

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKLA (*Vicia faba*.L) BİTKİSİNDE DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Gülden ÇETİN

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2010**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Gülden ÇETİN tarafından hazırlanan “**Bakla (*Vicia faba.L*) Bitkisinde Doku Kültürü alışmaları**” adlı tez çalışması 13.12.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Jüri yeleri:

Başkan: Prof. Dr. Orhan ARSLAN
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

ye : Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

ye : Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof.Dr.Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAKLA (*Vicia faba* L.) BİTKİSİNDE DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Güliden ÇETİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim dalı

Danışman : Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Bakla (*Vicia faba* L.) insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan proteince zengin bir yemeklik tane baklagil cinsi olup, tüm dünyada yetiştiriciliği yapılmaktadır. Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak günümüzde artık hastalık ve zararlılara, zor şartlara soğuğa, kurağa, tuzluluğa dayanıklı bitkiler elde edilebilmektedir. Ancak baklada bugüne kadar biyoteknolojik yöntemler kullanılarak fazla çalışma yapılmamıştır. Bu tezin amacı; beslenme değeri yüksek olan bakla bitkisinde gen aktarımına uygun bir sürgün rejenerasyonu sisteminin geliştirilmesidir. Bu amaçla Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin tohumları saf su, sukroz içermeyen sıvı MS, şekerli su ve şekerli sıvı MS içeren ortamlarda 24 saat ön muameleye tabi tutulmuştur. Daha sonra plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları farklı oranda BAP ile NAA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. En fazla sürgün rejenerasyonu şekerli su ön muamelesinde 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besi ortamında plumula uçlarından elde edilmiştir. Beş hafta sonra sürgünler 1 mg/l IAA içeren MS besi ortamında köklendirilmiştir. İkinci denemede ise her iki çeşidin embriyoları 10 mg/l BAP içeren MS ortamlarında 6 gün bekletilmiştir. Daha sonra embriyolardan alınan plumula uçları farklı oranda BAP ve BAP ile NAA içeren MS besi ortamlarında rejenerasyona tabi tutulmuştur. En fazla sürgün rejenerasyonu 10 mg/l BAP içeren ortam ile ön muamele yapılmış plumula uçları eksplantalardan 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamda elde edilmiştir. Yine beş hafta sonra sürgünler 1 mg/l IAA içeren MS besi ortamında köklendirilmiştir. Her iki denemeden elde edilen bitkiler çiçeklendirme ve tohum tutturma amacıyla seraya aktarılmıştır.

Aralık 2010, 55 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Bakla, rejenerasyon, plumula uçları, embriyo ekseni, *in vitro*, köklendirme

ABSTRACT

Master Thesis

TISSUE CULTURE STUDIES IN BROAD BEAN (*Vicia faba* L.)

Gülden ÇETİN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor : Associate Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

Broad bean (*Vicia faba* L), an important legume for human and animals, is rich in protein and is widely used throughout the world. These days new varieties resistant to diseases, cold stress, drought, and salt stress are developed using biotechnological methods. Very few studies are available on this subject in broad bean. The study aimed to develop a shoot regeneration method, more suitable for genetic transformation of broad bean. The seeds of Filiz 99 and Eresen 87 varieties were pretreated with water, liquid MS medium without sucrose, sucrosed water and liquid MS medium containing sucrose for 24 h. Thereafter, plumular tips and embryonic axis were cultured on MS medium containing different concentrations of BAP-NAA. Maximum shoot regeneration was recorded on plumular apices on MS medium containing 0,25 mg/l BAP and 0,25 mg/l NAA. After 5 weeks the shoots were rooted in MS medium containing 1 mg/l IAA. In the second experiment, embryos of two cultivars were pre treated with 10 mg/l BAP for 6 days. Thereafter, plumular shoot tips obtained from the embryos were cultured on MS medium containing different concentrations of BAP and NAA. Maximum shoot regeneration was recorded on the explants pretreated with 10 mg/l BAP followed by culturing on MS medium containing 0.25 mg/l BAP and 0.25 mg/l NAA. The regenerated shoots were rooted on MS medium containing 1 mg/l IAA. The plants from both experiments were transferred to the greenhouse for flowering and seed set.

December 2010, 55 Pages

Key Words: *Vicia faba*, regeneration, plumular shoot tips, embryonic axis, *in vitro*, rooting

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bakla, yemeklik tane baklagillerden önemli bir bitkidir. Bakla tohumları, % 25-35 arasında değişen yüksek protein oranları ile insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir protein kaynağıdır. Ayrıca köklerinde bulunan azot yumrucukları ile atmosferdeki nitrojeni toprağa fikse ederek toprağı azotça zenginleştirmektedir. Doku kültürü teknikleri bilinmeden ve kullanılmadan bitkilerin genetik yolla iyileştirilmesi, şu an için mümkün gözükmemektedir. Bu sebeplerle bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar bitki ıslahçılarına, biyologlara ve ticari olarak bitkilerin üretilmesi ile ilgili çalışan özel sektöre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Yüksek Lisans Tezimin yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen, araştırma ve çalışma şevkini kazandıran, tez konumun seçiminde ve yürütülmesinde bilgi ve tebrübelerinden faydalandığım tez danışmanım sayın Doç. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR'a (Ankara Üniversitesi), en içten teşekkürlerimi sunarım. Bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Nilgün BAYRAKTAR'a (Ankara Üniversitesi), laboratuvar olanaklarından yararlanmamızı sağlayan sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a (Ankara Üniversitesi), tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olan sayın Yrd. Doç. Dr. Sevil SAĞLAM'a (Ahi Evran Üniversitesi), laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi), Araş. Gör. Sibel DAY'a (Ankara Üniversitesi), Araş. Gör. Cansu TELCİ'ye (Ankara Üniversitesi), çalışma arkadaşlarıma, laborant arkadaşım Burak ÖNOL'a saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca bakla tohumlarının temininde emeği geçen sayın Dr. Taner AKAR'a, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ve bu zamana kadar değerli bilgileriyle eğitim hayatıma katkıda bulunan bütün hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim. Manevi desteğini her zaman hissettiren arkadaşım Bahar ARSLAN ve bugüne kadarki tahsil hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği gösteren kıymetli babam Mustafa ÇETİN ve değerli annem Yeter ÇETİN'e, sevgilerini göstermekten kaçınmayan ablam Gülay SİRTAŞ ve eniştem Burak SİRTAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Gülden ÇETİN

Ankara, Aralık 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1 Bitki Materyali.....	15
3.2 Doku Kültürü Metotları.....	15
3.2.1 Büyüme düzenleyicileri ve saklama koşulları.....	15
3.2.2 Besi ortamları ve kültür koşulları.....	15
3.3 Yüze Sterilizasyonu.....	16
3.3 <i>In Vitro</i> Çalışmaları.....	16
3.4.1 Bakla tohumlarının <i>in vitro</i> 'da çimlendirilmesi.....	16
3.4.2 Sürgün rejenerasyonu.....	16
3.4.3 Sürgünlerin köklendirilmesi.....	17
3.5 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	17
4.BULGULAR.....	19
4.1 Farklı Dezenfektan Dozlarının Filiz 99 ve Eresen 87 Çeşitlerinin Tohumlarının Çimlenme Oranları Üzerine Etkisi	19
4.2 Değişik Ön Muamelelerden Sonra Farklı BAP ve NAA İçeren MS Ortamlarda Sürgün Rejenerasyonu.....	20
4.2.1 Saf su ile ön muamelenin etkisi	20
4.2.2 Sukroz içermeyen sıvı MS ortamı ile ön muamelenin etkisi.....	24
4.2.3 Sukroz içeren saf su ile ön muamelenin etkisi.....	28
4.2.4 Sukroz içeren sıvı MS ortamı ile ön muamelenin etkisi.....	32

4.3 Farklı Çeşit, Eksplant ve Muamele Sonucu Elde Edilen	
SürgünlerinKöklenmeye Etkisi.....	38
4.4 Dış koşullara Alıştırılması.....	41
4.5 Filiz 99 ve Eresen 87 Çeşitlerinin 10 Mg/L Bap İle Ön Muamele Edilmiş	
Plumula Uçları Ve Embriyo Ekseni Eksplantlarından Farklı Ortamlarda	
Sürgün Rejenerasyonu.....	41
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	55

SİMGELER DİZİNİ

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
AgNO ₃	Gümüş nitrat
BAP	6 Benzilaminopürine
F	F testi
g, mg, µg	gram, miligram, mikrogram
GA ₃	Giberellik asit
Ha	Hektar
HCL	Hidroklorik asit
IAA	Indol 3 asetik asit
IBA	Indol 3 bütirik asit
K.O	Kareler ortalaması
l, ml, µl	Litre, mililitre, mikrolitre
Mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NAA	α Naftalenasetik asit
NaOCl	Çamaşır suyu
NaOH	Sodyum hidroksit
S.D.	Serbestlik derecesi
TDZ	Thidazuron (1 Phenyl 3-(1,2,3-thidiazol 5yL) urea)
V.K.	Varyasyon kaynakları
°C	Santigrad derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünün deneme tarlalarında yetiştirilen bakla bitkisinin bir görüntüsü.....	3
Şekil 1.2	Türkiye’de Akdeniz, Ege ve Güney Marmara bölgelerinde bakla yetiştiriciliği yapılan iller	4
Şekil 4.1	Saf su ile 24 saat ön muamele yapılmış baklanın Filiz 99 çeşidinin plumula uçlarında sürgün rejenerasyonu (a) 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamlarda plumula ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu (b) Elde edilen sürgünlerin 1 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmesi.....	24
Şekil 4.2	Sukroz içermeyen sıvı MS ile 24 saat ön muamele yapılmış baklanın Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında sürgün rejenerasyonu (a) 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamlarda embriyo ekseni eksplantından sürgün rejenersayonu (b) Elde edilen sürgünlerin 1 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmesi.....	28
Şekil 4.3	Sukroz içeren saf su ile 24 saat ön muamele yapılmış baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin plumula ucu ve embriyo ekseni eksplantında sürgün rejenerasyonu (a) Eresen 87 çeşidinin 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda plumula ucu eksplantından ve (b) Eresen 87 çeşidinin 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda embriyo ekseni eksplantından sürgün rejenersayonu (c) Filiz 99 çeşidinin 0.25 mg/l BAP ile 0.10 mg/l NAA içeren MS ortamda embriyo ekseni (d) Filiz 99 çeşidinin 0,25 mg/l BAP ile 0,25mg NAA içeren MS besin ortamında plumula ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu.....	32
Şekil 4.4	Sukroz içeren sıvı MS ile 24 saat ön muamele yapılmış baklanın Filiz 99 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında sürgün rejenerasyonu (a) 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarda embriyo ekseni eksplantından sürgün rejenerasyonu (b) Elde edilen	

	sürgünlerin 1 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmesi.....	36
Şekil 4.5	Baklanın Filiz 99 çeşidine ait sürgünlerin <i>in vitro</i> koşullarda 1mg/l IAA içeren MS ortamda köklendirilmesi.....	37
Şekil 4.6	Baklanın Eresen 87 çeşidine ait sürgünlerin <i>in vitro</i> koşullarda 1mg/l IAA içeren MS ortamda köklendirilmesi.....	38
Şekil 4.7	Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin <i>in vitro</i> koşullarda köklendirilmesi (a1, a2) Eresen 87 ve Filiz 99 çeşitlerinin sukroz içeren sıvı MS ile ön muamele görmüş tohumlarından elde edilen plumula ucu eksplantlarından gelişen sürgünlerin köklenmesi i-IAA muamele sonucunda gelişen sürgünler ve ii- kök uçları, (b,c) Filiz 99 (d,e) Eresen 87 çeşidinin saf su ile ön muamele görmüş tohumlarından gelişen embriyo eksenli eksplantlarından elde edilen sürgünlerin köklenmesi.....	40
Şekil 4.8	Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin plumula ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu (a) Filiz 99 çeşidinin 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda ve (b) Eresen 87 çeşidinin 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonu (c) Filiz 99 çeşidinin 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamda (d,e,f) Eresen 87 çeşidinin eksplantından sürgünlerin köklendirilmesi.....	44

ÇİZİLGELER DİZİNİ

Çizelge1.1	Baklanın 2000-2009 yılları arasında dünyada ekim alanı, üretim ve verim değerleri.....	4
Çizelge1.2	Ülkeler itibariyle bakla Ekim Alanı, Verim ve Üretim Değerleri.....	5
Çizelge3.1	Kullanılan Bitki Hormonları, çözücüleri, dozları ve saklama koşulları.....	15
Çizelge 4.1	Farklı çamaşır suyu konsantrasyonlarının baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisine ait varyans analizi tablosu.....	19
Çizelge 4.2	Farklı çamaşır suyu konsantrasyonlarının baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi	20
Çizelge 4.3	Saf su ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonun etkisine ait varyans analizi.....	21
Çizelge 4.4	Saf su ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenleri eksplantlarından elde edilen sürgünlerin rejenerasyonu.....	23
Çizelge 4.5	Sukroz içermeyen sıvı MS ortamı ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonun etkisine ait varyans analizi.....	25
Çizelge 4.6	Sukroz içermeyen sıvı MS ortamı ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonu.....	26

Çizelge 4.7	Sukroz içeren saf su ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi.....	29
Çizelge 4.8	Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenini eksplantlarından elde edilen sürgünlerin rejenerasyonu.....	30
Çizelge 4.9	Sukroz içeren sıvı MS ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi.....	33
Çizelge 4.10	Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenini eksplantlarından elde edilen sürgünlerin rejenerasyonu.....	35
Çizelge 4.11	Farklı Çeşit, Eksplant ve Muamele sonucu elde edilen sürgünlerin köklenmeye etkisine ait varyans analizi.....	38
Çizelge 4.12	Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde plumula uçları ve embriyo eksenini eksplantlarından elde edilen sürgünlerin köklenmeye etkisi.....	39
Çizelge 4.13	Farklı muamele ve farklı eksplantlardan elde edilen sürgünlerin köklenmeye etkisi.....	40
Çizelge 4.14	BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçlarından sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi...	42
Çizelge 4.15	Farklı BAP ve NAA dozlarının Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula ucu eksplantlarından elde edilen sürgünlerin rejenerasyonu	43

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışı, tarım alanlarının son sınırlarına ulaşması, toplumlara ya da bölgelere özgü birçok nedenden dolayı dünyanın birçok yerinde yetersiz ve dengesiz beslenme sorununu ortaya çıkarmıştır. Bu sorun bazı ülkelerde toplu ölümlerle, bazılarında ise sağlık problemlerinin artışı şeklinde kendini göstermekte olup, tek çözüm yolu da bitkisel ve hayvansal üretimi artırmaktır. En önemli protein kaynağı olan hayvansal ürünlerin pahalı oluşu, zor bulunmaları, çabuk bozulmaları ve kolesterol içeriklerinin yüksek oluşu; yemeklik tane baklagillerin proteinlerinin önemi ön plana çıkarmaktadır (Aasim 2010).

