

Farklı BAP Konsantrasyonlarının Soya Fasulyesinde (*Glycine max* L. Merrill) Adventif Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkileri

Özlem EFENDİOĞLU¹, Musa TÜRKER¹, Fethi Ahmet ÖZDEMİR^{*2}

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van

²Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın

*faozdemir@bartin.edu.tr

(Geliş/Received:15.05.2013; Kabul/Accepted:16.08.2013)

Özet

Bu çalışmada soya fasulyesinin (*Glycine max* L. Merrill) Agrova SA88 çeşidi kullanılarak, farklı BAP konsantrasyonlarının adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Uygulamalarda kullanılan fideler *in vitro* koşullarda çimlendirilmiştir. Çimlendirilen fidelerden alınan gövde ucu, boğum, yaprak, petiyol, kök, kotiledon ve hipokotil eksplantları Murashige ve Skoog (MS) ortamında farklı konsantrasyonlarda Benzil Amino Pürin (BAP) ile muamele edilmiştir. Eksplantlara uygulanan BAP'ın 2 ve 3 mg/l konsantrasyonlarında en iyi adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Adventif sürgünlerin köklendirilmesi için Naftelen Asetik Asit (NAA) ve İndol-3-bütirik asit (IBA) uygulanmış ve 2 mg/l IBA'nın kök gelişimini uyarmada en etkili Bitki Büyüme Düzenleyicisi (BBD) olduğu saptanmıştır. Gövde gelişimi ve köklendirilmesi tamamlanmış sürgünler gelişimini devam ettirebilmeleri için BBD içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Olgunlaşan bitkiler daha sonra saksılara transfer edilerek sağlıklı fideler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Benzilaminopürin (BAP), Soya Fasulyesi, Adventif kök ve Sürgün

Effects on Adventitious Shoot Regeneration of Different BAP Concentrations in Soybean (*Glycine max* L. Merrill)

Abstract

Micropropagation of soybean (*Glycine max* L. Merrill); strain Agrova SA88 was investigated. Seeds were surface sterilized and grown *in vitro*. The shoot tip, nod, leaf, petiole, root, cotyledon and hypocotyl explants from seedlings were incubated in Murashige and Skoog (MS) medium with different concentrations of Benzyl Amino Purine (BAP). 2-3 mg/l BAP was found to be most influential on adventitious shoot regeneration in soybean among the applications. The grown stem on explants were separated and incubated in MS medium with the Plant Growth Regulators (PGR)s of Naphthalene acetic acid (NAA) and Indole-3-butyric acid (IBA) 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 acclimatised in pots and mature plants were provided.

Key words: Benzyl amino purine (BAP), Soybean, Adventitious Shoot and Root

1. Giriş

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 durumun 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 [1]. Yıllardan beri bitkiler, hastalık ve zararlıların saldırılarına karşı kimyasal ilaçlarla korunmuş, ancak kullanılan bu ilaçların ayrışmadan 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 [2]. 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 itibarıyla beslenme ve endüstride önemli bir yeri olduğundan birçok ülkede yetiştirilmektedir. Anavatanı Çin ve Mançurya'dır [3]. Dünyada en çok soya fasulyesi yetiştiren ülkeler sırası ile ABD, Çin, Rusya, Brezilya, Endonezya, Kore, Japonya ve Kanada'dır. Avrupa'da Romanya ve Türkiye önemli ölçüde soya yetiştiren ülkelerdendir. Soya, bitki gelişimi, verim ve kalite açısından ekolojik koşullara tepkisi oldukça yüksek olan kültür bitkilerindendir. 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 [4]. Soya, önemli bir besin kaynağıdır. Tohumu yüksek oranda ham protein içermektedir. Bu protein, kolay sindirilen proteinlerdendir. En çok cholin, pantothenic asit, niacin, thiamine, riboflavin, inositol, vitamin E, vitamin K içermektedir. Soya A vitamini ve B grubu vitaminlerinin de kaynağıdır [5]. Soyanın beslenme ve yağ eldesi adına önemi, 1940'lara kadar anlaşılamamıştır. 1940'lardan sonra soya yetiştiriciliği ve genetiği üzerinde Amerika'da yoğun araştırmalar başlatılmıştır [6]. 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 [7]. Bu süre kısa zamanda ürün elde etmek isteyenler için oldukça uzun bir süredir.

