

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SOYA FASULYESİ [*Glycine max.* (L.) Merrill] BİTKİSİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE
MİKROÜRETİMİ ve SOMAKLONAL VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Özlem EFENDİOĞLU
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Musa TÜRKER

VAN-2008

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SOYA FASULYESİ [*Glycine max.* (L.) Merrill] BİTKİSİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE
MİKROÜRETİMİ ve SOMAKLONAL VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Özlem EFENDİOĞLU

VAN-2008

KABUL ve ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Musa TÜRKER danışmanlığında zlem EFENDİGLU tarafından hazırlanan “Soya Fasulyesi [*Glycine max.* (L.) Merrill] Bitkisinin Doku Kültüründe Mikroretimi ve Somaklonal Varyasyonların Ararştırılması ” isimli bu çalışma 20.02.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Peyami BATTAL

İmza

ye: Doç. Dr. Ahmet KAZANKAYA

İmza

ye: Yrd. Doç. Dr. Musa TÜRKER

İmza

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun...../...../..... Gün
ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Nahit AKTAş

Enstitü Müdürü

ÖZET

SOYA FASÜLYESİ [*Glycine max.* (L.) Merrill] BİTKİSİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE MİKROÜRETİMİ ve SOMAKLONAL VARYASYONLARIN ARARŞTIRILMASI

EFENDİOĞLU, Özlem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Musa TÜRKER

Şubat 2008, 46 sayfa.

Soya fasülyesi [*Glycine max.* (L.) Merrill] bitkisinin, Agrova SA88 varyetesi üzerinde *in vitro* klonal çoğaltım çalışması gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan fideler *in vitro* koşullarda çimlendirilmiştir. Çimlendirilen fidelerden alınan gövde ucu, boğum, yaprak, petiyol, kök, kotiledon, ve hipokotil eksplantları Murashige ve Skoog (MS) ve Gamborg's B5 ortamlarında farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) ile muamele edilip genotipin, kullanılan eksplantın ve BBD'nin soya fasülyesi bitkisinin klonal üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Oksin olarak 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit), IBA (İndol-3-bütirik asit) ve NAA (Naftalen asetik asit), sitokinin olarak da KN (Kinetin), BAP (Benzil amino pürin) ve *t-Z* (*trans*-Zeatin) farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda adventif sürgün rejenerasyonu için uygulanmıştır. Eksplantlara uygulanan BBD'nden BAP ve KN'in 2 ve 3 mg/l konsantrasyonlarında en iyi tomurcuk patlaması ve gövde gelişiminin olduğu gözlenmiştir (3-5 adet). Yaprak, petiyol ve kotiledon eksplantlarında ise *t-Z* ve 2,4-D'nin 2 mg/l ve 4 mg/l konsantrasyonları kallus gelişimine neden olmuştur. Gövde gelişimi gözlenen sürgünlerin köklendirilmesi için ise NAA ve IBA uygulanmış ve 2 mg/l IBA'nın kök gelişimini uyarmada en etkili BBD olduğu saptanmıştır. Gövde gelişimi ve köklendirilmesi tamamlanmış sürgünler gelişimlerini devam ettirebilmeleri için ayrıştırılarak BBD olmayan MS ortamına aktarılmıştır. Olgunlaşmış bitkiler daha sonra saksılara transfer edilerek sağlıklı fideler elde edilmiştir. Farklı BBD uygulanmış ortamlarda yetişen doku ve organlarda meydana gelmesi olası varyasyonlar RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) primerleri ile test edilmiş ve herhangi bir varyasyon gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Bitki büyüme düzenleyicileri, mikroüretim, somaklonal varyasyon, soya fasülyesi.

ABSTRACT

CLONAL PROPAGATION and SOMAKLONAL VARIATION OF SOYBEAN

[*Glycine max.* (L.) Merrill]

EFENDİOĞLU, Özlem

MSc. Biological Science

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Musa TÜRKER

February 2008, 46 pages.

Micropropagation applications on the Agrova SA88 variety of soybean [*Glycine max.* (L.) Merrill] were carried out. The seeds were surface sterilized and grown *in vitro*. The shoot tip, nod, leaf, petiole, root, cotyledon and hypocotyls explants from seedlings were incubated in Murashige and Skoog (MS) and Gamborg's B5 medium with different concentrations and combinations of plant growth regulators (PGR) to investigate the effect of genotype, PGRs and explant on clonal propagation of soybean. As PGRs, auxin and cytokinin in different concentration and combination for adventitious shoot and auxins for root regeneration were employed. Among the PGRs applications, BAP (Benzyl amino purine) and KN (Kinetin) were found to be most influential on adventitious shoot regeneration (3-5 buds) of soybean in 2 and 3 mg/l concentration. The *t*-Z (*trans*-Z) and 2,4-D (2,4-dicloro phenoxy acetic acid) in 2-4 mg/l concentration gave callus on leaf, petiole and cotyledon. The grown stem on explants were separated and incubated in MS medium with the PGRs of NAA (Naphthalene acetic acid) and IBA (Indole-3-butyric acid) for root development. 2 mg/l IBA was found to be more suitable for root development. The regenerated seedling were transferred PGRs-free MS medium for seedling development and the healthy individuals were acclimatize in pots and healthy plants were provided. Somaclonal variations were investigated with RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) primers on different tissues and organs regenerated with different PGR and no variation was found.

Key words: Micropropagation, plant growth regulators, somaclonal variations, soybean

ÖNSÖZ

20. yüzyılın ikinci yarısına damgasını vuran biyoteknolojinin tıp, eczacılık, gıda, tarım, hayvancılık, veterinerlik, ormancılık, madencilik, şehircilik, su arıtımı vb. gibi alanlarda yararları ve yeni kullanım yerleri her gün artmaktadır. Biyoteknolojinin uygulama alanları içinde en hızlı gelişme potansiyeline sahip olanlarının başında bitki biyoteknolojisi gelmektedir.

Türkiye’de 1970’li yıllarda başlayan bitki biyoteknolojisi çalışmaları önce doku kültürleri üzerinde yoğunlaşmış, 1990’ların başında ise hücre kültürü, moleküler biyoloji ve moleküler genetik teknikleri uygulamaları başlamıştır. Bugün kültürü yapılan birçok bitki türünün ürettiği etken maddeler laboratuarda üretilmektedir. Yine, tarımsal önemi olan genler değişik organizmalardan izole edilerek kültür bitkilerine kolaylıkla aktarılabilmektedir.

Gerek moleküler düzeyde yapılan gen aktarımı, gerekse bitki hücre kültürlerinde hücrelerde meydana getirilen manipülasyonların pratiğe aktarılıp ekonomik getiriye dönüştürülebilmesi ve bu hücrelerin, rejenere edilip bitkiye dönüştürülebilmesi için doku kültürü yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bazı bitki türleri tabi ortamda çevre şartlarına bağlı olarak bir takım üreme zorlukları yaşamakta veya tohumdan olgun bitki seviyesine kadar geçen süre çok uzun olmaktadır. Doku kültürü bu problemin aşılmasında çözümleri sunmaktadır.

Bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle iyileştirilmesinde doku kültürü yöntemlerine mutlak bir ihtiyaç vardır. Başka bir ifadeyle, doku kültürü teknikleri kullanılmadan bitkilerin genetik yolla iyileştirilmesi, en azından şu anda mümkün değildir. Bu nedenle bu çalışmanın bitki materyali ile uğraşan araştırmacılara ve bitki ıslahçılarına yardımcı olabileceğini kanaatindeyim.

Öncelikle bu çalışmayı tez projesi olarak destekleyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı’na, çalışmanın her aşamasında bilgi birikimi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren maddi ve manevi olarak destekleyen çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Musa TÜRKER’e ve laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Emre EREZ’e teşekkürlerimi sunarım.

VAN, 2008

Özlem EFENDİOĞLU

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	6
Adventif Sürgün Rejenerasyonu	7
2.1.1.Organogenesis	7
2.1.2. Somatik embriyogenesis	8
2.2. Klonal Üretim	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1. Materyal	12
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Yetiştirme yöntemleri	12
3.2.1.1. Toprakta yetiştirme yöntemleri	12
3.2.1.2. <i>İn vitro</i> yetiştirme yöntemleri	13
3.2.2. Ortam hazırlama yöntemleri	13
3.2.3. Sterilizasyon yöntemleri	15
3.2.3.1. Cam malzeme ve ekipmanların sterilizasyonu	15
3.2.3.2. Besin ortamı ve BBD sterilizasyonu	16
3.2.3.3. Bitkisel materyallerin sterilizasyonu	16
3.2.4. <i>İn Vitro</i> 'dan elde edilen soya fidelerinden eksplant izolasyon ile ilgili yöntemler	18
3.2.5. Rejenere olmuş soya sürgünlerinin köklendirilmesi ile ilgili yöntemler	18
3.2.6. Somaklonal varyasyonlar	18
3.2.6.1. Tampon ve stok çözeltiler	19

3.2.6.2. DNA ekstraksiyonu ve kantitatif tayini	19
3.2.6.3. RAPD primerleri ile DNA çoğaltımı	20
4. BULGULAR	21
4.1. Adventif Sürgün Rejenerasyonu	21
4.2. Rejenere Olan Adventif Sürgünlerin Köklendirilmesi	27
4.3. Eksplant ve Adventif Sürgünlerde oluşan Kontaminasyonlar	30
4.4. Somaklonal Varyasyonlar	32
4.4.1. DNA ekstraksiyonu	32
4.4.2 Ekstre edilen DNA örnüklerinin RAPD primerleri ile çoğaltılması	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Toprakta yetiştirilen soya fasulyeleri.	13
Şekil 3.2. Yüzeysel sterilizasyonu yapılmış olan soya fasulyesi tohumlarının MS ortamına inokülasyon şekli ve tohumların çimlenmeleri.	17
Şekil 4.1. 3 mg/l KN ortamına inoküle edilen kotiledon eksplantının köklenmesi.	22
Şekil 4.2. Farklı BBD konsantrasyonlarında oluşan sarı-yumuşak ve yeşil-sert kalluslar.	24
Şekil 4.3. 1 mg/l BAP ortamındaki eksplantlarda gözlenen tomurcuk patlaması.	25
Şekil 4.4. 3 mg/l BAP ortamına inoküle edilen tohum çimlenmesi.	25
Şekil 4.5. Adventif kök gelişimi.	28
Şekil 4.6. Köklenen soya fidelerinin BBD içermeyen MS ortamına aktarımı.	28
Şekil 4.7. MS ortamında büyüyen fidelerin saksılara aktarılması ve elde edilen yetişkin soya fasulyesi bitkisi.	29
Şekil 4.8. Saksılarda yetiştirilen soya fidelerinden alınan eksplantların kontaminasyonu.	31
Şekil 4.9. <i>İn vitro</i> yetiştirilen soya fidelerinin kontaminasyonu.	31
Şekil 4.10. Ekstre edilen DNA örnekleri.	32
Şekil 4.11. Ekstre edilen DNA örneklerinin SA-R primeri ile PCR reaksiyonunda çoğaltılması.	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Türkiye’de soya ekim alanı, üretimi ve verimi	3
Çizelge 1.2. Soya tohumlarında bulunan maddeler	4
Çizelge 3.1. Temel Murashige ve Skoog (1962) (MS) ortamı	14
Çizelge 3.2 Temel Gamborg’un B5 ortamı	15
Çizelge 4.1. Farklı <i>t</i> -Z ve KN konsantrasyonun değişik eksplantlarda adventif gövde üzerine etkileri	21
Çizelge 4.2. <i>t</i> -Z, KN ve 2,4-D konsantrasyonunda subkültüre alınmış eksplantlar üzerinde adventif gövde üzerine etkileri	23
Çizelge 4.3. Farklı BAP konsantrasyonun değişik eksplantlarda adventif gövde üzerine etkileri	24
Çizelge 4.4. Farklı BBD kombinasyonlarının eksplantlarda adventif gövde üzerine etkileri	26
Çizelge 4.5. BBD konsantrasyonu ve eksplantların adventif kök oluşumuna etkileri	27
Çizelge 4.6. Farklı koşullarda yetiştirilen tohumların çimlenme yüzdeleri	30

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μM	Mikromolar
g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
mg/ml	Miligram/mililitre
ml	Mililitre
mg/l	Miligram/litre
gr/l	Gram/litre

Kısaltmalar

BA	Benzil adenin
BAP	Benzil amino pürin
BBD	Bitki büyüme düzenleyicileri
2,4-D	2,4-Dikloro fenoksi asetik asit
GA ₃	Giberellik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
IBA	İndol-3-bütirik asit
IPA	İzopentenil adenin
KN	Kinetin
MS	Murashige ve skoog
NAA	Naftalen asetik asit
PAA	Fenoksi asetik asit
TDZ	Thidiazuran
<i>t-Z</i>	<i>trans</i> -zeatin
RAPD	Randomly Amplified Polimorphic DNA
PCR	Polimeraz Chain Reaction
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışı, çevresel ve coğrafi nedenlerden dolayı ekim alanlarının azalması, bilinçsiz tarım, çevre kirliliği ve kaynakların dengesiz kullanımı gibi nedenlerden dolayı Dünyanın pek çok bölgesinde açlık, kıtlık ve toplu ölümler gözlenmektedir. Bu sorunun çözümü bitkisel ve hayvansal üretimi arttırmak olarak düşünülmektedir. En önemli protein kaynağı olan hayvansal proteinlerin zor bulunması, pahalı olması, çabuk bozulması ve kolesterol içeriklerinin yüksek olması bitkisel proteinleri ön plana çıkarmaktadır.

