

**FASULYEDE (*Phaseolus Vulgaris* L.) IN VİTRO KOŞULLARDA
HAPLOİD BİTKİ ELDE ETME OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI KÜÇÜKRECEP

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
OCAK- 2022**

**FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris* L.) IN VİTRO KOŞULLARDA
HAPLOİD BİTKİ ELDE ETME OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLI KÜÇÜKRECEP

ORCID ID: 0000-0003-4287-4008

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Dilek TEKDAL
ORCID ID: 0000-0002-4545-9005**

**MERSİN
OCAK- 2022**

ÖZET

FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris* L.) IN VİTRO KOŞULLARDA HAPLOİD BİTKİ ELDE ETME OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Fasulyede doku kültürü ile haplod bitki üretiminin uygulanabilir protokollerinin geliştirilmesi özellikle çeşit geliştirme çalışmalarını hızlandıracaktır. Bu amaçla, bu tez kapsamında fasulyede erkek gametten haploid bitki eldesi (androgenesis) yönteminin uygulanabilirliği araştırılmış ve anter kültüründe genotip, besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının haploid bitki rejenerasyonuna etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bitkisel materyal olarak Akman, Bitlis-76, Bitlis-117, Göksun, Göynük, Hakkari-12, Karacaşehir, Önceler, Tunceli-1, Van-59, Barbunya ve Leklek fasulye genotipleri kullanılmıştır. Anter kültürü çalışmalarında farklı oksin ve sitokinin içeriğine sahip, 24 adet B5 ve 24 adet MS besi ortamı olmak üzere toplamda 48 adet besi ortamı denenmiştir. Kültür ortamında oksin kaynağı olarak 2,4-D, sitokinin kaynağı olarak ise kinetin kullanılmış ve ilave olarak antioksidan özelliğinin etkisini araştırmak amacıyla aktif kömür ilave edilen besi ortamları da test edilmiştir. Çalışmanın tarla denemeleri Mersin Üniversitesi Peyzaj Planlama Şube Müdürlüğü'ne ait sera alanında, doku kültürü çalışmaları ise Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda, 2019-2021 yılları arasında yürütülmüştür. Anter kültür denemeleri öncesi her genotip için sitolojik ve histolojik analizler yapılarak uygun tomurcuk büyüklüğü ve tek çekirdekli mikrospor evresi tespit edilmiştir. Sera koşullarında yetişen 12 fasulye genotipine ait uygun büyüklükteki tomurcuklara, +4°C de 2 gün süre ile ön soğuk uygulama yapılmış ve bu tomurcuklardan izole edilen anterler, oksin (2,4-D; 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg L⁻¹), sitokinin (kinetin; 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 mg L⁻¹) ve aktif karbonun (0, 0.5, 1 mg L⁻¹) farklı kombinasyon ve konsantrasyonları ile modifiye edilen MS ve B5 kültür ortamlarında kültüre alınmıştır. Kallus elde edilen genotipler ve besi ortamları kaydedilerek, genotiplerin androgenez yetenekleri ile besi ortamlarının seçilen genotiplerde kallus oluşumunu teşvik etme oranları karşılaştırılmış ve kallus indüksiyon oranı hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda seçilen tüm genotiplerde başarı ile embriyogenik kallus elde edilmiştir. En yüksek kallus indüksiyonu 2.5 mg L⁻¹ Kinetin ve 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D içeren B5 besi ortamından elde edilmiştir. Embriyogenik kallus oluşumu bakımından genotipler arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar saptanırken, "Göynük" çeşidinin yüksek kallus indüksiyon oranı ile test edilen diğer genotipler arasında öne çıktığı görülmüştür. Çalışma sonucunda anterlerden gelişen embriyogenik kalluslardan sadece barbunya genotiptinden 1 adet sürgün rejenerasyonu elde edilmiş, elde edilen sürgün ve kallusların ploidi düzeyleri flow sitometri analizi ile belirlenmiştir. Kültürde gelişen örneklerde spontan katlanma olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Phaseolus vulgaris*, anter, haploid, oksin, sitokinin.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi, Dilek Tekdal, Mersin Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

THE RESEARCH ON THE POSSIBILITIES OF OBTAINING HAPLOID PLANT IN COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) UNDER IN VITRO CONDITIONS

Developing applicable protocol of haploid plant production through tissue culture will accelerate the cultivar development in common bean. For this purpose, In this research the applicability of anther culture in beans, one of the methods of obtaining haploid plants from male gametes (androgenesis) in beans, was investigated. In the study, effects of genotype, basic nutrient medium and its plant growth regulator content on the haploid plant regeneration from anthers of common bean were studied. Akman, Bitlis-76, Bitlis-117, Göksun, Göynük, Hakkâri-12, Karacaşehir, Önceler, Tunceli-1, Van-59, Barbunya and Leklek varieties were used as plant material. In anther culture study, a total of 48 nutrient media combinations with different auxin and cytokinin contents of B5 and MS media were tested. In the culture medium, 2,4-D as auxin source and kinetin was used as a cytokinin source, and in order to investigate the effect of its antioxidant properties, nutrient media with activated charcoal were also tested. Donor plants for the anther culture were grown in the greenhouse of Mersin University Landscape Planning Branch Directorate, and tissue culture studies were carried out in the Faculty of Science and Letters, Biotechnology Department, Plant Biotechnology Laboratory between 2019-2021. The buds of 12 bean genotypes grown in greenhouse conditions were treated with 4 °C-cold for four days. Cytological and histological analyzes were performed for each genotype, and appropriate bud size and microspore stage were determined. After the determination of the appropriate microspore stage, the anthers isolated from the buds of the donor plants were culture on the media combinations of Ms and B5 with auxin (2,4-D; 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg L⁻¹), cytokinin (kinetin; 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 mg L⁻¹) and activated carbon (0, 0.5, 1 mg L⁻¹). As a result of the study, embryogenic callus was successfully obtained in all selected genotypes. Anther samples cultured in MS and B5 nutrient media were comparatively analyzed for each genotype and tested nutrient medium. According to the analysis results, the best callus induction was obtained from the B5 nutrient medium containing 2.5 mg L⁻¹ kinetin and 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D in the anther culture experiment. While significant differences were detected between genotypes in terms of embryonic callus formation, it was observed that the "Göynük" variety stood out among the other tested genotypes with its high callus induction rate. As a result of the study, shoot regeneration was obtained from embryonic calli developed from anthers, and ploidy levels of shoots and calli were determined.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, anther, haploid, auxin, cytokinin.

Advisor: Asst. Prof., Dilek Tekdal, Department of Biotechnology, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve lisansüstü eğitim-öğretimim süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden geleni sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı bildiğim kıymetli Danışman Hocam Sayın Dr. Dilek TEKDAL'a

Çalışmam boyunca elde ettiğim bulguları kıymetli zamanını ayırarak değerlendiren, kıymetli bilgileri ile beni her konuda aydınlatan ve istatistik analizlerimi gerçekleştiren kıymetli hocam Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU'na

Tez komitemde yer alarak ayırdığı zaman ve katkılarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Yüksel KELEŞ'e

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım, samimiyetleri ile iyi kötü her anıma yürekten ortak olan ve dostluklarıyla bana her zaman güç veren değerli arkadaşlarım İlknur AKÇA ve Şükran YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Isaac Newton'un da dediği gibi biz bilim insanları kumsalda çakıl taşları arayan çocuklar gibiyizdir. Eğer ben, arkadaşlarımdan biraz daha fazla, biraz daha renkli çakıl taşları toplayabildiysem bunun nedeni dizlerime kadar suya girmeye cesaret edebilmiş olmamdır. Bana doğduğum günden bu yana her zaman suya girme cesaretini veren, her koşulda elimden tutan ve varlığını her zaman hissettiğim canım babam Murat KILIÇ'a teşekkür ederim.

Bilim evrene durmaksızın sorular sorup o soruların potansiyel cevaplarını deney ve gözlem yolu ile alma prensibine dayalıdır. Biliyorum ki hata yapmıyorsan, bilim yapmıyorsun demektir. Eğer yaptığın hataları düzeltmiyorsan, kesinlikle bilim yapmıyorsun demektir. Var olduğum andan bugüne kadar sorduğum her soruya sabırla cevap veren, yaptığım her hatayı telafi etmem için elimden tutarak yanımda olan canım annem Pakize ÇINARLI'ya teşekkür ederim.

Carl Sagan: "Johannes Kepler, kendisinin yaptığı son derece hassas gözlemlerin, uzun yıllardır beslediği inançları ile uyuşmadığını gördüğünde, rahatsız edici olan gerçekleri kabul etti. Zorlu gerçeği, en kıymetli hayallerine tercih etti. Bilimin kalbinde yatan budur. "Diyerek bilimin özünü tarif etmiştir. Kendimde memnun olmadığım her şeyi tıpkı Johannes Kepler gibi kabul etmemi sağlayarak, bunları değiştirmem için bana güç veren hayattaki en büyük şansım eşim Anıl KÜÇÜKRECEP ve değerli KÜÇÜKRECEP ailesine minnettarım.

Sigmund Freud: "Bir kedi ile geçirilmiş vakit asla zaman kaybı değildir" demiştir. Hayatımdaki her anı mükemmele dönüştürerek bana sevginin ne demek olduğunu öğreten canım kedim SAMİL'e ve sadece tez yazım aşamasında değil, hayatımın her anında koşulsuz yanımda olan ve desteğini benden esirgemeyen tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Brian Greene: "Çocuklar, büyük müzisyenlere ve aktörlere hayranlık duydukları gibi büyük bilim insanlarına da hayranlık duyduklarında medeniyet bir sonraki seviyeye sıçramış olacaktır!" demiştir. Bilgisine ve azmine hayranlık duyduğum, bana bilinmezliğin korkusuyla savaşıma cesareti veren, değerli desteği ile tez çalışmam esnasında, bana aktardığı akademik tecrübeleri sayesinde, bilim insanı olmaya karar vermemde olduğu gibi bu süreci yönetmem konusunda da bana yardımcı olan değerli bilim insanı evrimsel biyolog ve evrim mühendisi ÇAĞRI MERT BAKIRCI'ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) tarafından finanse edilen 3501 Projesi (Proje No: 1190003) ve Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 2021-2-TP2-4473) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. Baklagiller	4
2.1.1. Dünyada Baklagillerin Durumu	4
2.1.2. Türkiye’de Baklagillerin Durumu	6
2.2. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	8
2.2.1. Sınıflandırma ve İsimlendirme	8
2.2.2. Morfolojik Özellikler ve Büyüme Alışkanlıkları	9
2.2.3. Çiçek, Meyve ve Tohum Yapısı	10
2.2.4. Genetik Yapısı	10
2.3. Haploid Bitkiler ve Oluşum Şekilleri	10
2.4. Bitki Doku Kültürü	12
2.4.1. Anter Kültürü	12
2.4.1.1. Androgenik Başarıyı Etkileyen Faktörler	13
2.5. Baklagillerde Doku Kültürü Çalışmaları	15
2.5.1. Fasulyede Doku Kültürü Çalışmaları	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. Bitki Materyali	19
3.2. Tohum Canlılık Tespiti	20
3.3. Tohumların Ekilmesi ve Bitkilerin Büyütülmesi	21
3.4. Anter Kültürü Denemeleri	25
3.4.1. Tek Çekirdekli Mikrospor Evresinin Tespiti	25
3.4.2. Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonu	27
3.4.3. Anter Kültürü Denemesinin Kurulması	28
3.5. Kültürdeki Anter Örneklerinde Çekirdek ve Hücre Bölünmelerinin Mikroskopik Olarak Gözlenmesi	34
3.6. Embriyogenik Kallus Eldesine Yönelik Çalışmalar	34
3.6.1. Elde Edilen Kalluslarda Embriyogenik Hücre Yapılarının Mikroskopik Olarak Gözlenmesi	35
3.7. Histolojik Analizler	35
3.8. Aday Haploid Bitkilerin Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi ve Flow Sitometri Analizleri	35
3.9. İstatistiksel Değerlendirme	36
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	37
4.1. Uygun Tomurcuk Büyüklüğünün Tespiti ve Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonu	37
4.2. Anter Kültürü Denemeleri	38
4.2.1. Aktif Karbon Denemeleri	38
4.2.2. Seçilen Fasulye Genotiplerine Farklı Konsantrasyonlarda 2,4-D ve Kinetin içeren B5 ve MS Besi Ortamı Kombinasyonlarına Tepkisi	40
4.3. Kallus İndüksiyon Oranının Belirlenmesi	42

	Sayfa
4.4. Embriyogenik Kallus Eldesine Yönelik Çalışmalar	45
4.4.1. Farklı Konsantrasyonlarda Bitki Büyüme Düzenleyiciler İçeren Besi Ortamlarında Rejenerasyon Denemeleri	47
4.4.2. Elde Edilen Kalluslardan Embriyogenik Hücre Yapılarının Gözlenmesi	52
4.5. Elde Edilen Kallusların Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi	53
4.6. Belirlenen Optimal Besi Ortamı ile Anter Kültürü Denemelerinin Kurulması	54
4.6.1. Kültürdeki Anter Örneklerinde Çekirdek ve Hücre Bölünmelerinin Gözlenmesi	55
4.6.2. Kallus Dokularında Embriyoid Gelişimlerinin Gözlenmesi	60
4.7. Histolojik Analizler	62
4.8. Haploid Bitki Eldesi	66
4.9. Anter Kültüründen Elde Edilen Kallus ve Aday Haploid Bitkinin Ploidi Düzeylerinin Tespiti	68
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	73
EKLER	89
ÖZGEÇMİŞ	92

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerine ait numaralandırma ve özellik bilgileri	19
Tablo 3.2. Anter kültürü denemeleri kapsamında kullanılan deneme planı	29
Tablo 3.3. Anter kültürü denemeleri kapsamında kullanılan aktif karbon uygulaması deneme planı	30
Tablo 3.4. Embriyogenik kallus eldesi için hazırlanan besi ortamları	34
Tablo 4.1. Farklı besi ortamlarında kültüre alınan fasulye genotiplerine ait anterlerin kallus indüksiyon oranı ile varyans analizi sonuçları	43
Tablo 4.2. Farklı besi ortamlarında reaksiyon oranı ortalamaları	43
Tablo 4.3. Farklı genotiplerin reaksiyon oranı ortalamaları	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Dünyadaki baklagil üretim miktarının yıllara göre değişimi	5
Şekil 2.2. 2019 yılı baklagil dünya ihracat miktarı ve ihracat değeri	5
Şekil 2.3. Türkiye’de en çok yetiştirilen baklagiller ve ekim alanlarının yıllar içerisindeki değişimi	6
Şekil 2.4. Türkiye’de en çok yetiştirilen baklagiller üretim miktarlarının yıllar içerisindeki değişimi	7
Şekil 2.5. Türkiye’nin nohut, kuru fasulye ve mercimek üretiminde kendine yeterlilik seviyesinin yıllar içerisindeki değişimi	8
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerin genel görüntüleri	20
Şekil 3.2. Tohum canlılık tespiti için 2,3,5-trifeniltetrazolium klorit solüsyonu içerisinde bekletilen fasulye çeşitlerine ait tohumların kapalı iken görüntüleri	21
Şekil 3.3. Tohum canlılık tespiti için 2,3,5-trifeniltetrazolium klorit solüsyonu içerisinde bekletilen fasulye çeşitlerine ait tohumların açık iken görüntüleri	21
Şekil 3.4. Mersin Üniversitesi sera alanında tohumların ekiminin gerçekleştirildiği viyollere ait görüntü	22
Şekil 3.5. Viyollerde gelişen fasulye bitkilerine ait görüntüler	22
Şekil 3.6. Saksılara aktararak kültürel bakım işlemleri yapılan bitkilerin genel görüntüsü	23
Şekil 3.7. Kültürel bakım işlemleri yapılarak iplere gerilen fasulye çeşitlerinin saksıdaki görüntüleri	23
Şekil 3.8. Arazide tohum ekimini takip eden 4. günden itibaren çimlenmeye başlayan bitkisel materyallerden örnek görüntü	24
Şekil 3.9. Arazide ekimi yapılan fasulye çeşitlerine ait görüntüler	24
Şekil 3.10. Fasulye çeşitlerine ait mikrosporlarda tek çekirdekli evrenin DAPI boyama yöntemi ile belirlenmesi	26
Şekil 3.11. Fasulye çeşitlerine ait mikrosporlarda tek çekirdekli evrenin asetokarmen boyama yöntemi ile belirlenmesi	26
Şekil 3.12. Tek çekirdekli mikrosporların gözlendiği çiçek tomurcuklarının görüntüsü	27
Şekil 3.13. Yüzey sterilizasyonu işlem basamakları	28
Şekil 3.14. Besi ortamlarının hazırlanmasına ait işlem basamakları	31
Şekil 3.15. Anterlerin besli ortamlarına aktarılması	32
Şekil 3.16. Örneklerin kültüre alındığı iklimlendirme kabini ve iklim koşullarının görüntüsü	32
Şekil 3.17. Medium Organizer isimli web uygulaması üzerinde uygun besli ortamı ile fasulye çeşidinin eşleştirilmesi	33
Şekil 3.18. Medium Organizer isimli web uygulaması üzerinde gelişen kallus sayılarının kaydedilmesi	33
Şekil 4.1. Aktif karbon içeren besli ortamında kültüre alınan anterlere ait petri görüntüleri	39
Şekil 4.2. MS besli ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların stereo mikroskop görüntüleri	41
Şekil 4.3. B5 besli ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların stereo mikroskop görüntüleri	42
Şekil 4.4. Genotiplere ait reaksiyon oranlarını gösteren grafik	45
Şekil 4.5. Bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besli ortamında kültüre alınan anterlerin 8 haftalık stereo mikroskop görüntüsü	46
Şekil 4.6. Bitki büyüme düzenleyici içermeyen B5 besli ortamında kültür alınan anterlerin 8 haftalık stereo mikroskop görüntüsü	46

	Sayfa
Şekil 4.7. Anter kültür denemesinde rejenerasyon ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların kök oluşumlarının mikroskop görüntüleri	48
Şekil 4.8. Anter kültür denemesinde rejenerasyon ortamında kültüre alınan 10 numaralı genotipe ait enanterlerden gelişen kallusların kök oluşumlarının mikroskop görüntüleri	49
Şekil 4.9. Anter kültüründe gelişen kallus örneklerinde yeşermelerin ve embriyoid benzeri yapıların gözleendiği örneklerin mikroskop görüntüleri	50
Şekil 4.10. Anter kültür denemesinde rejenerasyon ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kalluslardaki embriyogenik oluşumlarının mikroskop görüntüleri	51
Şekil 4.11. Anter kültür denemesinden elde edilen kallusların asetokarmin boyaması ile hücre şekillerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri	52
Şekil 4.12. Kallus örneklerinin ploidi seviyelerini belirlemede kullanılan flow sitomeri cihazı	53
Şekil 4.13. 3 numaralı fasulye genotipinde (Bitlis-117) anter eksplantlarından elde edilen kallusların flow sitometri analiz sonucu	53
Şekil 4.14. 2.5 mg L ⁻¹ kinetin ve 0.5 mg L ⁻¹ 2,4-D içeren B5 besi ortamında kültüre alınan anterlerin 1 hafta sonraki stereo mikroskop görüntüleri	55
Şekil 4.15. Kültüre alınan 1 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe (Akman) ait anter örneklerinde 7. gündeki çekirdek bölünmelerinin DAPI boyama sonrası floresan mikroskop görüntüsü	56
Şekil 4.16. Kültüre alınan 1 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe (Akman) ait anter örneklerinde 14. gündeki çekirdek bölünmelerinin asetokarmin boyama sonrası floresan mikroskop görüntüsü	56
Şekil 4.17. Kültüre alınan 1 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe (Akman) ait anter örneklerinin kültürdeki 18., 21. ve 24. gündeki gelişimlerinin asetokarmin boyama sonrası floresan mikroskop görüntüsü	56
Şekil 4.18. Kültüre alınan 2 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe (Bitlis-76) ait anter örneklerinin kültürdeki gelişimlerinin DAPI boyama sonrası floresan mikroskop görüntüsü	58
Şekil 4.19. Kültüre alınan 2 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe (Bitlis-76) ait anter örneklerinin kültürdeki gelişimlerinin asetokarmin boyama sonrası floresan mikroskop görüntüsü	58
Şekil 4.20. Kültüre alınan 2 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe (Bitlis-76) ait farklı anter örneklerinin kültürdeki gelişimlerinin asetokarmin boyama sonrası floresan mikroskop görüntüsü	59
Şekil 4.21. 2.5 mg L ⁻¹ Kinetin ve 0.5 mg L ⁻¹ 2,4-D içeren B5 besi ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların 3. haftadaki stereo mikroskop görüntüleri	60
Şekil 4.22. 2.5 mg L ⁻¹ Kinetin ve 0.5 mg L ⁻¹ 2,4-D içeren B5 besi ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların 2.aydaki stereo mikroskop görüntüleri	61
Şekil 4.23. Anter kültüründen elde edilen kallusun parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop altında gözlenmesi	62
Şekil 4.24. Anter kültüründen elde edilen 1-4 numaralı genotiplerin (Tablo 3.1) kültürdeki 1., 2. ve 3. aydaki kallus örneklerinin parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop görüntüsü	63
Şekil 4.25. Anter kültüründen elde edilen 5-8 numaralı genotiplerin (Tablo 3.1) kültürdeki 1., 2. ve 3. aydaki kallus örneklerinin parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop görüntüsü	64
Şekil 4.26. Anter kültüründen elde edilen 9-12 numaralı genotiplerin (Tablo 3.1) kültürdeki 1., 2. ve 3. aydaki kallus örneklerinin parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop görüntüsü	65
Şekil 4.27. Anter kültüründen elde edilen kallusların parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop altında gözlenmesi	66

	Sayfa
Şekil 4.28. 2.5 mg L ⁻¹ Kinetin ve 0.5 mg L ⁻¹ 2,4-D, 45 g L ⁻¹ süktroz ve 45 g L ⁻¹ maltoz içeren MS besi ortamında kültüre alınan ve 2 numaralı genotipe (Bitlis-76) ait anterden gelişen kallusun farklı gelişim dönemlerindeki görüntüsü	67
Şekil 4.29. 2 numaralı genotipe (Tablo 3.1.) (Bitlis-76) ait anterlerden gelişen ve embriyoid içeren kallus dokusunda yapılan flow sitometri analizi	69
Şekil 4.30. 2 numaralı genotipe (Tablo 3.1.) ait anterlerden gelişen örneğe ait yaprak dokusunda yapılan flow sitometri analiz sonucu	69

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
°C	Celcius
2iP	N6-(2-Isopentenyl) adenine
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
ABA	Absisik Asit
AS	Adenin Sülfat (6-aminoputine hemisulfate salt)
B5	Gamborg B5
BAP	Benzil Amino Purin (6-Benzylaminopurine)
cm	santi metre
cm ²	santi metre kare
da	dekar alan
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid
dk	dakika
EtOH	Ethanol
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	gram
GA3	Giberellik Asit
IAA	Indole Asetik Asit
IBA	Indole Bütirik Asit (4-(3-Indolyl) butanoic acid)
kg	kilogram
Kin	Kinetin (N- (furan-2-ilmetil) -7 H -pürin-6-amin)
L	litre
LS	Linsmaier ve Skoog
M	Molar
M.Ö.	Milattan önce
Mbç	Mega baz çifti
Mbp	Milyon baz çifti
mg	miligram
ml	mililitre
mM	miliMolar
mm	milimetre
MS	Murashige ve Skoog
NAA	Naftaline Asetik Asit (1-Naphthylacetic acid)
NaOCl	Sodyum Hipoklorid
NN	Nitsch ve Nitsch
<i>P. coccineus</i>	<i>Phaseolus coccineus</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
T.C.	Türkiye Cumhuriyeti
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultra Viyole
yy	Yüzyıl

1. GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), Leguminosae takımında yer alan Fabaceae familyasının, Papilionoideae alt familyasında bulunan, *Phaseolus* cinsine aittir [1]. Dünya genelinde yaklaşık 230 adet fasulye türü bulunmakta, bunlardan 20 adet fasulye türü insan beslenmesinde etkin olarak kullanılmaktadır. Yetiştiriciliği en fazla yapılan türünün ise *Phaseolus vulgaris* olduğu bilinmektedir [2,3]. Latin Amerika orijinli en eski bitki olan *Phaseolus vulgaris* L., $2n=2x=22$ kromozoma sahip, kendine döllen, küçük genom yapılı ve 587 Mbp büyüklüğünde genoma sahip bir bitkidir [4,5]. Fasulye, hem rehidrasyon sonrası olgun ve kuru tohumları hem de kabukları olgunlaşmamış taze formu ile taze ve kuru olarak tüketilebilmektedir [6]. Fasulye, insan beslenmesinin yanı sıra, hayvan yemi, boya ve kozmetik sanayi gibi endüstriyel alanlarda da efektif olarak kullanılmaktadır [7].

Fasulye, bol nemli, iyi drene edilen, kumlu-tınlı yapıdaki organik madde bakımından zengin toprakları sevmektedir [8–10]. Ağır, asitli ve ıslak topraklardan olumsuz etkilenmekte, 5.5 ila 6.5 pH aralığındaki toprakları tercih etmektedir [8,9,11]. Çimlenme ve çiçeklenme dönemlerinde farklı iklimsel hassasiyetler gösterirken, çimlenme dönemlerinde sıcaklığa, çiçeklenme dönemlerinde ise düşük nispi nem ve kuraklığa karşı toleransının az olduğu bilinmektedir [12].

Birçok farklı biyotik ve abiyotik stres faktörü diğer bitkilerde olduğu gibi fasulye bitkisinde de hem verimi hem de ekimi sınırlamaktadır. Yetiştirilen ülkelerin iklim yapısına bağlı olmakla birlikte, tropik ve subtropik iklime sahip ülkeler başta olmakla üzere, tüm dünyada çok sık rastlanan ve üründe %40 ile %80 arasında kayıp yaşanmasına sebep olan “fasulye köşeli yaprak lekesi hastalığı (*Pseudocercospora griseola*)” en önemli fasulye hastalıklarından biridir [13–18]. Tohum kaynaklı fungal patojenlerin sebep olduğu “çökerten, beyaz çürüklük, kömür çürüklüğü, güney yanıklığı” gibi hastalıklar ise ülkemizde ve dünyada fasulye üretimindeki sorunlar arasındadır [19,20].

Kolombiya devri öncesinde Arjantin, Meksika, Güney Amerika ve And bölgesinde, ilk olarak Amerikan yerlileri tarafından kültüre alındığı arkeolojik çalışmalar ile tespit edilen fasulyenin gen havuzu Güney ve Orta Amerika’dır [20–23]. Güney Amerika gen havuzundaki tiplerin yaprakları büyük, brakteleri mızrak ve üçgen şeklinde, tohumları iri ve çiçekleri beyaz renkteyken, Orta Amerika gen havuzunda bulunan tiplerin brakteleri oval ve kalp şeklinde çiçekleri ise renklidir [24]. Ülkemizin birçok bölgesinde yetiştirebilecek kadar iyi adapte olan fasulye, 17. yy’da Türkiye’ye gelmiş ve uzun yıllar yetiştiriciliğinin yapılması sonucu ortaya çıkan varyasyonlar ile çeşitli yöresel fasulye çeşitleri meydana gelmiştir [25][26].

Araştırmacıların geliştirmekte olan ülkeler için önemli protein kaynaklarından biri olduğunu belirttikleri yemeklik tane baklagillerden biri olan fasulye, Türkiye’de de insan

beslenmesinde protein ve karbonhidrat kaynağı olarak önemli bir yer tutmaktadır [27,28]. İçerdiği, kalsiyum, demir, fosfor, kükürt, çeşitli vitaminler (A, D, E, K) ile yüksek bir besin değerine sahiptir [29]. Fasulyenin olgun taneleri kuru maddede %23 ile %24 protein içeriğine sahipken, olgunlaşmamış bakla ve tanelerde bu oran %10'dur [30].

Fasulyenin insan beslenmesindeki öneminin yanı sıra, havanın serbest azotunu köklerinde bulunan *Rhizobium phaseoli* bakterisinin oluşturduğu nodüller ile toprağa bağlayarak, azot (N) ihtiyacını bu simbiyotik azot fiksasyonu ile sağladığı bilinmektedir [31]. Bu özelliği ile kendinden sonra ekimi yapılacak bitkinin azot ihtiyacını karşılayacak azot bakımından zengin bir toprak bırakmaktadır [32].