Doku kültürü ortamında bu süre kullanılan yöntemle bağlı olarak 2 aya kadar düşürülebilmektedir. Soya fasulyesi ile kültür ortamında yapılan çalışmalar özellikle somatik embriyo üzerinde yoğunlaşmıştır. Rajasekaran ve Pellow [8] soya bitkisinin epikotil ve tohumdan gelişen ilk yapraklarından somatik embriyo elde etmişlerdir. En iyi sonuç MS ortamında 2,4-D ile elde edilmiştir. Jank [9] sıvı kallus kültüründen somatik embriyo elde etmişlerdir. Soya fasulyesinde organogenez çalışmaları da yapılmıştır. Write [10] *Glycine max*. üzerinde yaptıkları organogenez çalışmalarında MS ortamında BA kullanarak nodlardan tomurcuk ve gövde etmiştir. Yapılan bir başka çalışma da ise soya bitkisinin hipokotilleri kullanılarak adventif kök üretimi başarılmıştır [11]. Kim ve arkadaşları [12] oksin ve sitokininlerin soya fasulyesi organogenezisi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Yine soya fasulyesi üzerinde yapılan organogenez çalışmalarında White Hilum besi ortamında TDZ ve BA kullanılarak kotiledon nodları üzerinde tomurcuk oluşumları gözlenmiştir. Rejenere edilen tomurcuklar hormonsuz ortamda köklendirilmiştir [13]. Bu çalışmada ekonomik ve besin değeri yüksek olan soya fasulyesinin adventif sürgün rejenerasyonu üzerine BAP'ın farklı konsantrasyonlarının etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu konuda oldukça önemli sonuçlar ve ipuçları elde edilmiştir. Soya fasulyesinin doku kültüründe klonal üretiminin ekonomik boyutlara ulaşması ve ticari şekle dönüştürülebilmesi için daha yoğun ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merrill) bitkisinin Agrova SA88 çeşidi kullanılmıştır. Soya fasulyesi tohumları Adana Tarım İl Müdürlüğünden temin edilmiştir.

2.2. Sterilizasyon

Kullanılan petri, erlen gibi cam malzemeler ile pens, bistüri gibi ekipmanlar ve çalışmada kullanılmış olan Murashige ve Skoog, (Duchefa, Netherland) besin ortamı 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C de farklı sürelerde tutularak sterilizasyonu sağlanmıştır. Sağlam olarak

seçilen soya fasulyesi tohumları önce 5 dk steril saf su içerisinde bekletilmiş. Buradan alınan tohumlar ilk önce %70'lik etanol içerisinde 30 sn, ardından %70 lik ticari çamaşır suyu (ACE-Türkiye, %5 NaOCl) içerisinde 15 dakika tutulmuştur. Bu aşamadan sonra soya tohumları steril saf su ile 3 kez durulanarak, otoklavlanmış kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuştur. Hormonsuz besin ortamlarına her erlene 3 adet soya tohumu gelecek şekilde ekim yapılarak bu ortamlarda çimlendirilmiştir.

2.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

Denemelerde Murashige ve Skoog (MS) besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlar içerisine %3 sakaroz ilave edilmiş ve % 0.8 agar (Sigma) ile katılaştırılmıştır. Ortam hazırlandığında çift distile saf su kullanılmış olup, besin ortamının pH'sı 1M NaOH ve 1M HCl kullanılarak 5.8 e ayarlanmıştır.

2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Çalışmada kullanılan BAP, Sigma Aldrich şirketinden temin edilmiştir. BAP uygun çözücülerde çözündürüldükten sonra istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan BAP stok solüsyonları 4 °C de saklanmıştır.

