

## ***Lisianthus (Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.)'ta In Vitro Çoğaltım Yönteminin Optimizasyonuna Yönelik Olarak Besin Ortamı Etkileşiminin İncelenmesi***

**Gizem GÖKÇE**<sup>1\*</sup> 

**Hakan AKTAŞ**<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> *Has Biotech A.Ş, Antalya/TÜRKİYE*

<sup>2</sup> *Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Isparta/TÜRKİYE*

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0009-0005-1763-3319>

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8280-5758>

\* Corresponding author (Sorumlu yazar): [hakanaktas@isparta.edu.tr](mailto:hakanaktas@isparta.edu.tr)

Received (Geliş tarihi): 31.03.2023 Accepted (Kabul tarihi):11.08.2023 Online: 29.12.2023

**ÖZ:** *Lisianthus*, çiçeklerinin uzun süre canlı kalması, birbiri ardına tomurcuklarının çiçeklenmesi ve gösterişli çiçekleri nedeniyle tercih edilen bir kesme çiçekli süs bitkisidir. Tüm dünyada hızla sektöre giren bitkinin üretimi, ağırlıklı olarak hibrit çeşitlerin tohumlarından fide elde edilmesi ve bunların seralarda yetiştirilmesi yoluyla yapılmaktadır. Tohumlar ise yurt dışından ithal edilmektedir. *Lisianthus* türünde ıslah çalışmalarının başlatılması ve yerli ticari çeşitlerin geliştirilmesi önem taşımaktadır. *In vitro* çoğaltım teknikleri, ıslah döngülerini hızlandırmak için yardımcı olmaktadır. *Lisianthus*'ta *in vitro* mutasyon ve genetik transformasyon çalışmalarına zemin oluşturmak üzere doku kültürü yoluyla çoğaltım sistemini optimize etmek, bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. *Lisianthus* tohumları aseptik koşullarda çimlendirilmiş, gelişen *in vitro* fidelerden yaprak eksplantları hazırlanarak 10 farklı bileşime sahip MS temel besin ortamına alınmıştır. Sitokinin olarak TDZ'nin 5 dozu (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L) tek başına veya 0,5 mg/L NAA ile kombine edilerek kullanılmıştır. Kontrol ortamı olarak bitki büyüme düzenleyici ilavesi yapılmayan MS ortamı kullanılmıştır. Kontrol ortamı hariç çalışmada yer alan diğer tüm ortam kombinasyonlarında organogenesis elde edilmiştir. Sadece TDZ veya TDZ + NAA içeren ortamlarda eksplant başına 7,7-15,2 arasında sürgün oluşumu saptanmış, 4 mg/L TDZ ortamı gelişim ve sürgün sayısı özellikleri bakımından dikkati çekmiştir. TDZ'nin 3 ve 4 mg/L dozunda kullanıldığı ortamlarda eksplant başına sırasıyla 14,3 ve 15,2 adet sürgün elde edilirken, en yüksek ortalama sürgün uzunluğu 0,5 mg/L TDZ içeren ortamda gözlemlenmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara aktarılması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Hormonsuz MS ve 1/2MS ortamlarında köklenme %100 olmuştur. Bitkiciklerin torf ve perlit karışımındaki saksılara aktarılması ve aklimatizasyonu da %95-100 arasında sağlıklı bitki elde edilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu çalışma ile *lisianthus* yaprak eksplantlarından mikroçoğaltım aşamaları başarıyla tamamlanmıştır. Optimizasyon sağlanan *in vitro* *lisianthus* üretimi, hızlı çoğaltım veya *in vitro* ıslah uygulamaları için kullanımına hazır hale getirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Eustoma grandiflorum*, TDZ, NAA, organogenesis, kitlesel çoğaltım.

### ***Investigation of Nutrient Medium Interaction for Optimization of In Vitro Propagation Method in Lisianthus (Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.)***

**ABSTRACT:** *Lisianthus* is a preferred cut-flower because of its long-lasting flowers, buds bloom one after another and its showy flowers. Production of this plant, which enters the sector rapidly all over the world, is mainly done by obtaining seedlings from the seeds of hybrid varieties and growing them in greenhouses. Seeds are imported from abroad. It is important to start breeding studies and develop domestic commercial varieties of *lisianthus*. *In vitro* propagation techniques are helpful to speed up breeding cycles. This study aims to optimize the propagation system through tissue culture to lay the groundwork for *in vitro* mutation and genetic transformation studies in *lisianthus*. *Lisianthus* seeds were germinated under aseptic conditions, leaf explants were prepared from the growing *in vitro* seedlings and transferred to MS basal nutrient medium with 10 different compositions. As cytokinin, five doses of TDZ (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L) were used alone or in combination with 0.5 mg/L NAA. MS medium without plant growth regulator was used as control medium. Organogenesis was achieved in all medium

combinations included in the study, except for the control medium. In media containing only TDZ or TDZ + NAA, shoot formation was detected with 7.7-15.2 shoots per explant, and 4 mg/L TDZ medium drew attention in terms of growth and shoot number characteristics. While 14.3 and 15.2 shoots were obtained per explant, respectively, when 3 and 4 mg/L doses of TDZ were used, the highest average shoot length was observed in the medium containing 0.5 mg/L TDZ. Rooting of shoots and acclimatization stages were carried out successfully. Rooting was 100% in hormone-free MS and 1/2 MS media. Transferring and acclimatization of plantlets to pots in a mixture of peat and perlite resulted in obtaining healthy plants between 95-100%. With this study, micropropagation steps from lisianthus leaf explants were successfully completed. The optimized in vitro lisianthus production protocol is ready for use for rapid propagation or in vitro breeding applications.

**Keywords:** *Eustoma grandiflorum*, TDZ, NAA, organogenesis, mass propagation.

## GİRİŞ

*Gentianaceae* familyasının bir üyesi olan lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] tek yıllık bir bitki olup, kesme çiçek olarak kullanılan bir süs bitkisidir. Anavatanı, Kuzey Amerika olan bitkinin, ‘lissos: güzel’ ve ‘anthos: çiçek’ anlamına gelen Yunanca sözcüklerin birleşmesiyle oluştuğu (Harbaugh, 1992; Özkan, 2017), sistematik sınıflandırma kapsamında bilimsel olarak *Eustoma grandiflorum* olarak bilinmesine rağmen *Eustoma andrewsii* ve *Eustoma russellianum* isimleriyle de sinonimlerinin olduğu bildirilmektedir (Everett, 1981; Harbaugh 2000).

Lisianthus, dünya üzerinde 1800’lü yıllardan bugüne kadar kesme çiçek olarak kullanılan gül, karanfil, krizantem gibi türlere nazaran yeni olmasına rağmen, hızlı bir yayılım göstermiştir. Kesme çiçek olarak ilk kez 1993 yılında Japonya’da kullanılan bu süs bitkisi, 2001 yılında Avrupa pazarında 122 milyon dal ile ilk 10 kesme çiçek türü arasına girmiştir. Piyasaya hızlı giriş yapan lisianthus tüm dünyada talep gören kalıcı kesme çiçek türleri arasında kalmayı başarmıştır. Çiçeklerinin dekoratif ve uzun ömürlü olmasının yanında, pembe, beyaz, mavi ve mor gibi çeşitli çiçek renklerine sahip olması, dolgun görümlü mavimsi-yeşil yaprakları, kuvvetli dik duruşu ve uzun vazo ömrü gibi özellikleri, lisianthusun kesme çiçek piyasasındaki önemini artırmaktadır (Anonim, 2015).

Avrupa pazarlarında ve ülkemizde kesme çiçek olarak tanınan lisianthus, kesme çiçek olarak kullanılmasının yanında, ABD başta olmak üzere birçok ülkede giderek yaygınlaşan bir ivmeyle dış mekân süs bitkisi ve saksı bitkisi olarak da kullanılmaktadır (Haspolat ve ark., 2020). Süs bitkilerinin küresel ticareti incelendiğinde, dünya

süs bitkileri ticari hacminin 42 milyar doların üzerinde olduğu görülmektedir. Bu ticaret hacmi içerisinde kesme çiçeklerin payı ise oldukça önemlidir. Lisianthus 2000’li yıllarda önemli gelişmeler kaydetmiş ve günümüzde kesme çiçek üretimindeki önemli konumuna gelmiştir. Türkiye’nin sektör raporları incelendiğinde lisianthus üretiminde %70’lik bir artış meydana geldiği anlaşılmaktadır. Bu artış 2018 yılında 11 milyon, 2020 yılında ise yaklaşık %100 artış göstererek 20 milyon dal sayısına ulaşmıştır. Böylece ülkemiz kesme çiçek yetiştiriciliği yapılan alanlarda lisianthus, son yıllarda kalıcı olarak ilk 10 tür arasında yer almıştır (TÜİK, 2020). Türkiye kesme çiçek ihracatı, Türkiye’nin süs bitkileri ihracatının yaklaşık yarısını oluşturmakta ve yaklaşık 60 farklı ülkeye ihracat yapılmaktadır. Bu durum ülkemizin kesme çiçek sektöründe önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Tapkı ve ark., 2018). Kesme çiçekler arasında lisianthus, sahip olduğu avantajlar ve potansiyel bakımından hem global anlamda hem de ülkemiz açısından önemli bir süs bitkisidir.