Günümüzde insanoğlunun karşılaştığı en büyük sorun, artan nüfusun beslenmesidir. Bu amaçla kültür bitkilerinin ıslahı üzerinde binlerce yıldan beri çalışılmakla birlikte, ürünlerdeki nicelik ve nitelik artışı, ancak son 50 yılda geliştirilen ıslah yöntemleri ve uygun yetiştirme tekniklerinin modern teknolojiyle birleşmesi sonucunda gerçekleşebilmiştir. Islah edilmiş kültür bitkilerinin, yabani formlarıyla karşılaştırıldıklarında birçok mantar, bakteri ve virüs hastalıkları ile zararlılara karşı daha duyarlı olduğu, bu durumum genelde uygulanan ıslah yöntemlerinin eksikliğinden kaynaklandığı görülmüştür. Islah programlarında, seleksiyon çalışmalarında ürün kalitesi ve miktarı gibi özellikler ön planda tutulduğundan, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık her zaman ikinci planda kalmıştır (Özcan ve Özgen, 1996). Yıllardan beri bitkiler, hastalık ve zararlıların saldırılarına karşı kimyasal ilaçlarla korunmuş, ancak kullanılan bu ilaçların ayrıştırmadan uzun süre kalabilmeleri insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından giderek artan bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Kimyasal ilaçlar genelde mantarlara karşı etkili olmakla birlikte, virüs, viroid ve bakterilere karşı yetersiz kalmaktadır. Bu durum kültür bitkilerini hastalık ve zararlılardan korumak için alternatif ıslah yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Akı, 1997).

Dünya nüfusu beslenmesinde en çok kullanılan yaklaşık 30 bitki grubu içinde en önemlileri tahıllar, endüstri bitkileri, sebzeler, meyve ağaçları ve baklagillerdir. Bununla beraber dünya florasında yaklaşık 250 bin bitki türünün bulunduğu ancak bunlardan 3000 türün besin değerine sahip olduğu bildirilmektedir (Babaoğlu, 1998).

20. yüzyılın başlarına kadar sınırlı bir üretime sahipken bugün dünyanın en önemli bitkisel protein ve yağ kaynağı haline gelen soya fasulyesi [*Glycine max* (L.) Merrill] bitkisinin, böylesine önemli bir tarımsal ürün haline gelmesinde, süreklilik gösteren bir ıslah döngüsü içerisinde mevcut genotiplerin genetiksel açıdan iyileştirilmesi anahtar rolü oynamıştır. Zengin oranda besin maddeleri içeren tohumları itibariyle beslenme ve endüstride önemli bir yeri olduğundan birçok ülkede yetiştirilmektedir. Anavatanı Çin ve Mançurya'dır

(Markley,1950). Dünyada en çok soya fasulyesi yetiştiren ülkeler sırası ile ABD, Çin, Rusya, Brezilya, Endonezya, Kore, Japonya ve Kanada'dır. Bu ülkelere göre Avrupa'da Romanya, Yugoslavya ve Türkiye önemli ölçüde soya yetiştiren ülkelerdendir.

Ülkemizde 1950'li yıllarda başlanılan soya üretimi, Karadeniz ve Akdeniz Bölgeleri'nde yoğunlaşmıştır. Üretimin büyük çoğunluğunu elinde bulunduran Akdeniz Bölgesi'nde I. ve II. Ürün şeklinde yetiştirilen soya, Karadeniz Bölgesi'nde ana ürün olarak yetiştirilmektedir. Soya üretimi her ne kadar 1982 yılında ülke çapında ikinci ürün projesinin başlatılması ile çok hızlı bir artış göstermişse de daha sonraki yıllarda bazı ekonomik ve tarımsal nedenlerden dolayı azalmaya başlamıştır (İşler ve Çalışkan, 1998).

Soya, bitki gelişimi, verim ve kalite açısından ekolojik koşullara tepkisi oldukça yüksek olan kültür bitkilerindendir ve özellikle gün uzunluğu, soya çeşitlerinin adaptasyon alanlarını dar bir kuşak içerisine sınırlamaktadır. Yapılan çalışmalarda soya fasulyesinin farklı olgunlaşma grubuna giren çeşitlerin performanslarının bölgelere göre değiştiği gibi bir bölgede aynı olgunlaşma grubu içerisindeki çeşitlerin göstermiş olduğu performansların da farklı olduğu görülmektedir (İşler ve Çalışkan, 1998).

Yurdumuzda soyanın en çok yetiştirildiği bölgelerden biri olan Doğu Karadeniz'de yıllık yağış 729 mm kadardır ve Mayıs – Ekim ayları sırasında ısı toplam 3600 °C dir. Nisbi nemi %71 – 74 kadardır (Meteoroloji Bültenleri, 1971). Buna göre, yurdumuzun birçok bölgesinde sulama yapmadan soyanın bazı çeşitlerinin yetiştirilebileceği anlaşılmaktadır. Soya, hemen hemen her çeşit toprakta yetiştirilmektedir. Fakat verimli, killi veya kumlu – killi yumuşak topraklarda en iyi netice alınmaktadır (İlisulu, 1973).

1948 yılında uluslararası botanik kongresinde soyaya *Glycine max.* (L.) Merrill adı verilmiştir. Bitkinin sistematigi ise şöyledir:

Takım	: Rosales	: Güller
Familiya	: Leguminosae	: Baklagiller
Alt Familiya	: Papilionaceae	: Kelebek Çiçekliler
Cins	: Glycine	: Soya cinsi
Tür	: <i>Glycine max.</i> (L.) Merrill	: Soya (n=20)

Çizelge 1.1. Türkiye’de Soya Ekim Alanı, Üretimi ve Verimi (TÜİK, 1986 – 2005)

Yıl ar	Ekim Alanı (ha)	Üretim (ton)	Verim (kg/ha)
1986	90 000	200 000	2 222
1987	112 000	250 000	2 232
1988	66 000	150 000	2 273
1989	75 300	161 000	2 138
1990	74 000	162 000	2 189
1991	49 500	110 000	2 222
1992	46 000	95 000	2 065
1993	26 750	63 000	2 355
1994	29 000	70 000	2 414
1995	31 000	75 000	2 419
1996	20 500	50 000	2 439
1997	19 000	40 000	2 105
1998	23 000	60 000	2 300
1999	24 000	66 000	2 750
2000	15 000	44 500	2 967

1	200	17 000	50 000	2941
2	200	25 500	75 000	2 941
3	200	27 000	85 000	3 148
4	200	14 000	50 000	3 571
5	200	8 600	29 000	3 372

Soya tarımı 1981 yılında Türkiye’de başlatılmıştır. Ancak, 1987 yılında yıllık 250 bin ton soya üretimine ulaşılan ülkemizde soya tarımı hızla gerilemeye başlamış ve 2005 yılında da 29 bin ton olarak gerçekleştirilmiştir (Yılmaz ve Efe, 1998).

Çizelge 1.2. Soya Tohumlarında Bulunan Maddeler (Markley, 1950)

Maddeler	Ort. (En az–En çok) (%)	Maddeler	Ort. (En az–En çok) (%)
Su	8.0 (5.0 – 9.2)	Selüloz	3.5 (2.8 – 6.3)
Protein	40.0 (29.6 - 50.3)	Fosfos	0.6 (0.4 – 0.8)
Yağ	18.0 (13.5 - 24.2)	Potasyum	1.7 (1.3 – 2.2)
Kül(madeni md)	4.6 (3.3 – 6.5)	Kalsiyum	0.3 (0.2 – 0.5)
Pentozanlar	4.4 (3.8 – 5.5)	Kükürt	0.4 (--- ---)
Şekerler	7.0 (5.6 – 9.5)	Magnezyum	0.4 (--- ---)
Invert Şeker	5.8 (4.8 – 7.4)	Lesitin	1.0 (0.6 – 1.5)
(Taze tohumlarda)		Diğer Karbon-hidratlar	5.6 (4.6 – 8.9)

Soya, önemli bir besin kaynağıdır. Tohumu yüksek oranda ham protein içermektedir. Bu protein, kolay hazmolan proteinlerdendir. En çok Cholin, Pantothenic asit, Niacin, Thiamine, Riboflavin, İnositol, Vitamin E, Vitamin K içermektedir. Soya A ve B vitaminlerinin de kaynağıdır (Shurpalekar, 1961).

Soyanın %60 – 65'i ise küspedir. Soya küspesi dünya çapında çiftlik ve kümes hayvanlarının ana protein kaynağıdır. Dünyada üretilen yenebilir bitkisel yağın %30 – 35'ni soya karşılamaktadır (Yılmaz ve Efe, 1998).

Soya bir baklagil bitkisi olması sebebi ile ihtiyacı olan azotu havanın serbest azotunu kullanarak karşılamaktadır. Havadan sağlanan bu azot kendinden sonra gelen ürünün azot ihtiyacının bir kısmının da karşılanmasına yaramaktadır. Bu sayede daha az azotlu gübre kullanılmaktadır. Daha az azot kullanımı ülkenin akarsu kaynaklarında daha az nitrik birikmesini ve dolayısıyla daha az kirlenmesini sağlamaktadır. Bu yüzden iyi bir münavebe bitkisi olarak kabul edilmektedir.

Soyanın beslenme ve yağ eldesi adına önemi, 1940'lara kadar anlaşılamamıştır. 1940'lardan sonra soya yetiştiriciliği ve genetiği üzerinde Amerika'da yoğun araştırmalar başlatılmıştır (Fehr, 1987). Öyle ki aşırı yağlı besinlerle kolesterol yüklemesi yapan Amerikalılar kurtuluşu soya fasulyesinde aramışlardır. Yapılan araştırmalar ile soya fasulyesinin kolesterolü düşürdüğü, göğüs kanserini önlediği ve kemikleri güçlendirdiği tespit edilmiştir.

Soya fasulyesinin ürün verme süresi tohumdan itibaren yaklaşık olarak 120 gündür (Yılmaz ve Efe, 1998). Bu süre kısa zamanda ürün elde etmek isteyenler için oldukça uzun bir süredir. Doku kültürü ortamında bu süre kullanılan yöntemle bağlı olarak 1 aya kadar düşürülebilmektedir.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Bitki doku kültürü alanında ilk çalışmalar 19. yüzyılın sonları ve 20. yüzyılın başlarında yapılmıştır. Ancak kullanılan eksplantların ve yetiştirme ortamlarının uygun olmayışı sebebiyle başarı sağlanamamıştır. Özellikle 1960'lı yıllarda uygun besin ortamlarının bulunmasından sonra, bu konudaki çalışmalar daha da artmış ve son 25 yıllık dönemde diğer biyolojik alanlarda olduğu gibi bu alanda da gözle görülür ilerlemeler kaydedilmiştir. Bugün doku kültürlerinden elde edilen sonuçlar laboratuvar dışına çıkarak pratikte ve ticarete kullanım alanı bulmuş olup gelişen teknikler her geçen gün daha da önem kazanmaktadır (Er ve Canpolat, 1992).

Bitki biyoteknolojisi ile ilgili araştırma yapan araştırmacıların büyük bir çoğunluğu doku kültürü ile uğraşmaktadır. Bu gün bu sayının en az ikiye katlandığı söylenebilir. Üzerinde çalışılan bitkiler sırasıyla tahıl, baklagil, sebze, meyve, çiçek, odunsu bitki ve yağlı tohum türleridir.

Gözen *ve ark.* (1995) tarafından yapılan bir araştırmada ekonomik önem ve teknik uygunluk (uygulamada kolaylık), çalışılacak bitki türünün seçiminde en önemli kriterler olarak tespit edilmiştir. Yine aynı araştırmaya göre ortaya çıkan ve Dünyadaki genel durumla da paralellik gösteren sonuç sosyo-ekonomik değeri yüksek olan türlerin doku kültürünün daha zor olması nedeniyle bu türlerdeki gelişmenin daha yavaş olduğu (örnek: buğday, şeker pancarı, pamuk, mısır) ve araştırmalarda sırasıyla yağ bitkileri, endüstri bitkileri, sebzeler, meyveler ve tahıllara öncelik verilmesi gerektiğidir.

Türkiye'de 25 yıl önce başlayan bitki biyoteknolojisi çalışmaları, başlangıçta doku kültürleri üzerinde yoğunlaşmış, son 10 yılda da moleküler biyoloji ve moleküler genetik teknikleri ile bütünleşmeye başlamıştır. Bu araştırmalarda virüssüz meyve ve asma fidanı üretimi, dihaploid hatların üretimi ile ıslah süresinin kısaltılması ve hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, kısa sürede çok verim elde etme gibi konularda pratik sonuçlar elde edilmiştir. Doku ve organ kültürleri aynı zamanda genetik manipülasyonlara da imkan sağlayan ortamlardır. Kültür ortamlarında bitki üretimi, yani mikroçoğaltım yöntemleri şu şekilde gruplandırılabilir.

- a) Adventif sürgün rejenerasyonu
 - Organogenesis
 - Somatik Embriyogenesis
- b) Klonal üretim

2.1. Adventif Sürgün Rejenerasyonu

Bitkilerden izole edilmiş bir sürgün, kök, yaprak, çiçek, hatta organize olmamış kallus gibi dokulardan bütün bir bitki rejenere edilebilir (Gönülşen, 1987). *İn vitro*'da hücre ve dokulardan sürgün rejenerasyonunu başarmak için uygun eksplantın seçilmesi, büyümede aktif maddeleri içeren uygun ortamın belirlenmesi ve fiziksel çevre koşullarının uygun olması gerekmektedir (Murashige, 1974; Evans ve Reed, 1981; Ammirato, 1983).

Doku kültüründe en çok kullanılan temel ortam, Murashige ve Skoog (1962) geliştirdiği MS besin ortamı ve B5 ortamıdır. Bitki rejenerasyonunda kullanılan besin ortamları bitki büyümesi için gerekli olan makro ve mikro elementler içerir. Bu ortamlara enerji kaynağı olan şeker ve katılaştırıcı olarak agar ilave edilerek katılaştırılır.

Besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) de bitki rejenerasyonuna etki eden önemli faktörlerdendir. Genelde yüksek oranda İndol-3-asetik asit (IAA), İndol-3-bütirik asit (IBA), Naftalen asetik asit (NAA), 2,4-Dikloro fenoksi asetik asit (2,4-D) gibi oksin grubu hormonları kallus ve kök gelişimini teşvik ederler (Miller ve Skoog, 1953; Paulet, 1965; Nitsch, 1968). Kallus, düzensiz bölünen, organize olmamış hücreler kümesidir (Gamborg ve Shyluk, 1981). Adventif sürgün rejenerasyonunu Benzil amino pürin (BAP), Zeatin (Ze), Kinetin (KN), İzopentenil adenin (IPA) gibi sitokinin grubu hormonları ise adventif sürgün rejenerasyonunu teşvik ederler.

