

---

*Araştırma Makalesi / Research Article*

---

## **Soya Fasulyesi (*Glycine max* L. Merrill)'nin Doku Kültüründe Mikroçoğaltımı**

Özlem EFENDİOĞLU<sup>1</sup>, Musa TÜRKER<sup>1</sup>, Fethi Ahmet ÖZDEMİR<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van

<sup>2</sup>Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın

---

### **Özet**

Bu çalışmada soya fasulyesinin (*Glycine max* L. Merrill) Agrova SA88 varyetesi kullanılarak *in vitro* klonal çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan fideler *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş tohumlardan elde edilmiştir. Çimlendirilen fidelerden alınan gövde ucu, boğum, yaprak, petiyol, kök, kotiledon ve hipokotil eksplantları Murashige ve Skoog (MS) ortamında farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) ile muamele edilip, genotipin, kullanılan eksplantın ve bitki büyüme düzenleyicilerinin soya fasulyesinde klonal üretim üzerine etkileri araştırılmıştır. Sitokinin olarak KN (Kinetin) ve t-Z (trans Zeatin)'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonları adventif sürgün rejenerasyonu için uygulanmıştır. Eksplantlara uygulanan BBD'lerden KN'nin 2 ve 3 mg/l konsantrasyonlarında en iyi adventif sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir (3-5 adet). Yaprak, petiyol ve kotiledon eksplantlarında ise t-Z'nin 2 mg/l ve 4 mg/l konsantrasyonu kallus gelişimine neden olmuştur. Adventif sürgünlerin köklendirilmesi için NAA (Naphthalene acetic acid) ve IBA (Indole-3-butyric acid) uygulanmış ve 2 mg/l NAA'nın kök gelişimini uyarmada en etkili BBD olduğu saptanmıştır. Gövde gelişimi ve köklendirilmesi tamamlanmış sürgünler gelişimini devam ettirebilmeleri için BBD içermeyen MS ortamına aktarılmıştır. Olgunlaşan bitkiler daha sonra saksılara transfer edilerek dış koşullara alıştırmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bitki büyüme düzenleyicileri, Soya fasulyesi, Mikroçoğaltım, Bitki doku kültürü.

---

## **Micropropagation of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) In Plant Tissue Culture**

---

### **Abstract**

In this study micropropagation on the Agrova SA88 strain of soybean (*Glycine max* L. Merrill) were carried out. The shoot tip, nod, leaf, petiole, root, cotyledon and hypocotyls explants from seedlings were incubated in Murashige and Skoog (MS) medium with different concentrations and combinations of plant growth regulators (PGR) to investigate the effect of genotype, PGRs and explant on clonal propagation of soybean. As PGRs, cytokinin in different concentration and combination for adventitious shoot regeneration were employed. Among the PGRs applications, KN (Kinetin) was found to be most influential on adventitious shoot regeneration (3-5 buds) of soybean in 2 and 3 mg/l concentration. The t-Z (trans-Zeatin) in 2-4 mg/l concentration gave callus on leaf, petiole and cotyledone. The grown stem on explants were separated and incubated in MS medium with the PGRs of NAA (Naphthalene acetic acid) and IBA (Indole-3-butyric acid) for root development. 2 mg/l NAA was found to be more suitable for root development and the regenerated seedling were transferred PGRs-free MS medium for seedling development and the healthy individuals were transferred to pots and acclimatized.

**Keywords:** Plant growth regulators, Soy bean, Micropropagation, Plant tissue culture

---

\* Sorumlu yazar: [ozdemirfethiahmet23@yahoo.com](mailto:ozdemirfethiahmet23@yahoo.com)

