

## Bezelye (*Pisum sativum* L.) Bitkisinin Organogenez Yöntemi ile Rejenerasyonu

Dilek TEKDAL<sup>1\*</sup>

<sup>\*</sup>Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, 33343, Mersin

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-4545-9005>

<sup>\*</sup>Sorumlu yazar: dilektekdal@mersin.edu.tr

### Araştırma Makalesi

#### Makele Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 12 Haziran 2020

Kabul tarihi: 4 Ağustos 2020

Online Yayınlanma: 15 Aralık 2020

#### Anahtar Kelimeler:

Baklagiller

Bezelye

Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Mikroçoğaltım

### ÖZET

Bitki hücre, doku ve organ kültürü yöntemlerinin kullanılması bitki klonal çoğaltımı için önemli olduğu kadar ileri moleküler tekniklerde uygulanan genetik manipülasyonları için de önemlidir. Bu çalışmada, insan besin gıdaları içerisinde önemli yer tutan ve yüksek protein içeriğine sahip baklagiller ailesinden bezelye bitkisinin mikro çoğaltımı üzerine farklı besin ortamı (MS ve B5) ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin (NAA, GA<sub>3</sub> ve Kinetin) etkisi çalışılmıştır. Bitkisel materyal olarak bezelye bitkisinin (*Pisum sativum* L.) ovül eksplantları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda en iyi kallus oluşum oranı (%80) Kinetin (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren MS besin ortamından sağlanmıştır.

## Regeneration of Pea Plants by Organogenesis

### Research Article

#### History:

Received: 12 June 2020

Accept: 4 August 2020

Available online: 15 December 2020

#### Keywords:

Fabaceae

Pea

Plant Growth Regulators

Micropropagation

### ABSTRACT

The use of plant cell, tissue, and organ culture methods is essential for plant clonal propagation as well as genetic manipulations applied in advanced molecular techniques. In this study, the effects of two nutritional media (MS and B5) and different plant growth regulators (NAA, GA<sub>3</sub>, and Kinetin) on the micropropagation of pea plants from the family of legumes, which have an important in edible foods and have high protein content, were studied. Pea plant (*Pisum sativum* L.) ovule explants were used as research material. As a result of the study, the best callus formation rate (80%) was obtained from MS medium containing Kinetin (1 mg L<sup>-1</sup>) and GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>).

**To Cite:** Tekdal D. Bezelye (*Pisum sativum* L.) Bitkisinin Organogenez Yöntemi ile Rejenerasyonu. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2020; 3(2): 103-107.

## 1. Giriş

Baklagiller (Fabaceae) yüksek oranda protein içermeleri ve kuru danelerinin sindirilebilirlik derecesinin yüksek olması nedeniyle bitkisel üretimde önemli yer tutmaktadır [1]. Ayrıca, baklagil ailesi üyeleri demir, fosfor, kalsiyum ve potasyum minerallerince ve B vitaminince zengin içeriğe sahiptir [2]. Bu özellikler sebebiyle baklagiller insan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır.

*Pisum sativum* L. (bezelye) baklagiller familyasına ait bir tür olup *Pisum* cinsi içerisinde yer almaktadır ve kültürü yapılmaktadır. Bezelye, diploid ( $2n=2x=14$ ), kendine döllen, tek yıllık ve otsudur [3]. Bezelyenin insan besin gıdasından, dondurulmuş ürün ve işlenmiş konserve olarak geniş yelpazede kullanım alanı mevcuttur. Ayrıca, bezelye, hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır. Dünya üzerinde bezelye 2.743,867 ha taze sebze ve 7.878,051 ha kuru dane olarak ekim alanına sahiptir. Dünyada bezelyenin kuru dane üretim miktarı 13.534,166 ton olup, 3.580,700 ton kuru

