ve sitokinin hormonlarının bulunduğu besi ortamlarında kültüre alınarak *in vitro* rejenerasyon yeteneklerinin belirlenmesi ve bu sayede de somatik embriyo gelişimi ve sentetik tohum oluşturabilme potansiyeli araştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma lale yaprak eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon yeteneğini araştırmak amacıyla Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada Mor Prens Lalesi (Purple Prince) ve karışık lale soğanları kullanılmıştır. Lale soğanlarının bir kısmı *in vitro* koşullarda çimlendirilirken bir kısmı ise ½ saksı toprağı ve ½ oranlarında bahçe toprağı içeren saksılarda çimlendirilmiştir.

Çalışmada steril bitkileri elde etmek amacıyla lale soğanları MS (Duchefa Biochemie, Katalog No: M0222) besi ortamı kullanılarak çimlendirilmiştir. Eksplantların alt kültürü aşamasında MS besi ortamına oksin ve sitokinin hormonlarının hem ayrı ayrı hem de farklı kombinasyonları

ilave edilerek modifiye edilen besi ortamları kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan besi ortamı içeriği Çizelge 1'de ve kullanılan hormonlar ve konsantrasyonları Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan besi ortamının içeriği

Kimyasal Madde	Miktar (mg.l ⁻¹)	Kimyasal Madde	Miktar (mg.l ⁻¹)
KNO ₃	1900	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25
CaCl ₂ .H ₂ O	332.2	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
NH ₄ NO ₃	1650	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
MgSO ₄ .7H ₂ O	180.7	Glycin	2.0
KH ₂ PO ₄	170	Myo-Inostol	100
Na ₂ -EDTA	37.25	Nicotinic asit	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	Pyrodoxine-HCl	0.5
H ₃ BO ₃	6.2	Thiamin HCl	0.1
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	Sukroz	30 000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	Agar	7 000
KI	0.83	pH	5.8

Çizelge 2. Araştırmada kullanılan MS besi ortamına ilave edilen hormon konsantrasyonları

MS Ortamına İlave Edilen Hormonlar	mg.l ⁻¹
2.4-D	2.0
TDZ	2.0
NAA	2.0
Kinetin	2.0
2.4-D+ Kinetin	1.0+1.0
2.4-D+Kinetin	2.0+2.0
NAA+Kinetin	1.0+1.0
NAA+Kinetin	2.0+2.0
IAA+ TDZ	1.0+1.0
IAA+TDZ	2.0+2.0
IAA+BAP	1.0+1.0
IAA+BAP	2.0+2.0
NAA+TDZ	1.0+1.0
NAA+TDZ	2.0+2.0
2.4-D+TDZ	1.0+1.0
2.4-D+TDZ	2.0+2.0

Çalışma kapsamında lale soğanlarının *in vitro* kültürü amacıyla farklı sterilizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Çalışma öncesinde sterilizasyon çalışmasında kullanılacak tüm malzemeler otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilizasyona tabi tutulmuş ve tüm sterilizasyon işlemleri biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan yöntemler şu şekildedir;

1. *Yöntem:* Lale soğanları bir miktar deterjanlı su ile yıkanıp musluk suya altında durulandıktan sonra %80'lik çamaşır suyu içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dakika muamelenin ardından %0.05 oranında fungusit (%37.5 Cyprodinil + %25 Fludioxonil etken madde) çözeltisinde 20 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde sterilizasyona tabi

tutulmuştur. Son olarak soğanlar steril su ile manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıcıda 3 kez 5'er dakika durulama işlemi yapılarak dikime hazır hale getirilip 10 kavanoz ve her kavanozda bir adet soğan olacak şekilde hormonsuz MS besi ortamına dikimler gerçekleştirilmiştir.