## 1. Giriş

Günümüzde insanoğlunun karşılaştığı en büyük sorun, artan nüfusun beslenmesidir. Bu amaçla kültür bitkilerinin ıslahı üzerinde binlerce yıldan beri çalışılmakla birlikte, ürünlerdeki nicelik ve nitelik artışı, ancak son 50 yılda geliştirilen ıslah yöntemleri ve uygun yetiştirme tekniklerinin modern teknolojiyle birleşmesi sonucunda gerçekleşebilmiştir. Islah edilmiş kültür bitkilerinin, yabancı formlarıyla karşılaştırıldıklarında birçok mantar, bakteri ve virüs hastalıkları ile zararlılara karşı daha duyarlı olduğu, bu durumun genelde uygulanan ıslah yöntemlerinin eksikliğinden kaynaklandığı görülmüştür. Islah programlarında, seleksiyon çalışmalarında ürün kalitesi ve miktarı gibi özellikler ön planda tutulduğundan, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık her zaman ikinci planda kalmıştır [1]. Yıllardan beri bitkiler, hastalık ve zararlıların saldırılarına karşı kimyasal ilaçlarla korunmuş, ancak kullanılan bu ilaçların ayrışmadan uzun süre kalabilmeleri insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından giderek artan bir endişe kaynağı haline gelmiştir. Kimyasal ilaçlar genelde mantarlara karşı etkili olmakla birlikte; virüs ve bakterilere karşı yetersiz kalmaktadır. Bu durum kültür bitkilerini hastalık ve zararlılardan korumak için alternatif ıslah yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır [2].

20. yüzyılın başlarına kadar sınırlı bir üretime sahipken bugün dünyanın en önemli bitkisel protein ve yağ kaynağı haline gelen soya fasulyesi (*Glycine max. L. Merrill*) bitkisinin, böylesine önemli bir tarımsal ürün haline gelmesinde, süreklilik gösteren bir ıslah döngüsü içerisinde mevcut genotiplerin genetik açıdan iyileştirilmesi anahtar rolü oynamıştır. Zengin oranda besin maddeleri içeren tohumları itibarıyla beslenme ve endüstride önemli bir yeri olduğundan birçok ülkede yetiştirilmektedir. Anavatanı Çin ve Mançurya'dır [3]. Dünyada en çok soya fasulyesi yetiştiren ülkeler sırası ile ABD, Çin, Rusya, Brezilya, Endonezya, Kore, Japonya ve Kanada'dır. Avrupa'da Romanya ve Türkiye önemli ölçüde soya yetiştiren ülkelerdendir. Soya, bitki gelişimi, verim ve kalite açısından ekolojik koşullara tepkisi oldukça yüksek olan kültür bitkilerindedir. Özellikle gün uzunluğu, soya çeşitlerinin adaptasyon alanlarını dar bir kuşak içerisine sınırlamaktadır. Yapılan çalışmalarda soya fasulyesinin farklı olgunlaşma grubuna giren çeşitlerin performanslarının bölgelere göre değiştiği gibi bir bölgede aynı olgunlaşma grubu içerisindeki çeşitlerin göstermiş olduğu performansların da farklı olduğu görülmektedir [4]. Soya, önemli bir besin kaynağıdır. Tohumu yüksek oranda ham protein içermektedir. Bu protein, kolay sindirilen proteinlerdendir. En çok cholin, pantothenic asit, niacin, thiamine, riboflavin, inositol, vitamin E, vitamin K içermektedir. Soya A vitamini ve B grubu vitaminlerinin de kaynağıdır [5]. Soyanın beslenme ve yağ eldesi adına önemi, 1940'lara kadar anlaşılabilmiştir. 1940'lardan sonra soya yetiştiriciliği ve genetiği üzerinde Amerika'da yoğun araştırmalar başlatılmıştır [6]. Öyle ki aşırı yağlı besinlerle kolesterol yüklemesi yapan Amerikalılar kurtuluşu soya fasulyesinde aramışlardır. Yapılan araştırmalar ile soya fasulyesinin kolesterolü düşürdüğü, göğüs kanserini önlediği ve kemikleri güçlendirdiği tespit edilmiştir. Soya fasulyesinin vejetasyon süresi yaklaşık olarak 120 gündür [7]. Bu süre kısa zamanda ürün elde etmek isteyenler için oldukça uzun bir süredir. Doku kültürü ortamında bu süre kullanılan yöntemle bağlı olarak 2 aya kadar düşürülebilmektedir. Bu çalışmada ekonomik ve besin değeri yüksek olan soya fasulyesinin klonal üretimi üzerine yoğunlaşarak, en iyi eksplant, ortam ve BBD tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu konuda oldukça önemli sonuçlar ve ipuçları elde edilmiştir. Soya fasulyesinin doku kültüründe klonal üretiminin ekonomik boyutlara ulaşması ve ticari şekle dönüştürülebilmesi için daha yoğun ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada soya fasulyesi bitkisinin Agrova SA88 çeşidi kullanılmıştır. Soya fasulyesi tohumları Adana Tarım İl Müdürlüğünden temin edilmiştir.