Giderek artan dünya nüfusu beraberinde beslenme ihtiyacını da artırmaktadır. Tarımsal faaliyetlerin gelişme süreci incelendiğinde iki önemli dönem göze çarpmaktadır. Bunlardan birisi ve ilki, 1950'li yıllar sonrasında tüm dünyayı etkisi altına alan ve büyük bir yıkım meydana getiren 2. Dünya Savaşı sonrası dönemde ortaya çıkmış ve artan nüfusun beslenme gereksinimlerinin karşılanması için geliştirilen yeni teknikleri kapsayan dönem, “Yeşil Devrim” olarak adlandırılmıştır. Üstün özelliklere sahip çeşitlerin geliştirilmesini sağlayan, ticari gübrelerin kullanımını, agronomik tekniklerin ileri düzeyde uygulanabilirliğini artıran yeşil devrim tarımsal üretimde ciddi anlamda artış meydana getirmiştir. Bu dönem, küçük alanlarda en yüksek ürün alınabilmesi için tarım ilaçlarının, kimyasal gübrelerin ve aşırı suyun kullanıldığı bir dönem olmuştur (Khush 2001, Godfray vd. 2010). Yaklaşık olarak 15–20 yıl içerisinde hızla etkisini hissettiren bu gelişmeler 1970'li yıllar sonrasında insan sağlığının ön plana çıkması ve çevresel hareketlerin özellikle de tarımsal faaliyetlerin insan sağlığı üzerine etkilerinin araştırılmaya başlaması ile tartışmaların başladığı bir sürece girmiştir. Tarım ilaçlarının ve kimyasal gübrelerin gereğinden fazla kullanımı insan sağlığına zarar vermeye başladığına dair çalışmalar ortaya konulmuş ve bazı tarım ilaçlarının kullanımı yasaklanmıştır. Tarım toprakları kimyasal maddelerin aşırı kullanımı ile kirlenmiş, su kaynakları dikkatsizce kullanılarak azalmaya ve nerdeyse tükenmeye başlamıştır. 1980'li yıllara gelindiğinde ise bu ve benzeri sebeplerle 50'li ve 60'lı yıllarda tarımda yaşanan yeşil devrim geriye çevre kirliliği gibi ciddi yan etkiler bırakmıştır (Balmford

vd. 2005, Pretty 2008). Bilim adamları yaşanan bu gelişmeler sonucunda insanlığın beslenme ihtiyacının karşılanması için yeni yöntemler geliştirme yoluna gitmişlerdir. Bu gelişmeler diğer çok önemli ikinci bir dönemin başlamasına zemin oluşturmuştur. Özellikle son yıllarda etkisinin daha fazla hissedildiği biyoteknoloji uygulamaları ile yaşanan ve tarımsal faaliyetlerin gelişme süreci içerisinde ikinci önemli dönem ise 'gen devrimi' olarak adlandırılmaktadır. Özellikle bitki biyoteknolojisi, çeşitli doku kültürü ve genetik mühendisliği tekniklerini kullanarak bitkilerin moleküler seviyede iyileştirilmesini üstün niteliklere sahip daha fazla verim sağlayan hastalık ve zararlılara dayanıklı, tuzluluk, kuraklık, soğuk gibi abiyotik stres koşullarına da dayanabilen yeni çeşitlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Tarımsal öneme sahip genler değişik kaynaklardan 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 çoğaltılarak bitkiye dönüştürülebilmesi için doku kültürü yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Tilman vd. 2002, Gewin 2010, Godfray vd. 2010).

Baklagiller (Leguminosae) dünyanın en geniş üç familyasından biridir ve kutuplar hariç dünyanın hemen her tarafına yayılmış bir familyadır. İnsan yiyeceği ve hayvan yemi olarak kullanılan önemli bir familya olmasının yanı sıra, çok sayıda süs bitkisi olan cinsleri de içermektedir (Ceyhan 2007). Dünya genelinde insan beslenmesindeki bitkisel proteinlerin % 22'si karbonhidratların da % 7'si yemeklik tane baklagillerden sağlanmaktadır. Bileşimlerinde % 18-36 oranında protein içermesi ve bu proteinlerin içerisinde mutlak gerekli aminoasitlerin bulunması oldukça önemlidir. Bakla; fasulye, mercimek, börülce, nohut ve bezelyeyi içine alan yemeklik tane baklagillerden önemli bitkidir. Bakla tohumları, % 25-35 arasında değişen yüksek protein oranları ile insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir protein kaynağıdır (Nachi ve Guen, 1996). Ayrıca köklerinde bulunan azot yumrucukları ile atmosferdeki nitrojeni toprağa fikse ederek toprağı azotça zenginleştirmektedir. Ancak çok sayıdaki olumlu etkilerine rağmen, Türkiye'de bakla bitkisinden (Şekil 1.1) yeterince yararlanabildiğimiz söylenemez. Bakla yetiştiriciliğindeki en önemli sorunların başında verimin yıllar veya yetiştirme dönemleri arasında büyük kararsızlık göstermesi gelmektedir. Birim alandan

alınan verimi artırmada kültürel uygulamalar yanında, ekolojik koşullara uygun çeşitlerin geliştirilmesi ve kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bakla verimi çevre koşullarından büyük ölçüde etkilenmektedir (Lawes vd. 1983).



Şekil 1.1 Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'nün deneme tarlalarında yetiştirilen bakla bitkisinin bir görüntüsü

Türkiye'de bakla Akdeniz'den Karadeniz'e kadar bütün sahil kesiminde yetişme özelliğinde olmakla beraber üretimin % 80'i Ege ve Güney Marmara'da yoğunlaşmaktadır (Anonim, 2009a).

Toplam üretim alanının ve üretim miktarının % 75'ine Balıkesir ve Çanakkale illeri sahiptir. Akdeniz ve Güney Ege'de turfanda sebze olarak yetiştirilen bakla Kuzey Ege ve Güney Marmara'da kuru tanesi için yetiştirilmektedir (Şekil 1.2)



Şekil 1.2 Türkiye’de Akdeniz, Ege ve Güney Marmara bölgelerinde bakla yetiştiriciliği yapılan iller

Dünya’da baklanın ekim alanı 2000 yılında 2 498 (ha) iken 2009 yılında 2507(ha), verimi 2000 yılında 1 481 (kg/ha), 2009 yılında ise 1 633 (kg/ha), üretimi 2000 yılında 3 700 ton iken 2009 yılında 4 096 tona yükselmiştir. (Çizelge 1.1, Anonim 2009b).

Çizelge 1.1 Baklanın 2000-2009 yılları arasında dünyada ekim alanı, üretim ve verim değerleri (Anonim, 2009b)

Yıllar	Ekim Alanı (bin ha)	Üretim (bin ton)	Verim (kg/ha)
2000	2 498	3 700	1 481
2001	2 773	4 128	1 488
2002	2 697	4 291	1 590
2003	2 705	4 508	1 666
2004	2 638	4 285	1 624
2005	2 619	4 419	1 687
2006	2 407	4 106	1 705
2007	2 468	3 920	1 588
2008	2 512	4 320	1 719
2009	2 507	4 096	1 633

Baklanın 2007 yılında ekim alanı 10 800 (ha), verimi 1 944 (kg/ha) üretimi ise 21000 ton'dur, aynı yılda istatiklere göre Türkiye'nin baklayla ilgili dış satımı 901 805 ve dış alımı 424 765 dolardır (Çizelge 1.2, Anonim 2009b ve Anonim 2009c). Baklanın bazı tarımsal karakterleri klasik ıslah yöntemleriyle iyileştirilebilirken, bitki hala birçok hastalık ve zararlıının tehdidi altındadır. Klasik bitki ıslahında özellikle melez çeşitlerden yararlanılarak elde edilen ürün miktar ve kalitesinde önemli artışlar sağlanmakla birlikte; hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere bitkilerin diğer birçok tarımsal özelliklerini iyileştirmede önemli sınırlamalarla karşılaşmaktadır.

Çizelge 1.2 Ülkeler itibariyle bakla ekim alanı, verim ve üretim değerleri (Anonim 2009b, Anonim 2009c)

Ülkeler	Ekim Alanı (bin ha)		Üretim (bin ton)		Verim (kg/ha)	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007
Çin HalkCumhuriyeti	929	912	1 730	1 420	1 862	1 557
Etiyopya	458	458	599	576	1 399	1 257
Fas	181	181	181	70	1 071	3 867
Avustralya	133	133	10,8	138	706	1 038
Türkiye	10,5	10,8	21	21	2 023	1 944

Kısırlık ve uyumsuzluk nedeniyle türlerarası melezlemenin yapıldığı bitki sayısının azlığı, istenen karakterlerle beraber istenmeyen özelliklerin de birlikte geçmesi, önemli genetik karakterlerin seçiminin uzun zaman gerektirmesi gibi sorunlar bitki genetik mühendisliği çalışmaları ile çözülebilmekte ve geleneksel ıslah süreci kısaltılmaktadır (Lindsey 1992, Özcan ve Özgen 1996).

Birim alandan alınan verimi artırmada kültürel uygulamalar yanında, ekolojik koşullara uygun çeşitlerin geliştirilmesi ve kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bakla yetiştiriciliği üzerine orobanş, anthracnose, hem tarla hemde depolardaki böcekler, gibi çeşitli faktörler verimi düşürmekte ve zararın çok yoğun olduğu yerlerde çiftçiler bakla

ekiminden vazgeçmektedirler. Bu sorunları gidermek için klasik islah yöntemler yetmemektedir ve hızlı şekilde bunların ortadan kaldırılması için biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Cubero ve Hernandez 1991, Weigand ve Bishara 1991, Ondřej ve Huňady 2007).

Bakla bitkisinde genel anlamda rejenerasyon büyük bir sorun olarak görülmekte ve dolayısıyla gen aktarımı çalışmaları için uygun rejenerasyon sistemine yönelik çok sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Daha önce yapılmış çalışmalarda dünyanın çeşitli yerlerinde bakla üzerinde doku kültürü ve transgenik bitki eldesine yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır (Rezmer vd. 1999, Hanafy vd. 2005, Rajesh vd. 2005). Ancak, Türkiye’de lupinus türü baklalarda rapd, issr ve Agrobacterium ile gen aktarım çalışmaları bulunurken (Babaoğlu vd. 2000, Yorgancılar vd. 2009) *Vicia faba* üzerinde henüz bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; yemeklik tane baklagillerinden beslenme ve ekonomik değeri yüksek olan bakla bitkisinde gen aktarımına uygun bir sürgün rejenerasyonu sisteminin geliştirilmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Önemli Yemelik Tane Baklagillerde Doku Kültürü Çalışmaları

Gamborg vd. (1974), bezelye (*Pisum sativum* L.)’de apikal hücrelerden sürgün oluşturmayı başarmışlardır. Sürgün uçlarını yumuşaması için bir gün suda bekletmişler ve hücreleri agarlı ortamda geliştirmişlerdir. Bu hücreler 0.2-5.0 µM BAP ve 1.0 mM NAA içeren besin ortamında 4-6 hafta içinde kallus ve sürgün oluşturmuştur. Kalluslar çok sayıda sürgün oluşturmuş ancak gelişen sürgünlerden başarılı bir köklenme meydana gelmemiştir.

Mroginski ve Kartha (1981), yaptıkları çalışmada *in vitro*’da elde edilen 3 günlük bezelye yapraklarını, 0.1, 1 ve 10 µM BAP ve NAA içeren B5 ortamlarına aktarmışlardır. Her ortamda 45–90 gün içinde, primer kallustan sürgünlerin geliştiği görülmüştür. En çok sürgün sayısı, 10 µM NAA ve BAP içeren B5 ortamlarından elde edilmiştir. 10 günlük yaprak eksplantları sürgün oluşturmamış, sürgün oluşturmayan kallusların 1 µM NAA içeren B5 ortamında köklendiği görülmüştür.

Jacobson ve Wilfred (1984), Dippes, Gelbe ve Victoria bezelye çeşitlerine ait yaprak eksplantlarını, 0.06 mg/l pikloram içeren MS besin ortamına aktarmışlar, burada gelişen kallusları sıvı ortama alarak embriyoid oluşumunu sağlamışlardır. Sıvı ortamda embriyoidlerin kallustan bir kaç gün sonra ayrıldığı görülmüştür. Torpedo şeklindeki bu embriyoidler daha sonra katı ortama aktarılmıştır. Aynı çeşitlerin epikotillerinden gelişen kalluslardan da embriyogenesinin meydana geldiği görülmüştür.

Hussey ve Gunn (1984), çimlendirilen bezelye tohumlarından aldıkları eksplantları, 1 mg/l BAP ile 4 ve 8 mg/l IBA içeren farklı MS besin ortamına alarak kallus ve sürgün oluşumunu teşvik etmişlerdir. Aynı ortamlara 2–4 hafta sonra 0.25 mg/l IBA daha ilave edilmiştir. Bu ortamlarda rejenere olan sürgünler, ½ MS mineralleri, % 15 sukroz ve 2 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmiştir.

Rubluo vd. (1984), yaptıkları çalışmada, farklı konstrasyonlardaki bazı sitokin ve oksin kombinasyonlarını kullanarak, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış bezelye yaprakcıklarından öncelikle sürgünler daha sonra da tam bitkiler elde etmişlerdir. BAP, NAA, IBA ve IAA içeren MS besin ortamında olgunlaşmamış yaprakcıklar ortalama 0.9-1.8 mm uzunluğunda sürgünler oluşturmuştur. Oluşan sürgün yüzdesi, ortalama % 26-38 arasında değişmiştir. BAP ve NAA içeren ortamda, olgunlaşmış yapraklardan gelişen sürgünlerin oranı % 7'ye kadar düşmüştür. GA₃'in sürgün oluşumunda etkili olmadığı, pikloram ve 2,4-D'nin ise olumsuz etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, adventif sürgün rejenerasyonunun büyük ölçüde sıcaklık ve genotipten etkilendiği belirtilmiştir.