dane üretimi ile Kanada ilk sırada yer almaktadır. Bununla beraber, dünya genelinde bezelyenin taze sebze olarak üretimi 21.225,579 ton olup, 12.960,844 ton ile Çin ilk sırada yer almaktadır. Türkiye’de 970 ha alanda kuru bezelye, 109.017 ha alanda ise taze bezelye yetiştirilerek sırasıyla 2,603 ton kuru, 107,344 tonluk taze üretim sağlanmıştır [4]. Bu verilerden görüleceği üzere ülkemizde bezelyenin süt olum döneminde yeşil tanelerinin üretimi daha yüksektir. Ülkemizde 2011 yılında 13,048 ha ekim alanı ve 3,628 ton üretim miktarı bulunan kuru bezelyenin 2019 yılı verilerine göre ekim alanının 7,813 ha ekim alanına ve üretiminin ise 2,193 tona gerilediği görülmektedir [5]. Bezelye üretiminin tekrar arttırılabilmesi için verimi yüksek yeni çeşitlerin geliştirilmesi önemli görülmektedir. Tescilli bezelye çeşit sayısı çok az olup, ülkemizde ıslah yolu ile geliştirilen 1 adet çeşidin olduğu bilinmektedir [6].

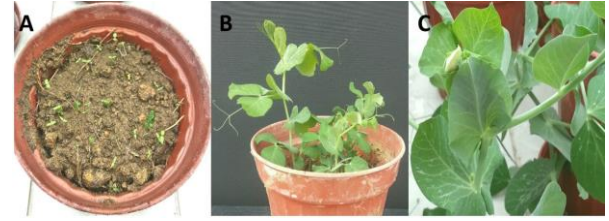
Islah çalışmalarında doku kültürü tekniklerinden sıklıkla faydalanılmaktadır. Bitki doku kültürü, aseptik koşullarda, bitki hücre, doku ve organlarının yapay ortamlar üzerinde kültüre alınarak yeni bir bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir [7]. Bitki doku kültürü, kısa sürede klonal çoğaltımı sağlaması, ucuz iş gücü ve düşük maliyeti nedeniyle tercih edilmektedir. Mikroçoğaltım tekniklerinden birisi olan organogenez, bir bitkinin yaprak, kök, gövde, sürgün gibi yapılarının *in vitro* ortamda başka bir doku veya organa farklılaştırılmasıdır [8]. Bezelye gibi tarımsal alanda ticari önemi olan bitkinin ıslah çalışmalarında yeni çeşitlerinin sektöre kazandırılması için doku kültürü tekniklerinin işlevselliği önemli olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, bezelyede organogenez aracılığıyla bitki rejenerasyonunu sağlamak ve en uygun rejenerasyon protokolünü belirlemektir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Bitkisel Materyal

Araştırmada, Adana ve çevresindeki yerel üreticilerden temin edilen bezelye tohumları kullanılmıştır. Bitki tohumları torf:perlit (1:1) içeren 1,5 L’lik saksılara dikilerek sera şartlarında kültüre alınmıştır (30 °C; 2-11 MJ m<sup>-2</sup> gün<sup>-1</sup>) (Şekil 1). Bitkiler yaz aylarında haftada 3 defa çeşme suyu ile sulanmış ve aşırı sıcaklardan korumak amacıyla serada gölgelendirme yapılmıştır.



**Şekil 1.** Serada büyütülen bezelye bitkilerinin görüntüleri; (A) tohum ekimini takip eden 1. haftada çimlenen bitkilerin görüntüsü, (B) gelişen bitkilerin 1. aydaki görüntüleri, (C) bitkilerin çiçek durumlarının görüntüsü

### 2.2. Yüzey Sterilizasyonu

Bitki çiçek tomurcukları bitkinin çiçeklenme dönemine göre antezisten 2-3 gün öncesinde toplanmış ve yüzey sterilizasyonu için vakit kaybedilmeden laboratuvara getirilmiştir. Toplanan bitki çiçek tomurcukları öncelikle toz ve toprak gibi kontaminantların uzaklaştırılması amacıyla 30 dakika boyunca çeşme suyu altında bekletilmiştir. Çeşme suyunda yıkama sonrası, bezelyeye ait çiçek tomurcukları 2 damla %2’lik tween 20 içeren %20’lik sodyum hipoklorit (NaOCl) içerisinde çalkalanarak 15 dakika bekletilmiştir. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen eksplantlardan sodyum hipokloritin uzaklaştırılması amacıyla örnekler 3 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Çalışma, steril koşulların oluşturulması amacıyla laminar akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