2.5. İn Vitro'dan Elde Edilen Soya Fidelerinden Eksplant İzolasyonu

İn vitro ortamda steril olarak yetiştirilen soya fidelerinden gövde ucu, boğum, hipokotil, kök ve petiyol eksplantları 1 cm uzunluğunda kesilerek rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. 90x15 mm steril petri kutularında MS ortamında uygun BBD konsantrasyonları eklenerek 16/8 ışık/karanlık fotoperiyodun da 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ floresans ışıklandırmasında iklim dolabında (Fitotron, Sanyo, Gellenkamp PLC, UK) 25±2 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Doku kültürü ile ilgili bütün çalışmalar steril hava akışlı kabin içerisinde yapılmıştır.

2.6. Rejenere Olan Soya Sürgünlerinin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler belirli bir uzunluğa geldikten sonra steril cam kavanozlar içinde farklı konsantrasyonlarda IBA ve NAA içeren köklendirme ortamına aktarılmıştır. Burada köklenen sürgünler saksılara aktarıldıktan sonra

iklim dolabında çevre şartlarına uyumu sağlanmıştır.

3. Bulgular

Bu çalışmada soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merrill) bitkisinin Agrova SA88 çeşidi in vitro ortamda geliştirilmiş. 7-15 günlük fidelerden alınan gövde ucu, boğum, yaprak, hipokotil, kotiledon, kök ve petiyol eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu eksplantlar değişik konsantrasyonlarda BAP içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Farklı BAP konsantrasyonlarının eksplantlar üzerinde etkilerine bakıldığında Tablo 1 deki sonuçlar gözlenmiştir.



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

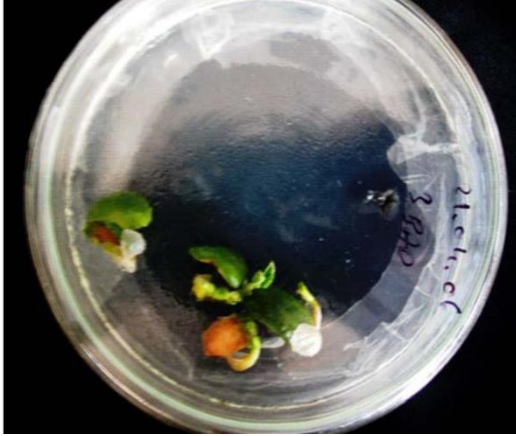
Tablo 1'e göre oldukça verimli sürgün gelişimleri 3 mg/l BAP ortamında boğum eksplantında gözlenmiştir (5-6 sürgün). 5 mg/l BAP ortamına inkübe edilen eksplantlardan da yine en iyi sürgün gelişimi boğum ve sürgün ucunda gözlenmiştir (2-3 adet). Kök eksplantında çürüme olurken, yaprak ve petiyolde verim alınamamıştır. 1 mg/l BAP ortamında ise kallus gelişmesi olmaksızın eksplantlarda sürgün gelişimi gözlenmiştir (3-4 adet). İn vitro şartlarda sürgün rejenerasyonunun sağlandığı besin ortamlarında her zaman köklenmeyi sağlamak mümkün olmamaktadır.

Tablo1. Farklı BAP konsantrasyonlarının değişik eksplantlarda adventif sürgün gelişimi üzerine etkileri (mg/L)

BAP (mg/l)	Kök	Petiyol	Yaprak	Kotiledon	Hipokotil	Boğum	Sürgün ucu
1	-	-	-	C	-	2.75±1.03 C+K	2.67±2.08 K
3	-	-	-	C	K	3.08±1.37 C+K	3.86±3.28 C+K
4	-	-	-	-	-	1.5±1.29 C	1.5±1.29
5	-	-	-	0.75±0.5 C	-	2±0.82 C	1.5±1.29

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

C: Kallus K: Köklenme



Şekil 2. 3 mg/l BAP ortamına inoküle edilen tohumun çimlenmesi.