Kysely vd. (1987), yaptıkları çalışmada bezelye (*Pisum sativum* L.)'de olgunlaşmamış embriyo ve sap uçlarını kullanarak adventif sürgün rejenerasyon yoluyla yeni bitkiler elde etmişlerdir. Somatik embriyo oluşumu, besin ortamına Pikloram ya da 2,4-D ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. Gelişkin embriyolar elde edebilmek için önce sitokin daha sonra ise oksin konsantrasyonu azaltılmıştır. Elde edilen bitkiler sitolojik olarak incelendiğinde ise, 3'ünün tetraploid, 6'sının diploid olduğu görülmüştür.

Polanco vd. (1988), kültür ortamı ve eksplant tipinin, mercimekte kallus ve sürgün oluşumuna etkisini incelemişlerdir. Üç İspanyol mercimek çeşidine ait değişik eksplantlar, (sürgün ucu, birinci boğum ve ilk yaprak çifti) BAP, NAA, IAA ve 2,4-D içeren 2 temel besin ortamında (MSO ve B5) kültüre alınmıştır. 2,4-D içeren besin ortamında tüm eksplantlar kallus oluşturmuş, ancak hiç organogenesis meydana gelmemiştir. En çok sürgün, 2.25 mg/l BAP, 0.186 mg/l NAA ve 2.25 mg/l IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Sürgün oluşumunda en etkili hormonun BAP olduğu, ancak bu hormonun köklenmeyi azalttığı görülmüştür. Köklenme, sadece NAA veya IAA içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Sürgün oluşumu bakımından en iyi sonucun birinci boğum eksplantlarından, en düşük sonuçların ise ilk yaprak çifti eksplantlarından elde edildiği bildirilmiştir.

Singh ve Raghuvanshi (1989), mercimekte boğum araları, meristem uçları ve kalluslardan yeni bitkiler elde etmek amacıyla boğum araları ve meristem uçlarını farklı hormonlar içeren MS besin ortamına almışlar, 4 hafta sonra sürgün ve kök oluşumunu incelemişlerdir. Kinetin içeren besin ortamında kallus ve köklenme olmadan çok sayıda direkt sürgün oluşmuş, en iyi kallus oluşturma ortamının 1.0 mg/l Kinetin ve 10.0 mg/l 2,4-D içeren MS besin ortamı olarak belirlenmiştir. Sürgün boğumları yeni bitkicik oluşturmak için MSO temel besin ortamına alınmış ve daha sonra toprağa aktarılmıştır.

Jackson ve Hobbs (1990), bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkisinin kotiledon boğumlarından, 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamında çok sayıda adventif sürgün elde etmişlerdir. Sitokinin konsantrasyonu arttıkça sürgün ucu sayısının da arttığı görülmüştür. Ancak, 5 mg/l BAP içeren besin ortamında oluşan sürgünler camsılaşma göstermişler ve köklenememişlerdir. Kullanılan bütün çeşitlerin boğumları 5 gün sonra sürgün oluşturmuş ve bu sürgünlerden 21 gün sonra eksplant alınmıştır. Yapılan histolojik çalışmalar, boğum ve sürgünlerin yüzeysel doku tabakalarından geliştiğini göstermiştir. Bu sistemin transgenik bitkiler elde etmek için kullanılabilmesi bildirilmiştir.

Özcan vd. (1992), bezelyede olgunlaşmamış kotiledonlardan sürgün rejenerasyon protokolü geliştirmişlerdir. Çalışma sonunda, 0.5 mg/l BAP ve 4 mg/l NAA içeren MS besin ortamında çoklu sürgünler elde edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu embriyo ekseninin kotiledondan koparıldığı bölgede gerçekleşmiştir. Ancak eksplantlarda embriyonik eksenlerin varlığı, sürgün oluşumuna engel olmuştur. Besin ortamına AgNO₃ ilave edildiğinde rejenere olan sürgün sayısı değişmediği, fakat iyi gelişmiş yapraklara sahip sürgünler elde edilmesine rağmen, köklenme kapasitesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Rejenere olan sürgünler, 1 mg/l IBA içeren ortamda köklendirilip, daha sonra komposta aktararak büyütülmüştür.

Malik ve Saxena (1992), bezelye, yer fıstığı, fasulye ve mercimekte organogenesis ve somatik embriyogenesis oluşumu için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bunun için olgunlaşmış tohumlar, BAP veya TDZ içeren MS besin ortamında çimlendirilmiştir.

Morfolojik olarak aynı fidelerin değişik yerlerinden somatik embriyolar elde edilmiştir. Organogenesis ve somatik embriyogenesis için bir adımlı tohum kültürünün yeterli olduğu, izolasyonun optimize edilmesinin eksplantların kültüre alınması ile ilgili zorluğu azalttığı bildirilmiştir.

Brar vd. (1997), börülcenin Georgia çeşidinin sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonu elde edilmiş; 5 mm'lik sürgün uçları *in vitro* gelişen bitkilerden elde edilip 1, 2.5 ve 5 mg/l BAP, 1, 2.5 ve 5 mg/l Kinetin ile 0.01, 0.10 veya 0.50 mg/l 2,4-D veya NAA içeren ortamda kültüre alınmıştır. BAP içeren ortamlarda Kinetin içeren ortamlara göre daha fazla sürgün gözlenmiştir. En fazla sürgün 5.0 mg/l BAP-0.01 mg/l NAA veya 2, 4-D içeren ortamdan elde edilmiştir. Tüm eksplantların bazal tabaklarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Kinetin içeren ortamlarda kök oluşumu gözlenirken BAP içeren ortamlarda kök oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen sürgünler 0.1 mg/l NAA içeren ortamda köklendirilmiştir. Sürgün ucu eksplantının hızlı çoğaltım için uygun eksplant olduğu görülmüştür.

Polanco ve Ruiz (1997), olgunlaşmış ve olgunlaşmamış mercimek tohumlarını 30 g/l sukroz ve çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamında 25°C ve 16 saatlik fotoperiyotta çimlendirmeye bırakmışlardır. Tohumlar, 4, 8 ve 4+4 (4 hafta MSO ve 4 hafta MS + BAP, Kinetin, GA₃, IAA ve NAA) hafta çeşitli BAP, Kinetin, GA₃, IAA ve NAA konsantrasyonları içeren MS besin ortamında çimlendirilmiştir. Yaklaşık 4 hafta sonra, 2.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında % 25 oranında kallus oluşumu gözlenmiştir. 0.25 ve 2.25 mg/l BAP içeren besin ortamında çok sayıda sürgün ucu elde edilmiştir. Gelişen sürgünler, 2 mg/l IAA içeren köklenme ortamında köklendirilmiştir. Düşük konsantrasyon (0.225 mg/l) veya hiç BAP içermeyen besin ortamında, önemli ölçüde köklenme olduğu gözlenmiştir. Köklenme başarısının, ilk ortamda kullanılan sitokinin miktarına, konsantrasyonuna ve rejenere olan sürgünlerin köklenme ortamına aktarılmadan önce geçen zamana bağlı olduğu ortaya konmuştur. BAP'ın *in vitro* koşullarda köklenmeyi olumsuz yönde etkilediğinden BAP konsantrasyonuna dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Ahmad vd. (1997), mercimek ve iki yabancı akraba türünde (*Lens ervoides* ve *Lens culinaris* ssp. *orientalis*) boğum eksplantlarından kallus oluşturmadan adventif sürgün elde etmeyi amaçlamışlardır. Eksplant başına sürgün sayısı ve sap/sürgün uzunluğu üzerine çeşit ile GA₃ ve BAP düzeylerinin etkisi fazla, interaksiyonun etkisi ise az olarak bulunmuştur. Kallus oluşturmadan sürgün oluşumu için, 2.89 µM GA₃ ve 1.11 µM BAP içeren ve sukroz içermeyen MS besin ortamının en uygun olduğu bulunmuştur. 5.37 µM NAA içeren MS besin ortamında ise sürgünlerden en iyi köklenme elde edilmiştir.

Khalafalla ve Hattori (2000), bu çalışmada embriyonik eksen, sürgün ucu eksplantı kullanılmıştır. Her 2 eksplant BAP ve TDZ içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Her 2 ortam üzerinde her 2 eksplantın farklı oranda sürgün rejenerasyonu görülmüştür. TDZ ve BAP birlikte en iyi sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Embriyonik eksen eksplantlarında sürgün ucuna göre daha fazla sürgün rejenerasyonu görülmüştür. Sürgün rejenerasyonu oranı çeşitlere göre değişmiştir. En fazla sürgün rejenerasyonu 740 çeşidinde 2 mg/l TDZ ve 2 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. Elde edilen sürgünler ½ MS ortamında köklendirilmiştir. Gerekğinde seraya aktarmadan önce 0,25 ile 1 mg/l NAA, IBA ve IAA'de kullanılmıştır.

Bhatti (2001), Mercimeğin Akm 49, Çiftçi, Meyveci 2001, Akm 260, Akm 261, Özbek, Akm 362, Masoor 85, Kırmızı51, Ill 62, Emre 20, Akm 565, Malazgirt, Sazak 91, Kayı 91, Akm 258, Ali Dayı, Pul 11, Masoor 93, Kışlık 21 ve Kafkas 21 çeşitleriyle yapılan *in vitro* adventif sürgün rejenerasyonu çalışmalarında olgunlaşmamış embriyonik eksenler izole edilerek ilk önce 20 mg/l NAA içeren MS ortamında 10 gün kültüre alınmıştır. Daha sonra eksplantlar tekrar MSO ortamında alt kültüre alınmıştır. MSO'a aktarıldıktan bir hafta sonra bir kaç genotipin eksplantı üzerinde kallus oluşumu başlamış ve 3 hafta sonra da bu kalluslar üzerinde adventif sürgün oluşumu gözlenmiştir. Ancak sürgün uzunluğu 1.66- 2.16 arasında ve sürgün oluşumu % 3.33- 30 arasında değişmiştir. Fakat ön muamele yapılmamış eksplantlarda 4 mg/l BAP ve 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamda sadece Emre 20 ve Kışlık 21 çeşidinin her ikisinde 10'ar

sürgün ile 3.33 ve 43.33 sürgün oluşumu gözlenmiştir. Geri kalan 19 çeşitte ise hiç sürgün oluşumu gözlenmemiştir.

Khawar ve Özcan (2002), MS besin ortamında gelişen Ali Dayı mercimek çeşidine ait 10 günlük sürgünleri keserek, köklendirme için 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l IBA içeren MS0 besin ortamına aktarmışlardır. Dört hafta sonra en yüksek köklendirme oranını (% 25), sürgün başına ortalama kök sayısını (7.87 adet) ve ortalama kök uzunluğunu (7.18 cm) 0.25 mg/l IBA içeren MS0 besin ortamından elde etmişlerdir. Ancak, diğer IBA uygulamalarında kök oluşumunu uyaramamışlardır.

Kaur vd. (2002)'nin sonuçlarına uyum göstermiştir. Araştırmacılar %4 mannitol ve su ile ön muamele (osmo ve hidro priming) görmüş nohut tohumlarında, ön muamele görmemiş tohumlara göre 3-4 kat çimlenme görmüşlerdir. Ön muamele görmüş tohumların kök ve sürgünlerinde amilaz, invertaz (asit, baz) sukroz sentez (SS) ve sukroz fosfat sentez (SPS) aktivitelerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sürgünlerde yüksek oranda amilaz aktivitesinin bulunması sürgünlerdeki geçiş, nişastasının miktarını artırmıştır. Sonuçta sürgün gelişme ve büyümesinde fazla miktarda glukoz fazlalığının etkili olduğu tespit edilmiştir.

Andersone ve Levinsh (2004) sitokinin etkisini artırmak için ilk önce *Pinus sylvestris* bitkisinin tomurcuk eksplantlarında soğuk muamlesinden sonra yüksek oranda BAP muamelesinin etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Madhulata vd. (2004) *in vitro* Muz çoğaltımı 50 mg/l BAP ve 50 mg/l Kin içeren ortamda 60 dk bekleterek elde etmişlerdir.

Andrade vd. (2006) *Eucalyptus grandis* bitkisinde *in vitro* çoğaltım için 0, 200, 400 ve 600 mg/l oranlarını 1,2 ve 3 süreyle uygulanmışlar ve 21 günlük kültürden sonra en etkili sonuçları BAP'ın 200 mg/l oranının 1 ve 2 saat muamelesinden elde edilmiştir.

Hamdy ve Hattori (2006) *In vitro* koşullarda Waza soramame ve Cairo 241 eşitlerinin boğum eksplantları kullanarak somatik embriyogenesis yoluyla mikroçoğaltım yapılmıştır. Bu çalışmada her iki çeşidin boğum eksplantlarının yaş, genotip ve (BAP-NAA) hormon dozlarının etkisi incelenmiştir. Her iki çeşidin de en iyi sürgün oluşum yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı 2.0 mg L^{-1} BAP+ 0.2 mg L^{-1} NAA içeren ortamda gözlenmiştir. Ancak eksplant başına sürgün sayısı bakımından Waza soramame eşidi Cairo 241 çeşidine göre daha uygun grlmştir. Çoğaltım sadece (0.58 mg L^{-1} TDZ or 1.24 mg L^{-1} BA) içine 2.15 mg L^{-1} NAA içeren ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Somatik oluşum için zigonik embriyolar IAA içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. IAA olmayan ve düşük konsantrasyonda 2,4-D eklenen ortam üzerindeki gelişmiş embriyolar taşıyan embriyonik dokular transfer edilince somatik embriyolar üzerindeki gelişmelerde artış gözlenmiştir. İkinici somatik embriyogenesis veya adventif somatik embriyoların oluşumuna yol açmışlardır.

Aasim vd. (2009) börülcenin Akız eşidinin plumula uçları uçları 10 mg/l BAP ile n muamele edildikten sonra $0.25, 0.50, 0.75$ ve $1.00, 1.25 \text{ mg/l}$ BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren veya içermeyen MS ortamına alınmıştır. Daha sonra eksplantlar üzerinde NAA olan veya olmayan BAP içeren bütün MS ortamlarında kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Ancak $0,1 \text{ mg/l}$ NAA eklenmesi sürgün uzunluğu ve kallus çap üzerinde olumlu etkiye sahip olmuştur. Eksplant başına en fazla sürgün $7,11$ adet; 1.00 mg/l BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir. BAP ile NAA içeren ve içermeyen ortamlar karşılaştırıldığında BAP-NAA içeren ortamların daha iyi olduğu tespit edilmiştir. 1 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmış bütün sürgünler 0.50 mg/l IBA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Köklenen bitkiler oda sıcaklığında, torprak dolu kaplarda kültüre alınmıştır. Bütün bitkiler 3 ay sonra çiçeklenmiş ve seralarda tohuma bırakılmıştır.