2. *Yöntem:* Lale soğanları 10 dakika musluk suyunda bekletildikten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde %70'lik EtOH'de 20 dakika, 3 damla Tween-20 bulunan %20'lik çamaşır suyu çözeltisinde 20 dakika ve içerisinde %0.3 oranında fungusit (%50 Captan etken madde) bulunan çözelti içerisinde 20 dakika muamele edildikten sonra 4 kez 5'er dakika steril su ile durulama işlemi yapılmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen soğanlar 10 kavanoz ve her

kavanozda bir adet soğan olacak şekilde hormonsuz MS besi ortamına dikimler gerçekleştirilmiştir.

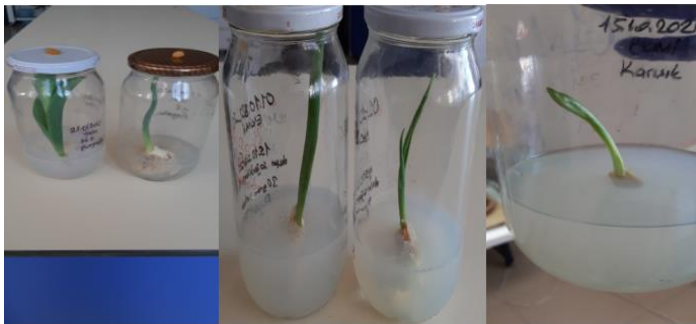
3. Yöntem: Lale soğanları yaklaşık 1 saat musluk suyu altında bekletildikten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde %70'lik EtOH'de 20 dakika, 3 damla Tween-20 bulunan %20'lik çamaşır suyu çözeltisinde 20 dakika ve %0.3 oranında fungusit (%50 Captan etken madde) bulunan çözelti içerisinde 20 dakika muamele edildikten sonra son olarak 4 kez 5'er dakika steril su ile karıştırıcıda durulama işlemi yapılmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen soğanlar kurumalarını sağlamak amacıyla steril kurutma kağıtları üzerinde yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra her kavanozda bir adet soğan olacak şekilde hormonsuz MS besi ortamına dikimler gerçekleştirilmiştir.

4. Yöntem: Lale soğanları deterjanlı su ile yıkandıktan sonra musluk suyunda 3 saat bekletilmiş sonrasında manyetik karıştırıcı üzerinde sırasıyla %70'lik EtOH'de karıştırıcıda 20 dakika, birkaç damla Tween-20 bulunan %20'lik çamaşır suyunda 20 dakika ve %0.3 oranında fungusit (%50 Captan etken madde) bulunan çözelti içerisinde 20 dakika muamele edildikten sonra son olarak 4 kez 5'er dakika steril su ile karıştırıcıda durulama işlemi yapılmıştır. Sonrasında steril kurutma kağıtları üzerinde bir süre bekletilip kurumaları sağlanan soğanların her kavanozda bir adet soğan olacak şekilde hormonsuz MS besi ortamına dikimler gerçekleştirilmiştir.

Kültüre alınan soğanların vernalizasyon ihtiyacının karşılanması amacıyla besi ortamına dikim sonrası +4 °C buzdolabında 4 hafta süre ile bekletilmiş sonrasında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 24 °C sıcaklık ayarlı iklimlendirme odasında kültüre alınmış ancak sıcaklığın çimlenme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkilediğinin gözlemlenmesi nedeniyle dikimi yapılan diğer soğanlar 20 °C sıcaklık ayarlı ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık iklimlendirme koşullarında geliştirilmiştir.

