

**T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**MOR PRENS LALESİ YAPRAK EKSPANTLARININ İN  
VİTRO REJENERASYON YETENEKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Meltem ERDEM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Hüseyin UYSAL**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ZRF-20037 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2022**

## KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Meltem ERDEM tarafından hazırlanan “MOR PRENS LALESİ YAPRAK EKSPANTLARININ İN VİTRO REJENERASYON YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savuma Tarihi:02/08/2022

Üye (T.D.) : Doç. Dr. Hüseyin UYSAL (Akdeniz Üniversitesi)

Üye: : Doç. Dr. Yelda EMEK (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Fatih ÖNER (Ordu Üniversitesi)

### ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Fen Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... numaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gönül AYDIN

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tüm alıőma sűreci boyunca desteklerini esirgemeyen tűm hocalarım ve ayrıca Sayın Doç. Dr. Hűseyin UYSAL hocama ve aileme teőekkűrlerimi sunarım.

Bu çalıőmaya maddi destek veren Aydın Adnan Menderes Ŭniversitesi, Bilimsel Araőtırma Projeleri (BAP) Birimine ve her durumda kahrımızı çeken ve yardımlarını hiç esirgemeyen birim personeli Ferda IRIZ Hanıma teőekkűr ederim (Proje Kodu: ZRF-20037).

Yine özellikle projenin son dűneminde proje ile alakalı her tűrlű yazıőmada ve yűksek lisans eėitimim sűresince gerektiėi her noktada hiçbir zaman yardımını geri çevirmeyen Sayın hocam Doç. Dr. Emre SEVİNDİK'e teőekkűrű borç bilirim.

Ayrıca bu çalıőmanın bitkisel materyallerinin önemli bir kısmını oluőturan Lale soğanlarının temininde yardımcı olan Atlas Lale Firması personeli Merve Ateő Hanım'a teőekkűr ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ÖZET .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Lale ( <i>Tulipa gesneriana</i> L.) Bitkisinin Özellikleri.....	3
2.2. Lale Bitkisinin Yayılışı, Ekolojisi ve Ticari Değeri.....	4
2.3. Bitki Doku Kültürü ve Somatik Embriyogenesis.....	5
2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....	7
2.4.1. İAA (İndole-3-Asetic Acid), NAA ( $\alpha$ -Naftalen Asetic Acid) ve 2,4-D (2,4- Dichloro Phenoxy Asetic Acid ) – Oksin Hormonları .....	8
2.4.2. BAP (6-Benzylaminopurine), Kinetin ve TDZ (Thidiazuron) – Sitokinin Hormonları .....	8
2.5. Sentetik Tohum .....	9
2.6. Lale’de Yapılan Biyoteknolojik Çalışmalar.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	13
3.1. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları ve İçeriği .....	13
Çizelge 3.2. Araştırma kapsamında kullanılan MS besisi ortamına ilave edilen hormon tipi ve konsantrasyonları .....	14
3.2. Soğan Sterilizasyonu ve Dikimi.....	14
3.3. Soğanların Dikimi ve Çimlenmesi .....	16
3.4. <i>In vitro</i> Ortamdan Elde Edilen Yaprakların Alt Kültürü.....	17

3.5. Topraktan Elde Edilen Yaprakların Kültüre Alınması.....	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	19
4.1. <i>In vitro</i> Ortamda Dikimi Yapılan Lale Soğanlarında Çimlenme .....	19
4.2. Toprağa Dikimi Yapılan Lale Soğanlarında Çimlenme.....	19
4.3. <i>İn Vitro</i> Ortamda Çimlendirilen Lale Soğanları Yapraklarında Alt Kültür Sonuçları.	20
4.4. Toprağa Dikilerek Çimlendirilen Lale Soğanları Yapraklarında Alt Kültür Sonuçları	22
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	25
KAYNAKLAR .....	26
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	32
ÖZGEÇMİŞ.....	33

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>BAP</b>	: 6-Benzylaminopurine
<b>IAA</b>	: İndole-3-asetic acid
<b>2,4-D</b>	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
<b>TDZ</b>	: Thidiazuron
<b>NAA</b>	: $\alpha$ -Naftalenasetic acid
<b>MS</b>	: Murashige ve Skoog kültür ortamı
<b>KNO<sub>3</sub></b>	: Potasyum nitrat
<b>CaCl<sub>2</sub> .H<sub>2</sub>O</b>	: Kalsiyum klorür monohidrat
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	: Amonyum nitrat
<b>MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O</b>	: Magnezyum sülfat heptahidrat
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Potasyum dihidrojen fosfat
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	: Disodyumetilendiamintetraasetik asit
<b>FeSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O</b>	: Demir II sülfat heptahidrat
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	: Borik asit
<b>MnSO<sub>4</sub> .H<sub>2</sub>O</b>	: Mangan II sülfat monohidrat
<b>ZnSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O</b>	: Çinko sülfat heptahidrat
<b>KI</b>	: Potasyum iyodür
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> .H<sub>2</sub>O</b>	: Sodyum molibdatmonohidrat
<b>CuSO<sub>4</sub> .5 H<sub>2</sub>O</b>	: Bakır sülfat pentahidrat
<b>CoCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O</b>	: Kobalt klorür heksahidrat
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Lalede soğan yapısı .....	3
Şekil 2. 2. Lale kapsül ve tohumları .....	4
Şekil 3. 1. Lale soğanlarının <i>in vitro</i> ortamda dikimi ve çimlenmesi.....	16
Şekil 3. 2. Lale soğanlarının toprağa dikimi ve çimlenmesi .....	16
Şekil 3. 3. Lale <i>in vitro</i> yaprak eksplantlarının alt kültürleri.....	17
Şekil 3. 4. Toprakta gelişen lale yapraklarından <i>in vitro</i> kültür .....	18
Şekil 4. 1. Mor Prens Lalesi <i>in vitro</i> ortamdan gelişen kalluslar .....	22



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Araştırmada kullanılan besi ortamının içeriği.....	13
Çizelge 3. 2. Araştırma kapsamında kullanılan MS besi ortamına ilave edilen hormon tipi ve konsantrasyonları.....	14
Çizelge 4. 1. <i>In vitro</i> lale soğanlarının çimlenme oranları .....	19
Çizelge 4. 2. Toprağa dikilen lale soğanlarının çimlenme oranları.....	20
Çizelge 4. 3. Mor Prens Lalesi <i>in vitro</i> ortamdan gelişen kallus sayıları ve oranları.....	20
Çizelge 4. 4. <i>In vitro</i> ortamda çimlendirilen karışık lale soğanından kültüre alınan yaprak eksplant sayıları .....	21
Çizelge 4. 5. Toprakta çimlendirilen Mor Prens Lalesi soğanından kültüre alınan yaprak eksplant sayıları .....	22
Çizelge 4. 6. Toprakta çimlendirilen karışık lale soğanından kültüre alınan yaprak eksplant sayıları .....	23



## ÖZET

### MOR PRENS LALESİ YAPRAK EKSPANTLARININ İN VİTRO REJENERASYON YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

**Erdem M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.**

**Amaç:** Bu araştırmada Lale'nin yaprak eksplantlarının kùltürü ile *in vitro* rejenerasyon yetenekleri belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve Yöntem:** Araştırmada, steril hale getirilen Lale soğanlarından elde edilen yaprakların *in vitro* kùltürü ve saksıda çimlendirilmiş lale soğanlarından elde edilen yaprakların steril hale getirilerek *in vitro* kùltüre alınması neticesinde *in vitro* rejenerasyon oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 2,4-D (2 mg/lt), TDZ (2 mg/lt), Kinetin (2 mg/lt), NAA (2 mg/lt), 2,4-D+Kinetin (1 mg/lt + 1 mg/lt), 2,4-D+Kinetin (2 mg/lt + 2 mg/lt), İAA+TDZ (1 mg/lt + 1 mg/lt), İAA+TDZ (2 mg/lt + 2 mg/lt), İAA+BAP (1 mg/lt + 1 mg/lt), İAA+BAP (2 mg/lt + 2 mg/lt), NAA+Kinetin (1 mg/lt + 1 mg/lt), NAA+ Kinetin (2 mg/lt + 2 mg/lt), NAA+TDZ (1 mg/lt + 1 mg/lt), NAA+TDZ (2 mg/lt + 2 mg/lt), 2,4-D+TDZ (1 mg/lt + 1 mg/lt) ve 2,4-D+TDZ (2 mg/lt + 2 mg/lt) hormonlarını içeren MS besi ortamı kullanılmıştır.

**Bulgular:** Mor Prens Lalesi soğanlarının *in vitro* ortamda çimlendirilmesi ile elde edilen yaprakların kùltüründen 2,4-D (2 mg/lt) ve NAA (2 mg/lt) hormonu içeren MS ortamlarında %6 oranında kallus oluşurken, Kinetin (2 mg/lt) hormonu içeren ortamda %10 oranında kallus oluşumu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Araştırmaya konu besi ortamları içerisinde sadece 2,4-D (2 mg/lt), NAA (2 mg/lt) ve Kinetin (2 mg/lt) hormonları içeren ortamlarda kallus rejenerasyonu gözlemlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Hormon, İn Vitro, Lale, Kallus, Rejenerasyon

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF IN VITRO REGENERATION CAPABILITIES OF PURPLE PRINCE TULIP LEAF EXPLANTS

**Erdem M. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Science and Technology, Agricultural Biotechnology Program, Master Thesis, Aydın, 2022.**

**Purpose:** In this study, it was aimed to determine the in vitro regeneration abilities of Tulip by leaf explants culture

**Material and Method:** In the study, *in vitro* regeneration created was tried as a result of in vitro leaves culture obtained from sterilized tulip bulbs and leaves obtained from tulip bulbs germinated in pots by sterilizing them in in vitro culture. For this aim the MS medium containing the hormones of 2,4-D (2 mg/l), TDZ (2 mg/l), Kinetin (2 mg/l), NAA (2 mg/l), 2,4-D+Kinetin (1 mg/l), 2,4 for callus formation 2,4-D+Kinetin (2 mg/l), IAA+TDZ (1 mg/l), IAA+TDZ (2 mg/l), IAA+BAP (1 mg/l), IAA+BAP (2 mg/l), NAA+Kinetin (1 mg/l), NAA+ Kinetin (2 mg/l), NAA+TDZ (1 mg/l), NAA+TDZ (2 mg/l), 2,4-D+TDZ (1 mg/l) and 2,4-D+TDZ (2 mg/l) were used.

**Results:** While 6% callus was formed in MS medium containing 2,4-D (2 mg/l) and NAA (2 mg/l) hormone, 10% callus developed in media containing Kinetin (2mg/l) hormone from the culture of leaves obtained by *in vitro* germination of Purple Prince Tulip bulbs.