Bitki hücre ve kallus dokularından *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonu, organogenesis ve somatik embriyogenesis olmak üzere iki şekilde gerçekleşir.

2.1.1. Organogenesis

Normal bir bitkinin tohumunu oluşturan hücreler, büyüme ve farklılaşma geçirerek kök, gövde, yaprak gibi bitkinin farklı organlarını oluşturur. Farklı hücre tiplerinin ortaya çıkmasına yol açan bu değişiklikler bitkinin normal hayat döngüsü boyunca devam eder.

Doku kültürü ortamında ise hücrelerin bölünmeleri sonucunda ya doğrudan adventif sürgün veya kök (direkt organogenesis) ya da hücreler yığını olan kallus oluşur. Bu kallustan ise sürgün veya kök meydana gelir (indirekt organogenesis) (Gürel, 1997). İndirekt organogenesisde eksplant belirli bir form ve polaritesi olmayan hücre yığınlarının (kallus) oluşması için uyarılır. Daha sonra bu kallus üzerinde meristematik bir merkez ve ardından sürgün ya da kök oluşumu gözlenir. Direkt organogenesisde ise hiç kallus gelişimi olmadan

sürgün oluşumu gözlenir. Organogenesis hücre ve dokulardan yeni bir bitki oluşmasını sağladığı için generatif yollardan çoğaltılması zor olan bitki türlerinin çoğaltılmasında tercih edilebilir.

2.1.2. Somatik embriyogenesis

Somatik hücrelerden elde edilen embriyolara somatik embriyo, adventif embriyo veya vejetatif embriyo adı verilir. Somatik embriyoların gelişimi de zigotik embriyoların gelişimine benzer. Somatik embriyogenesis için değişik bitki kısımları kullanılır. Özellikle olgunlaşmamış zigotik embriyolar başta olmak üzere çiçek kısımları, anterler, polen ve endospor dokularının somatik embriyogenesis için bir başlangıç olduğu bildirilmiştir (Sharp ve ark., 1983; Pierik, 1987; Er ve Canpolat, 1992).

Somatik embriyogenesis de direkt ve indirekt olmak üzere iki tipte oluşur. (Sharp ve ark., 1983). Direkt somatik embriyogenesisde somatik embriyolar hücre ya da dokudan ara bir kallus oluşturmada gelişirler. Bu tip embriyogenesis genellikle bitkilerin gövde ve epidermal hücreleri eksplant olarak kullanıldığında görülür (Pierik, 1987). İndirekt somatik embriyogenesisde ise kültüre alınan protoplast ya da eksplantlardan önce kallus oluşumu gözlenir, ardından kalluslar üzerinde embrioidler oluşur. Embriyo ve embrioidler tek hücreden gelişebildiği gibi hücre gruplarından da gelişebilir (Evans ve ark., 1981). Somatik embriyogenesis'in teşviki için öncelikle hücre veya eksplantlar yüksek oksin içeren (genellikle 2,4-D) besin ortamında kültüre alınırlar. Daha sonra da oksin içermeyen ortama aktarılırlar. Somatik embriyogeneze özellikle sıvı kültürlerde ve biyoreaktörlerde kitlesel üretim için oldukça uygun yöntemdir.

2.2. Klonal Üretim

Mikroüretim olarak adlandırılan klonal üretim, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embryo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanabilir. Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyacı, hormon ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester, 1975). Bitkilerin *in vitro* üretimi,

kullanılan eksplantın özelliğine göre (embriyo, meristem, anter, hücre veya protoplast kültürü vb.) adlandırılır. Ancak çoğunlukla üretimde tek-boğum yöntemi, aksiller dallanma, adventif sürgün ya da tomurcukların rejenerasyonu, kallus, hücre ve protoplaslardan bitki rejenerasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Klonal çoğaltım amacı ile kullanılan *in vitro* teknikler mikroçoğaltım teknikleri olarak da ifade edilir. Mikroçoğaltımın genel olarak bitki yetiştiriciliği ve genetiği yönünden önemi ve avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- a. Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi
- b. Kitlesel üretimde aşağıdaki yararların sağlanması:
 - üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite)
 - alışlagelen yöntemlerden daha kısa kültür süresi
 - zor üretilen türlerin daha kolay üretimi
 - seçilen belirli / üstün genotiplerin hızlı üretimi
 - üretimde daha az anaç kullanılması
- c. Somaklonal varyasyondan dolayı yeni çeşitlerin/genotiplerin elde edilmesi

(Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Kültür ortamında soya fasulyesi ile yapılan çalışmalar özellikle somatik embriyo üzerinde yoğunlaşmıştır. Lipmann ve Lipmann (1984) 2,4-D, 2,4,5-T, NAA, IAA ve IBA ortamında meristematik doku ve kotiledon kullanarak doğrudan embriyoidler elde etmişlerdir.

Hammatt ve Davey (1987), zigotik embriyo kullanarak B5 ortamında IBA ile somatik embriyo elde etmişlerdir.

Lazeri ve ark. (1987a) yaptıkları somatik embriyo çalışmasında gelişmemiş zigotik embriyo ve kotiledonlardan MS ortamında NAA, 2,4 – D, BAP ve IBA kullanarak somatik embriyo elde etmişlerdir. Bu çalışmada oksin ve türevlerinin daha verimli olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yine Lazzeri ve ark. (1987b) olgunlaşmamış soya fasulyesi embriyolarını ve kotiledonlarını kullanarak MS ortamının temel besin maddeleri B5 ortamı vitaminleri ve NAA kullanarak somatik embriyo elde etmişlerdir.

Soya fasulyesi bitkisi üzerinde yapılan somatik embriyo çalışmasında, 2,4 – D, NAA, KN, BA ve IAA içeren MS ortamında tam gelişmemiş embriyolardan kallus elde edilerek, önce katı kültür ortamından daha sonra da sıvı kültür ortamından embriyolar elde edilmiştir (Li ve ark., 1985).

Rajasekaran ve Pellow (1997) soya fasulyesi bitkisinin epikotil ve tohumdan gelişen ilk yapraklarından somatik embriyo elde etmişlerdir. En iyi sonuç MS ortamında bitki büyüme maddelerinden 2,4-D ile elde edilmiştir.

Jang ve ark. (2001) sıvı kallus kültüründen somatik embriyo elde etmişlerdir.

Soya fasulyesinde organogenez çalışmaları da yapılmıştır. Write ve ark. (1986) *Glycine max.* üzerinde yaptıkları organogenez çalışmalarında MS ortamında BA kullanarak nodlardan tomurcuk ve gövde elde etmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışma da ise soya fasulyesi tohumları MS ortamında 5 M BA kullanılarak çimlendirilmiştir. Elde edilen fidelerin epikotillerindeb SH ortamında 20 M Kinetin kullanılarak bitki gövdecikleri elde edilmiştir (Write ve ark., 1987).

Dan ve Reichert (1998) soya fasulyesi bitkisinin hipokotillerini kullanarak adventif kök üretimini başarmışlardır.

Kim ve ark. (2001) oksin ve sitokininlerin soya fasulyesi organogenesis üzerine etkilerini araştırmışlardır.

Yine soya fasulyesi üzerinde yapılan organogenez çalışmalarında White hilum besi ortamında TDZ ve BA kallanılarak kotiledon nodları üzerinde tomurcuk oluşumları gözlenmiştir. Rejenere edilen tomucuklar hormonsuz ortamda köklendirilmiştir (Shan ve ark., 2005).

Bitki hücre ve doku kültürü çalışmaları *in vitro* şartlarda gerçekleştirildiği için, rejenerasyonun yapıldığı fiziki ortam şartlarından veya ortamda kullanılan kimyasal maddelerden kaynaklanan gen düzeyinde birtakım farklılıkların meydana gelmesi muhtemeldir. Bu değişikliklere somaklonal varyasyonlar denir. Bu değişiklikler doku kültürü çalışmalarının her safhasında meydana gelebilir. Somaklonal varyasyonların nedenleri; bitkinin genotipi, ortam komponentleri ve kullanılan doku kültürü yöntemleri olabilir. (George and Sherrington, 1984; Karp, 1989). Örneğin ortamda kullanılan yapay bir oksin türevi ve aynı zamanda herbisit olarak bilinen 2,4-D'nin havuç hücre kültüründe DNA'nın metilasyonuna ve dolayısı ile havuç kültürünün gelişmemesine neden olduğu kaydedilmiştir. (LoSchiavo ve ark., 1989). Yine yüksek konsantrasyonlu oksin ve sitokinin'in deforme olmuş ve birbirinden ayrılmayan gövde sürgünü oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Verga ve ark., 1988). RAPD markırları ile *Pinus thunbergii* bitkisinin doku kültüründe yapılan testlerde herhangi bir varyasyona rastlanmamıştır (Goto ve ark., 1998). Freytag ve ark. (1989) soya fasulyesi kültürlerinde yaptıkları somaklonal varyasyon testlerinde BBD ile rejenere edilen soya fidelerinde herhangi bir değişiklik gözlememişlerdir. Barwale ve Widholm, (1987) doku kültüründe embriyogenik ve organogenik kültürlerde rejenere ettikleri soya bitkilerinde kısmi

albinoluk, ikiz embriyolar, birden fazla ve cüce gövdeler, anormal yaprak morfolojisi ve yaprak kıvrımları, kısırılık ve klorofil eksiklikleri gözlemiştir.

Gesteira ve ark. (2002) somatik embriyolardan rejenere ettikleri soya fasulyesi bitkilerinde RAPD primerleri kullanarak yaptıkları somaklonal varyasyon testlerinde polimorfizm gözlemiştir. Roth ve ark., (1989) RFLP (Restricted fragment length polymorphism) primerleri kullanarak soya kültürlerinde yaptıkları genetik varyasyon testlerinde polimorfizm gözlemiştir.

Bitki hücre ve doku kültürlerinde rejenere edilen fidelerde somaklonal varyasyon testleri oldukça tatmin edici sayıda bulunmaktadır. Soya fasulyesi kültürlerinde yapılan genetik kararlılık testleri de yine tatmin edici düzeydedir. Literatürde yer alan çalışmalarda somaklonal varyasyon tespitleri rapor edilmekle beraber bazı çalışmalarda da somaklonal varyasyon gözlenmediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada da klonal üretim yöntemi kullanılarak yapılan soya üretimi çalışmasında kullanılan BBD çeşidine bağlı olarak ortamda kallus, adventif sürgün ve kök gelişmesi gözlenmiştir. Bu nedenle rejenere edilen bu organlarda ve fidelerde somaklonal varyasyon meydana gelip gelmediğini test etmek amacı ile RAPD testi uygulanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada soya fasulyesi [*Glycine max.* (L.) Merrill] bitkisinin Agrova SA88 varyetesi kullanılmıştır. Soya fasulyesi tohumları Adana Tarım İl Müdürlüğünden temin edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yetiştirme yöntemleri

3.2.1.1. Toprakta yetiştirme yöntemleri

In vitro denemelerde kullanılan bitkisel materyalin eldesi için soya fasulyesi [*Glycine max.* (L.) Merrill] saksılarda yetiştirildi. Her bir saksıya 5'er adet tohum gelecek şekilde 5 adet saksıda ekim gerçekleştirildi. Saksılara, 3:1 oranında hazırlanan toprak: kum karışımı koyularak yetiştiricilik için gerekli olan toprak kalitesi elde edildi. Sulama iki günde bir kere olmak üzere sabah saatlerinde yapıldı (Şekil 3.1). Çalışmada aynı zamanda Steril Murashige ve Skoog (MS) ve Gamborg's B5 (B5) ortamlarında *in vitro* şartlarda fideler yetiştirildi.



Şekil 3.1. Toprakta yetiştirilen soya fasulyeleri.

3.2.1.2. *İn vitro* yetiştirme yöntemleri

İn vivo'ya alternatif steril olarak yetiştirilmiş olan fidelerin kullanılması düşünüldü. Bu amaç doğrultusunda, elimizde soya fasulyesi tohumlarının önce yüzey sterilizasyonları yapıldı. Daha sonra steril saf su ile yıkanan tohumlar her bir erlene üç tohum gelecek şekilde 5 tekrarlı olarak MS ve Gamborg's B5 ortamlarına ekildi. Tohum ekiminden sonra erlenler 16 saat ışık, 8 saat karanlık uzun gün koşullarında iklim dolabına aktarıldı. Ortam sıcaklığı 25 ± 2 °C de sabit olarak ayarlandı. Tohumlar çimlendikten sonra fideciklerinin denemeler için gereken büyüklüğe erişmesi için 3 hafta bekletildi, daha sonra 3 haftalık fideciklerden alınan gövde ucu, boğum, hipokotil, kotiledon, kök eksplantları uygun büyüklükte kesilerek hazırlanan çeşitli besi ortamlarına aktarıldı.

3.2.2. Ortam hazırlama yöntemleri

Besi ortamı doku kültürü çalışmalarında başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Besi ortamlarının bileşimleri bitkisel materyale ve çalışmanın amacına göre değişiklik gösterir. Çalışmamızda MS ve Gamborg's B5 ortamları ile bu ortamlara farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) farklı konsantrasyonlarının eklenmesi ile oluşturulmuş besi ortamları kullanıldı (Çizelge 3.1 ve 3.2).

Çizelge 3.1. Temel Murashige ve Skoog (1962) (MS) Ortamı

Bileşikler	Konsantrasyon (mg/l)
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Glycine	2.0
Nicotinic Acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
myo-inositol	100

Bitki büyüme düzenleyicilerinden olan oksin ve sitokininlerin stok solüsyonları hazırlanarak bunlar MS ve Gamborg's B5 ortamlarına eklendi. Çalışmamızda kullanılan MS ve Gamborg's B5 ortamlarının içeriğinde mineraller, vitaminler, aminoasit, tuz, karbon kaynağı olarak % 3 sukroz ve ortam katılaştırıcı olarak da % 0.8 agar kullanılmıştır (Çizelge 3.1 ve 3.2). Hazırlanan tüm ortamların pH düzeyleri 5.8 olarak ayarlandı.