Ülkemizde süs bitkileri ıslahındaki gelişmeler yenidir. Lisianthus türündeki bilimsel araştırmalar ise oldukça sınırlı sayıdadır. Bu nedenle yerli ticari çeşitlerin geliştirilmesi, bu türde ekonomik olarak iç ve dış piyasadaki etkinliğin artırılmasında önem taşımaktadır. Saksıda, kesme çiçek olarak veya dış mekânlarda kullanılacak çeşitlerinin yaygınlaştırılarak lisianthus türünün dünyada sahip olduğu ticari değerin ülkemizde de geliştirilmesinin önemli bir girişim olacağı düşünülmektedir. Ancak klasik yöntemlerle yapılan ıslah çalışmaları diğer türlerde olduğu gibi süs bitkilerinde de uzun süre alabilmektedir. Bu bitkilerde genetik varyasyon oluşturmaya katkı sağlayan ve çoğaltımını

kolaylaştıran biyoteknolojik teknikler, ıslah süresinin kısaltılmasını sağladığı gibi varyasyon oluşturma başarısını da artırmaktadır. Bitki doku kültürlerinin hızlı çoğaltım alanında avantajlar sağlamanın yanı sıra hızlandırılmış ıslah tekniklerinin günümüzde geleneksel ıslah programlarına entegre edilmesi, bu alanda da önemli faydalar sağlamaktadır. Özellikle *in vitro* mutasyon tekniği, genetik çeşitlilik meydana getirerek gen havuzu oluşturmada büyük katkı sunmaktadır. Bu sayede klasik melezleme programlarına göre daha kısa sürelerde, oluşturulan genetik çeşitlilik içerisinde seleksiyon yapma olanağı ortaya çıkmaktadır. Türler arası melezlemelerdeki engeller ile uğraşmak ya da türlere özgü çiçeklenme sorunları, uyumsuzluklar gibi eşeysel çoğaltımın dezavantajları, *in vitro* vejetatif çoğaltım yöntemi optimize edilmiş bir bitkide fiziksel mutasyon uygulanarak kolaylıkla aşılabilmektedir. Bununla birlikte bitki doku kültürü çalışmalarında genotip etkisi, kültür ortamının bileşimi, kullanılan eksplant tipi gibi birçok faktör çoğaltım çalışmalarından elde edilen başarıyı etkilemektedir. Nitekim, lisianthusun da etkin mikro çoğaltımındaki başarısının, genotip, kültür ortamı, bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) ve eksplant tipi gibi farklı faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir (Ordogh ve ark., 2006).

Ticari önemi gün geçtikçe artan bu süs bitkisinde yeni çeşitlerin geliştirilmesi ve ardından hızla çoğaltımının yapılabilmesi için yeni tekniklerinin geliştirilmesi, bitki doku kültürü kullanım olanaklarını araştırılması ve özgün reçetelerin oluşturmasının hem ülkemiz hem de bu türde yapılacak olan yeni araştırmalara yön göstermesi bakımından önemlidir. Ülkemizde doku kültürü ile organogenesis ve mikroçoğaltım konusundaki kapsamlı bir çalışma Özkan (2017) tarafından yapılmış olup geniş bir literatür bilgisi ve lisianthusun doku kültürü ile çoğaltımındaki temel prensipler ortaya koyulmuştur. Ancak bu çalışmaların devam ettirilerek yeni bilgilerin eklenmesi gereklidir.

Lisianthus, tohumla çoğaltılan bir tür olup, çoğaltım fide yetiştiriciliği ile sağlanmaktadır. Ancak, çift renkli ve katmerli çiçekli tiplerde fidelerin

homojen elde edilmesi zaman zaman sorunlar oluşturmakta ayrıca, heterojenitenin yüksek olduğu çeşitlerde tohumlardan gelişen bitkilerde çiçeklenme süresi, bitki boyu ve çiçek sayısında farklılıklar oluşabilmektedir (Furukawa, 1993). Bu gibi durumlarda yeşil çelik alma yoluyla da çoğaltım yapılabilir. Ancak vejetatif çoğaltımın alan ihtiyacı, virüslerle bulaşma riski vb. çeşitli dezavantajları da bilinmektedir. Bu nedenle lisianthusta, kısa sürede çok yüksek sayılarda sağlıklı ve birörnek bitki elde etme fikri oldukça ilgi çeken bir konudur. Vejetatif olarak çoğaltılabilen çeşitlerin geliştirilmesi, tohumla üretimde karşılaşılan sorunlarla başa çıkma zorunluluğunu ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle mikro çoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir. Ayrıca ıslah amaçlı seçilmiş bitkilerin büyük ölçekli çoğaltılması için doku kültürü ile çoğaltım önem taşımaktadır (Semeniuk ve Griesbach, 1987). *Eustoma grandiflorum*'nın *in vitro* çoğaltımı; sürgün ucu, yan tomurcuklar, boğum arası gövde ve yaprak parçaları gibi eksplantların kullanılmasıyla direkt organogenesis yoluyla yapılabildiği gibi (Semeniuk ve Griesbach, 1987; Mousavi ve ark., 2012), kallus üzerinden organogenesis (Rezaee ve ark., 2012; Akbari ve ark., 2014) şeklinde de elde edilebilmektedir. Somatik embriyogenesis konusunda ise geniş bir literatür bilgisi Nhut ve ark. (2006) tarafından sunulmuştur. Ayrıca yaprak eksplantlarından optimum somatik embriyo oluşumu için Yumbala-Orbes ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, oluşan rejenerantlarda flow sitometri ve histolojik çalışmalar da yapılmış ve somaklonal varyasyon oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Araştırmacılar hem somatik dokulardan alınan hem de tohumdan gelişen bitkiden alınan DNA örneklerinin aynı içeriği verdiğini ve herhangi bir genetik farklılaşmaya rastlanmadığını belirtmişlerdir.

Uluslararası bilimsel platformda, üzerinde çok fazla denemelerin yapıldığı bir tür olmasına karşın Türkiye'de henüz birkaç tez çalışmasının dışında araştırma yapılmamış bir tür olan ve özellikle ıslah çalışmaları için biyoteknoloji alanında hızla yol

alınması gereken lisianthus türünde *in vitro* çalışmalar genotipler bazında yapılarak, kullanılabilecek yöntemlerin belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada, lisianthus tohumlarının *in vitro* şartlarda çimlendirilmesinden elde edilen bitkiciklerden hazırlanan boğum eksplantlarının (=single node explant) kullanılmasıyla, doku kültürü yoluyla çoğaltım yöntemini belirlemek amaçlanmıştır. Besin ortamındaki bitki büyüme düzenleyici içeriklerinin organogenesis, sürgün sayısı ve uzunluğu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sürgünlerin köklendirilerek iklimlendirme aşamasının ardından gelişimleri sağlanmıştır. Yöntemin optimize edilmesinin ardından *in vitro* mutasyon yöntemleri kullanılarak vejetatif çoğaltım yöntemiyle ticari olarak çoğaltılacak yerli çeşitlerin ıslah edilmesi hedeflenmektedir.

## MATERYAL VE METOT

Araştırma 2021–2022 yılları arasında Has Biotech A.Ş.'ne ait araştırma seraları ve doku kültürü laboratuvarında, Antalya'da yürütülmüştür.

### Materyal

Çalışmamızda, Ege Plantek Firmasının Türkiye temsilcisi tarafından temin edilen lisianthus bitkisinin tohumları bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. *Eustoma grandiflorum* türüne ait ve beyaz çiçekli ticari çeşit, Şekil 1'de gösterilmektedir.

### Metot

**Besin ortamı hazırlığı:** Doku kültürü uygulamalarının tümü aseptik koşullar altında steril kabin (laminar flow kabin) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) temel ortam bileşimi kullanılmıştır. Besin ortamına %3 oranında sakkaroz (Sigma) eklendikten sonra pH 5,7'ye ayarlanmış ve %0,7 oranında agar (Merck) ilave edilmiştir. Besin ortamları 250 veya 500 ml'lik kapaklı otoklav şişeleri içinde otoklavda 1,2 atmosfer basınç altında, 121°C'ta 20 dakika sürede sterilizasyona tabi tutulmuştur. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra steril besin ortamını içeren şişeler iyice çalkalanarak agarın besiyerine tamamen

karışması sağlanmış, ardından daha önceden steril edilen 8 cm cam petri kaplarına steril kabin içerisinde 10'ar ml; 420 cc cam kavanozlara ise 40'ar ml olacak şekilde pay edilmiştir. Agarın oda sıcaklığında katılaşmasını takiben besiyerleri eksplantların dikimi için hazır duruma getirilmiştir.



Şekil 1. Araştırmada kullanılan lisianthus çeşidine ait çiçeklerin görünümü.

Figure 1. Appearance of the flowers of the lisianthus cultivar used in the research.