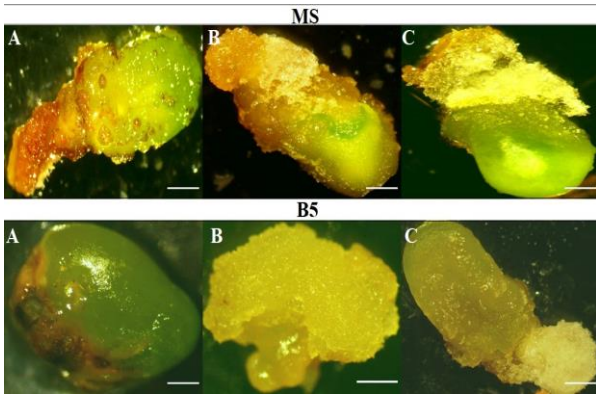
### 2.3. Rejenerasyon

Besin ortamı olarak farklı bitki büyüme düzenleyicileri (Naphthalene acetic acide (NAA, C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>); 6-furfurylaminopurine (Kinetin, C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>); Giberellic acide (GA<sub>3</sub>, C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>) içeren MS [9] ve B5 [10] temel ortam bileşimi kullanılmıştır. Eksplant kaynağı olarak olgun çiçek tomurcuklarından izole edilen ovül örnekleri kullanılmıştır. Farklı besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin rejenerasyon üzerine etkilerini araştırmak için Kinetin (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) ile NAA (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren MS ve B5 besin ortamları kullanılmıştır. Her besin ortamı 3 tekrarlı ve her tekrarda 5 adet örnek olacak şekilde çalışma planı oluşturulmuştur. Örnekler 25±1 °C ve 16 saat fotoperiyot (30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> floresan beyaz ışık) koşullarında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan örneklerin gelişimleri haftalık olarak gözlenmiştir ve kallus oluşumu görülen örnekler stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) ile incelenmiştir. *In vitro* kültürde sürgünleri

geliştirilmiş olan eksplantlar, yeterli bitki sayısına ulaşıncaya kadar 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Rejenerasyon oranı kültüre alınan toplam eksplantlardan gelişenlerin yüzdesi alınarak belirlenmiştir.

### 3. Bulgular

Bezelyede (*Pisum sativum* L.) rejenerasyon optimizasyonunu sağlamak amacıyla Kinetin ve GA<sub>3</sub> ile NAA ve GA<sub>3</sub> içeren MS ve B5 besin ortamları denenmiş ve ovül eksplantlarının gözlemleri kültüre alındıktan sonra haftalık olarak yapılmıştır. Herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besin ortamında kültüre alınan kontrol grubu hariç kültüre alınan diğer örneklerde 2. haftadan itibaren kallus oluşumu gözlenmiştir (Şekil 2). Eksplantlardan en iyi kallus gelişimi %80 rejenerasyon oranıyla Kinetin (1 mg mL<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren MS ortamında olmuştur (Tablo 1).



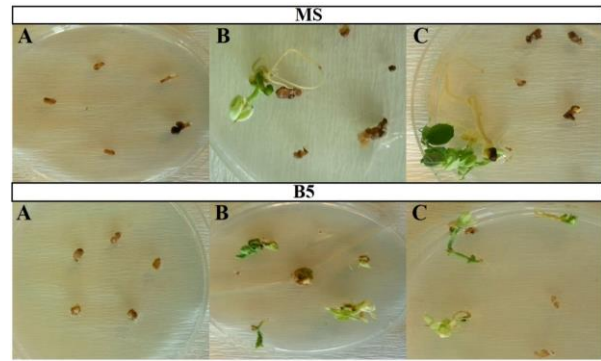
**Şekil 2.** Kultüre alınan bezelye bitkisine ait ovül örneklerinin 2. haftadaki stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) ile yapılan gözlem sonuçları; (A) Kontrol (bitki büyüme düzenleyici içermeyen besin ortamı), (B) Kinetin (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren besin ortamı, (C) NAA (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren besin ortamı (büyütme: 1.2x; ölçek çubuğu 200 µm), MS ve B5 deneme planında eş zamanlı kullanılan besin ortamlarıdır

