

In vitro Bulblet Production of Muş Tulip (*Tulipa sintensisii* Baker)

Muş Lalesi'nin (*Tulipa sintensisii* Baker) in vitro Ortamda Soğancık Üretimi

Mehmet SEZGİN^{1,*}, Ahmet YENİKALAYCI², Mehmet ARSLAN³, Seyma ÖNLÜ⁴, Mustafa KAHYA⁵, Gülşen AKÇA⁶, Nazlı A. YALINKILIÇ⁷, Ayşe Nida KURT⁸, Özlem ÖZCAN⁹

¹Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 18100, Çankırı, Türkiye

^{2,7,8}Muş Alparslan Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü, 49100, Muş, Türkiye

³Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye

⁴Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 49100, Muş, Türkiye

⁵Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 18100, Çankırı, Türkiye

⁶Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 49100, Muş, Türkiye

⁹Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım Ekonomisi Bölümü, 59030, Tekirdağ, Türkiye

Eser Bilgisi / Article Info

Araştırma makalesi / Research article

Geliş tarihi / Received

05.12.2022

Kabul tarihi / Accepted

20.12.2022

Yayın tarihi / Published

31.12.2022

Anahtar kelimeler

In-vitro, Muş Lalesi, Organogenesis, Soğancık üretimi, Tulipa sintensisii

Keywords

In-vitro, Muş Tulip, Organogenesis, Bulblet, Tulipa sintensisii Baker

Abstract

The study aimed to reproduce the Muş tulip (*Tulipa sintensisii* Baker), which is endemic to Anatolia, by tissue culture, which is an important biotechnological method that provides intensive, rapid, and clonal reproduction. The pistil organs of the fully flowered plants were used as an explant source. For this purpose, the combined doses of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzylaminopurine (0.5, 1, 2, and 4 mg/L) were added to the Murashige and Skoog basal medium. After the initial stage, 2 subculture stages were applied at 4-week intervals. It was incubated for 4 weeks in a growth chamber with a temperature of 4 ± 1 °C and dark conditions in order to meet the cooling needs of the Mus tulip. After the cooling stage, the explants were transferred to 25 ± 1 °C temperature and 16 hours of light and 8 hours of dark conditions for incubation. At the end of the 10th week following this situation, it was observed that it was covered with dense fungal formations thought to be endogenously originated. After 8 weeks, 26,7-93,3 % of bulblet formation was observed in the culture dishes. The results obtained in the study will be useful in removing the production barriers to the commercial reproduction of the Mus tulip and in the development of in vitro propagation techniques.

Özet

Çalışmada, Anadolu'da endemik olan Muş lalesi (*Tulipa sintensisii* Baker)'nin yoğun, hızlı ve klonal bir çoğaltım imkânı sağlayan ve önemli bir biyoteknolojik yöntem olan doku kültürü ile çoğaltılması hedeflenmiştir. Eksplant kaynağı olarak tam çiçeklenmiş bitkilerin pistil organları kullanılmıştır. Bu amaçla Murashige ve Skoog temel besin ortamına 2,4-Diklorofenoksiasetikasit ve 6-benzylaminopürin'in (0.5, 1, 2 ve 4 mg/L) dozları kombine edilerek ilave edilmiştir. Başlangıç aşamasından sonra 4'er hafta aralıkla 2 alt kültür aşaması uygulanmıştır. Muş lalesinin soğuklama ihtiyacının karşılanması amacıyla 4 ± 1 °C sıcaklık ve karanlık koşullara sahip iklim kabininde 4 hafta süreyle inkübe edilmiştir. Soğuklama aşamasından sonra eksplantlar inkübasyon amacıyla 25 ± 1 °C sıcaklık ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullara aktarılmıştır. Bu durumu takiben 10. hafta sonunda endojenik olarak kaynaklandığı düşünülen yoğun fungus oluşumları ile kaplı olduğu görülmüştür. 8 hafta sonra kültür kaplarında %26.7-93.3 oranlarda soğancık oluşumu gözlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, Muş lalesinin ticari çoğaltımının önündeki üretim engellerinin kaldırılmasında ve in vitro çoğaltım tekniklerinin geliştirilmesinde faydalı olacaktır.

* Sorumlu yazar / Corresponding author: Mehmet SEZGİN, sezgin@karatekin.edu.tr

© 2022 Karatekin University Journal of Science. All rights reserved.