**Tohumların yüzeysel sterilizasyonu:** Lisianthus tohumları buzdolabı sıcaklığında 10 gün süreyle bekletildikten sonra sterilizasyon işlemlerine tabi tutulmuş, sonrasında *in vitro* şartlarda MS besin ortamında çimlendirilmiştir. Tohumlar öncelikle filtre kağıdından hazırlanan küçük paketçikler içerisine koyulmuş ve bu paketler ataş ile tutturulmuştur. İçerisinde tohum bulunduran kâğıt paketçikler %20'lik ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) ve 3 damla Tween-20 içeren solüsyon içinde 15 dakika çalkalanarak yüzeysel sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Bunun ardından, 3 defa 5'er dakika steril saf su ile durulama işlemine tabi tutulmuştur. Sterilizasyon işleminin uygulandığı cam kavanozdaki son durulama suyu süzülükten sonra tohumları bulunduran kâğıt paketçikler steril kurutma kâğıdı üzerine alınarak fazla suları kurutma kâğıdına emdirilmiştir. Ataşlar açılarak kâğıt üzerine yapışmış durumdaki tohumlar MS besin ortamına ekilmiştir. Tüm bu işlemler laminar akışlı kabinde aseptik koşullarda yapılmıştır.

**Eksplantların hazırlanması, besin ortamlarına dikimi ve inkübasyonu:** *In vitro* şartlarda tohumdan elde edilen lisianthus bitkiciklerinden laminar kabin içerisinde steril edilmiş filtre kağıtları üzerinde steril bistüri ile dikdörtgen şekilli yaprak eksplantları hazırlanmış ve petri kapları içindeki 10 farklı büyüme düzenleyici içeriğine sahip MS ortamları üzerine yaprak alt yüzeyi besin ortamına temas edecek şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 2). Her petri içine 5-6 adet eksplant yerleştirdikten sonra streç film şeritler ile kapların çevresi sarılmış ve atmosferle olan teması kesilmiştir. İlk grup ortamlarda TDZ'nin (N-pheñil-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea) 5 adet (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 ve 4,0 mg/L) dozu tek başına kullanılmıştır. Bunların yanı sıra aynı ortamlara 0,5 mg/L NAA (Naftalen Acetic Acid) ilave edilerek hazırlanan ikinci 5 adet ortam da olmak üzere 10 farklı kombinasyon, denemede yer almıştır. Eksplantlar, petri kaplarındaki besin ortamlarına yerleştirilmesinin ardından  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ' ta ve 16 saat aydınlık (2500-3000 Lux)/ 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış fotoperiyodik düzene sahip iklim odalarına alınmıştır. Kùltürlerin 8. haftası tamamlandığında gözlem, sürgün adedi sayımı yapılmıştır. Gelişen sürgünlerde 1 cm'den küçük ve 1 cm'den büyük sürgün sayısı değerleri 12. haftada kaydedilmiş ve çizelgeler oluşturulmuştur. Bu aşamadan sonra 1 cm'den büyük olanlardan hazırlanan eksplantlar alt kùltüre alınmıştır.

**Alt kùltür aşaması:** Ölçüm yapılan ve uzunlukları 1 cm üzerinde olan 6 haftalık *in vitro* sürgünlerin tek boğum eksplantları hazırlanarak, aynı besin ortamı içeriklerinde alt kùltüre alınmıştır. Şekil 3'te üzerinde bir adet aksillar göz bulunan tek boğum eksplantının görünümü ve bu dokuların dikimden iki hafta sonraki gelişme durumları gösterilmiştir (Şekil 3).

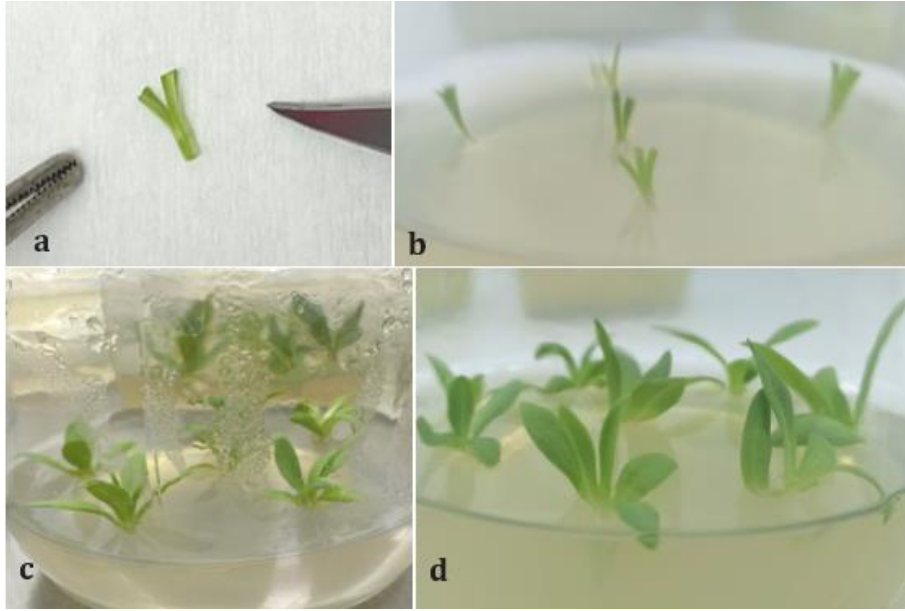
Bir önceki aşamada kullanılan aynı bileşimdeki besin ortamlarına dikimleri yapılan tek boğum eksplantlarının bulunduğu cam kavanozlar, 16/8 saatlik fotoperiyodik düzende ve  $25^{\circ}\text{C}$  sıcaklıktaki iklim odasında 4 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

**Köklendirme aşaması:** Alt kùltürlerde gelişen ve 1 cm'den büyük olan sürgünler kullanılarak köklendirme aşamasındaki uygulamalara geçilmiştir. Her bir gelişme ortamını (10 farklı bileşim) temsil edecek 20'şer adet sürgün, hazırlanan hormonsuz MS veya  $\frac{1}{2}$  MS ortamlarına aktarılmıştır. Böylece temel besin ortamındaki mineral tuzların ve vitaminlerin yarı kuvvette kullanıldığı ortam ile tam kuvvetteki MS ortamının köklenme üzerindeki etkisi incelenmiştir. Köklenme ortamlarına aktarım işleminden 4 hafta sonra sürgünlerdeki köklenme oranı belirlenmiş, köklenen sürgünler dış koşullara alıştırmaya aşamasına aktarılmıştır.



Şekil 2. MS ortamında çimlendirilen lisianthus bitkiciklerinden yaprak eksplantlarının hazırlanışı ve organogenesis amacıyla kùltüre alınması.

Figure 2. Preparation of leaf explants from *in vitro* germinated lisianthus seedlings and culture for organogenesis.



Şekil 3. Lisianthusun *in vitro* gelişen sürgünlerinden hazırlanan tek boğum eksplantı görünümü (a, b), tek boğum eksplantlarının dikiminden iki hafta sonra gelişimleri (c, d).

Figure 3. The appearance of single node explants prepared from *in vitro* shoots of lisianthus (a, b), development of single node explants two weeks after planting (c, d).

**Dış koşullara alıştırma aşaması:** Köklenmiş lisianthus bitkiciklerinin dış koşullara alıştırılmasında bitkicikler cam kavanozlardan çıkarılarak çeşme suyu altında kökleri yıkanmış ve agarlı besin ortamından arındırılmış, ambalajından çıkartılarak ilk kez kullanılan Clasmann marka hazır fide harcı doldurulan saksılara dikilmiştir. 10 cm çapındaki saksılara 4'er adet olacak şekilde (toplamda 200 adet) dikimleri yapılan bitkicikler, derin ve kapaklı plastik kutulara yerleştirilerek iklim odasında tutulmuştur. Plastik kapak örtülmeden önce bitkiler sulanmış, mini el pülverizatörü ile yaprakların üzerine su püskürtülmüştür. 4 gün boyunca günde iki kez mini sera kapağı açılarak su püskürtme işlemine devam edilmiş ve daha sonra kapak tedrici olarak hafifçe aralanarak bir hafta sonunda tamamen kaldırılmıştır. Bu işlemler doku kültürü iklim odasında (25°C) ve günlük 16 saatlik 2000 Lux şiddetindeki floresan lambaların kullanıldığı aydınlanma düzeninde gerçekleştirilmiştir. Bir süre sonra kapağı tamamen açılan kutularla seraya taşınan bitkiler tek tek olacak şekilde yeni saksılara aktarılmıştır.

Diğer yandan köklenen fideciklerin bir kısmı da (200 adet), viyollere doldurulan fide harcına doğrudan dikimleri yapıldıktan sonra dış koşullara alıştırılmıştır. Serada dikimleri yapılan ve can suyu verilen fidecikler, gölge bir alanda siyah renkli net altına strafolar üzerine yerleştirilmiştir. Günde iki kez yaprakları üzerine el pülverizatörü ile su püskürtme işlemi 5 gün boyunca yapılmış ve bu aşamadan sonra iki gün arayla günde bir kez su püskürtülmüştür. 10. günden sonra ise bitkiler normal gelişmelerine bırakılmıştır. Dış koşullara alıştırılan tüm bitkiler seraya aktararak, sağlıklı bir şekilde gelişmelerine devam etmeleri sağlanmış ve çiçeklenme aşamasına kadar takip edilmişlerdir.