**Conclusions:** Callus regeneration was observed in media containing only 2,4-D (2 mg/l), NAA (2 mg/l) and Kinetin (2 mg/l) hormones among the nutrient media subject to the study.

**Keywords:** Hormone, In Vitro, Tulip, Callus, Regeneration

# 1. GİRİŞ

Lale (*Tulipa gesneriana* L.), *Liliales* takımı, *Liliaceae* familyası *Tulipa* cinsine dahil olup, dünyanın ilk 10 çiçeği arasında bulunmaktadır (Şekil 1.1). Aynı zamanda, dünya üzerindeki soğanlı süs bitkileri içerisindeki en büyük grubu oluşturmakla birlikte, lale cinsi içerisinde 100-150 tür bulunmakta ve bunu sırasıyla nergis, iris, sümbül ve zambak bitkileri takip etmektedir (Nayeem ve Qayoom, 2015). Ana vatanı Orta Asya olup Sibirya, Moğolistan, Çin, Kaşmir, Hindistan, Afganistan, İran, Kafkasya ve Türkiye’de yayılış gösterir (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 çok zor ve soğan veriminin 3 yıl sürmesi nedeniyle çok fazla tercih edilmemektedir (Anonim, 2022a).



**Şekil 1. 1.** Lale bitkisinin genel görünümü (Anonim, 2022b)

Lale, zambak, nergis gibi soğanlı bitkilerde tohumla çoğaltımın bazı sakıncaları bulunmaktadır. Bunlar; heterozigoti ile genetik yapıda meydana gelen değişiklikler, tohumla üretimde elde edilen lale soğanlarının çiçeklenme olgunluğuna 4-5 yıl gibi uzun bir sürede gelmesi, tohumların çimlenme oranının düşük olmasıdır. Bu nedenle de bu tarz bitkilerin ticari üretiminde bitki soğanları tercih edilmektedir.

Ancak soğanlar taşınması ve muhafazasının zor olması, çok fazla alana ihtiyaç duyulması ve hastalık etmeninin 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 büyüyeblen yapraklar olup depo görevi görürler. En dıştaki kuru ve kahverengi olan kabuk “tunik”dir, soğanı hastalıktan ve yaralanmalardan korur. Temel katman soğanın kısa, etli gövdesidir (Le Nard ve De Hertogh, 1993a).

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 1.2). Lale; kesme çiçek, saksılı süs bitkisi, park, bahçe ve peyzaj düzenlemelerinde tasarım bitkisi olarak kullanılmaktadır (Benschop vd., 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 vd., 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 vd., 2022). Dünya lale soğanı üretiminde lider konumunda olan ülke Hollanda (108.000 da) olup bunu sırasıyla Japonya (3000 da), Fransa (2930 da), Polonya (2000 da), Almanya (1550 da) ve Yeni Zelanda (1220 da) izlemektedir. Ülkemizde ise Konya’da özel bir firma tarafından 400 da alanda yıllık 22 milyon adet lale soğanı üretimi yapılmaktadır. Bu soğanların neredeyse tamamı park ve bahçelerde tasarım bitkisi olarak değerlendirilmektedir. Türkiye’de kesme çiçek amacıyla kullanılan soğanlar ise Hollanda’dan ithal edilmektedir (Polat, 2018).

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.

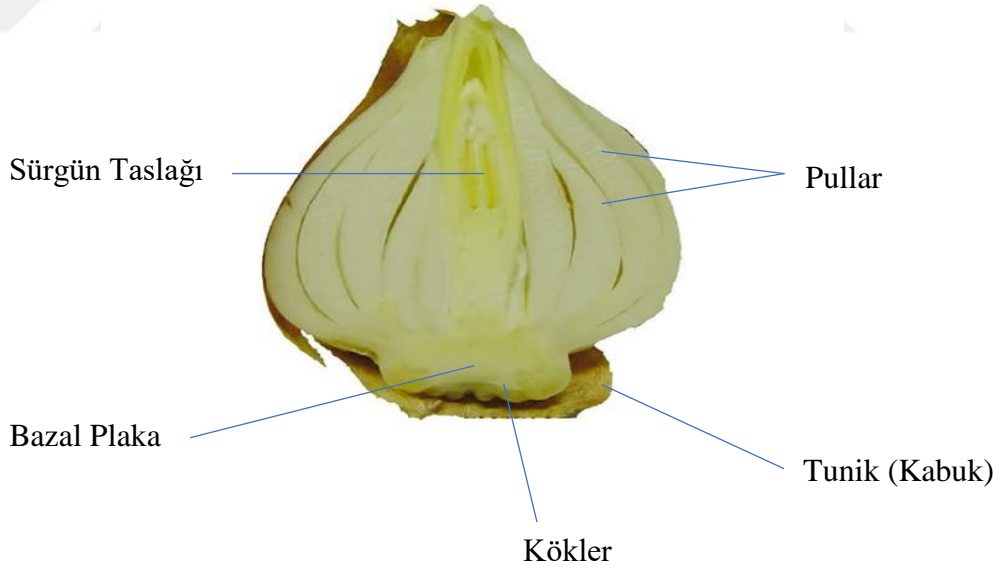


Şekil 1. 2. Lale soğanının görünümü

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Lale (*Tulipa gesneriana* L.) Bitkisinin Özellikleri

Zambakgiller (*Liliaceae*) familyasına ait olan lale bitkisi sapları 10-30 cm boylarında olan, sap üzerinde çanak şeklinde bulunan çiçeklere sahiptir. Kadeh şeklinde, güzel görünüm ve renklerde olup, kokusu olmayan çiçekler genel olarak yukarıya doğru dik bir görünüme sahiptir. Çiçekler, çiçek sapı üzerinde çoğunlukla tekli nadir olarak ikili veya üçlü şekilde bulunabilmektedir. Çiçek örtüsü 6 parçalı ve serbest yapıda olup sarı, kırmızı, mor, pembe veya beyaz renklerde olmakla birlikte ara renk tonlarında da olabilmektedir. Lale bitkisinin çiçek açma zamanları Mart ile Mayıs aylarıdır. Yaprakları 2-8 adet etli yapıda ve mavi yeşil renkli olup, sap üzerinde kılıç şeklinde ve kıvrımlı bir yapıya sahiptir (Botschantzeva, 1982). Erkek organları, 6 adet, filamentlerin dip kısımları, bazı türlerde şişkin ve tüylüdür (Gürdal, 2017). Kesme çiçek, saksı bitkisi veya dış mekan süs bitkisi olarak yararlanılmaktadır (Malta, 2016). Soğanlar sert ve kahverengi kabuklu olup, pullu yapıya sahiptir. Bitki oluşumunda soğanın tam ortasından sürgün vererek gelişim görülür (Şekil 2.1.).



Şekil 2. 1. Lalede soğan yapısı (Hosier, 2011)

Her lale çiçeği tohum oluşturmaz ancak tohum oluşumunu garantilemek için çiçekteki erkek organların polen tozlarının tam ortadaki dişi organa bulaşmasını (tozlama) sağlamak gerekmektedir. Tohumdan soğan üretimi 3 yılı bulmaktadır. Eğer bitki tohum verecek ise bu durumda kısa ve veya uzun şekilli kapsül içerisinde sayıca fazla olarak tohumlar oluşmaktadır (Anonim, 2022c) (Şekil 2.2).



**Şekil 2. 2.** Lale kapsül ve tohumları

## **2.2. Lale Bitkisinin Yayılışı, Ekolojisi ve Ticari Değeri**

Lale, Anadolu'nun dağlık bölgelerinde, Kafkasya ve Himalayalar'ın yaklaşık 4000 m'ye kadar olan yüksekliğe sahip kesimlerinde ayrıca yazın kuru ve sıcak, kışın ise soğuk ve nemli bir iklim yapısı gösteren bölgelerde doğal bir şekilde yetişmektedir (Benschop vd., 2010; Van Tuyl ve Van Creji, 2006; Hernández Bermejo ve Sánchez, 2009; Zonneveld, 2009). Genellikle Hollanda ile özdeşleşmiş olmasına rağmen lalenin ana gen merkezi Orta Asya'daki Pamir Alai ve Tien Shan dağları arasında bulunmaktadır. Bu bölgelerde meydana gelen çeşitlilik, Fas'tan Batı Avrupa'ya ve Batı Çin'e kadar yayılım göstermiştir. Lalenin ikinci gen merkezi ise Kafkaslar'dır (Sonyol, 2012). Laleler için yarı gölge ve serin yerler daha uygundur. Yetiştirildiği ortamda yeterli miktarda besin bulunuyorsa uygun miktarda sulamak yeterli olacaktır ancak çiçek açtığı dönemlerde düzenli bir şekilde sulama işlemi yapılması gerekmektedir. Soğanlar sivri kısımları yukarı gelecek şekilde 10-15 cm derinliğe

ekilmeli ve ekildikten hemen sonra sulanmalıdır. Çok nemli ortamlar, çok sıcak ve soğuk hava bitkinin çiçeklerine, köklerine ve yapraklarına zarar verebilmektedir (Anonim, 2022d). Lale ticari üretimi en çok olan süs bitkisidir. TÜİK (2021) verilerine göre süs bitkileri üretim miktarı 2021 yılında bir önceki yıla göre %2,9 oranında artış göstermektedir. Süs bitkileri üretimi içerisinde kesme çiçekler %62,3'lük, diğer süs bitkileri ise %37,7'lik bir paya sahiptir.

Kesme çiçek üretimi 2020 yılına göre %5,2, iç mekan süs bitkilerinin üretimi %11,4'lük bir artış gösterirken, dış mekan süs bitkileri üretimi %1,8 oranında azalma göstermiştir. Süs bitkileri içerisinde ticari üretimde önemli bir paya sahip olan lale bitkisinde 371.500 m<sup>2</sup> alana ekim yapılmış ve 27.830.000 adet kesme çiçek üretimi gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak lale soğanı üretiminde her ne kadar Hollanda ön planda olsa da ülkemiz içerisinde de çeşitli yerlerde soğan üretimi yapılmaktadır.