Çizelge 3.2. Temel Gamborg's B5 Ortamı

Bileşikler	Konsantrasyon (mg/l)
CaCl ₂ .2H ₂ O	150
KNO ₃	2500
(NH ₄) ₂ SO ₃	134
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	150
MgSO ₄ 7H ₂ O	250
MnSO ₄ . H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.0
H ₃ BO ₃	3.0
KI	0.75
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Nicotinic Acid	1.0
Thiamine-HCl	10.0
Pyridoxine-HCl	1.0
myo-inositol	100

3.2.3. Sterilizasyon yöntemleri

Doku kültürü çalışmaları sırasında mikroorganizmaların meydana getirebilecekleri kontaminasyonlar, çalışmanın her aşamasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Çünkü bitkisel materyalin kültüre alındığı besi ortamları mikroorganizmaların üremesi için çok elverişlidir. Bu nedenle steril çalışmak birinci koşuldur. Kullanılacak her türlü malzemenin, hazırlanan besin ortamlarının, kullanılacak bitkiye ait olan tohumların ve her türlü bitkisel materyalin sterilizasyon yöntemlerinden birisi ile steril edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda kullandığımız laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonunda, besin ortamının sterilizasyonunda ve eksplant sterilizasyonunda çeşitli yöntemler kullanıldı.

3.2.3.1. Cam malzeme ve ekipmanların sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında çok sayıda laboratuvar malzemesi kullanılmaktadır. Bunların çoğunu cam eşyalar oluşturmaktadır, bunun yanı sıra pens, kesici aletler, alüminyum folyo vb. malzemeler de kullanılmak zorundadır. Denemelerimizde kullanılan cam

malzemelerin tümü öncelikle deterjanlı su ile yıkanarak organik maddelerden arındırıldı. Petriler ve erlenlerin ağızları alüminyum folyo ile paketlenmiştir ve pens, bistüri gibi ekipmanlarla birlikte 121°C 1.5 atmosfer basınç altında de 20 dk. otoklavda tutularak sterilizasyon gerçekleştirildi.

3.2.3.2. Besin ortamı ve BBD sterilizasyonu

Bu çalışmada, kullanılmış olan tüm besin ortamlarının sterilizasyonu 121°C de 1.5 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak gerçekleştirildi. Bu süre ortam hacmine bağlıdır. Aynı hacimdeki bir ortam daha uzun sürede karamelize olabilir.

Çalışmada kullanılan BBD'ler Merck ve Sigma şirketlerinden temin edildi. Zeatin'in trans formu kullanıldı. BBD'ler uygun çözücülerde çözdürüldükten sonra istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlandı. Stok çözeltiler 1g/l olarak hazırlanmış ve 4°C'de saklandı. Çalışmanın amacına uygun olarak bu stoklardan 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 ml/l olacak şekilde seyreltilerek besi ortamına ilave edildi. BAP, KN, *t*-Z, IBA, 2,4-D ve NAA içeren besi ortamları otoklavda 121°C de 1.5 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

Çalışmamızda kullandığımız besi ortamlarının tümüne otoklavlanmadan önce agar eklendiğinden dolayı, ortam katılaşmadan steril edilmiş olan kültür kaplarına (erlen, petri) boşaltıldı. Ortamı kültür kaplarına sıcak bir halde aktarmak kontaminasyon riskini büyük ölçüde engellemektedir. Kullanılan petrilerin etrafları parafilm ile iki üç kat kuşatılıp besi ortamlarının dış ortamdan izole edilerek ve ekim için hazır hale getirildi.

3.2.3.3. Bitkisel materyallerin sterilizasyonu

Her bitki tohumunun yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresi farklıdır. Dolayısıyla en uygun dezenfektan dozu ve sterilizasyon süresinin belirlenmesi önemlidir (Yıldız, 2000). Tohum yüzey sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat ve antibiyotikler kullanılabilir. Ancak ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) en yaygın kullanıma sahiptir (Özcan ve Özgen, 1996).

Sağlam olarak seçilmiş olan soya fasulyesi tohumları önce 5 dk steril saf su içerisinde bekletilmiştir, buradan alınan tohumlar farklı sürelerde %70' lik etanol (EtOH) ve % 5-10'

luk hipoklorit (NaOCl-amaşır suyu) içersinde bekletildi. Bu aşamadan sonra soya tohumları steril saf su ile 3 kez durulanarak, otoklavlanmış kurutma kağıtları üzerinde suları alınmıştır ve gerekli besin ortamlarına her erlene 3 adet tohum gelecek şekilde inoküle edilerek bu ortamlarda imlendirildi (şekil 3.2).



şekil 3.2. Yüzeysel sterilizasyonu yapılmış olan soya fasulyesi tohumlarının MS ortamına inokülasyon şekli ve tohumların imlenmeleri.

Başlangıçta saksılarda yetiştirilen fideliklerden 1 cm kesilerek alınan gövde ucu, boğum, hipokotil, petiyol eksplantları yüzeysel sterilizasyon amacı ile öncelikle saf suda bekletilerek toz ve kirletici partikülleri uzaklaştırıldı. Daha sonra 2 dk. sürelerde %70' lik etanol (EtOH) ve 10 dk. % 5-10' luk hipoklorit (NaOCl-amaşır suyu) içersinde bekletildi. Son aşamada ise 3 kere steril edilmiş saf su ile durulanarak, otoklavlanmış olan kurutma kağıtları üzerine konarak üzerlerindeki fazla su alındı ve petrilerdeki ortamlara inoküle edildi.

In vitro şartlar altında yetiştirilen fideler zaten steril olduklarından bu tip bitkisel materyaller için sterilizasyon işlemine gerek duyulmadı. Bu *in vitro* fidelerden eksplantlar alınarak doğrudan gerekli besi ortamlarına aktarıldı.

3.2.4. *İn vitro*'dan elde edilen soya fidelerinden eksplant izolasyon ile ilgili yöntemler

İn vitro ortamda steril olarak yetiştirilen soya fidelerinden gövde ucu, boğum, hipokotil, kök ve petiyol eksplantları 1 cm uzunluğunda kesilerek rejenerasyon ortamına aktarıldı. 90 x 15 mm steril petri kutularında MS ortamında uygun BBD konsantrasyonları eklenerek 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodunda $500 \mu\text{molm}^{-2}\text{sec}^{-1}$ floresans ışıklandırmasında iklim dolabında (Fitotron, Sanyo, Gellenkamp PLC, UK), 25 ± 2 °C sıcaklıkta inkübe edildi.

Tarla şartlarında yetiştirilen bitkilerden alınan soya tohumları yüzey sterilizasyonuna tabii tutulmuş, meyve kabuğu soyularak elde edilen kotiledonlar düz kısımları üste gelecek şekilde rejenerasyon ortamına konuldu. Doku kültürü ile ilgili bütün çalışmalar steril hava akışlı kabin (Laminar Flow Cabin) içerisinde yapıldı.

3.2.5. Rejenere olmuş soya sürgünlerinin köklendirilmesi ile ilgili yöntemler

Rejenere olan sürgünler belirli bir uzunluğa geldikten sonra steril cam kavanozlar içinde farklı konsantrasyonlarda IBA içeren köklendirme ortamına aktarıldı. Burada köklenen sürgünler saksılara aktarıldıktan sonra iklim dolabında çevre şartlarına uyumu sağlandı.

3.2.6. Somaklonal varyasyonlar

Soya fasulyesinin klonal üretimi esnasında meydana gelen kallus, adventif sürgün ve doğal ortamda yetişen bitkilerden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Seçilen örneklerin farklı BBD ile üretilmiş doku ve organlar olmasına özen gösterilmiş ve bu amaçla 2,4-D ile üretilmiş kallus, Kinetin ve BAP ile çoğaltılmış adventif sürgün, BAP ile elde edilmiş kallus ve doğal ortamda yetiştirilmiş soya fidesi kullanılmıştır. Ekstre edilen DNA materyalleri, çimlendirilmiş tek bir tohumdan elde edilen bir fideden kaynaklanan eksplantlardan elde edildi. DNA ekstraksiyonunda kullanılacak tüm malzeme ve çözeltiler otoklavda sterilize edildi.

3.2.6.1. Tampon ve stok çözeltiler

Ekstraksiyon tamponu: 2% cTAB (Sigma Chemical Co., Poole, UK.), 1% PVP 40.000 (Sigma Chemical Co., Poole, UK.), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) (Boehringer Mannheim, Lewes UK.), 20 mM EDTA (Sigma Chemical Co., Poole, UK.) pH: 8.0 pH 1 M NaOH ve 1 M HCl ile ayarlandı, 1.4 M NaCl. Ekstraksiyon tampon çözeltisi bidistile ve steril su ile 100 ml ye tamamlandı.

TBE Tamponu: (5 X Stok): 1.4 M Tris, 1.4 M Boric acid (BDH, Merck Ltd., Poole, UK.), 0.01 M EDTA

DNA yükleme tamponu: 25 % sukroz, 0.05% w/v bromophenol blue, Xylene cyanol FF (Sigma Chemical Co., Poole, UK.), Sure cut buffer H (Boehringer Mannheim, Lewes UK.).

Jel Boyama: Ethidium bromide (Sigma Chemical Co., Poole, UK.) 10 mg/ml stok çözeltisi olarak hazırlandı ve karanlıkta saklandı. Kullanılacağı zaman son konsantrasyonu 0.1 mg/ml olacak şekilde seyreltili.

dNTP karışımı: 1 mM dATP, dATP, dGTP, dCTP

Taq DNA Polimeraz reaksiyon tamponu: (10 X Stok): 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl. Kullanım konsantrasyonu 1X dir.

Taq DNA Polimeraz: *Taq* polimeraz enzimi, Tamponu ve MgCl₂

3.2.6.2. DNA ekstraksiyonu ve kantitatif tayini

0.5 g taze bitki örnekleri sıvı azot ile önceden soğutulmuş havan içinde tamamen toz haline gelinceye kadar ezilir ve önceden sıvı azotta soğutulmuş sapatül ile 1.5 ml lik Eppendorf tüplerine aktarılaraq üzerine 1 ml önceden 55 °C ye kadar ısıtılmış cTAB ekstraksiyon çözeltisi eklenir. Tüpler 55 °C de her 15 dk da bir çalkalamak sureti ile 1 saat inkübe edilir. 5 dk 12.000 rpm de santrifüj edilir. Üstteki tabaka temiz eppendorf tüplerine aktarılır ve üzerine kendi hacmi kadar kloroform ilave edilir. 2 dk iyice çalkalandıktan sonra 5 dk 12.000 rpm de santrifüj edilir. Üstteki tabaka alınarak hacminin 2/3'ü kadar önceden soğutulmuş izopropanol (Sigma Chemical Co.) eklenir ve yavaş bir şekilde defalarca ters çevirme hareketi yapılır. 15 dk derin dondurucuda saklanarak aynı hareket birkaç defa tekrarlanır. 30 s 12.000 rpm de santrifüj edilir. İzopropanol dökülür ve eppendorf içinde kalan DNA pelleti üzerine 0.5 ml önceden soğutulmuş % 70 lik etanolden ilave edilir. Tekrar

yumuşak bir şekilde tüpler döndürülerek DNA'nın iyice yıkanması sağlanır. Alkol uzaklaştırılarak DNA kurutulur ve TE tamponu veya bidistile steril suda çözünerek -20 °C de saklanır. Ekstre edilen DNA'nın kantitatif tayini miktarı önceden bilinen kesilmemiş λ DNA ile mukayese edilerek hesaplanır. Bunun için % 0.7 lik agaroz jel 1XTBE tamponu içinde eritilerek hazırlanır. Jel taraklarından 2 mm derinliğinde havuzlar oluşturulur ve erimiş agaroz, jel tankına dökülür ve soğumaya bırakılır. Soğuduktan sonra tarak çıkarılarak jel içinde havuzlar oluşturulur. Tankın üzeri kapanıncaya kadar 1XTBE tamponu ilave edilir. Havuzlara 10 μ l DNA ve 4 μ l yükleme tamponu yerleştirilir. Bir havuza da miktarı bilinen kesilmemiş λ DNA ve yükleme tamponu yüklenir. Güç kaynağında 50 v'ta 2 sa yürütülerek boyama tamponu ile boyanıp UV altında fotoğrafı çekilir. Miktarı bilinen DNA ile ekstre edilen DNA karşılaştırılarak miktarı tayin edilir.

3.2.6.3. RAPD primerleri ile DNA çoğaltımı

Çalışmada kullanılan RAPD primerleri (Operon Technologies) 10 DNA bazı içermektedir. Bu çalışmada 8 farklı RAPD primeri kullanıldı. Fakat bunlardan AGGTCACGTA dizisine sahip SA-R primeri ile elde edilen amplifikasyon örneği en net bir şekilde varyasyon hakkında bilgi verebilecek bir düzeyde görüldü. Diğer primerlerin bir kısmında DNA profili tümüyle bazılarında ise kısmen gözlemlendi. Böyle bir çalışmada elde edilen jel görüntülerinin varyasyon konusunda bilgilendirici olabilmesi için tüm örneklerin DNA profilleri elde edilmesi gereklidir. Bu nedenle bu çalışmada sadece bir örnek sunulabilmiştir. PCR reaksiyon koşulları Williams ve ark. (1990) metodu modifiye edilerek hazırlandı. Reaksiyon karışımı şu şekildedir: 1 X Taq polimeraz tamponu, 200 μ M herbir dNTP den, 0.2 μ M primer, 25 ng kalıp DNA, 1.5 unite *Taq* polimeraz enzimi ve 1.5 mM MgCl₂. Reaksiyon karışımı üzerine DNaz ve RNaz dan arındırılmış su ilave edilerek 50 μ l'ye tamamlanır. DNA, termal saykıl (Thermo Hybaid) cihazında aşağıdaki program takip edilerek çoğaltılmıştır: 94 °C de 5 dk bir döngü; 1 dk. 92 °C de, 1.5 dk 35 °C de, ve 2 dk 72 °C de 45 döngü ve 5 dk 72 °C de bir döngü. Çoğalan DNA bant profilinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforez işlemi aynen DNA'nın kantitatif tayini işlemindeki basamaklar takip edilerek yapılır. Buradaki tek istisna agaroz jel konsantrasyonunun % 1.4 olmasıdır. UV altında görüntülenen DNA bantları karşılaştırılarak polimorfizm tespit edilir.