**Verilerin analizi ve değerlendirilmesi:** Denemeye ait veriler, Tesadüf Parselleri Deneme Deseninde istatistikî olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler, SAS-JMP pro13 programında yapılmıştır (Anonymous, 2016). BBD cinsi ve dozları kombinasyonlarını ifade eden "uygulama grupları" arasındaki farklılıklar varyans analizi ile test edilmiş; istatistikî düzeyde farklı bulunan ortalamalar LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

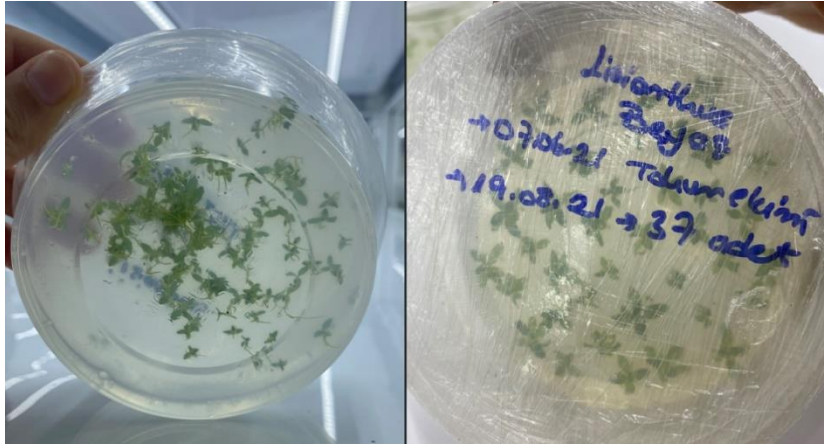
### Tohumların doku kültüründe çimlendirilmesi

Lisianthus tohumlarının (200 adet) besin ortamlarına dikimini takiben ilk çimlenme, 17 gün sonra %99,8 oranında meydana gelmiştir. Şekil 4'te çimlenme ortamında elde edilen lisianthus fidelerine ait görüntülere yer verilmiştir.

### Organogenesis aşaması

Aseptik koşullarda elde edilen *in vitro* bitkilerden alınan yapraklardan hazırlanan eksplantların doğrudan organogenesis yoluyla sürgün meydana getirmesi amacıyla kültüre

alındığı bu uygulamada, TDZ (sitokinin)'nin tek başına ve NAA (oksin) ile kombinasyonları kullanılmıştır. Kültüre alınan yaprak eksplantları üzerinde 6 hafta sonunda sürgün oluşumları gözlemlenmeye başlamıştır. Kontrol grubu eksplantlarda sürgün oluşumu meydana gelmemiştir. BBD içeren ortamlarda ise 12. haftada oluşan sürgünlerin ortalama sayısı, 1 cm altı ve üstündeki ortalama sürgün sayıları, sürgün uzunluğu değerleri belirlenmiştir. Toplam 10 farklı içerikteki MS ortamlarının gelişme ve sürgün sayıları üzerine etkilerine ilişkin sayısal veriler, Çizelge 1'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Lisianthus tohumlarının *in vitro* ekimlerinin ardından elde edilen çimlenmiş fidelerin görünümü.  
Figure 4. The appearance of germinated seedlings of lisianthus seeds obtained after *in vitro* sowing.

Çizelge 1. Ortalama sürgün sayısı, 1cm altı ve üstünde oluşan sürgün sayısı.

Table 1. The mean average number of shoots, number of shoots shorter and longer than 1 cm.

BBD	Konsantrasyon (mg/L) Concentration	Ortalama Sürgün Sayısı (*) Mean number of shoots	Sürgün Sayısı <1cm (A) Number of shoots	Sürgün Sayısı ≥1cm (B) Number of shoots	B/A
TDZ	0,5	12,7 ± 5,25 ab	4,0 ± 2,73 b	8,7 ± 2,69 a	2,2
	1	7,7 ± 3,53 b	5,4 ± 3,10 ab	2,3 ± 0,43cd	0,4
	2	10,0 ± 0,88 ab	3,9 ± 1,84 b	6,1 ± 1,02abc	1,6
	3	14,3 ± 10,37 ab	5,1 ± 5,50 ab	9,2 ± 5,39a	1,8
TDZ+NAA	4	15,2 ± 5,39 a	7,1 ± 4,26 ab	8,1 ± 1,55a	1,1
	0,5+0,5	9,5 ± 0,53 ab	7,2 ± 0,00 ab	2,3 ± 0,57 cd	0,3
	1+0,5	12,1 ± 5,97 ab	10 ± 6,93 a	2,1 ± 0,96 d	0,2
	2+0,5	12,2 ± 5,98 ab	8,9 ± 5,04ab	3,3 ± 1,11 bcd	0,4
	3+0,5	10,5 ± 0,22 ab	3,4 ± 2,36 b	7,1 ± 2,30 ab	2,1
	4+0,5	12,8 ± 6,51 ab	7,4 ± 5,94 ab	5,4 ± 2,07 abcd	0,7

Ortalama Sürgün Sayısı (Mean of shoots) → Ortam (Medium) P<0,001. LSD: 7,35; CV: % 37

Sürgün Sayısı (Mean of shoots) <1cm → Ortam (Medium) P<0,001. LSD: 5,52; CV: % 42

Sürgün Sayısı (Mean of shoots) ≥1cm → Ortam (Medium) P<0,001. LSD: 3,91; CV: % 48

(\* Her bir sütunda aynı harfleri alan rakamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz; farklı harfleri alan rakamlar arasındaki farklılık önemlidir).

(\*Values followed by different letters in columns are significantly different).

Yaprak eksplantları, tüm ortamlarda sürgün farklılaşması sağlamıştır. Lisianthusun doku kültüründe organogenesis amacıyla yapılacak uygulamalar söz konusu olduğunda yaprak eksplantlarının başarıyla kullanılabilmesi çalışmamızda ortaya koyulmuştur. Literatürde farklı eksplantların *in vitro* lisianthus çoğaltımında kullanılabilmesi önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin Paek ve Hahn (2000), Ordogh ve ark. (2006), Nhut ve ark. (2006), Esizad ve ark. (2012) ve Yumbala-Orbes ve ark. (2017) gibi araştırma grupları, lisianthusta boğum arası, kök, petal gibi farklı eksplantları başlangıç materyali olarak kullandıklarında da sürgün organogenesisi sağlayabilmişlerdir. Bununla birlikte Rezaee ve ark. (2012) çalışmasında, yaprak eksplantlarının diğer tüm eksplantlara göre daha yüksek çoğaltım kapasitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Deroles ve ark. (1993), Semeria ve ark. (1996) ile Handa ve Deroles (2001) de yaprak eksplantlarının *in vitro* sürgün rejenerasyonu için başarılı bulunduğunu ve lisianthusta genetik transformasyon çalışmaları için en uygun eksplant olabileceğini bildirmişlerdir.

TDZ'nin 5 farklı dozu ve NAA ile kombine edildiği ikinci 5 adet ortamdaki yaprak eksplantları üzerindeki gelişmeyi gösteren görüntülere ise Şekil 5'te yer verilmiştir.

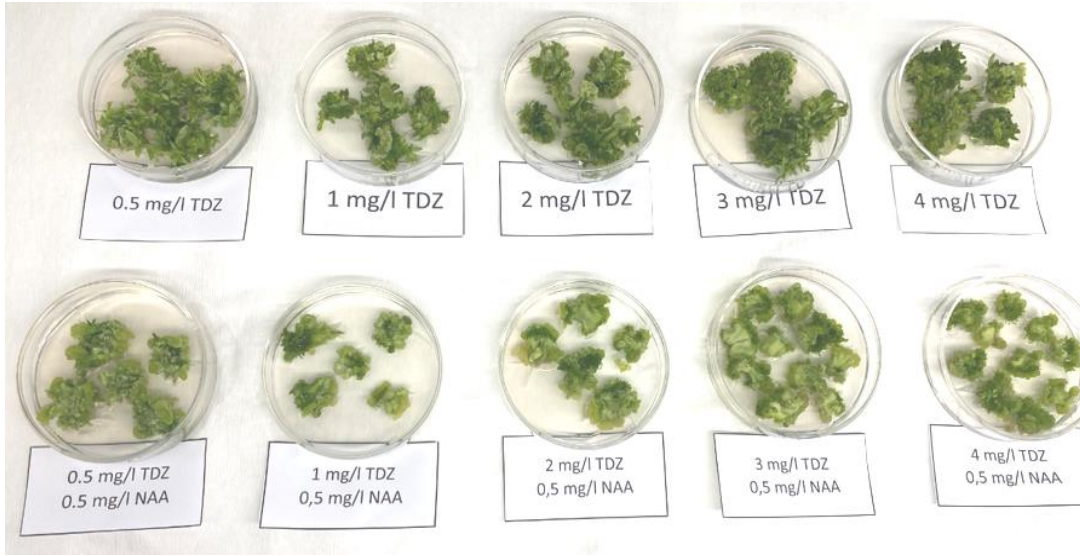
Sürgün sayısı değerleri açısından uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Ortalama sürgün sayısı maksimum 4 mg/L TDZ: 15,2 adet/eksplant ve 3 mg/L TDZ: 14,3 adet/eksplant ortamlarında gözlemlenmiştir. Genel olarak, kullanılan BBD'lerin yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu sağlama konusunda yeterli uyarımı sağladığı söylenebilir. Eksplant başına 7,7-15,2 arasında sürgün sayısı oluşturan 10 farklı bileşimde oluşan ortalama sürgün sayısı ise 11,7 olmuştur. Kullanılan ortamlar arasında çok farklı grupların oluşmaması, literatür bilgileri ışığında seçilen büyüme düzenleyici tür ve dozlarının doğrudan organogenesis konusunda başarılı seçimler olduğu yönünde yorumlanmıştır. Uddin ve ark. (2017) da, çalışmadan elde edilen bulgulara benzer şekilde yaprak eksplantı başına 12,7 adet sürgün rejenerasyonunu 0,1-1,5 mg/L BAP ve GA<sub>3</sub>