### **2.3. Bitki Doku Kültürü ve Somatik Embriyogenesis**

Aseptik şartlar altında ve yapay bir besi ortamında bitki, hücre, doku, organ gibi bitki kısımlarının kullanımıyla yeni doku, bitki, organ veya çeşitli bitkisel kaynaklı ürünlerin üretilmesi işlemine bitki doku kültürü denilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001; Uysal vd., 2007). Bitkilerin hızlı bir şekilde klon olarak çoğaltılabilmesi, klasik yöntemle zor çoğaltılan bitkilerde çoğaltımın sağlanabilmesi, hastalık etmenlerinden arındırılmış bitki üretiminin sağlanabilmesi, bitki ıslahının etkinliğini arttırıp süresini kısaltacak birçok çalışmanın gerçekleştirilmesi, somatik hücrelerde varyasyon oluşturabilmek, haploid (n) yapıda bitkilerin üretilmesi, bitki gen kaynaklarının muhafaza edilmesi ve sekonder metabolitler gibi biyokimyasal ürünlerin üretilmesi gibi birçok farklı amaçlar için doku kültüründen yararlanılmaktadır (Tekin, 2015). Farklılaşmamış bitki hücreleri, steril ortamda uygun şartları sağlandığı takdirde kültüre alma işleminden sonra yeni bitki veya bitkicikler oluşturabilmektedir (Mohammed vd., 2021). Steril koşullar altında bitki oluşumunu sağlayan bitki hücrelerinin sahip oldukları yapısal fonksiyona "totipotensi" denilmektedir. Totipotensi; bitkisel hücre ve dokuların farklılaşmasıyla yeni bir bitki meydana getirebilme yeteneğidir (Kurt, 2015).

Somatik embriyogenesis doku kültürünün en önemli ve en çok kullanılan rejenerasyon yöntemidir (İpekci, 2002). Somatik embriyogenesisde oluşan embriyolar somatik hücrelerden embriyo geliştirme yöntemi olup, dölleme sonucu meydana gelen embriyolar ile benzerlik göstermektedir (Merkle vd., 1995). 1950'lerde bitki doku kültüründe kallus

yapısından embriyo ve embriyoya benzeyen yapı oluşumu gerçekleşse de somatik embriyogenesis ilk defa 1958 yılında Steward ve arkadaşları tarafından havuç (*Daucus carota*) bitkisinin somatik dokulardan gerçekleştirilmiştir (Erdem ve Uysal, 2021). Sonralarda pek çok süs ve bahçe bitkisinin de mikroçoğaltımında özellikle de orman ağaçlarının çoğaltılmasında somatik embriyogenesis yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde *in vitro* rejenerasyon protokolleri geliştirilmiştir (Germena ve Lambardi, 2016). Eksplant kaynağı, bitkinin genetik yapısı, besi ortamında kullanılan bitkisel hormonlar, azot kaynağı, çevre şartları ve bitkinin fizyolojik durumu somatik embriyogenesis yönteminin başarısını etkileyen faktörlerdir (Tisserat, 1985; Takamura vd., 1995; Özcan vd., 2001; Koçak vd., 2014). Somatik embriyo gelişiminin genetik yapıya bağlı olması ve meydana gelen embriyoların düşük oranda çimlenmesi bu metodun kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır (Jalali vd., 2012).

Somatik embriyogenesis embriyogenik gelişim süreci dikotiledon (çift çenekli) bitkilerde; globular, kalp, torpedo ve kotiledon safhalarını içerirken, monokotiledon (tek çenekli) bitkilerde ise globular, skutellar ve koleoptilar gelişim safhalarına sahiptir (Babaoğlu vd., 2001).

Günümüzde yapay kültür koşulunda ve özellikle bitkisel hormonların kullanımıyla bir bitki dokusu veya organında bulunan somatik hücreden ya direkt olarak ya da kallus yapısının meydana gelmesiyle indirekt olarak embriyo oluşabilmektedir (Babaoğlu vd., 2001). Somatik doku hücrelerinin ilk olarak yüksek miktarda oksin hormonları olan (genelde 2,4-D), naftalin asetik asit, pikloram ve dikamba maddelerinin bulunduğu yapay ve steril ortamda kültüre alınmasının ardından oksin hormonunun bulunmadığı ikinci bir kültür ortamına aktarılmasıyla embriyo oluşturabilme potansiyeli gösterirler (Monnier, 1990). Somatik embriyogenesis yoluyla oluşan embriyolar organogenez yoluyla oluşan embriyolardan farklı bir yapıya sahiptir. Çünkü kök ve gövde eksenini olarak iki kutuplu yapıda olup gelişen kallus dokusuyla vasküler bağlantıları olmadığından bu dokudan çok kolay bir şekilde ayrılabilirler (De Jong vd., 1993). Eğer somatik embriyogenezde oluşan embriyolar direkt olarak eksplant yapısından oluşarak aynı yapıya sahip klon oluşturuyorsa doğrudan somatik embriyogenesis ile embriyo gelişimi söz konusudur. Ama eksplantlar yüksek oranda oksin hormonu bulunan ortamda kültüre alındığında embriyonik kallus oluşup sonrasında oksin hormonunun bulunmadığı tekrar besi ortamına aktarılır ise şartların elverişli olması durumunda bu yapıdan bitki ve bitkicikler geliyorsa burada da dolaylı somatik embriyogenesis söz konusu olmaktadır. Ayrıca dolaylı somatik embriyogenez



yönteminde genel olarak bir oksin hormonu olan 2,4-D kullanılmaktadır (Tisserat, 1985). Somatik embriyogenesis; klonal çoğaltım, gen transferi ve sentetik tohum alanlarında önemli kullanım potansiyeline sahiptir (Temiz, 2019). Somatik embriyoların kültüre alındıkları bitki eksplantının somatik hücrelerinde oluşması ve eksplant alınan bitkinin genetik yapısını taşıdıklarından dolayı zigotik embriyolara göre genetik açılımın olmaması en önemli üstünlükleridir. Çünkü bu şekilde klonal çoğaltım gerçekleştirilmiş olmaktadır (Parrot vd., 1991).

#### **2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri**

Kompleks yapılar gösteren yüksek organizasyonlu canlılar düzenli olarak büyüyüp gelişebilmek için hücreler arası iletişime ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde bu iletişimi sağlayan temel araç, bilgiyi kimyasal mesaj olarak hücreden hücreye taşıyan bitki büyüme düzenleyicileridir (Özen ve Onay, 1999). Doğal olarak bitkilerde üretilen, büyüme ve buna bağlı olarak diğer çeşitli fizyolojik olayları kontrol eden, üretildiği yerden bitkilerin diğer kısımlarına da taşınarak taşındığı bölgelerde de etkin olabilen, çok az miktardaki konsantrasyonlarda bile etkisini gösterebilen organik moleküllere hormon (bitki büyüme düzenleyicileri) adı verilmektedir (Öktüren ve Sönmez, 2005).

Bu hormonlar yüksek yapıdaki bitkilerin çeşitli organlarından ve bir kısım mantarlardan elde edilmektedir (Morsünbül vd., 2010). Ancak doğal bitki hormonlarının etkilerine benzer etkiler gösterebilen hatta bazen daha fazla etkili olabilen, kimya endüstrisi tarafından meydana getirilen sentetik yapıda hormonlar da bulunmaktadır (Çetin, 2002). Bitkisel hormonların bir kısmı bitki büyümesini ve gelişmesini uyarıp bu süreci olumlu yönde hızlandırmaktayken bir kısmı ise bitki büyüme ve gelişmesini geriletken hatta durduran etkilere sahiptir. Bitki büyüme ve gelişmesini olumlu yönde etki eden bitkisel hormonlar stimülatör olarak adlandırılır; bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyen hormonlar ise inhibitör olarak adlandırılır. Stimülatör grubuna oksinler, sitokininler ve giberellinler dahil iken inhibitör grubuna absisik asit ve etilen hormonları dahil olmaktadır. Bitkinin büyüme ve gelişmesi bu iki gruptaki hormonların etkisi altında gerçekleşmektedir. Bu nedenle günümüzde bu hormonlardan bitki büyüme ve gelişmesini düzenleyebilmek amacıyla çok çeşitli şekillerde yararlanılmaktadır (Bozcuk ve Topçuoğlu, 1982).

Bu çalışmada somatik embriyogenesis yoluyla kallus ve somatik embriyo gelişimini teşvik etmek amacıyla 2,4-D (2,4-dichloro phenoxy asetic acid), İAA (indole-3-asetic acid),

BAP (6-benzylaminopurine), NAA ( $\alpha$ -Naftalen asetic acid), Kinetin ve TDZ (thidiazuron) bitkisel hormonları kullanılmıştır.

#### **2.4.1. İAA (İndole-3-Asetic Acid), NAA ( $\alpha$ -Naftalen Asetic Acid) ve 2,4-D (2,4-Dichloro Phenoxy Asetic Acid) – Oksin Hormonları**

İlk olarak keşfedilen bitki büyüme maddesi ve tarımda en eski kullanılan bitkisel hormonlar oksin yapısındadır (Özen ve Onay, 1999; Halloran ve Kasım, 2002). Bitkilerde doğal olarak sentezlenen tek hormondur. Fakat üretimi yapılan birçok sentetik oksin hormonunun da İAA'ya benzer nitelikte etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Kumlay ve Eryiğit, 2011). Bitkilerin yaprak, tepe tomurcukları ve çiçek gibi meristematik dokularında sentezlenir ve taşınması yukarıdan aşağı yöne doğrudur (Algül vd., 2016).

Hücre genişlemesi ve büyümesine yardımcı olan aynı zamanda da doku gelişimi, hücre uzaması ve kök oluşumunu teşvik eden unsurlar hormonlardır (Grunewald vd., 2009). Ayrıca bitkinin türü ve yaşına bağlı olarak değişmekle birlikte genellikle düşük konsantrasyonda kullanımı adventif ve primer kök oluşumunda artış, tohum çimlenmesi, dişi çiçek oluşumu, partenokarpik meyve oluşumu ve floem dokusunda asimilat taşınımını teşvik etmekte olup bitkide etilen sentezinin daha çok artırılmasıyla çiçeklerde yumurtalık gelişimini düzenler. Oksin grubu hormonlar kök oluşumunu teşvik eder (Güleryüz, 1982).

#### **2.4.2. BAP (6-Benzylaminopurine), Kinetin ve TDZ (Thidiazuron) – Sitokinin Hormonları**

Bitkilerde hücre bölünmesini başlatan hormonlar olup hücre bölünmesinde etkili oldukları için dokuların ve organların farklılaşmasında görevlidirler (Çetin, 2002). Sitokinin grubu hormonlar sürgün oluşumunu teşvik eder (Güleryüz, 1982). Özellikle bitkinin kök meristemlerinde sentezlenir ve ksilem dokusuyla bitkinin yeşil olan tüm kısımlarına iletilir. Aynı zamanda hayvanlarda da sitokinin hormonu bulunur (Kumlay ve Eryiğit, 2011). Zeatin, mısır tohumlarından elde edilen ilk bitki kaynaklı sitokinin hormonudur (Ünsal, 1993). Doku kültüründe kullanılan besi ortamlarında hem organ oluşumu hem de organ gelişimine katkı sağlar. Ayrıca dormansi (uyku hali) kırılmasında, karbonhidrat transferinin hızlandırılmasında, tepe sürgünü baskınlığının engellenmesinde etkili olmakla birlikte Kinetin (6-furfurylamino purine) protein ve nükleik asit sentezinin devam ettirilmesini sağlayarak kesme çiçeklerin uzun bir süre canlılıklarını sürdürmesine yardımcı olurken,

BAP ise yeşil sebzelerin hasat edilmesinden sonraki zamanda daha uzun süre dayanmasını sağlar.