Bahgat vd. (2009) bakla bitkisinde uygun nrejenerasyon çalışmaları bulunmamaktadır. Bu yüzden genetik transformasyon çalışmaları yoktur. Bu makalede bakla bitkisinde somatik embriyo oluşumu anlatılmıştır. Bu çalışmada mısır kökenli Giza2 ve 24 Hyto eşitleri kullanılmıştır. Epikotil ve sürgün ucu eksplantlarından MS ve Gamborg (Gamborg vd. 1968) ortamında $\%0,25$ askorbik ve sitrik asit ile 10 mg/l BAP ve $0,5$

mg/l NAA yada 2,4-D ile 1 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA içeren ortamda rejenerasyon elde edilmiştir. BAP, NAA, 2,4-D içeren ortamlar kallus için en uygun görülmüştür. Ancak somatik embriyo oluşumu yalnız kallusların ½ B5 ortama aktarıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Somatik embriyolardan bitki elde edilmiştir. Daha sonra bu çalışmalarda genetik stabiliteyi belirlemek için değişik eksplantlar kullanılarak Rapd analizi yapılmıştır. Giza2 çeşidinde 24 Hyto çeşidine göre daha fazla genetik stabilite görülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumları Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, İzmir'den temin edilmiştir.

3.2 Doku Kültürü Metotları

3.2.1 Büyüme düzenleyicileri ve saklama koşulları

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck KgaA (Damstadt, Almanya), ve Sigma Aldrich Chemical Co. (St Lo. MO, ABD), Duchefa Biochemie (Hollanda) firmalarından temin edilmiştir. NAA, IAA ve BAP stok solüsyonları 10 mg olarak 1N NaOH veya etanol ile çözüldükten sonra 10 ml su ile tamamlanıp 1mg/ml olarak hazırlanmıştır ve 4 °C'de 12 ay saklanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Kullanılan bitki hormonları, çözücüleri, dozları ve saklama koşulları

Bitki hormonları	Çözücü	Dozu (mg/l)	Saklama koşulları (°C)
Oksinler			
NAA	1N NaOH	0.1-2.0	4
IAA	1N NaOH	0.5-1.0	- 20
Sitokininler			
BAP	1N NaOH	0.25-2.0	4

3.2.2 Besi ortamları ve kültür koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog 1962) kullanılmıştır. Ortam hazırlığında saf su kullanılmış ve besin ortamının pH'sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.6–5.8'e ayarlandıktan sonra ortamlar 120 °C'de 20 dk tutularak

otoklavlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı (Preheat Daylight-42 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında 16 saat ışık fotoperiyodunda $24\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta tutulmuştur.

3.3 Yüzey Sterilizasyonu

Her iki çeşidin tohumları %100, %80, %60, %40, %20, %10, %5 ticari çamaşır suyu (Ace, Türkiye %5 NaOCl ile 20 dk. muamele edilerek sterilizasyon için çamaşır suyunun çimlenmeye en olumlu etki yapan oranı belirlenmeye çalışılmıştır. Tohumlar çamaşır suyu ile muamele edildikten sonra steril saf su ile 5'er dk 3 kez durulanmıştır.

3.4 *In vitro* Çalışmaları

3.4.1 Bakla tohumlarının *in vitro*'da çimlendirilmesi

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumları yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra 24 saat saf su içeren ortamda çalkalamalı inkübatörde içerisinde 190 rpm ve 24°C de bekletilmiştir. Daha sonra, tohumlardan plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları elde etmek amacıyla tohum kabuklarının yumuşaması ve kotiledonların kolay açılabilmesi için bir günlük steril saf su içeren kaplarda bırakılmıştır.

3.4.2 Sürgün rejenerasyonu

Su içinde bir gün bekletilen ve su ile şişen tohumlar bisturi ile nazikçe açılarak embriyoya zarar vermeden plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları elde edilmiştir. İlk denemede bakla tohumları saf su, sukrozsuz sıvı MS, 30g/l sukroz içeren saf su ve 30g/l sukroz içeren sıvı MS içeren ortamlarda ön muamele tabi tutulmuştur. Daha sonra plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.10 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarında $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

İlk denemede bakla tohumları saf su, sukrozsuz sıvı MS, sukroz içeren saf su ve sukroz içeren sıvı MS içeren ortamlarda ön mumaleye tabi tutulmuştur. Daha sonra plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarında 24 ± 1 °C'de 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

İkinci denemede ise elde edilen eksplantlar önce 10 mg/l BAP içeren ortamda 6 gün bekletilmiştir ve 6 günün sonunda elde edilen sürgünler, 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA, 0.25mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25mg/l BAP ile 0.05mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarında 24 ± 1 °C'de 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

3.4.3 Sürgünlerin köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler kesilerek 1 mg/l IAA içeren MS besin ortamında, steril Magentalarda kültüre alınmıştır. Dört ile altı hafta sonra köklenen sürgünler iklim odasında ya da serada toprak içeren saksılara aktarılmış olup üzerine plastik poşet geçirilip $20-25 \pm 2$ °C'de bir hafta için tutularak yeni bitkiciklerin hem ortam şartlarına uyması, hem de kök sisteminin gelişmesi sağlanmıştır.

Köklendirilmiş bitkilerin köklerindeki agar çesme suyu ile köklere zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. Agar uzaklaştırıldıktan sonra bitkiler çesme suyu içinde 10-15 dk bekletilmiştir (Aasim vd. 2008).

3.5 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Laboratuvar denemeleri faktöriyel deneme desenine göre kurulmuştur ve denemelerin her muamelesi içerisinde 5 adet eksplantın bulunduğu 3 tekerrürlü petri kutuları (100 x

10 mm) veya magentalardan (GA7) oluşturulmuştur. Elde edilen veriler “SPSS 16 for Windows” programı ile “univariate analysis” desenine göre analiz edilmiştir. Uygulama ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerleri istatistik analizi yapılmadan önce “arcsin transformasyon”una tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran 1967).

4. BULGULAR

4.1 Farklı Dezenfektan Dozlarının Filiz 99 ve Eresen 87 Çeşitlerinin Tohumlarının Çimlenme Oranları Üzerine Etkisi

Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumlarının yüzeysel olarak bakteri, mantar ve benzeri organizmalardan temizlenebilmesi için çamaşır suyunun en uygun dozunun belirlenmesi için her iki çeşide ait tohumlar (% 100, %80, %60, %40, %20, %10, % 5) ticari çamaşır suyu (Ace-Türkiye, % 5 NaOCl) ile 20 dk. muamele edilmiştir. Çimlendirmeye konan tohumlardan 10 gün içinde plumula uçları ve radikula belirlemeye başlamıştır. Çimlenme başlangıcından 10 gün sonra, uygulanan farklı çamaşır suyu dozlarının çimlenme ve bulaşıklık yüzdelere ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı çamaşır suyu konsantrasyonlarının baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisine ait varyans analizi tablosu

VK	sd	Bulaşık Oranı (%)		Çimlenme Oranı (%)	
		KO	F	KO	F
Çeşit	1	11666.67	5.44*	85.71	0.13
Çamaşır suyu dozu	6	1904.76	0.89	2619.05	3.87**
Çeşit x Çamaşır suyu dozu	6	2222.22	1.04*	352.38	0.52*
Hata	28	2142.86		676.19	
Genel Toplam	41				

*p<0.05 **p<0.01

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda bulaşık oranı (%) ve çimlenme oranı (%) bakımından çeşit x çamaşır suyu dozu arasında % 0.05 düzeyinde etkileşim görülmüştür. Tohum çimlenme oranında ise sadece çamaşır suyunun farklı dozları arasında % 0.01 düzeyinde farklılık olduğu görülmüştür. Bu etkileşimlerin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi her iki çeşidin de % 60 çamaşır suyunda hiç bulaşıklık görülmeden en yüksek çimlenme (% 60) görülmüştür. Ayrıca % 100 ve 80 çamaşır suyu kullanıldığında da Eresen 87 çeşidinde herhangi bir bulaşık görülmemiştir.

Çizelge 4.2 Farklı çamaşır suyu konsantrasyonlarının baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi

Çamaşır suyu (%)	Bulaşık oranı (%)		Çimlenme Oranı(%)	
	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99
100	0.00b	66.67b	53.33ab	33.33c
80	0.00b	66.67b	46.67bc	26.67cd
60	0.00b	0.00d	60.00a	60.00a
40	33.33a	33.33c	13.33e	26.67cd
20	33.33a	100.00a	20.00d	40.00b
10	33.33a	33.33c	6.67ef	0.00e
5	33.33a	66.67b	6.67ef	0.00e

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde önemlidir.

4.2 Değişik ön muamelelerden sonra farklı BAP ve NAA içeren MS ortamlarda sürgün rejenerasyonu

4.2.1 Saf su ile ön muamelenin etkisi

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumları yüzey streilizasyonundan sonra 24 saat saf su içeren ortamda çalkalayıcı inkübatör içerisinde 190 rpm ve 24°C de bekletilmiştir. Daha sonra, steril kabin içerisinde tohumlardan testa uzaklaştırılmış olup, kotiledonlar açılmış ve bisturi yardımıyla embriyoları elde edilmiştir. Her iki çeşidinden elde edilen embriyolardan plumula uçları ve embriyo eksenini eksplantları 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP içeren MS besin

ortamlarında kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra eksplantlarda sürgün uçları ve iki hafta sonra da sürgünler gözlenmeye başlamıştır. Beş hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuş ve sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Saf su ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonun etkisine ait varyans analizi

Vk	Sd	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Eksplant	1	2281.66	24.23**	0.03	0.43	14.70	59.64**
Çesit	1	2406.66	25.56**	0.16	2.03*	12.24	49.66**
Ortam	4	882.29	9.37**	0.94	11.54**	5.12	20.76**
Eksplant x Çesit	1	1601.66	17.01**	0.95	11.68**	0.12	0.49*
Eksplant x Ortam	4	2828.54	30.03**	0.27	3.30**	9.67	39.22**
Çesit x Ortam	4	397.29	4.21**	0.30	3.70**	4.27	17.33**
Eksplant x Çesit x Ortam	4	2423.54	25.73**	0.18	2.29*	8.03	32.59**
Hata	40	94.16		0.08		0.25	
Genel toplam	59						

*p<0.05 **p<0.01

Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sürgün oluşum oranı ve sürgün uzunluğu bakımından eksplantlar, çeşit ve ortamlar arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı bakımından ise eksplant, çeşit ve ortam arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimlerin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseninde sürgün oluşum oranı %80 ile 100 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşum oranı 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından

elde edilen sürgünlerde ise sürgün oluşum oranı ise %53.33 ile 86.67 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşum oranı 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir. Filiz 99 çeşidinin embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün oluşum oranı %25 ile 100 arasında değişen oranlardadır ve en fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında görülmüştür. Plumula uçları eksplantından sürgün oluşum oranı %25 ile 100 arasında değişmiş olup en fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren ortamlarda gözlenmiştir (Şekil 4.1a).

Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında eksplant başına sürgün sayısı 1.0 ile 2.40 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. En az sürgün sayısı ise 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA içeren ortamlarda görülmüştür. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde eksplant başına sürgün sayısı 1.0 ile 1.77 adet arasında değişmiş olup en fazla sürgün 0.25 mg/l BAP içeren ortamda gözlenmiştir. En az sürgün sayısı ise 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Filiz 99 çeşidinde eksplant başına sürgün sayısı embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde 1.0 ile 1.62 arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gözlenirken en az sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde 1.00 ile 2.00 adet arasında değişmiştir.

Eresen 87 çeşidinde embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 1.57 ile 5.93 cm arasında değişmiştir ve en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında görülmüştür. En kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gözlenmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise sürgün uzunluğu 1.80 ile 5.67 cm arasında değişmiştir. Filiz 99 çeşidinde sürgün uzunluğu sırasıyla embriyo ekseni eksplantı ve plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde, 1.00 ile 3.13 arasında ve 1.50 ile 5.50 arasında değişmiştir. Embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde en

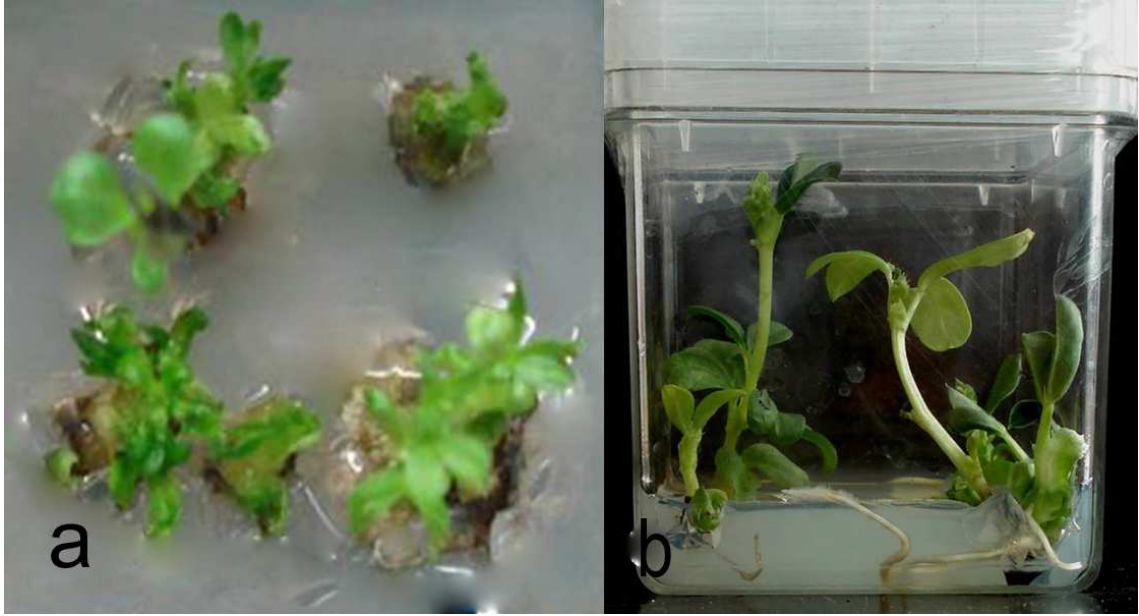
uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA içeren MS besin ortamında ve en kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA içeren MS besin ortamında ve en kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamında görülmüştür.