### 2.2. Sterilizasyon

Kullanılan petri, erlen gibi cam malzemeler ile pens, bistüri gibi ekipmanlar ve çalışmada kullanılmış olan Murashige ve Skoog, (Duchefa, Netherland) [8] besin ortamı 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C de 20 dakika tutularak sterilizasyonu sağlanmıştır.

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

### 2.3. Büyüme Ortamları ve Kültür Koşulları

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

### 2.4. Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) Merck ve Sigma şirketlerinden temin edilmiştir. BBD'ler uygun çözücülerde çözdürüldükten sonra istenilen miktarda ve oranda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan BBD stok solüsyonları 4 °C'de saklanmıştır.

### 2.5. In Vitro'dan Elde Edilen Soya Fidelerinden Eksplant İzolasyonu

In vitro ortamda steril olarak yetiştirilen 7-15 günlük soya fidelerinden gövde ucu, boğum, hipokotil, kök ve petiyol eksplantları 1 cm uzunluğunda kesilerek rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. 90x15mm steril petri kutularında MS ortamında uygun BBD konsantrasyonları eklenerek 16/8 h ışık/karanlık fotoperiyodun da beyaz floresans ışıklandırmasında iklim dolabında (Fitotron, Sanyo, Gellenkamp PLC, UK) 25±2 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Doku kültürü ile ilgili bütün çalışmalar steril hava akışlı kabin (laminar flow) içerisinde yapılmıştır.

### 2.6. Rejenere Olan Soya Sürgünlerinin Köklendirilmesi

Rejenere olan sürgünler 7-9 cm uzunluğuna geldikten sonra steril cam kavanozlar içinde farklı konsantrasyonlarda IBA ve NAA içeren köklendirme ortamına aktarılmıştır. Burada köklenen sürgünler saksılara aktarıldıktan sonra iklim dolabında çevre şartlarına uyumu sağlanmıştır.

## 3. Bulgular

Bu çalışmada soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merrill) bitkisinin Agrova SA88 çeşidi in vitro ortamda geliştirilmiş. 7-15 günlük fidelerden alınan gövde ucu, boğum, yaprak, hipokotil, kotiledon, kök ve petiyol eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu eksplantlar değişik konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda KN, t-Z içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Uygulanan BBD'nin eksplantlar üzerinde etkilerine bakıldığında Tablo 1'deki sonuçlar gözlenmiştir.

**Tablo1:** Farklı t-Zeatin ve Kinetin konsantrasyonlarının eksplantlarda adventif sürgün gelişimi üzerine etkileri (mg/L)

BBD (mg/L)	Petiyol	Yaprak	Kotiledon	Boğum	Gövde ucu	Hipokotil
2 t-Z	1± 0.70	C	-	2.75±1.71	-	-
4 t-Z	C	-	C	C	C	-
3 KN	-	C	1.75±1.71 K	2.9±2.20 K	2.67± 0.57 C+K	1.5±1.29 K
5 KN	C	-	C	1.75±0.96 C	-	-
6 KN	C	-	-	1±0.82 C	0.75±0.5 C	C

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

C: Kallus K: Köklenme BBD: Bitki büyüme düzenleyicileri



Şekil 1. 3 mg/l KN ortamında kotiledon eksplantının köklenmesi

Gelişim gözlenmiş olan eksplantlar gelişimlerini devam ettirebilmeleri için farklı BBD konsantrasyonları içeren ortamlarda alt kültüre alınmıştır.

*In vitro* şartlarda sürgün rejenerasyonunun sağlandığı besin ortamlarında her zaman köklenmeyi sağlamak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle sürgünlerin köklenmeyi teşvik edici BBD'nin bulunduğu ortamlara transfer edilmesi gerekmektedir. Köklenmeyi teşvik edici olarak IBA'nın 1mg/l ve 2mg/l konsantrasyonları kullanılmıştır[9]. Kullanılan her iki ortamda da birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. NAA'nın sadece 2mg/l konsantrasyonu kullanılmış ve bu konsantrasyondaki sürgünlerde kısa, kalın ve her sürgünde 5'den fazla kök uzamasının olduğu gözlenmiştir. NAA ortamına göre IBA ortamında gelişen köklerin yapısı daha ince ve az sayıdadır.