Tüm dünyada iklim koşullarında meydana gelen değişimler, insanlar için gıda güvenliğinin önem kazanması ve bununla birlikte dengeli beslenme alışkanlıklarının değişmesi, global olarak gerçekleşen sosyal ve ekonomik gelişmeler ve krizler diğer sektörler gibi tarım sektörünün de değişim ve dönüşümüne neden olmaktadır. Giderek artan nüfusa bağlı olarak tarımsal ürün talebi de gün geçtikçe artmaktadır. Tarımsal ürünlerin eşit dağılımını engelleyen koşulların sebep olduğu sorunlar dünyada birçok ülkede dengesiz beslenme ve açlığa neden olmaktadır. Dolayısı ile bu sorunlar ile baş edebilmek amacı ile tarımda bitkisel üretimin miktarının artırılması bir zorunluluk haline gelmektedir [33]

Üretimin artırılabilmesi amacı ile verimin artırılabilmesi ve bunun için de kaliteli, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. İslah programlarının gelişimi iyi düzeyde olmasına rağmen, geleneksel ıslah yöntemlerdeki yüksek zaman, iş gücü ve finansal gereksinimi, , verim gibi bazı önemli özelliklerin düşük kalıtsallıkta olması, türler arası melezlemelerdeki düşük başarı şansı gibi etmenler sınırlandırıcı faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır [34].

Fasulye yetiştiricilerinin kullandığı yerel çeşitler fiziksel ve genetiksel açıdan saf olmamaları nedeniyle, popülasyondaki bireylerin tek tip bir büyüme ve gelişme göstermemesinden kaynaklı makinalı tarım uygulamalarında çeşitli zorluklar yaşanmakta, depolamada ve pişirme aşamasında, uniform olmayan ürünler dolayısı ile sıkıntılar yaşanmaktadır[35]. Fasulye bitkisinde kendilemeler mümkün olmakla beraber homozigotiye ulaşmak uzun zaman almaktadır. Çiçek yapısı nedeniyle melezlemeler zor olabilmektedir. Klasik melezleme çalışmalarının yüksek iş gücü gerektirdiği, saf hat eldesi için yapılan kendilemenin 7-9 yıl gibi uzun zaman aldığı bilinmektedir [36].

Bazı bitki türlerine ait ıslah çalışmalarında doku kültürü tekniklerinden yararlanılabilmektedir. Özellikle anter kültürü tekniği haploid bitki üretiminde yaygın olarak kullanılmakta ve bu sayede kısa sürede homozigotlaşma sağlanarak daha kısa sürede yeni çeşitler geliştirmek mümkün olabilmektedir [37]

Haploidizasyon yöntemi ile tamamen homozigot saf hatların elde edilmesi mümkündür. Haploid bitkilerin kromozom sayıları spontan olarak veya kromozom katlaması ile tekrar diploid hale getirildiğinde saf hat eldesi gerçekleştirilmiş olmaktadır. Kendileme depresyonu ve gençlik kısırılığı gibi sebepler ile klasik yöntemler ile homozigot bireylere ulaşmanın zor olduğu bitkilerde tek generasyonda homozigot birey elde edilebilmektedir. Haploid bitki elde etme teknikleri ile genomik çalışmalarda kullanılacak materyal elde edilebilmekte bunun yanı sıra resesif mutasyonların ortaya çıkarılması sağlanabilmektedir. Ayrıca birden çok gen tarafından etkilenen karakteristik özelliklerin moleküler düzeyde tanımlanabilmesinde birçok kolaylık sağlamaktadır [38].

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait olduğu bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı (n) kadar olan bitkilere haploid bitki adı verilmektedir. Generatif organ ve hücreleri oluşturmaya başlamadan önce, belirli çözeltiler ile belirli konsantrasyonda muamele edilen bu bitkilerin kromozom sayısı iki katına çıkartıldıktan sonra gamet ve tohum üretimi gerçekleştirilebilmektedir [39]

Bu tez çalışması ile, ülkemizdeki önemli besin kaynaklarından bir olan fasulyeye ait 12 farklı genotipte anter kültür tekniği ile haploidizasyon olanaklarının araştırılması ve gerekli protokollerin oluşturulması hedeflenmiş olup, ilk kez bu genotipler üzerinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın aynı zamanda, daha sonra bu alanda yapılacak çalışmalar için model oluşturacağı da öngörülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Baklagiller

Baklagiller (Leguminosae), dikotiledonların üçüncü büyük ailesidir. Hem ekonomik olarak hem de insan ve hayvan beslenmesinde içerdikleri yüksek protein miktarı ile önemli bir yer tutmaktadırlar. Aynı zamanda sanayide hammadde olarak kullanılmaları nedeniyle de çok önemli bitkilerdir [40–42].

Besin değerinin yüksek olmasının yanı sıra baklagiller, *Rhizobium* adı verilen bakteriler ile kurdukları simbiyotik ilişki sayesinde havanın serbest azotunu toprağa bağlayarak, ekildikleri toprakların azot içeriğinin zenginleşmesini sağlarlar. Yılda yaklaşık 5 ila 20 kg/da azotu toprağa bağlama kapasitesine sahiptirler. Bu miktar bitkinin türüne, genotipine ve çevre koşullarına göre değişiklik göstermektedir [12]

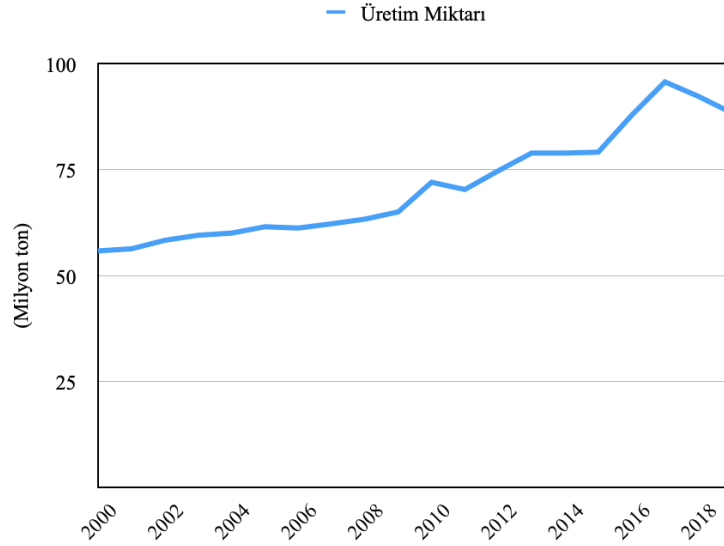
Baklagiller ilk çağlardan beri kültürü yapılan ve insan beslenmesinde çok uzun zamandır önemli bir yere sahip olan besin grubudur. Baklagillerin bilinen en eski türü olan mercimeğin günümüzden 8000 yıl, nohutun ise 7000 yıl öncesinde Orta Doğu'da tarımının yapıldığı bilinmekle birlikte, nohudun Anadolu'da M.Ö 5000'de besin olarak kullanılmaya başladığı bildirilmektedir [43,44].

2.1.1. Dünyada Baklagillerin Durumu

2017 yılında 80,6 trilyon dolar olarak belirlenen Dünya Gayri Safi Milli Hasıla değerinin, 3,22 trilyon dolarlık kısmını tarım sektörü oluşturmakta, nohut, mercimek ve kuru fasulye ise toplam tarımsal üretim değerinin 24,6 milyar dolarını (%0,76) oluşturmaktadır [45].

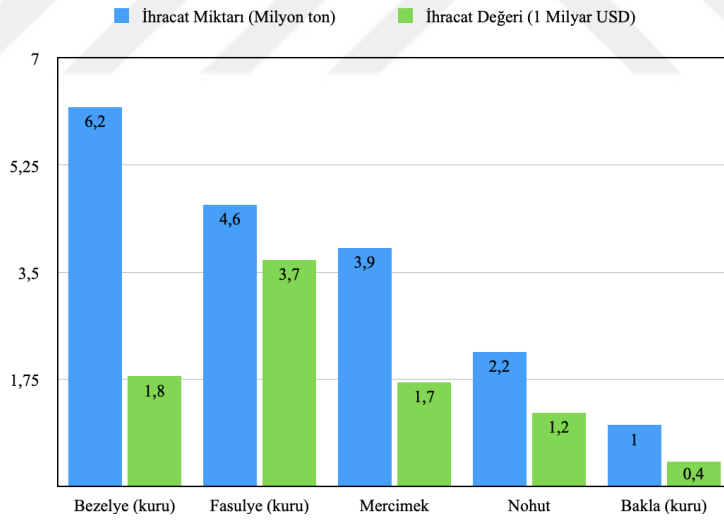
Börülce, fasulye, nohut, mercimek, bakla gibi çeşitli türlerin yetiştiriciliği yapılmakta olup baklagiller içerisinde dünyada ağırlıklı olarak yetiştirilen türler nohut mercimek ve kuru fasulyedir.

2000 yılında tüm dünyada baklagil üretimi, 55,8 milyon ton iken, 2019 yılında bu miktar yıllar içerisinde artarak 88,3 milyon tona ulaşmıştır. Her ne kadar bu süreç içerisinde üretim miktarında artış yaşansa da 2017 yılında 95,6 milyon ton olan üretim miktarı azalarak 2019 yılında 88,3 milyon tona gerilemiştir (Şekil.2.1.)[46].



Şekil 2.1. Dünyadaki baklagil üretim miktarının yıllara göre değişimi (2000 – 2019) [46].

Dünya baklagil ihracatı 2019 yılı itibariyle miktar olarak 6,1 milyon ton kuru bezelye, 4,5 milyon ton kuru fasulye ve 3,8 milyon ton kuru mercimek olarak gerçekleşmiş, değer olarak ise 3,7 milyar dolar kuru fasulye, 1,8 milyar dolar kuru bezelye ve 1,7 milyar dolar mercimek ihracatı gerçekleşmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. 2019 yılı Baklagil dünya ihracat miktarı ve ihracat değeri [46].

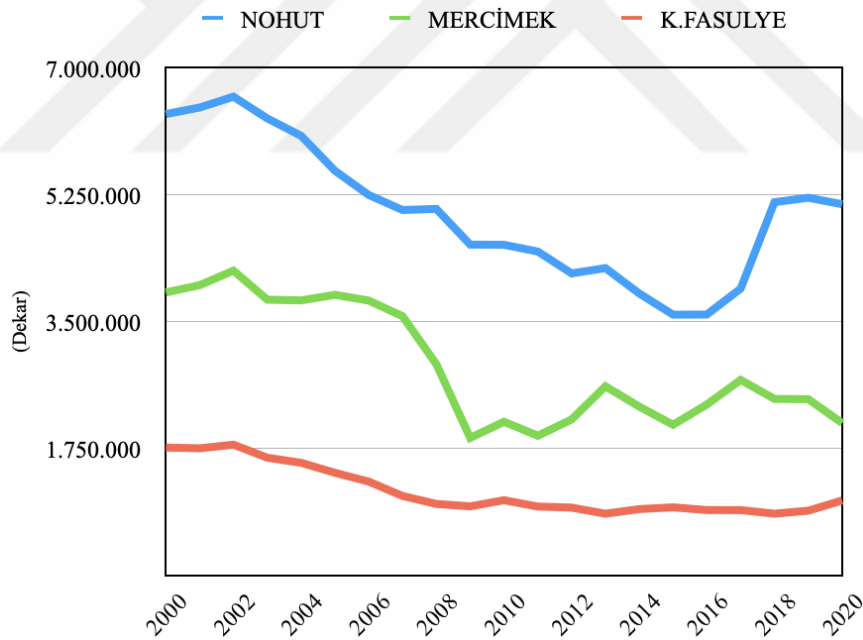
Dünya baklagil ithalatında 2019 yılı itibariyle 7,7 milyon ton nohut, 6,3 milyon ton kuru bezelye ve 3,7 milyon ton mercimek ithalatı gerçekleşmiştir. 2000 yılı ile karşılaştırıldığında dünya bezelye ithalatının miktar olarak 2.3 kat, mercimek ithalatının 3,7 kat, kuru fasulye ithalatının ise yaklaşık 2 kat arttığı görülmektedir [46].

2.1.2. Türkiye’de Baklagillerin Durumu

Baklagil üretiminin ülke geneline yayılmış durumda olduğu Türkiye’de, nohut, kuru fasulye ve mercimek en fazla üretilen baklagiller olup, Güneydoğu Anadolu, Orta Anadolu ve Marmara Bölgesi üretimin en yoğun olduğu bölgelerdir [47].

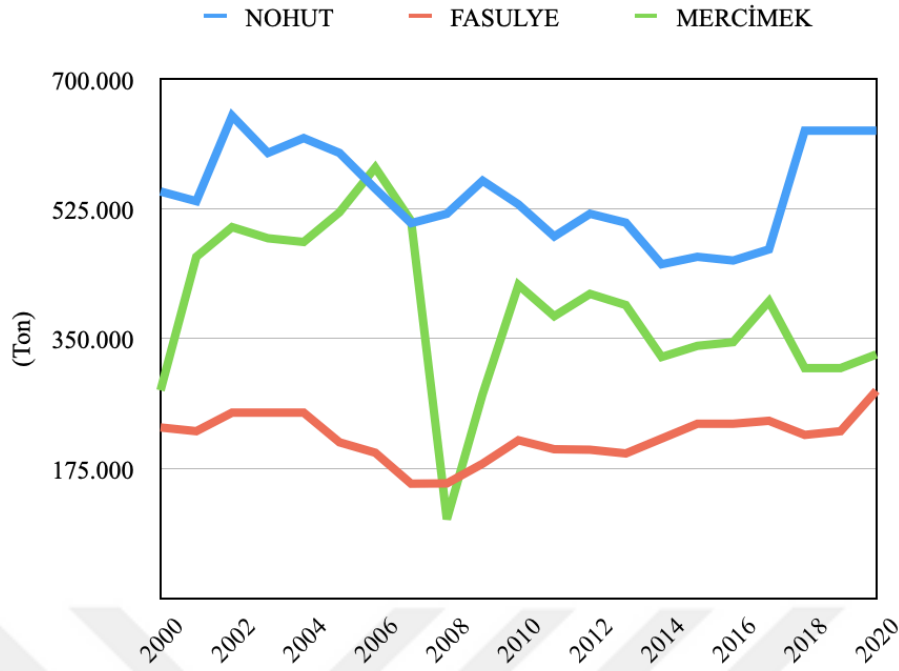
Yemelik tane baklagillere ait tarım alanlarının payı 1980 yılında %3 iken 1990 yılında %11,2’e yükselmiştir. 1980’li yıllarda ülkemizde yürütülen “Nadas Alanlarının Daraltılması (NAD)” projesi ile tarım alanlarında baklagillerin ekimi teşvik edilmiş ve yaygınlaştırılmıştır. Fakat, artan baklagil ekim alanları 1990 yılından sonra tekrar azalmaya başlamış bunun sonucunda ise 1995 yılında %8,8’e, 2005 yılında %6,4’e ve 2012 yılında %5’ kadar gerilemiştir [47,48].

Türkiye’nin 2020 yılı itibari ile, toplam baklagil (kuru fasulye, nohut ve mercimek) ekim alanı 824 bin hektar, üretimi ise 1,23 milyon ton civarındadır. Ülkemizde yetişen yemelik baklagiller içerisinde nohut ve mercimek üretim miktarı açısından en önemli yeri tutmaktadır [49] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Türkiye’de en çok yetiştirilen baklagiller ve ekim alanlarının yıllar içerisindeki değişimi (2000 – 2020) [49].

2020 yılında, 824 bin hektar ekim alanında gerçekleşen üretim ile; 630 bin ton nohut, 328 bin ton kırmızı mercimek, 279 bin ton kuru fasulye elde edilmiştir [49]. (Şekil 2.4)

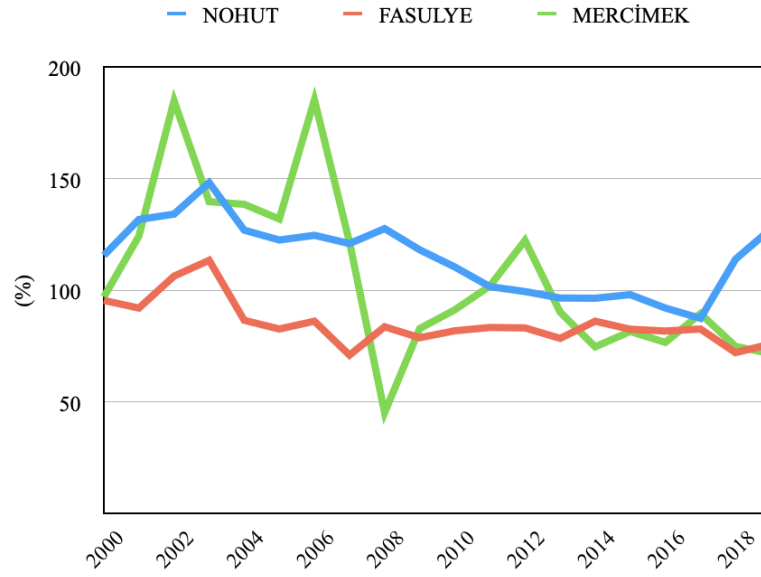


Şekil 2.4. Türkiye’de en çok yetiştirilen baklagiller üretim miktarlarının yıllar içerisindeki değişimi (2000 – 2020) [49].

Son yıllarda ithalatta görülen artış içerisinde özellikle mercimek üretimi, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde GAP projesi ile sulanan alanlardaki artış ve bunun sonucu kuru tarım bitkisi olan mercimeğin ekim alanının azalması yanında yaşanan kuraklığın etkisi ile de üretimde ciddi oranda düşüş olmuş ve buna bağlı olarak ithalat 2008 yılında ciddi oranda artmıştır [50].

Önemli bir baklagil ithalatçısı olan Türkiye baklagil üretiminde kendine yeterlilik açısından 2020 yılında nohutta %127,5, kırmızı mercimekte %71,7, ve kuru fasulyede ise %76 oranlara sahip iken, 2000 yılındaki veriler ile karşılaştırıldığında nohutta kendine yeterlilik seviyesi artarken, kuru fasulye ve mercimekte ise düşüş olduğu görülmektedir (Şekil 2.5) [49].

Üretim girdilerinin yüksek maliyeti, kalite standartlarına uygun büyüklükte ürün yetiştirilememesi, yaygın olmayan makinalı tarım, zararlılar ve hastalıklar ile mücadelenin ve sertifikalı tohum kullanımının yetersiz olması, ekim alanlarının azalmasına buna bağlı olarak da yemeklik tane baklagil üretiminde düşüşe neden olmaktadır [51].



Şekil 2.5. Türkiye'nin nohut, kuru fasulye ve mercimek üretiminde kendine yeterlilik seviyesinin yıllar içerisindeki değişimi (2000 – 2020) ^[49]

2.2. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.2.1 Sınıflandırma ve İsimlendirme

Fasulyenin bilimsel adı *Phaseolus vulgaris* L.'dir [52]

Fasulye, baklagiller ailesinin bir üyesidir ve taksonomik hiyerarşisi şu şekildedir:

Bölüm: Phanerogameae (Tohumlu bitkiler)

Alt Bölüm: Angiospermae (Kapalı tohumlular)

Sınıf: Dicotyledoneae (Çift çenekliler)

Takım: Leguminosae (Baklagiller)

Familiya: Papilionoideae (Kelebek çiçekliler)

Cins: *Phaseolus*

Tür: *vulgaris*

Çoğu tür, kelebek benzeri bir şekle sahip beş taç yapraklı çiçekler taşır. Fabaceae türlerinin meyvesi, çeşitli şekil ve boyutlarda, birden çok tohum taşıyan tek karpelli bir bakla olmakla birlikte, birçok türde meyve, tohumları serbest bırakmak için bir ya da her iki kenar boyunca uzanan ve merkezi sütun olarak da bilinen yapılara sahiptir [53].

Phaseolus vulgaris ait olduğu familyayı karakterize eden birçok karakteristik özelliği taşısa da çiçek omurgasının bir veya iki dönüşlü bir tüp içerisinde son bulması ve hem üreme hem de vejetatif yapılarında barındırdıkları kanca şeklindeki kıl yapıları ile familyanın geri kalan üyelerinden ayrılırlar [54–56].

Dünya çapında en çok tüketilen baklagil olan fasulye, diğer tüm baklagil mahsullerinin toplamını aşan ticari değeri ile kritik bir öneme sahiptir [57–59]. Özellikle tropik bölgelerdeki milyonlarca insan için mısır, pirinç ve diğer gıdalara dayalı diyetlerde eksik olan amino asitleri tamamlayan temel bir protein kaynağıdır [57]. İçerdiği lizin ve triptofan aminoasitleri; demir, bakır ve çinko mineralleri; faydalı fitokimyasallar, antioksidanlar ve flavonoidler ile insan sağlığı için de değerli bir besin kaynağı durumundadır [60].

2.2.2. Morfolojik Özellikler ve Büyüme Habitüsleri

Fasulye, kapsamlı olarak yürütülen yetiştirme çalışmaları neticesinde tohum büyüklüğü, rengi, farklı büyüme habitüsleri gibi çeşitli morfolojik ve agronomik özelliklerde birçok çeşide sahiptir. *P. vulgaris*'in sarılıcı ve tırmanıcı çeşitlerinin yanı sıra daha az sıklıkta da olsa kısmen dik yapıya sahip birçok çeşidi bulunmaktadır [56,61]. Yarı tırmanıcı çeşitler kısa gün uzunluğuna sahip serin ve dağlık bölgelerde tercih edilir [62].

Gövde başına boğum ve tohum sayısı bitkinin ana gövdesinin uzunluğu ile pozitif olarak ilişkilidir [63]. Artan bakla sayısı, boyut, etlilik, daha büyük tohumlar ve tohumların suya erişimini kolaylaştıran artan geçirgenlik gibi seçilen özellikler evcilleştirilerek fasulyeye kazandırılan özelliklerdendir [55,61].

Fasulye temelde yan köklere sahip bir kazık kök sistemine sahip olmakla birlikte, bu kökler *Rhizobium* bakterileri tarafından kolonize edilerek düzensiz kök nodüllerinin oluşumu ile sonuçlanır [56].

Kökler günde yaklaşık 3-3,5 cm hızlı bir şekilde uzama göstererek, herhangi bir şekilde, toprak içerisinde bir engel ile karşılaşır, büyümesini durdurarak yan kök oluşumuna yönelir [12].

Fasulye tek yıllık, otsu bir gövdeye sahip olup, gövde tipik olarak tüylüdür ve tüylerin uzunluğu ve yoğunluğu çeşitlilik göstermekte, kısa ve çengelli kıllar (unsinat olmayan kıllar) her zaman gövdenin genç kısımları üzerinde bulunmaktadır [54,61,64,65]. Tüylerin hem zararlılara hem de hastalıklara karşı bir savunma oluşturduğu, aynı zamanda mantar sporlarını engellediğine dair çalışmalar bulunmaktadır [66,67]. Boğum (node) ve boğum aralarından (internode) meydana gelen gövde, sırık ya da sarılıcı olarak adlandırılan çeşitlerde üç metreye kadar uzayabilmekte ve ortalama 11-35 boğum taşımaktadır [68].

Fasulyede asıl yapraklar, üç adet yaprağın bir yaprak sapına bağlandığı, üç yaprakçıklı (trifoliat) ve alternat dizilime sahip, yaprakçıkları tüylü, küçük kulakçığı birleşik yapıdadır [66]. Çeşitler arasında şekiller farklılık gösterse de yaprakçıklar genelde geniş tabanlı ve sivri uçludur [61].

2.2.3. Çiçek Meyve ve Tohum Yapısı

Fasulyede çiçekler aksillar ya da terminal tomurcuklardan meydana gelip, çeşide göre, pembe, beyaz ya da menekşe rengine sahiptirler [56]. Koltuksal (axillary) çiçek durumu adı verilen, yaprak koltuğundan çıkan salkım şeklindeki çiçek, salkım sapının ucuna çiçek sapı (pedicel) ile bağlanmaktadır [68]. Çiçeklenme için optimum sıcaklık 21°C olarak belirlenmiştir [69].

Polen taneleri yaklaşık 30 mikrometre çapa sahip, ağsı bir eksin tabakası ile çevrili, küresel, üçgen ya da trikolpat yapıdadır [70]. Anter ve stigmanın birbirine yakın şekilde konumlanmış durumda olduğu çiçek yapısı, anter duvarının açılmasıyla stigma alıcılığının da aynı anda, çiçek açılmadan önce meydana gelmesi fasulyenin yüksek oranda kendine döllenmesi ile sonuçlanır [71]. Fasulyenin bakla (legume) adı verilen meyvesi, döllenmeyi takiben yumurtalığın gelişmesi ile meydana gelir ve çevre şartları ile çeşide bağlı olarak bitkide 4 ila 29 adet bulunabilir [72]. Yine çeşide ve çevresel koşullara bağlı olmakla birlikte tohumun olgunlaşması için gereken süre 50 ila 250 güne kadar geniş bir aralıkta değişmektedir [61].

2.2.4. Genetik Yapısı

$2n=2x=22$ kromozoma sahip diploid yapıdaki fasulyenin genomu, 521 Mbç ve %41 tekrarlı DNA'lardan oluşmaktadır [5]. Bakla (*Vicia faba* L.) genomundan yaklaşık 21 kat daha küçük olan fasulye genomu, börülce (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genomuna yakın ve soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merrill) genomunun yarısı kadardır [73]

2.3. Haploid Bitkiler ve Oluşum Şekilleri

Bitkisel üretimin arttırılabilmesi için verimin arttırılması ve bunun için de kaliteli, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. İslah programlarının gelişimi iyi düzeyde olmasına rağmen, geleneksel ıslah yöntemlerinde homozigot hatların elde edilmesinin uzun zaman, yoğun iş gücü ve masrafı gerektirmesi, verim gibi bazı önemli özelliklerin düşük kalıtsallıkta olması, türler arası melezlemelerdeki düşük başarı şansı gibi etmenler sınırlandırıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır [34].

Klasik ıslah metodları kullanılarak yeni bir çeşidin geliştirilmesi 10-14 yıl kadar uzun bir süreç gerektirmektedir. Biyoteknolojik gelişmelerin hız kazanması ile doku kültürü çalışmalarındaki gelişmeler, özellikle anter kültürü tekniğinin kullanılması homozigot hatların elde edilme süresini kısaltarak yeni çeşit geliştirilmesi için gerekli süreyi önemli ölçüde azaltmıştır [12,37].

Somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait olduğu bitki türünün gamet hücrelerindeki kromozom sayısı (n) kadar olan bitkilere haploid bitki adı verilmektedir. Normal gelişim gösteren bitkilere kıyasla haploid bitkiler, daha küçük yapıda olup ait oldukları bitkinin gamet hücrelerinde kromozom sayısı kadar kromozom taşıdıkları için gamet meydana getiremez ve tohum bağlayamazlar [74].

Haploid bitki elde etmek amacıyla uygulanan çeşitli teknikler olmakla birlikte doğal olarak meydana gelen spontan haploid bitki oluşumu da gözlenmektedir. Haploid bitkilerin oluşumu 5 farklı şekilde meydana gelmektedir:

- ❖ Androgenez: Erkek gamet hücrelerinin gelişim göstermesi ile haploid yapıda bitkiler oluşabilmektedir [75].
- ❖ Ginogenez: Ovaryum içerisine sperm girişi olmasına rağmen döllenmenin gerçekleşmemesi sonucunda, ovül hücreleri bölünmeye başlayarak haploid bitki oluşumu gözlenebilmektedir [76,77].
- ❖ Kromozom eliminasyonu: döllenme gerçekleşse de oluşan embriyoda ebeveynlere ait kromozomların kaybolması sonucunda haploid yapıda bitkilerin meydana geldiği bilinmektedir. Genel olarak erkek eşey hücresine ait kromozomlar elimine olmaktadır [78].
- ❖ Semigami: Embriyo oluşumu, dişi ve erkek bitkiye ait eşey hücrelerinin katılımı ile gerçekleşse dahi çekirdeksel erimenin gerçekleşmediğinden dolayı ana ve babaya ait kimeralı haploid bitkiler oluşmaktadır [79-82].
- ❖ Apogami: Embriyo kesesi içerisinde var olan sinerjit hücrelerden birinin bölünerek haploid yapıda bitkiyi oluşturmaktadır [79-82].

