

Bazı Şeker Pancarı (*Beta vulgaris L.*) Hatlarında *In vitro* Adventif Sürgün Rejenerasyonu

Ayşegül ALTUNOK¹ Celâl ER²

¹*Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü P.K. 9 35661 Menemen-İzmir/Turkey*
²*Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü-Ankara/Turkey*

Geliş tarihi (Received): 24.04.2013

ÖZ: Bu çalışmada; farklı dozlarda benzil amino pürin (BAP) ,naftalen asetik asit (NAA) ve indol-3-bütirik asi t(İBA) kullanılarak şeker pancarı (ELK 345, ÇBM 315 ve M 114) hatlarına ait petiol ve yaprak eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu ve kararma kapasiteleri belirlenmiştir. Petiol eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyon kapasitesi (% 15,00) 2 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA ve 10 g/l sukroz içeren MS ortamına yerleştirilen ELK 345 hattına ait eksplantlarda elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu 0,5 mg/l BAP ve 0,2 mg/l NAA içeren MS ortamına yerleştirilen ÇBM 315 hattına ait petiol eksplantlarında (% 9,66) tespit edilmiştir. Maksimum kararma 2 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA içeren rejenerasyon ortamına yerleştirilen M 114 hattına ait petiol (% 96,17) eksplantlarından elde edilmiştir. M 114 hattına ait yaprak eksplantlarında da yüksek oranda (ort. % 91,81) kararma görülmüştür. Bununla birlikte kararma petiol eksplantlarında daha fazla olmuştur.

Anahtar Sözcükler: Şeker pancarı, *Beta vulgaris L.*, doku kültürü, *in vitro*, adventif sürgün rejenerasyonu, kahverengileşme.

***In vitro* Adventitious Shoot Regeneration In Some Sugar Beet (*Beta vulgaris L.*) Lines**

ABSTRACT: This study describes adventitious shoot regeneration and browning in three sugar beet (*Beta vulgaris L.*) lines (ELK 345, ÇBM 315 and M 114) with petiole and leaf explants using different concentrations of Benzylaminopurine (BAP) , Naphtalaneacetic acid (NAA) and Indole-3-butyric acid (IBA) for adventitious shoot regenerations and browning in sugar beet. The highest shoot regeneration capacity in petiole explants was obtained of line ELK 345 (15 %) with 2 mg/l; BAP, 0,2 mg/l NAA and 10 g/l sucrose in MS media. The highest shoot regeneration was determined in petiole explants of line ÇBM 315 (9,66 %) where 0,5 mg/l BAP and 0,2 mg/l NAA was used as regenerant in MS. Maximum browning of 96,17 % was observed in regenerant media containing 2 mg/l BAP and 0,5 mg/l NAA in petiole explants of line M 114. Whereas, high frequency of browning was observed in leaf (average 91,81 %) explants of line M 114. However, browning of petiole explants was more severe.

Keywords: Sugar beet, *Beta vulgaris L.*, doku kültürü, tissue culture, *in vitro*, adventitious shoot regeneration, browning.

GİRİŞ

Pancar ilk kez Doğu Akdeniz ve Orta Doğuda sahil formlarından kültüre alınmıştır (yaprak tipleri) (de Bock, Th. S. M., 1986). Arkeolojik deliller az

olmasına karşın liguistik (dilbilim) deliller oldukça fazladır. Pancarın kültüre alınmasına ilişkin ilk yazılı bilgiler Babil’de M.Ö. sekizinci yüzyıla dayanmaktadır (Zohari ve ark., 2012).

Bu çalışma “Bazı Şeker Pancarı (*Beta vulgaris L.*) Hatlarında *In vitro* Adventif Sürgün Rejenerasyonu” isimli yüksek lisans tezidir. Sorumlu Yazar (Corresponding Author): Ayşegül ALTUNOK E-mail: altunok.a@gmail.com

Yüksek enerjili tatlı bir besin maddesi olan şeker, birer molekül fruktoz ve glikoz içeren bir disakkarittir.

Dünyada üretilen şekerin % 75'i şeker pancarından % 25'i de şeker kamışından elde edilmekte iken Türkiye'de şeker üretiminin tamamı şeker pancarından sağlanmaktadır (Anonim, 1993; 1998; 1999).

Besin değeri arpanın 2, buğdayın ise 2,5 katı olan şeker pancarı, temel gıda ihtiyacının karşılanması açısından olduğu kadar, istihdam ve tarımsal üretime katkısı açısından da önemli bir bitkidir (Anonim, 1997).

Son 60 yılda ürünlerin nitelik ve nicelik artışında başarılı sonuçlar elde edilse de, klasik bitki ıslah yöntemlerinin kullanımıyla istenilen tüm özelliklerin tek bir genotipte toplanması oldukça zordur. Klasik ıslah yöntemlerinin zaman alıcı bir uğraş olmasının yanı sıra bu yöntemden beklenen başarının, üzerinde çalışılan populasyonun genişliği ile doğru orantılı olması, dolayısıyla var olan çeşitliliğin artırılması içinde yeni ıslah yöntemlerin geliştirilmesi kabul edilen bir sonuç olmuştur (Yıldız, 2000).