Şekil 2. Adventif sürgünlerden kök gelişimi

Çalışma sonrasında köklenen fideler BBD içermeyen MS ortamına aktarılarak fidelerin belirli bir büyüklüğe gelmeleri sağlanmıştır (Şekil 3). Belirli bir büyüklüğe ulaşan fideler 3:1 oranında toprak:kum içeren saksılara dikilerek ortama uyumları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. Köklenen soya fidelerinin BBD içermeyen MS ortamında rejenerasyonu

#### 4. Tartışma

İnsanların beslenmesi yönünden önem taşıyan bitkilerin, verimini, hastalık ve zararlılara karşı dirençlerini arttırmak amacı ile gerçekleştirilen klasik ıslah metotlarının yanı sıra günümüzde doku kültürü ve biyoteknoloji sayesinde her yönü ile istenen özelliklere sahip bitki türlerinin üretimi çok daha kısa sürelerde ve kontrollü koşullarda elde edilerek bu bitkilerin doğa koşullarına uygun hale getirilmesi mümkündür. Bugüne kadar *in vitro* şartlar altında yapılan çalışmalar sırasında soya fasulyesi bitkisinin çok farklı çeşitleri kullanılarak bunların rejenerasyon kapasiteleri, somatik embriyogenez, organogenez gibi alanlarda denemeler gerçekleştirilmiştir. Klonal üretime yönelik soya fasulyesi ile çalışmalar fazla olmadığı için bu çalışmamızda soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merrill) bitkisinin Agrova SA88 çeşidinin doku kültürü ortamında farklı BBD konsantrasyon ve kombinasyonları ile gövde ucu, boğum, hipokotil, kotiledon, yaprak, petiyol ve kök eksplantları kullanılarak adventif sürgün rejenerasyonu ve bu adventif sürgünlerin köklendirilmesi üzerine denemeler yapılmıştır.

*In vitro* şartlarda yetiştirilen fidelere ait gövde ucu, boğum, hipokotil, kotiledon, yaprak, petiyol ve kök eksplantları bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlar ve kombinasyonları şeklinde desteklenen besi ortamlarında inkübe edilmiştir. Bu ortamlar vasıtası ile adventif sürgün oluşturma potansiyelleri arttırılmıştır. En verimli ortam ve eksplant hakkında bir genelleme yapılması gerekirse şu sonuçlar ortaya çıkmaktadır. 3 mg/l KN destekli MS hemen hemen bütün eksplantlar için klonal üretim bakımından en verimli ortamdır. Kinetin sentetik bir sitokinin türevi olup sitokininlerin genel etkileri olan sürgün gelişimini teşvik etmesi beklenen bir sonuçtur [10]. Petiyol, yaprak ve kök eksplantları sürgün ve kök gelişiminde olumsuz sonuçlar vermişlerdir. Petiyol ve yaprak eksplantında kısmen kallus gözlenirse de kök eksplantında hiçbir gelişme gözlenmemiştir. Özellikle boğum ve gövde ucu eksplantı çok iyi adventif sürgün oluşturmuştur. Her ne kadar bitkisel hormonlar farklılaşmış bölünme yeteneğini kaybetmiş hücrelere yeniden bölünme özelliği kazandırsa da meristematik hücreler içermesi bakımından gövde ucu, sürgün ve kök gelişiminde en verimli eksplant olarak rapor edilmiştir [11]. BBD konsantrasyonları ve kombinasyonları, fiziksel şartlar ve bitkilerin genotipinin yanında eksplantların hasat edilip ana bitkiden ilişkisinin kesilmesi ve kültür ortamına alınması esnasında içerdikleri endojen BBD lerin metabolizmadaki görevleri göz önünde bulundurulduğunda özellikle sitokininlerin, kısmen oksinlerin ve bu iki büyüme düzenleyicisinin etkileşimlerinin adventif sürgün oluşumu üzerine en etkili maddeler oldukları görülmektedir [12].

Uygulamalarımızda kinetin ile yapılan çalışmalardan olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Kinetinin de yine farklı konsantrasyonları kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre en verimli ortamın 3 mg/l KN destekli MS olduğu tespit edilmiştir. Bunu 2 mg/l KN konsantrasyonu takip etmiştir. 4 mg/l KN, 5 mg/l KN, 6mg/l KN ile yapılan çalışmalarda verimin konsantrasyon artışına paralel olarak düştüğü ve çoğunlukla kallus oluştuğu gözlenmiştir. 2 mg/l KN ve 3 mg/l KN ortamlarında adventif kök gelişimi ve kallus oluşumu gözlenmiştir. KN konsantrasyonu arttıkça adventif sürgün patlamasının azalması genotip veya dolaylı olarak KN nin sürgün oluşumu sürecindeki büyüme baskılayan diğer hormonlarla antagonist etkileşimini akla getirmektedir [13].