Doku kültürü çalışmalarında kendiliğinden katlanarak $2n$ kromozom sayısına sahip bitkiler elde edilebilmekte, aynı zamanda generatif organ ve hücreleri oluşturmaya başlamadan önce, haploid bitkiler belirli çözeltilerin belirli konsantrasyonları ile muamele edilerek kromozom sayısı iki katına çıkartılarak bu bitkilerin gamet ve tohum üretimi gerçekleştirilebilmektedir [39,79].

Doku kültürü ile, kendileme depresyonu ve gençlik kısırlığı gibi sebepler ile klasik yöntemler ile homozigot bireylere ulaşmanın zor olduğu bitkilerde tek generasyonda homozigot birey elde edilebilmektedir. Haploid bitkiler, genomik çalışmalarda kullanılabildiği gibi, resesif mutasyonların ortaya çıkarılmasında da kolaylık sağlamaktadırlar. Ayrıca birden çok gen tarafından etkilenen karakteristik özelliklerin moleküler düzeyde tanımlanabilmesinde birçok kolaylık sağlamaktadır [83].

Dihaploidizasyon yönteminde, öncelikle somatik hücrelerinde ait oldukları o türün gamet hücrelerindeki kromozom sayısı kadar kromozom taşıyan farklı bir ifade ile tek set kromozom bulunduran haploid bitkiler elde edilir. Elde edilen haploid bireyler çeşitli kimyasallar

kullanılarak kromozom katlanması sonucu katlanmış haploid hale getirilirler. Elde edilen bu %100 homozigot hatlara saf hat adı verilir ve kendine döllen bitkilerde bu hatların her birisi birer çeşit adaydır [36].

2.4. Bitki Doku Kültürü

Organizmalardaki her hücrenin uygun çevre koşulları sağlandığında bağımsız olarak gelişebilmesi özelliği 1839 yılında Schwan'ın çalışmaları ile ortaya konmuş ve totipotensi özelliği olarak adlandırılmıştır [84,85]. Bitkilerin totipotensi özelliğinden faydalanılarak, laboratuvarlarda ve steril koşullarda, gerekli bileşenleri içeren belirli besi ortamlarında, bitkilerin doku veya organları kullanılarak, yeni bitkilerin veya bitkisel ürünlerin üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bu bilgiler ışığında Gottlieb Haberlandt 1902 yılında bitkilerin totipotensi özelliğinden faydalanarak ilk bitki doku kültürü çalışmasını yürütmüş ve Kolte ve Robbins'in 1922 yılında yapmış oldukları bitki doku e kültürü çalışması başarı ile sonuçlanmıştır [86].

In vitro doku kültürü çalışmaları ile bitki elde edilmesi amacı ile eksplant kaynağı olarak bitkilerin farklı doku ve organları kullanılmakta, kallus, organ, embriyo, hücre ve protoplast kültürü tekniklerinden faydalanılmaktadır [87,88].

2.4.1. Anter Kültürü

Anter kültürü tekniği temelde in vitro koşullarda ve yapay besi ortamları kullanılarak, tomurcuklarından ayrılan ve içinde olgunlaşmamış polenleri barındıran anterlerin yapay besi ortamlarına yerleştirilmesi prensibine dayanır.

Normal koşullarda polen taneleri iki çekirdekli yapıya dönüşerek gametik gelişim göstermekte iken anter kültürü sayesinde henüz tek çekirdekli evrede olan polen taneleri somatik gelişme gösterecek şekilde uyarılmaktadır. Bu olaya "androgenez" adı verilmektedir [89].

Tulecke (1953), *Ginkgo biloba* L. bitkisi üzerinde yaptığı çalışmalarda, ilk defa haploid bitki oluşturmak amacı ile olgun polenlerin kültür koşullarında uyarılabileceğini bildirmiştir [89,90].

Guha ve Maheswari (1964), tarafından ilk defa, *Datura stramonium* bitkisine ait genç anterler kültüre alınarak haploid embriyolar elde edilmiştir [91].

Burgin ve Nitsch (1967), tütün bitkisinde yaptıkları anter kültürü çalışmaları ile haploid bitki elde etmeyi başarmışlardır. Bu çalışmaları takiben ekonomik değeri yüksek çok sayıda bitkide aynı yöntem kullanılarak haploid bitkiler elde etmek amacı ile çok sayıda çalışma yapılmıştır [79].[92].

Keller (1987), haploid bitki elde etmek amacı ile izole edilen mikrosporları kültüre alarak başarıya ulaşmışlardır [93] .

Haploid embriyolar, anter kültüründe mikrosporların bölünmesiyle oluşan hücrelerin sporofitik gelişim göstermesi ile meydana gelse, mısır, buğday ve arpa gibi bitkilerde doğal yollar ile bölünen tek çekirdekli mikrosporlar daha sonra vejetatif bölünme ile sporofitleri oluşturabilmektedir [94][95].

Tütün (*Nicotiana tabacum* L.), buğday (*Triticum aestivum* L.), arpa (*Hordeum vulgare* L.), kanola (*Brassica napus* L.), pirinç (*Oryza sativa* L.), yer fıstığı (*Arachis hypogaea*) ve mısır (*Zea mays* L.) gibi birçok bitkide, bitki ıslah programlarında kullanılmak üzere katlanmış haploid bitkiler başarı ile elde edilebilmiştir [96–101]

2.4.1.1. Androjenik Başarıyı Etkileyen Faktörler

Anter kültüründe başarı, kallusların eldesi ve rejenerasyon oranı ile elde edilen katlanmış bitki oranı gibi ölçütler ile değerlendirilmekte ve türe ve genotipe göre değişkenlik göstermektedir [102].

Bajaj, (1990), anter kültüründe genotip, verici bitkinin yetiştirildiği koşullar, mikrospor gelişme evresi ve inkübasyon koşulları ile anter ve tomurcuğa yapılan ön uygulamaların başarıyı etkilediğini bildirmiştir [103].

Cho ve Zapata (1990), besi ortamına yoğun şekilde yerleştirilen anterlerin ortama salgılanan toksik maddelerin yoğunluğunu arttıracak, bu sebeple de mikrosporların gelişimleri üzerine olumsuz etki yapabileceğini belirtmişlerdir [104].

Kristiansen ve Andersen (1993), sıcaklık ve donör bitkinin yaşının embriyo gelişimini etkilediğini, fotoperiyodun ise etkisiz olduğunu bildirmişlerdir [105].

Mityko ve ark. (1995), genotipe bağlı olarak androjenik bitki oluşum frekansının %0.5 - 75 arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir [106].

Genotipe bağlı faktörlerin elimine edilmesinde izlenecek yollardan bir tanesi farklı koşulların, farklı genotipler için optimum olabileceği göz önünde bulundurularak, her genotip için koşulların optimize edilmesidir. Diğer bir yol ise embriyo oluşturma yeteneği yüksek genotipler ile embriyo oluşturma yeteneği düşük genotiplerin melezlenerek, az ya da çok embriyo elde etmeyi sağlamaktır [107].

Mikrospor gelişim evresi, anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli aşamalardan biridir [108,109]. Birçok bitki türünde mikrospor evresinin tomurcuk büyüklüğü ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir [110–113].

Her ne kadar morfolojik niteliklerin anterin alınması için doğru zamanı belirlemede kullanılabileceğini belirten araştırmacılar olsa da tomurcuk büyüklüğü gibi kriterlerin çeşitlere

ve ekolojik koşullara göre değişebileceği dolayısı ile yanıltıcı olabileceği de bildirilmiştir [114,115].

Sıcaklık, ışık şiddeti, günlük ışıklanma süresi, gibi çevresel faktörlerin, başarıyı etkilediği bilinmektedir [116]. Donör bitkilerin uygun koşullarda yetiştirilmesi başarıyı etkilemekte olup, doğal ışık altında gelişen bitkilere ait anterlerin daha sağlıklı polenler içerdiği bildirilmiştir [117].

Anter kültüründe embriyogenezi uyarmada dışardan uygulanan stres etkenlerinin etkili olduğu, yüksek ya da düşük sıcaklık şoklarının farklı sürelerde uygulanmasının başarıyı etkilediği bildirilmiştir [118,119]. Düşük sıcaklık uygulamasının ise en etkili yöntem olduğu tespit edilmiştir [120-123].

Bitki büyüme hormonları bitkide sentezlenen ve düşük konsantrasyonlarda dahi önemli etkileri olan organik maddelerdir. Doğal olarak sentezlenen bitki büyüme hormonlarının yanı sıra benzer fizyolojik aktiviteleri gösterebilen sentetik yapıdaki bileşikler de üretilerek kullanıma sunulmaktadır. Doğal olarak sentezlenebilenlerin yanı sıra sentetik olarak da sentezlenebilen bu maddeler bitki büyüme düzenleyicileri olarak isimlendirilmektedir [124]

Oksin grubu, bitki büyüme düzenleyici hormonlar arasında ilk keşfedilen hormon grubu olup 1928 yılında tespit edilmiş ilk oksin indol asetik asit (IAA) olarak tanımlanmıştır [125,126]. Sitokininler ise 1955 yılında Miller ve arkadaşları tarafından oksin üzerine devam eden çalışmalar esnasında tespit edilmiş ve oksin duyarlılığını dengelediği ve oksin ile hücre bölünmesini teşvik ederek hücrelerin farklılaşmasında ve koordinasyonunu sağlamada etkili olduğu belirlenmiştir [127-130].

Çeşitli çalışmalarda sitokininin sürgün oluşumunu teşvik ederek dişi gametofit gelişimini arttırdığı fakat yanal köklerin oluşumunu engelleyerek kök büyümesini baskıladığı, oksinin ise tam tersi etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [128,130,131]. Kinetin (N - (furan-2-ilmetil) -7 H - pürin-6-amin), yapılan in vitro çalışmalar ile kalsiyum akışının uyarılmasında, gen ekspresyonunda ve hücre döngüsünde etkili olduğu belirlenen ve sitokininlerden elde edilen ilk sentetik hormon olup, hücre bölünmesini teşvik ettiği için bu şekilde adlandırılmıştır [127,132-136].

Rejenerasyonu istenilen şekilde yönlendirebilmek amacı ile çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri kullanılır. Bunlardan bazıları büyüme ve gelişmeyi teşvik ederken bazıları ise engellemektedir. Bitkilerin hangi amaçla kültüre alındıkları önemli olup türlerine göre besi ortamına eklenecek bitki büyüme düzenleyicilerinin oranları değişiklik göstermektedir [137].

Bitki doku kültürü çalışmalarında bitki büyüme düzenleyicileri kök-sürgün ve yumru oluşumunu uyarmak amacı ile kullanılmaktadır. Kültür çalışmalarının değişik aşamalarında dahi anterlerin ihtiyaçları farklılık göstermektedir. Örneğin gametofitik dokuları sporofitik geliştirmeye yönlendirilmede besi ortamı içerisinde oksinlere ihtiyaç duyulurken, bitkicik oluşumu için ise sitokininlerin varlığı gerekmektedir. Aktif kömür gibi besi ortamı içerisine

eklenebilen katkı maddeler ile çeşitli amino asitler de başarı şansını arttırmak amacıyla kullanılmaktadır [107].

Doku kültürü işlemlerinde öncelikle uygun besi ortamının belirlenmesi gerekmektedir. Bitki doku kültürü çalışmalarında birçok besi ortamı kullanılmakla beraber en sık kullanılan besi ortamı yüksek tuz konsantrasyonuna sahip “MS” olarak adlandırılan, Toshio Murashige ve Folke K. Skoog adlı bitki bilimciler tarafından 1962 yılında geliştirilen besi ortamıdır. Gamborg ve arkadaşları tarafından geliştirilen “B5” adı verilen ve yüksek nitrat azotu içeren besi ortamı ile “NN (Nitsch ve Nitsch)”, “LS (Linsmaier ve Skoog)” gibi çeşitli besi ortamları da kullanılabilmektedir [138,139].

2.5. Baklagillerde Doku Kültürü Çalışmaları

Gamborg ve ark. (1974), bezelye (*Pisum sativum* L.) ile yaptıkları çalışmada 2-5.0 μM BAP (6-Benzylaminopurine) ve 1.0 mM NAA (1-Naphthylacetic acid) içeren agarlı besi ortamında bitkiye ait apikal hücreleri kültüre alarak kallus ve sürgün elde etmeyi başarmış fakat etkin bir köklenme sağlayamamışlardır [138].

Mroginski ve Kartha (1981), çalışmalarında eksplant kaynağı olarak in vitro elde edilen bezelye yapraklarını kullanmışlardır. 0.1, 1 ve 10 μM BAP ve NAA içeren B5 besi ortamlarına aktarılan örnekler, tüm ortamlarda kallustan sürgün oluştursa da en iyi sonucu 10 μM NAA ve BAP ilave edilen besi ortamında elde etmişlerdir [140].

Hussey ve Gunn (1984), bezelye (*Pisum sativum* L.) ile yaptıkları çalışmada 1 mg L⁻¹ BAP ile 4 ve 8 mg L⁻¹ IBA (4-(3-Indolyl) butanoic acid) içeren MS ortamlarına aldıkları eksplantlardan kallus ve sürgün oluşumu gözlemlemişlerdir. Aynı ortamlara 2-4 hafta sonrasında 0.25 mg L⁻¹ IBA eklenmesi ile sürgünlerin rejenere olduğunu ve, 1/2 MS mineralleri, %15 sukroz ve 2 mg L⁻¹ IAA içeren ortamda ise köklenmenin gerçekleştiğini bildirmişlerdir [141].

Rubluo ve ark. (1984), çalışmalarında olgun ve olgunlaşmamış bezelye yaprakçıklarını kullanarak MS besi ortamına farklı konsantrasyonlarda BAP, NAA, IBA ve IAA ilave ederek bu oksin ve sitokininlerin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Sürgün ve tam bitkilerin elde edildiği çalışmada %26 ile %38 arasında değişen sürgün yüzdesi BAP ve NAA içeren besi ortamlarında %7'ye kadar düşerken, araştırmacılar sürgün rejenerasyonunun genotip ve sıcaklıktan da etkilendiğini bildirmişlerdir. [142].

Kysely ve ark. (1987), bezelye (*Pisum sativum* L.) ile yaptıkları çalışmada önce sitokinin daha sonra oksinin dozlarını azaltarak olgunlaşmamış embriyo ve sürgün uçlarından adventif sürgün rejenerasyonunu başarmışlardır. [143].

Polanco ve ark. (1988), mercimekte kallus ve sürgün oluşumu üzerine eksplant kaynağı ve besi ortamının etkisini belirlemek amacı ile birinci boğum, ilk yaprak çifti ve sürgün ucunu

farklı konsantrasyonlarda BAP, NAA, IAA, IBA ve 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) içeren B5 ve MSO (Hormonsuz Murashige ve Skoog basal besi ortamı) besi ortamlarında kültüre almışlardır. Çalışma bulgularında, sürgün oluşumu için en iyi eksplant tipinin boğum olduğunu, BAP'ın sürgün oluşumunu teşvik eden en etkili hormon olsada kök oluşumunu baskıladığını ve en fazla sürgün eldesinin ise 2.25 mg L⁻¹ BAP, 0.186 mg L⁻¹ NAA ve 2.25 mg L⁻¹ IBA içeren MS ortamında gerçekleştiğini bildirmişleridir. [144].

Jackson ve Hobbs (1990), bezelyede (*Pisum sativum* L.) yaptıkları çalışmalarında kotiledon boğumlarını kültüre almışlar ve sürgün ucu sayısının artan sitokinin konsantrasyonu ile arttığını bildirmişlerdir. [145].

Özcan ve ark. (1992), 0.5 mg L⁻¹ BAP, 4 mg L⁻¹ NAA ilave edilen MS besi ortamında bezelyenin olgunlaşmamış kotiledonlarından sürgün elde etmişlerdir. [146].

Polanco ve Ruiz (1997), BAP, Kinetin, GA3 (Gibberellin A3), IAA ve NAA konsantrasyonları içeren MS besi ortamında çimlendirdikleri mercimek tohumlarından 2.25 mg L⁻¹ BAP ortamında kallus elde ederek 0.25 ve 2.25 mg L⁻¹ BAP içeren besi ortamında yüksek oranda sürgün ucu elde etmeyi başarmış ve 2 mg L⁻¹ IAA içeren MS ortamında sürgünlerin köklendirilmesini gerçekleştirmişlerdir. [147].

2.5.1. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*)'de Doku Kültürü Çalışmaları

Mehta (1965), ilk kez fasulyede yapılan doku kültürü çalışması ile kallus oluşumunu bildirmiştir [148].

Haddon ve ark. (1976), tek çekirdekli polen kullanarak kallus oluşumunu bildiren ilk çalışmayı yapmışlardır. Fakat farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile takviye edilmiş besiyerlerinde kültüre alınan anter kalluslarından rejenerasyon elde edememişlerdir. Ayrıca fasulyelerin, doku kültüründe ploidi düzeyi ve morfogenetik potansiyeli üzerine büyüme koşullarının ve dokuların kökeninin etkilerini araştırmışlardır [149].

Crocom, Peters ve ark. (1976), eksplant olarak fasulye yapraklarının kesitlerini, Malik & Saxena, (1991) ise yaprak sapı ve genç yaprakları kullanarak sürgün organogenezi yoluyla bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir [150,151].

Mok ve ark. (1978), yüksek sitokinin konsantrasyonunda büyüyen bir genotipin, optimal düzeyde kallus oluşturabilmesi için benzer ya da daha yüksek oksin konsantrasyonunun gerekli olacağını varsaymış fakat, optimal koşullar ile kallusun rejenerasyon yeteneği arasında bir ilişki olduğuna dair hiçbir kanıt sağlayamamışlardır [152].

Peralte ve ark., (1978)'de bitki büyüme düzenleyicileri olmadan hindistan cevizi sütü ile takviye edilen besi ortamında apikal meristem kültürleri ile bitkileri rejenere ettiğini bildirmişlerdir. [153].

Crocomo ve ark., (1979)'da çalışmalarında farklı oksin ve sitokinin konsantrasyonlarının embriyo eksenlerinin in vitro gelişimini kontrol edebileceğini bildirmişlerdir. [154].

Malmberg (1979), *P. vulgaris*'te rejenerasyon için bir sistem geliştirmeye yönelik ilk adım olarak birçok genetik hattın taranmasını önermiştir. [155].

Kartha ve ark., (1982)'de kriyoprezervasyon çalışmalarında in vitro kültüre alınan meristemlerden bitki rejenerasyonunun araştırılması amacı ile farklı konsantrasyonlarda BAP ilave edilen besi ortamlarında, bitkilerin başarılı şekilde rejenere edildiğini bildirmişlerdir. [156].

Rubluo ve Kartha (1985), çeşitli sıcaklık rejimleri ile bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının bitkide oluşturduğu morfogenetik yanıtı değerlendirerek kültür ortamına BAP ilavesi yapıldığında apikal meristemden bitki rejenerasyonunun gerçekleştiğini belirtmişlerdir. [157].

Benedicic ve ark., (1991)'de tomurcuk indüksiyonunun BAP veya 2iP (N6-(2-Isopentenyl)adenine) ve giberellik asit (GA3) konsantrasyonlarına, sürgün oluşumu ve uzamasının ise sitokin varlığına bağlı olduğunu ortaya koymuşlardır. [158].

Benedicic ve ark. (1991), jasmonik asidin *P. vulgaris*'in sürgün oluşturma yeteneği üzerinde uyarıcı bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir [158].

Farklılaşmamış kallus hücrelerinden sürgün organogenezi için ilk protokol Mohamed ve ark. (1993) tarafından geliştirilmiştir [159]

de Oliveira ve ark. (1994), bazı oksinlerin ve sitokininlerin fasulyesinin olgun anterlerinin in vitro tepkisi üzerindeki etkisini araştırmışlar ve oksinler (2,4-D veya NAA) düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında daha yüksek bir kallus oluşum oranının görüldüğünü, yüksek sitokinin konsantrasyonlarında ise daha çok kök oluşumunun gözlemlendiğini bildirmişlerdir [160].

Fernandez-Caso ve ark., (1996), BAP ve GA3 içeren ortamlarda yaptığı çalışmalar ile sürgün rejenerasyonu için besi ortamını optimize etmiştir [161].

Klu ve ark. (1997), eksplant olarak kullandıkları kotiledon boğum dokularından doğrudan organogenez yoluyla fasulye bitkilerini rejenere ederek histolojik çalışmalar ile sürgünlerin kotiledon boğumunun sub-epidermal hücrelerinden geliştiğini doğrulamışlardır. [162].

Zhang ve ark. (1997), donör bitkinin fizyolojik durumunu değiştirmenin, in vitro rejeneratif kapasiteyi değiştirebilecek yaklaşımlardan biri olduğunu belirtmişlerdir [163]

Santalla ve ark. (1998), *P. coccineus*'un *P. vulgaris*'ten daha yüksek bir rejenerasyon potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir. [164].

Cruz de Carvalho ve ark. (2000), doğrudan organogenez yoluyla fasulye rejenerasyonu için tekrarlanabilir bir ince hücre tabaka yöntemini tanımlamışlardır [165].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

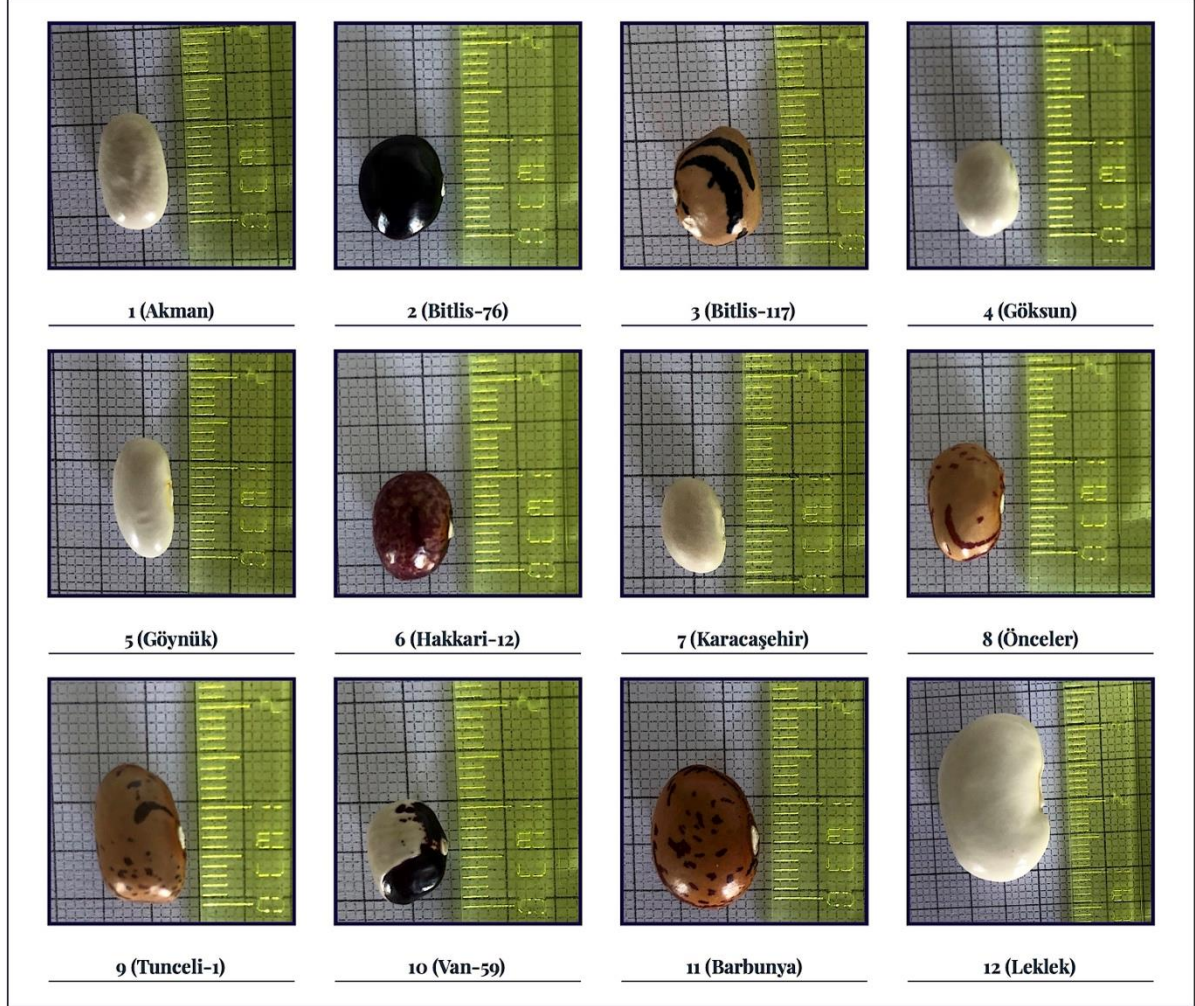
Tez kapsamında 12 fasulye genotipi/çeşidi kullanılmış olup, kullanılan genotiplerin 5'i yerel çeşit ve 5'i ticari çeşitlerden seçilmiştir. 12 fasulye çeşidine ait bilgiler Tablo 3.1. 'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerine/genotiplere ait özellik bilgileri

Numara	Fasulye İsmi	Özellik
1	Akman	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1998 yılında tescil ettirilmiş bir çeşittir Yarı-sarılcı gelişim göstermektedir. 60-70 cm bitki boyuna sahiptir. Hasat olum süresi 115-125 gün olan bir çeşittir.
2	Bitlis- 76	Yerel popülasyondur.
3	Bitlis-117	Yerel popülasyondur.
4	Göksun	Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 2012 yılında tescil ettirilmiş bir çeşittir. Yarı sarılcı gelişim göstermektedir. 90-100 cm bitki boyuna sahiptir. Hasat olum süresi 104-124 gün olan bir çeşittir
5	Göynük	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1998 yılında tescil ettirilmiş bir çeşittir. Bodur-dik gelişim göstermektedir. 45-55 cm bitki boyuna sahiptir. Hasat olum süresi 110-120 gün olan bir çeşittir.
6	Hakkâri-12	Yerel popülasyondur.
7	Karacaşehir	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1990 yılında tescil ettirilmiş bir çeşittir. Yarı-sarılcı gelişim göstermektedir. 50-55 cm bitki boyuna sahiptir. Hasat olum süresi 110-115 gün olan bir çeşittir.
8	Önceler	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1990 yılında tescil ettirilmiş bir çeşittir. Bodur-dik gelişim göstermektedir. 40-50 cm bitki boyuna sahiptir. Hasat olum süresi 105-110 gün olan bir çeşittir.
9	Tunceli-1	Yerel popülasyondur.
10	Van-59	Yerel popülasyondur
11	Barbunya	Niğde ilinin Elmalı kasabasında yetiştiricilerden temin edilmiştir. Yarı-sarılcı gelişim göstermektedir.
12	Leklek	Mersin ilinin Gülnar ilçesinde yetiştiricilerden temin edilmiştir. Yarı-sarılcı gelişim göstermektedir.