Şimdiye kadar belirtildiği üzere önemli bir bitki olan şeker pancarının *in vitro* rejenerasyonu oldukça zordur. Bu nedenle yapılan biyoteknolojik çalışmalarda istenilen başarıya ulaşılamamıştır (Özcan, 1999).

Bitki hücrelerinde yeni genetik çeşitlerin geliştirilmesinin farklı yöntemleri vardır. Bunlardan birisi DNA teknikleridir. Bu yolla, kalite özellikleri, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, muhtelif stres durumlarına tolerans ve herbisitlere dayanıklılık açısından genlerin izolasyonu ve transfer etme çalışmalarına başlanmıştır (Fraley ve ark., 1985).

Bitki ıslahında yararlanılan bir diğer yöntem olan hücre ve doku kültürünün seçimi ve bu alandaki çalışmaların getirdiği avantajlar şeker pancarı ıslahçıları tarafından da kabul edilmiştir (Detrez 1988).

Ritchie ve ark. (1989), *in vitro*'da yaprak diplerinden, kalluslardan ve petiollerden sürgün rejenerasyonu ile ilgili çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada % 3 sukroz, 0,8 agar, vitaminler ile indikatör olarak

NAA ve BAP eklenen MS ortamından yararlanılmış olup; 6 tane pancar hattına ait tohumlar steril edilmiş, ancak yüzey sterilizasyonundaki gelişmeler şüpheli bulunmuştur. 0,1 mmol m⁻³ BAP eklenen MS ortamında 25°C sıcaklıkta sadece 4 haftada belirgin olarak daha fazla yaprak oluşumu gözlenmiştir. Sadece 3 ay süre ile 5 mmol m⁻³ BAP ilave edilen MS ortamında ise *in vitro*'da sürgün kültüründe petiollerden sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Jack ve ark. (1992), 21 günlük şeker pancarı fidelerinin hipokotil eksplantlarından. 0,3 mg/1 BAP, 0,1 mg/1 NAA, % 0,5 adenin, % 0,5 fruktoz, % 0,5 sukroz ve % 0,5 glikoz içeren MS ortamında basit ve tekrarlanabilen bir rejenerasyon sistemi geliştirmişler ve elde edilen sürgünler köklendirilerek seralarda büyütülmüşlerdir.

Burke ve ark. (1993), monogerm şeker pancarlarının *in vitro*'da çoğaltımları ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. MS ortamına eklenen IAA, NAA, BAP, 2,4-D ve TIBA ile elde edilen 2 haftalık fidelerden alınan sürgünler kotiledonların üzerinden kesilip çıkartılmış ve 0,3 mg/1 içeren ortama yerleştirilmiştir. Yüksek oranda kallus verimi 2,4-D ile elde edilmiştir. Bu seviyeye 1mg/1 kinetin veya BAP ile kombinasyon oluşturan NAA ile de ulaşılabilirken daha sonra yapılan çalışmalarda kök oluşumu da gözlenmiştir.

Köksoy ve ark. (1995), kallus kültürlerinin diğer organ kültürlerinden farklı olarak parankimatik dokuların hormon kapasitelerine sahip olmamaları nedeniyle hormona ihtiyaç duyduklarını bildirmişlerdir. Bu amaçla, bitki büyüme düzenleyicilerinden 2,4-D, NAA ve IAA kullanılmıştır. Bu hormonların kallus gelişiminin ve hücre bölünmesinin teşvik edilmesinde esas rol oynayan faktörler olduğu bu çalışma sonucunda ifade edilmiştir.

Toldi ve ark. (1996), şeker pancarının karanlıkta ve 0,2 mg/1 BAP, 2 mg/1 GA₃ ve 0.1 mg/1 IAA içeren besin ortamında kültür sonucu uzayan epikotillerini 5-8 mm uzunlukta, 2-3 mm genişlikte ve 0,8-1 mm kalınlığında keserek, 1 mg/1 BAP ve 1 mg/1 TIBA içeren ortamlarda kültüre almışlar ve bu parçalardan eksplant başına 6,3 adet adventif

sürgün elde etmişlerdir. Bu aşamadan sonra besin ortamına ilave edilen 100 mg/1 NaCl sürgünlerin köklendirilmesini artırmıştır.

Zhong ve ark. (1993), şeker pancarında adventif sürgün rejenerasyonu gerçekleştirmek için yaprak sapı eksplantlarını kültüre almışlardır. Yapılan bu çalışmada 6 çeşit üzerinde BAP, NAA ve farklı dozlarda sukroz denenerek en iyi sonuç araştırılmıştır. Neticede; % 3 sukroz ile 1 mg/1 BAP içeren MS ortamından en yüksek sürgün rejenerasyonu elde edilirken, % 3 sukroz ve 1 mg/1 NAA içeren yarı MS ortamının kullanılmasıyla en yüksek köklenmenin elde edildiği bildirilmiştir.