**Tablo 1.** *Pisum sativum* L. türünde besin ortamı-hormon interaksiyonunun kallus gelişim oranına etkisi

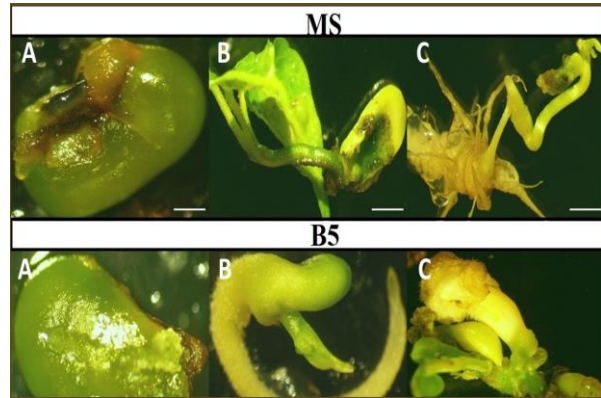
Ortam-Hormon Konsantrasyonu	Kallus Gelişim Oranı (%)
MS + Kinetin (1 mg L <sup>-1</sup> ) + GA <sub>3</sub> (1 mg L <sup>-1</sup> )	80
MS + NAA (1 mg L <sup>-1</sup> ) + GA <sub>3</sub> (1 mg L <sup>-1</sup> )	60
B5 + Kinetin (1 mg L <sup>-1</sup> ) + GA <sub>3</sub> (1 mg L <sup>-1</sup> )	70
B5 + NAA (1 mg L <sup>-1</sup> ) + GA <sub>3</sub> (1 mg L <sup>-1</sup> )	55

Kontrol grubu hariç kültüre alınan diğer örneklerde 4. haftadan itibaren kallus

dokularından sürgün oluşumunun geliştiği gözlenmiştir (Şekil 3 ve 4).



**Şekil 3.** Kultüre alınan bezelye bitkisine ait ovül örneklerinin 4. haftadaki genel görünüşleri; (A) Kontrol (bitki büyüme düzenleyici içermeyen besin ortamı), (B) Kinetin (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren besin ortamı, (C) NAA (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren besin ortamı, MS ve B5 deneme planında eş zamanlı kullanılan besin ortamlarıdır



**Şekil 4.** Kultüre alınan bezelye bitkisine ait ovül örneklerinin 4. haftadaki stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) ile yapılan gözlem sonuçları; (A) Kontrol (bitki büyüme düzenleyici içermeyen besin ortamı), (B) Kinetin (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren besin ortamı, (C) NAA (1 mg L<sup>-1</sup>) ve GA<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup>) içeren besin ortamı (büyütme: 1.2x; ölçek çubuğu 200 µm), MS ve B5 deneme planında eş zamanlı kullanılan besin ortamlarıdır

Çalışma kapsamında ayrıca gelişen kallusların morfolojik yapıları gözlemlenmiştir. *P. sativum* türüne ait ovül örneklerinde MS ve B5 ortamlarının her ikisinde de gerçekleştirilen kültür denemesinde değişen oranlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Gözlem sonucunda, MS ortamında gelişen kallus dokusunun B5 besin ortamında oluşan kalluslara göre daha yumuşak ve kırılğan olduğu ve kallus renginin ise rejenerasyonun ilerleyen aşamalarında kahverengine döndüğü gözlenmiştir (Şekil 2). Bununla beraber, B5 besin ortamında gelişen kallus dokusunun ise kompakt ve sert, ayrıca kallusların renginin şeffaf-sarımsı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, farklı yapıdaki

kalluslarda sürgün gelişiminin olduğu gözlenmiş (Şekil 4).

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Doku kültürünün en önemli bileşenlerinden biri bitki büyüme düzenleyicileridir. Bir sitokin olan kinetin hücre bölünmesi, bitki rejenerasyonu ve yeniden farklılaşmada etkilidir. Sentetik oksinler arasında yer alan NAA somatik embriyo oluşumunun uyarılması, hücrenin gelişimi ve kallus oluşumu üzerine etkilidir. GA<sub>3</sub> embriyo ve ovül kültüründe sıklıkla kullanılmakta olup kallus gelişimi ve organogenezde etkilidir [7].