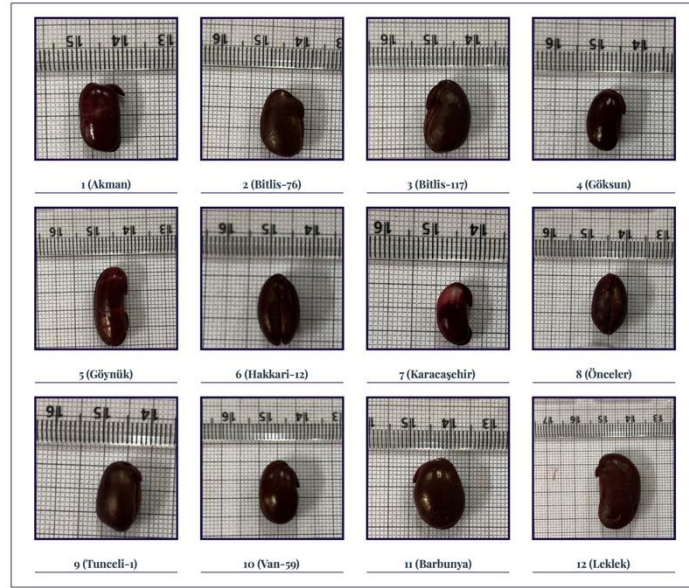
3.2. Tohum Canlılık Tespiti

Çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerine/genotiplere ait tohumlar Şekil 3.1.'de verilmiştir

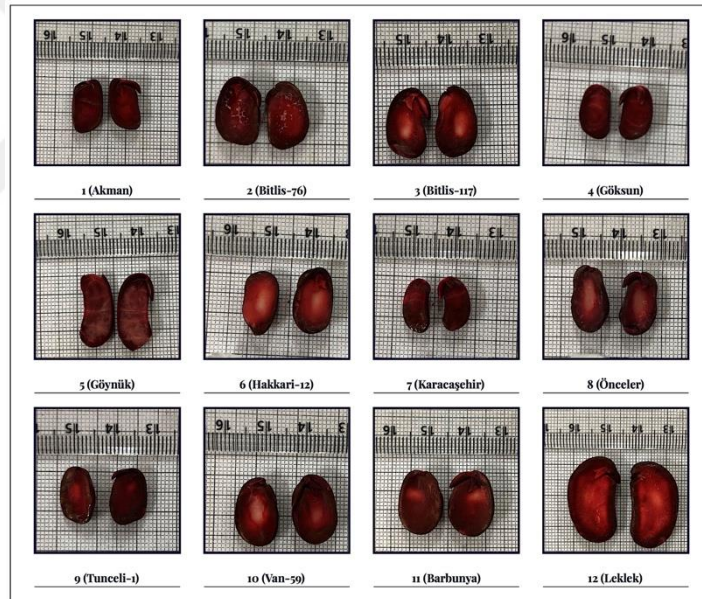


Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan fasulye çeşitlerine/genotiplerine ait tohumların genel görüntüleri (Çeşitlere ait numaralandırmalar Tablo 3.1.'de verilmiştir)

Tohumların canlılıklarının tespiti amacı ile ISTA (1996)'nın önerdiği 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit yöntemi kullanılmıştır [166]. Fasulye çeşitlerine/genotiplere ait tohumlar 24 saat boyunca su içerisinde bekletilmiş ve bu sürenin sonunda tohumların kabukları soyulmuştur. Ardından 1 g L⁻¹ 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit (TTC) solüsyonu içerisine alınarak 24 saat bekletilen tohumların canlılık kontrolleri yapılmıştır (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3.).



Şekil 3.2. Tohum canlılık tespiti için 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit solüsyonu içerisinde bekletilen fasulye çeşitlerine/genotiplerine ait tohumların kapalı iken görüntüleri (Çeşitlerin/genotiplerin numaralandırılmaları Tablo 3.1.'de belirtildiği şekildedir)

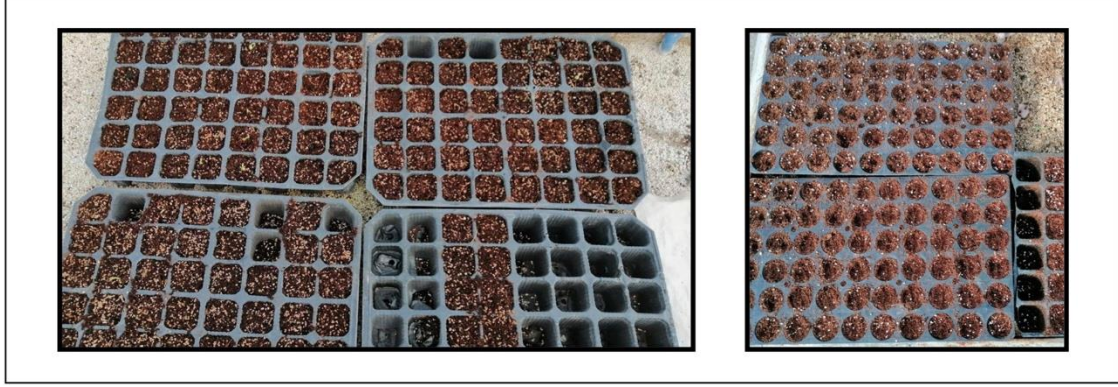


Şekil 3.3. Tohum canlılık tespiti için 2,3,5 trifeniltetrazolium klorit solüsyonu içerisinde bekletilen fasulye çeşitlerine/genotiplere ait tohumların açık iken görüntüleri (Çeşitlerin/genotiplerin numaralandırılmaları Tablo 3.1.'de belirtildiği şekildedir)

3.3. Tohumların Ekilmesi ve Bitkilerin Büyütülmesi

Tablo 3.1'de belirtilen fasulye tohumları tarla koşullarında ortaya çıkabilecek yabancı ot sorunu göz önüne alınarak ve kolay çimlenebilmelerini sağlamak amacı ile Mersin Üniversitesi

serasında öncelikle torf ve perlit (1:1) içeren viyoller içerisine ekilmiş ve çimlenmeye bırakılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Mersin Üniversitesi sera alanında tohumların ekiminin gerçekleştirildiği viyollere ait görüntü

Viyollerde ekimi gerçekleştirilen tohumların 4. günden itibaren çimlenmeye başladığı gözlenmiş olup, ortalama 10-15 günlük süre içerisinde şaşırtılarak saksılara dikilmişlerdir (Şekil 3.5.)



Şekil 3.5. Viyollerde gelişen fasulye bitkilerine ait görüntüler

Şaşırtma işleminden önce budanan bitkiler kırmızı toprak: torf: perlit (1:1:1) içeren, Serinova No:3 marka bahçe saksılarına aktarılmış olup, ilk stresi ortadan kaldırmak ve kök oluşumunu teşvik etmek amacı ile can suyu ve humik fulvik asit uygulaması yapılmıştır. Kırmızı toprak olarak; elenmiş bahçe toprağı, torf olarak; *Sphagnum* yosunundan elde edilen ithal torf (İspanya-Barcelona) ve perlit olarak; 0.4 mm tarım perliti, gübre olarak ise basacote kullanılmıştır. Her saksıda 10 adet bitki ve her bitkinin arasında 20 cm boşluk olacak şekilde bitkiler dikilmiştir. Saksılara alınan bitkiler zararlıların olumsuz etkilerinden korunmaları

amacıyla fungusit (Captan) ve insektisit uygulanmış ve kültürel bakım işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6.).



Şekil.3.6 Saksılara aktarılarak kültürel bakım işlemleri yapılan bitkilerin genel görüntüsü

Saksılara alındıktan 15 gün sonra gelişen ve sarılcı olan bitkiler gölgelik borularına ip gerilerek bağlanmıştır (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Kültürel bakım işlemleri yapılarak iplere gerilen fasulye çeşitlerinin saksıdaki görüntüleri (çeşitlere ait numaralandırılmalar Tablo 3.1.'de verilmiştir)

İklim koşulları ya da zararlıların hasarları dolayısıyla bitki materyallerinin kaybedilme riskine karşı Mersin il sınırları içerisinde 20 cm²'lik bir arazi üzerinde her çeşitten 10 adet tohumun ekimi yapılmış ve ekimi takip eden 4. günden itibaren çimlenmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Arazide tohum ekimini takip eden 4. günden itibaren çimlenmeye başlayan fasulye fidelerinden örnek görüntü

Arazide gelişen bitkilerin düzenli aralıklarla budamaları ve kargılamaları yapılarak gelişimleri gözlemlenmiştir. 12 fasulye çeşidine ait tohumların hepsinin çimlenmesi gerçekleşmiştir ve bitkisel gelişimlerini sürdürmüşlerdir (Şekil 3.9.).



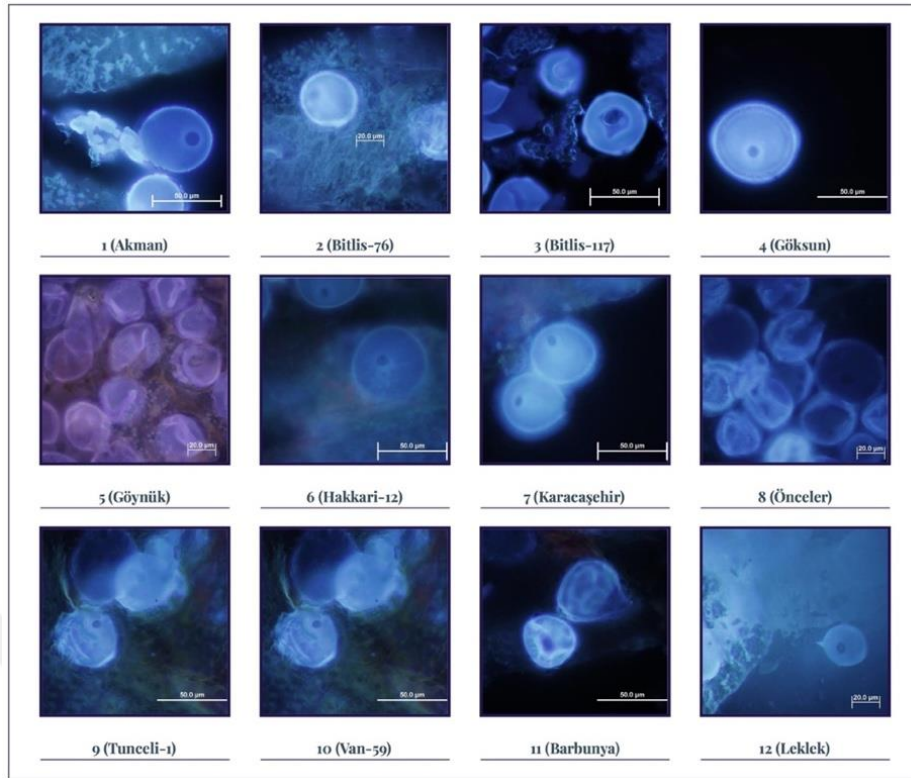
Şekil 3.9. Arazide ekimi yapılan fasulye çeşitlerine ait görüntüler

3.4. Anter Kültürü Denemeleri

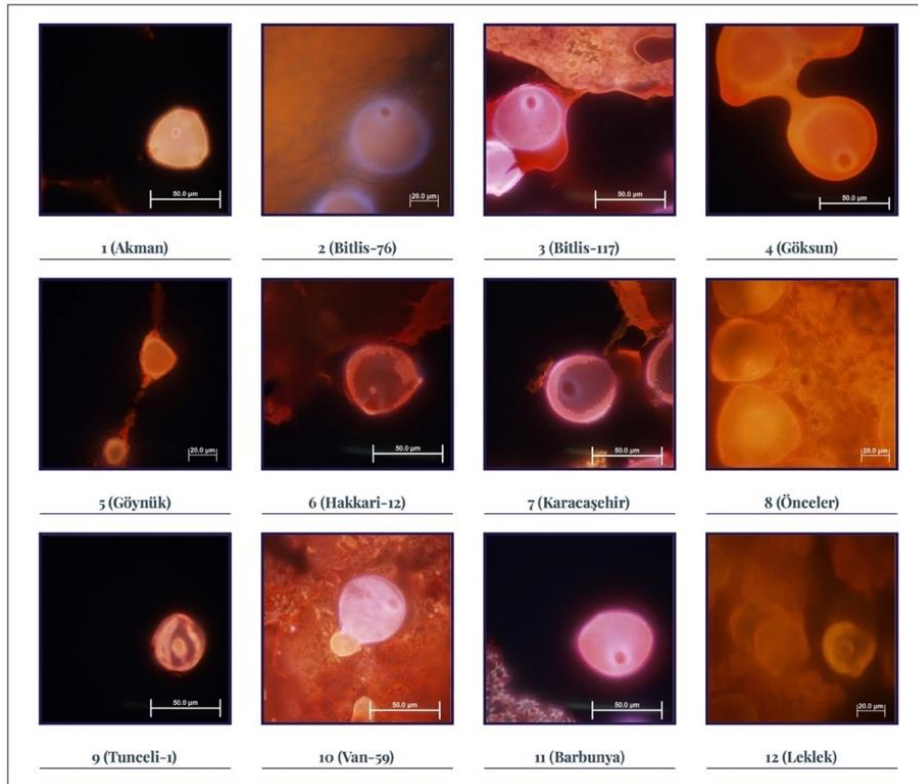
3.4.1. Tek Çekirdekli Mikrospor Evresinin Tespiti

Mikrospor hücrelerinin gelişim aşamaları anter kültürü çalışmalarında başarıyı etkilemektedir. Kültür için en uygun evre mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli olduğu evredir. Androgenezin uyartılmasında, anterlerin verici bitkiden izole edildikleri anda mikrosporların içinde bulunduğu gelişme aşamasının, tek çekirdekli dönemin, orta-geç safhası olması başarı şansını önemli ölçüde etkileyen faktörlerden birisidir [167,168]. Kültüre alınacak mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli olduğu evrenin ve örneklerin ekstrakte edileceği uygun çiçek tomurcuklarının gelişim evreleri belirlenerek, kültür için uygun evre tespit edildikten sonra uygun gelişim evresindeki çiçek tomurcuklarından mikrosporlar izole edilerek kültürleri yapılmıştır.

Tek çekirdekli mikrospor evresinin belirlenmesi için farklı gelişim evresinde ve farklı büyüklükteki tomurcukların çanak ve taç yaprakları diseksiyon mikroskop (Olympus) altında çıkarılarak anterler izole edilmiş ve ezme preparatları hazırlanmıştır. Lam üzerine alınan ve ezilerek lam yüzeyine yayılan örneklerin üzerine 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) solüsyonu damlatılarak lamel kapatılmış ve hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus) incelenmiştir (Şekil 3.10.). Daha sonra örnekler aynı işlem basamakları takip edilerek DAPI boyası yerine asetokarmin boyası damlatılarak floresan mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 3.11.)



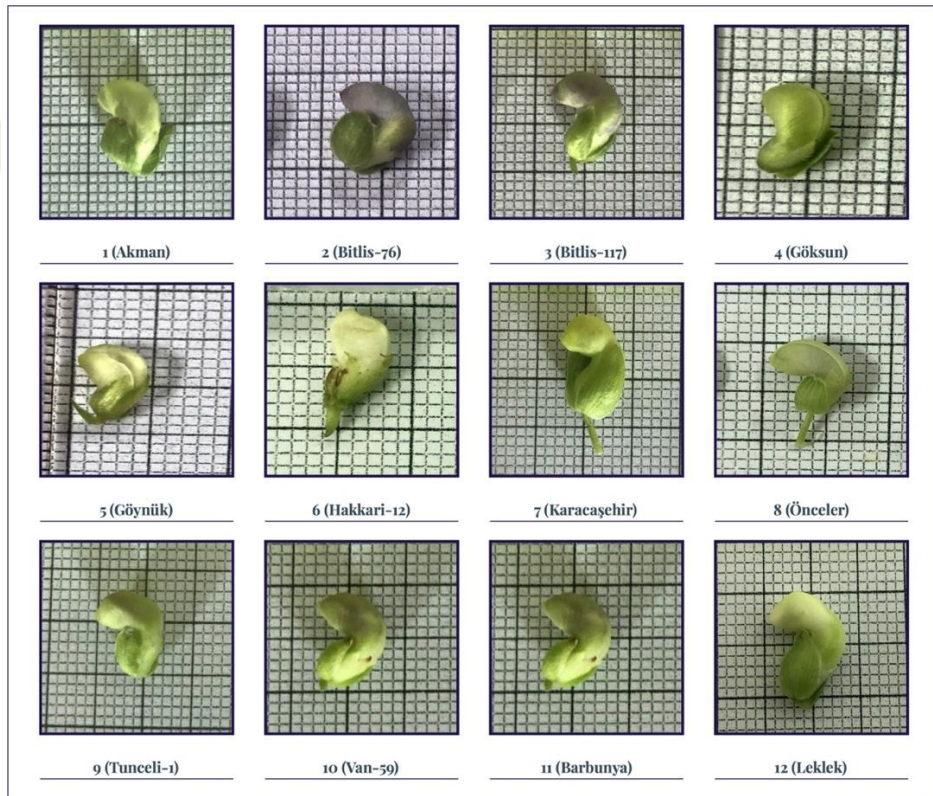
Şekil 3.10. Fasulye çeşitlerine/genotiplerine ait mikrosporlarda tek çekirdekli evrenin DAPI boyama yöntemi ile belirlenmesi (örneklerin numaralandırılmaları Tablo 3.1’de belirtildiği şekildedir; büyütme 100x, filtre: UMB3)



Şekil 3.11. Fasulye çeşitlerine/genotiplere ait mikrosporlarda tek çekirdekli evrenin asetokarmen boyama yöntemi ile belirlenmesi (örneklerin numaralandırılmaları Tablo 3.1’de belirtildiği şekildedir; büyütme 100x, filtre: UMB3)

DAPI boyası 61.5 ml 0.1 M Sitrik asit ile 38.5 ml 0.2 M di-sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) karıştırılarak hazırlanmış daha sonra ise karışıma %1 oranında Triton 100, ilave edilerek 1 ml'lik hacimler halinde $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Asetokarmin boyası (Norateks) kullanıma hazır halde ticari olarak satın alınmıştır.

Test edilen 12 fasulye çeşidi/genotipi için de tek çekirdeklik evrelerine ait tomurcuk büyüklük ve görüntüleri tespit edilmiş olup, yaklaşık 8 -9 mm boyuta sahip olan tomurcuklardan alınan anterlerin mikrospor hücrelerinin tek çekirdekli evrede olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. Tek çekirdekli mikrosporların gözlemlendiği çiçek tomurcuklarının görüntüsü (örneklerin numaralandırılmaları Tablo 1'de belirtildiği şekildedir)

3.4.2. Fasulye Çiçek Tomurcuklarının Yüzey Sterilizasyonu

Anter kültürü için uygun gelişim evresi ve büyüklüğü belirlenen çiçek tomurcukları petri kapları içerisinde $+4^\circ\text{C}$ 'de 2 gün boyunca bekletilerek (Şekil 3.13a) 2 gün sonunda tomurcukların yüzey sterilizasyonu steril kabinde (Şekil 3.13b) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Anter kültür denemesi için tespit edilen uygun büyüklükteki çiçek tomurcukları, toprak ve/veya toz kalıntılarının uzaklaştırılması için musluk suyu altında 30 dk. bekletildikten sonra steril saf su ile birkaç kez yıkanmıştır. Steril kabin içerisine alınan eksplantlar %70' lik EtOH'da 3 dk.

bekletildikten sonra saf su ile yıkanmış daha sonra %25'lik NaOCl (Sodyum hipoklorid)'de 15 dk. çalkalanmıştır (Şekil 3.13c). Steril saf su ile 4-5 kez yıkanarak örneklerin yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.13d). Steril edilen çiçek tomurcuğundaki anterler stereo mikroskop altında (Olympus SZ61, Japonya) izole edilerek doku kültürü çalışmasında materyal olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.13. Yüzey sterilizasyonu işlem basamakları: a: 2 gün soğuk ön uygulaması yapılan tomurcuklar; b: çalışmanın yürütüldüğü steril kabin; c: %25'lil NaOCl içerisinde bekletilen tomurcuklar; d: durulanarak steril hale getirilen tomurcuklar

3.4.3. Anter Kültür Denemesinin Kurulması

Besi ortamı ve aktif karbon uygulamalarının değerlendirilmesi amacıyla Munoz vd., (1993), Oliveire vd., (1994) ve Munoz ve Baudoin (2002)'in önerdiği MS (Ek 2.) ile [139,160,169,170] ayrıca literatürden bazı Fabaceae türlerinin anter kültüründe MS besi ortamına göre daha etkili olduğu bildirilen [97,170,171] B5 (Ek 3.) [172] besi ortamı ile

çalışılmıştır. Besi ortamı bileşenleri olarak uygun şekilde stok çözeltileri hazırlanan (Ek 1.) bitki büyüme düzenleyicileri (Kinetin ve 2,4-D) ve aktif karbon kullanılmış olup, kullanılan besiy ortamı bilgileri Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Anter kültürü denemelerinde test edilen besiy ortamı kombinasyonları

Anter Kültürü Deneme Planı			Bitki Türü
Uygulama Kodu	Kin (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	<i>P. vulgaris</i> (her bir çeşit için uygulanılacak deneme planı)
MS			5 petri (her petride 20 anter eksplantı)
1	0	0	
2	0.5	0.5	
3	0.5	1	
4	0.5	2	
5	1	0.5	
6	1	1	
7	1	2	
8	2	0.5	
9	2	1	
10	2	2	
11	2.5	0.5	
12	2.5	1	
13	2.5	2	
14	3	0.5	
15	3	1	
16	3	2	
17	3	3	
18	3.5	0.5	
19	3.5	1	
20	3.5	2	
21	4	0.5	
22	4	1	
23	4	2	
24	4	4	
B ₅			5 petri (her petride 20 anter eksplantı)
25	0	0	
26	0.5	0.5	
27	0.5	1	
28	0.5	2	
29	1	0.5	
30	1	1	
31	1	2	
32	2	0.5	
33	2	1	
34	2	2	
35	2.5	0.5	
36	2.5	1	
37	2.5	2	
38	3	0.5	
39	3	1	
40	3	2	

Tablo 3.2.(devamı) Anter kültürü denemelerinde test edilen besi ortamı kombinasyonları

40	3	2	5 petri (her petride 20 anter eksplantı)
41	3	3	
42	3.5	0.5	
43	3.5	1	
44	3.5	2	
45	4	0.5	
46	4	1	
47	4	2	
48	4	4	

Tablo 3.3. Anter kültürü denemeleri kapsamında test edilen aktif karbon kombinasyonları

Anter Kültürü (Aktif Karbon Uygulaması) Deneme Planı				Bitki türü
Uygulama Kodu	Kin (mg L ⁻¹)	Aktif Karbon (g L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)	<i>P. vulgaris</i> (her bir çeşit için uygulanılacak deneme planı)
ac1	0	0	0	5 petri (her petride 20 anter eksplantı)
ac2	0.5	0.5	0	
ac3	0.5	0.5	0.5	
ac4	0.5	0.5	1	
ac5	0.5	0.5	2	
ac6	0.5	1	0	
ac7	0.5	1	0.5	
ac8	0.5	1	2	
ac9	1	0.5	0	
ac10	1	0.5	0.5	
ac11	1	0.5	1	
ac11	1	0.5	1	
ac12	1	0.5	2	
ac12	1	0.5	2	
ac13	1	1	0	
ac14	1	1	0.5	
ac15	1	1	2	
ac16	2	0.5	0	
ac17	2	0.5	0.5	
ac18	2	0.5	1	
ac19	2	0.5	2	
ac20	2	1	0	
ac21	2	1	0.5	
ac22	2	1	2	
ac23	0	0.5	0.5	
ac24	0	1	0.5	

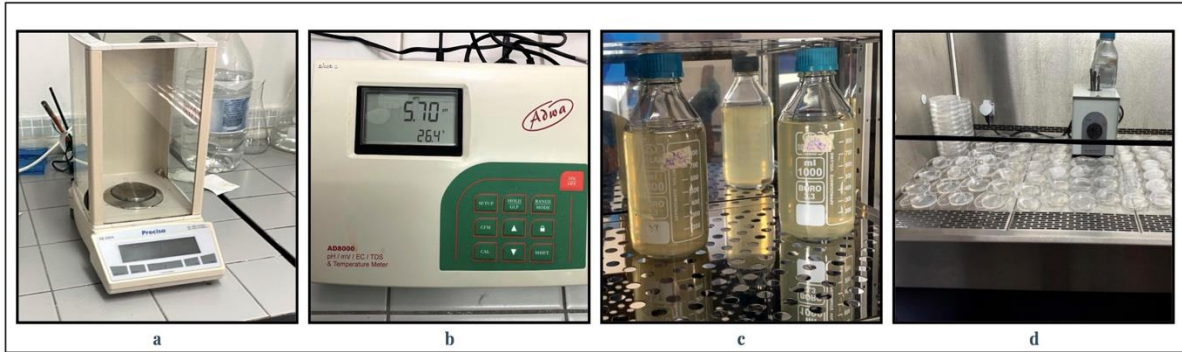
MS besi ortamının hazırlanması:

MS besi ortamı, 4.33 g L⁻¹ MS [139] (Caissonlabs msp09, vitamin içeren), 30 g L⁻¹ süktroz (Caissonlabs s011), ve 7.5 g L⁻¹ agarın (Caissonlabs a038) hassas terazi ile tartılması (Şekil 3.14a) ve araştırmada planlanan büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının ortama eklenmesi ile

hazırlanmıştır. Hazırlanan ortamların pH'ı pH metre ile ölçülerek 5.7-5.8'e ayarlanmıştır (Şekil 3.14b). Besi ortamlarının pH'ı ayarlandıktan sonra agar ilave edilmiştir. Hazırlanan besî ortamları otoklavda 121°C 'de 1 atmosfer basınç altında 15 dk. sterilize edilmiştir (Şekil 3.14c). Sterilizasyon sonrası besî ortamları 60 x 15 mm çapındaki steril petri kaplarına (Isolab) boşaltılmıştır (Şekil 3.14d).

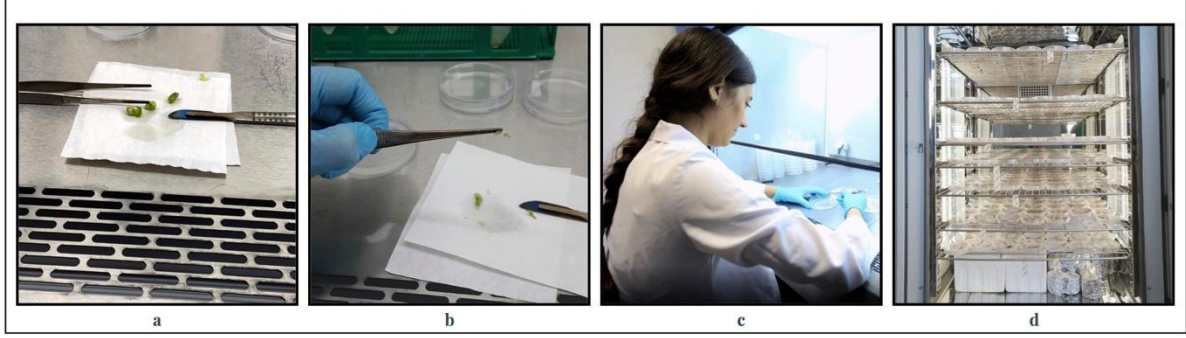
B5 besî ortamının hazırlanması:

B5 besî ortamı, 3.21 g L⁻¹ B5 (Gamborg, 1976) (Caissonlabs gbp05, vitamin içeren), 30 g L⁻¹ süktroz (Caissonlabs s011), ve 7.5 g L⁻¹ agarın (Caissonlabs a038) hassas terazi ile tartılması (Şekil 3.14a) ve araştırmada planlanan büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarının ortama eklenmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan ortamların pH'ı pH metre ile ölçülerek 5.7-5.8'e ayarlanmıştır (Şekil 3.14b). Besi ortamlarının pH'ı ayarlandıktan sonra agar ilave edilmiştir. Hazırlanan besî ortamları otoklavda 121°C 'de 1 atmosfer basınç altında 15 dk. sterilize edilmiştir (Şekil 3.14c). Sterilizasyon sonrası besî ortamları 60 x 15 mm çapındaki steril petri kaplarına (Isolab) boşaltılmıştır (Şekil 3.14d).



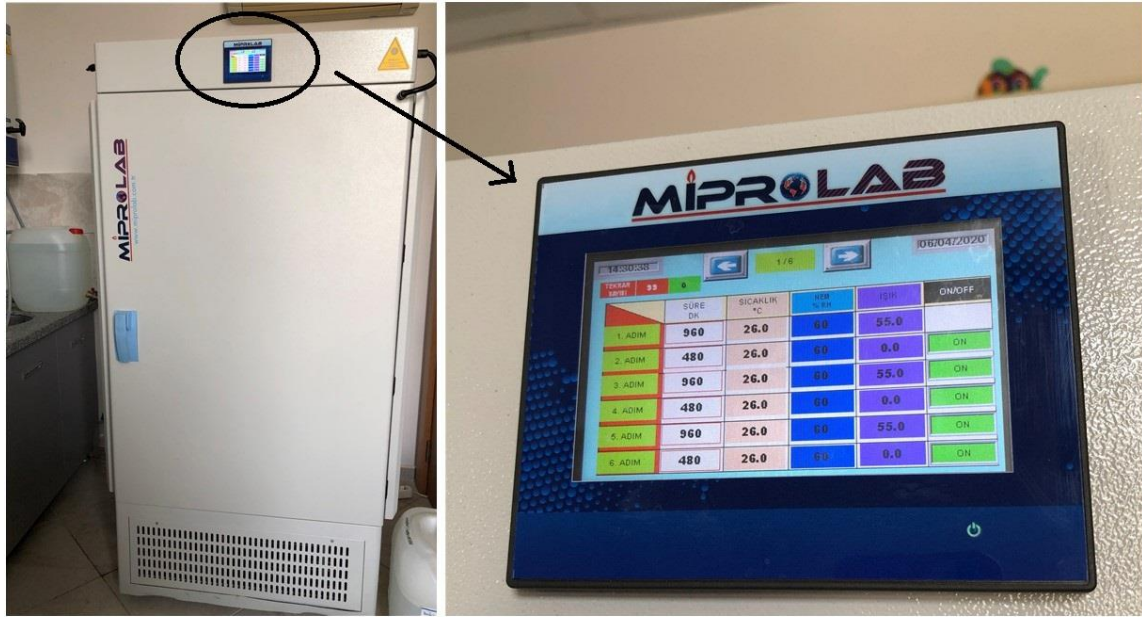
Şekil 3.14. Besi ortamlarının hazırlanmasına ait işlem basamakları: a: tartımların yapıldığı hassas terazi; b: pH'ın 5.7'ye sabitlenmesini gösteren görse; c: otoklavda sterilize edilerek hazır hale getirilen besî ortamlarının şişelerdeki görüntüsü; d: besî yerlerinin steril kabin içerisinde petri kaplarına dökülerek ve donmaya bırakılmasını gösteren görsel

Yüzey sterilizasyonu tamamlanmış olan çiçek tomurcuklarının (Şekil 3.15a) çanak ve taç yaprakları dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır (Şekil 3.15b). Anterlerin filamentleri anterlere zarar vermeden çıkarıldıktan sonra besî ortamına yerleştirilmiştir (Şekil 3.15c). Petrilerin etrafı parafilm ile sarılmıştır. Karanlık koşulların sağlanması amacıyla anterleri içeren petriler kallus oluşumu gözleninceye kadar strafor köpükler içerisine alınmış ve 26±1°C'de iklim odasında muhafaza edilmiştir (Şekil 3.15d).