Yıldız ve ark. (1997), şeker pancarının *in vitro* rejenerasyon kabiliyetini önemli ölçüde düşüren eksplant kararmasının ortadan kaldırılması için yaptıkları çalışmada, farklı şekillerde yetiştirilen şeker pancarı fidelerinin kotiledon eksplantlarını kullanmışlardır. Araştırma sonucunda; steril fidelerden alınan eksplantlar kültürden önce steril edildiğinden kararmanın kullanılan dezenfektan ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, ortamda bulunan şeker konsantrasyonunun düşürülmesinin eksplantlardaki kararmayı azalttığı ifade edilmiştir.

In vitro şartlarda sürgün rejenerasyonunun sağlandığı besin ortamlarında köklenmeyi sağlamak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle sürgünlerin sitokinin içermeyen, fakat köklenmeyi teşvik edici hormonların (IBA gibi) bulunduğu ortamlara transfer edilmesi gerekmektedir (Gönülşen, 1987). Raghava ve ark. (1992)'da yaptıkları çalışmada IBA'nın gelişen sürgünlerin köklendirilmesinde en yaygın kullanılan oksin olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Tohum yüzey sterilizasyonunda hidrojen peroksit, civa, gümüş nitrat ve antibiyotikler kullanılabilirse de çamaşır suyu en yaygın kullanıma sahiptir. Sterilizasyonda kullanılan dezenfektanın konsantrasyonu ve sterilizasyonun süresi, tohumdan gelişen fidelerin ve dolayısıyla eksplantın canlılığını ve rejenerasyon kapasitesini önemli derecede etkilemektedir (Allan, 1991).

Şeker pancarının *in vitro*'daki problemleri çözümlenerek adventif sürgün rejenerasyonunun belirlenebilmesi bu çalışmanın ana amacını oluşturmuştur.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada, Türkiye Şeker Fabrikaları, Etimesgut Şeker Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen M114, ELK 345 ve ÇBM 315 şeker pancarı hatları kullanılmıştır. M 114 diploid-monogerm, kök verimi iyi, şeker varlığı orta seviyede bir hattır. ELK 345, diploid-multigerm bir hat olup N-tipi bir pancardır. ÇBM 315 ise tetraploid- multigerm, kök verimi ve şeker düzeyi iyi olan bir hattır.

Besin Ortamı ve Doku Kültürü Koşulları

Denemelerde MS mineral tuz ve vitaminleri (Murashige ve Skoog, 1962) ile % 3 sukroz içeren ve % 0,7'lik agar (Type A) ile katılaştırılan besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 1). Ortam hazırlığında çift distile saf su kullanılmıştır. Gerekliğinde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5,8'e ayarlandıktan sonra 1,2 atmosfer basınç altında ve 120°C'de 20 dakika tutularak sterilizasyonu sağlanmıştır. Tüm kültürler beyaz floresan ışık altında 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta 23°C'de tutulmuşlardır.

In vitro'da Fide Yetiştirilmesi ve Eksplantların İzolasyonu

Şeker pancarının üç hattına ait tohumlar, % 100'lük ticari çamaşır suyu içerisinde (% 5 NaOCl içeren), çalkalayıcı inkübatörde oda sıcaklığında 20 saat süreyle tutularak yüzey sterilizasyonu sağlanmıştır

Daha sonra, steril kabin içerisinde süzdürülerek steril saf su ile üç defa çalkalandıktan sonra yeniden steril saf su eklenerek, çalkalayıcı inkübatörde tohumlar 3 saat süreyle durulanmaya bırakılmıştır. Bu işlem sonunda steril edilen tohumlar yine steril edilmiş olan baby-jar'larda % 3 sukroz ve % 0,7 agar içeren MSO bitki besin ortamında 23°C de 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirilmiştir.

Çizelge 1. MS (Murashige ve Skoog) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları.
Table 1. The ingredients and their concentrations in the MS media.

Ortamda bulunan madde Ingredient in the media		Konsantrasyon Concentration (mg/l)
Makro element Macro element	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Mikro element Micro element	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,20
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30
	Inisitol	100,0
Vitamin	Nicotinic Acid	0,5
	Pyridoxine-HCl	0,5
Vitamin	Thiamine-HCl	0,1
	Glycine	2,0

Petiol ve Yaprak Eksplantlarının Steril Şeker Pancarı Fidelerinden İzolasyonu

Yaprak ve petiol eksplantları MSO besin ortamında çimlendirilen 4 haftalık fidelerden elde edilmiştir. Bu fidelerden eksplantların bir kısmı farklı oranlarda büyümeyi düzenleyiciler içeren MS besin ortamına yerleştirilmiştir. Alınan eksplantların bir kısmı da 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l sukroz içeren ve farklı oranlarda büyümeyi düzenleyicilerin ilave edildiği MS besin ortamlarına yerleştirilmiştir.

Rejenere Olmuş Sürgünlerin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler 10-20 mm uzunluğa ulaştığı zaman kesilerek steril baby-jar'larda, farklı konsantrasyonlarda IBA içeren köklendirme ortamına yerleştirilmişlerdir. Burada köklenen sürgünler daha sonra harç bulunan saksılara aktararak, iklim odasında yüksek nemde bir süre tutulduktan sonra seraya aktarılmışlardır.