4. BULGULAR

4.1. Adventif Sürgün Rejenerasyonu

Soya fasulyesi [*Glycine max.* (L.) Merrill] bitkisinin Agrova SA88 varyetesi ile yapılan *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında *in vitro* ortamda gelişen 7 – 15 günlük bitkiciklerden gövde ucu, boğum, yaprak, hipokotil, kotiledon, kök ve petiyol eksplantları ve *in vivo* ortamda saksılarda yetiştirilen bitkiciklerden alınan hipokotil, boğum, gövde ucu ve petiyol eksplantları değişik konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda BAP, KN, *t*-Z ve 2,4-D içeren MS ve Gamborg's B5 besin ortamlarında kültüre alınmıştır.

Eksplantlar arasında hemen hemen tüm ortamlarda en verimli eksplant boğum (nod) olurken, kök eksplantı hiçbir zaman tomurcuk üretmemiştir. Yine yaprak ve petiyol eksplantlarında da hemen hemen tüm ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Kotiledon eksplantı da çoğunlukla kallus üretmiştir. BBD konsantrasyonu dikkate alındığında tüm eksplantlarda 3 mg/l BAP en verimli ortam olduğu gözlenmiştir. Bunu 3 mg/l KN ve 1 mg/l BAP takip etmiştir. En verimsiz hormon ortamı ise 4 mg/l *t*-Z ortamı olmuştur. Uygulanan BBD'nin eksplantlar üzerinde etkilerine ayrı ayrı bakıldığında ise şu sonuçlar gözlenmiştir;

Çizelge 4.1. Farklı *t*-Zeatin ve Kinetin konsantrasyonlarının değişik eksplantlarda adventif gövde üzerine etkileri (mg/L)

BBD (mg/L)	Petiyol	Yaprak	Kotiledon	Boğum	Gövde ucu	Hipokotil
2 <i>t</i> -Z	1±0,70	K	-	2,75±1,71 K	-	-
4 <i>t</i> -Z	K	-	K	K	K	-
3 KN	0	K	1,75±1,71 Kö	2,9±2,20 Kö	2,67±0,57 K+Kö	1,5±1,29 Kö
5 KN	K	-	K	1,75±0,96 K	-	-
6 KN	K	-	0	1±0,82 K	0,75±0,5 K	-

*Sayılar bir eksplanttan üretilen tomurcuk sayısını ve en az üç tekrarla elde edilen standart sapmayı ifade etmektedir.

K: Kallus, Kö: Köklenme, BBD: Bitki Büyüme Düzenleyicileri

2 mg/l *t*-Z ortamındaki eksplant türlerinden en iyi tomurcuk patlaması boğumda gözlemlendi (2-3). Yaprak eksplantında kallus oluştu. Petiyol eksplantında ise düşük oranda verim elde edildi. 3 mg/l KN ortamında en iyi tomurcuk patlaması yine boğumda gözlemlendi. 3 mg/l KN'in tüm ortamlara göre en verimli tomurcuk patlamasını teşvik edici olduğu saptandı (3-4). 5 mg/l KN ve 6 mg/l KN ortamlarındaki eksplantlardan sadece boğum eksplantında düşük oranda verim elde edildi (1-2). 4 mg/l *t*-Z ortamında da bütün eksplantlardan kallus gelişimi gözlemlendi (Çizelge 4.1). Kullanılan BBD arasında sadece 3 mg/l KN ortamına inoküle edilen kotiledon eksplantında köklenme gözlemlendi (Şekil 4.1).

Yukarıda gelişimi gözlenmiş olan eksplantların gelişimlerini devam ettirebilmeleri için farklı BBD konsantrasyonlarına subkültürleri yapıldı.



Şekil 4.1. 3 mg/l KN ortamına inoküle edilen kotiledon eksplantının köklenmesi.

Çizelge 4.2. *t-Z*, KN ve 2,4-D konsantrasyonunda subkültüre alınmış eksplantlar üzerinde adventif gövde üzerine etkileri (mg/L)

BBD (mg/L)	Boğum	Gövde ucu
1 <i>t-Z</i>	K	-
3 <i>t-Z</i>	K	2,33±1,52 K+Kö
2 KN	3,33±2,08 K+Kö	2,67±0,57 K
4 KN	1,67±0,58 K+Kö	1,33±1,53 K
3 2,4-D	K	K
2 2,4-D	K	K

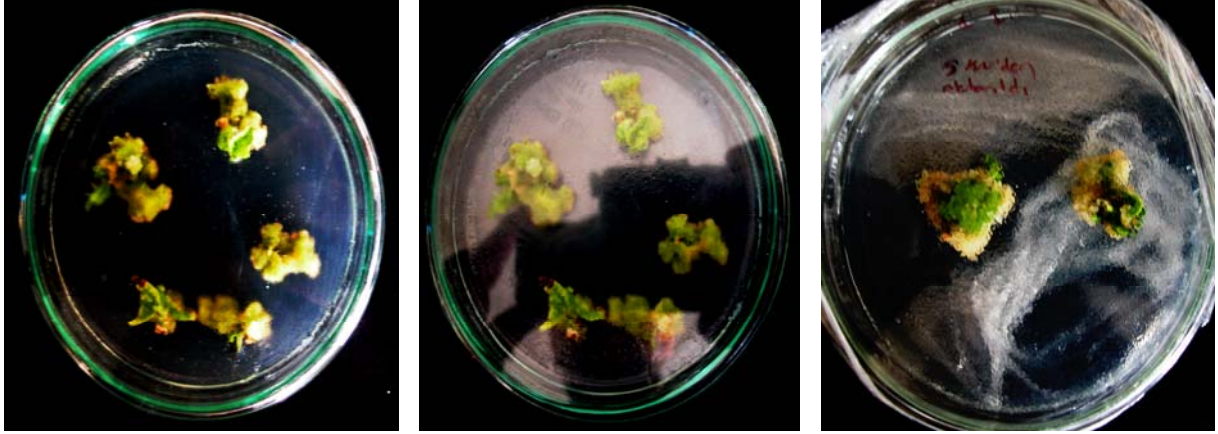
* Sayılar bir eksplanttan üretilen tomurcuk sayısını ve en az üç tekrarla elde edilen standart sapmayı ifade etmektedir.

K: Kallus, Kö: Köklenme, BBD: Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Çizelge 4.2'ye göre gövde gelişimi olan eksplantlar 1 mg/l *t-Z*, 3 mg/l *t-Z*, 2 mg/l KN ve 4 mg/l KN ortamlarına aktarılırken, kallus gelişimi olan eksplantlar da 2 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l 2,4-D ortamlarına aktarıldılar. 1 mg/l *t-Z*'e aktarılan gövde eksplantlarında zamanla kallus oluşumu gözlemlendi. 3 mg/l *t-Z*'e aktarılan gövde eksplantlarında ise 1 mg/l *t-Z*'e göre en iyi gelişim gözlemlenmiştir (2-4 sürgün).

2 mg/l KN ve 4 mg/l KN ortamlarındaki gövde eksplantlarında da tomurcuk patlaması olmuştur. 3 mg/l *t-Z*, 2 mg/l KN ve 4 mg/l KN ortamlarında tomurcuk gelişmesinin yanı sıra kök gelişimi de gözlemlenmiştir.

Kallus oluşturan eksplantların kallus gelişimini devam ettirebilmeleri için ideal bir BBD ortamı 2,4-D ortamıdır. Kallusların bu ortama subkültürlerinin yapılması ile kallus gelişimi devam ettirilebilir. Bunun için eksplantlarda oluşan kallus yapılarından açık sarı ve yumuşak yapıda olanlar tercih edilmelidir (Şekil 4.2). Bu şekilde kallus gelişiminden organogenez elde etmemiz mümkün olabilmektedir.



Şekil 4.2. Farklı BBD konsantrasyonlarında oluşan sarı-yumuşak ve yeşil-sert kalluslar.

Çizelge 4.3. Farklı BAP konsantrasyonunun değişik eksplantlarda adventif gövde üzerine etkileri (mg/L)

BBD (mg/L)	Kök	Petiyol	Yaprak	Kotiledon	Hipokotil	Boğum	Gövde ucu
1 BAP	-	-	-	K	-	2,75±1,03 K+Kö	2,67±2,08 Kö
3 BAP	-	-	-	K	Kö	3,08±1,37 K+Kö	3,86±3,28 K+Kö
4 BAP	-	-	-	-	-	1,5±1,29 K	1,5±1,29
5 BAP	0	0	0	0,75±0,5 K	-	2±0,82 K	1,5±1,29

* Sayılar bir eksplanttan üretilen tomurcuk sayısını ve en az üç tekrarla elde edilen standart sapmayı ifade etmektedir.

K: Kallus, Kö: Köklenme, BBD: Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Çizelge 4.3'deki değerlere göre oldukça verimli tomurcuk gelişimleri 3 mg/l BAP ortamında boğum eksplantında gözlenmiştir (5-6 sürgün). 5 mg/l BAP ortamına inkübe edilen eksplantlardan da yine en iyi tomurcuk patlaması boğum ve gövde ucunda gözlenmiştir (2-3). Kökte çürüme olurken, yaprak ve petiyolde verim alınamamıştır. 1 mg/l BAP ortamında ise kallus gelişmesi olmaksızın eksplantlarda tomurcuk gelişimi gözlenmiştir (3-4) (Şekil 4.3).

3 mg/l KN ve 3 mg/l BAP ortamlarında yapılan tüm çalışmalar verimli sonuç verdiği için bu BBD konsantrasyonları üzerinde daha yoğun çalışılmış ve bu ortamlara doğrudan soya

tohumu inoküle edilmiştir. Burada BBD içermeyen MS ortamına göre gelişmenin köklenme olmaksızın gerçekleştiği ve 2-3 adet tomurcuk patlamasının olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. 1 mg/l BAP ortamındaki eksplantlarda gözlenen tomurcuk patlaması.



Şekil 4.4. 3 mg/l BAP ortamına inoküle edilen tohum çimlenmesi.

Çizelge 4.4. Farklı BBD kombinasyonlarının eksplantlarda adventif gövde üzerine etkileri (mg/L)

BBD (mg/L)	Petiyol	Yaprak	Hipokotil	Boğum	Gövde ucu
3 KN + 1 2,4-D	-	0	-	K	-
5 BAP + 1 2,4-D	-	0	-	1±0,7 K	-
2 t-Z + 5 BAP	-	-	-	1,5±1,29 K	-
5 KN + 5 BAP	-	-	-	1,5±1,29 K+Kö	-
0,5 IBA + 2,5 KN	K	-	2,66±0,57 K	1±0,81 K	1±0,81 K
0,5 IBA + 1,5 t-Z	-	-	-	1,66±1,57 K	-

* Sayılar bir eksplanttan üretilen tomurcuk sayısını ve en az üç tekrarla elde edilen standart sapmayı ifade etmektedir.

K: Kallus, Kö: Köklenme, BBD: Bitki Büyüme Düzenleyicileri

3 mg/l KN + 1 mg/l 2,4-D kombinasyonuna inkübe edilen eksplantların hiç birinde tomurcuk patlaması gözlenmemiştir. 5 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D kombinasyonunda ise sadece boğum eksplantında düşük oranda tomurcuk patlaması gözlenmiştir (1-2). 2 mg/l t-Z + 5 mg/l BAP ve 5 mg/l KN + 5 mg/l BAP kombinasyonlarında ise sadece boğum eksplantı kullanılmasına rağmen yine düşük oranlarda verim elde edilmiştir (1 sürgün).

Yine 0,5 mg/l IBA + 2,5 mg/l KN kombinasyonunda da eksplantlardan verimli tomurcuk patlamaları gözlenmiştir (2-3). Yalnızca petiyol eksplantında kallus gelişmiştir. Buna göre 0,5 mg/l IBA + 1,5 mg/l t-Z kombinasyonunda köklenme ve tomurcuk patlaması beklenirken, aksine tomurcuk gelişimi yok denecek kadar az olmuştur.

Yapılan BBD uygulamalarında en yüksek düzeyde sürgün sayısı Gamborg B5 besin ortamında gövde nodu eksplantında 3 mg/l BAP ile elde edilmiştir (5-6). Başka bir uygulamada 3 mg/l BAP ortamında gövde ucu eksplantından 11 adet sürgün patlaması gözlenmiştir.

4.2. Rejenere Olan Adventif Sürgünlerin Köklendirilmesi

In vitro şartlarda sürgün rejenerasyonunun sağlandığı besin ortamlarında köklenmeyi sağlamak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle sürgünlerin sitokinin içermeyen, fakat köklenmeyi teşvik edici BBD'nin bulunduğu ortamlara transfer edilmesi gerekmektedir.

Çeşitli eksplantlardan elde edilen tomurcuklar belli büyüklüğe geldiğinde birbirlerinden ayrıştırılarak köklendirilmek amacı ile düşük konsantrasyonda IBA ve NAA içeren ortamlara transfer edilmişlerdir. Burada kullanılan BBD'nden NAA, IBA'ya göre kök gelişimini daha fazla teşvik etmesine karşılık IBA ortamında sürgünlerden kök gelişimi ile birlikte tomurcuk gelişiminin de olduğu gözlenmiştir.

Köklenmeyi teşvik edici olarak IBA'nın 1 mg/l ve 2 mg/l konsantrasyonları kullanılmıştır. Kullanılan bu her iki ortamda da birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. NAA için sadece 2 mg/l konsantrasyonu kullanılmış ve bu konsantrasyondaki sürgünlerde kısa, kalın ve her sürgünde 5'den fazla kök uzamasının olduğu gözlenmiştir. NAA ortamına göre IBA ortamında gelişen köklerin yapısı daha ince ve az sayıdadır (Şekil 4.5).