kombinasyonlarında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte farklı çeşit ve besin ortamı bileşimlerinde sürgün sayıları da değişiklik göstermektedir. Nitekim 'Mariachi Pure White' çeşidinde *in vitro* rejenerasyon üzerinde çalışan Özkan (2017), eksplantlardan adventif sürgün rejenerasyonunda maksimum sürgün sayısının 1,0 mg/L Kin içeren ortamda 3,3 adet olduğunu bildirmiştir. Meydana gelen *in vitro* sürgünlerin en yüksek sayısal değeri 1,0 mg/L BAP ve 4,0 mg/L Gibberellik asit (GA<sub>3</sub>) kombinasyonundan 1,13 adet olarak elde edilmiştir. Pop ve ark. (2016)'nin 4 farklı hibrit lisianthus çeşidinde *in vitro* rejenerasyon çalışmasında eksplant olarak sürgün uçları kullanılmış olup, bunlar MS ortamına iki farklı BBD kombinasyonu ilave edilmesi ile elde edilen ortamlarda kültüre alınmıştır: V1 (MS + 0,5 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IAA); V2 (MS + 1,0 mg/L BAP + 0,5 mg/L IAA). Eksplant başına 3,1 (V1) ve 5,7 (V2) adet sürgün alınabilmiştir. Yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde, tarafımızca gerçekleştirilen çalışmada yaprak eksplantından çok başarılı bir sürgün rejenerasyonu sağlandığını söylemek mümkündür.

Toplam sürgün sayısı bakımından birbirine yaklaşan sayısal değerler veren 10 farklı bileşimdeki ortam, 1 cm'den küçük veya büyük sürgün sayıları konusunda daha belirgin biçimde ayrılmışlardır. Boyu 1 cm altında olan sürgün sayısı açısından en yüksek değer, 1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA ve 2 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA ortamlardan alınmıştır (10 ve 8,9 adet/eksplant). Diğer ortamların önemli bir kısmı aynı istatistiksel grupta yer alarak benzerlik gösterirken, farklı bir istatistiksel grupta bulunan 0,5 mg/L TDZ, 2 mg/L TDZ ve 3 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA uygulamalarında 1 cm'den küçük sürgün sayısı en az değerleri almıştır.

Hemen hemen tüm ortamlarda çok küçük meristematik dokuların yoğun bir şekilde oluştuğu, özellikle yüksek sitokinin dozlarında bu oluşumun daha belirgin olduğu görülmüştür. Bununla birlikte kültürün ilerleyen aşamalarında küçük olan meristematik oluşumlar gelişmelerine devam etmiş ve sürgün olarak farklılaşmıştır (Şekil 6).





Şekil 5. TDZ'nin 5 dozu (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L) ve bunların 0,1 mg/L NAA ilave edilmiş ikinci 5 adet serisinde lisianthus yaprak eksplantlarında, kültüre alma işleminden 8 hafta sonraki görünüm.  
Figure 5. The appearance of cultures 5 doses of TDZ (0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 mg/L) and their second 5 series with 0.1 mg/L NAA added in lisianthus leaf explants, 8 weeks after culturing.



Şekil 6. Sürgün sayısı bakımından yüksek değer veren 3 mg/L TDZ içeren ortamda lisianthus yaprak eksplantlarından elde edilen sürgün rejenerasyonu görünümleri.  
Figure 6. Appearance of regenerated shoots obtained from lisianthus leaf explants in the medium containing 3 mg/L TDZ, which gives a high value in terms of shoot number.

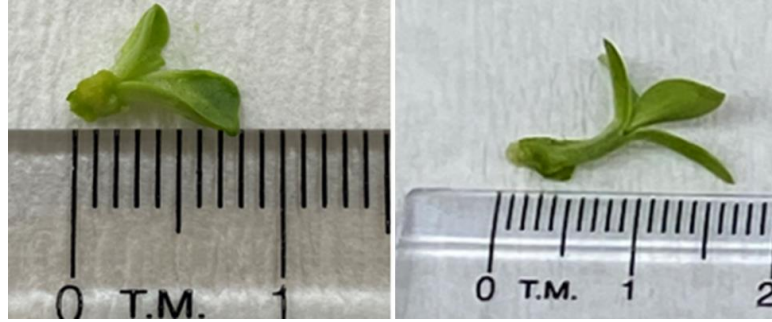
Boyu 1 cm üzerinde ölçülen ortalama en çok sürgün sayısı 3 mg/L TDZ ve 0,5 mg/L TDZ içeren ortamlarda (9,2 adet ve 8,7 sürgün/eksplant). Bununla birlikte oluşan toplam sürgün sayısı farklı olduğundan tek başına bu değerlerin ortam seçimi için yeterli olmayabileceği açıktır. Bu nedenle 1 cm'den büyük sürgünler / 1 cm'den küçük sürgünler arasındaki oran fikir vermesi açısından incelendiğinde; en düşük TDZ dozunun 0,5 mg/L bu açıdan önde geldiği görülmekte ve büyük

sürgünlerin (>1 cm) oluşumu, küçük ve rozet görümlü oluşan sürgün sayısından daha fazladır.

Tüm bu değerlendirmeler kapsamında hem toplam sürgün oluşumu ve hem de 1 cm'den büyük alt kültüre alınmaya uygun sürgün oluşturma özellikleri bakımından 0,5 mg/L TDZ, 3 mg/L TDZ ve 4 mg/L TDZ içeren ve ortamlarının tercih edilebilir bulunduğunu söylemek mümkündür (Çizelge 1).

Elde edilen sürgün sayısının yanı sıra, bunların alt kültürere alınabilir büyüklüğe gelmiş olmaları ve birbirlerine oranları da önemli olmaktadır. Bu nedenle kullanılacak besin ortamı bileşimini belirlemek amacıyla oluşan sürgünlerin 12. haftadaki uzunlukları da ölçülmüştür (Şekil 7).

Sürgün uzunlukları bakımından yapılan ölçümlere ilişkin sonuçlar Çizelge 2'de gösterilmiştir. Sürgünlerin kültüre alındığı 10 farklı ortam içerisindeki sürgün uzunluğu gelişimleri, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Ortalama sürgün uzunluğu en fazla 0,5 mg/L TDZ ortamında ölçülmüş ve bunu farklı bir istatistik grubta yer alan 2 mg/L TDZ uygulaması takip etmiştir; 0,5 mg/L TDZ ortamında en yüksek sürgün uzunluğu değeri 1,9 cm iken 2 mg/L TDZ ve 4 mg/L TDZ ortamında 1,6 olarak belirlenmiştir (Çizelge 2).



Şekil 7. Alt kültüre alınmadan önce, yaprak eksplantlarının dikiminden 12 hafta sonra her bir eksplant üzerinde oluşan 1 cm altında ve 1 cm üzerinde uzunluğa sahip olan sürgünlerin görüntüleri.

Figure 7. Images of shoots shorter than 1 cm and longer than 1 cm long formed on each explant 12 weeks after planting the leaf explants, before subculture.

Çizelge 2. Ortalama, maksimum ve minimum sürgün uzunlukları.

Table 2. Mean, maximum and minimum shoot lengths.

BBD PGR	Konsantrasyon (mg/L) Concentration	Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm) (*) Mean of shoot length	Min. Sürgün Uzunluğu (cm) Minimum shoot length	Mak. Sürgün Uzunluğu (cm) Maximum shoot length
TDZ	0,5	0,80 ± 0,05 a	0,1	1,9
	1	0,51 ± 0,05 bc	0,2	1,2
	2	0,62 ± 0,05 b	0,1	1,6
	3	0,47 ± 0,09 cd	0,1	1,1
	4	0,55 ± 0,17 bc	0,1	1,6
TDZ+NAA	0,5+0,5	0,37 ± 0,12 de	0,3	0,5
	1+0,5	0,45 ± 0,10 cd	0,3	1,2
	2+0,5	0,30 ± 0,17 e	0,1	0,6
	3+0,5	0,30 ± 0,10 e	0,1	0,6
	4+0,5	0,30 ± 0,10 e	0,1	0,5

Ortalama Sürgün Uzunluğu (Mean shoot length) → Ortam (Medium) P<0,001. LSD: 0,14; CV: % 17

(\* Her bir sütunda aynı harfleri alan rakamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz; farklı harfleri alan rakamlar arasındaki farklılık önemlidir).

(\*Values followed by different letters in columns are significantly different).