1 GİRİŞ

Muş lalesi (*Tulipa sintenisii* Baker) Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Korunma Birliği'nin (International Union for Conservation of Nature (IUCN)), Tehlike Altındaki Bitkiler Komitesi Sekreterliği'nin (Threatened Plant Committee (TPC)), Dünya Doğayı Koruma Vakfı (World Wildlife Foundation (WWF)) gibi kuruluşların yanı sıra ülkemizde de Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından kırmızı liste kategorisine göre az tehdit altında (LR, Lower Risk) ve koruma önlemi gerektiren (CD, Conservation Dependent) önemli bir bitki türüdür (Ekim ve ark., 2000).

Ülkemizde, doğal olarak yetişen 15 lale (*Tulipa* spp.) türü bulunmaktadır. Dünyada sadece Anadolu'ya endemik olan Muş lalesi, Muş ili dışında Erzurum, Ağrı, Kahramanmaraş, Gaziantep, Siirt ve Hakkâri'de yetişmektedir. Ancak en büyük popülasyon alanları Muş ve Bulanık ovalarıdır. Muş ovasında bahar mevsimi başlangıcı Nisan ayı sonu ile Mayıs ayı başlarında topraktan çıkarak çiçeklenmektedir. Ancak bu çiçeklerin 15-20 gün süren kısa bir ömrü vardır. Doğal yaşam ortamı genellikle tarlalar ve çayırlıklardır. Muş lalesi, doğal görünüşüyle kültür lalelerinden çok daha gösterişlidir (Koyuncu ve Tekin, 2003) (Şekil 1).



Şekil 1. Doğal yayılış alanında Muş lalesi

Büyük, çekici ve gösterişli çiçeklere sahip olan Muş lalesinde bitki boyu 23-45 cm civarında olduğundan

kesme çiçek olarak yetiştirmeye uygundur. Soğanları kış soğuklarına karşı oldukça dayanıklıdır. Klasik çoğaltım yöntemleri kullanarak tohum çimlenmesi ile lale soğanı elde etmek ve çiçekli haline ulaşmak için en az dört yıl geçmesi gerekir. Kış mevsiminde kar altında kalan toprağın 50-60 cm derininde geçiren lale soğanlarının her birinden tek bir çiçek oluşmaktadır.

Çeşit geliştirmeye yönelik olarak klasik ıslah yöntemlerinin (melezleme vb.) uygulanması, soğanlı süs bitkilerinde tohumdan soğan oluşumu çiçeklenmeye kadar geçen sürenin (4-6 yıl) uzun olması nedeniyle pek tercih edilmemektedir (İlav, 2018). Soğanlı bitkilerde tohumla çoğaltmada elde edilen bireylerin heterozigot yapıya sahip olmaları, tohumdan meydana gelecek soğanların çiçek verecek büyüklüğe ulaşması için uzun zaman (3-6 yıl) gerektirmesi ve tohumlarda dormansi görülmesi nedeniyle soğanlı bitkilerde vejetatif üretim yöntemleri tercih edilmektedir (Alp, 2006). Muş lalesinin soğandan üretiminde genelde her ana soğandan 1 yavru soğan vermesi ve kardeş soğan verme özelliğinin çok düşük olması nedeni ile diğer lale türlerine göre çoğaltılması zordur.

Bu araştırmada; Muş lalesi (*T. sintenisii*)'in yoğun, hızlı ve klonal bir çoğaltım imkânı sağlayan ve önemli bir biyoteknolojik yöntem olan doku kültürü ile çoğaltılması hedeflenmiştir. Çiçek yapısında bulunan, pistilin eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada *in vitro* şartlarda soğancık üretimi ve elde edilen bitkilerin aklimitizasyonuna yönelik bir protokol geliştirmeye çalışılmıştır.

2 MATERYAL VE METOT

2.1 Bitki Materyali Temini

Çalışmada kullanılan Muş lalesi (*T. sintenisii*) 2021 yılı Nisan ve Mayıs ayları içerisinde tam çiçeklenmiş bitkilerdir. Bitki örnekleri Muş Alparslan Tarım İşletmesinin $38^{\circ}47'39"N - 41^{\circ}30'13"E$ koordinatlarında ve 1350

metre rakımda bulunan tarım yapılmayan arazisinde, doğadaki popülasyon bütünlüğüne zarar vermeden toplanmıştır. Bitkiler, Alparslan Tarım işletmesine ait Biyoteknoloji laboratuvarına getirilerek sterilizasyon aşamasına geçilmiştir.

2.2 Sterilizasyon

Muş lalesinin pistil organı, bistürü yardımı ile çiçekten ayrılarak bir magenta kabına alınmıştır. Eksplantlar öncelikle akan su altında 20 dk boyunca yıkanmış, ardından 5 dk Tween 20 damlatılmış 60'lık Ticari NaOCl (Cl oranı %5) içinde 10 dk. çalkalanarak steril edilmiştir. Ardından bitki dokularından NaOCl'nin uzaklaştırılması amacıyla 3 defa 5'er dk. boyunca steril saf su ile çalkalanmıştır (Kalyoncu, 2007).