2 mg/l *t-Z* + 5 mg/l BAP ve 5 mg/l KN + 5 mg/l BAP 'lı ortamlarda 5 haftalık gelişimlerini sürdüren sürgünlerin köklendirilmesi için 2 mg/l IBA ortamı kullanılmıştır. Köklenme ile birlikte sürgünlerin gelişimi de devam etmektedir (Çizelge 4.5). 6 mg/l KN ortamındaki gelişen sürgünlerin köklendirilmesi için de 1 mg/l IBA ortamı kullanılmıştır. Burada hem en iyi kök gelişimi hem de sürgün gelişimi devam etmiştir. 5 mg/l KN ortamında gelişen sürgünler 1 mg/l IBA içeren ortama aktarılmış, fakat burada hiç köklenme olmamıştır.

Çizelge 4.5. BBD konsantrasyonu ve eksplantların adventif kök oluşumuna etkileri (mg/L)

BBD (mg/L)	Adventif sürgün oluşturmuş eksplantlar			
	Boğum + K	Boğum	Petiyol + K	Gövde ucu
1 IBA	-	1,5±1,29 K	-	-
1 IBA	2,33±1,52 K+Kö	-	-	-
2 IBA	-	-	-	-
2 IBA	1,5±1,29 K	-	-	-
2 IBA	1,5±1,29 K+Kö	-	-	-

* Köklendirilmek üzere ortama inkübe edilmiş adventif sürgünlerden gelişen tomurcuklardan elde edilen standart sapmaları ifade etmektedir. K: Kallus, Kö: Köklenme, BBD: Bitki Büyüme Düzenleyicileri

3 mg/l KN ve 3 mg/l BAP ortamlarına inoküle edilen soya tohumlarının köklendirilmesi içinde 2 NAA ortamı kullanılmış ve kısa, kalın kökler gelişmiştir.

Bütün bu yapılan çalışmalar sonrasında köklenen fideler BBD içermeyen MS ortamında aktarılarak (Şekil 4.6.), fidelerin belli bir büyüklüğe gelmesinden sonra fideler 3:1 oranında toprak – kum içeren saksılara ekilerek ortama uyumları sağlanır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.5. Adventif kök gelişimi.



Şekil 4.6. Köklenen soya fidelerinin BBD içermeyen MS ortamına aktarımı.



Şekil 4.7. MS ortamında büyüyen fidelerin saksılara aktarılması ve elde edilen yetişkin soya fasulyesi bitkisi.

4.3. Eksplant ve Adventif Sürgünlerde oluşan Kontaminasyonlar

In vivo ortamda saksılarda yetiştirdiğimiz soya fasulyesi fidelerine ait eksplantlar *in vitro* denemeler için kullanıldı. Bu tip eksplantların *in vitro*'ya aktarılmadan önce yüzeysel sterilizasyondan geçirilmesi gerek duyuldu. Denemelerimizde yapılan yüzeysel sterilizasyonlarda, eksplantların gereğinden uzun sürede hipoklorit içerisinde kalması sonucunda, eksplantların yaralı yüzeylerinden başlamak üzere zaman ilerledikçe dokuların iç kısımlarına doğru ilerleyen renk değişimleri, kuruma gibi doku hasarlarının olması ve buna bağlı olarak da *in vitro*'da beklenen düzeyde tomurcuk patlamalarının olmadığı, çoğu zaman eksplantların zaman içerisinde canlılığını kaybettiği gözlemlendi. Bu doku hasarları eksplantların 10 dk.'dan daha fazla hipoklorit içerisinde kalması sonucunda olduğu gözlemlendi. Eksplantlar 6 dk. ve daha az sürede hipoklorit içerisinde bekletilirse bitkisel materyalden kaynaklanan kontaminasyonlara sebebiyet verdiği saptandı (Şekil 4.8). Kullanılan eksplantlar için en uygun süre %70'lik etanol içerisinde 2 dk. ve %10'luk NaOCl içerisinde de 10 dk. olarak bulundu.

Laboratuvar şartlarımız sera ortamına uygun olmadığı için saksılarda yetiştirilen soya fidelerinden elde edilen eksplantlardan *in vivo*'da çoğunlukla istenen sonuç elde edilemedi. Her ne kadar uygun sürelerde sterilizasyon yapılsa da kontaminasyon riskini çok yüksekti. Bu yüzden çalışmalarımızda çoğunlukla *in vitro* yetiştirilen fidecikler kullanıldı. Her iki ortamda da soya tohumlarının çimlenme yüzdeleri ise şöyledir;

Çizelge 4.6. Farklı koşullarda yetiştirilen tohumların çimlenme yüzdeleri

Yetiştirme Koşulları	Tohumların Çimlenme Yüzdeleri (%)
<i>In vivo</i>	50 – 60
<i>In vitro</i>	60 – 66.6

In vitro denemelerde tohumların çimlenme yüzdeleri daha yüksek olduğu görüldü. Bu durum tohumların *in vitro*'ya daha iyi uyum sağladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.8. Saksılarda yetiştirilen soya fidelerinden alınan eksplantların kontaminasyonu.

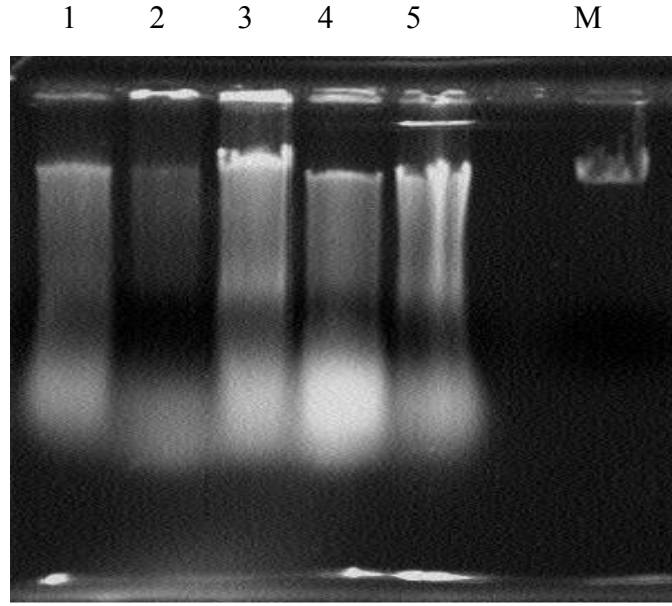
Steril tohumlar BBD içermeyen MS ortamında çimlendirilmiş, çimlenmenin 7-10 gün içerisinde iklimlendirme dolabında 25 ± 2 °C sıcaklıkta gerçekleştiği gözlemlendi. 2 hafta sonra soya fideleri 13–15 cm boyuna erişti. *In vitro* denemelerimizde her ne kadar tohumların yüzey sterilizasyonlarına dikkat etsek de uygun ortam şartları sağlanamadığı için tohumlar fide haline geldiklerinde kontaminasyona maruz kalmışlardır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. *In vitro* yetiştirilen soya fidelerinin kontaminasyonu.

4.4. Somaklonal Varyasyonlar

4.4.1. DNA ekstraksiyonu

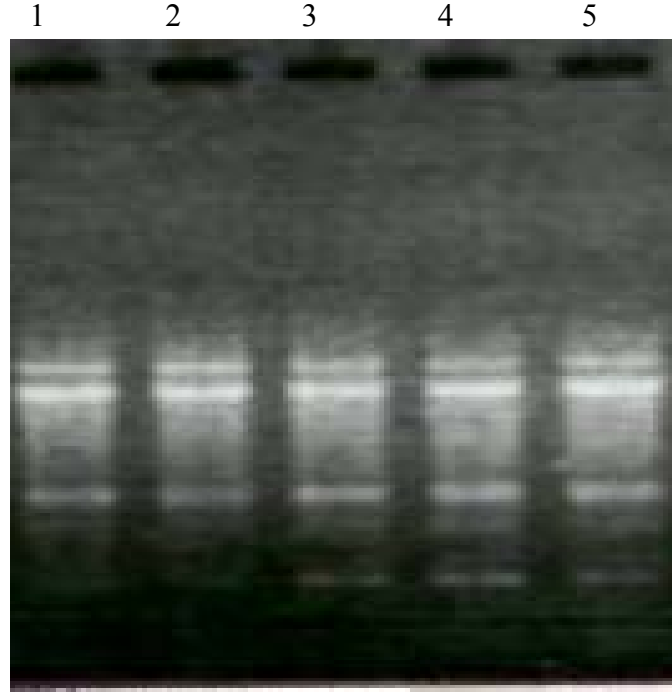


Şekil 4.10. Ekstre edilen DNA örnekleri M: markır 1. 2,4-D ile elde edilmiş kallus 2. KN ile elde edilmiş fide 3. BAP ile elde edilmiş fide 4. tabi ortamda yetişmiş bitki 5. BAP ile elde edilmiş kallus

Bu çalışmamızda soya fasulyesi fide eksplantları MS ve B5 ortamlarında farklı BBD konsantrasyonları ve kombinasyonları kullanılarak kallus ve adevtif gövde sürgünleri elde edilmiştir. Ortamda kullanılan kimyasallar özellikle BBD'nin genom üzerinde bir takım değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Bu amaçla özellikle yüksek BBD konsantrasyonunda yetiştirilen kallus ve sürgünlerden ekstre edilen DNA örnekleri RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) testlerine tabi tutulmuştur. Bunun için 2,4-D, Kinetin, BAP uygulamaları yapılmış kallus, adventif sürgün ve BBD içermeyen tabi ortamda yetişen bitkilerden DNA ekstre edilerek PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile özel primerler kullanılarak çoğaltılmış ve varyasyon olup olmadığı gözlenmiştir. Markır olarak 1µg kesilmemiş λ DNA kullanılarak doku ve organlardan ekstre edilen DNA miktarları mukayese edilmiştir. Buna göre 2,4-D ile elde edilen 0.5 g kallustan elde edilen DNA miktarı yaklaşık olarak 0.5 µg, kinetin ile elde

edilen 0.5 g fide yapraklarından 2 µg, BAP ile elde edilen fideden alınan 0.5 g taze örnekten elde edilen DNA miktarı 3.5 µg, tabi ortamda yetiştirilen bitkinin 0.5 g yapraklarından elde edilen DNA miktarı 1.5 µg, BAP ile elde edilen 0.5 g kallustan elde edilen DNA miktarı ise 1.25 µg olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

4.4.2 Ekstre edilen DNA örneklerinin RAPD primerleri ile çoğaltılması



Şekil 4.11. Ekstre edilen DNA örneklerinin SA-R primeri ile PCR reaksiyonunda çoğaltılması 1. 2,4-D ile elde edilmiş kallus 2. KN ile elde edilmiş fide 3. BAP ile elde edilmiş fide 4. tabi ortamda yetişmiş bitki 5. BAP ile elde edilmiş kallus

Elde edilen konsantre DNA örnekleri, DNA ve RNA parçalayıcı enzimlerden ari bidistile ve sterile su kullanılarak tümü aynı konsantrasyona gelecek şekilde seyreltildikten sonra Materyal ve Yöntem bölümünde açıklandığı şekilde PCR reaksiyonuna tabi tutularak jel görüntüsü elde edilmiştir.

Yukarıdaki jel görüntüsüne göre kullanılan kimyasal maddelerin ve kültür ortamı şartlarının herhangi bir somaklonal varyasyona neden olmadığı söylenebilir. Çünkü örneklerin band profillerine göre tüm örneklerden monomorfik bir DNA profili gözlenmiştir. Her ne

kadar 2,4-D ile elde edilen kallus (1. örnek) ve KN ile elde edilmiş fide (2. örnek) de en son sütunda bulunan DNA bantları eksik gibi görünse de dikkatle bakıldığında bu bantların az miktarda sentezlendiği ve silik olduğu ancak çok dikkatle bakıldığında fark edilebildiği söylenebilir (Şekil 4.11).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanların beslenmesi yönünden önem taşıyan bitkilerin, verimini, hastalık ve zararlılara karşı dirençlerini artırmak amacı ile gerçekleştirilen klasik ıslah metodlarının yanı sıra günümüzde doku kültürü ve biyoteknoloji sayesinde her yönü ile istenen özelliklere sahip bitki türlerinin eldesi çok daha kısa sürelerde ve kontrollü koşullarda elde edilerek bu bitkilerin doğa koşullarına uygun hale getirilmesi artık alışılan bir durum haline gelmek üzeredir. Biyoteknolojik metodlar, insan ve hayvanlarda olduğu gibi, bitkilerde de oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir. Çeşitli yöntemler bitkiler üzerinde denenmekte ve her gün yeni gelişmeler elde edilmektedir.

In vitro hücre ve doku kültürlerinden rejenere edilecek olan bitkilerin kullanım alanları: seçkin veya izolasyonu zor olan stokların vejetatif üretimi, kullanışlı çeşitlerin hücre seleksiyonu ve genetik mühendisliği ile elde edilen hücrelerinden transforme olmuş bitkilerin ıslahıdır (Philips ve Hubstenberger, 1985). Elektroporasyon, biyolistik gibi gelişmiş metodlar da aynı amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır.

İnsanlık için bitki büyüme maddelerinin her geçen gün daha da önem kazanır olması ve sınırlı tarım alanlarında verimliliğin artırılması amacı ile bitki büyüme maddelerinin kullanılması da güncel bir konu halini almıştır. Bitki büyüme maddeleri veya bitki büyüme düzenleyicileri bitkiler tarafından sentezlenen, çok küçük konsantrasyonlarda bile fizyolojik olaylarda etkili olabilen ve sentezlendikleri yerden uzaklarda veya hemen orada etkili olabilen organik bileşiklerdir (Palavan ve Ünsal, 1993). Yukarıda bahsetmiş olduğumuz yöntemlerin kullanılması ve işler hale getirilmesi için de bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü bu maddeler, kullanılan bitkisel materyallerden ve buradan elde edilen kalluslardan morfogenetik değişiklikler meydana getirebilme yeteneğine sahiptir. Tüm bu nedenlerden dolayı, denemelerimizde bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşitli konsantrasyonları ve kombinasyonlarından yararlanılmıştır.