Oksin hormonlarına göre sitokin hormonları bitki ıslahı ve doku kültürü çalışmalarında daha çok kullanılmaktadır (Güleryüz, 1982; Kaynak ve Ersoy, 1997). Sitokinler doku kültürü uygulamalarında sürgün ve kök farklılaşması, lateral tomurcukların büyümesi, kloroplast ve yaprak gelişimi ayrıca da senesens üzerine etkisi olan hormonlardır. Ancak bütün bu gelişimler genel olarak oksin hormonu ile birlikte kullanıldığı zaman mümkündür Bundan dolayı kullanılan besi ortamlarının içerisine oksin ve sitokin hormon karışımları eklenir (Özen ve Onay, 1999).

## 2.5. Sentetik Tohum

*In vitro* rejenerasyonun en yaygın kullanım alanlarından birisi sentetik tohumların oluşturulmasıdır. Normal tohumlar erkek ve dişi gametlerin birleşmesiyle meydana gelip, embriyo, besi doku ve tohum kabuğu bölümlerinden oluşurken; sentetik tohumlar, sodyum alginat gibi bileşenler ve besin maddeleriyle somatik embriyoların kaplanmasından oluşan yapılardır (Erdem ve Uysal, 2021). Sentetik tohum üretiminde somatik embriyolar, sürgün uçları, kalluslar, sürgün tomurcukları, protokorm benzeri yapılar, saçaklı kökler, organojenik ve embriyojenik tüm hücreler kullanılmaktadır (Khor ve Loh, 2005; Magray vd., 2017). Fakat sentetik tohum üretimi için yapılan çalışmaların çoğunda genellikle somatik embriyolar kullanılmaktadır (Soneji vd., 2002). Genellikle somatik embriyo yapıları kullanıldığı için bunların ekim zamanına kadar canlı kalabilmesi ve gelişim sürecinde ihtiyaç duyduğu besin maddelerini karşılayabilmek amacıyla bu embriyoların uygun jel maddeleriyle kaplanması, kurutulduktan sonra ekimi ile sıvı içine ekimi olmak üzere çeşitli metodlar tercih edilmektedir (Babaoğlu vd., 2001). Sentetik tohum oluşturmak için somatik embriyoların kaplanmasında genel olarak; potasyum alginat, agar, gelrite, sodyum pestat, karagenan, karbosksimetil selülozlu sodyum alginat, kitre zamkı, guargum gibi kaplama materyalleri kullanılmakta olup en çok kalsiyum alginat kullanılmaktadır (Rai ve Jaiswal, 2008; Koçak, 2019). Fakat bunların içerisinde sodyum alginat; uygun vizkozitesi, hızlı jelleşmesi, maliyetinin düşük olması ve biyo-uyumluluk etmenlerinden dolayı en çok tercih edilen kaplama materyalidir (Saiprasad, 2001; Swamy vd., 2009). Sentetik tohum aşamaları; bitki seçimi, somatik embriyogenez, somatik embriyoların olgunlaştırılması ve somatik embriyoların uygun jel kapsülüyle kaplanmasını içermektedir (Murashige, 1978). Murashige tarafından 1978 yılında sentetik tohum geliştirme çalışmaları

yapılmış olup, ardından Lavrence tarafından kapsülasyon işlemi 1981 yılında gerçekleştirildikten sonra Redenbaugh tarafından 1984 yılında hidrojel ile kaplama işlemi ve son olarak sentetik tohum ile bitki geliştirme çalışması 1989 yılında Fujii tarafından gerçekleştirilmiştir (Ara vd., 2000). Sentetik tohumlar yaş ve kuru tohumlar olmak üzere iki çeşittir. Yaş (hidratlanmış) tohum, çeşitli somatik yapıdaki dokuların sodyum alginat, agar, gelrit ve karragenan gibi farklı jeller kullanılarak kapsüle alınmasıyla oluşurken kurutulmuş tohumlar ise somatik yapıdaki dokuların polietilen glikol ile kaplanması, steril koşullar altında teflon bir yüzeyde saatlerce kurumaya bırakılmasının ardından yapay kültür ortamına alınıp suyun uzaklaştırılması sağlanarak oluşturulan tohum çeşididir. Böylelikle embriyoların canlılığının sürmesi sağlanmış olur (Çölgeçen ve Toker, 2006).

İlk olarak Kitto ve Janick (1982) tarafından havuç bitkisinin embriyolarının kaplanmasında kurutulmuş tohum yöntemi kullanılmıştır. Sentetik tohumlar kullanım alanları bakımından; benzer yapıda ve çok sayıda embriyo üretimi, tohum üretemeyen bitkilerin üretimi, boyutları küçük olduğu için depolama, nakliye ve dikim kolaylığı, bir bitkinin üretiminin sağlanması (monokültür), nesli tükenmiş ve tükenmekte olan bitkilerin genetik yapılarının muhafazası, transgenik bitkilerin esas bitki genotipinin korunması, hastaliksız bitki oluşturabilmek, maliyetnin düşük olması, belli bir zaman ve mevsime bağlı olmaksızın istenilen zaman içerisinde üretiminin gerçekleştirilebilmesi, tohum kısırlığı gösteren hibrit yapıdaki bitkilerin üretilebilmesi gibi birçok avantaja sahip olmaktadır (Rihan vd., 2017; Ravi ve Anand, 2012; Çölgeçen ve Toker, 2006; Magray vd., 2017; Saiprasad, 2001). Sentetik tohumların avantajlarının yanında; mikroçoğaltım sağlamak canlı yapıların az miktarda olması, somatik embriyoların aynı zaman içerisinde gelişmemesi, gelişen embriyonik yapılarda strese tolerans ve dormant durumun eksik olması, uygun olmayan olgunlaşmalardan dolayı kolaylıkla çimlenme olmaması ve olgun bir bitki yapısına dönüşme kapasitesinin düşük olması gibi bazı dezavantajlar da bulunmaktadır (Ara vd., 2000; Singh vd., 2020).

## **2.6. Lale’de Yapılan Biyoteknolojik Çalışmalar**

Lale çiçek sapı kültürlerinde somatik embriyogenesis oluşumu için prosedür geliştirilen çalışmada, somatik embriyogenesis düşük sıcaklık ile muamele edildiği “Apeldoorn” soğanlarından elde edilen çiçek sapı eksplantları kullanılarak yapılmıştır. Soğanlar soğukta bekletilmemiş ya da 12 ile 24 hafta boyunca 5 °C’ de bekletilmiştir. Eksplantlar 1-100 µM ekzojen oksin olan 2,4-D (2,4-dikloro fenoksi asetik asit), Picloram

(4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit) ve NAA ( $\alpha$ -Naftalen asetik asit) ortamları ile 0,5-50  $\mu$ M BA (Benzil adenin) ve ZEA (Zeatin) ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda yüksek konsantrasyondaki oksin, eksplantların yoğun bir şekilde kallusa ve damar demetlerinin sarımsı nodüller kallusa dönüşmesi sağlanmıştır. Picloram, embriyonik kallus oluşumunun teşvikinde daha etkili olurken 2,4-D hormonunun renksiz kallus oluşumunda etkili olduğu belirlenmiştir. 12 hafta boyunca soğutulan soğanlardan gelişen çiçek saplarının alt kısımlarının kallus oluşumunda en iyi eksplant olduğu kanıtlanmıştır. En yüksek sayıda somatik embriyonun 25  $\mu$ M Picloram ve 0,5  $\mu$ M BA hormonu içeren ortamlarda geliştiği belirlenmiştir. Ortamda 2,4-D varlığında adventif kök oluşumu ve aynı zamanda 5  $\mu$ M BA hormonu ile 0,5  $\mu$ M NAA hormonunun etkisi altındaki globüler embriyoların torpedo aşamasındaki embriyolara dönüştüğü görülmüştür (Ptak ve Bach, 2007).

Podwyszyńska ve Ciolakowska (2020) yaptıkları Lale'nin somatik embriyogenesis yoluyla mikroçoğaltılması çalışmasında eksplant olarak soğutulmuş soğanlardan kesilen çiçek sapı parçalarını kullanmışlardır. Yalnızca oksin hormonları olan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 1-naftalin asetik asit (NAA) ve 4-amino-3,5, 6-trikloro-2-piridin karboksilik asit (pikloram) hormonlarını kapsayan MS ortamları veya 0.1 ve 0.5 mg L<sup>-1</sup>'de tidiazuron (TDZ) ile kombine edilmiş modifiye besi ortamlarını kullanmışlardır. Damar yığınlarının dokularından kesilen yüzeylerde bütün oksinlerin varlığıyla granüler bir yapıya sahip olan sarımsı beyaz kallus geliştiğini gözlemlemişlerdir. Oksinli ortama TDZ eklenmesi somatik embriyo oluşumunu önemli ölçüde uyarmış olup bundan embriyonik kallus hatları elde etmişlerdir. Embriyonik kallusun en yüksek dönüşümü ve çoğalması hem de embriyo oluşumunu 0,1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D'nin 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ ile kombinasyonunda olduğunu belirlemişlerdir. Prolin eklenmesi halinde ya kallus çoğalma oranının ya da embriyo oluşum frekansını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Soğan oluşturabilen 10 mm'den uzun kotiledonlara sahip en kaliteli embriyolar, 0,1 mg L<sup>-1</sup> konsantrasyonunda TDZ'nin 6-benzilaminopurin (BAP) ile değiştirilmesiyle oluştuğunu belirlemişlerdir.

Çalışma sonucunda embriyonik hücreler, küçük hacimleri, düzenli şekilleri, yoğun sitoplazmaları ve büyük çekirdekleri ile karakterize edilmiş olup, globüler embriyoların ayrı bir periderm tabakasıyla kaplandığı ve embriyoların prokambiyal bir iplik ve vejetatif apeksin (stolon) yana doğru yönlendirilmiş bir meristemi ile yaprak şeklinde kotiledonlara sahip yapılar haline geldiğini aynı zamanda da kotiledon embriyolarının ana doku ile vasküler bağlantı göstermeyip embriyonik kökler oluşturmadıklarını gözlemlemişlerdir.