2.3 Kültür şartları

Muş lalesi (*T. sintenisii*)'nin pistil organlarının organogenesis yöntemi ile çoğaltılmak amacıyla *in vitro* ortamda kültüre alınmıştır. Bu amaçla; Murashige and Skoog (MS-macro and micro elements including vitamins, Duchefa®) (Murashige and Skoog, 1969) temel besin ortamı olarak kullanılmıştır. MS besin ortamına katılaştırıcı olarak gelrite (2.1 g /L-Duchefa®) eklenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinden 2,4-Diklorofenoksiasetikasit'in (2,4-D- Duchefa®) ve 6-benzilaminopürin'in (BAP-Duchefa®) (0.5, 1, 2 ve 4 mg /L) dozları kombine edilerek temel besin ortamına ilave edilmiştir. MS içerisine 60 g/L sakkaroz eklenerek ortamın pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır. Eksplantların dikiminden sonra oluşabilecek olası bir kontaminasyonu önlemek amacı ile hazırlanan besin ortamına Plant Preservative Mixture (PPM-Duchefa®) 1 ml/L kullanılmıştır (Yenikalaycı ve ark., 2021).

Besin ortamlarının sterilizasyonu dijital kontrollü otoklav ile 121°C ve 1.2 atm. basınç altında 20 dk. süreyle yapılmıştır. Otoklavdan çıkarılan besin ortamları laminar hava akışlı kabin içerisinde katılaşmasından

hemen önce steril petri kaplarına (90 x 17 mm) 40'ar ml. olarak dağıtılmıştır. Her petride 5'er adet eksplant olacak şekilde tüm kombinasyonlar 3'er tekrar halinde hazırlanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Muş lalesinin pistil organının kültüre alınması

Hazırlanan tüm kültürler soğuklama ihtiyacını karşılamak ve kallus oluşumunu teşvik etmek amacıyla $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve karanlık koşullara sahip iklim kabininde 4 hafta süreyle inkübe edilmiştir. Başlangıç aşamasından sonra eksplantlar, yine aynı kombinasyonları içeren ortamlarda 4 hafta sonra alt kültüre alınmıştır. Bu sayede taze ortamdan yararlanmaları sağlanmıştır. Denemeler gelişimleri için her gün kontrol edilmiştir.

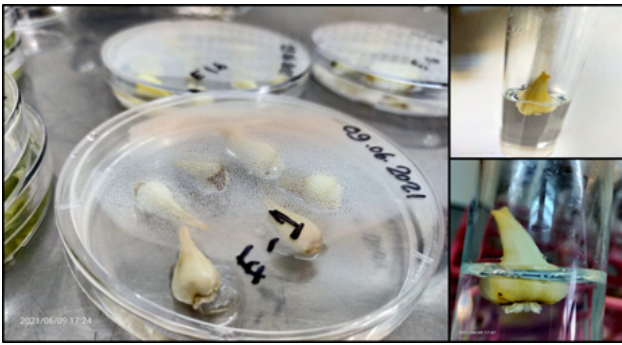
2.4 İstatistik Analiz

Çalışma "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"ne göre kurulmuştur. Bitkinin eksplant olarak kullanılan pistil organları 2,4-Diklorofenoksi asetikasit (2,4-D) ve 6-Benzilaminopürin (BAP)'nin 4 farklı dozunun 17 farklı kombinasyonu kullanılarak 3 tekerrürlü olarak 51 adet kültür kabı içerisinde iklim kabininde inkübe edilmiştir. Araştırmanın istatistik analizleri SPSS 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences) istatistik paket programı ile yapılmıştır. Denemede 8. haftanın sonunda elde edilen soğancık oluşumuna dair verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogrov Simirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile varyansların homojenliği Levene testi ile test edilmiştir. Soğancık sayıları 17 farklı

bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu arasındaki farklılık tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) ile test edilmiştir. Aralarında anlamlı farklılık bulunan kombinasyon ortalamalarının sınıflandırılması Duncan çoklu karşılaştırma testi (Duncan multiple comparison test) ile yapılmıştır ($\alpha = 0.05$ olarak alınmıştır).

3 BULGULAR VE TARTIŞMA

Muş lalesi (*T.sintensis*)'nin pistil organlarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada büyüme düzenleyici maddelerin farklı dozlarının kombine edilerek eklendiği MS besin ortamında kültüre alınmıştır. İnkübe sonrası 8 hafta sonra kültür kaplarında %26.7-93.3 oranlarda soğancık oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Soğancık oluşumu

Kültür kaplarındaki soğancıkların sayımı ile elde edilen verilerin analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (Tablo 1).