Ayrıca bir kısım lale soğanı 5 Ekim 2020 - 21 Kasım 2020 ve 17 Ekim 2021 - 1 Ocak 2022 tarihleri arasında çeşitli zamanlarda 1/1 oranında bahçe toprağı ve ticari saksı toprağı karışımı ihtiva eden saksılara dikilerek çimlendirilmiş ve bu bitkilerden elde edilen yapraklar steril hale getirilerek *in vitro* kültür çalışması bu yapraklar kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. Bu yapraklar kültüre alınmadan önce %70'lik EtOH çözeltisinde 5 saniye, %10 çamaşır suyu + 3 damla Tween-20 çözeltisinde 10 dakika ve %0.1'lik fungusit (%37.5 Cyprodinil- %25 Fludioxonil etken madde) çözeltisinde 10 dakika muamele edildikten sonra steril su ile 3 kez durulama işlemi uygulanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Hem *in vitro* ortamda çimlendirilen soğanlardan (Şekil 3) elde edilen steril yaprakların *in vitro* kültürü hem de saksıda çimlendirilen soğanlardan alınarak steril hale getirilen lale yapraklarının *in vitro* kültürü amacıyla Çizelge 2'de verilen hormon konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında her bir besi ortamı için 5 petri ve her bir petride 10 eksplant olacak şekilde çalışma yürütülmüştür. Ancak soğanların *in vitro* dikimlerinde karşılaşılan yoğun kontaminasyon nedeni ile bazı besi ortamları için yeterli sayıda yaprak eksplantı kültüre alınamamış olup kültür işleminde tekrerrür sayısı farklılık göstermiştir. *In vitro* kültür yapılan petriler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık 24 °C iklimlendirme odasında geliştirilmiştir. Kültüre alınan bütün eksplantlar günlük düzenli olarak kontrol edilmiş olup kontaminasyon görülmesi halinde kurtarılabilir olan eksplantlar tekrar aynı ortama aktarılarak kontaminasyonun önüne geçilmeye çalışılmıştır. Kallus oluşumu başlayan eksplantlar 4-5 hafta boyunca haftada bir kez taze ortama aktarılarak kallus oluşumunun ve somatik embriyo gelişiminin hızlandırılması hedeflenmiştir. Çalışmadan elde edilen verilerin analizinde Microsoft Excel paket programından yararlanılmıştır.



Şekil 3. Lale soğanlarının *in vitro* ortamda dikimi ve çimlenmesi

BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırma kapsamında denenen sterilizasyon yöntemleri içerisinde; en iyi sonuç 4. Sterilizasyon yönteminden alınmıştır. Lakin bu başarı sadece soğanların dış yüzeyi için söz konusu olup iç yüzeyinden kaynaklanan kontaminasyonlara herhangi olumlu bir etkisi mümkün

olmamıştır. Araştırmaya konu olan lale soğanlarından Mor Prens Lalesi soğanı *in vitro* ortama 91 adet dikilmiş olup 5 adet soğanda çimlenme gözlemlenerek %5.5 oranında çimlenme tespit edilmiştir. Karışık lale soğanlarının *in vitro* dikimlerinde ise toplam 60 adet dikim yapıp sadece 1

adetinde çimlenme gözlemlenerek çimlenme oranı %1.7 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Uygulanan sterilizasyon yöntemlerinden istenilen başarının elde edilememesi ve hem soğanların yüzeylerinin pürüzlü olması hem de soğanın iç yüzeyinin de mikroorganizmalarca enfekte edilmiş olması gibi nedenlerden kaynaklandığını ifade edebiliriz. Mor Prens

Lalesinde toprağa dikilen soğan sayısı 43 adet olup 39 adet soğanda çimlenme gözlemlenerek %91 oranında çimlenme olduğu tespit edilmiştir. Karışık lale soğanlarında ise toprağa toplam 35 adet dikim yapıp tamamında çimlenme gözlemlenerek çimlenmede %100 başarı sağlanmıştır.

Çizelge 3. *In vitro*'da ekimi gerçekleştirilen lale soğanlarının çimlenme sayıları ve çimlenme oranları

	Mor Prens Lalesi Soğanı		Karışık Lale Soğanı	
	<i>In vitro</i>	Saksı	<i>In vitro</i>	Saksı
Toplam Ekim Sayısı (adet)	91	43	60	35
Toplam Çimlenme (adet)	5	39	1	35
Çimlenme Oranı (%)	5.5	91	1.7	100