Beş hafta sonra hem plumula uçları (Şekil 4.1b) hemde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünler 1 mg/l IAA içeren ortamda başarı ile köklendirilmiştir

Çizelge 4.4 Saf su ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantlarından elde edilen sürgünlerin rejenerasyonu

Ortamlar		Sürgün oluşum oranı (%)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	100.00a	66.67c	86.67	80.00b
0.25	0.25	100.00a	86.67a	25.00d	100.00a
0.25	0.10	100.00a	86.67a	73.33c	100.00a
0.25	0.05	100.00a	53.33cd	80.00bc	50.00c
0.25	0.00	80.00b	73.33b	100.0a	25.00d
Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	1.60b	1.10d	1.40b	1.40c
0.25	0.25	1.00d	1.50b	1.00c	1.40c
0.25	0.10	1.57bc	1.40c	1.00c	1.00d
0.25	0.05	1.70b	1.00e	1.62a	1.70b
0.25	0.00	2.40a	1.77a	1.47b	2.00a
Ortamlar		Sürgün uzunluğu (cm)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	2.50c	5.30b	3.13a	5.50a
0.25	0.25	1.57d	5.67a	1.00d	2.20d
0.25	0.10	5.93a	1.80e	1.90c	2.70c
0.25	0.05	2.10c	4.50c	1.67cd	1.50e
0.25	0.00	3.37b	2.70d	2.80b	4.00b

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.1 Saf su ile 24 saat ön muamele yapılmış baklanın Filiz 99 çeşidinin plumula uçlarında sürgün rejenerasyonu

a. 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamlarda plumula ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu

b. Elde edilen sürgünlerin 1 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmesi

4.2.2 Sukroz içermeyen sıvı MS ortamı ile ön muamelenin etkisi

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumları steril ettikten sonra 24 saat sukrozsuz sıvı MS içeren ortamda çalkalayıcı inkübatör içerisinde 190 rpm ve 24°C de bekletilmiştir. Daha sonra, steril kabin içerisinde tohumlardan testa uzaklaştırılmış olup kotiledonlar açılmış ve bisturi yardımıyla embriyoları elde edilmiştir. Elde edilen embriyolardan plumula uçları ve embriyo eksenini eksplantları 0.25 mg/l BAP, 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra eksplantlarda sürgün uçları ve iki hafta

sonra da sürgünler gözlenmeye başlamıştır. Beş hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Sukroz içermeyen sıvı MS ortamı ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonun etkisine ait varyans analizi

Vk	sd	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Eksplant	1	4166.66	19.68**	0.07	0.44	0.198	0.19
Çesit	1	666.66	3.15*	0.51	2.96*	7.88	7.91**
Ortam	4	844.16	3.98**	0.66	3.80*	8.94	8.97**
Eksplant x Çesit	1	806.67	3.81*	0.03	0.15	14.45	14.49**
Eksplant x Ortam	4	479.16	2.26*	0.64	3.66*	19.33	19.39**
Çesit x Ortam	4	687.50	3.24*	0.27	1.54	4.01	4.03**
Eksplant x Çesit x Ortam	4	335.83	1.58*	0.44	2.51*	10.75	10.78**
Hata	40	211.67		0.17		0.99	
Genel toplam	60						

*p<0.05 **p<0.01

Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sürgün oluşum oranı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından eksplant x çeşit x ortam arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından ise eksplant x çeşit x ortam arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimlerin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Eresen 87 çeşidinin embriyo eksenini eksplantında sürgün oluşum oranı %76.67 ile 100 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşum oranı 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. En az sürgün oluşum oranı ise 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında gözlenmiştir. Plumula uçları eksplantında ise sürgün oluşum oranı %46.67 ile 86.67 arasında değişen oranlardadır.

En fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmişken en az sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında görülmüştür. Filiz 99 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında sürgün oluşum oranı %60 ile 100 arasında değişmektedir. En fazla sürgün oluşum oranı 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamından, en az sürgün oluşum oranı ise 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün oluşum oranı %46.67 ile 80 arasında değişmektedir. En fazla sürgün oranı 0.25 mg/l BAP, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren ortamlarda gözlenmiştir.

Çizelge 4.6 Sukroz içermeyen sıvı MS ortamı ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonu

Ortamlar		Sürgün oluşum oranı (%)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	93.33ab	80.00a	80.00b	66.67c
0.25	0.25	100.00a	60.00c	80.00b	46.67d
0.25	0.10	76.67c	46.67d	80.00b	80.00b
0.25	0.05	100.00a	86.67c	100.00a	80.00b
0.25	0.00	100.00a	76.67ab	60.00c	80.00a
Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	1.80a	1.30b	1.00c	1.13b
0.25	0.25	1.85a	1.65ab	1.70a	1.00c
0.25	0.10	1.25b	1.15b	1.68a	1.20b
0.25	0.05	1.17b	1.25ab	1.40ab	1.00c
0.25	0.00	1.85a	2.00a	1.00c	2.30a
Ortamlar		Sürgün uzunluğu (cm)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	1.60c	4.76b	1.40c	3.80c
0.25	0.25	3.20b	4.10c	8.20a	1.80d
0.25	0.10	3.15b	2.35d	6.50b	2.40c
0.25	0.05	4.33a	4.45c	4.43c	7.63a
0.25	0.00	3.05b	5.15a	3.33d	3.90b

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde önemlidir.

Eksplant başına sürgün sayısı Eresen 87 çeşidinin embriyo eksen eksplantından elde edilen sürgünlerde eksplant başına sürgün sayısı 1.17 ile 1.85 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP, 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamlarından elde edilmiştir (Şekil 4.2.a). Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise en fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında görülmüştür. Filiz 99 çeşidinin embriyo eksen eksplantından elde edilen sürgünlerde eksplant başına sürgün sayısı 1.00 ile 1.70 adet arasında değişmiştir ve en fazla sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde eksplant başına sürgün sayısı 1.00 ile 2.30 arasında değişmiştir. En fazla sürgün 0.25 mg/l BAP içeren ortamda görülmüştür.

Eresen 87 çeşidinin embriyo eksen eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 1.60 ile 4.33 cm arasında değişmiş olup en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise sürgün uzunluğu 2.35 ile 5.15 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında görülmüştür. Filiz 99 çeşidinin embriyo eksen eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 1.40 ile 8.20 cm arasında değişmiştir. En uzun ve en kısa sürgünler sırasıyla 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise sürgün uzunluğu 1.80 ile 3.90 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında, en kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gözlenmiştir.

Beş hafta sonra hem plumula uçları (Şekil 4.2.b) hemde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünler 1 mg/l IAA içeren ortamda başarı ile köklendirilmiştir.



Şekil 4.2 Sukroz içermeyen sıvı MS ile 24 saat ön muamele yapılmış baklanın Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında sürgün rejenerasyonu

- 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamlarda embriyo ekseni eksplantından sürgün rejenerasyonu
- Elde edilen sürgünlerin 1 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmesi

4.2.3 Sukroz içeren saf su ile ön muamelenin etkisi

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumları steril ettikten sonra 24 saat şekerli su içeren ortamda çalkalayıcı cihaz içerisinde 190 rpm ve 24°C de bekletilmiştir. Daha sonra, steril kabin içerisinde tohumlardan testa uzaklaştırılmış olup kotiledonlar açılmış ve bisturi yardımıyla embriyoları elde edilmiştir. Elde edilen embriyolardan plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları 0.25 mg/l BAP, 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra eksplantlarda sürgün uçları ve iki hafta sonra da sürgünler gözlenmeye başlamıştır. Beş hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Sukroz içeren saf su ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA içeren MS ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonunun etkisine ait varyans analizi

VK	Sd	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Eksplant	1	11760.00	213.82**	3.55	43.15 **	0.35	0.49*
Çesit	1	2160.00	39.27**	0.15	1.82*	1.91	2.66**
Ortam	4	772.500	14.04**	0.83	10.04**	60.50	84.59**
Eksplant x Çesit	1	7260.00	132.00**	0.01	0.13	5.40	7.55**
Eksplant x Ortam	4	322.50	5.86**	1.42	17.31**	14.73	20.59**
Çesit x Ortam	4	472.50	8.59**	1.55	18.86**	6.23	8.71**
Eksplant x Çesit x Ortam	4	922.50	16.77**	1.80	21.92**	4.04	5.65**
Hata	40	55.00		0.08		0.72	
Genel Toplam	59						

*p<0.05 **p<0.01

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sürgün oluşum oranı, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından eksplant x çeşit x ortam arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimlerin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Eresen 87 çeşidinin embriyo eksplantında sürgün oluşum oranı %80 ile 100 arasında değişmiş olup en fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0,05 mg/l NAA içeren MS ortamlarında gözlenmiştir. Plumula uçları ekseni eksplantında ise sürgün oluşumu %70 ile 100 arasında değişmiştir ve en fazla sürgün oluşum oranı 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir. Filiz 99 çeşidinin embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün oluşum oranı % 100 dür. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise sürgün oluşum oranı %20 ile

80 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 eşitlerinin plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantlarından elde edilen sürgünlerin rejenerasyonu

Ortamlar		Sürgün oluşum oranı (%)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	100.00a	90.00b	100.0	80.00a
0.25	0.25	80.00c	80.00c	100.0	20.00c
0.25	0.10	80.00c	80.00c	100.0	60.00b
0.25	0.05	100.00a	70.00d	100.0	60.00b
0.25	0.00	90.00b	100.00a	100.0	30.00c
Ortamlar		Eksplant başına srgn sayısı (adet)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	1.25b	1.60c	1.47b	1.50b
0.25	0.25	1.00c	1.30d	1.00c	4.00a
0.25	0.10	1.26b	1.80b	1.60a	1.00c
0.25	0.05	1.20b	1.75b	1.43b	1.00c
0.25	0.00	1.85a	2.47a	1.43b	2.00b
Ortamlar		Srgn uzunluğu (cm)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uları	Embriyo ekseni	Plumula uları
0.25	0.50	4.10c	3.95c	5.60b	4.53c
0.25	0.25	7.00b	3.35c	4.73b	4.73c
0.25	0.10	9.73a	6.60a	9.00a	9.67a
0.25	0.05	2.63d	6.50b	4.53b	8.17b
0.25	0.00	3.01d	3.85c	1.40c	1.93d

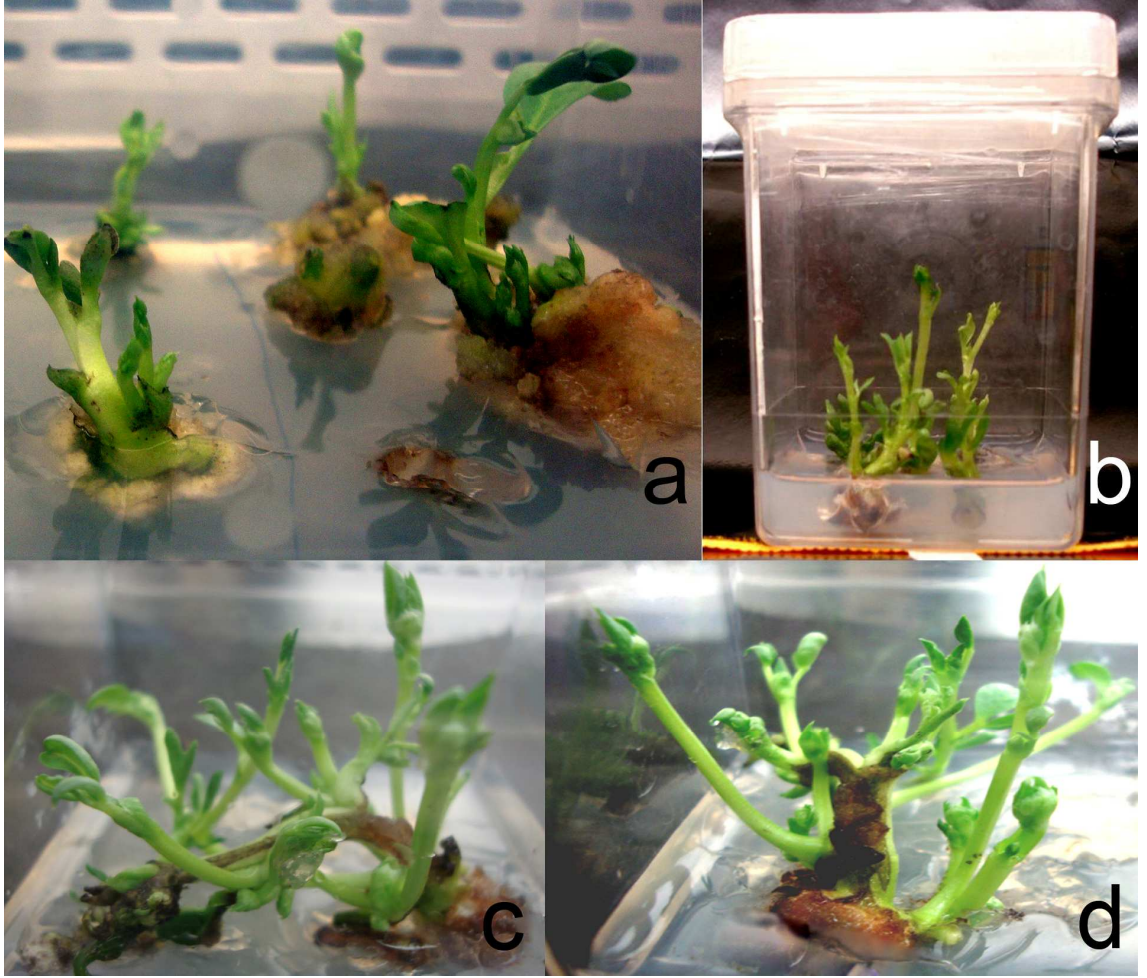
Aynı stnda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde önemlidir.