İstatistiksel Değerlendirmeler

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Her muamele, içerisinde 10 adet eksplantın bulunduğu 4 tekerrürlü 100x10 mm'lik petri kutularından oluşmuştur. Elde edilen veriler

varyans analizine tabi tutulup, muamele ortalamaları Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerler, istatistik analizinden önce 'arcsin' değerlerine çevrilmiştir (Snedecor ve Cochran, 1967).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma ile; şeker pancarı hatlarında farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin yanı sıra değişen dozlarda sukroz kullanımı ile hatlara ait petiol ve yaprak eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu ve kararma kapasiteleri belirlenmiştir.

Şeker Pancarı Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu, Çimlendirilmesi ve Steril Fide Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan ELK 345, ÇBM 315 ve M 114 hatlarına ait tohumlarda yüzey sterilizasyonu sırasında, sterilizasyon süresine yönelik yapılan çalışmada 1 saat, 2 saat ve 3 saatlik bekleme süreleri göz önünde tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre; % 100'lük ticari çamaşır suyunda 1 saat bekletilen ELK 345 ile 2 saat bekletilen M 114 hatlarına ait tohumlarda bulaşıklık tespit edilmiştir. Çamaşır suyu içerisinde 3 saat bekletilen tohumlarda her 3 çeşitte de herhangi bir bulaşıklık görülmemiştir. Ancak çimlendirme ortamına konulan pancar tohumlarının çimlenmesi çok güç olmuş ve istenen düzeyde çimlenme yüzdesi elde edilememiştir. Bu durumun tohumun dış yüzeyinin girintili çıkıntılı olmasının yanı sıra tohum kabuğunun kalın olması nedeniyle tohumun yeterli su alıp şişmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yüzey sterilizasyonunda 20 saat çamaşır suyu içerisinde çalkalayıcı inkübatörde bekletilen materyallerde tohum kabuklarının tamamen soyulmasıyla yüzey sterilizasyonunda başarı sağlanmıştır. Tohumlar steril çift distile su ile 3-4 kez yıkanarak muhtemel kimyasal kalıntılardan temizlenmiştir. Bundan sonra yine çift distile su içerisinde 4 saat çalkalayıcı inkübatörde tutulan tohumların kolay çimlenebilmeleri amacıyla şişmeleri sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra *in vitro* koşullarda petri kutularında genç fideler elde edilebilmiştir.

Şeker Pancarı Eksplantlarında Doku Kararması

Farklı ortam ve sukroz dozlarının petiol eksplantlarında kararma üzerine etkileri

Farklı ortam ve sukroz dozlarının şeker pancarı hatlarına ait petiol eksplantlarında kararma üzerine etkileri, yapılan istatistiki analiz sonucu 0,05 düzeyinde önemli bulunmuş ve sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Ortam ve sukroz dozları arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır. Çalışmada sukroz dozlarına bağlı olarak kararma oranlarına bakıldığında her 3 hatta da 30 g/l sukroz dozunun kullanıldığı ortamlarda en fazla kararmanın olduğu gözlemlenmiştir. En düşük kararma oranı ise 10g/l sukroz içeren ortamdan elde edilmiştir. Sonuçlar ortam bazında incelendiğinde ise; eksplantlardaki kararma oranlarının BAP dozları ile değişiklik gösterdiği, NAA dozlarının ise kararmada bir etken olmadığı gözlemlenmiştir.

Farklı ortam ve sukroz oranlarının yaprak eksplantlarında kararma üzerine etkisi

Farklı şeker pancarı hatlarına ait yaprak eksplantlarında farklı ortam ve sukroz dozlarının kararmaya olan etkisi 0,05 düzeyinde önemli bulunmuş ve sonuçlar Çizelge 3'de verilmiştir.

Sonuçlar incelediğinde, tüm hatlara ait yaprak eksplantlarında en yüksek kararma oranı 30 g/l sukroz içeren ortamdan elde edilirken, en düşük kararma oranı ise her üç hat içinde sukrozun 10 g/l dozunda kullanıldığı uygulamalarda görülmüştür (Çizelge 3).

ELK 345, ÇBM 315 ve M 114 hatlarına ait yaprak eksplantları ile yapılan bu çalışmada, hatların hiçbirinde ortam ve sukroz dozları arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmadığı gibi ortam bazında incelendiğinde de elde edilen veriler istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 2. Farklı ortam ve sukroz dozlarının petiol eksplantlarında kararma üzerine etkileri (%).

Table 2. Effects of different media and sucrose doses on browning of petiol explants (%).