Şekil 3.15. Anterlerin besiy ortamlarına aktarılması: a: yüzey sterilizasyonu tamamlanarak steril filtre kâğıdı üzerine alınan tomurcuklar; b: çanak ve taç yaprakları çıkarılarak tomurcuktan izole edilen anterler; c: anterlerin besiy ortamı üzerine yerleştirilmesi; d: iklim dolabının genel görüntüsü

Kallus oluşumu gözlenen petriler strafor köpükten alınarak $26\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de, 3000-4000 lüks ışık yoğunluğunda, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ışıklandırma süresine sahip iklim dolabında kültüre alınmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Örneklerin kültüre alındığı iklimlendirme kabini ve iklim koşullarının görüntüsü

Her bir çeşit için kallus oluşumunu hangi besiy ortamının teşvik ettiğinin belirlenmesine yönelik PHP 7.4 üzerinde Laravel Framework 6 ve Vue.js 2 kullanılarak 'Medium Organizer' isimli web uygulaması geliştirilmiştir. Veritabanı olarak MariaDB 10.4 kullanılmıştır. Uygulamanın geliştirilmesinde, besiy ortamları ve bu ortamlara ekimi gerçekleştirilen anterlerin ait olduğu fasulye çeşitlerinin kayıtlarının düzenli bir şekilde kaydedilmesi, saklanması ve gerekli istatistiklerin oluşturulması amaçlanmıştır.

Uygulamanın planlanmasında izlenen basamaklar şu şekildedir;

- a. Düzenleme sayfası üzerinde denemesi gerçekleştirilen 48 adet besi ortamı belirlenen uygulama kodları ile liste şeklinde adlandırılmıştır. Aynı şekilde çalışılan fasulye çeşitleri ise ayrı bir liste olarak 1'den 12'ye kadar numaralandırılmıştır. Çalışılan besi ortamının liste üzerinden seçilmesinden sonra, bu ortamda ekimi gerçekleştirilen fasulye çeşidi de listeden seçilerek eşleştirilmiştir (Şekil 3.17.)

The screenshot shows the 'Medium Organizer' web application interface. On the left, there is a list of 'Besin Ortamları' (Growth Media) numbered 1 to 12. The number '2' is highlighted in blue. On the right, there is a section titled 'KN(0.5) AK(0.5)' with a sub-section 'Fasulye Çeşitleri' (Bean Varieties) numbered 1 to 12. The number '4' is highlighted in blue. Below the 'Fasulye Çeşitleri' list, there is a red arrow pointing to the text '2-Seçilen ortamda çalışılan fasulye çeşidi ile uygun eşleşme yapıldı.' (A suitable match was made with the bean variety worked in the selected medium). Below this, another red arrow points to the text '1-Besin ortamlarının seçimi yapıldı.' (Selection of growth media was made).

Şekil 3.17. Medium Organizer isimli web uygulaması üzerinde uygun besi ortamı ile fasulye çeşidinin eşleştirilmesi

- b. Uygun seçim yapıldıktan sonra açılan panelde çalışılan örneğin tipi (anter) seçilerek her petri için bir kart eklenmiştir. Kart üzerine kallus oluşumu gözlenen anter sayısı kaydedilmiştir (Şekil 3.18.)

The screenshot shows the 'Medium Organizer' web application interface. On the left, there is a list of 'Besin Ortamları' (Growth Media) numbered 1 to 12. The number '2' is highlighted in blue. On the right, there is a section titled 'KN(0.5) AK(0.5)' with a sub-section 'Fasulye Çeşitleri' (Bean Varieties) numbered 1 to 12. The number '4' is highlighted in blue. Below the 'Fasulye Çeşitleri' list, there is a red arrow pointing to the text '1-Çalışılan petriye göre uygun seçim yapıldı.' (A suitable selection was made according to the petri dish worked). Below this, there are two panels: 'Ovarium 1' and 'Anther 1'. Each panel has a 'Kallus sayısı' (Callus count) input field and a 'Kaydet' (Save) button. The 'Ovarium 1' panel has a value of '4' and the 'Anther 1' panel has a value of '5'. Below these panels, there is a red arrow pointing to the text '2-Açılan kartlar üzerinde kallus oluşumu gerçekleşen örnek sayısı kaydedildi.' (The number of samples in which callus formation occurred on the opened cards was recorded).

Şekil 3.18. Medium Organizer isimli web uygulaması üzerinde gelişen kallus sayılarının kaydedilmesi

- c. Kaydedilen veriler istatistik hesaplamaların yapılması amacı ile depolanmıştır.

3.5. Kültürdeki Anter Örneklerinde Çekirdek ve Hücre Bölünmelerinin Mikroskopik Olarak Gözlenmesi

Kültüre alınan anter örneklerinde çekirdek ve hücre bölünmelerinin gerçekleşip gerçekleşmediğinin incelenmesi için mikroskopik gözlemler yapılmıştır. Kültüre alınan anter örneklerinin kültürdeki 14., 21. ve 28. gününde örnekler steril kabin içerisinde lam üzerine alınarak DAPI ve asetokarmin boyası ile boyanmış, oluşturulan preparatlar floresan mikroskopunda (Olympus BX51, Japonya) incelenmiştir.

3.6. Embriyogenik Kallus Eldesine Yönelik Çalışmalar

Gelişimlerinin 4. haftasından itibaren gelişen kallus örnekleri hem bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS besi ortamında hem de farklı rejenerasyon ortamlarında (Tablo 3.4) kültüre alınmıştır.

Tablo 3.4. Embriyogenik kallus eldesi için hazırlanan besi ortamları

MS	
M₁	MS (Kontrol)
M₂	Murashige & Skoog Shoot Multiplication Medium (HiMedia, PT022)
M₃	Sukroz (20 g L ⁻¹)
M₄	IAA (2 mg L ⁻¹) + NAA (1 mg L ⁻¹) + 2,4-D (1 mg L ⁻¹) + Kinetin (0.2 mg L ⁻¹)
M₅	ABA (2 mg L ⁻¹)
M₆	TDZ (1.0 mg L ⁻¹)
M₇	BAP (2.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (2 mg L ⁻¹)
M₈	BAP (2.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (6 mg L ⁻¹)
M₉	BAP (6.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (2 mg L ⁻¹)
M₁₀	BAP (6.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (6 mg L ⁻¹)
M₁₁	BAP (4.0 mg L ⁻¹) + NAA (1.0 mg L ⁻¹)
M₁₂	BAP (5.0 mg L ⁻¹) + NAA (1 mg L ⁻¹)
M₁₃	BAP (10.0 mg L ⁻¹) + NAA (0.5 mg L ⁻¹)
M₁₄	NAA (1.0 mg L ⁻¹) + ABA (1.0 mg L ⁻¹) + Glutamine (0.5 mg L ⁻¹)
B5	
B₁	B5 (Kontrol)
B₂	Sukroz (20 g L ⁻¹)
B₃	IAA (2 mg L ⁻¹) + NAA (1 mg L ⁻¹) + 2,4-D (1 mg L ⁻¹) + Kinetin (0.2 mg L ⁻¹)
B₄	ABA (2 mg L ⁻¹)
B₅	TDZ (1.0 mg L ⁻¹)
B₆	BAP (2.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (2 mg L ⁻¹)
B₇	BAP (2.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (6 mg L ⁻¹)
B₈	BAP (6.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (2 mg L ⁻¹)

Tablo 3.4. (devamı) Embriyogenik kallus eldesi için hazırlanan besi ortamları

B₈	BAP (6.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (2 mg L ⁻¹)
B₉	BAP (6.0 mg L ⁻¹) + Adenin Sülfat (6 mg L ⁻¹)
B₁₀	BAP (4.0 mg L ⁻¹) + NAA (1.0 mg L ⁻¹)
B₁₁	BAP (5.0 mg L ⁻¹) + NAA (1 mg L ⁻¹)
B₁₂	BAP (10.0 mg L ⁻¹) + NAA (0.5 mg L ⁻¹)
B₁₃	NAA (1.0 mg L ⁻¹) + ABA (1.0 mg L ⁻¹) + Glutamine (0.5 mg L ⁻¹)

3.6.1. Elde Edilen Kalluslardan Embriyogenik Hücre Yapılarının Mikroskopik Olarak Gözlenmesi

Anter kültür denemesinden elde edilen kallusların embriyogenik gelişim göstermeye yatkınlıklarının belirlenmesi amacı ile asetokarmin boyaması ile preparatları hazırlanmış ve hücre şekillerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri alınarak kaydedilmiştir.

3.7. Histolojik Analizler

Anter denemelerinde gelişim gösteren farklı gelişim evresindeki kallus örneklerinin (1., 2. ve 3. aylar) histolojik gelişimlerinin gözlenmesi amacı ile anter kültürünün 1., 2. ve 3. ayında bulunan kallus örnekleri fiksasyon solüsyonu (FPA: formaldehit: propiyonik asit: alkol; 900 ml %70'lik alkol + 50 ml propiyonik asit +50 ml formaldehit) içerisine alınmıştır. Johansen (1940) ve Eti (1990, 1991)'in önerdiği protokole göre parafin blok içerisine hapsedilen kallus örnekleri tahta bloklar üzerine yerleştirilerek mikrotom cihazı (Leice RM 2125 RT Almanya) ile 10 micron çapında örnekler alınmıştır [173–175]. Ilık suda yüzdürülen örnekler lam üzerine alınarak kurutulduktan sonra hematoksin boyama yöntemi ile boyanarak floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) altında incelenmiştir. Parafin blok analizi yapılmış ve gelişim görüntüleri eksplantlar üzerindeki büyüme noktaları, vakuol büyüklükleri, kallus dokuları arasındaki farklılıklar, epidermis dokuları ve farklı embriyo aşamaları bakımından incelenerek kayıt altına alınmıştır.

3.8. Aday Haploid Bitkilerin Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi ve Flow Sitometri Analizleri

Steril kabin içerisinde haploid aday bitkilerden ploidi seviyelerini belirlemek amacı ile in vitro aşamada yaprak örnekleri alınarak nemli steril filtre kağıtları bulunan petri kapları içerisine alınmış ve flow sitometri analizinin yapılacağı Mersin'de bulunan T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'ne flow sitometri analizi için getirilmiştir. Flow sitometri analizinde cihazın optik okuyucusundan geçen DNA miktarları ile bitkilerin ploidi düzeyleri karşılaştırılarak yorum yapılmaktadır. Flow sitometri analizinde kit (CyStain UV

Precise P, Sysmex, Amerika) kullanılarak analiz sonucunda, elde edilen pikler ve grafikler Tuna (2016)'ya göre yorumlanmıştır [176].

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Anter kültür denemesi boyunca; (1) anter canlılığı (%)- anter kültürü boyunca canlı kalan anter sayısının kültüre alınan toplam anter sayısına oranlanması ile saptanmıştır (2) embriyoid ve/veya kallus oluşturma oranı- reaksiyon gösteren anter sayısının kültüre alınan toplam anter sayısına oranlanması ile saptanmıştır. Anter eksplantlarının kallus/embriyo oluşturma oranlarına (Reaksiyon oranı), besi ortamları ana parsel, genotipler alt parsel olarak dikkate alınarak tesadüf parsllerinde bölünmüş parseller deneme desenine uygun olarak MSTAT-C istatistik paket programında varyans analizi uygulanmıştır. Yüzde olarak saptanan anter reaksiyon oranı değerlerine varyans analizi uygulanmadan önce, verileri normal dağılıma uygun hale getirmek için açı transformasyonu ($\text{Arcsin } \sqrt{x + 0.5}$) uygulanmıştır. İstatistiksel olarak önemli çıkan faktör ortalamaları $P \leq 0.05$ olasılık sınırları içinde Tukey testi ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada materyal olarak kullanılan 12 farklı fasulye çeşidine ait anterlerin farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeriğine sahip kültür ortamlarında rejenerasyon cevapları araştırılmıştır.

4.1. Uygun Tomurcuk Büyüklüğünün Tespiti ve Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonu

Uygun tomurcuk büyüklüğünün tespiti anter kültüründe başarıyı ciddi oranda etkilemektedir [108]. Tek çekirdekli mikrospor evresindeki tomurcuk, şekil ve boyutları değerlendirilerek yapılan fenotipik gözlemler ile de tespit edilebilmektedir [177]. DAPI ve asetokarmin boyama yapılarak hazırlanan farklı gelişim dönemlerindeki çiçek romurcuklarından izole edilen anterlere ait ezme preparatların floresan mikroskop altında incelenmesi ile mikrosporların tek çekirdekli evrede olduğu uygun tomurcuk büyüklüğü tespit edilmiştir. Buna göre, araştırılan her 12 genotipte de yaklaşık 8 ila 9 mm büyüklükteki tomurcuklarda bulunan mikrosporların tek çekirdekli evrede olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.12.).

Çeşitli çalışmalar soğuk stresine maruz bırakılan mikrosporların katlanmış haploid bitki oluşturma çalışmalarında daha iyi sonuç verdiğini ortaya koymuştur [97,108]. Bu amaçla tek çekirdekli evrede bulunan mikrosporları içeren uygun büyüklükteki tomurcuklar 2 gün süreyle +4°C'de soğuk uygulamasına maruz bırakılarak gametofitik gelişimin engellenmesi ve polen embriyogenezinin tetiklenmesi amaçlanmıştır.

Doku kültürü çalışmalarında, besi ortamı ya da deney materyalinde bakteri, mantar maya vb. mikroorganizmaların varlığı kontaminasyon olarak kabul edilmekte olup, doku kültürü çalışmalarında ciddi kayıplara sebep olmaktadır [178]. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan besi ortamları farklı besi maddeleri, vitamin ve minerallerin yanı sıra çeşitli şekerlerin kombinasyonlarını da içermekte olup, bu maddelerin varlığı aynı zamanda kontaminasyona sebep olan bakteri ve mantarların da gelişimini hızlandıran etkiye sebep olmaktadır. Bakteri ve mantarlar bitki doku kültürü çalışmalarında kontaminasyona sebep olarak sağlıklı çalışmaların yürütülmesine engel olan bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır [179]. Hızlı büyüme gösteren bu mikroorganizmalar kültür ortamını istila ederek besi ortamını tüketmekte, bitki dokusunun gelişimini engellemenin yanı sıra çeşitli toksik etkilere sebep olabilecek maddeler üreterek dokunun ölümüne de sebep olabilmektedir.

Oluşabilecek olası kontaminasyonların engellenmesi amacıyla çalışmalar steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiş ve kültüre alınacak olan anterlerin izole edileceği tomurcuklar, kullanılacak alet ve ekipmanlar steril edilmiştir.

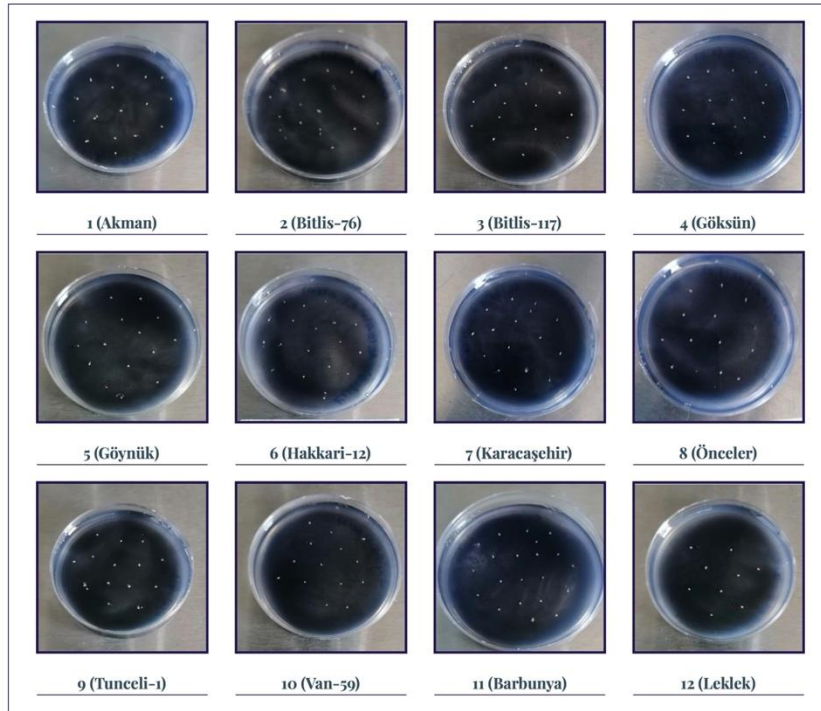
Tomurcukların yüzey sterilizasyonu aşamasında kullanılacak kimyasalın dozunu ve süresini optimize edebilmek, canlı dokuların zarar görmemesi açısından önem arz etmektedir. Kullanılan doku ve hücrelerin canlı kalabileceği bununla beraber kontaminasyon oluşumunu da engelleyecek dozda kimyasalları içeren sterilizasyon yöntemi çalışmanın başarısını olumlu yönde etkileyecektir. Tomurcukların yüzey sterilizasyonu aşamasında öncelikle %20'lik NaOCl kullanılmış, fakat kültüre alma sonrası kontaminasyon oluşması sebebiyle %25'lik NaOCl denenmiştir ve kontaminasyon durumunun oluşmadığı görülmüş ve yüzey sterilizasyonu çalışmada kullanılan tüm genotipler için optimize edilmiştir.

4.2. Anter Kültürü Denemeleri

Uygun şekilde strese maruz bırakılan tomurcuklar optimize edilen yüzey sterilizasyonu ile steril hale getirilmiştir. Steril kabin içerisinde sterilizasyon işlemi tamamlanan tomurcukların taç yaprakları pens ve bistüri yardımı ile dikkatlice açılarak anterlerizole edilmiş ve Tablo 3.2. ve Tablo 3.3.'te belirtilen besi ortamlarını içeren petri kaplarına dikkatlice yerleştirilmiştir. Munoz vd., (1993) yaptıkları haploidizasyon çalışmasında Colomba ve Meksika orijinli 3 yabancı tip *P. vulgaris* ve 1 Rwanda orijinli *P. coccineus* kültür çeşidi kullanarak, 2,4-D ve Kinetin büyüme düzenleyicilerinin, mikrospor gelişim aşamasının ve ayrıca petri kabı genişliğinin (55 mm) anter kültürü başarısında önemli olduğunu belirtmişlerdir [169] . Bu nedenle, bu tez kapsamında anter kültüründe 60 mm Petri kapları kullanılmış ve anterlerden elde edilen kallus örneklerinin rejenerasyonu çalışmalarında ise 90 mm Petri kabı kullanılmıştır.

4.2.1. Aktif Karbon Denemeleri

Farklı konsantrasyonlarda kinetin, 2,4-D ve aktif karbon içeren besi ortamlarında kültüre alınan anter dokuları kültür ortamlarında periyodik olarak gözlemlenmiştir. Aktif karbon içeren besi ortamlarının hiçbirinde kallus oluşumu gerçekleşmemiştir (Şekil 4.1.).



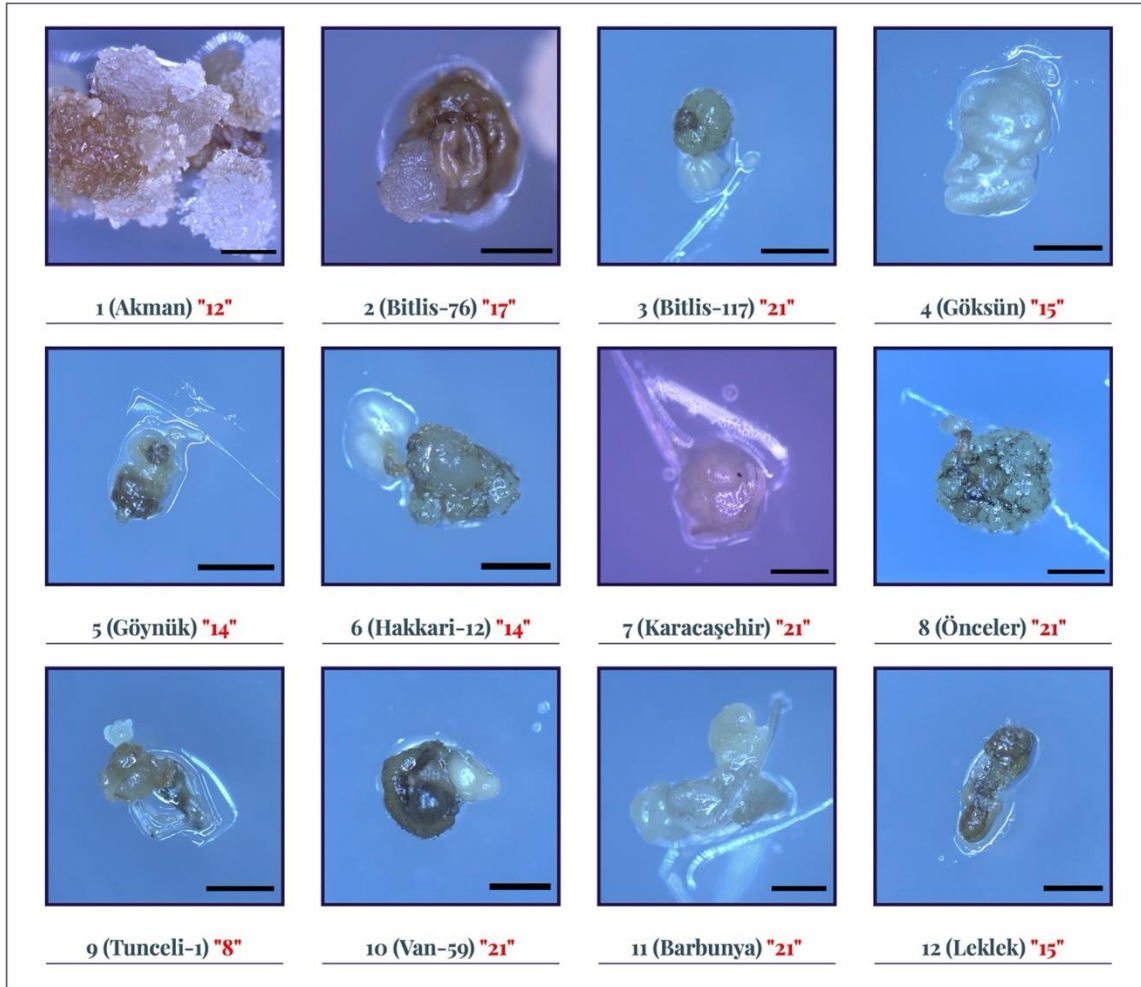
Şekil.4.1. Aktif karbon içeren besi ortamında kültüre alınan anterlere ait petri görüntüleri

Fasulyeye ait apikal meristemlerin kullanıldığı bir araştırmada antioksidan içeren besi ortamlarının antioksidan içermeyenlere kıyasla rejenerasyon sıklığı ve çoklu sürgün gelişimini önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan farklı antioksidanlar içerisinde etkili olanların gümüş nitrat ve aktif kömür olduğu bildirilmiş olup, rejenerasyon sıklığında aktif karbonun %16'lık bir artış sağladığı rapor edilmiştir [180]. Edinilen bilgiler ışığında sunulan bu tez kapsamında farklı dozlarda aktif karbon içeren besi ortamlarında anter kültürü denemeleri yapılmış olsa da 12 genotipe ait anterler ile yapılan kültür denemelerinin hiçbirinde gelişim gözlenmemiştir. Aktif karbonun test edilen fasulye genotiplerine ait anterlerde kallus gelişimini inhibe etmiş olabileceği düşünülmektedir. Aktif karbon, in vitro kültürde eksplant kaynaklı fenol bileşiklerini adsorbe ederek söz konusu bileşiklerin bitki hücrelerine zarar vermesini önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak, aktif karbon aynı zamanda besi ortamında başta büyüme düzenleyicileri olmak üzere diğer besi ortamı komponentlerini de adsorbe edebilmekte ve eksplanların bu besi ortamı komponentlerinden yararlanmasını engellemektedir. Bu tez çalışmasında da aktif karbonun böyle bir olumsuz etkisi ortaya çıkmış olabilir.

Çeşitli kültür ve yetiştirme koşulları, kültüre alınan eksplantın fizyolojik durumu ve genotip, doku kültüründe kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkili temel faktörlerdendir [181]. Genotip tüm baklagillerde olduğu gibi fasulye için de rutin bir rejenerasyon protokolünün geliştirilmesindeki zorluğun altında yatan önemli sebeplerden biridir [34]. Doku kültürüne reaksiyon açısından fasulyenin son derece yüksek çeşitliliğe sahip olduğu bilinmektedir.