Bugüne kadar *in vitro* şartlar altında yapılan çalışmalar sırasında soya fasulyesi [*Glycine max.* (L.) Merrill] bitkisinin çok farklı varyete ve kültürvarları kullanılarak bunların rejenerasyon kapasiteleri, somatik embriyogenez, organogenez gibi alanlarda denemeler gerçekleştirilmiştir. Klonal üretime yönelik soya fasulyesi ile çalışmalar fazla olmadığı için bu çalışmamızda soya fasulyesi [*Glycine max.* (L.) Merrill] bitkisinin Agrova SA88 varyetesinin doku kültürü ortamında farklı BBD ve BBD konsantrasyonları ile gövde ucu,

boğum, hipokotil, kotiledon, yaprak, petiyol ve kök eksplantları kullanılarak adventif sürgün rejenerasyonu ve bu adventif sürgünlerin köklendirilmesi üzerine denemeler yapıldı.

In vitro çalışmalarda kullanılan alet ve ekipmanlar ile bitkisel materyalin sterilizasyonu çalışmayı etkileyen en önemli konudur. Bitkisel materyalin eldesi için öncelikle tohumlara ve bunların yüzeysel sterilizasyonlarının yapılmasına gerek vardır. Denemelerimizde kullanılan soya fasulyesi [*Glycine max.* (L.) Merrill] bitkisinin Agrova SA88 varyetesine ait tohumların yüzeysel sterilizasyonlarında aynı sterilant maddelerin farklı konsantrasyonları ve süreleri kullanıldı ve optimal yüzeysel sterilizasyon süresi %70'lik etanol içerisinde 5 dk. ve sonra %10'luk NaOCl içerisinde de 10 dk. olarak saptandı. Daha uzun süren sterilizasyonlar ise tohumların embriyolarını öldürdüğü için çürümelere, sterilizasyon süresi çok kısa tutulursa bu durumda da kontaminasyon olduğu için tohumlarda kararma ve bozulmalar görüldü.

In vitro ve *in vivo* şartlarında yetiştirilen fidelere ait gövde ucu, boğum, hipokotil, kotiledon, yaprak, petiyol ve kök eksplantlar bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonları şeklinde hazırlandı, ortamlara aktarıldı ve bu ortamlar yolu ile adventif sürgün oluşturma potansiyelleri artırıldı.

En verimli ve verimsiz ortam ve eksplant hakkında bir genellenme yapılması gerekirse şu sonuçlar ortaya çıkmaktadır. 3 mg/l KN ve 3 mg/l BAP ortamları hemen hemen bütün eksplantlar için en verimli ortamlardır. 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları ise sürgün oluşumunda en verimsiz ortamlar olarak tespit edilmiştir. Bu ortamlar kallus gelişimi için uygun ortamlardır. Ayrıca kullanılan eksplantlardan da petiyol, yaprak ve kök eksplantları en verimsiz olanlarıdır. Petiyol ve yaprak eksplantında kısmen kallus gözlenirse de kök eksplantında hiçbir gelişme gözlenmedi.

Kullanılan her bir eksplantın farklı BBD konsantrasyonlarına cevabı farklı olmuştur. Burada özellikle boğum eksplantı ve gövde ucu eksplantları çok iyi tomurcuk patlamaları verdi. Özellikle 3 mg/l BAP ortamında gövde ucu eksplantında en verimli tomurcuk patlaması gözlemlendi (11 Adet). 3 mg/l BAP konsantrasyonunda hipokotil 2-3 tomurcuk verirken boğumda 5-6 tomurcuk gözlemlendi. Kotiledon eksplantında ise 3-4 tomurcuk patlamasıyla birlikte kallus gelişti. Burada genotipin yanında eksplantların hasat edilip ana bitkiden ilişkisinin kesilmesi ve kültür ortamına alınması esnasında içerdikleri endojen BBD konsantrasyonları ve fiziksel şartlar da tomurcuk patlaması üzerine etkili olduğu düşünülebilir. BBD ların metabolizmadaki görevleri göz önünde bulundurulduğunda özellikle sitokininlerin, kısmen oksinlerin ve bu iki bitki büyümesini düzenleyicilerinin (BBD) etkileşimlerinin tomurcuk patlaması üzerine en etkili maddeler oldukları görülmektedir.

BAP'ın farklı konsantrasyonları kullanıldığında eksplantlardaki tomurcuk patlama sayıları birbirine yakın değerlerdir. Boğum eksplantı 1 mg/l BAP konsantrasyonunda 3-4 tomurcuk verirken, 4 mg/l BAP konsantrasyonunda 3 tomurcuk vermiştir. Buna rağmen 3 mg/l BAP konsantrasyonu gövde ucunda 3-11 arasında tomurcuk vermektedir. Tomurcuk gelişimlerine paralel olarak bu ortamlarda kılcal kök gelişiminin olması da dikkat çekicidir. BAP'ın bütün konsantrasyonlarında gövde ucu, boğum ve hipokotil eksplantları üzerinde kılcal kökler tespit edildi. 5 mg/l BAP ortamına inoküle edilen eksplantlardan da gövde ucu ve boğum 2-3 tomurcuk verirken, kök, petiyol ve yaprak eksplantlarında herhangi bir gelişme gözlenmedi. Ayrıca gövde gelişmelerinin yanında yeşil - sert ve sarı – yumuşak kıvamda çeşitli kalluslar gelişti. Bu sonuçlar doğrultusunda BAP'ın konsantrasyonunda artma oldukça verim düşmektedir. BAP sentetik bir sitokinin çeşidi olup özellikle hücre bölünmesini düzenlediği, büyüme ve farklılaşmayı teşvik ettiği, tomurcuk ve yaprak patlamasına neden olduğu, oksinlerle kullanıldığında kök gelişimini teşvik ettiği bilinmektedir (McGaw, 1995). Bu çalışmamızda tomurcuk patlamasını en etkin bir şekilde BAP ile elde edilmesi de bu bulguları doğrulamaktadır. Literatürde soya fasulyesi ile yapılan doku kültürü çalışmaları organogenez ve somatik embriyogenez üzerine yoğunlaşmış olup bizim kullandığımız yöntem olan klonal üretim hakkındaki çalışmalar oldukça azdır. Kullanılan BBD çeşidi, konsantrasyonu ve kombinasyonları bu çalışmalar ışığı altında modifiye edilerek seçilmiş ve farklı konsantrasyon ve kombinasyonlar denenmiştir. BAP konsantrasyonunun arttıkça adventif gövde sürgünü gelişimini baskılaması BBD'nin çok düzeydeki miktarlarının dahi metabolizma üzerinde etkili olması ve muhtemelen gövde gelişimini kodlayan gen/genlerin ekspresyonunu engellemesi ile açıklanabilir (Palavan ve Ünsal, 1993).

Uygulamalarımız arasında kinetin ile yapılan çalışmalardan da olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Kinetin'in de yine farklı konsantrasyonları kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre en verimli ortamın 3 mg/l KN olduğu tespit edildi. Bunu 2 mg/l KN konsantrasyonu takip etmektedir. 4 mg/l KN, 5 mg/l KN ve 6 mg/l KN ile yapılan çalışmalarda verimin konsantrasyon artışına paralel olarak düştüğü ve çoğunlukla kallus oluştuğu gözlemlendi. 2 mg/l KN ve 3 mg/l KN ortamlarında da BAP ortamında olduğu gibi adventif kök gelişimi ve kallus gözlemlendi. Kinetin de bir sentetik oksindir ve BAP'nin zayıf bir türevidir. Dolayısı ile BAP ile aynı etkiye sahip olması doğaldır. Yine KN konsantrasyonu arttıkça adventif sürgün patlamasının azalması genotip veya dolaylı olarak KN'nin sürgün oluşum sürecindeki bazı metabolik yolları baskılamış olabileceğini akla getirmektedir (Kadioğlu, 2004).

t-Z ile yapılan çalışmalarda çok fazla verim elde edilemedi. *Trans*-Zeatin en verimli konsantrasyonu da 2 mg/l dir. 4 mg/l *t-Z* ortamındaki bütün eksplantlarda kallus gözlemlendi.

Trans-zeatin'in bütün konsantrasyonlarında yoğun bir şekilde oluşan kalluslardan sarı-yumuşak yapıda olanlardan altkültür yapılarak 2,4-D ortamlarına aktarıldılar. Aynı şekilde uygulamalarımızda kullandığımız bütün BBD konsantrasyonlarından elde edilen kalluslar 2,4-D ortamlarına aktarıldılar. 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları hazırlanarak yapılan alt kültürlerden kalluslardan indirekt organ gelişimi düşünüldü. Özellikle burada kullanılan kallusun yapısı sarı ve yumuşak olmalıdır. Yeşil ve sert olan kalluslar organ gelişimi için uygun değildir. Yaklaşık 5 hafta sonra uygun ortam şartları olmadığı için kalluslarda kararır ve çürümeye olduğu tespit edildi. Bu şekilde istenilen sonuç elde edilmediği için elde ettiğimiz diğer kallusları somaklonal varyasyon tespiti için dondurucuda saklandı. *Trans*-zeatin tabii bir sitokindir ve sitokininlerin genel etkileri bu çalışmada *t-Z* üzerinde gözlenmedi. Yüksek konsantrasyonlu *t-Z* daha çok oksinler gibi davranarak kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Zaten *t-Z*'nin adventif sürgün oluşumundan ziyade kallus ve indirekt somatik embriyo gelişimini teşvik ettiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Halperin ve Wetherell, 1965).

Çalışmalarımızda kullandığımız farklı BBD kombinasyonlarında da çok verim elde edilmedi. Burada kullanılan kombinasyonlardan en iyi sonucu 0,5 mg/l IBA + 2,5 mg/l KN verdi. Bu ortamda boğum ve hipokotil eksplantları (2-3) tomurcuk verirken diğer kombinasyonların hepsi boğum eksplantında (1-2) tomurcuk vermiştir. Bütün kombinasyonlarda kallus oluşumu dikkat çekicidir. 5 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D kombinasyonunda olduğu gibi BAP ve 2,4-D'nin beraber kullanılması ile hazırlanan ortamlarda, aynı eksplanttaki tomurcuk sayısının sadece BAP kullanılarak hazırlanan ortamlardaki tomurcuk sayısından daha az olduğu görülmüş ve 2,4-D'nin adventif sürgün rejenerasyonunu engelleyebileceği düşünülmüştür. GA₃'ün sürgün oluşumunda etkili olmadığını, pikloram ve 2,4-D'nin ise olumsuz etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca adventif sürgün rejenerasyonunun büyük ölçüde sıcaklık ve genotipten etkilendiğini belirtmişlerdir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Elde edilen eksplantların köklendirilmesi için hazırlanan IBA'lı ortamların sürgün oluşumunu teşvik ettiğinin gözlenmesi üzerine başlangıçta IBA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren ortamlar hazırlanarak eksplantlar bu ortamlarda inkübe edildi. Fakat daha sonraki çalışmalarda köklendirmede 2 mg/l NAA konsantrasyonunun çok iyi sonuç verdiği gözlemlendi ve NAA'in sadece 2 mg/l konsantrasyonu ile çalışmalara devam edildi.

6 mg/l KN ortamında tomurcuk patlamasıyla birlikte köklenmenin de olduğu boğum eksplantının köklenmesinin devam etmesi için 1 mg/l IBA ortamı kullanıldı. Bu ortamda köklenmeyle birlikte açık renkte kallusların meydana geldiği gözlemlendi. Kalluslar temizlenip 1 mg/l 2,4-D ortamına aktarıldı. 1 mg/l IBA ortamında gövde tomurcuklanmasının devam ettiği

dikkat çekici bir durumdur. Aynı durum 5 mg/l KN ortamındaki boğum eksplantına da uygulandı ve benzer gelişmeler gözlemlendi. Bu gelişmelerin yanında 0,5 mg/l IBA + 2,5 mg/l KN kombinasyonundaki hipokotil ve gövde ucu eksplantları da köklendirilmeleri için 1 mg/l IBA ortamına aktarılmışlardır. Fakat bu ortamda diğer ortamlara göre köklenme olmadı, tomurcuk patlaması ve kallus oluşumu gözlemlendi. Görüldüğü üzere kullanılan IBA ortamı eksplantın alındığı BBD ortamına göre farklı sonuçlar vermiştir.

Yapılan tüm çalışmalar doğrultusunda IBA uygulamaları adventif sürgün oluşumu üzerine etkisi BAP ve KN uygulamaları kadar yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. Sentetik bir oksin türevi olan IBA'nın sürgün gelişimini an az sitokininler kadar teşvik etmesi oldukça ilginç bir bulgudur. Burada endojen sitokinin ve önceki ortamdan gelebilmesi muhtemel olan sitokinin ile ikinci uygulamada uygulanan oksin miktarının interaksiyonunun böyle bir sonuca neden olduğu düşünülmektedir. Çünkü sitokinin oksin interaksiyonunun sürgün oluşumuna neden olduğu bilinen bir gerçektir (Cambecedes ve ark., 1991).

Elde edilen adventif sürgünlerin köklendirilmesi için deneme çalışmaları yapıldığı bir durumda 3 mg/l KN ve 3 mg/l BAP ortamına inoküle edilen soya tohumları BBD içermeyen MS ortamına göre çok hızlı bir gelişme gösterdi ve 2-3 tomurcuk patlamasıyla birlikte köklenme olmadığı tespit edildi. Bu patlayan tomurcukların köklenmesi için 2 mg/l NAA ortamı denendi ve kısa kalın köklerin geliştiği görüldü. Bu ortamda aynı zamanda kallusların geliştiği ve bu kalluslar üzerinde de kök gelişiminin olduğu saptandı. Bu köklenmiş kallusların BBD içermeyen MS ortamına aktarıldığında sürgün gelişiminin devam ettiği fakat kök gelişiminin aynı oranda olmadığı belirlendi. Doku kültürü çalışmalarında yüksek konsantrasyondaki BBD uygulamalarının olumlu sonuçları görülse de genellikle toksik etkileri veya büyüme ve gelişmeyi engelleyici maddeleri indükleyici etkileri bilinmektedir (Kadioğlu, 2004). Normalde BBD içermeyen MS ortamlarında tohumlardan uzun-kılcal kökler gelişirken, 2 mg/l NAA ortamında kısa- kalın kökler gelişmiştir. Yine 3 mg/l KN ortamında, 1 mg/l BAP ortamında ve 3 mg/l BAP ortamlarına inoküle edilen eksplantlardan da adventif kökler gelişmiştir. Oksinlerin kök gelişimini teşvik etmektedir. Bu nedenle NAA ve IBA kullanılarak adventif sürgünlerde kök gelişimi gözlemlendi. En iyi sonuç 1 mg/l IBA ortamından elde edildi. IBA sentetik bir oksin olup, doğal bir oksin olan IAA türevidir. Bu güne kadar en iyi kök oksinlerin adventif kök gelişimi üzerine etkisi diğer BBD den çok yüksektir. Bu da oksinlerin genom üzerindeki etki mekanizmaları ile ilgili bir olaydır (Bandursky ve ark, 1995).