Bitki büyüme düzenleyici Plant growth regulator (mg/l)	Hatlarda kararma oranları / Browning rates of lines (%)								
	ELK 345 Sukroz (Sucrose) (g/l)			ÇBM 315 Sukroz (Sucrose) (g/l)			M 114 Sukroz (Sucrose) (g/l)		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
0,5 BAP + 0,2 NAA	38,33	42,67	68,83	30,67	43,17	70,83	32,33	75,33	100,00
1 BAP + 0,2 NAA	29,00	50,83	78,50	33,33	37,17	73,67	32,00	56,75	85,33
2 BAP + 0,2 NAA	29,67	43,17	62,33	46,67	39,50	71,17	34,50	50,00	92,67
Ortalamalar / Means	32,33 c*	45,56 b	69,89 a	36,89 b	39,95 b	71,89 a	32,94 c	60,69 b	92,67 a

* Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0,05 düzeyinde önemlidir.

* Difference between mean values shown on the same line with different letter was found to be significantly different (p < 0,05).

Çizelge 3. Farklı ortam ve sukroz dozlarının yaprak eksplantlarında kararma üzerine etkileri (%).

Table 3. Effects of different media and sucrose doses on browning of leaf explants (%).

Bitki büyüme düzenleyici Plant growth regulator (mg/l)	Hatlarda kararma oranları / Browning rates of lines (%)								
	ELK 345 Sukroz (Sucrose) (g/l)			ÇBM 315 Sukroz (Sucrose) (g/l)			M 114 Sukroz (Sucrose) (g/l)		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
0,5BAP + 0,2NAA	31,17	66,33	87,17	36,33	54,50	90,17	29,17	68,07	100,00
1BAP + 0,2NAA	33,17	52,00	84,75	40,50	55,50	77,33	29,50	69,33	82,67
2BAP + 0,2NAA	39,67	43,17	85,67	41,17	61,50	80,00	24,10	79,33	92,77
Ortalamalar / Means	34,67 *	53,83 b	85,86 a	39,33 c	57,17 b	82,50 a	27,59 c	72,24 b	91,81 a

* Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0,05 düzeyinde önemlidir./

* Difference between mean values shown on the same line with different letter was found to be significantly different (p < 0,05).

Farklı BAP ve NAA dozlarının petiol eksplantlarında kararma üzerine etkisi

Farklı BAP ve NAA dozlarının petiol eksplantları üzerinde kararmaya olan etkilerine ait analiz sonuçları Çizelge 4'te verilmiştir. Eksplantlarda görülen kararma istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. BAP ve NAA dozlarının interaksyonu 0,05 düzeyinde önemli çıktığından her bir faktörün doğrudan etkisinin incelenmesi yerine interaksyonunun incelenmesi yoluna gidilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ELK 345 ve ÇBM 315 hatlarına ait petiol eksplantlarında BAP ve NAA dozları arasında herhangi bir ilişkiye rastlanılmamıştır. Yine elde edilen sonuçlar gerek BAP, gerekse NAA bazında ayrı ayrı incelendiği zaman da elde edilen verilerin istatistiki açıdan bir değer taşımadığı tespit edilmiştir.

Yapılan analizler neticesinde; şeker pancarı hatlarından elde edilen eksplantlardaki kararma oranlarında ortamda kullanılan farklı BAP dozlarının önemli bir etkisinin olduğu, ancak NAA dozlarının tek başlarına istatistiki açıdan herhangi bir önemlerinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Çizelge 4).

Farklı BAP ve NAA dozlarının yaprak eksplantlarında kararma üzerine etkisi

Farklı şeker pancarı hatlarına ait yaprak eksplantlarında farklı BAP ve NAA dozlarının kararma üzerine etkisine ait veriler Çizelge 5'te verilmiştir. Eksplantlarda farklı BAP ve NAA dozlarının etkisi 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur. BAP ve NAA interaksyonu 0.05 düzeyinde önemli çıktığından interaksyonun incelenmesi yoluna gidilmiştir.

Eksplantlardaki kararmaya yönelik yapılan bu çalışmada BAP ve NAA interaksyonunun etkisi 0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Ancak elde edilen diğer sonuçlar BAP ve NAA dozlarının tek başlarına incelendiklerinde istatistiki açıdan bir önem taşımadıkları görülmüştür.

Pancar hatlarından ELK 345 hattına ait yaprak eksplantlarında ise gerek BAP ile NAA dozları ayrı ayrı incelendiklerinde gerekse de BAP ve NAA interaksyonu incelendiğinde elde edilen sonuçların istatistiki açıdan herhangi bir önem taşımadığı görülmüştür. ÇBM 315 hattına ait yaprak eksplantlarında en yüksek kararma oranı 1 mg/l BAP + 0 mg/l NAA içeren MS ortamında % 75,00 olarak saptanmıştır (Çizelge 5).

Çizelge 4. Farklı BAP ve NAA dozlarının-petiol eksplantlarında kararma üzerine etkileri (%).

Table 4. Effects of different BAP and NAA doses on browning of petiol explants (%).

BAP (mg/l)	Hatlarda kararma oranları / Browning rates of lines (%)								
	ELK 345			ÇBM 315			M 114		
	NAA (mg/l)			NAA (mg/l)			NAA (mg/l)		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
0,5	44,17	37,33	57,17	67,17	25,00	57,00	55,50	55,83	43,67 cde
1	56,67	48,83	47,83	61,83	73,16	46,17	65,33	64,50	55,17 cde
2	38,00	45,33	74,83	41,50	60,33	49,00	60,83	68,83	34,47 cde

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0,05 düzeyinde önemlidir.