Soğancık oluşumu bakımından en yüksek orana 8, 13 ve 17 no'lu kombinasyonlarında, en düşük soğancık oluşum oranına ise 16 no'lu kombinasyonda elde edilmiştir. 8, 13 ve 17 no'lu ve bu kombinasyonları takip eden 9 no'lu kombinasyonda sitokin grubu olan BAP'ın yüksek olduğu ortamlarda meydana geldiği istatistiksel olarak anlaşılmıştır. Bu durum sitokinlerin diğer BDD ile birlikte bulunduğu ortamlarda eksplantların; hücre bölünmesinin ve proliferasyonun indüklenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Mi-

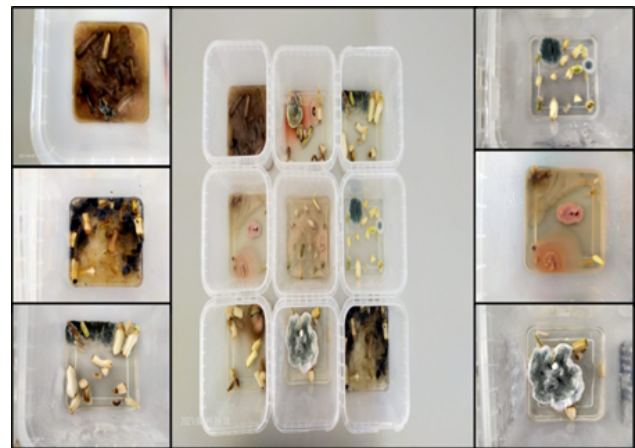
ransari ve Smith 2014; Sezgin ve Dumanoglu, 2014; Sezgin ve Kahya, 2021) (Tablo 1).

Tablo 1. Muş lalesinin (*Tulipa sintensis* BAKER) soğancık oluşumuna büyüme düzenleyici madde (BDM) kombinasyonlarının etkileri ($P < 0.05$).

K.NO	BDM Kombinasyonları (mg/L)		Soğancık Oluşum Yüzdesi (%)	Ortalama± Standart Sapma
	2,4-D	BA		
1	0	0	46.7	2.60±0.34 bcd*
2	0.5	0.5	40.0	2.13±1.02 cde
3	0.5	1	60	3.13±0.80 bc
4	0.5	2	53.3	2.67±0.57 bcd
5	0.5	4	33.3	1.67±0.57 de
6	1	0.5	33.3	1.67±0.57 de
7	1	1	53.3	2.80±0.34 bc
8	1	2	93.3	4.67±0.57 a
9	1	4	73.3	3.67±0.57 ab
10	2	0.5	46.7	2.60±0.34 bcd
11	2	1	46.7	2.33±0.57 cde
12	2	2	46.7	2.60±0.34 bcd
13	2	4	93.3	4.67±0.57 a
14	4	0.5	53.3	2.80±0.34 bc
15	4	1	33.3	1.67±0.57 de
16	4	2	26.7	1.33±0.57 e
17	4	4	93.3	4.67±0.57 a

*Harflendirmeler uygulamalar arasındaki farklılıkları göstermektedir.

Başlangıç aşamasından itibaren geçen 8. haftanın sonunda elde edilen soğancıkların buldukları iklim kabini içerisindeki karanlık ortam ve $4\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık şartları, $25\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 8 saat karanlık olarak değiştirilmiştir. Bu durumu takiben 10'uncu hafta sonunda soğancıkların gövdeleri endojenik olarak kaynaklandığı düşünülen yoğun fungus oluşumları ile kaplı olduğu görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. Soğancıklarda fungus oluşumu

Soğancıkların tümünün kurtarılamayacağı düşünüerek çalışmaya son verilmiştir. Çalışmada elde edilen soğancıkların oluşum süresi ve miktarı bakımından dikkate değer olduğu istatistiksel olarak anlaşılmıştır.