TDZ'nin farklı dozları tek başına kullanıldığında, vasküler meristematik doku indüksiyonu ve bunun ardından sürgün farklılaşması başarıyla gerçekleşmiştir. Sitokinin olarak çalışmada yer alan TDZ ile birlikte oksin kaynağı olarak tek dozda (0,5 mg/L) NAA'nın da kullanımı, organogenesis üzerinde önemli düzeyde teşvik edici bulunmamış, hatta bir miktar engelleyici etkisi gözlenmiştir. NAA+TDZ kombinasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınan sürgünlerde, camsılaşmanın da olduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden TDZ'nin tek başına kullanımı yaprak eksplantlarından sürgün farklılaşması ve çoğaltım için tercih edilebilir bulunmuştur. Farklı büyüme düzenleyici tür ve dozlarının lisianthusta *in vitro* somatik embriyogenesis veya organogenesis amacıyla kullanıldığı, literatürden

izlenebilmektedir. Yumbla-Orbes ve ark. (2020), 10 µM 2,4-D kullanımının yaprak eksplantlarından somatik embriyogenesis uyartımı yaptığını; Mousavi ve ark. (2012), organogenesis ve bitki oluşumu için MS ortamı yerine B5 Gamborg ortamının daha başarılı bulunduğunu, en uygun BBD dozunun ise 1 mg/L BAP olduğunu bildirmektedir. Ghanati ve ark. (2012) ise, LS, B5 ve MS ortamlarına karşılaştırmış, 1'er mg/L BAP ve GA<sub>3</sub> içeren B5 ortamlarında maksimum sürgün rejenerasyonu elde edildiğini rapor etmişlerdir. Kaviani (2014), sitokinin olarak kinetin kullanmıştır. NAA ile kombinasyonları bulunan çalışmalarda en iyi sürgün rejenerasyonu 0,5 mg/L kinetin içeren MS ortamından gözlemlenmiştir. Aynı araştırmacı farklı bir çalışmasında 0,1 mg/L BA

ve 0,2 mg/L NAA kombinasyonu içeren MS ortamında kallus ve bunun üzerinden sürgün organogenesi elde ettiklerini bildirmiştir (Kaviani, 2014). Lisianthusun direkt organogenesis yoluyla çoğaltımı konusunda Özkan (2017) ve Haspolat ve ark. (2020)'nın da bildirdiği gibi yıllar içerisinde çeşitli araştırmacılar tarafından BBD cins ve dozları, besin ortamı bileşimleri denenmiştir. MS ve B5 ortamlarının ağırlıklı olduğu çalışmalarda tek başına sitokinin (BAP) ve bunun oksin ile birlikte kullanımı (NAA veya IAA), rejenerasyonu teşvik etmektedir (Mousavi ve ark., 2012). Nitekim burada sonuçları sunulan çalışmada da tek başına kullanılan TDZ (sitokinin), yaprak eksplantlarından başarılı bir şekilde sürgün rejenerasyonu sağlamış, besin ortamına NAA ilave edilmesinin (denemede yer alan doz çerçevesinde) önemli bir etki oluşturmaksızın benzer sonuçları verdiği görülmüştür.

Literatürdeki farklı çalışmalardan sürgün oluşumu oranı, sürgün sayısı gibi değerlerde değişik sonuçlar elde edilmesi ve en uygun ortam bileşiminin farklı olması; çalışmalarda kullanılan genotiplerin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Haspolat ve ark. (2020) tarafından yapılan literatür çalışmasında da belirtildiği gibi lisianthus eksplantlarından organogenesis elde etmek amacıyla 0,1-2,0 mg/L arasındaki sitokinin dozları uygulanmıştır. Çalışmamızda ise 4 mg/L'ye kadar çıkan sitokinin dozları kullanılmış ve 3 mg/L TDZ dozuna sahip ortamlarda, çalışmanın en iyi sonuçları elde edilmiştir. Doku kültüründe süre uzadıkça yeni sürgünler meydana gelmeye devam etmekte, önceden oluşanlar ise uzayarak gelişmektedir. Çalışmada 12 haftalık kültürlerde ölçümler yapılarak o aşamadaki sayısal veriler değerlendirilmiştir. Kültür süresi uzatıldığında veya ortama hücre uzamasını teşvik eden BBD katkısı yapılması durumunda yüksek dozda sitokinin kullanımının yol açtığı sıkışık yapılı ve küçük sürgün oluşumunun olumsuz etkilerinin azaltılabileceği düşünülebilir. Besin ortamlarına GA<sub>3</sub> ilave edilmesi, küçük sürgünlerin uzamasını teşvik ettiğinden *in vitro* çoğaltım çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Gümüş, 2009; Bejaoui,

2022). Nitekim Uddin ve ark. (2017) lisianthus rejenerasyon sisteminde Gibberellik asit ilavesini tercih etmişlerdir. Bu çalışmada sürgün rejenerasyonu için uygun bulunan 3 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA ortamına GA<sub>3</sub> ilave edilmesiyle yeni denemeler yapılması yararlı olabilecektir. Böylece hem sürgün sayısında artış sağlanabilecek hem de elde edilecek sürgünlerin alt kültüre alınması aşamasında daha kolay ayrılabilen gelişmiş sürgün sayısı artırılabilir.

### Alt kültür aşaması

TDZ'nin 5 farklı dozu ve NAA ile kombine edildiği ikinci 5 adet ortamdaki tek boğum eksplantları üzerindeki gelişmeyi gösteren görüntülere ise Şekil 8'de yer verilmiştir. Tek boğum eksplantlarının, başlangıçta kullanılan aynı BBD içeren 10 adet besin ortamına aktarım işlemi tamamlandıktan bir ay sonra yapılan sayım ve değerlendirmelerin sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir. Alt kültürler sonrasında oluşan bitki sayısı açısından en etkili ortam 3 mg/L TDZ içeren ortam olurken bunu 4 mg/L TDZ içeren ortam takip etmiş ve bu iki uygulama istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. 4 mg/L TDZ uygulaması ile oluşan kardeş bitkilerin 75 adedinin boyu 1 cm altında iken 81 adedinin boyu 1 cm üzerinde ölçülmüştür (Çizelge 3).

Yapılan çalışmada tek boğum eksplantları olarak hazırlanarak alt kültüre alınan eksplantlardan ortalama 11,5 adet sürgün/eksplant elde edilmiştir. Bu sayı, önceki çalışmaların oldukça üzerinde bir değere sahiptir. Uddin ve ark. (2017), 0,1-1,5 mg/L BAP ve GA<sub>3</sub> kombinasyonlarında alt kültüre alınan tek sürgünlerden en fazla 3,23 adet yeni sürgün geliştiğini bildirmiştir. Genotip farklılığının yanı sıra kullanılan dozların da daha düşük tutulmasının bu etkiye yol açmış olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, *in vitro* rejenere olan sürgünlerden hazırlanan tek boğum eksplantları, alt kültüre alma aşamasında kullanımı ve en uygun ortam bileşiminde 15,6 sürgüne kadar eksplant başına yeni aksillar sürgün gelişimi sağlanabilmiştir. Pop ve ark. (2016) tarafından yapılan denemede tek boğum kültürlerinden başarıyla aksillar sürgünler elde edilmiştir. Ancak bu kaynakta kullanılan BBD

dozlarının düşük olması elde edilen aksillar sürgün sayısının da sınırlı kalmasına neden olmuştur. Bizim çalışmamızdaki rejenerasyon sayıları gibi aksillar sürgün oluşturma kapasitesi de kullanılan nispeten yüksek dozların etkisiyle de daha fazla olmuştur.

4 mg/L TDZ+0,5 mg/L NAA ortamı, 1 cm altında oluşan bitki sayısı bakımından en yüksek değeri almıştır ve bu ortamı farklı grupta yer alan 4 mg/L TDZ uygulaması takip etmiştir. Diğer yandan 3 mg/L TDZ ortamı, 1 cm üstünde oluşan bitki sayısı bakımından en yüksek değeri almıştır ve bu ortamı farklı grupta yer alan 0,5 mg/L TDZ uygulaması takip etmiştir (Çizelge 3).



Şekil 8. TDZ'nin 5 dozu (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L) ve bunların 0,5 mg/L NAA ile kombinasyonunda gelişen lisianthus tek boğum eksplantlarında, kültüre alma işleminden 8 hafta sonraki *in vitro* bitkilerin görünümü.

Figure 8. The appearance of *in vitro* plants 8 weeks after culturing lisianthus single node explants in 5 doses of TDZ (0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 mg/L) and their combination with 0.5 mg/L NAA.

Çizelge 3. Alt kültür sonrasında oluşan toplam, 1 cm altı ve üstündeki bitki sayıları.

Table 3. Total number of plants shorter and longer than 1 cm after subculture.