In vitro çoğaltım amacıyla seçilen doku kültürü tekniğinin ıslah çalışmaları için uygun olup olmadıklarının belirlenmesinde kültüre alınan eksplant örneğinden embriyo gelişiminin olup olmadığı önemli bir kıstastır. Bu nedenle, doku kültürü çalışmasında seçilen doku tipi, kültür koşulları ve besin ortamı bileşenleri önemlidir [9]. Sunulan çalışmada, denenen her iki besin ortamında da (MS ve B5) *P. sativum* ovüllerinden kallus gelişimi ve sürgün oluşumu gerçekleşmiştir (Şekil 4). Eksplant kaynağının fizyolojik durumu ve genetik yapısı in vitro çoğaltımda kullanılan bitki düzenleyicilerinin absorbe edilmesini ve böylece kallus uyartımının oluşmasını etkilemektedir [11]. Sunulan çalışmada, *P. sativum* ovülleri biktisel materyal olarak kullanılmış olup denemede kullanılan ortam-hormon interaksiyonunun *P. sativum* ovül eksplantlarında kallus gelişim oranına etkisi Tablo 1’de verilmiştir. MS besin ortamında B5 besin ortamına göre daha yüksek oranda kallus oluşumu gözlenmiştir. MS besin ortamının amonyum konsantrasyonu B5 besin ortamına göre daha yüksektir. Bu durum, neden MS besin ortamında daha yüksek oranda kallus oluşumunun gerçekleştiğinin açıklaması olabilir.

Sunulan çalışmada, gelişen kallus yapıları da incelenmiş olup farklı renk ve yapıda kallusların oluştuğu gözlenmiştir. Bununla beraber, gelişen kallus dokularından sürgünlerin oluştuğu gözlenmiştir. Bu nedenle, kallus yapılarının sürgün rejenerasyonu üzerine negatif yönde bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Benzer görüş, Schween ve Schwenkel [12] ve Winkelmann ve Serek [13] çalışmalarında da ifade edilmiştir.

Her bitki, tür, çeşit ve genotip için in vitro çoğaltımda farklı doku kültürü protokolleri gerekmektedir. Doku kültürü protokolü belirlenirken, çalışılan bitkinin eksplant

parçasından (yaprak, kök, gövde, sürgün, anter, ovül, ovaryum vs.) besin ortamının kompozisyonu önemli kıstaslar arasındadır. Sunulan çalışma kapsamında, bezelye bitkisi ovül örneklerden kallus uyartımı ve sürgün rejenerasyonu başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir.

#### Kaynakça

- [1] Çiftçi CY. Dünyada ve Türkiye’de yemelik tane baklagiller tarımı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Yayınlar Dizisi No: 5 2004.
- [2] Pekşen E., Artık C. Antinutritional factors and nutritive values of food grain legumes, The Journal of Agricultural Faculty of Ondokuz Mayıs University 2005; 20(2): 111-121.
- [3] Hofer J., Turner L., Hellens R., Ambrose M., Matthews P., Michael A., Ellis, N. UNIFOLIATA regulates leaf and flower morphogenesis in pea, Current Biology 1997; 7(8): 581-587.
- [4] FAOSTAT. Crops. 2016. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Son erişim tarihi: 03 Haziran 2020.
- [5] TÜİK. Kuru Baklagiller. 2019. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001) Son erişim tarihi: 03 Haziran 2020.
- [6] Karayel R., Bozoğlu H. Türkiye’nin farklı bölgelerinden toplanan yerel bezelye populasyonunun bazı agronomik özellikleri. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 2008; 23(1): 32-38.
- [7] Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. Bitki biyoteknolojisi, doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları 2001.
- [8] Chawla HS. Introduction to plant biotechnology, 2nd ed. USA: Science Publisher INC; 2004.
- [9] Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 1962; 15: 473-497.
- [10] Gamborg OL., Murashige T., Thorpe TA., Vasil IK. Plant tissue culture media, In

Vitro Cellular and Developmental Biology-  
Plant 1976; 12: 473-478.

- [11] Sharma G., Nautiyal AR. Influence of explants type and plant growth regulators on in vitro multiple shoots regeneration of a Laurel from Himalaya, Nature and Science 2009; 7(9):1-7.
- [12] Schween G., Schwenkel HG. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp. Plant Cell Tissue and Organ Culture 2003; 72: 53-61.
- [13] Winkelmann T., Serek M. Genotypic differences in callus formation and regeneration of somatic embryos in *Cyclamen persicum* Mill. Euphytica 2005; 144: 109-117.