Different between mean values shown on the same line with different letter was found to be significantly different (p < 0,05)

Çizelge 5. Farklı BAP ve NAA dozlarının yaprak eksplantlarında kararma üzerine etkileri (%).

Table 5. Effects of different BAP and NAA doses on browning of leaf explants (%).

BAP (mg/l)	Hatlarda kararma oranları / Browning rates of lines (%)								
	ELK 345			ÇBM 315			M 114		
	NAA (mg/l)			NAA (mg/l)			NAA (mg/l)		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
0,5	34,33	20,33	25,83	23,00	15,83 d*	39,17 bcd	41,33 bc	42,50 bc	55,50 abc
1	37,50	27,83	15,17	18,67	75,00 a	39,17 bcd	18,67 cd	47,83 ab	64,83 ab
2	22,67	37,33	14,33	28,67	49,17 ab	38,17 bcd	50,83ab	54,50 ab	44,50 bcde

*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0,05 düzeyinde önemlidir.

* Difference between mean values shown on the same line with different letter was found to be significantly different (p < 0,05).

Şeker Pancarı Eksplantlarında Adventif Sürgün Rejenerasyonu

Farklı ortam ve sukroz dozlarının petiol ve yaprak eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Şeker pancarında ELK 345 hattına ait petiol eksplantlarında rejenerasyon oranı 2 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamda 10 g/l sukroz kullanıldığında % 15 ve aynı ortamda eksplant başına sürgün sayısı da 7,33 olarak bulunmuştur. Diğer sukroz dozlarını içeren ortamlarda ise herhangi bir adventif sürgün rejenerasyonu görülmemiştir. ÇBM 315 hattına ait petiol eksplantlarında ise 2 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamda 10 g/l sukroz kullanıldığında rejenerasyon oranı % 12,33 ve eksplant başına sürgün sayısı da 6,67 olarak tespit edilmiştir. Farklı sukroz dozlarını içeren ortamlar incelendiğinde ise adventif sürgün rejenerasyonuna rastlanmamıştır. Son olarak M 114 hattına ait petiol eksplantlarında ise 10 g/l sukrozun kullanıldığı 2 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamlarda % 4,33 rejenerasyon oranı ve 3,37 adet eksplant başına sürgün sayısı elde edilmiştir. Diğer ortamlardan elde edilen sonuçlara bakıldığında adventif sürgün rejenerasyonu elde edilemediği görülmektedir.

Şeker pancarı hatlarından ELK 345, ÇBM 315 ve M 114 hatlarına ait yaprak eksplantlarında yapılan çalışmalarda adventif sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Ritche ve ark. (1989) da yaptıkları çalışmada başarılı sürgünlerin elde edilmesinde petiol eksplantlarında yaprak eksplantlarına oranla daha başarılı olduklarını belirtmişlerdir.

Farklı BAP ve NAA dozlarının petiol eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi

Yapılan çalışmada ELK 345 hattına ait petiol eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyon oranı 1 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamda % 8,67 olarak elde edilmiştir. En düşük adventif sürgün rejenerasyon oranı ise % 4,33 ile 2 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA ile 2 mg/1 BAP + 0 mg/1 NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir. Eksplant

başına en fazla sürgün sayısı ise 6,67 ile 0,5 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamdan elde edilmişken en düşük sürgün sayısı 3,67 ile 2 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamda tespit edilmiştir.

ÇBM 315 hattına ait petiol eksplantlarında da en yüksek sürgün rejenerasyon oranı % 9,66 ile 0,5 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamdan elde edilmiş olup eksplant başına en fazla sürgün sayısı 7,33 olarak yine aynı ortamdan elde edilmiştir. En düşük rejenerasyon oranı ise 2 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamdan % 4,33, eksplant başına en fazla sürgün sayısı da 2,33 ile aynı ortamdan elde edilmiştir. M 114 hattına ait petiol eksplantlarında ise adventif sürgün rejenerasyon oranı % 2,66 ile 2 mg/1 BAP + 0,2 mg/1 NAA içeren ortamdan elde edilirken, eksplant başına sürgün sayısı da 3,33 olarak yine aynı ortamdan elde edilmiştir.

Petiol eksplantlarından elde edilen adventif sürgünlerin köklendirilmesi ve tarlaya aktarılması

In vitro'da gelişen 5-6 cm uzunluğundaki sürgünler 0 mg/1, 1 mg/1, 2 mg/1 ve 3 mg/1 IBA içeren köklendirme ortamlarına aktarılmışlardır. Köklendirme ortamlarına yerleştirilen sürgünler çalışmada kullanılan eksplantlar içerisinde sadece petiol eksplantlarından elde edilebilmişlerdir.

ELK 345 hattına ait petiol eksplantlarından elde edilen sürgünler farklı dozlarda IBA içeren köklendirme ortamlarına yerleştirilmişler ve neticede sadece 0 mg/1 ve 1 mg/1 IBA içeren ortamlarda köklenme olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 6).