Sun vd. (2022), Jasmonik asitin TgLOX4 ve TgLOX5 biyosentetik genlerinin lalede yavru soğan gelişimine etkisi araştırmıştır. Sonuçta; lale çeşitlerinin farklı soğan boyutları varyasyonu gösterdikleri gözlemlenmiştir. Yapılan transkriptomik analizlerin, iki lipoksijenaz gen olan TgLOX4 ve TgLOX5 dahil olmak üzere bitki hormonları ve bitki gelişiminde rol oynayan genlerin, lale soğanı büyümesiyle birlikte ekspresyonunda önemli değişiklikler gösterdiğini belirlenmiştir. *Arabidopsis*'te TgLOX4 ve TgLOX5 genlerinin ektojik ekspresyonu, endojen JA içeriğini arttırdığı, bitki büyümesini iyileştirdiği ve yan kök sayılarını arttırdığını gözlemlenmiştir. Ayrıca, eksojen JA (jasmonik asit) muamelesi lale soğanı büyümesini desteklerken, JA biyosentez inhibitörü sodyum dietilditiyokarbamatın (DIECA) bu süreci engellediğini belirlemiştir.

Farklı konsantrasyonlarda BA'nın *in vitro* kültür ile lale (*Tulipa gesneriana* L. cv. arma) tomurcuklarının sürgün çoğalması üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA ve çeşitli seviyelerde (0,5, 1, 1,5, 2 ve 2,5 mg L<sup>-1</sup>) BA hormonlarının bulunduğu MS ortamları kullanılmıştır. Sonuçta, 1 mg L<sup>-1</sup> BA muamelesinin, sekiz haftalık kültürden sonra %83,33'e ulaşan sürgün çoğalmasında önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Fakat, apikal tomurcuklar kullanılan hiçbir konsantrasyonda sürgün çoğalması göstermediği gözlemlenmiştir. Bununla beraber, 1 mg L<sup>-1</sup> BA konsantrasyonuna sahip MS ortamında büyüyen aksiller tomurcuklar, sırasıyla eksplant başına 5,33 sürgün ve 5,67 cm ile diğer muamelelere göre sürgün sayısında ve uzunluğunda önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir en düşük sürgün çoğalması, sürgün uzunluğu ve sürgün başına yaprak sayısı (sırasıyla sürgün başına %61,0, 2,33 cm ve 1,67 yaprak) 0,5 mg L<sup>-1</sup> BA hormonunun bulunduğu ortamda belirlenmiştir (İbrahim ve Draaj, 2020).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma lale soğanlardan elde edilen yaprak eksplantlarından somatik embriyo ve sentetik tohum geliştirmek 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.

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları ve İçeriğı

Çalışmada steril bitkileri elde etmek amacıyla lale soğanları MS (Duchefa Biochemie, Katalog No: M0222) besi ortamı kullanılarak çimlendirilmiş; eksplantların alt kültürü aşamasında bu ortama oksin ve sitokinin hormonlarının hem ayrı ayrı hem de kombinasyonunu içeren besi ortamları kullanılmıştır. Besi ortamı içeriğı Çizelge 3.1'de ve kullanılan hormonlar ve konsantrasyonları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Araştırmada kullanılan besi ortamının içeriğı

Kimyasal Madde	Miktar mg/lit	Kimyasal Madde	Miktar mg/lit
KNO <sub>3</sub>	1900	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,25
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	332,2	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	180,7	Glycin	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Myo-Inostol	100
Na <sub>2</sub> -EDTA	37,25	Nicotinic asit	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85	Pyrodoxine-HCl	0,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	Thiamin HCl	0,1
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	Sukroz	30 000
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	Agar	7 000
KI	0,83	pH	5,8

**Çizelge 3. 2.** Araştırma kapsamında kullanılan MS besi ortamına ilave edilen hormon tipi ve konsantrasyonları

MS Ortamına İlave Edilen Hormonlar	mg/lt
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
İAA+ TDZ	1,0 +1,0
İAA+TDZ	2,0+2,0
İAA+BAP	1,0+1,0
İAA+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

### 3.2. Soğan Sterilizasyonu ve Dikimi

Çalışma kapsamına soğanlarının *in vitro* dikimi amacıyla aşağıdaki sterilizasyon yöntemleri denenmiştir. Soğan dikimlerinde pensler herhangi bir kontaminasyon riskine karşı kullanımdan önce otoklavda 121°C’de steril edilmiştir.

#### 1. Yöntem

Lale soğanları bir miktar deterjanlı su ile yıkanıp musluk suya altında durulandıktan sonra %80’lik çamaşır suyunda karıştırıcıda 30 dakika muamelenin ardından %0,05 oranında fungusit (%37,5 Cyprodinil + %25 Fludioxonil etken madde) çözeltisinde 20 dakika karıştırıcıda sterilizasyona tabi tutulmuştur. Son olarak soğanlar steril su ile karıştırıcıda 3 kez 5’er dakika durulama işlemi yapılarak dikime hazır hale getirilip 10 kavanoz ve her kavanozda bir adet soğan olarak hormonsuz besi ortamına dikimler geçekleştirilmiştir.



## 2. Yöntem

Lale soğanları 10 dakika musluk suyunda bekletilip, % 70'lik EtOH'de karıştırıcıda 20 dakika, 3 damla Tween 20 bulunan %20'lik çamaşır suyu çözeltisinde 20 dakika karıştırıcıda ve içerisinde %0,3 oranında fungusit (% 50 Captan etken madde) bulunan çözelti içerisinde karıştırıcıda 20 dakika muamele edildikten sonra son olarak 4 kez 5'er dakika steril su ile karıştırıcıda durulama işlemi yapılmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen soğanlar 10 kavanoz ve her kavanozda bir adet soğan olacak şekilde hormonsuz besi ortamına dikimler gerçekleştirilmiştir.

## 3. Yöntem

Lale soğanları yaklaşık 1 saat musluk suyunda bekletilip, %70'lik EtOH'de 20 dakika, 3 damla Tween 20 bulunan %20'lik çamaşır suyu çözeltisinde karıştırıcıda 20 dakika ve %0,3 oranında fungusit (%50 Captan etken madde) bulunan çözelti içerisinde karıştırıcıda 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 yarım saat bekletildikten sonra her kavanozda bir adet soğan olacak şekilde hormonsuz besi ortamına dikimler gerçekleştirilmiştir.

## 4. Yöntem

Lale soğanları deterjanlı su ile yıkandıktan sonra musluk suyunda 3 saat bekletilerek sırasıyla %70'lik EtOH'de karıştırıcıda 20 dakika, birkaç damla Tween 20 bulunan %20'lik çamaşır suyunda karıştırıcıda 20 dakika ve %0,3 oranında fungusit (%50 Captan etken madde) bulunan çözelti içerisinde karıştırıcıda 20 dakika muamele edildikten sonra son olarak 4 kez 5'er dakika steril su ile karıştırıcıda durulama işlemi yapıldıktan sonra steril kurutma kağıtlarında bir süre bekletilip kurumaları sağlandıktan sonra her kavanozda bir adet soğan olacak şekilde hormonsuz besi ortamına dikimler gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca aynı yöntemler soğan ve sterilizasyon çözeltilerinin bulunduğu ağzı kapalı steril kavanozlar kullanılarak elde çalkalama yoluyla da uygulanmıştır.

Soğanlar *in vitro* ortama dikildikten sonra çimlenebilmesi için soğuklama ihtiyacından dolayı buzdolabında yaklaşık 4 hafta bekletilmiştir. Buzdolabında bekletildikten sonra iklimlendirme koşullarına (16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 24 °C sıcaklık) alınan soğanların bir kısmı daha ideal çimlenme sağlayacakları varsayılarak 20°C'de tutulmuştur.

*In vitro*' da yeterli eksplant elde edilemeyeceği anlaşıldığından soğanların toprakta çimlendirilip elde edilen lale yapraklarının steril hale getirilerek besi ortamına ekimi yoluna gidilmiş ve lale soğanlarının saksılara dikimleri de yapılmıştır.

### 3.3. Soğanların Dikimi ve Çimlenmesi

Lale soğanları *in vitro* ortamda her kavanozda birer adet olacak şekilde biyogüvenlik kabinde hormonsuz MS ortamına ve 1/1 oranında bahçe toprağı ve ticari saksı toprağı karışımı ihtiva eden saksılara dikilmiştir (Şekil 3.1). Saksılara dikim 5 Ekim 2020 - 21 Kasım 2020 ve 17 Ekim 2021 - 1 Ocak 2022 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Saksılara dikilen soğanlar fazla soğuk ve yağmurdan korumak için naylon örtü ile kapatılarak sera ortamı oluşturulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3. 1. Lale soğanlarının *in vitro* ortamda dikimi ve çimlenmesi



Şekil 3. 2. Lale soğanlarının toprağa dikimi ve çimlenmesi

### 3.4. *In vitro* Ortamdan Elde Edilen Yaprakların Alt Kültürü

*In vitro* ortama ekilen soğanlardan elde edilen yaprak eksplantları farklı oksin ve sitokinin hormonlarının bulunduğu ortamlara her petride 10 ar eksplant olacak şekilde alt kültürleri yapılmıştır (Şekil 3.3). Alt kültür işlemi için kullanılacak pens ve bistüriler olası kontaminasyon riskini önlemek amacıyla kullanımdan önce otoklavda 121°C’ de steril edilmiştir. Alt kültür yapılan petripler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık 24°C iklimlendirme koşullarında muhafaza edilmiştir. Ayrıca bazı petripler rejenerasyonu teşvik etmek amacıyla karanlık ortamda bekletilmiştir. Çalışmada her ortam için beş petri ve her petride 10’ar eksplant kültürü hedeflenmiş olup eksplant sayısı yeterli olmadığından dolayı kültür işleminde tekrür sayısı farklılık göstermiştir.