Bu nedenle sürgünlerin köklenmeyi teşvik edici BBD'nin bulunduğu ortamlara transfer edilmesi gerekmektedir. Köklenmeyi teşvik edici olarak IBA'nın 1mg/l ve 2mg/l konsantrasyonları kullanılmıştır. Kullanılan her iki ortamda da birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. NAA'nın sadece 2mg/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. Çalışma sonrasında köklenen fideler BBD içermeyen MS ortamına aktararak fidelerin belirli bir büyüklüğe gelmeleri sağlanmıştır. Belirli bir büyüklüğe ulaşan fideler 3:1 oranında toprak:kum içeren saksılara ekilerek ortama uyumları gerçekleştirilmiştir.

4. Tartışma

İnsanların beslenmesi yönünden önem taşıyan bitkilerin, verimini, hastalık ve zararlılara karşı dirençlerini arttırmak amacı ile gerçekleştirilen klasik ıslah metotlarının yanı sıra

günümüzde doku kültürü ve biyoteknoloji sayesinde her yönü ile istenen özelliklere sahip bitki türlerinin üretimi çok daha kısa sürelerde ve kontrollü koşullarda elde edilerek bu bitkilerin doğa koşullarına uygun hale getirilmesi mümkündür. Bugüne kadar in vitro şartlar altında yapılan çalışmalar sırasında soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merrill) bitkisinin çok farklı çeşitleri kullanılarak bunların rejenerasyon kapasiteleri, somatik embriyogenez, organogenez gibi alanlarda denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmamızda soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merrill) bitkisinin Agrova SA88 çeşidinin doku kültürü ortamında farklı BAP konsantrasyonları ile gövde ucu, boğum, hipokotil, kotiledon, yaprak, petiyol, ve kök eksplantları kullanılarak adventif sürgün rejenerasyonu ve bu adventif sürgünlerin köklendirilmesi üzerine denemeler yapılmıştır. İn vitro şartlarda yetiştirilen fidelere ait gövde ucu, boğum, hipokotil, kotiledon, yaprak, petiyol ve kök eksplantları BAP'ın farklı konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında inkübe edilmiştir. Bu ortamlar vasıtası ile adventif sürgün oluşturma potansiyelleri arttırılmıştır. Özellikle 3 mg/l BAP ortamında gövde ucu eksplantında en verimli tomurcuk patlaması gözlenmiştir. 3 mg/l BAP konsantrasyonunda hipokotil 2-3 tomurcuk verirken boğum da 5-6 tomurcuk gözlenmiştir. Kotiledon eksplantın da ise 3-4 tomurcuk patlamasıyla birlikte kallus gelişimi gözlenmiştir. BAP'ın farklı konsantrasyonları kullanıldığında eksplantlardaki tomurcuk patlama sayıları birbirine yakın değerlerdir. Boğum eksplantı 1mg/l konsantrasyonda 3-4 tomurcuk verirken, 4mg/l BAP konsantrasyonunda 3 tomurcuk vermiştir. Buna rağmen 3mg/l BAP konsantrasyonu Sürgün ucunda 3-11 arasında tomurcuk vermiştir. 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 edilmiştir. 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 gözlenmemiştir. Ayrıca eksplantlarda sürgün gelişiminin yanı sıra yeşil-sert ve sarı-yumuşak kıvamda çeşitli kallusların geliştiği de gözlenmiştir. 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, sürgün gelişimi ve yaprak patlamasına neden olduğu, oksinlerle kullanıldığında kök gelişimini teşvik ettiği bilinmektedir [14]. Bu çalışmamızda BAP ile sürgün gelişiminin olması bu bulguları doğrulamaktadır. Ayrıca adventif sürgün rejenerasyonunun büyük ölçüde sıcaklık ve genotipten etkilendiği de belirlenmiştir [15]. Gelişen adventif sürgünler köklendirilmek amacıyla 1 mg/l ve 2 mg/l IBA içeren ortamlara aktarılmışlardır. Oksinlerin köklenmeyi teşvik ettiği bilinen bir gerçektir [16]. Ancak bu çalışmada oksin tek başına köklendirmede başarılı olmuştur. Yapılan köklendirme çalışmalarından sonra sürgünlerin gelişimini tamamlayabilmeleri için BBD içermeyen MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda gelişen soya fasulyesi fideleri saksılara transfer edilmiş. İklimlendirme dolabında belli bir büyüklüğe getirilerek daha sonra bitkinin normal şartlara adaptasyonu sağlanmıştır. Bu bitkiler çiçeklenme aşamasına kadar büyütülmüştür.