ÇBM 315 hattına ait petiol eksplantlarından elde edilen sürgünlerde yine farklı dozlarda IBA eklenen köklendirme ortamlarına yerleştirilmişlerdir. Sadece 1 mg/1 ve 2 mg/1 IBA içeren ortamlarda köklenen sürgünler iklim odalarında yerleştirilen saksılara alınmışlardır. Burada gelişen bitkiler bir süre sonra tarlaya aktarılmışlardır.

M 114 hattına ait eksplantlarla yapılan çalışmaların sonucunda ise petiol eksplantlarında sürgün oluşumu sağlanamamıştır.

Çizelge 6. Farklı IBA dozlarının ELK 345 ve ÇBM 315 hatlarına ait petiol eksplantlarında köklenme üzerine etkileri (%).

Table 6. Effects of different doses of IBA on rooting of the petiol explants belong to ELK 345 and ÇBM 315 lines.

Hat Line	IBA (mg/l)			
	0	1	2	3
ELK 345	10	33,3	-	-
ÇBM 315	-	10	20	-

SONUÇ VE ÖNERİLER

Doku kültürü çalışmalarında elde edilecek başarı kullanılan eksplantın yüzey sterilizasyonu durumuna sıkı sıkıya bağlıdır. Burada amaç; eksplantın rejenerasyon kapasitesini düşürmeden yüzeyde bulunan mikroorganizmaların temizlenmesidir. Bunun için başarılı sonucun alındığı en uygun dezenfektan dozunun tespit edilmesi gerekmektedir. Uygun doz ve bekleme süresi neticesinde yumuşayan kabuklar diğer mikroorganizmalarla birlikte temizlenmiş ve geriye kalan çıplak tohum da yeteri kadar su çekerek kolaylıkla çimlenebilmiştir. Yapılan araştırmalar tohumların sterilizasyonu neticesinde elde edilen steril fidelerden alınan eksplantlarda rejenerasyon kapasitesinin çok yüksek olduğunu göstermiştir (Yıldız 2000).

Bu çalışmada materyalin dezenfektanda bekleme süresi açısından yapılan değerlendirmede; şeker pancarı tohumunda sert kabukluluk özelliğinin yanı sıra tohum yüzeyinin girintili-çukurlu olması nedeniyle sterilizasyon ve sonrasındaki çimlenme aşamasında olumsuzluklar gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla (Ritche ve ark., 1989; Allan 1991, Burke ve ark., 1993; Hall ve ark., 1993; Zhong ve ark., 1993) paralellik göstermektedir.

Çimlenen tohumlardan elde edilen fidelerden alınan eksplantlarda yerleştirildikleri ortama bağlı olarak kararma tespit edilmiştir. Yapılan analizler doğrultusunda kararma üzerine BAP dozlarının yanı sıra daha önce de belirtildiği üzere sukroz dozlarının önemli sayılabilecek derecede etkisi olduğu, NAA dozlarının ise eksplantlarda kararma

üzerine tek başına bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Ortamlarda kullanılan sukroz dozlarında görülen artışın kararma oranındaki artışla doğru orantılı olduğu gözlenmiştir. Çünkü şeker zaten eksplant tarafından üretildiğinden, normal şartlarda ortamda şeker fazlalığı oluşmaktadır. Bunun sonucunda da eksplantta kararma görülmektedir. Kararma sonucunda canlılığını kaybeden eksplantlardan ise, herhangi bir gelişim sağlanamamıştır. Kullanılan sukroz dozunun yanı sıra çalışmada yer alan hatlar açısından da kararma değerlendirilecek olursa, M 114 hattına ait eksplantların kararmaya neden olan sukroz dozlarına ÇBM 315 ve ELK 345 hatlarına göre daha hassas oldukları söylenebilir. Nitekim elde edilen sonuçlar bu düşüncüyü doğrulamaktadır. Dolayısıyla çalışmada kullanılan eksplantların canlılığını devam ettirebilmeleri için kullanılan sukroz dozlarının azaltılması gerekmektedir. Yıldız ve ark. (1997) da eksplant kararmasına yönelik yapmış oldukları çalışmalarında, hem ortamda bulunan hem de eksplant tarafından üretilen şeker konsantrasyonunun düşürülmesiyle eksplanttaki kararmanın azaldığı sonucuna ulaşarak çalışmamızla paralellik göstermişlerdir.

Adventif sürgün rejenerasyonu ile ilgili çalışılan 3 pancar hattına ait sonuçlara göre; besin kombinasyonlarında kullanılan dozlar doğru olarak ayarlanmalıdır. Bu çalışma kapsamında hazırlanan besi ortamlarından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde düşük sukroz dozlarında petiol eksplantlarında en yüksek sürgün rejenerasyonu elde ediliyorken; yaprak eksplantlarında uygulanan ortam ve doz değişimlerine rağmen adventif sürgün rejenerasyonu elde edilemediği gözlenmiştir.