BBD PGR	Konsantrasyon (mg/L) Concentration	Kültüre Alınan Bitki Sayısı Number of cultured plants	Oluşan Toplam Bitki Sayısı (*) Number of total regenerated plants	Oluşan Bitki Sayısı <1cm Number of regenerated plants <1cm	Oluşan Bitki Sayısı ≥1cm Number of regenerated plants ≥1cm
TDZ	0,5	10	133 ± 2,52 b	43 ± 1,73 f	90 ± 1,15b
	1	10	82 ± 1,53 i	60 ± 1,00 d	22 ± 1,15 h
	2	10	108 ± 0,58 c	46 ± 1,53 f	62 ± 1,15 e
	3	10	157 ± 1,53 a	60 ± 4,16 d	97 ± 5,51 a
	4	10	156 ± 2,31 a	75 ± 3,61 b	81 ± 1,53 c
TDZ+NAA	0,5+0,5	10	107 ± 0,58 c	55 ± 2,08 e	52 ± 1,53 f
	1+0,5	10	84 ± 2,00 e	62 ± 2,08 d	22 ± 0,58 h
	2+0,5	10	101 ± 1,00 d	68 ± 2,52 c	33 ± 1,53 g
	3+0,5	10	106 ± 0,58 c	36 ± 1,00 g	70 ± 1,53 d
	4+0,5	10	134 ± 1,53 b	80 ± 1,00 a	54 ± 1,53 f

Oluşan Toplam Bitki Sayısı (Number of total regenerated plants) → Ortam P<0,001. LSD: 2,96; CV: % 1

Oluşan Bitki Sayısı <1cm (Number of regenerated plants <1cm) → Ortam P<0,001. LSD: 4,53; CV: % 5

Oluşan Bitki Sayısı ≥1cm (Number of regenerated plants ≥1cm) → Ortam P<0,001. LSD: 3,18; CV: % 3

(\* Her bir sütunda aynı harfleri alan rakamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz; farklı harfleri alan rakamlar arasındaki farklılık önemlidir)

### **Köklenme aşaması**

Alt kültürde yeterli sürgün sayısı elde edildiğinden köklendirme denemesine geçilmiştir. Bu amaçla 1 cm'den büyük sürgünler her ortamdan 20'şer adet alınarak MS veya ½ MS ortamlarına herhangi bir BBD ilave edilmeksizin aktarılmış ve 4 hafta sonra aktarılan tüm sürgünlerin kölendiği belirlenmiştir. Köklenme oranı her iki aktarım ortamında da %100 olmuştur. Hatta bazı alt kültür ortamlarında (özellikle NAA katkısı bulunan ortamlarda) köklenmenin önceden de meydana geldiği gözlemlenmiştir. Lisianthus sürgünlerinin *in vitro* köklendirme aşamasında hormonsuz ½ MS ve tam MS ortamlarına aktarılmaları sonucunda köklenme oranları bakımından farklılık bulunmazken, denemeye alınan toplam 800 sürgün köklenmiş olup bunlardan 100 adedi dış koşullara alıştırılma aşamasına transfer edilmiştir. Dış koşullara aktarım için 4 haftasını tamamlayan köklenmiş sürgünlerin kullanımı uygundur.

Lisianthusun köklenme konusunda hiçbir sorunu bulunmadığı, hatta sürgün çoğaltım aşamasında da uzun süre bekletilen ortamlarda köklenmenin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bunun yanında köklendirme denemeleri kurularak sonuçlar elde edilmiştir. Bu aşamanın sonucunda, kullanılan ortamların tümünde köklenme meydana gelmiştir. Tam kuvvetteki MS tuzlarının kullanıldığı köklenme ortamları çoğu bitki türünde olumlu sonuçlar vermektedir (Németh, 1986). Bununla birlikte, makro ve mikroelementerin ½, ⅓ veya ¼ oranında seyreltilerek kullanıldığı ortamlar da köklenme için bazen daha iyi sonuçların elde edildiği çalışmalar mevcuttur (Skirvin ve ark., 1980; Lineberger, 1983). Uddin ve ark. (2017),

hormonsuz ½ MS ortamının lisianthusta köklenme için çalışmamıza benzer şekilde optimum koşullar olduğunu kaydetmiştir.

Lisianthus, *in vitro* uygulamalara hızlı cevap veren ve yoğun BBD dozlarına ihtiyaç duymayan bir bitki türü olarak gözlemlenmiştir. Bu durum köklenme aşamasında da kendini belli etmiştir. Düşük kuvvetteki sade ortamlar, daha sağlıklı bitkiciklerin elde edilmesini sağlamıştır. Köklenme oranları bakımından farklılık olmaksızın kullanılan ortamların ikisinde de %100 oranında köklenme gerçekleştiği için hem MS hem de yarı kuvvetteki hormonsuz MS ortamı başarılı bulunmuştur.

### **Dış koşullara alıştırma aşaması**

Köklenen lisianthus bitkicikleri fide harcına dikilmiş ve üzerleri birkaç gün kapatılmıştır. Tedrici olarak atmosfer koşullarına alıştırılan bitkicikler %100 oranında sağlıklı bir şekilde yaşamalarına devam etmiş ve seraya aktarılmıştır. Saksılara aktarılarak iklim odasında dış koşullara aktarılan fideler gibi, doğrudan viyollerdeki fide harcına aktarılarak serada gölgelendirme neti altında günde iki kez yapraklarına su püskürtülmek suretiyle 5 gün boşunca dış koşullara alıştırılan fideler de hiçbir kayıp olmaksızın canlılıklarını sürdürmüşlerdir. Lisianthus, doku kültürüne olumlu cevap veren ve kolaylıkla çoğaltılabilen bir tür olmasının yanı sıra dış koşullara adaptasyonu evresinde de yaşama oranı yüksekliği ile adaptasyon yeteneği güçlü bir bitki olduğunu kanıtlamıştır. Araştırmamızda gelişen fideler, daha büyük hacimli saksılara aktarılmış olup Antalya'daki kapalı seralarda geliştirilmişlerdir (Şekil 9).



Şekil 9. Dış koşullara aktarılan ve çiçeklenme aşamasına kadar geliştirilen *in vitro* çoğaltılmış lisianthus bitkileri.  
Figure 9. *In vitro* propagated lisianthus plants transferred to outdoor conditions and developed up to the flowering stage.

Torf: perlit karışımı, dış koşullara aktarım aşaması için uygun bulunmuştur. Herhangi bir enfeksiyon ile karşılaşılmamış ve tüm bitkiler sağlıklı bir şekilde gelişmiştir. Torf ile birlikte, su tutma ve köklerin havalanma ihtiyacını karşılayan vermikulit, perlit, kum gibi malzemelerin harç karışımına ilave edilmesinin; *in vitro* koşullardan çıkan bitkiciklerin dış koşullara aktarılmasında olumlu etkisi bulunmaktadır. Nitekim Bejaoui ve ark. (2023) da bir başka süs bitkisi olan kalanşo'nun doku kültüründe çoğaltılan bitkiciklerin toprağa aktarım aşamasında torf içerisine kum ve vermikulit katkılarının yapılmasını olumlu bulmuşlardır. Kabakçı (1996), lisianthusta *in vitro* koşullarda elde ettiği fideleri önce pomza ortamında dış koşullara alıştırdığını ve daha sonra toprak ortamına transfer ettiğini bildirmiştir. Bu aşamada farklı uygulamaların da yapılabileceği, *ex vitro* köklendirme denemeleri kurularak sonraki çalışmalarda lisianthusun dış koşullara aktarılma aşamasında aynı zamanda köklendirilebileceği yönünde bir izlenim oluşmuştur. Sonraki dönemlerde bu konu üzerinde çalışmalar yapılması faydalı olabilecektir. Böylece *in vitro*'da geçen süre azaltılarak daha ekonomik bir üretim döngüsü sağlanması mümkün görünmektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

*E. grandiflorum* türünde doku kültürüyle çoğaltma protokolü geliştirmek amacıyla gerçekleştirilen bu

araştırmada farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları, MS tuzlarının tam veya yarı kuvvette kullanılmaları konuları üzerinde uygulamalar yapılmış ve elde edilen bulgular değerlendirilmiştir. Buna göre çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. *Eustoma grandiflorum* türünde *in vitro* koşullarda yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonu sağlanmış, bitkicik elde edilebilmiştir. Kültürlerde kararma, kontaminasyon gibi sorunlarla karşılaşılmamış ve çoğaltım için protokol oluşturulmuştur.
2. Yaprak eksplantlarının, doku kültürü ile lisianthus çoğaltımı için elverişli bir eksplant kaynağı olduğu, uygun besin ortamı bileşimi seçildiğinde kesim yüzeylerinde kallus gelişiminin ardından doğrudan sürgün rejenerasyonu meydana getirdiği belirlenmiştir.
3. Sitokin ve oksin dengesi iyi ayarlandığında hem yeterli sayıda başlangıç materyali olarak sürgün farklılaşması oluşmakta, hem de oluşan bu sürgünler 1 cm'den büyük ve kolaylıkla alt kültürlere alınabilen (kompakt yapılı veya küme şeklinde olmayan) yapıda meydana gelmektedir.
4. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu için %20'lik sodyum hipoklorit kullanılabileceği ve ara sıra çalkalanarak 15 dk beklenip ardından 3 kez steril saf su ile durulama yapılması halinde temiz bir kültür süreci sağlanabildiği, herhangi bir kontaminasyon ile karşılaşmadığı belirlenmiştir.