5. Kaynaklar

- Özcan, S., Özgen, M., Bitki genetik mühendisliği, Kükem dergisi, 1(1): 69-95, 1996.
- Akı, C., *Capsicum annum* L. Nin bazı varyeteleri üzerinde doku kültürü çalışmaları, Doktora tezi, Ege üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1997.
- Markley, S.K., Soybeans and soybean products, Volum 1, New York, USA. P, 15-210, 1950.
- İşler, N., Çalışkan, M.E., GAP bölgesi ekolojik koşullarında soyada (*Glycine max*. L. Merrill) verim ve verime etkili bazı özelliklerin korelasyonu ve path analizi. Tr. J. Of Agriculture and Forestry, 22,1-5, 1998.
- Shurpalekar, S.A., Chemical composition and nutritive value of soybeans and soybeans products. Soybeans concil of America, international Office. Vol. 11 No:2, 7-12, 1961, Roma.
- Fehr, W.R., Breeding methods for cultivar development in B. E. Caldwell (Ed) soybeans. Improvement, production and uses, Agronomy, 16, 249-294, 1987.
- Yılmaz, H.A., Efe, L., Bazı soya (*Glycine max*. L. Merrill) çeşitlerinin Kahramanmaraş koşullarında 2. Ürün olarak yetiştirilebilme olanakları. Tr. J. Of Agriculture and Forestry, 22, 135-142, 1998.
- Rajasekaran, K., Pellow, J.W., Somatic embriogenesis from cultured epicotyls and primary leaves of soybean (*Glycine max*. L. Merrill), In Vitro Cell Dev. Biol Plant, 33, 88-91, 1997.
- Jang, G.W., Park, R.D., Kim, K.S., Plant regeneration form embryogenic suspension cultures of soybean (*Glycine max*. L. Merrill), J. Plant Biotechnology, 3(2), 101-106, 2001.
- Wright, M.S., Koehler, S.M., Hinchee, M.A., Carnes, M.G., Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*, Plant Cell Reports, 5(2), 150-154, 1986.
- Dan, Y., Reichert, N.A., Organogenic regeneration of soybean (*Glycine max*. L. Merrill) from hypocotyl explants, In Vitro Cell Dev. Biol. Plant, 34, 14-21, 1998.
- Kim, K.H., Park, H.K., Park, M.S., Yeo, U.D., Effects of auxins and cytokinins on organogenesis of soybean (*Glycine max*. L. Merrill), J. Plant Biotechnology, 3(2), 95-100, 2001.
- Shan, Z., Raemakers, K., Tzitzikas, E.N., Ma, Z., Visser, R.G.F., Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max*. L. Merrill), Plant Cell Reports, 24(9), 507-512, 2005.
- McGaw, B.A., Cytokinin biosynthesis and metabolism, Plant hormones, pyhsiology, biochemistry and molecular biology, Kluwer academic Publisher, Dordrect, Netherlands, p66-98, 1995.
- Mansuroğlu, S., Gürel, E., Bitki biyoteknolojisi I doku kültürü ve uygulamaları, Selçuk üniversitesi basımevi, 2001.
- Kadioğlu, A., Bitki Fizyolojisi, Eser ofset matbacılık, 258-317, 2004, Trabzon.