Eresen 87 eşidinin embriyo ekseni eksplantında eksplant başına sürgün sayısı 1.00 ile 1.85 arasında değişmiştir. Sırasıyla en fazla ve en az sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP (şekil

4.3a) ve 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantında eksplant başına sürgün sayısı 1.30 ile 2.47 adet arasında değişmiştir. En fazla ve en az sürgün sayıları sırasıyla 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Filiz 99 çeşidinin embriyo eksenini eksplantından elde edilen sürgünlerde eksplant başına sürgün sayısı 1.00 ile 1.60 arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise eksplant başına sürgün sayısı 1.0 ile 4.0 arasında değişmiş olup en fazla sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gözlenmiştir.

Eresen 87 çeşidinin embriyo eksenini eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 2.63 ile 9.73 cm arasında değişmiştir ve en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 3.35 ile 6.60 cm arasında değişmiştir. En uzun ve en kısa sürgünler sırasıyla 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Filiz 99 çeşidinin embriyo eksenini eksplantından (Şekil 4.3c) elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 1.40 ile 9.00 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren ortamda, en kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP içeren ortamda gözlenmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 1.93 ile 9.67 cm arasında değişmiştir. En uzun ve en kısa sürgünler sırasıyla 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP içeren ortamlarda görüldüğü kaydedilmiştir.

Beş hafta sonra her 2 çeşidinin hem plumula uçları hemde embriyonik eksen eksplantından elde edilen sürgünler 1 mg/l IAA içeren ortamda başarı ile köklendirilmiştir.



Şekil 4.3 Sukroz içeren saf su ile 24 saat ön muamele yapılmış baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin plumula uçları ve embriyo eksenini eksplantında sürgün rejenerasyonu

- Eresen 87 çeşidinin 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda plumula ucu eksplantından ve
- Eresen 87 çeşidinin 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda embriyo eksenini eksplantından sürgün rejenerasyonu
- Filiz 99 çeşidinin 0.25 mg/l BAP ile 0.10 mg/l NAA içeren MS ortamda embriyo eksenini
- Filiz 99 çeşidinin 0,25 mg/l BAP ile 0,25mg/l NAA içeren MS besin ortamında plumula ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu

4.2.4 Sukroz içeren sıvı MS ortamı ile ön muamelenin etkisi

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumları steril ettikten sonra 24 saat şekerli sıvı MS içeren ortamda çalkalayıcı inkübatör içerisinde 190 rpm ve 24°C de bekletilmiştir. Daha sonra, steril kabin içerisinde tohumlardan testa uzaklaştırılmış olup

kotiledonlar açılmış ve bisturi yardımıyla embriyoları elde edilmiştir. Elde edilen embriyolardan plumula uçları ve embriyo eksenini eksplantları 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra eksplantlarda sürgün uçları ve iki hafta sonra da sürgünler gözlenmeye başlamıştır. Beş hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9 Sukroz içeren sıvı MS ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo eksenlerinden sürgün rejenerasyonun etkisine ait varyans analizi

Vk	sd	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	Ko	F	Ko	F
Eksplant	1	7260.00	54.79**	0.45	2.73*	94.87	57.75**
Çesit	1	240.00	1.81	0.02	0.14	1.90	1.16
Ortam	4	249.37	1.88*	0.96	5.83**	5.23	3.18*
Eksplant x Çesit	1	240.00	1.81*	0.08	0.49	8.17	4.97*
Eksplant x Ortam	4	2019.37	15.24**	0.70	4.24**	8.21	5.02**
Çesit x Ortam	4	811.87	6.12**	0.32	1.94*	30.25	18.42**
Eksplant x Çesit x Ortam	4	1261.87	9.52**	1.58	9.62**	10.04	6.12**
Hata	40	132.50		0.16		1.64	
Genel Toplam	59						

*p<0.05 **p<0.01

Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sürgün oluşum oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından eksplantlar x çeşit x ortam arasında arasında 0.01 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimlerin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında sürgün oluşum oranı %65 ile 100 arasında değişmiş olup en fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir. Plumula uçları ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde ise sürgün oluşumu %50 ile 90 arasında değişmiştir ve en fazla sürgün oranı 0.25 mg/l BAP ve 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamlarından elde edilmiştir (Şekil 4.4.a.b). Filiz 99 çeşidinin embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün oluşum oranı % 40 ile 80 arasındadır. En fazla sürgün oranı 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren ortamdan elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise sürgün oluşum oranı %20 ile 80 arasında değişmiştir. En fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir.

Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde eksplant başına sürgün sayısı 1.00 ile 2.0 adet arasında değişmiştir. Sırasıyla en fazla ve en az sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde eksplant başına sürgün sayısı 1.0 ile 3.0 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında gözlenmiştir. Filiz 99 çeşidinin embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde eksplant başına sürgün sayısı 1.50 ile 2.23 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise eksplant başına sürgün sayısı 1.0 ile 2.33 arasında değişmiş olup en fazla sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında gözlenmiştir.

Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 2.17 ile 4.55 cm arasında değişmiştir ve en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün uzunluğu 1.03 ile 3.10 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA ortamda görülmüştür. Filiz 99 çeşidinin embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde sürgün

uzunluğu 2.77 ile 8.83 cm arasında değişmiştir. En uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA içeren ortamda, en kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren ortamda gözlenmiştir. Plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ise sürgün uzunluğu 2,73 ile 8.66 cm arasında değişmiştir. En uzun ve en kısa sürgünlerin sırasıyla 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren ortamlarda görüldüğü kaydedilmiştir.

Çizelge 4.10 Farklı BAP ve NAA dozlarının baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantlarından elde edilen sürgünlerin rejenerasyonu

Ortamlar		Sürgün oluşum oranı (%)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	100.00a	90.00a	40.00e	20.00e
0.25	0.25	65.00cd	80.00b	80.00a	30.00d
0.25	0.10	70.00c	80.00b	50.00d	60.00c
0.25	0.05	90.00b	50.00c	70.00b	80.00a
0.25	0.00	65.00	90.00a	60.00c	70.00b
Ortamlar		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	1.00c	1.40c	1.67b	1.00e
0.25	0.25	1.70b	1.00d	1.50c	2.00b
0.25	0.10	2.00a	1.00d	1.67b	2.33a
0.25	0.05	1.13c	1.73b	2.23a	1.60d
0.25	0.00	1.73b	3.00a	1.73b	1.70c
Ortamlar		Sürgün uzunluğu (cm)			
		Eresen 87		Filiz 99	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları
0.25	0.50	2.17e	2.75ab	2.77d	8.66a
0.25	0.25	4.55a	1.03c	8.83a	5.50b
0.25	0.10	4.20b	2.13b	3.40c	2.73c
0.25	0.05	2.50d	3.10a	3.05c	8.03a
0.25	0.00	3.52c	2.45b	7.76ab	2.80c

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.4 Sükroz içeren sıvı MS ile 24 saat ön muamele yapılmış baklanın Filiz 99 çeşidinin embriyo akseni eksplantında sürgün rejenerasyonu

a. 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamlarda embriyo akseni eksplantından sürgün rejenerasyonu

b. Elde edilen sürgünlerin 1 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmesi



Şekil 4.5 Baklanın Filiz 99 çeşidine ait sürgünlerin *in vitro* koşullarda 1mg/l IAA içeren MS ortamda köklendirilmesi

Beş hafta sonra hem Eresen 87 hemde Filiz 99 çeşidine ait sürgünleri 1 mg/l IAA içeren ortamda başarı ile köklendirilmiştir (Şekil 4.5-4.6).



Şekil 4.6 Baklanın Eresen 87 çeşidine ait sürgünlerin *in vitro* koşullarda 1 mg/l IAA içeren MS ortamda köklendirilmesi

4.3 Farklı Çeşit, Eksplant ve Muamele sonucu elde edilen sürgünlerin köklenmeye etkisi

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantlarından elde edilen sürgünler 1 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmiştir ve iki hafta sonra kök uçları gözlenmeye başlamıştır. Beş hafta sonra kök uçlarından kökler gelişmiş olup elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11 Farklı Çeşit, Eksplant ve Muamele sonucu elde edilen sürgünlerin köklenmeye etkisine ait varyans analizi

VK	sd	Köklenme Oranı (%)		Kök Uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F
Çeşit	1	102.08	0.19	0.04	0.01
Eksplant	1	133.33	0.25	0.10	0.02
Muamele	3	417.36	0.77	1.07	0.21
Çeşit x Eksplant	1	300.00	0.55*	3.33	0.65*
Çeşit x Muamele	3	78.47	0.14	0.53	0.10
Eksplant x Muamele	3	584.72	1.08*	2.71	0.53
Çeşit x Eksplant x Muamele	3	51.39	0.09	1.82	0.35
Hata	32	539.58		5.12	
Genel toplam	47				

*p<0.05, **p<0.01

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda köklenme oranı (%) bakımından çeşit x eksplant; eksplant x muamele arasında ve kök uzunluğu bakımından çeşit x eksplant arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimlerin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan t ve Duncan testi sonuçları Çizelge 4.12 ve 4.13’te verilmiştir.

Filiz 99 çeşidinde en fazla köklenme %68.33 oranıyla plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde (Şekil 4.7.b.c), Eresen 87 çeşidinde ise en fazla köklenme %68.75 ile embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde gözlenmiştir. Kök uzunluğu Filiz 99 çeşidinde en uzun kök plumula uçları eksplantından elde edilen sürgünlerde ve Eresen 87 çeşidinde ise en uzun kökün embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.7e).

Çizelge 4.12 Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantlarından elde edilen sürgünlerin köklenmeye etkisi

Çeşit	Köklenme oranı(%)		Kök Uzunluğu(cm)	
	Plumula uçları	Embriyo ekseni	Plumula uçları	Embriyo ekseni
Filiz 99	68.33a	66.66ab	7.03a	6.40b
Eresen 87	60.42b	68.75a	6.48b	6.91a

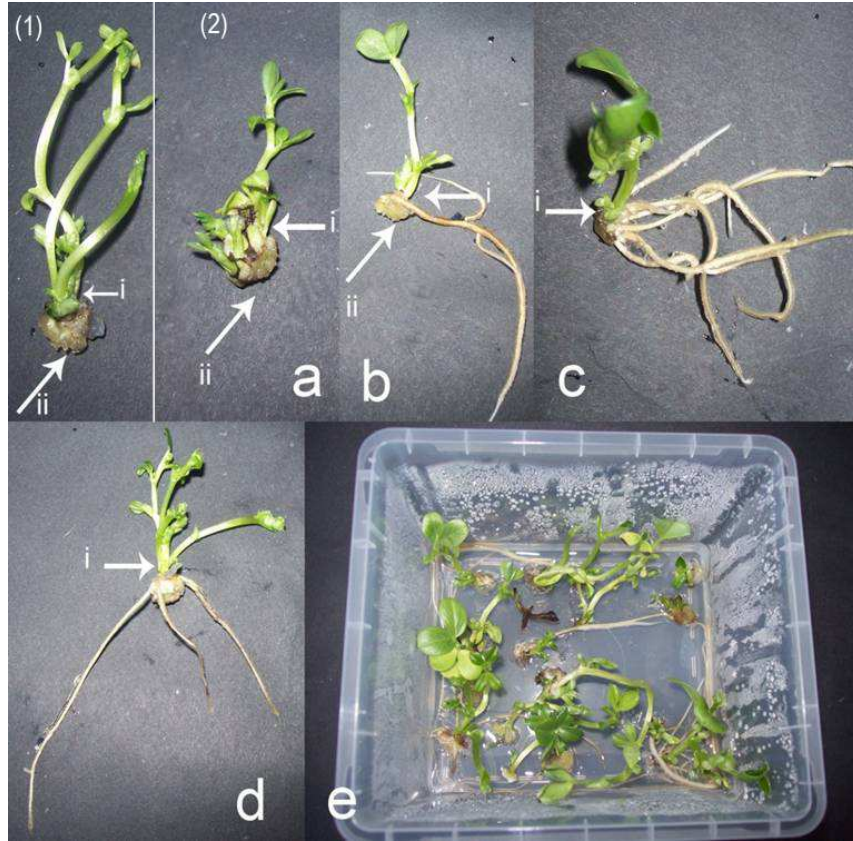
Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark t testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi ön muamele görmüş plumula uçları eksplantlardan elde edilen sürgünlerde köklenme oranı %56.66-68.33 ve embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde %51.67-80 arasında değişmiştir. Plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde en iyi köklenmenin saf su içeren MS ortamı ile ön muamele görmüş eksplantlarda olduğu kaydedilmiştir. Embriyo ekseni eksplantından elde edilen sürgünlerde ise en iyi köklenme oranı saf su ile ön muamele görmüş eksplantlardadır.

Çizelge 4.13 Farklı muamele ve farklı eksplantlardan elde edilen sürgünlerin köklenmeye etkisi

Muamele	Köklenme oranı (%)	
	Plumula uçları	Embriyo ekseni
Saf Su	67.50a	80.00a
Sukroz içermeyen sıvı MS	56.66c	70.00b
Sukroz içeren saf su	65.00ab	69.17b
Sukroz içeren sıvı MS	68.33a	51.67c

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark t testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.7 Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin *in vitro* koşullarda köklendirilmesi

a1, a2. Eresen 87 ve Filiz 99 çeşitlerinin sukroz içeren sıvı MS ile ön muamele görmüş tohumlarından elde edilen plumula eksplantlarından gelişen sürgünlerin köklenmesi i-IAA muamele sonucunda gelişen sürgünler ve ii- kök uçları,

b,c. Filiz 99

d,e. Eresen 87 çeşidinin saf su ile ön muamele görmüş tohumlarından gelişen embriyo ekseni eksplantlarından elde edilen sürgünlerin köklenmesi

4.4 Dış Koşullara Alıştırılması

Su içinde bekletilmemiş bitkilerin hızlı su kaybettiğinden dolayı çabuk kurduğu ve alıştırmada olumsuz etki gösterdiği kaydedilmiştir. Dolayısıyla tüm köklendirilmiş bitkilerin köklerindeki agar çeşme suyu ile köklere zarar vermeden uzaklaştırılmış olup çeşme suyu içinde 10-15 dk bekletilmişlerdir. Bu yöntemle tüm bitkiler kolayca dış koşullara alıştırılmıştır.