t-Z ile yapılan çalışmalarda çok fazla verim elde edilememiştir. t-Z nin en verimli konsantrasyonu 2mg/l dir. 4 mg/l t-Z ortamındaki bütün eksplantlarda kallus gözlenmiştir. t-Z nin bütün konsantrasyonlarında yoğun bir şekilde kallus oluşmuştur. t-Z tabii bir sitokinidir ve sitokinlerin genel etkileri bu çalışmada t-Z üzerinde gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlu t-Z daha çok oksinler gibi davranarak kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Zaten t-Z'nin adventif sürgün oluşumundan ziyade kallus ve indirekt somatik embriyo gelişimini teşvik ettiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir [14].

Elde edilen eksplantların köklendirilmesi için hazırlanan IBA lı ortamların adventif sürgün oluşumunu teşvik ettiğinin gözlenmesi üzerine başlangıçta IBA nın farklı konsantrasyonlarını içeren ortamlar hazırlanarak eksplantlar bu ortamlarda inkübe edilmiştir. Fakat daha sonraki çalışmalarda köklendirmede 2 mg/l NAA konsantrasyonunun çok iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. NAA nın sadece 2mg/l konsantrasyonu ile çalışmalara devam edilmiştir. Oksinlerin köklenmeyi teşvik ettiği bilinen bir gerçektir [13]. Ancak bu çalışmada oksin tek başına köklendirmede başarılı olmuştur. Bu ortamda gelişen soya fasulyesi fideleri saksılara transfer edilmiştir. İklimlendirme dolabında belli bir büyüklüğe getirilerek daha sonra bitkinin normal şartlara adaptasyonu sağlanmıştır. Bu bitkiler çiçeklenme aşamasına kadar büyütülmüştür.

## Kaynaklar

1. Özcan S., Özgen M. 1996. Bitki Genetik Mühendisliği, Kükem dergisi, 1(1): 69-95.
2. Akı C. 1997. *Capsicum Annum* L. nin Bazı Varyeteleri Üzerinde Doku Kültürü Çalışmaları. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, İzmir.
3. Markley S. K. 1950. Soybeans and Soybean Products, Vol. 1, New York, USA. P, 15-210.
4. İşler N., Çalışkan M. E. 1998. GAP Bölgesi Ekolojik Koşullarında Soyada (*Glycine max. L. Merrill*) Verim ve Verime Etkili Bazı Özelliklerin Korelasyonu ve Path Analizi, Tr. J. Of Agriculture and Forestry, 22: 1-5.
5. Shurpalekar S. A. 1961. Chemical Composition and Nutritive Value of Soybeans and Soybeans Products. Soybeans Concil of America, International Office.11(2): 7-12. Roma.
6. Fehr W. R. 1987. Breeding Methods for Cultivar Development in B. E. Caldwell (Ed) soybeans. Improvement, production and uses, Agronomy, 16: 249-294.
7. Yılmaz H. A., Efe L. 1998. Bazı Soya (*Glycine max. L. Merrill*) Çeşitlerinin Kahramanmaraş Koşullarında 2. Ürün Olarak Yetiştirilebilme Olanakları, Tr. J. Of Agriculture and Forestry, 22:135-142.
8. Murashige T., Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
9. Ma H. H., Wu T. L. 2008. Rapid and Efficient Regeneration in Soybean [*Glycine max. L. Merrill*] from Cotyldenary Node Explants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(2): 209-216.
10. Lincoln T., Eduardo Z. 2008. Bitki Fizyolojisi 3. Baskıdan tercüme, Palme yayıncılık, 493-515s, Ankara.
11. Özgen M., Özcan S., Sevimay C. S., Sancak C., Yıldız M. 1998. High Frequency Adventitious Shoot Regeneration in Sainfoin, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 42: 205-208.
12. Mariashibu T. S., Anbazhagan V. R., Jiang S.Y., Ganapathi A., Ramachandan S. 2013. In Vitro Regeneration and Genetic Transformation of Soybean, Edited by James E. Board, Published: January 2.
13. Kadioğlu A. 2004. Bitki Fizyolojisi, Eser ofset matbacılık, 258-317s, Trabzon.
14. Halperin W., Wetherell D. F. 1965. Ammonium Requirement for Somatic Embryogenesis in Vitro, *Nature*, 205: 519-520.