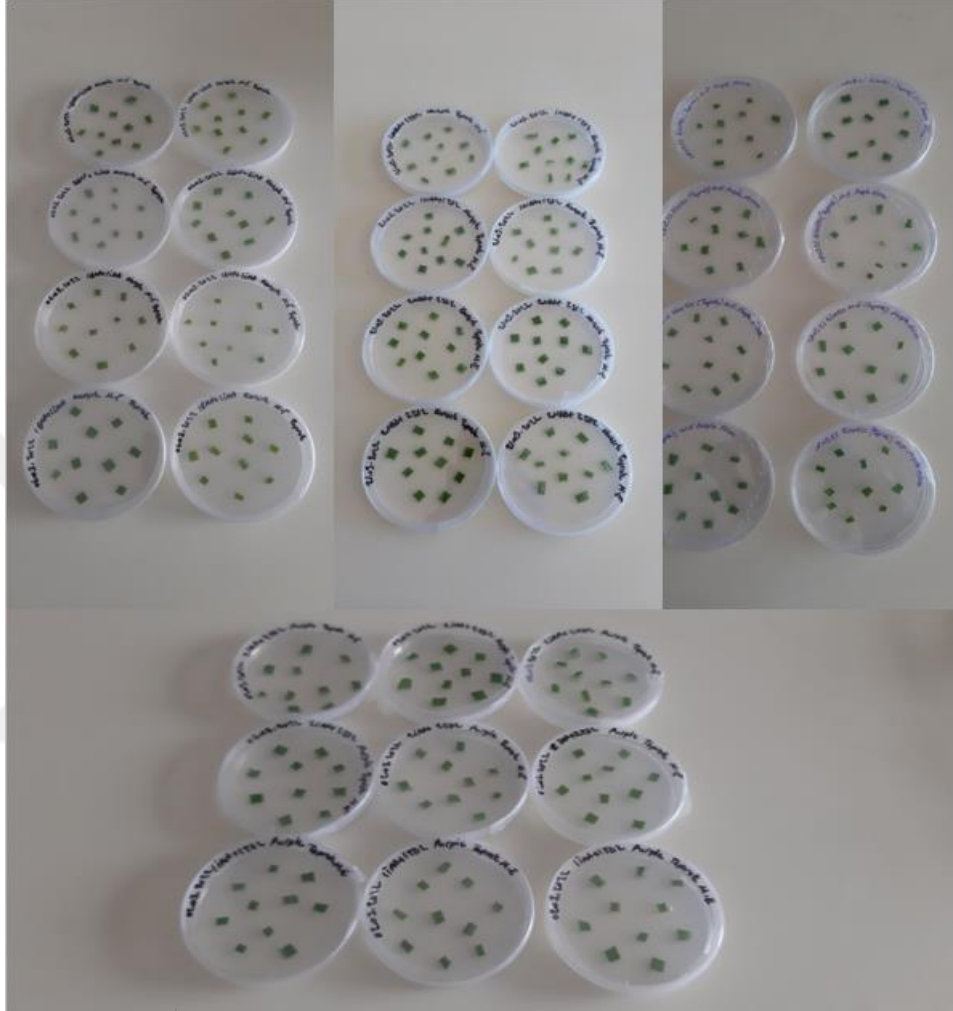


Şekil 3. 3. Lale *in vitro* yaprak eksplantlarının alt kültürleri

### 3.5. Toprakdan Elde Edilen Yaprakların Kültüre Alınması

Toprağa ekilen soğanlardan elde edilen yaprak eksplantları dış ortamdan alındıkları ve steril halde olmadıkları için kültüre alınmadan önce sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. %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 3 kez durulama işleminin ardından farklı oksin ve sitokinin hormonlarının bulunduğu ortamlara her petride 10’ar adet eksplant olacak şekilde kültürleri yapılmıştır (Şekil 3.4). Ayrıca yapraklar %0,3’lük fungusit (%50 Captan etken madde) çözeltisi kullanılarak da kültür işlemi yapılmıştır. Alt kültür yapılan petripler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık 24°C iklimlendirme koşullarında muhafaza edilmiştir. Ayrıca bazı

petriler rejenerasyon gelişimi için karanlık ortama alınıp gözlemlenmiştir. Çalışmada her ortam için beş petri ve her petride 10'ar adet eksplantın kültürü hedeflenmiş olup elde edilen yaprakların durumuna göre tekerrür sayısı farklılık göstermiştir.



**Şekil 3. 4.** Toprakta gelişen lale yapraklarından *in vitro* kültür

Kültüre alınan eksplantların gelişimleri düzenli olarak takip edilmiş olup, herhangi bir kontaminasyona rastlanması durumunda kurtarılabilecek eksplantlar aynı ortama aktararak kurtarılmıştır. Yine kallus oluşumu başlayan eksplantlar da 4-5 hafta boyunca haftada bir kez taze ortama aktararak kallus oluşumunun ve somatik embriyo gelişiminin hızlandırılması hedeflenmiştir.

### **3.6. Verilerin Analizi**

Çalışmadan elde edilen verilerin analizinde Microsoft Excel paket programından yararlanılmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. *In vitro* Ortamda Dikimi Yapılan Lale Soğanlarında Çimlenme

Mor Prens Lalesi ve karışık lale soğanlarının *in vitro* ortamda çimlenme yüzdeleri Çizelge 4.1.' de gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 1.** *In vitro* lale soğanlarının çimlenme oranları

Mor Prens Lalesi Soğanı		Karışık Lale Soğanı	
Toplam Ekim Sayısı (adet)	91	Toplam Ekim Sayısı (adet)	60
Toplam Çimlenme (adet)	5	Toplam Çimlenme Sayısı (adet)	1
Yüzde Çimlenme Oranı (%)	5,5	Yüzde Çimlenme Oranı (%)	2

Çizelge 4.1'in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi *in vitro* ortama toplam 91 adet Mor Prens Lalesi soğanı dikilmiş ve 5 tane soğanda çimlenme gözlemlenmiş olup çimlenme oranı %5.5 olarak tespit edilmiştir. Karışık lale soğanlarından ise 60 adet ekim yapılmış olup 1 tanesinde çimlenme gözlemlenmiş ve çimlenme oranı %2 olarak belirlenmiştir.

Yapılan bu kadar ekime 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 yumrulu bitkilerde sıklıkla karşılaşılan bir olgudur. Bazen çimlenme gerçekleştikten sonra dahi soğan/yumru içerisinden çıkan yeni sürgünlerde kontaminasyonlar ortaya çıkmakta ve bu sürgünlerin *in vitro* çalışmalarda kullanımı imkansız hale gelmektedir. Bu tez çalışmasında da benzer durumlarla sıklıkla karşılaşılmış olup *in vitro* kültürde çimlendirilen lale soğanlarından elde edilen ekplantlardan efektif bir alt kültür çalışması yürütülemediği görülmüştür.

### 4.2. Toprağa Dikimi Yapılan Lale Soğanlarında Çimlenme

Mor Prens Lalesi ve karışık lale soğanlarının toprağa yapılan ekimlerinde çimlenme yüzdeleri Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4. 2.** Toprağa dikilen lale soğanlarının çimlenme oranları

<b>Mor Prens Lalesi Soğanı</b>		<b>Karışık Lale Soğanı</b>	
Toplam Ekim Sayısı (adet)	43	Toplam Ekim Sayısı (adet)	35
Toplam Çimlenme (adet)	39	Toplam Çimlenme Sayısı (adet)	35
Yüzde Çimlenme Oranı (%)	91	Yüzde Çimlenme Oranı (%)	100

Çizelge 4.2'nin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi toprağa dikilen toplam 43 adet Mor Prens Lalesi soğanından 39 adet çimlenme tespit edilmiştir. Çimlenme oranı %91 olarak belirlenmiştir. Karışık soğanlardan ise 35 adet dikilmiş olup tamamı çimlenme göstererek çimlenmede %100 oranında başarı sağlanmıştır.

#### **4.3. *In Vitro* Ortamda Çimlendirilen Lale Soğanları Yapraklarında Alt Kültür Sonuçları**

*In vitro* ortamda çimlendirilen Mor Prens Lalesi soğanlarından yapılan alt kültürlerden elde edilen kallus oluşum oranları ve somatik embriyo oluşum oranları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

**Çizelge 4. 3.** Mor Prens Lalesi *in vitro* ortamdan gelişen kallus sayıları ve oranları

<b>Mor Prens <i>in vitro</i> kallus ve somatik embriyo</b>			
<b>Besiyeri (mg/l)</b>	<b>Eksplant Sayısı</b>	<b>Kallus Sayısı</b>	<b>%Kallus Oluşumu</b>
2,4-D (2 mg/l)	50	3	6
TDZ (2 mg/l)	50	0	0
KİNETİN (2 mg/l)	90	9	10
NAA (2 mg/l)	70	4	6
2,4-D+KİNETİN (1 mg/l + 1 mg/l)	30	0	0
2,4-D+KİNETİN (2 mg/l + 2 mg/l)	20	0	0
İAA+TDZ (1 mg/l + 1 mg/l)	30	0	0
İAA+TDZ (2 mg/l + 2 mg/l)	20	0	0
İAA+BAP (1mg/l + 1 mg/l)	30	0	0
İAA+BAP (2 mg/l + 2 mg/l)	20	0	0
NAA+KİNETİN (1 mg/l + 1 mg/l)	30	0	0
NAA+KİNETİN (2 mg/l + 2 mg/l)	20	0	0
NAA+TDZ (1 mg/l + 1 mg/l)	30	0	0
NAA+TDZ (2 mg/l + 2 mg/l)	20	0	0
2,4-D+TDZ (1 mg/l + 1 mg/l)	30	0	0
2,4-D+TDZ (2 mg/l + 2 mg/l)	20	0	0
<b>TOPLAM</b>	<b>560</b>	<b>16</b>	<b>22</b>

Çizelge 4.3'ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi *in vitro* ortamda çimlendirilen soğanlardan elde edilen yaprak eksplantlarından besi ortamı başına minimum 20 adet olmak üzere toplam 560 adet yaprak eksplantı kültüre alınmıştır. Elde edilen yaprakların alt kültürü neticesinde 2,4-D besi ortamında %6 kallus, Kinetin besi ortamında %10 kallus (Şekil 4.1), NAA besi ortamında %6 oranında kallus oluştururken TDZ ve oksin-sitokinin kombinasyonu olan ortamlarda kallus dahil olmak üzere herhangi bir rejenerasyon oluşumu gözlemlenmemiştir.

*In vitro* ortamda gelişerek kültüre alınan karışık lalelerin yapraklarının kültürlerine ilişkin veriler Çizelge 4.4'de verilmiştir.

**Çizelge 4. 4.** *In vitro* ortamda çimlendirilen karışık lale soğanından kültüre alınan yaprak eksplant sayıları

<b>Karışık <i>in vitro</i> eksplant sayısı</b>		
<b>Besiyeri</b>	<b>Eksplant Sayısı</b>	<b>Toplam Eksplant Sayısı</b>
2,4-D+KİNETİN (1 mg/lt + 1 mg/lt)	20	180
2,4-D+KİNETİN (2 mg/lt + 2 mg/lt)	10	
İAA+TDZ (1 mg/lt + 1 mg/lt)	20	
İAA+TDZ (2 mg/lt + 2 mg/lt)	10	
İAA+BAP (1 mg/lt + 1 mg/lt)	20	
İAA+BAP (2 mg/lt + 2 mg/lt)	10	
NAA+KİNETİN (1 mg/lt + 1 mg/lt)	20	
NAA+KİNETİN (2 mg/lt + 2 mg/lt)	10	
NAA+TDZ (1 mg/lt + 1 mg/lt)	20	
NAA+TDZ (2 mg/lt + 2 mg/lt)	10	
2,4-D+TDZ (1 mg/lt + 1 mg/lt)	20	
2,4-D+TDZ (2 mg/lt + 2 mg/lt)	10	

*In vitro* ortamda çimlendirilen karışık lale soğanlarından elde edilen yaprak eksplantlarından minimum 10 adet eksplant olmak üzere toplamda 180 adet yaprak eksplantı kültüre alınmış ancak bu eksplantlarda herhangi bir rejenerasyon tespit edilememiştir (Çizelge 4.4.).