4.5 Filiz 99 ve Eresen 87 Çeşitlerinin 10 Mg/L Bap İle Ön Muamele Edilmiş Plumula Uçları ve Embriyo Ekseni Eksplantlarından Farklı Ortamlarda Sürgün Rejenerasyonu

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumları steril ettikten sonra 6 gün 10 mg/l BAP içeren ortamda bekletilmiştir. Daha sonra, steril kabin içerisinde tohumlardan testa uzaklaştırılmış olup kotiledonlar açılmış ve bisturi yardımıyla embriyoları elde edilmiştir. Elde edilen embriyo eksplantları, 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bir hafta sonra her iki çeşidinin plumula ucu eksplantlarında (Şekil 4.5a,b) sürgün uçları ve iki hafta sonra da sürgünler gözlenmeye başlamıştır. Beş hafta sonra elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuştur ve sonuçlar Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.14 BAP ile ön muameleden sonra farklı oranlarda BAP ve NAA ortamlarının Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçlarından sürgün rejenerasyonun etkisine ait varyans analizi

VK	sd	Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
		KO	F	KO	F	KO	F
Çeşit	1	140.83	0.37	0.04	0.19	2.34	4.19
Ortam	4	113.33	0.54	0.18	0.39	0.84	1.51
Çeşit x Ortam	4	695.00	1.84*	0.16	0.36*	1.29	2.32*
Hata	20	377.50		0.45		0.56	
Genel Toplam	29						

*p<0.05, **p<0.01

Çizelge 4.14’de görüldüğü gibi yapılan varyans analizi sonucunda sürgün oluşum oranı(%), eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından çeşit ve ortamlar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Sürgün oluşum oranı (%), eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından çeşit x ortam arasında 0.05 düzeyinde etkileşim bulunmuştur. Bu farklılık ve etkileşimlerin önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Filiz 99 çeşidinde sürgün oluşum oranı % 63.33 ile 93.33 arasında değişmiş olup en fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA içeren MS ortamlarında; en az sürgün oluşumu ise 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir. Eresen 87 çeşidinde ise sürgün oluşum oranı % 76,67 ile 100 arasında değişmiştir ve en fazla sürgün oluşumu 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı Filiz 99 çeşidinde 1.92 ile 2.38 adet arasında değişmiş olup en fazla sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.50 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir (Şekil 4.8b). Eresen 87 çeşidinde ise eksplant başına sürgün sayısı 1.95 ile

2.53 adet arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısının 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.8.a).

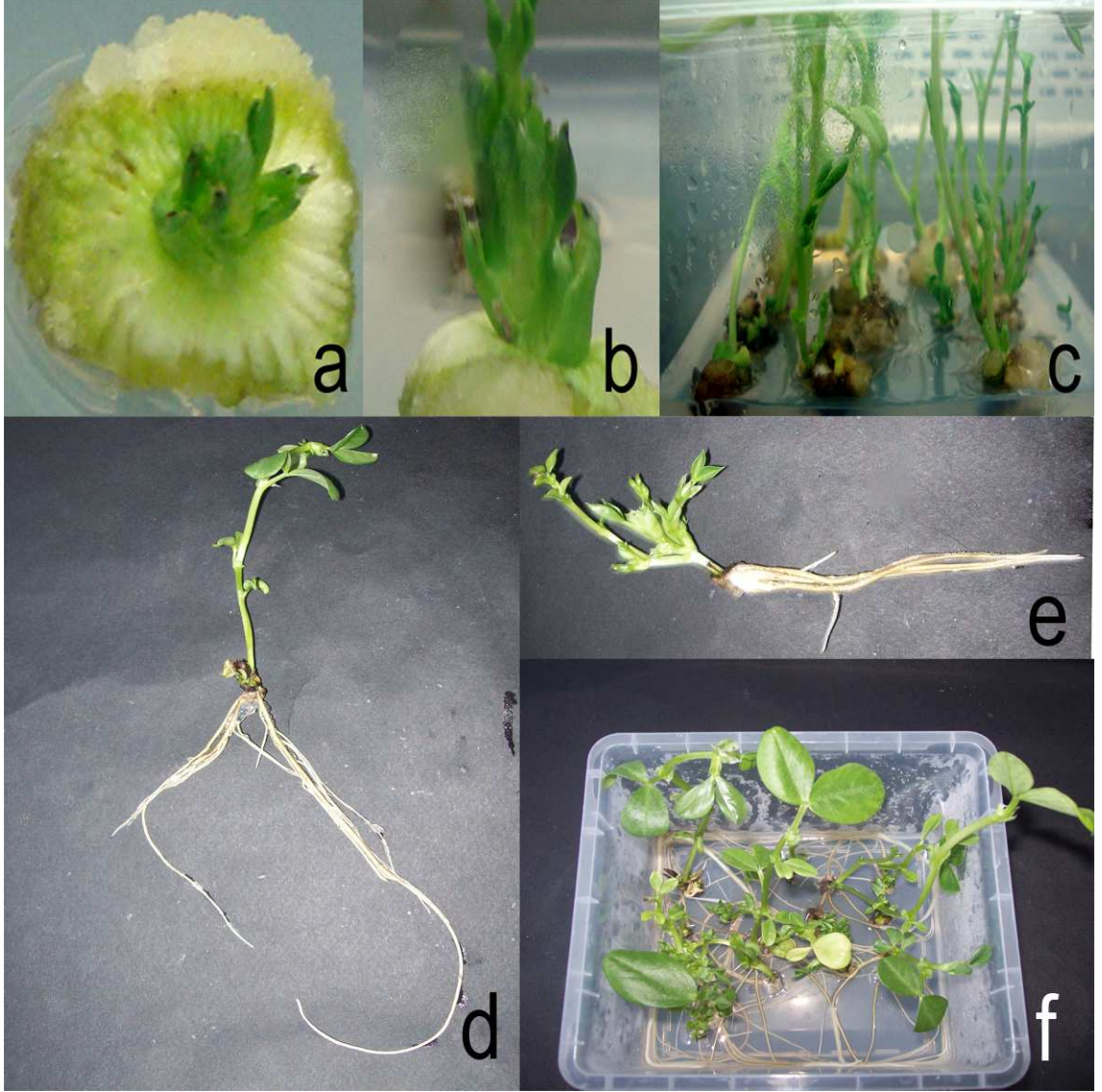
Filiz 99 çeşidinde sürgün uzunluğu 1.98 ile 3.33 cm arasında değişmiş olup en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. En kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Eresen 87 çeşidinde sürgün uzunluğu 1.57 ile 2.99 cm arasında değişmiş olup en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamında ve en kısa sürgün ise 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS ortamında gözlenmiştir.

Çizelge 4.15 Farklı BAP ve NAA dozlarının Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula ucu eksplantlarından elde edilen sürgünlerin rejenerasyonu

Ortamlar		Sürgün oluşum oranı (%)		Eksplant başına sürgün sayısı (adet)		Sürgün uzunluğu (cm)	
BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87	Filiz 99	Eresen 87
0.25	0.50	93.33 a	76.67bc	2.38a	2.50a	2.94b	2.17b
0.25	0.25	93.33 ab	80.00b	2.20b	1.97c	2.27c	1.58c
0.25	0.10	90.00 a	93.33 ab	2.06c	1.95c	3.33a	1.57c
0.25	0.05	63.33 c	100.00 a	2.30a	2.28b	1.98cd	1.60c
0.25	0.00	75.00 bc	86.67b	1.92d	2.53a	2.18c	2.99a

Aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark Duncan testi sonuçlarına göre 0.05 düzeyinde önemlidir.

Beş hafta sonra elde edilen sürgünler 1 mg/l IAA ile 10 dk on muamele yapılmış olup MS içeren ortamda başarı ile köklendirilmiştir.



Şekil 4.8 Baklanın Filiz 99 ve Eresen 87 çeşidinin plumula ucu eksplantından sürgün rejenerasyonu

a Filiz 99 çeşidinin 0.25 mg/l BAP içeren MS ortamda ve

b Eresen 87 çeşidinin 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamda sürgün rejenerasyonu

c Filiz 99 çeşidinin 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS ortamda

d,e,f Eresen 87 çeşidinin eksplantından sürgünlerin köklendirilmesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yüzey sterilizasyonu doku kültürü çalışmalarındaki en önemli aşamalardan biridir. Yüzey sterilizasyonu için eksplanta uygulanacak olan kimyasalların bitkiye zarar verme olasılığı çok yüksektir. Bu nedenle kullanılacak kimyasalların en az miktarda ve en kısa sürede muamelesi gerekmektedir. Baklagil bitkilerinin sterilizasyonu ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır (Bhatti 2001, Sağlam 2010, Aasım 2010). Fakat Türkiye koşullarında bakla tohumlarının yüzey sterilizasyonu için bir literature rastlanmamıştır. Her bitkinin yüzeysel olarak baktari, mantar vb. organizmalardan temizlenebilmesi için gerekli dezenfektan dozu ve süresi farklı olabilir; dolayısıyla bunların belirlenmesi önemlidir. Bu yüzden bakla tohumlarının sterilizasyon çalışmalarında optimizasyon işlemleri yapılmıştır. Sterilizasyon aşamasında %100, %80, %60, %40, %20, %10, %5 çamaşır suyu ile 20 dk işlemler yaparak tohum sterilizasyonu sağlanmaya çalışılmış olup steril saf su ile 5'er dk 3 kez durulanmıştır. Çalışma sonucunda en uygun dozu %60 çamaşır suyu ve 20 dk süresi olarak belirlenmiştir. Bu oran ve sürede tohumlar en az zarar görmüşlerdir. Bu yüzden daha sonra yapılan tüm çalışmalarda %60 çamaşır suyu ve 20 dk. muamelesi tercih edilmiştir.

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumlarının kolay açılıp plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantlara ulaşılabilmesi için steril saf su, 30g/l sukroz içeren saf su, 30g/l sukroz içeren sıvı MS ve sukrozsuz sıvı MS içeren kaplarda bir gün bekletilmiştir. Ayrıca, bu denemede 4 değişik tip sıvının plumula uçları ve embriyonik eksen üzerinde sürgün rejenerasyonuna etkilerinin olup olmadığı da görülmeye çalışılmıştır. Her dört uygulamadan sonra tohumlarından elde edilen plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantları 0.25 mg/l BAP, 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Beş hafta sonra elde edilen sonuçlara göre; Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında sürgün oluşum oranının saf su ile ön muamele görmüş ortamda en fazla olduğu gözlenmiştir.

30 g/l Sukroz içeren saf su ile ön muamele görmüş eksplantlarda sürgün oluşum oranı bakımından her iki çeşitte embriyonik ekseni eksplantı plumula uçları eksplanta göre daha iyi performans göstermiştir. Ancak sürgün sayısı bakımından her iki çeşitte plumula uçları eksplantından daha fazla sürgün elde edilmiştir. Saf su ve 30g/l sukroz içeren ortamın çimlenme üzerinde daha olumlu etkisi olduğu kaydedilmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından; Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında en fazla sürgün sayısı saf su ile ön muamele görmüş bitkiciklerin bulunduğu 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında olduğu kaydedilmiştir. Plumula uçları eksplantında en fazla sürgün sayısı 30g/l sukroz içeren sıvı MS ile ön muamele görmüş sürgünlerin bulunduğu 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında gözlenmiştir. Filiz 99 çeşidinin embriyo ekseni eksplantında en fazla sürgün sayısı 30g/l sukroz içeren sıvı MS ile ön muamele görmüş tohumlardan elde edilen sürgünlerin bulunduğu 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Embriyo ekseni eksplantında ise en fazla sürgün 30g/l sukroz içeren saf su ile ön muamele görmüş tohumlardan gelişen sürgünlerin bulunduğu 0.25 mg/l BAP ile 0.25 mg/l NAA içeren MS besin ortamında görülmüştür.

Sürgün sayısı bakımından; Eresen 87 çeşidinin embriyo ekseni ve plumula uçları eksplantında en uzun sürgün 30g/l sukroz içeren saf su ile ön muamele görmüş tohumlardan elde edilen sürgünlerin bulunduğu 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Filiz 99 çeşidinin de embriyo ekseni ve plumula uçları eksplantında en uzun sürgün Eresen 87 çeşidi gibi 30g/l sukroz içeren saf su ile ön muamele görmüş tohumlardan elde edilen sürgünlerin bulunduğu 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında görülmüştür.

Her 4 ön muamele karşılaştırıldığında en iyi sürgün rejenerasyonu sırasıyla 30g/l sukroz içeren saf su, sukrozsuz sıvı MS, saf su, 30g/l sukroz içeren sıvı MS ile hirdoprining sonucunda gözlenmiştir. Sukroz eksplantların bünyesine geçip amilaz aktivitesini artırmanın ve yeni meristemlerin oluşumuna sebep olup sürgün rejenerasyonu için daha fazla etkili olduğu düşünülmektedir. Sonuçlar Kaur vd. (2002)'nin sonuçlarına uyum

göstermiştir. Araştırmacılar %4 mannitol ve su ile ön muamele (osmo ve hidro priming) görmüş nohut tohumlarında, ön muamele görmemiş tohumlara göre 3-4 kat daha fazla çimlenme görmüşlerdir. Ön muamele görmüş tohumların kök ve sürgünlerinde amilaz, invertaz (asit, baz) sukroz sentez (SS) ve sukroz fosfat sentez (SPS) aktivitelerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sürgünlerde yüksek oranda amilaz aktivitesinin bulunması sürgünlerdeki geçiş nişastasının miktarını artırmıştır. Sonuçta sürgün gelişme ve büyümesinde fazla miktarda glukoz fazlalığının etkili olduğu tespit edilmiştir.

In vitro denemede Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin plumula uçları ve embriyo ekseni eksplantlarından elde edilen sürgünler 1 mg/l IAA içeren ortamda köklendirilmiştir. Köklendirilmiş bitkilerin köklerindeki agar çesme suyu ile köklere zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. Agar uzaklaştırıldıktan sonra bitkiler çesme suyu içinde 10-15 dk bekletilmiştir (Aasim vd. 2008). Su içinde bekletilmemiş bitkilerin hızlı su kaybettiğinden dolayı çabuk kuruduğu ve alıştırma zorluk çekildiği görülmüştür. Beş hafta sonra elde edilen sonuçlara göre; plumula uçları eksplantında en fazla köklenme oranı Filiz 99 çeşidinde görülmüştür. Embriyo ekseni eksplantında ise en fazla köklenme oranı Eresen 87 çeşidinden elde edilmiştir. Kök uzunluğu en fazla Filiz 99 çeşidinin plumula uçları eksplantında 7,03 cm olarak gözlenmiştir. Ayrıca en fazla köklenme oranının % 80.00 ile saf su ön muamelesi görmüş tohumların embriyo ekseni eksplantında olduğu kaydedilmiştir. Sonuçlar Mroginski ve Kartha (1981), Polanco vd. (1988), Özcan vd. (1992), Khawar ve Özcan (2002) ve Mukhtar vd. (2010) tarafından yapılan farklı baklagillerin *in vitro* köklendirme çalışmalarına uyum göstermektedir.