Yapılan köklendirme çalışmalarından sonra sürgünlerin gelişimini tamamlayabilmeleri için BBD içermeyen MS ortamı kullanıldı. Bu ortamda gelişen soya fasulyesi fidecikleri saksılara transfer edildi. İklimlendirme dolabında belli bir büyüklüğe getirilerek daha sonra normal şartlara adaptasyonu sağlandı. Bu bitkiler çiçeklenme aşamasına kadar büyütüldü.

Yapılan bu çalışmada ekonomik ve besin değeri yüksek olan soya fasulyesi bitkisinin klonal üretimi üzerine yoğunlaşılarak, en iyi eksplant, ortam ve BBD tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu konuda oldukça önemli sonuçlar ve ipuçları elde edilmiştir. Soya fasulyesi bitkisinin doku kültüründe klonal üretiminin ekonomik boyutlara ulaşması ve ticari şekle dönüştürülebilmesi için daha yoğun ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Somaklonal varyasyonların saptanmasında RAPD yöntemi, pratik, radyoaktif madde kullanılmadığı için güvenli ve sağlıklı sonuçlar vermektedir. Somaklonal varyasyonların tespitinde ne kadar çok primer kullanılırsa o kadar sağlıklı sonuçlar elde edilebilir. Yapılan bu çalışmada kullanılan primer sayısı yüksek olmamakla birlikte, varyasyonların tespiti konusunda da ancak bir primerden sağlıklı sonuç alınmıştır. Burada laboratuvar şartları ve altyapı yetersizlikleri önemli rol oynamış olabilir.

Doku kültüründe rejenere edilen soya fasulyesi genellikle somaklonal varyasyon göstermektedir (Barwale ve Widholm, 1987; Freytag ve ark., 1989; Roth ve ark., 1989; Gesteira ve ark., 2002). Bulgularımız bu çalışmalarla paralellik göstermemektedir.

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda genellikle varyasyon tespiti daha fazla olmakla birlikte, varyasyon tespit edilmemiş çalışmalar da vardır. Bu çalışmada varyasyon tespit edilmediği için literatürdeki bu tür çalışmalara da örnekler verilmiştir. Isabel ve ark., (1993) ladinde, Shenoy ve Vasil, (1992) ise mor gök darıda varyasyona rastlamamışlardır. Dolayısı ile bu çalışmalar bizim bulgularımızla örtüşmektedir.

Kullandığımız ortam komponentleri ve çevre şartlarının somaklonal varyasyona yol açıp açmadığının tespiti için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Akı, C., 1997. *Capsicum annum L.'un bazı varyeteleri üzerinde doku kültürü çalışmaları* (Doktora tezi. yayınlanmamış). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ammirato, P.V., 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures. *Suspension Culture Tehniques and Hormone Requirements*, 14(1): 68 – 74.
- Babaoğlu, M., 1998. *Bitki Doku Kültürleri ve Geleceği*. Tarımda Yeni Ufuklar Sempozyumu. Türk Ziraat Yüksek Müh. Bir. Vakfı, s. 142-148. Ankara.
- Bandursky, R.S., Cohen, J.D., Slovin, J. ve Reinecke, D.M., 1995, Auxin biosynthesis ve mechanism. *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, (Davies, P.J. ed). Kluwer academic Publisher, Dordrect, Netherlands. s: 39-65.
- Barwale, U.B. ve Widholm, J. M., 1987. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. *Plant Cell Rep.*, 6(5). 365-368.
- Cambededes, J., Duron, M. ve Decourtye, L. 1991. Adventitious bud regeneration from leaf explants of the shrubby ornamental honeysuckle *Lonicera nitida* Wils cv. Maigrun: Effect of thidiazuron and 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Cell Rep.* 10: 471-474.
- Dan, Y., Reichert, N.A., 1998. Organogenic Regeneration of Soybean From Hypocotyl Explants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 34: 14-21.
- Devlet Meteroloji İşleri Genel Müd., 1971. *Meteroloji Bültenleri*.
- Er, C., Canpolat N., 1992, *Bitki Islahında Doku Kültürleri*. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayınları, Ankara.
- Evans, D., Reed, S. M., 1981. Cytogenetic techniques. *Plant Tissue Culture*. Thorpe Acad. Pres, New York.
- Evans, D.A., Sharp, W. R., ve Flick, C.E., 1981. Growth and behaviour of all cultures. *Plant Tissue Culture*, 23(18): 45 – 113.
- Fehr, W. R., 1987. Breeding Methods for Cultivar Development. In B. E. Caldwell (Ed) Soybeans: *Improvement, production, and uses*. Agronomy, 16: 249-294.
- Freytag A.H., Rao-Arelli A.P., Ananda S.C., Wrather J.A. ve Owens, L.D., 1989. Somaclonal variations in soybean plants regenerated from tissue culture, *Plant Cell Reports*, 8(4): 199-202.).
- Gamborg, O. L., Shyluk, J. P., 1981. Nutrition media and charecteristics of plant cell and tissue cultures. *Plant Tissue Culture Acad. Pres*, 4(24): 19-25.

- George, E.F., Sherrington, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. **Handbook and Directory of Commerical Laboratories**. Exegetics Ltd.,73-87.
- Gesteira, A. S., Otoni, W. C., Barros, E. G. ve Moreira, M. A., 2002. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. **Plant Breeding** **121**, 269—271.
- Goto, S., Thakur, R.C., ve Ishii, K., 1998. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. **Plant Cell Reports** **18**: 193-197.
- Gönülşen, N., 1987. **Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Uygulama Alanları**. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Gözen, A., Abak, K., Kasnakoğlu, H., Çetiner, S., ve Güzel, A., 1995. Türkiye’de Bitki Biyoteknolojisi Öncelikleri. **Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı**, Yay. No: 2, s. 227-229, Ankara.
- Gürel, E., 1997. Plant tissue culture techniques and types of in vitro developments occurring in cultures. **1. Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi**. 14 – 16 Mayıs 1997. Kırıkkale.17-21.
- Halperin, W., Wetherell, D.F., 1965. Ammonium requirement for somatic embryogenesis in vitro. **Nature** **205**: 519-520.
- Hammatt, N., Davey, MR., 1987. Somatic Embriyogenesis and Plant Regeneration From Cultured Zygotic Embryos of Soybean (*Glycine max* L. Merrill). **J. Plant Physiol**, **128**: 219-226.
- Hartman, H.T., Kester, D.E., 1975. Plant Propagation – Principles and Practices. **Practice-Hall**. Inc., New Jersey.
- Isabel, N., Tremblay, L., Michaud, M., Tremblay, F.M. ve Bousquet, J., 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. **Theor. and Appl. Genet.** **86**: 81-85.
- İlisulu, K., 1973. **Yağ Bitkileri ve Islahı**. İstanbul.
- İşler, N., Çalışkan, M.E., 1998. GAP Bölgesi Ekolojik Koşullarında Soyada (*Glycine max* (L.) Merr.) Verim ve Verime Etkili Bazı Özelliklerin Korelasyonu ve Path Analizi. **Tr. J. of Agriculture and Forestry** **22**: 1-5.
- Jang, G.W., Park, R.D. ve Kim, K.S., 2001. Plant Regeneration Form Embryogenic Suspension Cultures of Soybean (*Glycine max* L. Merrill). **J. Plant Biotechnology**, **3**(2): 101-106.
- Kadıoğlu, A., 2004. **Bitki Fizyolojisi**. Eser ofset matbacılık, Trabzon. 258-317.

- Karp A. (1989). Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? *International Association of Plant Tissue Culture Newsletter* **58**: 2-11.
- Kim, K.H., Park, H.K., Park M.S. ve Yeo U.D., 2001. Effects of Auxins and Cytokinins on Organogenesis of Soybean *Glycine max* L. *J. Plant Biotechnology*, **3**(2): 95-100.
- Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F. ve Collins, G.B., 1987a. A Procedure for Plant Regeneration From Immature Cotyledon Tissue Of Soybean. *Plant Mol Biol Rep.*, **3**: 160-167.
- Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F. ve Collins, G.B., 1987b. Soybean Somatic Embryogenesis: Effects of Hormones and Culture Manipulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **10** (3): 197-208.
- Li, B. J., Langridge, W. H. R. ve Szalay, A. A., 1985. Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration in the Soybean. *Plant Cell Reports*, **4**(6): 344-347.
- Lippmann, B., Lippmann, G., 1984. Induction of Somatic embryos in Cotyledonary Tissue of Soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Reports*, **3**(6): 215-218.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nutironchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S. ve Terzi, M., 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 325-331
- Mansuroğlu, S. Gürel E., 2001. Mikroçoğaltım. Ed: Babaoğlu, M. Gürel, E., Özcan, S., *Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- Markley, S. K., 1950. *Soybeans and Soybean Products. Volum 1*. New York. USA. P. 15-210.
- McGaw, B.A. Cytokinin biosynthesis and metabolism 1995. *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, (Davies, P.J. ed). Kluwer academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. S: 66-98.
- Miller, T., Skoog, F., 1953. In vitro culture of higher plant. *Am J. Botanic*, **(40)**: 768-773
- Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. Annu. Rev. *Plant Physiology*, **(25)**: 135 – 166.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, **84** (15): 473 – 497.
- Nitsch, N., 1968. In vitro culture of higher plants. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol.*, **12** (9): 1 – 92.
- Özcan, S., Özgen, M., 1996. Bitki genetik mühendisliği. *Kökem dergisi*, **1**(1): 69 – 95.
- Palavan-Ünsal, N., 1993. *Bitki Büyüme Maddeleri*, İst., Üniv., Enst., Yayın No: 4, 357 s.
- Paulet, F., 1965. In vitro culture of higher plants. *Rev. Gen. Bot.*, **(72)**: 697 – 792.

- Philips, G.C., Hubstenberger, J. F., 1985. Organogenesis in Pepper Tissue Cultures, ***Plant Cell Tissue Organ Culture***, 4:261-269.
- Pierik, R. L. M., 1987. In vitro culture of higher plants. ***Martinus Nijhoff***, 139 – 154.
- Rajasekaran, K., Pellow, JW., 1997. Somatic Embryogenesis From Cultured Epicotyls and Primary Leaves of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. ***In Vitro Cell Dev Biol. Plant***, 33: 88-91.
- Roth, J.E., Frazier, B.L., Apuya, N.R., ve Lark, K.G., 1989. Genetic Variation in an Inbred Plant: Variation in Tissue Cultures of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] E. ***Genetics*** 121: 359-368.
- Shan, Z., Raemakers, K., Tzitzikas, E. N., Ma, Z. ve Visser, R. G. F., 2005. Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), ***Plant Cell Reports***, 24(9):507-512.
- Sharp, W., Evans, D. A. ve Sondahl, M. R., 1983. Application of somatic embryogenesis to crop improvement. ***Plant Tissue Culture***, 35(53): 759 – 762.
- Shenoy, V.B., Vasil, I.K. 1992. Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum). ***Theor. Appl. Genet.*** 83: 947-952.
- Shurpalekar, S. A. 1961. Chemical Composition and Nutritive Value of Soybeans and Soybeans Products. ***Soybeans Concil of America, International Office. Vol. 11.*** No:2,P. 7-12, Roma.
- Türkiye İstatistik Kurumu Verileri, 1986-2005. ***Tarımsal Yapı ve Üretim.***
- Verga, A., Thomas, L.H. ve Bruinsma, J., 1988. Effects of auxins on epigenetic instability of callus propagated *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. ***Plant Cell, Tissue Organ Culture*** 15: 223-231.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., ve Tingey S.V., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. ***Methods Enzymology*** 18: 704-740.
- Wright, M. S., Koehler S. M., Hinchey, M. A. ve Carnes, M. G., 1986. Plant Regeneration by Organogenesis in *Glycine max*. ***Plant Cell Reports***, 5 (2): 150-254.
- Wright, M. S., Williams, M. H., Pierson, P. E. ve Carnes, M. G., 1987. Initiation and Propagation of *Glycine max* L. Merr.: ***Plants from Tissue-Cultured Epicotyls. Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, 8(1): 83-90.
- Yıldız, M., 2000. ***Keten bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve Agrobacterium tumefaciens aracılığıyla gen aktarımı***, (Doktora tezi. yayınlanmıştır). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,

Yılmaz, H. A., Efe, L., 1998. Bazı Soya [*Glycine Max* (L.) Merrill] Çeşitlerinin Kahramanmaraş Koşullarında İl.Ürün Olarak Yetiştirilebilme Olanakları. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 22: 135-142.

ÖZGEÇMİŞ

1979 Yılında Van'ın Erciş ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erciş'de tamamladı. 1996 yılında liseden mezun oldu. 1997 yılında Fırat Üniversitesi TBMYO Bilgisayar Programcılığı bölümünü kazandı. 1999 yılında buradan başarıyla mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2003 yılında bu bölümden de başarıyla mezun oldu. Erciş Milli Eğitim Müdürlüğüne bağlı çeşitli okullarda sözleşmeli olarak geçici öğretmenlik yaptı. 2004 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına kayıt yaptı. 2007 yılında 6 aylık bir sözleşme kapsamında TÜİK veri giriş sorumlusu olarak çalıştı. Evli, 1 çocuk annesidir.