Şekil 4. 1. Mor Prens Lalesi *in vitro* ortamdan gelişen kalluslar

#### 4.4. Toprağa Dikilerek Çimlendirilen Lale Soğanları Yapraklarında Alt Kültür Sonuçları

Toprakta gelişerek steril edilip kültüre alınan Mor Prens Lale'lerinin yapraklarının kültürlerine ilişkin veriler Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4. 5. Toprakta çimlendirilen Mor Prens Lalesi soğanından kültüre alınan yaprak eksplant sayıları

Mor Prens toprak eksplant sayısı		
Besiyeri	Eksplant Sayısı	Toplam Eksplant Sayısı
2,4-D (2 mg/l)	140	1920
TDZ (2 mg/l)	170	
KİNETİN (2 mg/l)	130	
NAA (2 mg/l)	130	
2,4-D+KİNETİN (1 mg/l)	120	
2,4-D+KİNETİN (2 mg/l)	110	
İAA+TDZ (1 mg/l + 1 mg/l)	110	
İAA+TDZ (2 mg/l + 2 mg/l)	130	
İAA+BAP (1 mg/l + 1 mg/l)	110	
İAA+BAP (2 mg/l 2 mg/l)	120	
NAA+KİNETİN (1 mg/l + 1 mg/l)	120	
NAA+KİNETİN (2 mg/l + 2 mg/l)	70	
NAA+TDZ (1 mg/l + 1 mg/l)	100	
NAA+TDZ (2 mg/l + 2 mg/l)	60	
2,4-D+TDZ (1 mg/l + 1 mg/l)	140	
2,4-D+TDZ (2 mg/l + 2 mg/l)	130	



Toprakta çimlendirilen Mor Prens Lalesi soğanlarından elde edilen yapraklardan besi ortamı başına minimum 60 adet yaprak eksplantı olmak üzere bütün ortamlarda kültürleme işlemi gerçekleştirilmiş ve toplamda 1920 adet yaprak eksplantı kültüre alınmış ancak bu eksplantlarda herhangi bir rejenerasyon tespit edilememiştir (Çizelge 4.5.).

Toprakta gelişerek steril edilip kültüre alınan karışık lalelerin yapraklarının kültürlerine ilişkin veriler Çizelge 4.6’da verilmiştir.

**Çizelge 4. 6.** Toprakta çimlendirilen karışık lale soğanından kültüre alınan yaprak eksplant sayıları

Karışık toprak eksplant sayısı		
Besiyeri	Eksplant Sayısı	Toplam Eksplant Sayısı
2,4-D+KİNETİN (1 mg/lit + 1 mg/lit)	140	1670
2,4-D+KİNETİN (2 mg/lit + 2 mg/lit)	140	
İAA+TDZ (1 mg/lit + 1 mg/lit)	180	
İAA+TDZ (2 mg/lit + 2 mg/lit)	160	
İAA+BAP (1 mg/lit + 1 mg/lit)	100	
İAA+BAP (2 mg/lit + 2 mg/lit)	140	
NAA+KİNETİN (1 mg/lit + 1 mg/lit)	140	
NAA+KİNETİN (2 mg/lit + 2 mg/lit)	100	
NAA+TDZ (1 mg/lit + 1 mg/lit)	160	
NAA+TDZ (2 mg/lit + 2 mg/lit)	160	
2,4-D+TDZ (1 mg/lit + 1 mg/lit)	140	
2,4-D+TDZ (2 mg/lit + 2 mg/lit)	110	

Toprakta çimlendirilen karışık lale soğanlarından elde edilen yapraklardan besi ortamı başına minimum 100 adet olmak üzere her bir besi ortamında kültür işlemi gerçekleştirilmiş; toplamda 1670 adet yaprak eksplantı kültüre alınmış ancak bu eksplantlarda herhangi bir rejenerasyon tespit edilememiştir (Çizelge 4.6.).

İn vitro ortamda başarı genotip, besi ortamının bileşimi, eksplant büyüklüğü, verici bitkilerin yetiştirme koşulları, sterilizasyon koşulları, kültürlerin geliştiği ortamdaki ışık, sıcaklık, nem gibi faktörler tarafından etkilenmektedir (Hatipoğlu, 2015). Mor Prens Lalesi soğanları ve karışık lale soğanlarından elde edilen yaprak eksplantlarının herhangi bir rejenerasyon gösterememesinin farklı nedenleri olabilir. Bunlar; *i*) kullanılan besi ortamlarının bileşimi, *ii*) soğanın içsel kaynaklı hastalık taşınmasından dolayı yaprak sterilizasyonunun yetersiz kalması sonucu bu eksplantlarda kontaminasyon oluşmasından, *iii*) her ne kadar eksplantlar genel itibari ile in vitro kültür için ideal büyüklükte kesilmeye

özen gösterilmiş olsa da eksplantların boyutunun lale yapraklarında in vitro kültür için ideal olmamasından, iv) yaprakların sterilizasyon aşamalarındaki sürelerin olması gerekenden fazla sürede gerçekleşmesi ve sterilizasyonda kullanılan maddelerin yaprak eksplantının canlılığına zarar vermesinden veya sterilizasyonun tam olarak sağlanamamasından, v) yaprak eksplantlarının madde salgılayıp besi ortamında allelopatik etki oluşturmasından ve vi) diğer kültür koşulları ve çevresel faktörlerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Mor Prens Lalesi ana materyal olmak üzere lale soğanlarının çimlendirilmesi ile elde edilen yaprakların kültürü ile *in vitro* rejenerasyon ve somatik embriyo oluşumu amaçlanmış olup bu yolla sentetik tohum üretim imkanları araştırılmıştır.

Çalışmada *in vitro* ortama ekilen soğanlarda yeterli ölçüde sterilizasyon sağlanamaması ve soğanların iç yüzeylerinde ortaya çıkan kontaminasyonlar nedeni ile toprakta çimlendirilen soğanlardan elde edilen yaprakların *in vitro* kültürleri denenmiştir. Toprağa ekilen karışık lale soğanları Mor Prens Lalesi soğanlarına göre %100 çimlenme göstererek daha fazla sayıda eksplant kaynağı oluşturmuştur.

Lale soğanlarının sterilizasyonunu sağlayabilmek amacıyla farklı sterilizasyon denemeleri yapılarak bu sıkıntının önüne geçilebilir. Ancak burada lale soğanlarının iç yüzeylerinin de etkin bir şekilde sterilize edilmesi önem arz etmektedir. 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, sitokin 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/lt), Kinetin (2 mg/lt) ve NAA (2 mg/lt) 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/lt) 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-sitokin hormonlarının ayrı ayrı veya karışımlarının denenmesi hem *in vitro* rejenerasyon hem de somatik embriyo oluşumu açısından yararlı olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Algül, B.E., Tekintaş, F.E., Dalkılıç, G.G. (2016). Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Kullanımı ve İçsel Hormonların Biosentezini Arttırıcı Uygulamalar. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 13(2), 87-95.
- Anonim, 2022a. <https://ziraatyapmablogspot.com> (Erişim Tarihi: 20.06.2022)
- Anonim, 2020b. <https://www.cokilginbilgiler.com/?Syf=26&Syz=554271> (Erişim Tarihi: 20.06.2022)
- Anonim, 2022c. <http://aoc.gov.tr> (Erişim Tarihi: 20.06.2022)
- Anonim, 2022d. <https://isvespeyzaj.com/lale.html> (Erişim Tarihi:20.06.2022)
- Ara, H., Jaiswal, U., Jaiswal, V. S. (2000). Synthetic seed: Prospects and limitations. *Current Science*, 78(12), 1438-1444.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Konya Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Benschop, M., Kamenetsky, R., Nard, M.L., Okubo, H., De Hertogh, A. (2010). *The Global flower bulb industry: production, utilization, research*. J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews* (pp.1-115). Hoboken, New Jersey: Wiley Publishers.
- Botschantzeva, Z. (1982). *Tulips: taxonomy, morphology, cytology and physiology*. Rotterdam.
- Bozcuk, S., Topçuoğlu, Ş.F. (1982). Değişik Stres Koşullarında Bitkilerde Absisik Asit (ABA) Miktarının Değişimi ve Strese Adaptasyon Mekanizması. *Doğa Bilim Dergisi*, 6(3),157-167.
- Çetin, V. (2002). Meyve ve Sebzelerde Kullanılan Bitki Gelişmeyi Düzenleyiciler. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (2), 40-50.
- Çölgeçen, H., Toker, M. C. (2006). Sentetik Tohum. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(2), 323-336.
- De Jong, A. J., Schmidt, E. D. L., de Vries, S. C. (1993). Early events in higher- plant embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 22, 367-377.
- Erdem, M., Uysal, H. (2021). Sentetik Tohum. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 2(2), 68-74.

- Germena, M.A., Lambardi, M. (2016). *In vitro embriyogenesis in higher plants*. Humana New York, NY.
- Güleryüz, M. (1982). *Bahçe ziraatinde büyütücü ve engelleyici maddelerin kullanılması ve önemi*. Atatürk Üniversitesi Yayınları.
- Grunewald, W., Noorden, G.V., Isterdael, G.V., Beeckman, T., Gheysen, G., Mathesius, U., (2009). Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *The Plant Cell*, 21, 2553–256.
- Gürdal, S. (2017) *Farklı uygulamaların bazı lale (Tulipa gesneriana L.) çeşitlerinde soğan sayısı ve gelişimine etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Halloran, N., Kasım, M.U. (2002). Meyve ve Sebzelerde Büyüme Düzenleyici Madde Kullanımı ve Kalıntı Düzeyleri. *GIDA*. 27(5), 351-359.
- Hatipoğlu, R. (2015). *Bitki biyoteknolojisi* (Yayın No: 176). Adana: Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü.
- Hernández Bermejo, J.E., García Sánchez, (2009). E. Tulips: An Ornamental Crop in the Andalusian Middle Ages. *Econ Bot*, 63, 60–66. <https://doi.org/10.1007/s12231-008-9070-3>
- Hosier, M. (2011). Tulip bulbs: the inside story. <http://www.learner.org/jnorth/>. (Erişim Tarihi: 20.06.2022)
- İbrahim, M., Draaj I.A. (2020). Effect of different concentrations of BA on the shoot multiplication of tulip (*Tulipa gesneriana* L. cv. Arma) buds by *in vitro* culture. *Applied Science Dysona*, 1(3), 96-100.
- İpekci, K. Z. (2002). *Paulownia elongata'nın doku kültürü sistemlerinin optimizasyonu ve sentetik tohum üretimi* Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Jalali, N., Naderi, R., Shahi-Gharahlar, A., Teixeira da Silva, J. A. (2012). Tissue culture of *Cyclamen spp.* *Scientia Horticulturae*, 137, 11-19.
- Kaynak, L., Ersoy, N. (1997). Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10, 223-236.