Birçok ekim yapılmasına rağmen çimlenme oranlarının çok düşük kalmasının gerçekleştirilen sterilizasyonun başarıya ulaşmamasından kaynaklandığını söyleyebiliriz. *In vitro* çalışmalarda her ne kadar kullanılan bitki eksplantlarında yüzey sterilizasyonu yapılsa da eksplantların iç yüzeyindeki bulaşmaların önüne geçilememekte ve bu da *in vitro* çalışmaların başarısı açısından çok büyük riskleri beraberinde getirmektedir. Özellikle bu durum lale gibi soğanlı veya yumru bitkilerde sıklıkla karşılaşılan bir olgudur. İlhan (2015); lale gibi geofitlerde eksplant kaynağı olarak bitki soğanlarının kullanılmasının oldukça ağır kontaminasyonlara sebebiyet verdiğini, her lale soğanının ortalama 3-5 pul

içermesinin bu riski daha da arttırdığını bildirmiştir. Bu bilgi, yapmış olduğumuz bu çalışmada kontaminasyonun kaynağının soğanlar olduğunu teyit eder niteliktedir. Öyle ki bazen çimlenme gerçekleşikten sonra dahi soğan/yumru içerisinden çıkan yeni sürgünlerde kontaminasyonlar ortaya çıkmakta ve bu sürgünler de *in vitro* çalışmalarda kullanılamamaktadır. Bu çalışmada da benzer durumlarla sıklıkla karşılaşmış olup *in vitro* kültürde çimlendirilen lale soğanlarından elde edilen eksplantlardan efektif bir alt kültür çalışması yürütülememiştir.

Araştırma süresinde kültüre alınan lale yaprak eksplantlarına ilişkin veriler Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Araştırma süresince farklı besi ortamlarında kültüre alınan lale yaprak eksplantlarının sayıları ve başarı oranlarına ilişkin veriler

Besi Ortamları	<i>In vitro</i> dan (Mor prens)			Saksıdan (Mor prens)			<i>In vitro</i> dan (Karışık lale)			Saksıdan (Karışık lale)		
	E. S.	K. S.	%	E. S.	K. S.	%	E. S.	K. S.	%	E. S.	K. S.	%
2.4-D (2 mg.l ⁻¹)	50	3	6	140	-	-	-	-	-	-	-	-
TDZ (2 mg.l ⁻¹)	50	-	-	170	-	-	-	-	-	-	-	-
KİNETİN (2 mg.l ⁻¹)	90	9	10	130	-	-	-	-	-	-	-	-
NAA (2 mg.l ⁻¹)	70	4	6	130	-	-	-	-	-	-	-	-
2.4-D+KİNETİN (1 mg.l ⁻¹ + 1 mg.l ⁻¹)	30	-	-	120	-	-	20	-	-	140	-	-
2.4-D+KİNETİN (2 mg.l ⁻¹ + 2 mg.l ⁻¹)	20	-	-	110	-	-	10	-	-	140	-	-
İAA+TDZ (1 mg.l ⁻¹ + 1 mg.l ⁻¹)	30	-	-	110	-	-	20	-	-	180	-	-
İAA+TDZ (2 mg.l ⁻¹ + 2 mg.l ⁻¹)	20	-	-	130	-	-	10	-	-	160	-	-
İAA+BAP (1 mg.l ⁻¹ + 1 mg.l ⁻¹)	30	-	-	110	-	-	20	-	-	100	-	-
İAA+BAP (2 mg.l ⁻¹ + 2 mg.l ⁻¹)	20	-	-	120	-	-	10	-	-	140	-	-
NAA+KİNETİN (1 mg.l ⁻¹ + 1 mg.l ⁻¹)	30	-	-	120	-	-	20	-	-	140	-	-
NAA+KİNETİN (2 mg.l ⁻¹ + 2 mg.l ⁻¹)	20	-	-	70	-	-	10	-	-	100	-	-
NAA+TDZ (1 mg.l ⁻¹ + 1 mg.l ⁻¹)	30	-	-	100	-	-	20	-	-	160	-	-
NAA+TDZ (2 mg.l ⁻¹ + 2 mg.l ⁻¹)	20	-	-	60	-	-	10	-	-	160	-	-
2.4-D+TDZ (1 mg.l ⁻¹ + 1 mg.l ⁻¹)	30	-	-	140	-	-	20	-	-	140	-	-
2.4-D+TDZ (2 mg.l ⁻¹ + 2 mg.l ⁻¹)	20	-	-	130	-	-	10	-	-	110	-	-
Toplam	560	16	2.86	1890	-	-	180	-	-	1670	-	-