5. Kontrol ortamı olarak kullanılan hormonsuz MS ortamında herhangi bir organogenesis olmadığı, sadece dokularda şişme ve çok hafif olarak kesim yüzeylerinde kabarmaların oluştuğu, lisianthusta *in vitro* rejenerasyon için BBD ihtiyacı olduğu belirlenmiştir.
6. BBD olarak 0,5 ve 3 mg/L TDZ içeren MS ortamlarının, yaprak eksplantlarından yeni lisianthus sürgünlerinin rejenerasyonu için iyi bir başlangıç ortamı olabileceği kanaatine varılmıştır.
7. Yaprak eksplantlarında 6.haftada sürgünlerin görüldüğü ve 8. hafta sonunda eksplant başına 10-15 arasında sürgün elde edildiği saptanmıştır.
8. TDZ'nin tek başına (1,0; 2,0; 3,0 ve 4,0 mg/L) veya NAA (0,5 mg/L) ile birlikte kullanımı, yaprak eksplantlarından çok fazla meristematik sürgün ucu farklılaşmasına neden olduğu tespit edilmiştir.
9. TDZ'nin 3 mg/L dozunda tek başına kullanımı hem yaprak eksplantlarından organogenesis için hem de tek boğum kültüründe sürgün proliferasyonu için kullanılabilir bulunmuştur.
10. Lisianthus türünde *in vitro* sürgünler kolaylıkla köklenmektedir. Bu amaçla hormonsuz MS veya ½ MS ortamları kullanılabilir. Köklenme oranı tüm ortamlarda %100 olmuştur.

Çalışmada elde edilen sonuçların, başta *in vitro* mutasyon ve genetik transformasyon gibi ıslah çalışmalarında kullanılabileceği, süs bitkileri konusundaki uzun döngülerin hızlandırılmasında hizmet edebileceği ortaya konmuştur. Geliştirilen protokoller ve öneriler sayesinde yeni çeşitlerin geliştirilmesi mümkün olabilecek, sektöre katkılar sağlanabilecektir.

## TEŞEKKÜR

Gizem GÖKÇE'nin yüksek lisans tezinden türetilen bu çalışmaya destek sağlayan Has Biotech A.Ş (Antalya) firmasına teşekkür ederiz. Ayrıca laboratuvar ve sera çalışmalarındaki desteklerinden dolayı sayın Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU ve Ebru AKYÜZ'e teşekkürlerimizi sunarız.

## LİTERATÜR LİSTESİ

- Akbari, H., R. Pajooheşgar, and N. Karimi. 2014. Evaluating the micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) as an important ornamental plant. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 4 (2): 596-602.
- Anonim. 2015. Lisianthus Yetiştiriciliği. [http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/lisianthus\\_yetistiriciligi](http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/lisianthus_yetistiriciligi).
- Anonymous, 2016. SAS Institute Inc. 2016. Cary, North Carolina, USA.
- Bejaoui, R. 2022. *In vitro* Micropropagation of Kalanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.). Doktora tezi. Ankara Uni. Fen. Bil. Ens. Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı- Ankara.
- Bejaoui, R., C. Gümüş, K. Sönmez, E. Kırbay, and Ş.Ş. Ellialtıoğlu. 2023. The Effects of Different PGR Contents on *in vitro* Organogenesis and Shoot Proliferation in Kalanchoe (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.). *In: 11th International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Rural Development*, 03-05 March. Muş Alparslan University, Muş – Türkiye. p. 995-1010. ISBN:978-625-7720-91-5.
- Deroles, S.C., S.E. Ledger, R.M. Miller, K.M. Davies, and N.K. Given. 1993. Transformation in *Eustoma grandiflorum* (lisianthus). *In Plant Protoplasts and Genetic Engineering III*. 22: 202-212
- Esizad, S.G., B. Kaviani, A. Tarang, and S.B. Zanjani. 2012. Micropropagation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), an ornamental plant. *Plant Omics* 5(3): 314-319.
- Everett, T.H. 1981. *The New York Botanical Garden Illustrated Encyclopedia of Horticulture*. Garland Publishing, New York, USA
- Furukawa, H. 1993. Some characteristics of regenerated plants from leaf and root explants of *Eustoma grandiflorum*. *Plant Tissue Culture Letters* 10(1): 98-99.
- Ghanati, F., F. Rezaee, and L.Y. Boroujeni. 2012. Micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) from different explants to flowering onset. *Iranian Journal of Plant Physiology* 3(1): 583-587.
- Gümüş, C. 2009. Batı Karadeniz Bölgesinde Salep Elde Edilmesinde Kullanılan Bazı Orkide Türlerinin (Orchidaceae) Çoğaltım Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar. Ankara Uni. Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı-Ankara.

- Handa, T., and S.C. Deroles, 2001. Transgenic *Eustoma grandiflorum* (Lisianthus). In Transgenic Crops III. Biotechnology in Agriculture and Forestry 48:107-122. Springer, ISSN:251- 3696.
- Harbaugh, B.K., M.L. Bell, and R. Liang, 2000. Evaluation of forty-seven cultivars of lisianthus as cut flowers. HortTechnology 10 (4): 812-815.
- Harbaugh, B.K., Roh, M.S., Lawson, R.H., and Pemberton, B. 1992. Rosetting of Lisianthus cultivars exposed to high temperature. HortScience 27 (8): 885-887.
- Haspolat, G., R. Bejaoui, E.G. Vural, and Ş.Ş. Ellialtıoğlu. 2020. Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) İslahı ve Gelecek Projeksiyonu. Ziraat, Orman ve Su Ürünleri Alanında Teori ve Araştırmalar II. 65-104.
- Kabakçı, M. 1996. *Lisianthus (Eustoma grandiflorum c.v. Royal)*'un Mikroçoğaltımı Üzerine Araştırmalar. Yüksek lisans tezi. Ege Uni. Fen. Bil. Ens. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı -İzmir
- Kaviani, B. 2014. Micropropagation of ten weeks (*Matthiola incana*) and lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) by using Kinetin (KIN), Naphthalene Acetic Acid (NAA) and 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D). Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus 13 (1): 141-154.
- Lineberger, R.D. 1983. Shoot proliferation, rooting, and transplant survival of tissue-cultured "Hally Jolivette" cherry. Hortscience, 18 (2): 182-185.
- Mousavi, E.S., M. Behbahani, E. Hadavi, S.M. Miri, and N. Karimi. 2012. Plant regeneration in *Eustoma grandiflorum* from axillaries buds (*Gentianaceae*). Trakia Journal of Sciences, 10 (2): 75-78.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15 (3): 473-497.
- Németh, G. 1986. Induction of Rooting. In Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees I. 1:49-64. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Nhut, D.T., N.S. Tuan, H.M. Ngoc, P.N. Uyen, N.T. Don, N.T. Mai, and J.T. Da Silva. 2006. Somatic embryogenesis induction from *in vitro* leaf cultures of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.). Propagation of Ornamental Plants 6 (3): 121-127.
- Ordogh, M., E. Jambor-Benczur, and A. Tilly-Mandy. 2006. Micropropagation of echo cultivars of *Eustoma grandiflorum*. Acta Horticulturae 725:457-460.
- Özkan, H. 2017. *Lisianthus [Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn. cv. 'Mariachi Pure White (F1)]* Süs bitkisinin organogenez ile mikroçoğaltımı. Yüksek lisans tezi. Kocaeli Uni. Fen Bil. Ens. -Kocaeli.
- Paek, K.Y., and E.J. Hahn. 2000. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36:128-132.
- Pop, R., M. Cantor, E. Buta, and I. Csete. 2016. *In vitro* plant propagation and crop improvement in Lisianthus russelianus Hook. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture 73 (2): 168-174.
- Rezaee, F., F. Ghanati, and B.L. Yusefzadeh. 2012. Micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* L.) from different explants to flowering onset. Iranian Journal of Plant Physiology 3 (1): 583-587.
- Semeniuk, P., and R.J. Griesbach. 1987. *In vitro* propagation of prairie gentian. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 8 (3): 249-253.
- Semeria, L., B. Ruffoni, M., Rabaglio, A. Genga, A.M. Vaira, G.P. Accotto, and A. Allavena. 1996. Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue Organ Culture 47:67-72.
- Skirvin, R.M., M.C. Chu, and H. Rukan. 1980. Rooting studies with prunus-supp *in vitro*. Hortscience 15 (3): 415-415.
- Tapkı, N., T. Kızıltuğ, and A.D. Çelik. 2018. Türkiye'de kesme çiçek üretim ve ticaretinde mevcut durum, sorunlar ve çözüm önerileri. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 6 (3): 313-321.
- TÜİK. 2020. Türkiye İstatistik Kurumu, Türkiye Süs Bitkileri Üretim Verileri. <https://biruni.tuik.gov.tr /medas/?kn =92&locale=tr>.
- Uddin, A.F.M.J., S.S. Rahman, H. Ahmad, S. Parvin, and K. Momena. 2017. *In vitro* regeneration of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Grise). International Journal of Business, Social and Scientific Research 5(2): 126-135.
- Yumbla-Orbes, M., A.C.F. da Cruz, M.V.M. Pinheiro, D.I. Rocha, D.S. Batista, A.D. Koehler, J.G. Barbosa, and W.C. Otoni. 2017. Somatic embryogenesis and de novo shoot organogenesis can be alternatively induced by reactivating pericycle cells in Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) root explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 53 (3): 209-218.
- Yumbla-Orbes, M., D.I. Rocha, E.M. de Matos, A.D. Koehler, M.V.M. Pinheiro, D.S. Batista, D.M.S. Freitas, A.C.F. da Cruz, J.G. Barbosa, L.F. Viccini, and W.C. Otoni. 2020. Somatic embryogenesis induced from vascular tissues in leaf explants of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) generates true-to-type diploid plants. Vegetos 33(1):135-144.