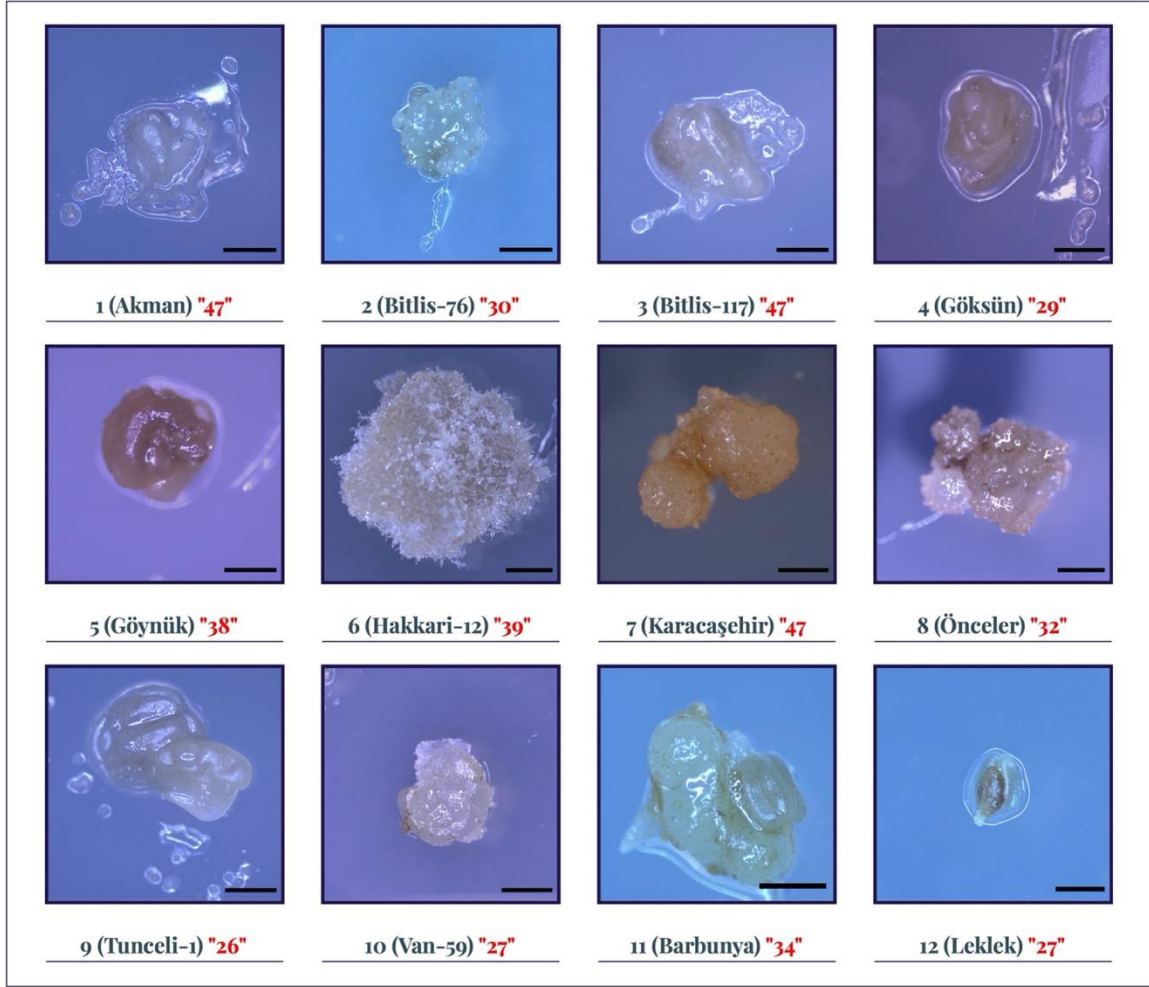
4.2.2. Seçilen Fasulye Genotiplerine Ait Anter Örneklerinin Farklı Konsantrasyonlarda 2,4-D ve Kinetin içeren B5 ve MS Besi Ortamı Kombinasyonlarında Gelişimi

Wodzici (1978) yılında yaptığı çalışmada, fasulye bitkisindeki endojen oksin seviyesinin mevsimsel olarak değişmesinin, kallus indüksiyonunu etkilediğini belirtmiştir [182]. Farklı bilim insanları da benzer şekilde farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşitli eksplantlarda hücre poliferasyonunu indüklediğini rapor etmişlerdir [152,156,183]. Mok ve ark. (1978), yüksek sitokinin konsantrasyonunda büyüyen eksplantın, optimal kallus indüksiyonu için benzer ya da daha yüksek oksin konsantrasyonuna gereksinim duyacağı belirtmiştir [152]. Büyüme düzenleyicilerinin çeşidi, konsantrasyonu, uygulama zamanı ve süresinin hem kültüre reaksiyon ve hem de embriyo morfolojisi açısından spesifik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [184,185]. Bu nedenlerden dolayı, farklı oksin (2,4-D) ve sitokinin (kinetin) konsantrasyonlarını ve kombinasyonlarını içeren MS ve B5 besi ortamları fasulye anter kültürü için denenmiştir. Tez kapsamında çalışılan her 12 genotipe ait anterlerin kültürdeki 4-6. haftada kallus gelişimi gözlenmiş ve gelişen kallus örneklerinin stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) altındaki görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 4.2.). Şekil 4.2.'de MS besi ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kalluslar görülmektedir.



Şekil 4.2. MS besi ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) görüntüleri (siyah rakamlar: genotip numaralarını belirtmekte olup detay Tablo 3.1’de verilmiştir; kırmızı rakamlar: kallus gelişiminin gözlemlendiği besi ortamını belirtmekte olup detay Tablo 3.2.’de verilmiştir; büyütme: 1.2x; ölçek çubuğu 200 µm)

Quintero-Jiménez ve ark. (2010), kültür için kullanılan MS [139] ve B5 [172] besi ortamları arasında, rejenerasyon etkinliği açısından önemli ölçüde farklılık olabileceğini bildirmişlerdir. Eksplant kaynağı olarak embriyonik eksenleri kullandıkları çalışmalarında, B5 ortamı yüksek organogenik sürgün oluşumunu %98-100 ve tüm bitki rejenerasyonunu %93 teşvik ederken, MS ortamında bu oran %15-73 olarak belirlenmiştir [186]. Literatür taramaları sonucu B5 besi ortamının bazı Fabaceae türlerinin anter kültüründe, MS besi ortamına göre daha etkili olduğu bilgisi kazanılmış olup [97,170,171] anterler, belirlenen konsantrasyonlarda kinetin ve 2,4-D içeren B5 besi ortamlarında da kültüre alınmışlardır. Şekil 4.3.’de B5 besi ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kalluslar görülmektedir. Mikroskop görüntülerine göre kallusların anterlerin internal kısımlarından geliştiği gözlenmiş olup, gelişimin mikrospor hücrelerinden olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4.3. B5 besi ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) görüntüleri (siyah rakamlar: genotip numaralarını belirtmekte olup detay Tablo 3.1.'de verilmiştir; kırmızı rakamlar: kallus gelişiminin gözlemlendiği besi ortamını belirtmekte olup detay Tablo 3.2'de verilmiştir; büyütme: 1.2x; ölçek çubuğu 200 µm)

4.3. Anter Reaksiyon Oranı

Toplamda 12 farklı fasulye genotipinin uygun dönemdeki çiçek tomurcuklarından izole edilerek farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonları içeren 48 farklı MS ve B5 besi ortamında kültüre alınan anter eksplantlarının kallus/embriyo oluşturma oranlarına (reaksiyon oranı), besi ortamları ana parsel, genotipler alt parsel olarak dikkate alınarak tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme desenine uygun olarak MSTAT-C istatistik paket programında varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi sonuçları Tablo 4.1.' verilmiştir.

Tablo 4.1. Farklı besi ortamlarında kültüre alınan farklı fasulye genotiplerine ait anterlerin kallus indüksiyon oranı ile ilgili varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F-Değeri
Besi Ortamı	47	1196.862	62.6774**
Hata1	96	19.096	
Genotip	11	456.211	33.1935**
Besi Ortamı x Genotip	517	233.386	16.9809**
Hata2	1056	13.744	
Genel	1727		

** $P \leq 0.01$ Hata Sınırları İçerisinde Önemli

Tablo 4.1.' de izlendiği gibi, besi ortamı ve genotipler reaksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Ayrıca, besi ortamı x genotip interaskiyonunun da istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

Farklı besi ortamlarında saptanan anter reaksiyon oranı ortalamaları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Farklı besi ortamlarında anter reaksiyon oranı ortalamaları (%)

Besi Ortamı Uygulama Kodu	Reaksiyon Oranı	Besi Ortamı Uygulama Kodu	Reaksiyon Oranı
1	0.6 j-l ¹	25	0.7 kl
2	0.0 l	26	3.7 c-k
3	0.0 l	27	1.7 e-l
4	0.6 j-l	28	0.0 l
5	0.6 j-l	29	6.7 b-d
6	0.0 l	30	3.7 c-k
7	0.0 l	31	1.3 h-l
8	4.4 c-j	32	8.7 b
9	1.7 f-l	33	4.4 c-j
10	0.0 l	34	4.6 c-i
11	0.0 j	35	40.5 a
12	2.2 g-l	36	0.6 j-l
13	0.0 l	37	2.4 d-l
14	6.5 c-e	38	5.6 c-h
15	5.2 c-h	39	5.0 c-k
16	0.7 j-l	40	5.2 c-k
17	2.6 e-l	41	4.8 c-g
18	0.0 l	42	3.1 c-k
19	1.7g-l	43	2.4 d-l
20	0.0 l	44	1.5 h-l
21	4.8 c-f	45	4.1 c-j
22	0.0 l	46	0.0 l
22	0.0 l	46	0.0 l
23	3.9 j-k	47	8.1 bc

Tablo 4.2. (devamı) Farklı besi ortamlarında reaksiyon oranı ortalamaları (%)

23	3.9 j-k	47	8.1 bc
24	1.9 i-l	48	2.4 d-l
Ortalama: 3.3			

1) Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Tukey testine göre $P \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde istatistiksel birbirinden farklıdır.

Tablo 4.2.'de izlendiği gibi, kallus oluşturan anterlerin oranı (reaksiyon oranı) besi ortamlarına bağlı olarak %0 ile %40.5 arasında değişmiştir. 35 numaralı besi ortamı %40.5 reaksiyon oranı ortalaması ile incelenen diğer tüm ortamlara göre önemli derecede daha yüksek reaksiyon oranı sağlarken, 32 numaralı ortam 35 ve 47 nolu ortamlar dışındaki ortamlara (Tablo 3.2) göre önemli derecede daha yüksek reaksiyon oranı sağlamıştır. Test edilen ortamlardan 12'sinde anterler hiç reaksiyon göstermemiştir: Anterlerin reaksiyon göstermediği 12 besi ortamından 10 tanesi (Tablo 3.2) MS besi ortamıdır. Tablo 3.2.'de uygulama kodu verilen besi ortamlarından MS besi ortamı ile hazırlanan, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 18, 20 ve 22 numaralı ortamlarda B5 ile hazırlanan ortamlardan 28 ve 46 numaralı ortamlarda reaksiyon gerçekleşmemiştir. Aynı büyüme düzenleyicisi kombinasyon ve konsantrasyon içeriğine sahip farklı basal besi ortamları anter reaksiyon oranını önemli şekilde etkilemiştir. MS kullanılarak hazırlanan ve reaksiyon görülmeyen besi ortamları aynı içerikle B5 kullanılarak hazırlandığında kallus indüksiyonunu teşvik edilmiştir.

Elde edilen bulgular literatürdeki bazı Fabaceae türlerinin anter kültüründe MS besi ortamına kıyasla B5 ortamının daha etkili olduğu [97,170,171] bulgusuyla tutarlılık göstermektedir.

Test edilen fasulye genotiplerde reaksiyon oranı % 1.3 ile % 6.3 arasında değişmiş olup tüm genotipler reaksiyon göstermiştir (Tablo 4.3.).

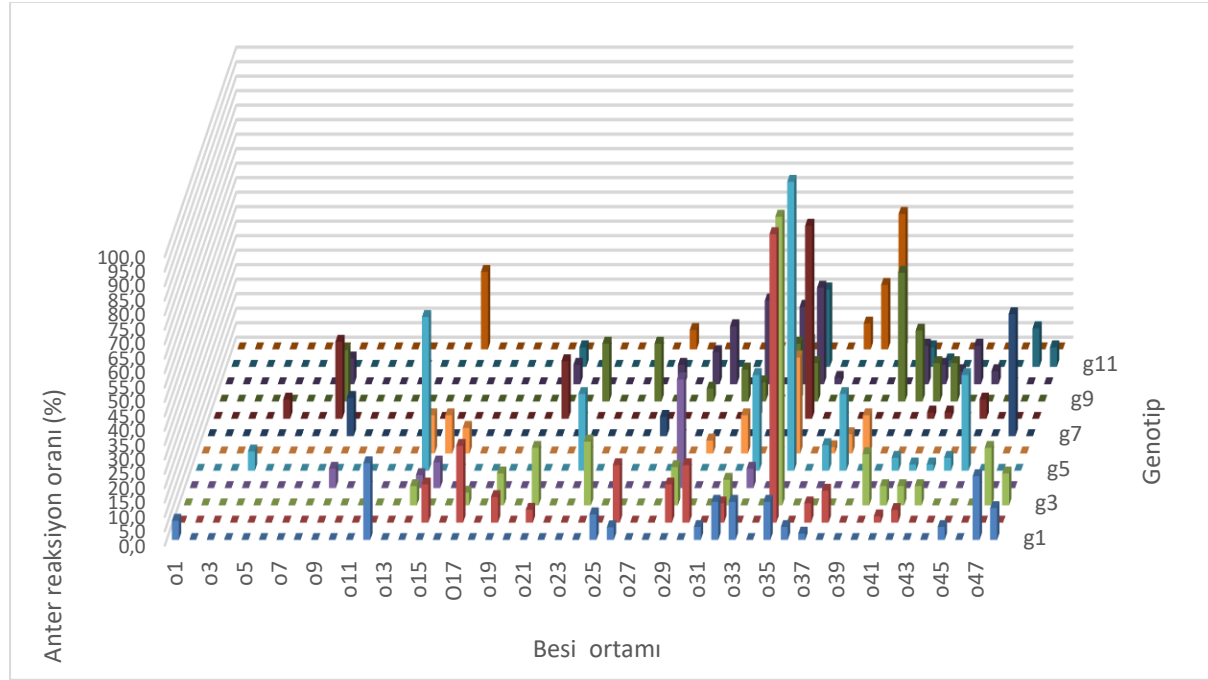
Tablo 4.3. Farklı fasulye genotiplerinde saptanan anter reaksiyon oranı ortalamaları (%)

Genotip	Reaksiyon Oranı	Genotip	Reaksiyon Oranı
1	2.8 bc	7	1.3 e
2	5.0 a	8	3.0 c
3	5.3 a	9	4.4 a
4	1.3 de	10	3.9 ab
5	6.3 a	11	1.8 c-e
6	2.3 cd	12	2.3 c-e
Ortalama: 3.3			

1) Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Tukey testine göre $P \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde istatistiksel birbirinden farklıdır.

Tablo 4.3'te izlendiği gibi tüm genotipler reaksiyon göstermiş olup, 5 numaralı genotip (Tablo 3.1) %6.3'lük reaksiyon oranı ile en yüksek anter reaksiyon oranı gösteren genotip

olmuştur. Söz konusu genotip, 2, 3, 9 ve 10 nolu genotipler dışındaki diğer genotiplere göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek reaksiyon oranı göstermiştir. Elde edilen bu sonuç literatür bilgileri ile tutarlılık göstermektedir [181]. Hammat ve ark. (1986), tüm büyük tohumlu baklagillerin in vitro rejenerasyona karşı gösterdiği direncin, yüksek performanslı genotipler elde etmek için uzun süren akrabalı yetiştirme ve seleksiyon geçmişlerinden kaynaklanabileceğini ve bunun modern çeşitlerde genetik değişkenliğin azalmasına yol açabileceğini öne sürmüşlerdir [187].



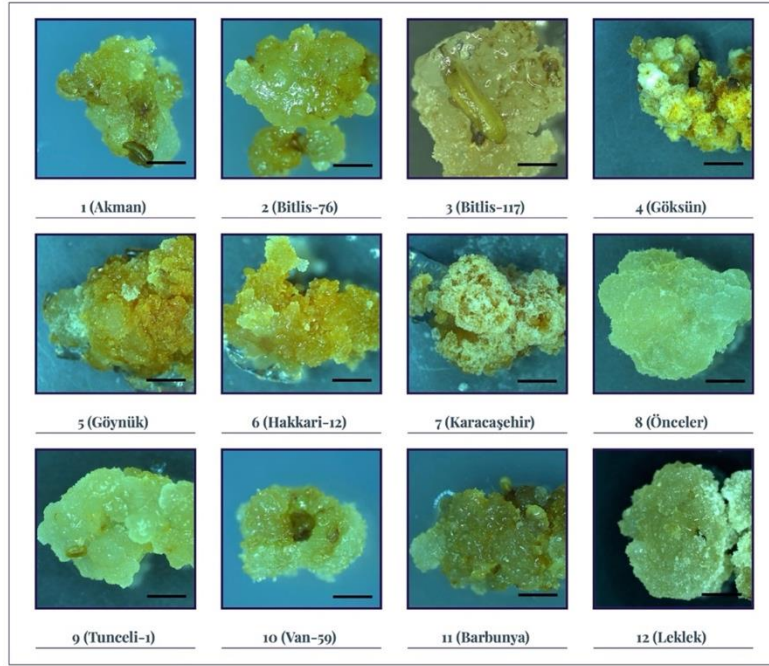
Şekil 4.4. Genotiplere ait reaksiyon oranlarını gösteren grafik.

Diğer taraftan, varyans analizi sonuçları besi ortamı x genotip interaskiyonun istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiştir (Tablo 4.1). Bu sonuç, besi ortamlarının anter reaksiyon oranına etkisinin genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Nitekim, 1 nolu genotip en iyi reaksiyon oranını 47 nolu ortamda göstermesine karşılık, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 ve 11 nolu genotipler 35 nolu ortamda, 4 nolu genotip 29 nolu ortamda, 9 nolu genotip 41 nolu ortamda, 12 nolu genotip ise 15 nolu ortamda göstermiştir (Şekil 4.4).

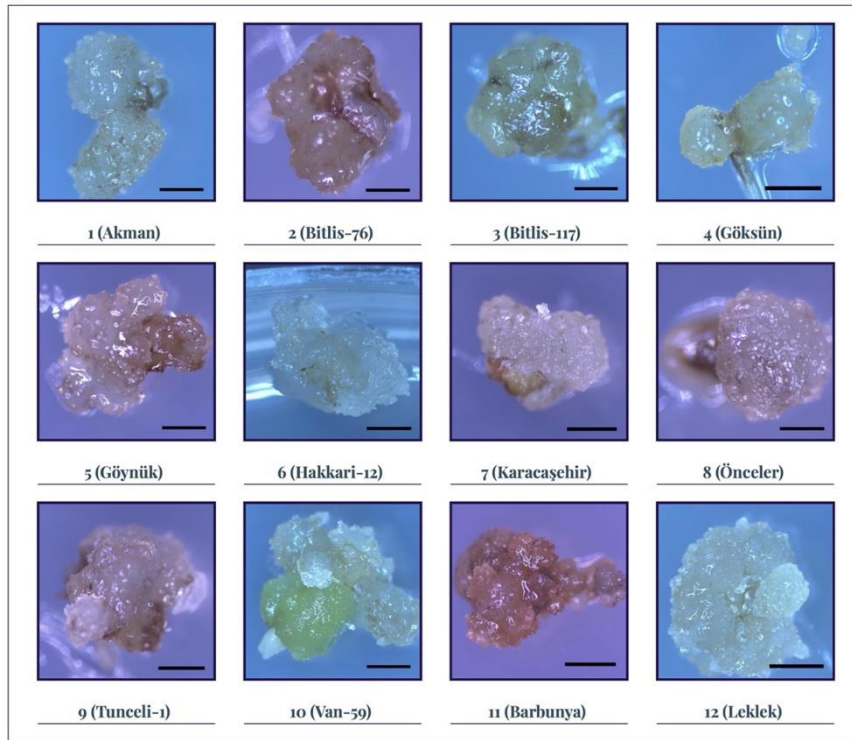
4.3. Embriyogenik Kallus Eldesine Yönelik Çalışmalar

Kalluslar elde edildikten yaklaşık 6 hafta sonra embriyo gelişimini tetiklemek amacıyla bitki düzenleyicisi içermeyen MS ve B5 ortamında kültüre alınmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi yerinde kültüre alınan kalluslardan embriyo oluşumu gözlenmemiştir. (Şekil

4.5 ve 4.6) ve kültürün devamında kallus örneklerinin bazılarında kahverengileşme görülmüş ve bazı kallus örnekleri de kararmıştır.



Şekil 4.5. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamında kültüre alınan anterlerin 8 haftalık stereo mikroskop görüntüsü

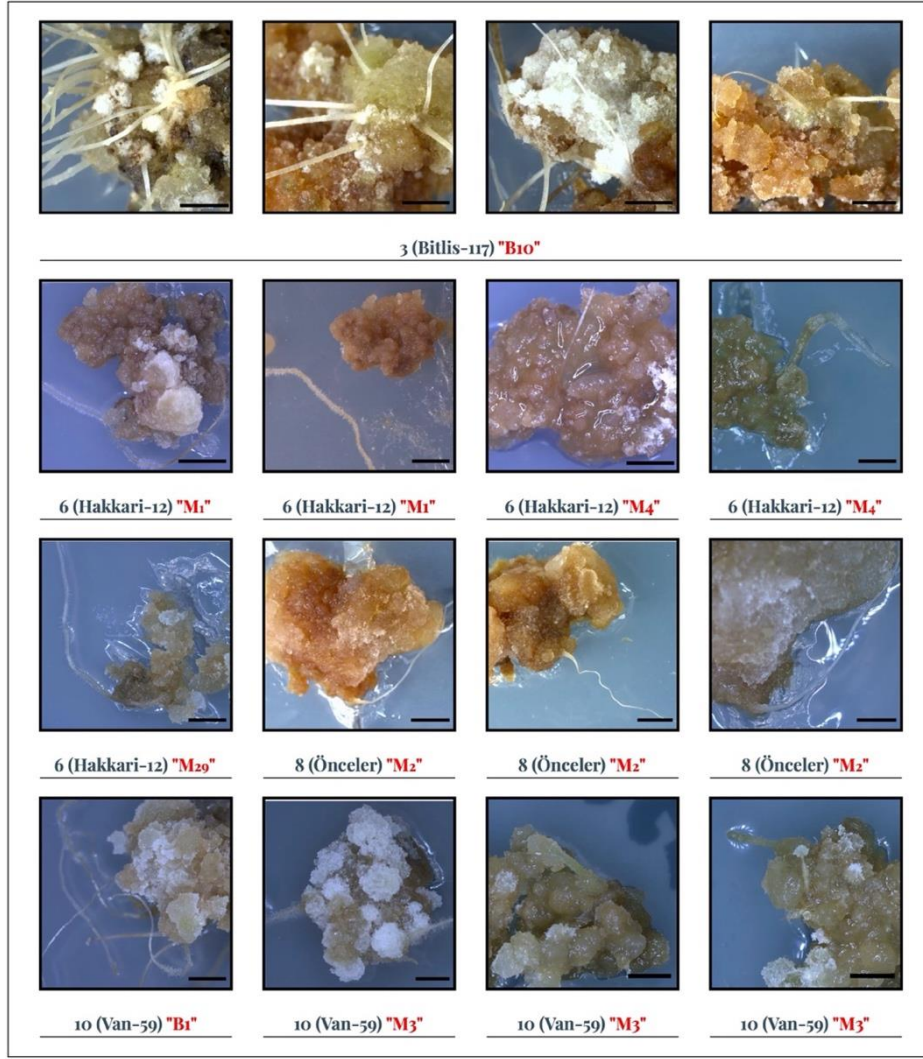


Şekil 4.6. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen B5 besi ortamında kültüre alınan anterlerin 8 haftalık stereo mikroskop görüntüsü

Çeşitli çalışmalara göre, yara dokusundan salgılanan fenolik bileşikler ve bunların peroksidazlar, pelifenoloksidazlar ve hava ile oksidasyonları sonucu, kültür ortamındaki eksplantlar ve bu eksplantı çevreleyen besi ortamı karakteristik bir kahverengileşmeye sebep olmaktadır [188]. Benzer bir çok çalışmada kahverengi kallus oluşumunun sürgün rejenerasyonunu engellediği bildirilmiştir [180,189,190].

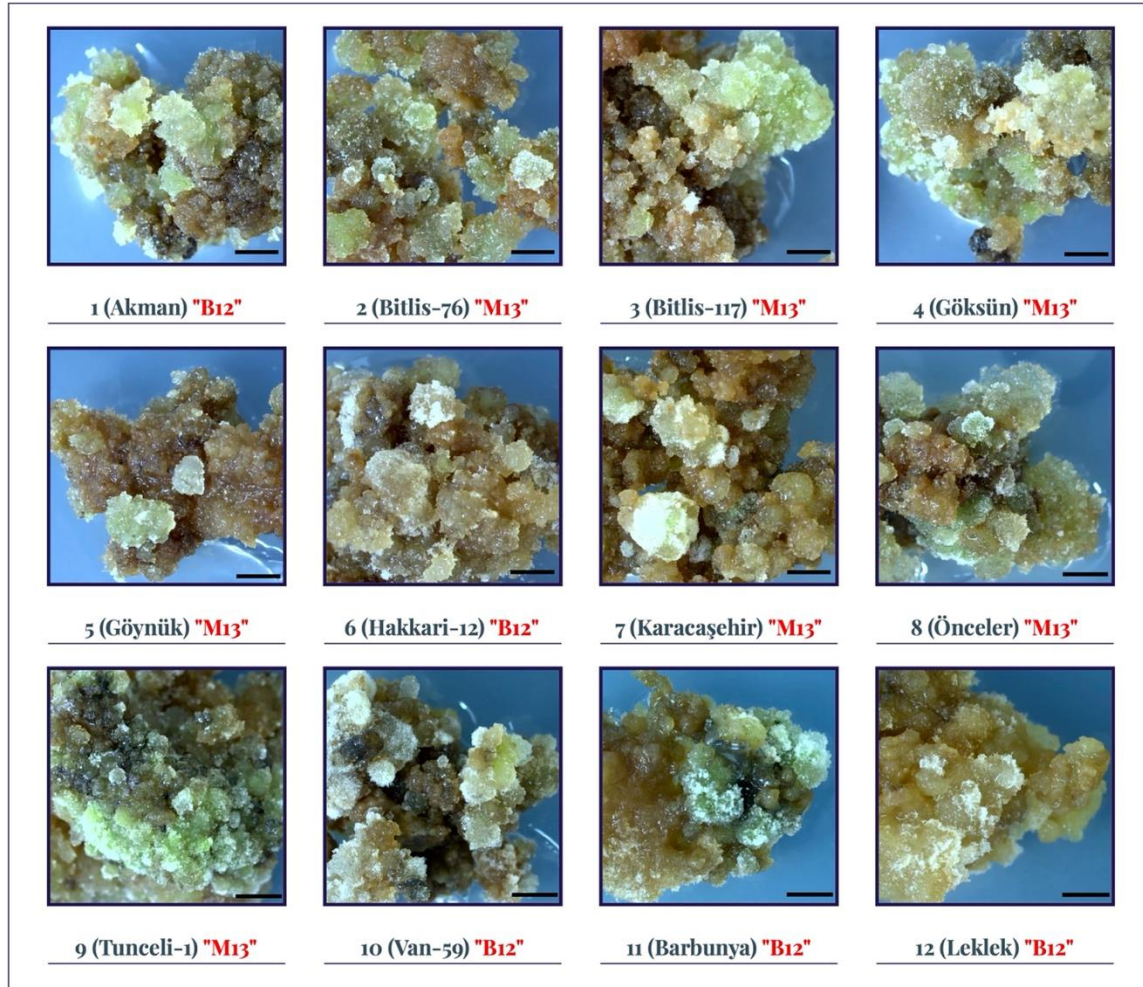
4.3.1. Farklı Konsantrasyonlarda ve Kombinasyonlarda Bitki Büyüme Düzenleyicileri İçeren Besi Ortamlarında Rejenerasyon Denemeleri

Kallus örneklerinin gelişim gösterdiği aynı besi ortamında kültürlerinin alt kültüre alma şeklinde devam etmesi sonucu kallusların kararmaya başladığı ve gelişimlerinin durduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, kallus örnekleri kültürdeki 8. haftadan itibaren Tablo 3.4'te belirtilen farklı rejenerasyon ortamlarında kültüre alınmıştır. Yürütülen rejenerasyon denemelerinde kallus örneklerinde ağırlıklı olarak kök oluşumları (rizogenez) gözlenmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Gelişen kallusların Tablo 3.4'te belirtilen besi ortamında kültürlerinde gözlenen kök oluşumlarının mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) görüntüleri; (siyah rakamlar: genotip numaralarını belirtmekte olup detay Tablo 3.1.'de verilmiştir; kırmızı rakamlar: kök gelişiminin gözlemlendiği besi ortamını belirtmekte olup detay Tablo 3.4'te verilmiştir; büyütme: 1.2x; ölçek çubuğu 200 µm)

Rejenerasyon denemesinde bazı kültürlerde yeşermelerin olduğu ve kallusların hacimsel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. (Şekil 4.9.).