İkinci *in vitro* denemede ise Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinin tohumları steril edildikten sonra 10 mg/l BAP içeren MS ortamında 6 gün bekletilen embriyo eksplantları daha sonra 0.25 mg/l BAP, 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0,25 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.1 mg/l NAA, 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Beş hafta sonra elde edilen sonuçlara göre Filiz 99 çeşidinde en fazla sürgün oluşum oranı ve en fazla sürgün sayısı 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Eresen 87 çeşidinde ise en

yüksek değere 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS besin ortamında rastlanırken en fazla sürgün 0.25 mg/l BAP içeren ortamda görülmüştür.

Filiz 99 çeşidinde en yüksek sürgün oluşum oranı 0.25 mg/l BAP ile 0.10 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısının en fazla olduğu ortam 0.25 mg/l BAP ile 0.05 mg/l NAA içeren MS ortamında Filiz 99 ve Eresen 87 çeşitlerinde sırasıyla en uzun sürgün 0.25 mg/l BAP ile 0.5 mg/l NAA ve 0.25 mg/l BAP içeren MS besin ortamlarında gözlenmiştir.

Baklagil bitkilerinde ön muamele görmüş eksplantlarla çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sitokinin ön muamelesi ile plumula uçları eksplantından sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Andersone ve Levinsh (2004) sitokinin etkisini artırmak için ilk önce *Pinus sylvestris* bitkisinin tomurcuk eksplantlarında soğuk muamelesinden sonra yüksek oranda BAP muamelesinin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Madhulata vd. (2004) *in vitro* muz çoğaltımını 50 mg/l BAP ve 50 mg/l Kin içeren ortamda 60 dk. bekleterek elde etmişlerdir. Andrade ve ark (2006) *Eucalyptus grandis* bitkisinde *in vitro* çoğaltım için 0, 200, 400 ve 600 mg/l oranlarını 1, 2 ve 3 saat süreyle uygulamışlar ve 21 günlük kültürden sonra en etkili sonuçları BAP'ın 200 mg/l oranda 1 ve 2 saat muamelesinden elde edilmiştir. Benzer şekilde Aasim vd. (2009) börülce bitkisinde 10 mg/l BAP ön muamelesiyle plumula uçları eksplantından yüksek oranda sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında dünya ve ülkemiz için ekonomik değere sahip olan bakla bitkisinde doku kültürü çalışmaları yapılmıştır. Bakla bitkisi ile ilgili bu çalışmaların devam etmesi büyük önem taşımaktadır ve bu alandaki açığın kapatılmasına yardımcı olacaktır. Bu tez kapsamında elde edilmiş sonuçlara dayanarak bakla bitkisinde yapılan doku kültürü çalışmalarının ileride yapılacak gen aktarımı çalışmalarına yardımcı olacağı ve dolayısıyla sektöre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aasim, M. 2010. Börülce (*Vigna unguiculata* L.)’de doku kültürü ve gen aktarım çalışmaları. Doktora tezi. Ankara üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Aasim, M., Khawar, K.M. and Ozcan, S. 2009. *In vitro* micropropagation from plumula uçları apices of Turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivar Akkiz. *Scientia Horticulturae* 122: 468–471.
- Ahmad, M., Fautrier, A. G, McNeil, D.L. , Hill, G D. and Burrit, D. J. 1997. *In vitro* propagationnnn of *Lens* species and their F1 interspecific hybrids. *Plant Cell Tiss. Org Cult.*, 47; 169-176.
- Andersone, U. and Levinsh, G. 2004. Regulation of cytokinin response-competence by cold treatment of mature *Pinus silvestris* tissues *in vitro*. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676; 143-148.
- Andrade, W. F., Almeida, M. and Gonçalves, A. N. 2006. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* under BAP pulse. *Perquisa Agropecuaria Brasiçeira*, 41 (12); 153-158.
- Anonim. 2009,a. <http://die.org.tr>, 22/04/2010
- Anonim. 2009,b. <http://fao.org.tr>, 20/05/2010
- Anonim.2009c. <http://tuik.gov.tr>, 15/05/2010
- Babaoglu, M., McCabe, M.S., Power, J.B. and Davey, M.R. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of *Lupinus mutabilis* L. using shoot apical explants *Acta Physiologiae Plantarum* 22 (2);111-119
- Bahgat, S., Shabban, O.A., El-Shihy, O., Lightfoot, D.A., El-Shemy, H.A. 2009. Establishment of the regeneration system for *Vicia faba* L. *Current Issues in Molecular Biology* ,11: i47-i54.

- Balmford, A., Green, R.E and Scharlemann, J.P.W. 2005. Sparing land for nature: Exploring the potential impact of changes in agricultural yield on the area needed for crop production . *Global Change Biology*, 11 (10), pp. 1594-1605.
- Bhatti K.M.K. 2001. Mercimek (*Lens culinaris* Medik)'te doku kültürü çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Ankara üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Brar, M.S., Al-Khayri, J.M., Shamblin, C.E., McNew, R.W., Morelock, T.E., Anderson, E.J.1997. *In vitro* Shoot Tip Multiplication Of Cowpea *Vigna Unguiculata* (L.) Walp. *In vitro* Cellular and Developmental Biology - *Plant*, 33 (2), pp. 114-118.
- Ceyhan, E. 2007. Yemeklik Tane Baklagiller. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü ders notları, 42070 Selçuk / Konya.
- Cubero JI., Hernandez L. 1991. Breeding faba bean (*Vicia faba* L.) for resistance to *Orobanche crenata* Forsk. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires - n 10: 51-5*
- Gamborg O., L. Constable F, Fowke LC, Kao KM, Ohyama K, Kartha K, Pelcher L. 1974. Protoplast and cell culture methods in somatic hybridization in higher plants. *Can J Genet. Cytol.* 16:737-750
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gewin, V. 2010. Food: An underground revolution. *Nature*, 466 (7306): 552-553.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C. 2010. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science.* 327(5967):812-818.
- Hamdy, M.A.A., Hattori, K. 2006. *In vitro* micropropagation of (*Vicia faba* L.) cultivars 'Waza Soramame and Cairo 241' by nodal explants proliferation and somatic embryogenesis. *Biotechnology.*5(1):32-37.

- Hanafy, M., Thomas, P., Heiko, K. and Jacobsen, Hans-Joerg . 2005. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Faba bean (*Vicia faba* L.) using embryo axes. *Euphytica*. 142: 227- 236.
- Hussey, G and Gunn, H.V. 1984. Plant production in pea (*Pisum sativum* L. cv. Peuket and Upton) from long term callus with superficial meristems. *Pl. Sci. Letters*, 37;143-148.
- Jackson, J. A. and Hobbs, S.L.A. 1990. Rapid multiple shoot production from cotyledonary node Eksplants of pea. (*Pisum sativum* L). *In vitro* Cell Dev. Biol. Pl. 26. 835-838
- Jacobson, H-J, and Kysely W. 1984. Induction of somatic embryos in pea *Pisum sativum* L. *Plant. Cell Tiss. Organ Cult.* 3. 319-324.
- Kaur, S., Gupta AK, and Kaur N. 2002. Effect of osmoand hydropriming of chickpea seeds on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit stress. *Plant Growth Regulation* 37:17-22.
- Khalafalla, M.M., Hattori, K. 2000. Differential in vitro direct shoot regeneration responses in embryo axis and shoot tip explants of faba bean. *Breeding Science* 50 (2):117-122.
- Khawar, K.M. and Özcan, S. 2002. Effect of Indole-3-Butyric Acid on *In vitro* root Development in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Turk J. Bot.* 26,109-111.
- Khush, G.S. 2001. Green revolution: The way forward. *Nature Reviews Genetics*, 2 (10): 815-822.
- Kysely, W., James, R.M., Paul, A.L. Glenn, B.C. and Jacobson, H-J.1987. Plant regeneration via somatic embriyogenesis in pea. (*Pisum sativum* L.) *Plant Cell Rep.*, 6; 305-308.
- Lawes, DA., Bond DA, Poulsen MH, 1983. Classification, origin, breeding methods and objectives. In the Faba bean, (*Vicia faba* L.) Hebblethwaite, PD ed. butterworths, London, 23.

- Lindsey, K., 1992. Genetic manipulations of crop plants. *J. Biotech.*, 26: 1-28.
- Madhulata, P., Anbalagan, M., Jayachandran, S. and Sakthivel, N. 2004. Influence of liquid pulse treatment with growth regulators on *in vitro* propagation of banana (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76 (2); 189-192.
- Malik, K.A. and Saxena, P.K. 1992. *In vitro* regeneration of plants: a novel approach. *Naturwissenschaften*. 79; 136-137.
- Mroginski, L.A. and Kartha, K.K. 1981. Regeneration of pea *Pisum sativum* L cv. Century) plants by *in vitro* culture of immature leaflets. *Plant Cell Rep.*, 1; 64-66.
- Mukhtar, S., Anis, M., Ahmad, N. 2010. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. *In vitro* optimization of phytohormones on micropropagation in butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) 16(2): 98-105.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures *Physiol. Plant.* 15,473-497.
- Nachi, N., Guen, J.L., 1996. Dry matter accumulation and seed yield in faba bean (*Vicia faba* L) genotypes. *Agronomie*. 16:47-59.
- OnDřej M., HuňADy I. 2007. Faba Bean (*Vicia faba* L.) Breeding for Resistance to Anthracnose (*Ascochyta fabae* Speg.) in the Czech Republic. *Czech j. Genet. Plant Breed.*, 43(2): 61–68.
- Özcan, S., Barghchi, M., Firek, S. and Draper, J. 1992. High frequency adventitious shoot regeneration from immature cotyledons of pea *Pisum sativum* L. *Plant Cell Rep.*, 11; 44-47.
- Özcan, S., Özgen, M., 1996. Bitki genetik mühendisliği. *Kükem Dergisi*, 1: 69-95.
- Özgen, M., Özcan, S., Sevimay, C. S., Sancak, C. and Yıldız, M. 1998. High frequency adventitious shoot regeneration in sainfoin. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 52: 205-208.

- Polanco, M. C. and Ruiz, M. L. 1997. Effect of benzylaminopurine on *in vitro* and *in vivo* root development in lentil *Lens culinaris* Medik. Plant Cell Rep., 17; 22-26.
- Polanco, M. C., Pelaez, M. I. and Ruiz M.L. 1988. Factors affecting callus and shoot formation from *in vitro* cultures of *Lens culinaris* Medik. Plant Cell Tiss. Org Cult., 15(2); 175-182.
- Pretty, J. 2008. Agricultural sustainability: Concepts, principles and evidence. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363 (1491): 447-465.
- Rajesh, P.N., Muehlbaue, F.R. and Mcphee, K. 2005. *Agrobacterium mediated* transformation of a large genomic iInsert in chickpea. Plant & Animal Genomes XIII. Conference January 15-19, Town & Country A Convention Center San Diego, CA.
- Rezmer, Schlichting, C. R., Wächter, R. and Cornelia, I. U. 1999. Identification and localization of transformed cells in *Agrobacterium tumefaciens* induced plant tumors. Planta. 209 : 399-405.
- Rubluo, A., Kartha, K. K., Mroginiski, L. A. and Dyck, J. 1984. Plant regeneration from pea leaflets cultured *in vitro* and genetic stability of regenerants. J. Plant Physiol.,117; 119-130.
- Sağlam S. 2010. Tohum Böceklerine (Bruchidae: Coleoptera) Dayanıklı Transgenik Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkilerinin Elde Edilmesine Yönelik Araştırmalar. Doktora Tezi. Ankara üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Singh, R. K. and Raghuvanshi, S.S. 1989. Plantlet regeneration from nodal segment and shoot tip derived Eksplants of lentil. *Lens news letter*,16 (1); 33-35.
- Snedecor, GW. and Cochran, W.G 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa. USA.

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418 (6898): 671-677.

TUIK 2009. <http://www.tuik.gov.tr>

Weigand S., Bishara SI. 1991. Status of insect pests of faba bean in the Mediterranean region and methods of control. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires-n."*10(1): 67-70

Yorgancilar, M., Babaoğlu, M., Hakki, E.E., Atalay, E. 2009. Determination of the relationship among Old World Lupin (*Lupinus* sp.) species using RAPD and ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 8 (15); 3524-3530.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gül den ÇETİN
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 22.03.1985
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Mustafa Kemal Süper Lisesi (2003)
Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri A.B.D
(2009)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri
A.B.D (Eylül 2009-Aralık 2010)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Proje elemanı 2007-2008
Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Proje elemanı 2008-2009
Ulusoy Tohumculuk Ziraat Mühendisi 2010-

Yayımları (SCI ve diğer) :

Ulusal kongrelerde sunulmuş bildiri ve posterler

1. **Çetin, G.**, Sağ lam S., Khawar, K.M., Ozcan, S. 2009. Bakla (*Vicia faba* L.)'nın plumula uçları eksplantlarından *in vitro* koşullarda adventif sürgün rejenerasyonu. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi. 19–22 Ekim 2009, Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Hatay.
2. **Çetin, G.**, Mokhtarzadeh, S., Hajyzadeh, M., Khawar, K.M., Ozcan, S. 2011. Bakla (*Vicia faba* L.)'nın embriyo eksen i eksplantlarından *in vitro* koşullarda adventif sürgün rejenerasyonu. 1. Ulusal Ali Numan Kır aç Tarım Kongresi ve Fuarı, 27-29 Nisan 2011, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir (kabul edilmiştir).
3. Hajyzadeh M, Mokhtarzadeh S, Ahmad HA, **Çetin G**, Khawar KM, Ozcan S. 2011. Nohut bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) Gökçe çeşidinin plumula ucu eksplantından *in vitro* koşullarda sürgün rejenerasyonu. 1. Ulusal Ali Numan Kır aç Tarım Kongresi ve Fuarı, 27-29 Nisan 2011, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir (kabul edilmiştir).
4. Mokhtarzadeh S, **Cetin G**, Khawar KM, Ozcan S. 2011. Karabaş otu (*Lavandula stoechas* L.)'nın *in vitro* mikroçoğaltımı. 1. Ulusal Ali Numan Kır aç Tarım Kongresi ve Fuarı, 27-29 Nisan 2011, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir (kabul edilmiştir).