E.S.: Eksplant sayısı, K.K.: Kallus sayısı

Çizelge 4'ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi *in vitro* ortamda çimlendirilen Mor Prens Lalesi soğanlarından yapılan alt kültür çalışmalarında besi ortamı başına minimum 20 maksimum 90 adet olmak üzere toplam 560 adet yaprak eksplantı kültüre alınmıştır. Kültüre alınan bu yaprak eksplantlarından 2 mg.l⁻¹ 2.4 D içeren besi ortamında 3 adet kallus elde edilmiş ve başarı oranı %6 olarak, 2 mg.l⁻¹ Kinetin içeren besi ortamında 9 adet kallus elde edilmiş ve başarı oranı %9 olarak, 2 mg.l⁻¹ NAA içeren besi ortamında 4 adet kallus elde edilmiş ve başarı oranı %6 olarak hesaplanmıştır. Araştırmaya konu gerek *in vitro* ortamda yetiştirilip alt kültüre alınan ve gerekse saksıda yetiştirilip steril edilerek diğer besi ortamlarında kültüre alınan Mor prens lalesi ve karışık lale eksplantlarından herhangi bir rejenerasyon sağlanamamıştır.

Lale gibi geofit bitkilerin yetiştiriciliğindeki en önemli sorunlardan biri düşük çoğalma hızlarıdır. Bu açıdan *in vitro* doku kültürü tekniği çok elverişli bir yöntemdir. Ancak toprak altı depo organlarının başlangıç materyali olarak kullanılmaları durumunda ortaya çıkan eksplant kökenli kontaminasyon problemlerinin aşılması gerekmektedir. Ayrıca *in vitro* kültürde başarı birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bu faktörlerin başında besi ortamının bileşimi, genotip, eksplant kaynağı bitkinin yetiştirme koşulları, eksplantların büyüklüğü, kültürlerin geliştirildiği ortamın fiziksel koşulları gibi faktörler gelmektedir (Hatipoğlu, 2012). Bu çalışma kapsamında kültüre alınan lale yaprak eksplantlarından sadece 2.4-D, Kinetin ve NAA içeren ortamlardan düşük oranlarda da olsa başarı elde edilmiş olması bu durumu desteklemektedir. *In vitro* kültürdeki düşük başarının muhtemel nedenleri ise eksplantların besi ortamı ile uyum sağlayamaması, eksplantların salgılamış olduğu salgılar nedeni ile allelopatik bir etki oluşması, dış ortamda yetiştirilerek steril edilen yapraklarda sterilizasyon aşamasında tahribatların meydana gelmiş olması ve genetik yapı gibi birçok etmenin etkili olması muhtemeldir. Gürlek (2011), *F. imperialis* ve *F. persica* türlerinde yapmış olduğu çalışmada dış ortamdan almış olduğu yapraklarda ve soğan pullarında kullanmış olduğu üç farklı sterilizasyon yöntemi dahilinde; fungusit ön uygulaması sonrasında %70 etanolde bekletme, (i) %50 hidrojen peroksit, (ii) %50 ticari çamaşır suyu, (iii) %100 ticari çamaşır suyu muamelelerinin tamamında yaprak eksplantlarının tamamen karardığını, soğan pullarının ise tamamının kontamine olduğunu rapor etmiştir. Lale *in vitro* kültüründe yaygın olarak çiçek sapları (Ptak ve Bach, 2007; Podwyszyńska ve Sochacki, 2010; Podwyszyńska ve Ciolakowska, 2020), soğan pulları (Maślanka ve Bach, 2014; İlhan 2015), sürgünler (Kuijpers ve Langens-Gerrits, 1997) kullanılmıştır. Yaprak eksplantlarının kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Van Rossum ve ark. 1998).