In vitro şartlardaki fungus hastalıkları bakımından Kalyoncu (2007) yılında yaptıkları çalışmada *Tulipa karamanica*, *Tulipa sintenisii*, *Tulipa humulis* ve *Tulipa armena*'nin soğan, tohum, olgunlaşmamış embriyo, çiçek ve yapraklarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Geofit olan Muş lalesi (*T. sintenisii*) soğanlarının doğal ortamında toprağın 50-60 cm altında bulunması nedeniyle soğanlarında toprak ve endojenik kaynaklı fungus bulunmaktadır (Ergün ve Tosun, 2015). Kış aylarında toprak altında düşük sıcaklıkta gelişimini sürdürmekte olan soğanlar, bahar aylarında havanın ısınması ile birlikte vejetatif gelişimi hızlanmakta ve generatif gelişimi aşamasına geçerek çiçeklenmektedir. Bu süreç hava ve toprak sıcaklığı paralelinde toprakta düşük hava sıcaklıkları nedeniyle spor halinde bulunan fungus ile mücadele edebilecek sekonder metabolitleri üretmesine ve hastalıkları kontrol altında tutmasına yardımcı olabilecek biyolojik süreçlerde ilerlediği düşünülmüştür.

In vitro şartlardaki bitki soğanlarının bulunduğu topraktaki fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişimlerin sekonder metabolit üretimin kesintiye uğratması ve bitkinin gelişimi için ortamda bulunan sakarozun fungusların aşırı çoğalarak bitkinin mücadele edebileceği seviyeyi aşmasına neden olduğu düşünülmüştür.

4 SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğada soğan gelişimi ve çoğalması çok yavaş olan Muş Lalesinde, *in vitro* ortamda elde edilen soğancıklar sayesinde ıslah çalışmalarında zamandan olukça fazla miktarda tasarruf edilmesi sağlanmıştır. Bu durum kısa

sürelerde ticari olarak pazarlanabilir çeşitlerin geliştirilmesine imkan tanımaktadır. Özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'nde üreticiye yüksek gelir getiren alternatif bir ürün olarak bölge çiftçisine sunulabilir olması çalışmanın sonuçlarının kıymeti bakımından önemlidir.

Çalışma, *in vitro* çoğaltım aşamasında fungus probleminin çözülmesi ile ileride yapılacak olan bilimsel ve ticari çalışmalara da önemli bir alt yapı oluşturacaktır.

Araştırmacıların Katkı Oranı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Teşekkür

Bu çalışmayı "Muş Lalesinin (*Tulipa sintenisii* Baker)'in *in vitro* Koşullarda Üretim Olanaklarının Belirlenmesi" BAP-20-UBF-4901-03 proje numarası ile maddi olarak destekleyen Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne ve çalışmada laboratuvarlarının kullanımına izni veren Muş Alparslan Tarım İşletmesi'ne katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Alp Ş (2006) Doğal çiçek soğanları ve ters lale koruma önlemleri ve yetiştiriciliği. Doğal Çiçek Soğanları Derneği, Yayın No:2, Altınova-Yalova
- Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N (2000) Türkiye bitkileri kırmızı listesi, (Red Data Book of Turkish Plants (Pteridophyta and Angiospermae), Türkiye Tab Kor Dern ve Van 100. Yıl Üniversitesi Yayını, Ankara

- Ergün A, Tosun N (2015) İthal edilen bazı çiçek soğanlarındaki *Fusarium spp.*'ye karşı kimyasal mücadele olanakları. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi* 25(1): 31-48
- İlav (2018) İstanbul Lale Vakfı İLAV, <https://www.ilav.org/bilimsel-calismalar.php?calisma=lale-yetistirme-tekniklerinin-iyilestirilmesi=1> (erişim tarihi: 29.10.2022)
- Kalyoncu DD (2007) Bazı yabancı Tulipa türlerinde in vitro soğancık üretimi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora tezi, Ankara, 90s
- Kızıl S, Khawar KM (2017) Farklı bitki büyüme düzenleyici ve sıcaklıklarının endemik Muş lalesi (*Tulipa sintenisii* Baker) tohumlarının çimlenmesi ve soğan gelişimi üzerine etkileri. In: VI. Süs bitkileri kongresi kitabı, Antalya, 232-237s
- Koyuncu M, Tekin E (2003) Muş ovasının incisi Muş lalesi. *Çevre ve İnsan Dergisi* 57:44-46
- Miransari M, Smith DL (2014) Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 99: 110-121
- Murashige T, Skoog F (1969) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Planta* 15(3): 473-97
- Sezgin M, Dumanoglu H (2014) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 50(1): 58-68
- Sezgin M, Kahya M (2021) Doğu mazısının (*Thuja orientalis* L.) embriyo kültürü ile çoğaltımı. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 8(2):381-387
- Yenikalaycı A, Sezgin M, Kahya M, Yalınkılıç AN, Kurt AN, Akça G (2021) Muş lalesi (*Tulipa sintenisii* Baker)'nin ovaryum kültürü ile çoğaltımı. In: Proceedings of Ispec 7th International Conference On Agriculture, Animal Sciences And Rural Development, pp108-110