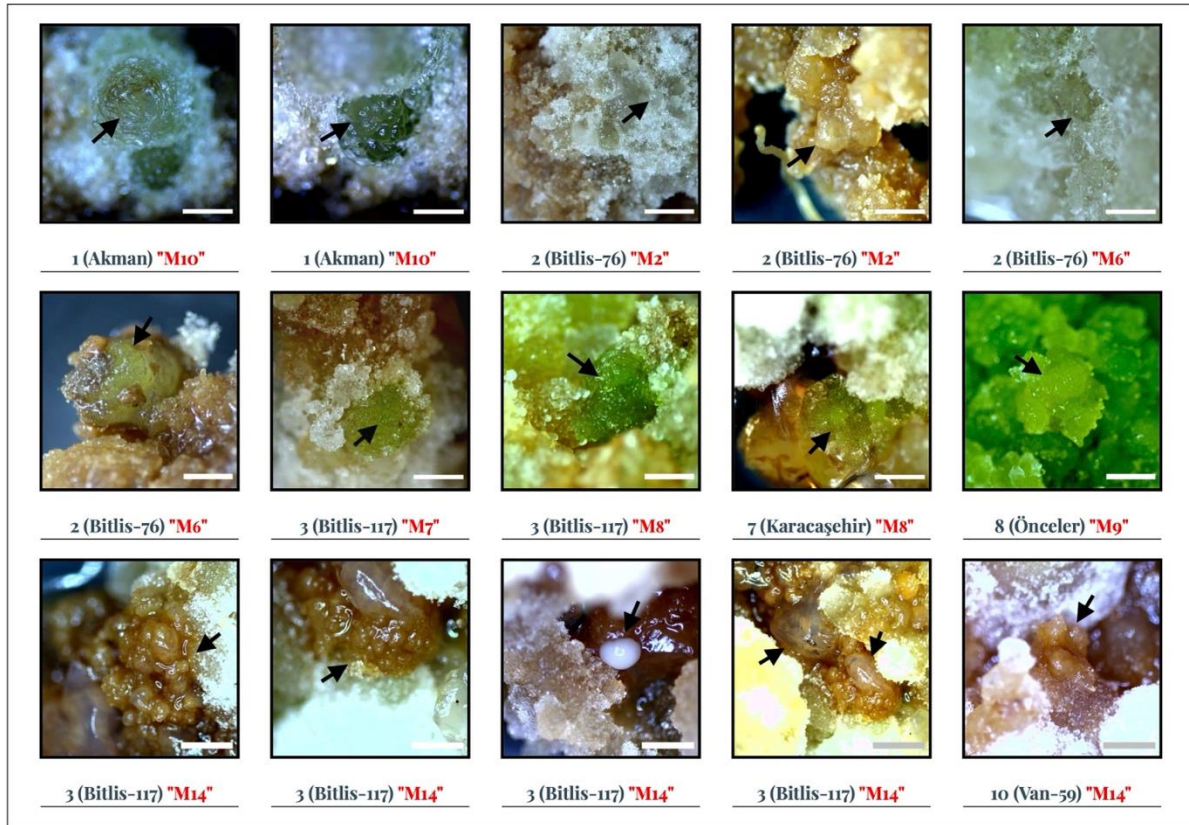


Şekil 4.9. Anter kültüründe yeşermelerin ve embrioid benzeri yapıların gözlemlendiği örnekler (siyah rakamlar: genotip numaralarını belirtmekte olup detay Tablo 3.1’de verilmiştir; kırmızı rakamlar: kök gelişiminin gözlemlendiği besi ortamını belirtmekte olup detay Tablo 3.4’de verilmiştir; büyütme: 1.2x; ölçek çubuğu 200 µm)

Saam ve ark. (1987), bazı sitokininlerin ve oksinlerin fasulyenin in vitro rejenerasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlar ve çeşitli BAP konsantrasyonları içeren besi ortamında sürgün organogenezini indükleyebilmişlerdir [183]. Farklı çalışmalarda rejenerasyon kapasitesi, yetiştirme süresi ve BAP konsantrasyonu arasında bir korelasyon bildirilmiştir [191]. Barbunya ile gerçekleştirilen bir çalışmada, çoklu sürgün oluşumu için üç farklı yöntem geliştirilmiş ve bu yöntemler rejenerasyon verimliliği açısından karşılaştırılmış olup BAP ve NAA 'in rejenerasyon üzerinde uyarıcı etkisi olduğu belirlenmiştir [192]. Ruiz ve ark. (2019), altı farklı *P. vulgaris* çeşidinin farklı büyüme düzenleyicisi (2,4-D, NAA, kinetin ve BAP) içeren besi ortamları üzerinde

rejenerasyon yeteneğini araştırdıkları çalışmalarında BAP içeren besi ortamlarında sürgün rejenerasyonunun olduğunu bildirmişlerdir [193].

Kallus rejenerasyon denemelerinde yapılan gözlemlerde kültürlerin 3. haftasından itibaren kallus dokularının esmerleşmeye başladığı ve kültürün devamında dokuların canlılığını kaybettiği gözlenmiştir. Ancak, daha kırılğan ve açık renkte olan kallus dokuları canlılığını korumuş olup periyodik olarak kontrol edilerek mikroskop görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Anter kültür denemesinde rejenerasyon ortamında (Tablo 3.4) kültüre alınan anterlerden gelişen kalluslardaki embriyogenik oluşumlarının mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) görüntüleri; (siyah rakamlar: genotip numaralarını belirtmekte olup Tablo 3 1’de verilmiştir; kırmızı rakamlar: embriyogenik oluşumların gözlemlendiği besi ortamını belirtmekte olup detay Tablo 3.’de verilmiştir; büyütme: 1.2x; ölçek çubuğu 200 µm, siyah renkli oklar embriyogenik oluşumları göstermektedir.

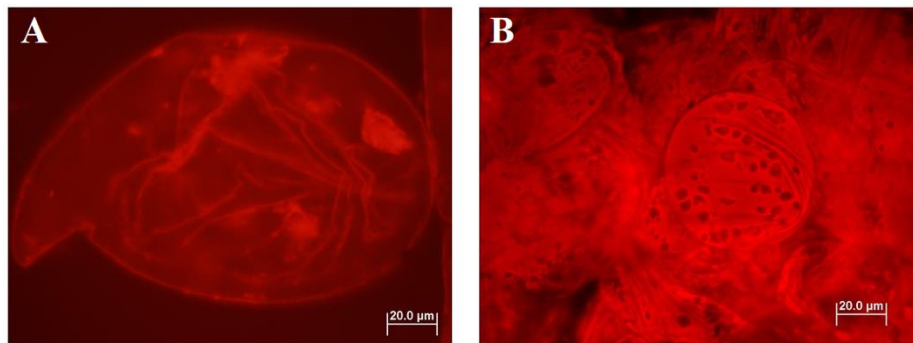
Elde edilen mikroskop görüntüleri değerlendirildiğinde özellikle NAA (1.0 mg L⁻¹) + ABA (1.0 mg L⁻¹) + Glutamin (0.5 mg L⁻¹) içeren besi ortamında embriyogenik yapıların geliştiği gözlenmiştir. *Bixa arellana* bitkisi ile yapılan in vitro kültür çalışmalarında, NAA + BAP kombinasyonunun, beyaz ve kırılğan yapıda kallus oluşumuna neden olduğunu , daha sonra ise yeşil ve embriyogenik küresel yapıların oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir [194]. Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalar sonucunda, her ne kadar embriyogenik yapılar NAA, ABA ve

Glutamin içeren besi ortamlarında gözlemlense de TDZ, BAP ve Adenin Sülfat (AS) içeren besi ortamlarında gelişim gösteren embriyogenik yapıların nispeten daha sağlıklı gelişim gösterdiği kaydedilmiştir.

BAP ve AS kombinasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada bu kombinasyonun organogenez sürecini iyileştirdiği bildirilmiştir [188]. Adenin, adenosin ve adelinik asidin, sitokinin aktivitesine sahip olduğu ve büyümeyi iyileştirmek veya sitokinin yanıtını güçlendirmek için kültür ortamına ilave edildikleri belirtilmiştir [188]. Adenin, kalluslardan dolayı olarak ya da doğrudan eksplanttan sürgün oluşumunu teşvik etmektedir [195]. Adenin olumlu etkileri genellikle ortamda sadece amonyum nitrat, BAP veya kinetin gibi sitokininlerin varlığında fark edilmektedir [195]. Tez çalışma sonuçları, AS ile BAP'ın embriyogenik gelişimi teşvik ettiğini göstermektedir. Çalışmadan elde edilen bulgular literatür bilgileri ile tutarlı olup adeninin doğal sitokinin sentezi için bir öncü görevi gördüğü ya da doğal sitokinin biyosentezini teşvik ettiği şeklinde yorumlanmıştır. Adenin öncülüğünde teşvik edilen sitokinin biyosentezi ile üretilen bileşiklerin kültür ortamına dışardan eklenen sitokininlere kıyasla fizyolojik tepki oluşturmada daha etkili olabileceğini ileri süren çalışmalar mevcuttur [195].

4.3.2. Elde Edilen Kalluslardan Embriyogenik Hücre Yapılarının Gözlenmesi

Hacimsel olarak artış gösteren kalluslarda 4.haftada karmen kırmızısı boyaması yapılmış ve yapılan gözlemlerde yuvarlak-oval şekilli embriyogenik hücre yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.11.). Kallus hücrelerinin yuvarlak-oval yapıda olmaları onların embriyogenik gelişme göstermeye yatkın oldukları şeklinde ifade edilmektedir [196]. Çalışma bulguları incelendiğinde kallus hücrelerinin oval ve yuvarlak yapıda olduğu gözlenmiş ve literatüre göre embriyogenik gelişim göstermeye yatkın oldukları sonucuna varılmıştır. Bununla beraber, kültürdeki örneklerden sürgün oluşumu kaydedilmemiştir.



Şekil 4.11. Anter kültür denemesinden elde edilen 4 haftalık kallusların karmen kırmızısı boyaması ile hücre şekillerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri; A: 10 numaralı genotipe (Tablo 3.1.) ait anterlerden elde edilen kallus; B: 2 numaralı genotipe (Tablo 3.1a) ait anterlerden elde edilen kallus; büyütme: 100x

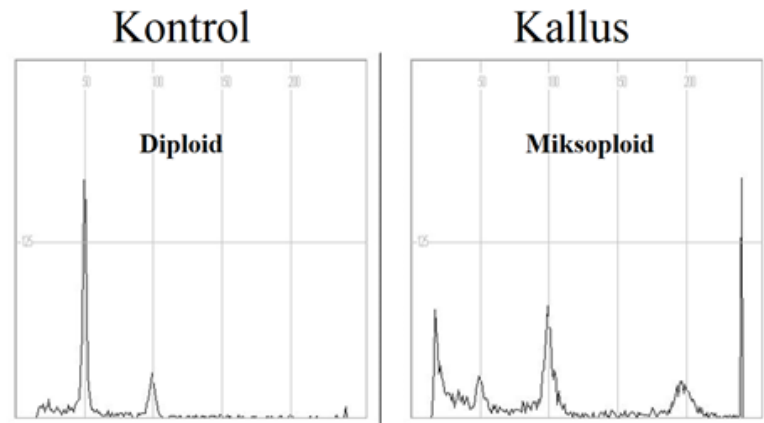
4.4. Elde Edilen Kallusların Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi

Anter kültürlerinden elde edilen kalluslardan kök rejenerasyonu gerçekleştiğinden bitkicikler elde edilememiş bu nedenle, anter kültür denemelerinden elde edilen kallus örneklerinin ploidi seviyelerini belirlemek amacıyla kallus örnekleri, Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında hazırlanıp T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı Alata Bahçe Kültürler Araştırma Enstitüsü (Mersin) laboratuvarına götürülmüş ve analiz edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Kallus örneklerinin ploidi seviyelerinin belirlenmesine dair aşamalardan birinin ve bu analiz için kullanılan flow sitomeri cihazının görüntüsü

Kültüre alınan anter örneklerinden gelişen kallus örneklerinin gelişimlerinin erken safhasında ploidi seviyelerine bakılmış ve miksploidi (diploidi ve tetraploidinin birlikte görüldüğü) tespit edilmiştir (Şekil 4.13)



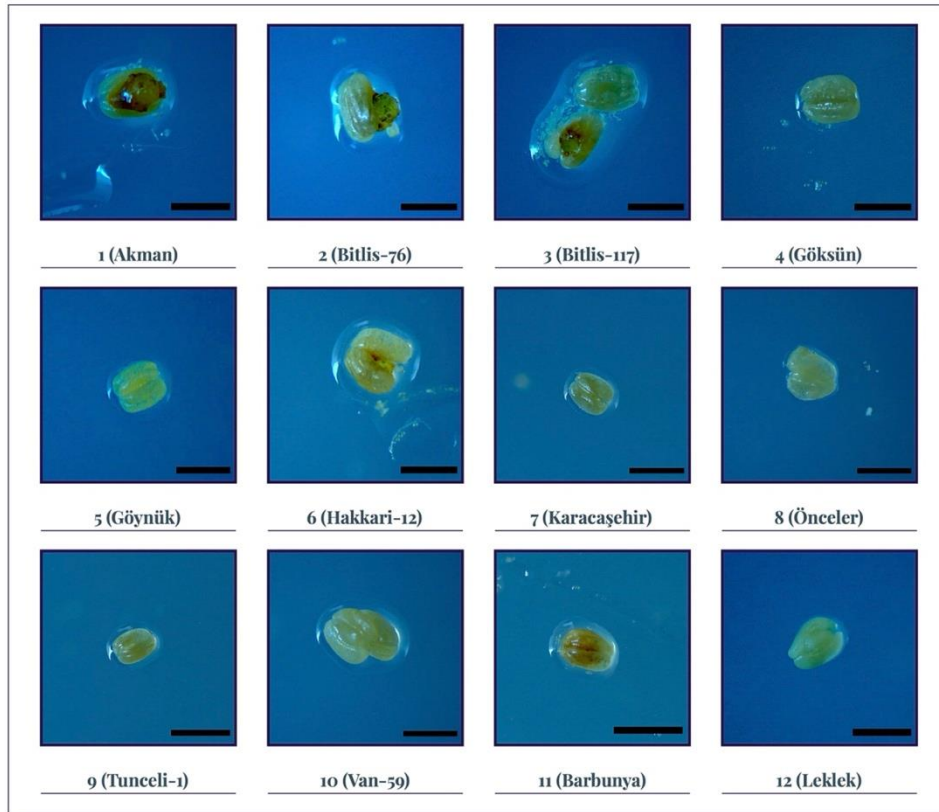
Şekil 4.13. 3 numaralı fasulye genotipinde (Tablo 3.1) anter eksplantlarından elde edilen kallusların flow sitometri analiz sonucu; elde edilen kallusların miksploid olduğunu belirten grafik.

Munoz ve Baudoin (2001), *P. vulgaris* L. ve *P. cocineus* L. ile yaptıkları androgenez çalışmalarından elde ettikleri kallusların ilk gelişim evrelerinde haploid iken ilerleyen gelişim dönemlerinde spontane katlanma gösterip diploid hale geçtiğini belirtmişlerdir [170]. Ayrıca, benzer görüşe Lulsdorf ve ark. (2011)'in baklagillerde androgenez ve double-haploid üretimi başlıklı kaleme aldıkları kitap bölümünde de yer verilmiştir [171]. Flow sitometri analiz sonuçlarının mikroploid çıkması kallusların ileri gelişim evrelerinde olup spontane katlanma göstermesi ile açıklanabilir. Ayrıca, Chen ve ark. (1984), polen gelişim esnasında çekirdek füzyonu ve endomitoz nedeniyle androgenez ile elde edilen bitkilerin ploidi seviyelerinin farklılık gösterebildiğini; diploid, poliploid ve mikroploid olabildiklerini belirtmiştir. Flow sitometri analizi sonucu elde edilen bulgular literatürde yer alan bilgiler ile tutarlılık göstermektedir [197].

Şekil 4.13'te görüldüğü üzere, kallus örneklerinde diploid ve tetraploidi durumu gözlenmiştir. Bu durumun sebebi yukarıda da bahsedilen literatür bilgileri ışığında değerlendirildiğinde, kültürde denenilen Kinetin ve 2,4-D'nin katlanmayı teşvik edici etkileri olabileceği üzerinde durulmaktadır. Ayrıca, örnek materyalin analiz için yeterli miktarda elde edilmesi için beklenen süre zarfında kallus gelişim evrelerinde ilerleme olacağı ve literatürde bahsedildiği üzere spontan katlanmaların gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

4.5. Belirlenen Optimal Besi Ortamı ile Anter Kültür Denemelerinin Kurulması

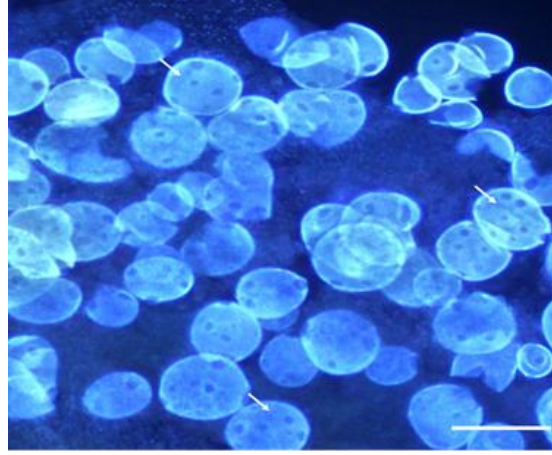
Anter kültürü denemeleri, rejenerasyonu sağlayabilmek amacı ile en yüksek reaksiyon oranı sağlanan besi ortamı ile kurulmuştur. Detaylı olarak Tablo 3.2'de verilen MS ve B5 besi ortamlarında kültüre alınan anter eksplantlarından en yüksek kallus eldesinin karşılaştırmalı istatistik analiz sonucunda, B5 besi ortamının daha etkili olduğunun belirlenmesi üzerine MS besi ortamı yerine B5 (35 numaralı besi ortamı; Tablo 3.2) besi ortamı ile çalışmalar yapılmıştır. Tablo 3.1'de belirtilen 12 fasulye genotipinin anter kültürü denemeleri için belirlenen uygun boyuttaki çiçek tomurcuklarından izole edilen anterler eksplant kaynağı olarak kullanılmış olup, önceki yıla ait çalışmalar sonucu belirlenen protokole göre 35 numaralı besi ortamında (Tablo 3.2.) denemeler tekrar edilmiştir. Kültüre alınan anterlerin 1 hafta sonra alınan mikroskop görüntülerinde kallusların şişerek irileşmeye başladığı, 1, 2 ve 3 numaralı genotiplerde (Tablo 3.1) ise kallus dokularının oluşmaya başladığı gözlenmiştir.



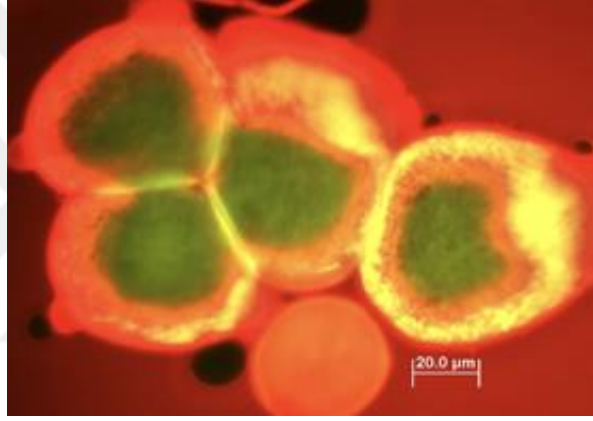
Şekil 4.14. 2.5 mg L^{-1} kinetin ve 0.5 mg L^{-1} 2,4-D içeren B5 besi ortamında (35 numaralı besi ortamı, Tablo 3.2.) kültüre alınan anterlerin 1 hafta sonraki stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) görüntüleri rakamlar: genotip numaralarını belirtmekte olup detay Tablo 3.1’de verilmiştir; büyütme: $1.2\times$; ölçek çubuğu $200 \mu\text{m}$

4.5.1. Kültürdeki Anter Örneklerindeki Çekirdek ve Hücre Bölünmelerinin Mikroskopik Olarak Gözlenmesi

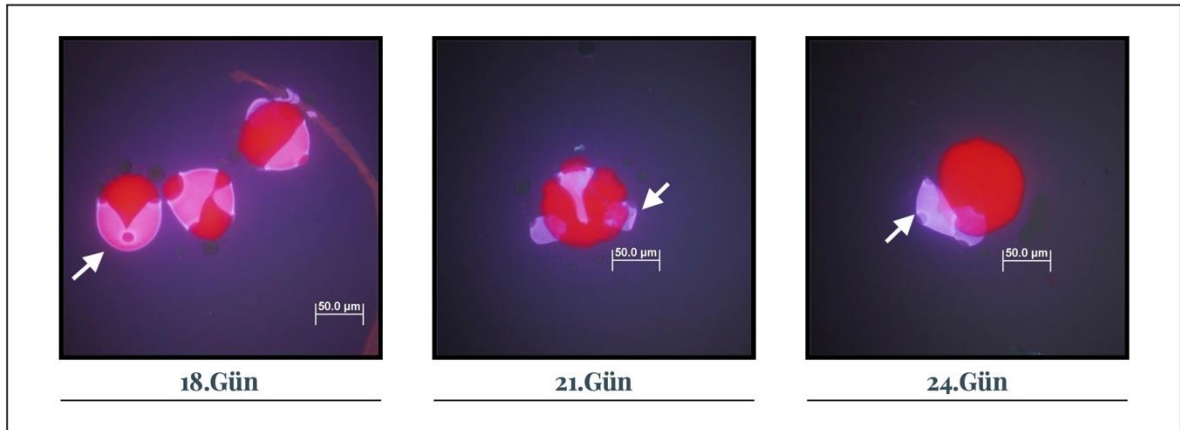
Kültüre alınan anter örneklerinde çekirdek ve hücre bölünmelerinin gerçekleşip gerçekleşmediğinin incelenmesi için mikroskopik gözlemler yapılmıştır. Kültüre alınan anter örneklerinin 7. ve 14. günde Floresan mikroskopunda (Olympus BX51, Japonya) DAPI ve asetokarmin boyası kullanılarak oluşturulan preparatları incelenmiştir. İnceleme sonucunda, çekirdek (Şekil 4.15) ve hücre (Şekil 4.16) bölünmelerinin ve ayrıca ekzin dokusunun yırtılmasının (Şekil 4.17) başarı ile gerçekleştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.15. Kültüre alınan 1 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe ait anter örneklerinde 7. gündeki çekirdek bölünmelerinin DAPI boyama sonrası floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) görüntüsü; Beyaz oklar 3'ten fazla olan çekirdekleri göstermektedir; ölçek çubuğu 200 μ m



Şekil 4.16. Kültüre alınan 1 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe ait anter örneklerinde 14. gündeki çekirdek bölünmelerinin asetokarmin boyama sonrası floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) görüntüsü; ölçek çubuğu 200 μ m



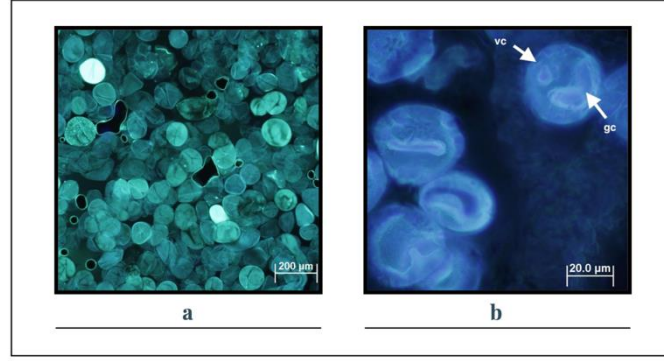
Şekil 4.17. Kültüre alınan 1 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe ait anter örneklerinin kültürdeki 18., 21. ve 24. gündeki gelişimlerinin (ekzin dokusunun yırtılmasının (beyaz ok ekzin dokusunu göstermektedir) asetokarmin boyama sonrası floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) görüntüsü

Çeşitli genotiplere ait mikrosporlar, ekzin tabakası içerisinde bir miktar şişme ve bölünme tepkisi göstermiştir (Şekil 4.17). Şişmiş durumdaki mikrosporlar genellikle 2 ya da daha fazla çekirdek içermektedir. Ancak kalın yapıdaki ekzin tabakasının bazı çekirdekleri örtmesi sebebi ile tamamının gözlenmesi mümkün olmamıştır. Croser ve ark. (2006), baklagiller için işlevsel bir dihaplodizasyon protokolü geliştirebilmek için genotip, indüksiyon, tetikleyiciler ve kültür koşullarının tümünü ele alarak incelediği çalışmasında genotipler arasında belirgin farklılıklar rapor etmişlerdir [97]. Bezelye ve nohut ile yapılan çalışmalarda, mikrospor kültürlerinde genotipler arasında bir varyasyonun mevcut olduğu bildirilmiştir [198,199]. Tez çalışmasından elde edilen bulgular bu literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir. Literatürden edinilen bilgiye göre, mikrosporlar tomurcukların toplanması esnasında meydana gelen yaralanmaya bağlı olarak savunma tepkisi göstermekte ve bu durum oksitleyici bileşiklerin bitki bünyesinde birikmesine neden olmaktadır. Bakla (*Vicia faba* L.) ile yapılan bir çalışmada, bitkinin, yaralanmaya karşı bir yanıt olarak jasmonik asit ve trihidroksi oksilipin düzeylerini hızla arttırdığı gösterilmiştir [200].

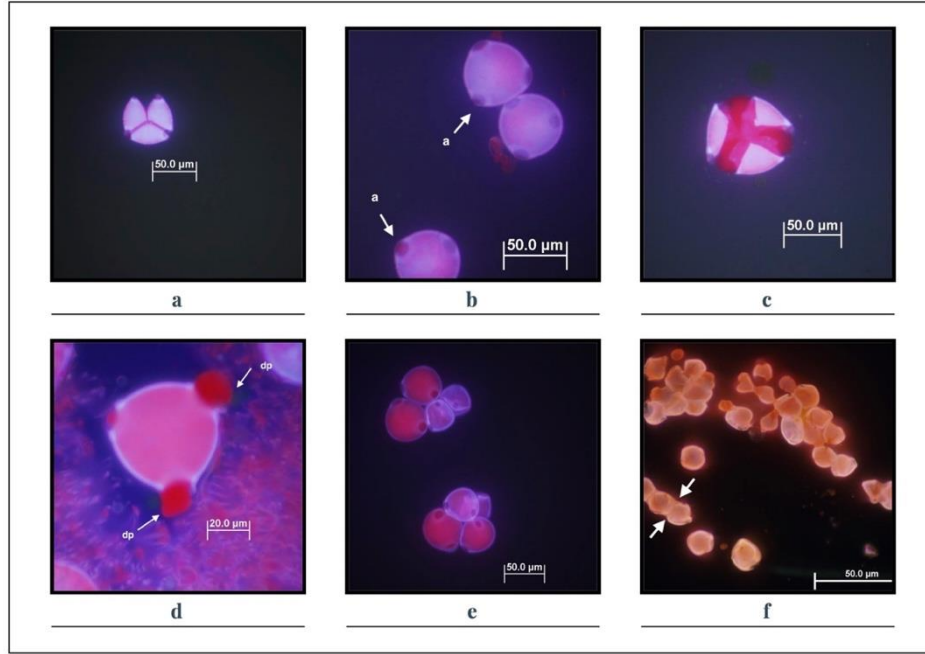
Literatür bilgisi ile karşılaştırıldığında, bu tez çalışmasında mikrospor tepkisinin farklı genotiplerde çeşitlilik göstermesi, tomurcuk toplanmasının neden olduğu yaralanmaya karşı savunma tepkisi olarak oksitleyici bileşiklerin birikmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Tez kapsamında çalışılan ve Tablo 3.1’de detaylı olarak bilgileri verilen genotilere ait polenlerin yapıları incelendiğinde, generatif çekirdeğin uzun, iğ şeklinde ve sınırları belirgin yapıda, vejetatif çekirdeğin ise yuvarlak şekilde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.18). Polen tipinin trikolporatae, apertürlerde porslar belirgin yuvarlak ve yuvarlağa yakın şekilde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ekzin süslerinin strüktürünün retikulat olduğu ortaya konmuştur (Şekil 4.19) Polenlerin hem büyüklüklerinde hem de boyanma derecelerinde varyasyon gözlenmiştir.

Normal çimlenme gösteren polen taneleri monosifonik yapıda olup (Şekil 4.20.) belirli polenlerde ise 3 apertürden de sitoplazma çıkıntılarının varlığı tespit edilmiştir (4.19d.). Ayrıca bazı polen tanelerinin intin yapısı ile birbirine bağlandığı görülmektedir (4.19f.). Graybosch ve Palmer (1988), *Glycine max* L. ile yaptıkları çalışmalarında polen tanelerinin intin ile bağlanmasını steriliten nedeni olarak açıklamışlardır [201].