Hem Mor Prens Lalesi hem de karışık lale soğanlarından elde edilen yaprak eksplantlarından rejenerasyon gelişmemesi birçok farklı etmene bağlı olmakla birlikte bu etmenlerin; besi ortamının bileşimi, soğanın içsel hastalık taşımasından dolayı yaprak sterilizasyonunun yetersiz kalarak alt kültüre alınan yaprak eksplantlarında kontaminasyon oluşması, alt kültür için lale yaprak eksplantlarının uygun büyüklükte olmaması, sterilizasyon sürelerinin fazla olması ve dolayısıyla yaprakların canlılığına zarar vermesi, sterilizasyonun tam olarak sağlanamaması, eksplantların madde salgılayarak allelopatik etki göstermesi, farklı kültür şartları ile çevresel faktörler olabileceği düşünülmektedir. Ancak yapmış olduğumuz bu çalışma bize lale yapraklarının *in vitro* kültürde rejenerasyon yeteneklerinin zayıf olduğunu göstermiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada lale popülasyonlarında *in vitro* ortamda soğanların çimlendirilmesi ve dış ortamda çimlendirilen lale soğanlarının yapraklarının steril edilerek kültüre alınması ile *in vitro* rejenerasyon ve somatik embriyo oluşumu amaçlanmış olup bu yolla sentetik tohum üretim imkanları araştırılmıştır.

Çalışmada lale soğanlarının sterilizasyonu amacıyla farklı yöntemler denenmiş olup sterilizasyon yöntemleri içerisinde; soğanların deterjanlı su ile yıkandıktan sonra musluk suyunda 3 saat bekletilip manyetik karıştırıcı yardımıyla önce %70'lik EtOH'de 20 dakika, ardından birkaç damla Tween 20 bulunan %20'lik çamaşır suyunda 20 dakika ve son olarak %0.3 oranında fungusit (%50 Captan etken madde) bulunan çözelti içerisinde 20 dakika muamelelenin ardından 4 kez 5'er dakika steril su ile karıştırıcıda durulama işlemi yapılarak steril edilmiş kurutma kağıtları üzerinde kurumaları için bekletildiği yöntem olan 4. sterilizasyon yöntemi en iyi başarıyı sağlamıştır. Ancak lale soğanlarının iç yüzeylerinden kaynaklanan kontaminasyon problemi aşılamamıştır.

Yapılan bu araştırmaya konu olan Mor Prens Lalesi soğanlarının karışık olarak kullanılan lale soğanlarına kıyasla %5.5 oranında çimlenme göstererek eksplant kaynağı olarak kullanımının daha avantajlı durumda olduğunu söyleyebiliriz. Birçok oksin, sitokinin hormonu bulunduran besi ortamı ile bu hormonların kombinasyonunu içeren besi ortamlarında her ne kadar kallus ve somatik embriyo gelişimi gözlemlenemediyse de Mor Prens Lalesi yapraklarının alt kültüründe sadece 2.4-D (2 mg.l⁻¹), Kinetin (2 mg.l⁻¹) ve NAA (2 mg.l⁻¹) hormonlarının bulunduğu ortamlarda kallus oluşumu gözlemlenmiş olup bu ortamlar sırasıyla %6, %10 ve %6 oranlarında kallus üretmişlerdir. Buradan da anlaşılacağı üzere en iyi oranda kallus oluşum oranı Kinetin (2 mg.l⁻¹) hormonu içeren besi ortamında tespit edilmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre Kinetin, lale yapraklarında kallus oluşumu amacıyla kullanılabilir. Ancak daha iyi

sonuçlar için daha farklı konsantrasyonların ve daha farklı oksin-sitokinin hormonlarının ayrı ayrı veya karışımlarının denenmesi hem *in vitro* rejenerasyon hem de somatik embriyo oluşumu açısından yararlı olacaktır.

TEŞEKKÜR

Proje çalışmasına vermiş olduğu maddi destekten ötürü Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (BAP) teşekkür ederiz (Proje Kodu: ZRF-20037).