Besi ortamlarında kullanılan hormonların bazıları sürgün oluşumunu artırırken bazıları da kök oluşumunu artırıcı özelliklere sahiptirler. Farklı bitki türlerinin en iyi köklendiği büyüme düzenleyicileri (IBA) ve bunların kullanım dozlarının farklı olabileceği Gönülşen (1987) tarafından yapılmış olan çalışmada belirtilmiştir.

Sonuç olarak; besi ortamında kullanılan BAP dozlarının sürgün rejenerasyonunda, NAA dozlarından daha etkili olduğu görülmüştür. Adventif sürgün oluşumunu teşvik eden BAP'ın eksplantlardaki kararmayı ise artırdığı tespit edilmiştir. Kök oluşum aşamasında kullanılan IBA dozlarının ise gelişen genç fidelerde köklenmeyi sağladığı tespit edilmiştir.

Sonuçlar çalışmada kullanılan eksplantlar açısından değerlendirecek olursak; petiol eksplantları yaprak eksplantlarından çok daha fazla sürgün gelişimi göstermişlerdir. Ancak kararma ile ilgili elde edilen sonuçlara baktığımızda yaprak eksplantlarının bileşiminde bulunan sukroz dozunun petiol eksplantlarına oranla kararmada daha etkili olduğu düşünülmektedir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Anonim, 1993. Şeker Pancarı El Kitabı. Kozan Ofset Mat. San. ve Tic. Ltd. Şti., 32 s.
- Anonim, 1997. Türkiye'de Şeker ve Şeker Pancarı Üretiminde Mevcut Durum, Sorunlar ve Çözüm Önerileri. İstanbul Ticaret Odası, İstanbul.
- Anonim, 1998. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Şeker Endüstrisi Agronomi Şubesi, 1997 yılı vejetasyon seyir raporları, Ankara.
- Anonim, 1999. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Şeker Endüstrisi Agronomi Şubesi, 1998 yılı vejetasyon seyir raporları, Ankara.
- Allan, A. 1991. Plant cell culture in: "Plant Cell and Tissue Culture". Stafford, A. and Warren, G. (eds.), Open University Press, UK.
- Burke, J.I., Sullivan, C.F., Finch, I. and Dix, P.J., 1993. Studies of *in vitro* propagation systems for sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Reports, 32, 27-35
- De Bock, Th.S.M. 1986. The genus *Beta*: domestication, taxonomy and interspecific hybridization for plant breeding. Acta Hort. (ISHS) 182: 335-344.
- Detrez, C., Tetu., Sangwan, R.S., Sangwan-Norreel, B.S. 1988. Direct organogenesis from petiol and thin cell layer explants in *Beta vulgaris* L. cultured *in vitro*. Journal of Experimental Botany. 39:917-726
- Fraley, R.T., Horsch, R.B., Rogers, S.G. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Plant Science, 227:1229-1231.
- Gönülşen, N. 1987. Bitki Doku kültürü yöntemleri ve uygulama alanları. Menemen - İzmir
- Hall, R.D., Krens, F.A., Pedersen C. 1993. Petioles as the tissue source for isolation and culture of *Beta vulgaris* and *Beta maritima* protoplasts. Plant Science, 9S: 89-97.
- Jacq, B., Tetu, T., Sangwan, R.S., Laats, A.D., Sangwan-Norreel, B.S. 1992. Plant regeneration from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured *in vitro* and cytometric nuclear DNA analysis of regenerants. Plant Cell Reports,
- Koç, H. 1992. Nişasta ve Şeker Bitkileri Ders Kitabı. Tokat Ziraat Fakültesi Yayınlan. No:48
- Köksoy, N.F. 1995. Tahıllarda doku kültürü çalışmaları üzerine araştırmalar. Seminer notları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yayınları, Ankara.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15(3): 473-497.
- Özcan, S., Babaoğlu, M. 1999. I. Uluslararası Pancar Sempozyumu 11-13 Haziran, Konya
- Raghawa Swamy, B.V., Himabindu, K, Lakshmi Sita, G. 1992. *In vitro* micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). Plant Cell Rep. II: 126-131.
- Ritchie, G.A., Short, K.C., Davey, M.R. 1989. *In vitro* shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Journal of Experimental Botany, 40. 277-283
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G. 1967. Statistical methods. The Iowa State University Press, Iowa, US.
- Toldi, O., Gyulai, G., Kiss, J., Tamas, I.A., Belazs, E., 1996. Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl originated thin-layer explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. Plant Cell Rep. 15: 851-854
- Yıldız, M. 2000. Keten (*Linum usitatissimum* L) bitkisinde adventif sürgün rejenerasyonu ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. Doktora tezi. Fen Bil. Enst. Ank. Univ.
- Yıldız, M., Avcı, M., Özgen, M., 1997. Studies of sterilization and medium preparation techniques in sugarbeet regeneration. 5th. Turk-German Agricultural Research Symposium. 29 Sep.- 4 Oct. Akdeniz Univ. 125-130.
- Zhong, Z., H. G. Smith, and T. H. Thomas. 1993. *In vitro* culture of petioles and intact leaves of Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Growth Regulation, 12: 59-66.