- Khor, E., Loh, C. S. (2005). Artificial seeds. V. Nedovic, R. Willaert (Eds). *Applications of Cell Immobilization Biotechnology* (pp. 527-537). Springer, Netherlands.
- Kitto, S. K., Janic, J. (1982). Polyox as an artificial seed coat for a sexual embryos. *Horticultural Science*, 17, 488.
- Koçak, M., İzgü, T., Sevindik, B., Tütüncü, M., Çürük, P., Şimsek, O., Kaçar, Y. A., Teixeira da Silva, J. A., Yalçın Mendi, Y. (2014). Somatic embryogenesis of Turkish *Cyclamen persicum* Mill.. *Scientia Horticulturae*, 172, 26-33.
- Koçak, M., (2019). *Cyclamen coum*'da somatik embriyogenesis yöntemi ile rejenerasyonun araştırılması Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kumlay, A.M., Eryiğit, T. (2011). Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(2): 47-56.
- Kurt, O. (2015). *Bitki ıslahı*. Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Le Nard, M., De Hertogh, A.A. (1993a). Tulipa. A. A. De Hertogh ,M. Le Nard (Eds.), *The Physiology of Flower Bulbs* (pp 617-682). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Le Nard, M., De Hertogh, A.A. (1993b). Bulb growth and development and flowering. A. A. De Hertogh , M. Le Nard (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.
- Magray, M.M., Wani, K. P., Chatto, M. A., Ummyiah, H. M. (2017). Synthetic Seed Technology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 662-674.
- Malta, S. (2016) *Farklı yetiştirme ortamları, lokasyon ve gölge uygulamalarının lale (Tulipa gesneriana L.) 'de bitki gelişimi ve kalite özelliklerine etkisi* Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Merkle, S.A., Parrot, W.A., Flinn, B.S. (1995). Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. T.A. Thorpe (Ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants* (pp. 155-203). Springer Dordrecht.

- Mohammed, K. T., Javed, M. A., Huyop, F., Kaya, Y. (2021). Plant tissue culture of *Nicotiana tabacum* cv. TAPM 26 and its minimum inhibition against herbicide-Dalapon. *MANAS. Journal of Engineering*, 9(1), 35- 42.
- Monnier, M. (1990). Induction of embriyogenezis in callus culture. J. W. Pollard, J. M. Walker (Eds.), *Plant Cell and Tissue Culture* (pp. 141-148). Humana Press, New Jersey.
- Morsünbül, T., Solmaz, S.K.A., Üstün, G.E., Yonar, T. (2010). Bitki Gelişim Düzenleyici (BGD)'lerin Çevresel Etkileri ve Çözüm Önerileri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 15(1), 1-11.
- Mu, H., Fan, L., Zhu, S., Sun, T. (2020). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on root growth and architecture of Tulip *Gesneriana*. *Land Science*, 2,60-66.
- Murashige, T. (1978). The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. T. A. Thorpe (Ed), *Frontiers of Plant Tissue Culture* (pp. 15-26). University of Calgary, Alberta, Canada.
- 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.
- Öktüren F., Sönmez S. (2005). Bitki Besin Maddeleriyle Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicileri (Hormonlar) Arasındaki İlişkiler. *Derim*, 22(2), 20-32.
- Özcan, S., Babaoğlu, M., Sancak, C. (2001). Somatik embriyogenezis. M . Babaoglu, E. Gürel., S. Özcan (Eds.), *Bitki Biyoteknolojisi* (pp.71- 88). Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Özen, H.Ç., Onay, A.(1999). *Bitki Büyüme ve Gelişme Fizyolojisi*. Diyarbakır.
- Parrot, W. A., Merkle, S. A., Williams, E. G. (1991). Somatic embryogenesis: Potential for usein propagation and gene transfer systems. D. R. Muray (Ed.), *Advanced Methods in Plant Breeding and Bitechology* (pp. 158-200). Ist ed, CAB International Press UK.
- Podwyszyńska, M., Ciolakowska, A.M. (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 stem cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, 35-39.
- Rai, M.K., Jaiswal, V.S. (2008). Synthetic seeds of guava (*Psidium guajava* L) from somatic embryos and plant regeneration, I.D. Arya, Arya, Sarita, (Eds.), *Utilization of biotechnology in plant sciences* (pp. 217-225). Dehradun.
- Ravi, D., Anand, P. (2012). Production and Applications of Artificial Seeds: A Review. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(5), 74-78.
- Rihan, H. Z., Kareem, F., El-Mahrouk, M. E., Fuller, M. P. (2017). Artificial Seeds (Principle, Aspects and Applications). *Agronomy*, 7(4), 71.
- Saiprasad, G. V. S. (2001). Artificial seeds and their applications. *Resonance*, 6, 39-47.
- Singh, D., Pal, S., Sinha, A. (2020). Artificial seed/synthetic seed production–brief procedure–advantages and limitations. *Biotica Research Today*, 2(6), 422-424.
- Soneji, J. R., Rao, P. S., Mhatre, M. (2002). Germination of Synthetic Seeds of Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Cell Reports*, 20, 891-894.
- Sonyol, Ş.C. (2012). *Lale soğanlarında uygulanacak soğuklatma işlemleri ve farklı dikim zamanlarının soğanların büyümesi ve çiçeklenmesi üzerine etkileri* Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Sökmen, A., Gürel, E. (2001). Sekonder metabolit üretimi. M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan (Eds), *Bitki Biyoteknolojisi I., Doku Kültürü ve Uygulamaları* (pp. 211-261). Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Swamy, M. K., Balasubramanya, S., Anuradha, M. (2009). Germplasm conservation of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) by encapsulation of *in vitro* derived nodal segments. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 1(8), 224-230.
- Sun, Q., Zhang, B., Yang, C., Wang, W., Xiang, L., Wang, Y., Chan, Z. (2022). Jasmonic acid biosynthetic genes *TgLOX4* and *TgLOX5* are involved in daughter bulb development in tulip (*Tulipa gesneriana*). *Horticulture Research*, 9, 1-13.



- Takamura, T., Miyajima, I., Matsuo, E. (1995). Somatic Embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. “Anneke” from aseptic seedlings. *Plant Cell Reports*, 15, 22-25.
- Tekin, H. I. (2015). *Bitki doku kültürü. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.*  
<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/alata/Belgeler/Digerbelgeler/DokuK%C3%BClt%C3%BCr%C3%BCH.%C4%B0>. (Erişim Tarihi:20.06.2022)
- Temiz, M.G. (2019). *Nar (Punica granatum)’da farklı büyüme düzenleyicilerinin ve farklı eksplant kaynaklarının somatik embriyogenesis üzerine etkileri* Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tisserat, B. (1985). Embryogenesis, organogenesis, and plant regeneration. R. A. Dixon (Ed.) *Plant Cell Culture: A Practical Approach* (pp. 79- 106). Information Retrieval Limited Press. Oxford, England.
- TÜİK, (2021). <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim Tarihi:20.06.2022)
- Uysal, H., Seyis, F., Kurt, O. (2007). Tarla bitkilerinde melezleme bariyerlerinin aşılmasında alternatif bir yöntem: embriyo kültürü. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(1), 116-122.
- Ünsal, P. N., 1993. *Bitki büyüme maddeleri*. İstanbul Teknik Üniversitesi. Üni. Yayın No: 3677. Enst. Yay. No:4. ISBN 975-404254-3
- Van Tuyl, J.M., Van Creji, M.G.M. (2006). *Tulipa gesneriana* and *T. hybrids*. N.O. Anderson (Ed.), *Flower Breeding and Genetics* (pp. 623–641). Springer, Netherlands.
- Zonneveld, Ben J.M. (2009). The systematic value of nuclear genome size for “all” species of *Tulipa* L. (*Liliaceae*). M.Koch, M.A. Lysak, K.Marhold (Eds), *Plant Systematics and Evolution*, (pp. 217-245). Springer.

**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“MOR PRENS LALESİ YAPRAK EKSPANTLARININ İN VİTRO REJENERASYON YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Meltem ERDEM

... / ... / ...

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : ERDEM, Meltem  
**Doğum Tarihi** : ██████████  
**Doğum Yeri** : ██████████  
**E posta** : ██████████

## EĞİTİM

**Lise** : Menemen Halide Gencer Anadolu Ticaret Meslek Lisesi (2013)  
**Lisans** : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi (2018)  
**Yüksek Lisans** : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

## AKADEMİK YAYINLAR

## MAKALELER

Erdem, M., Uysal, H. (2021). Sentetik Tohum. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 2(2), 68-74.

## **BİLDİRİLER**

### **A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler**

1. Uysal Hüseyin, Erdem Meltem (2018). Ak zambak (*Lilium candidum*) Tohumlarının Farklı Besi Ortamlarında Çimlenme ve Gelişme Performanslarının Belirlenmesi lisans bitirme tez çalışması. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)
2. Erdem Meltem, Uysal Hüseyin (2019). Akzambak (*Lilium candidum*) Tohumlarından Elde Edilen Eksplantların Farklı Konsantrasyonlardaki Besi Ortamlarında Gelişme Performanslarının Araştırılması. 1st International Young Researchers Student Congress, 1(1), 585-593. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

### **BELGELER**

1. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Menemen Halide Gencer Anadolu Ticaret Meslek Lisesi Bilişim Teknolojisi Alanı, Web Programcılığı Dalı İş Yeri Açma Belgesi (19.02.2014)
2. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü “Bitki Doku Kültürü ve Islahında Kullanılan Güncel Uygulamalar” Eğitim Seminerine Katılım Belgesi (24-28 Temmuz 2017)
3. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi Katılım Belgesi (26-27-28 Ekim 2018)
4. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Menemen Halk Eğitim Merkezi İlk Yardım Kursu Kurs Bitirme Belgesi (26-28 Ağustos 2019)
5. 1st International Young Researchers Student Congress Katılım Belgesi (28-30 Kasım 2019)
6. B Sınıfı Ehliyet (28.08.2018)