KAYNAKLAR

- Benschop M, Kamenetsky R, Nard ML, Okubo H, De Hertogh A (2010) The Global Flower Bulb Industry: Production, Utilization, Research. In: Janick J (ed.), Horticultural Reviews, Wiley Publishers, Hoboken, New Jersey, 1-115.
- Gürlek D (2011) *Fritillaria imperialis* L. ve *Fritillaria persica* L. Türlerinde *in vitro* Soğancık Üretimi Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, ANKARA.
- Hatipoğlu R (2012) Bitki Biyoteknolojisi. Ders Kitabı, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, No:176, Adana.
- Hosier M (2011) Tulip Bulbs: The Inside Story. <http://www.learner.org/jnorth/>. (Erişim Tarihi: 20.06.2022).
- İlhan E (2015) Ters Lale (*Fritillaria imperialis* L.) Bitkisinde *In Vitro* Koşullarda Organ Rejenerasyonlarının Sağlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD, İzmir.
- Kazaz S (2021) Süs Bitkileri Islahı. In: Kazaz S, Mendi YY (eds.), Süs Bitkileri Islahı Kitabı, Klasik ve Biyoteknolojik Yöntemler, Geceyayınları, Ankara, 1, 12-19.
- Kuijpers A-M, Langens-Gerrits M (1997) Propagation of Tulip *In Vitro*. Acta Hort. 430:321-324. DOI: 10.17660/ActaHortic.1997.430.49
- Le Nard M, De Hertogh AA (1993a) Tulipa. In: De Hertogh AA, Le Nard M (eds.), The Physiology of Flower Bulbs, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 617-682.
- Le Nard M, De Hertogh AA (1993b) Bulb Growth and Development and Flowering. In: De Hertogh AA, Le Nard M (eds.), The Physiology of Flower Bulbs, Elsevier, Amsterdam, 2943.
- Li Y, Cihen L, Zhan X, Liu L, Feng F, Guo Z, Wang D, Chen H (2022) Biological Effects of Gamma-ray Radiation on Tulip (*Tulipa gesneriana* L.). PeerJ 10:e12792 DOI 10.7717/peerj.12792.
- Maślanka, M, Bach A (2014) Induction of Bulb Organogenesis In *In Vitro* Cultures of Tarda Tulip (*Tulipa tarda* Stapf.) From Seed-Derived Explants. In Vitro Cell.Dev. Biol.-Plant 50, 712–721. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9641-1>
- Mu H, Fan L, Zhu S, Sun T (2020) Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi On Root Growth and Architecture of *Tulipa gesneriana*. Land Science 2: 60-66.
- Nayeem M, Qayoom A (2015) Inside Greenhouses For Cultivation of Tulip Flowers. International Journal of Advances In Production and Mechanical Engineering 1(2) : 2394-6210.
- Podwyszyńska M, Sochacki D (2010) Micropropagation of Tulip: Production of Virus-Free Stock Plants. In: Jain S, Ochatt S (eds.), Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants. Methods in Molecular Biology. Humana Press vol 589. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_23
- Podwyszyńska M, Ciolakowska AM (2020) Micropropagation of Tulip via Somatic Embryogenesis. Agronomy 10(12): 1857.
- Polat Z (2018) Lale (*Tulipa gesneriana* L.) 'nin Kesme Çiçek Performansı Üzerine Farklı Zorlama Uygulamalarının Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ptak A, Bach A (2007) Somatic Embryogenesis In Tulip (*Tulipa gesneriana* L.) Flower Ctem Cultures. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 43: 35-39.
- TÜİK (2021) Süs Bitkileri Üretim Tabloları. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Urun-Denge-Tabloları-2020-2021-45505> (Erişim Tarihi: 16.02.2023).
- Van Gelder K (2021) <https://www.statista.com/statistics/641905/total-area-used-forproduction-of-tulip-bulbs-in-the-netherlands>.
- Van Rossum MWPC, De Klerk GJM, Van Der Plas LHW (1998) Adventitious Regeneration From Tulip, Lily and Apple Explants At Different Oxygen Levels. J Plant Physiol 153(1-2):141-145.