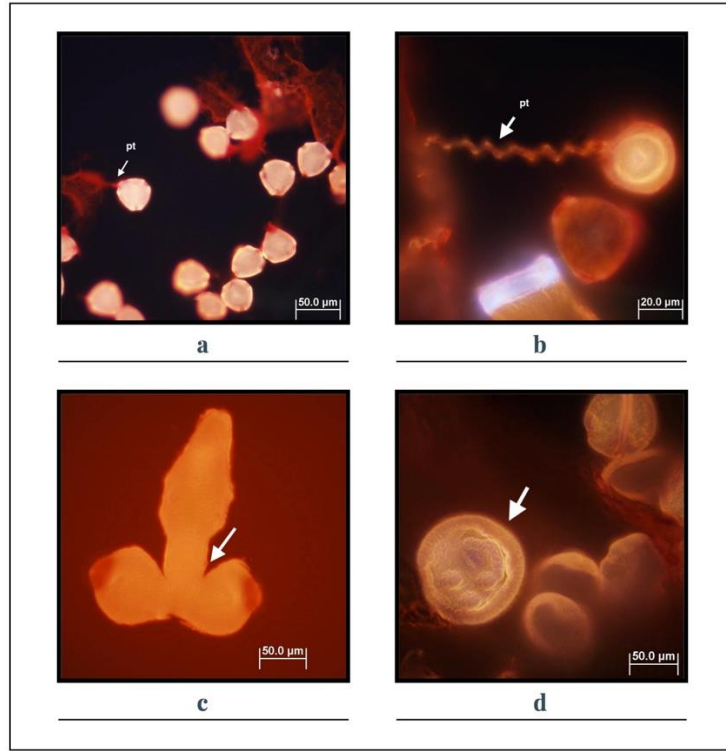


Şekil 4.18. Kültüre alınan 2 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe ait anter örneklerinin kültürdeki gelişimlerinin (a: mikrospor hücrelerine ait genel görüntü; b: mikrospor hücresi; vc: vejetatif çekirdek, gc: generatif çekirdek) DAPI boyama sonrası floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) görüntüsü



Şekil 4.19. Kültüre alınan 2 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe ait anter örneklerinin kültürdeki gelişimlerinin (a: trikolporat polen; b: apertür (ekzo açıklık); c: ekzini açılmış olan polen tanesi; d: 3 apertürde gözlenen sitoplazma çıkıntıları; e: tetrat yapıları; f: intin ile birbirine bağlanan polen hücreleri) asetokarmin boyama ile floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) incelemesi; a: apertür, dp: dorsal por

Elde edilen bulgular arasında bazı mikrosporlar arasında kanal oluşumu (Şekil 4.20) ve hücre duvarının çözünmesine bağlı olarak tetratların doğrudan füzyona uğradığı gözlenmektedir (Şekil 4.20). Bu şekilde bir kanal oluşumu kromatinin mikrosporal transferi sonucu çekirdeklerin füzyona uğramasına sebep olmaktadır [202]. Bu durum, flow sitometri analizi sonucu elde edilen mixploid oluşumu açıklamaktadır.



Şekil 4.20. Kültüre alınan 2 no'lu (Tablo 3.1.) genotipe ait farklı anter örneklerinin kültürdeki gelişimlerinin (a: tek apertürden gelişen monosifonik polen tüpü; b: normal gelişim gösteren monosigonik polen tüpü; c: mikrosporlar arasında tüp oluşumu; d: hücre duvarının çözünmesiyle doğrudan füzyon oluşumu) asetokarmin boyama ile floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) incelemesi; pt: polen tüpü

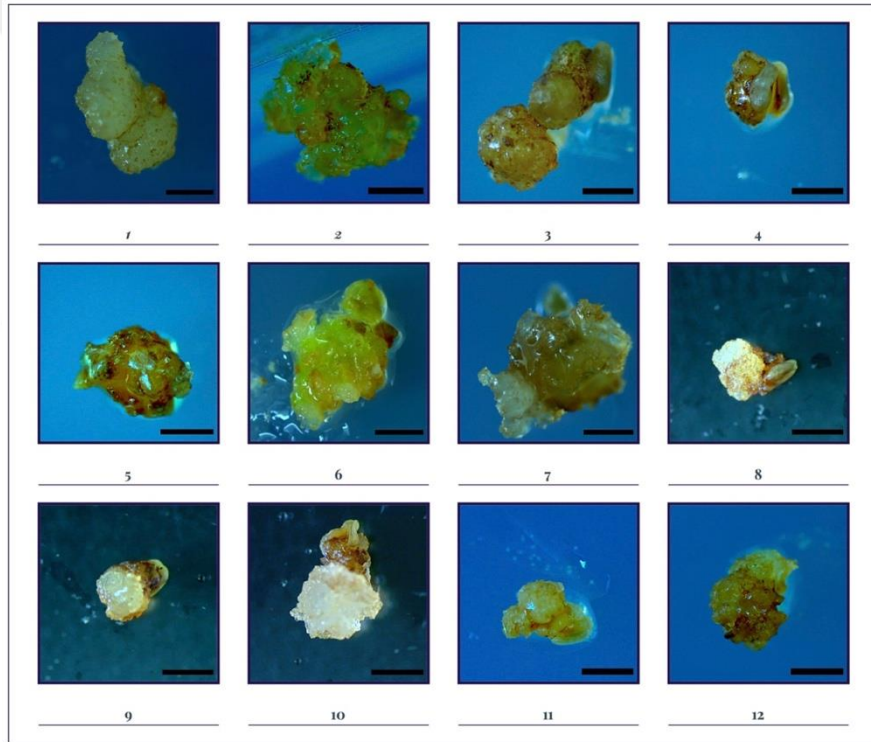
Paratasilpin (1978), bakla ile yaptığı anter kültürü çalışmalarında MS ortamında bölünen çekirdeklere sahip mikrosporlar bildirmiştir. Tez çalışmasından elde edilen bulgular bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Tez çalışmasında, kültürün yaklaşık 2. haftasında bölünen mikrospor hücreleri gözlenmiş olup, bu mikrospor hücrelerinin Paratasilpin (1978) tarafından tanımlanan şekilde şişmiş durumda oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.17). [203]. Paratasilpin (1978), mikrosporların şişmiş olmasını haploid embriyogenezin bir işareti olarak tanımlamıştır. Bayliss ve ark. (2004)'nın acı bakla, Croser ve ark (2011)'in ise nohut ile yaptıkları çalışmalarda, elde ettikleri pro-embriyo yapıları incelendiğinde tez çalışmasından elde edilen görsel bulgular ile tutarlılık göstermektedir [198,204]. Her iki çalışmada da araştırmacılar mikrosporların bu şekilde şişme tepkisi göstermesinin pro-embriyo oluşturma tepkisi olduğunu belirtmişlerdir ve Bayliss ve ark. (2004) bu yapıya pro-embriyo adını vermişlerdir. Bahsedilen bu literatür bilgileri ışığında, tez kapsamında gerçekleştirilen anter kültür denemelerinden elde edilen yapılar pro-embriyo olarak nitelendirilebilir. Bu tez bulguları, denenilen 12 fasulye genotipi için pro-embriyo oluşumunu bildiren ilk rapordur.

Kolza ve soya fasulyesi ile yapılan anter ve mikrospor kültürü çalışmalarında polene ait ekzin tabakasının yırtılması ile bölünen hücrelerin serbest kalmasının embriyo gelişiminin

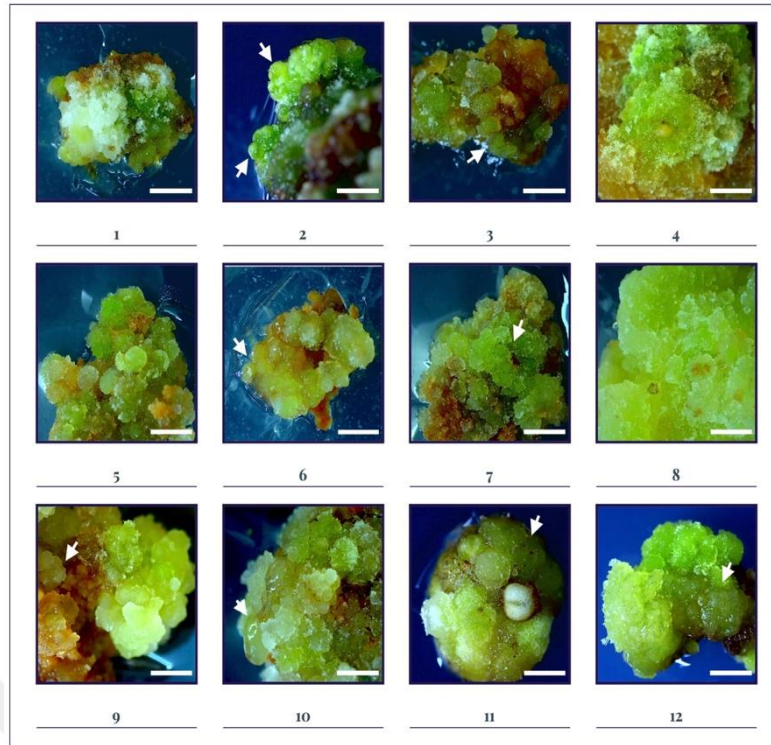
önemli bir aşaması olduğu bildirilmiştir [205,206]. Embriyonun gelişiminin serbest kalması için ekzin tabakasının yırtılması ve bölünmüş hücrelerin serbest kalması gerekliliği elde edilen embriyogenik kallus miktarını arttırmak için önemli bir adım olarak tespit edilmiş olup mikroskop görüntüleri değerlendirildiğinde elde edilen kallusların embriyogenik olduğu sonucuna varılmaktadır.

4.5.2. Kallus Dokularından Embrioid Gelişimlerinin Gözlenmesi

Devam eden kültür çalışmalarının 3. haftasında anter dokusuna ait kalluslarda embrioid yapıların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.21). Embrioid gelişimi gözlenen örneklerin aynı besi ortamında alt kültüre alınmaları neticesinde kallus dokularında embrioid gelişiminin devam ettiği ve kallus dokusunun hacimsel olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. 2.5 mg L⁻¹ Kinetin ve 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D içeren B5 besi ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların 3. haftadaki stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) görüntüleri (siyah rakamlar: genotip numaralarını belirtmekte olup detay Tablo 3.1.'de verilmiştir)



Şekil 4.22. 2.5 mg L⁻¹ Kinetin ve 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D içeren B5 besi ortamında kültüre alınan anterlerden gelişen kallusların 2.aydaki stereo mikroskop (Olympus SZ61, Japonya) görüntüleri (siyah rakamlar: genotip numaralarını belirtmekte olup detay Tablo 3.1.'de verilmiştir)

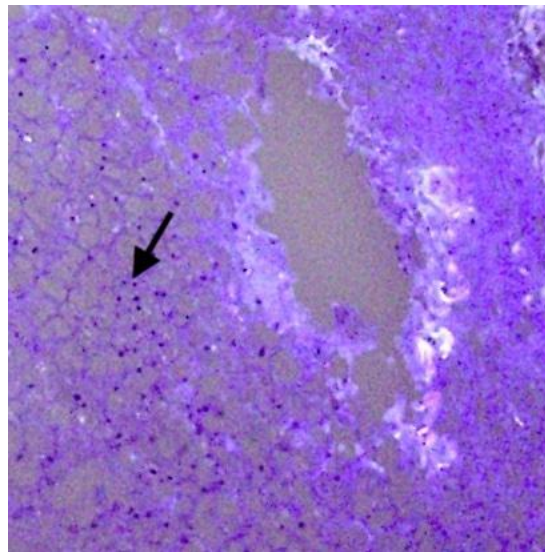
Fasulyenin rejenerasyonunun yüksek oranda genotipe bağlı olduğu bildirilmiştir [207]. Tez çalışmasının amacını fasulyede anterlerde haploid birki rejenerasyonunda genotipten bağımsız bir protokol geliştirme oluşturmıştır. Kültürün 2. ayında bulunan anterlerden elde edilen kallusların mikroskop görüntülerindeki yeşil noktalar embriyo oluşumunu göstermektedir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ve B5 ortamlarında kültüre alınan ve emriyogenik olmayan kallus örnekleri kırılgan ve yumuşak bir yapı gösterirken (Şekil 4.9), 35 numaralı besi ortamında (Tablo 3.2) sürekli alt kültüre alınan kallus örnekleri yeşil, pürüzsüz ve kompakt yapı göstermiştir (Şekil 4.22). Embriyogenik kallus örnekleri aynı besi ortamında (B5 + kinetin (2.5 ml L⁻¹) + 2,4-D (0.5 ml L⁻¹)) kültüre alındığında dahi organize bir yapı ve morfoloji sergilemiştir. Emriyogenik oluşumların kolaylıkla ayırt edilebilen ve bir hücre tabakasıyla sınırlanan yuvarlak yapıda olduğu görülmüştür. Buna karşılık, emriyogenik olmayan ve bir süre sonra dokunun ölümüyle sonuçlanan kallusların yumuşak, gevrek ve yarı saydam olduğu tespit edilmiştir. Embriyogenik kallusun elde edilmesi, somatik embriyo gelişimi ve bitki rejenerasyonu için önemli bir adımdır. Bu süreç, ancak kullanılan eksplantın rejenerasyon yeteneği ve bu eksplantın uygun teşvik edicilerle uyarılması ile mümkündür.

Ikeuchi ve ark. (2013)'nın sınıflandırmasına göre, görünür organ rejenerasyonu olmayan kallus, kırılgan veya kompakt kallus olarak, ve belirli bir dereceye kadar organ rejenerasyonu sergileyen kallus gelişen organların tipine bağlı olarak köklü, sürgünlü veya embriyonik kallus olarak adlandırılmıştır [208]. Rejenerasyona dirençli olduğu kabul edilen fasulye için

embriyogenik kallusun elde edilmesi etkin bir bitki rejenerasyon sistemi için önemli bir ilk adımdır. Skoog ve Miller'ın (1957) öncü çalışmasından bu yana, oksinler ve sitokininler arasındaki dengenin hücre farklılaşmasını etkilediği bilinmektedir [209]. Yüksek bir oksin/sitokinin oranı kök rejenerasyonunu indüklerken, düşük bir oran sürgün indüksiyonunu teşvik etmektedir. Yüksek nitrat azotu içeriğine sahip olduğu bilinen B5 besi ortamı embriyogenik kallus oluşumunu arttırmıştır. Tez çalışmasında kullanılan genotiplerin B5 besi ortamında MS besi ortamına kıyasla daha sağlıklı yapıda ve embriyogenik kallus eldesinde daha yüksek başarı göstermesinin nedeninin B5 besi ortamının yüksek nitrat azotu içeriğine sahip olmasından kaynaklı olacağı düşünülmektedir. Hiç kallus gelişimi elde edilemeyen besi ortamlarının çoğu yüksek sitokinin ve düşük oksin içeriğine sahip MS besi ortamı ile hazırlanmış besi ortamlarıdır. B5 besi ortamı içerisinde en yüksek kallus indüksiyonunun elde edildiği besi ortamına ait oksin ve sitokinin oranları (2.5 ml L^{-1} kinetin, 0.5 ml L^{-1} 2,4-D) aynı şekilde MS besi ortamı ile hazırlandığında kalluslar reaksiyon göstermemiştir. Bu durum, B5 içerisindeki yüksek nitrat azot oranının bitki büyüme düzenleyicilerin doğru kombinasyonları ile kallus indüksiyonunu teşvik ettiğini düşündürmektedir.

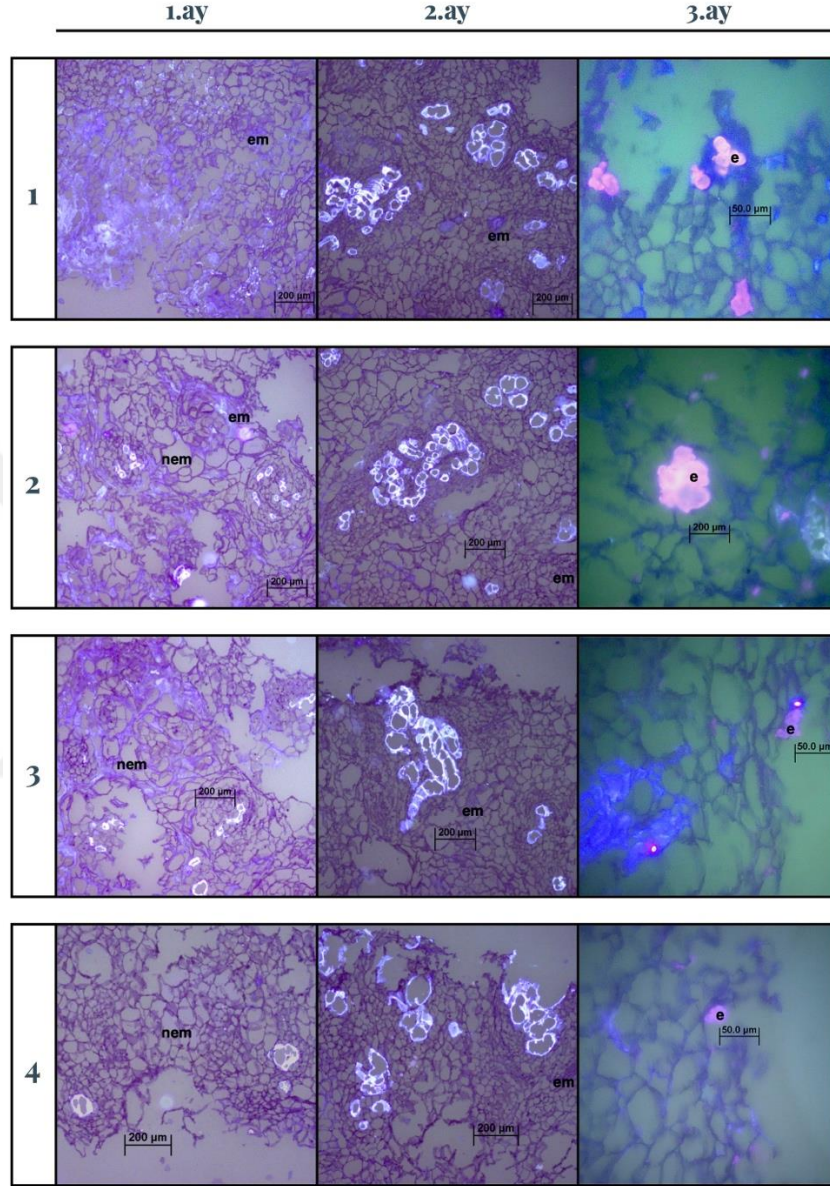
4.6. Histolojik Analizler

Kültür başlangıcından yaklaşık 3 hafta sonra yapılan histolojik analizler sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri incelendiğinde, kallus yüzeyinde kalın duvarlı ve nişasta içeren hücrelerin varlığı gözlenmiştir (Şekil 4.23). Benzer özellikteki hücreler daha önce Karlsson ve Vasil (1986) tarafından embriyogenik özellikteki hücreler olarak rapor edilmiştir [210].

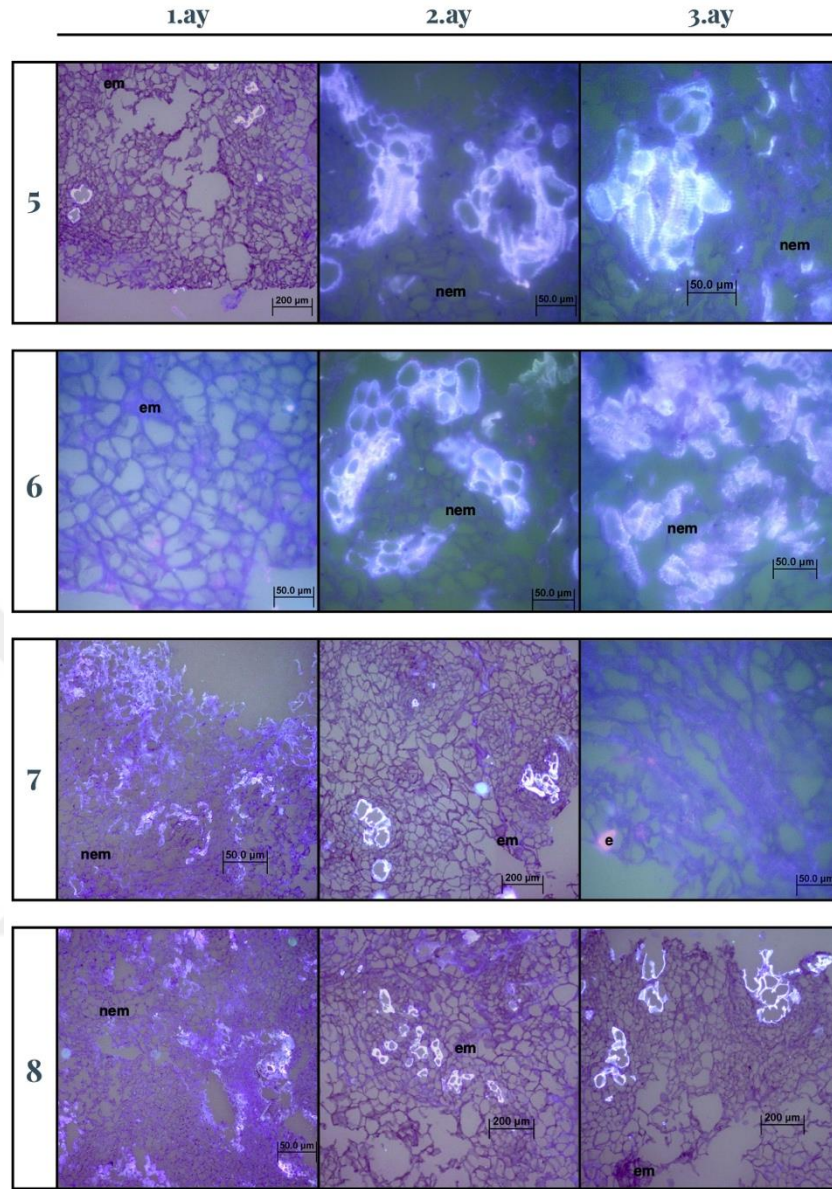


Şekil 4.23 Anter kültüründen elde edilen kallusun parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) altında gözlenmesi. ok, kallusun nişasta taneleri içeren hücrelerden oluşan kısmı belirtmektedir

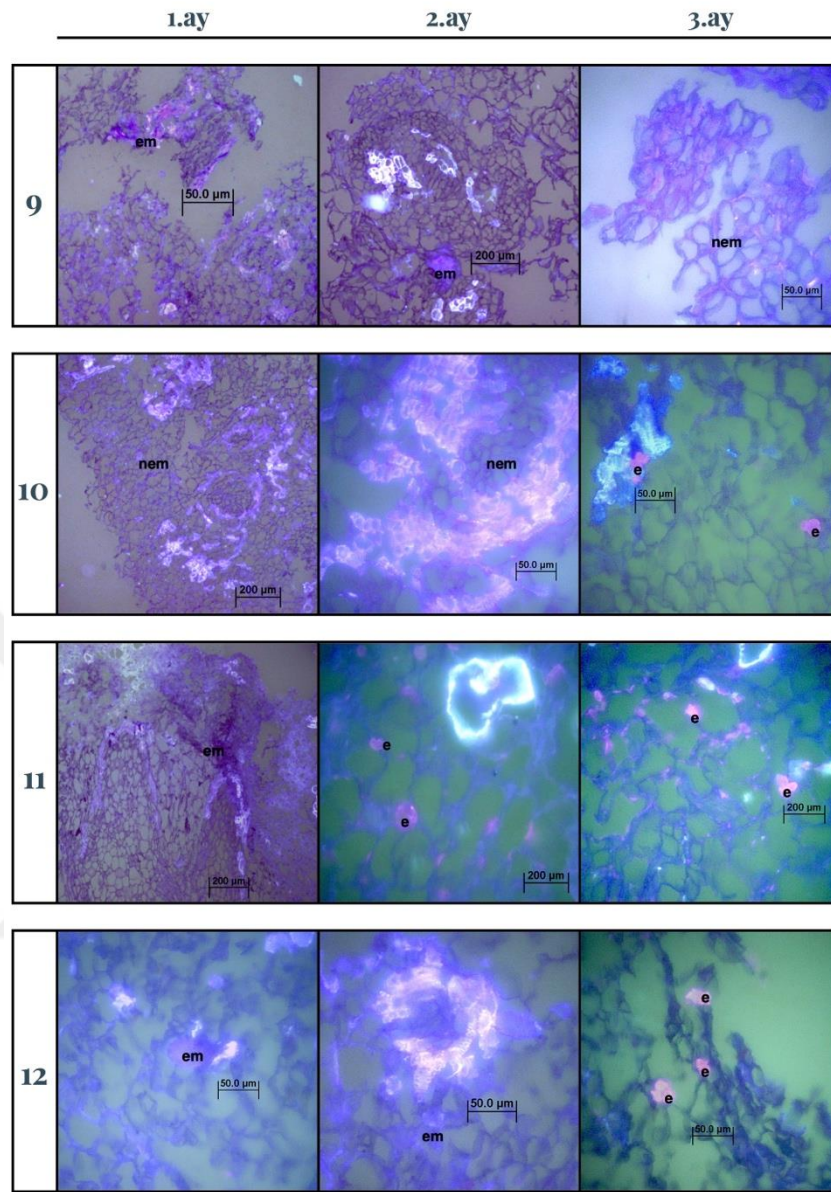
Her 12 genotip için de anter kültüründen elde edilen kalluslar, denemenin 1., 2. ve 3. aylarında periyodik olarak histolojik analizlere tabi tutularak görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 4.24- 4.26)



Şekil 4.24. Anter kültüründen elde edilen 1-4 numaralı genotiplerin (Tablo 3.1) kültürdeki 1., 2. ve 3. aydaki kallus örneklerinin parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) altında gözlenmesi. Solda yukarıdan aşağıya belirtilen rakamlar genotip numaralarını (Tablo 3.1) vermektedir. em: embriyogenik, nem: embriyogenik olmayan, e: embriyo



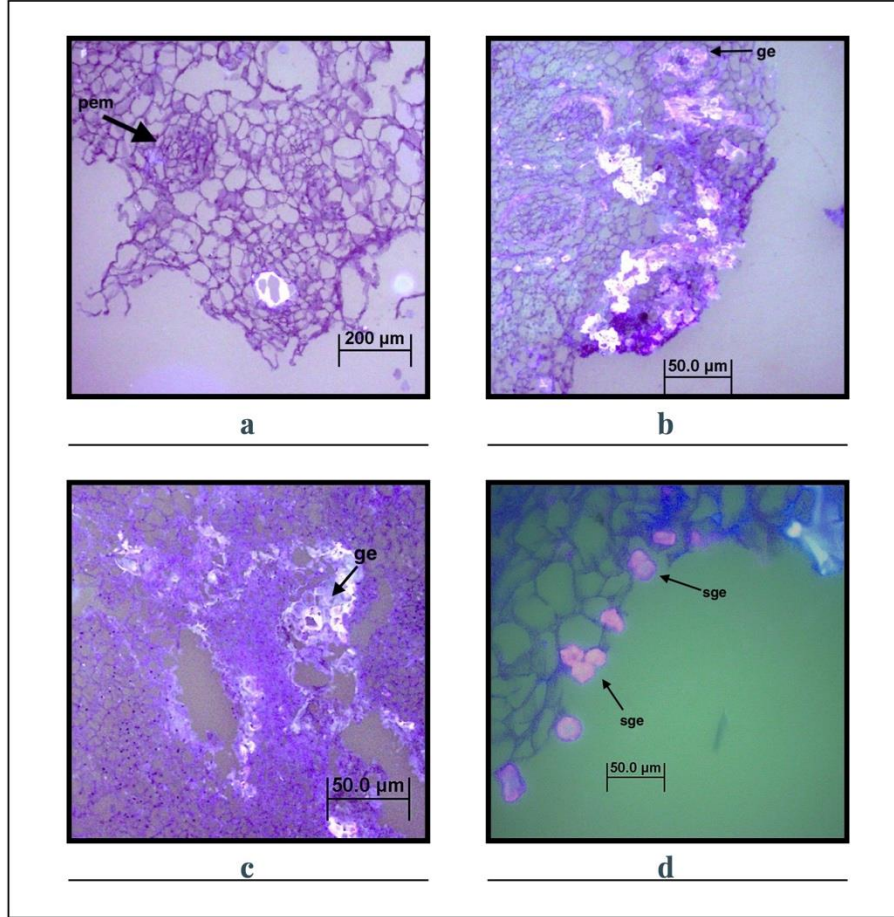
Şekil 4.25. Anter kültüründen elde edilen 5-8 numaralı genotiplerin (Tablo 3.1) kültürdeki 1., 2. ve 3. aydaki kallus örneklerinin parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) altında gözlenmesi. Solda yukarıdan aşağıya belirtilen rakamlar genotip numaralarını (Tablo 3.1) vermektedir. em: embriyogenik, nem: embriyogenik olmayan, e: embriyo



Şekil 4.26. Anter kültüründen elde edilen 9-12 numaralı genotiplerin (Tablo 3.1) kültürdeki 1., 2. ve 3. aydaki kallus örneklerinin parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) altında gözlenmesi. Solda yukarıdan aşağıya belirtilen rakamlar genotip numaralarını (Tablo 3.1) vermektedir. em: embriyogenik, nem: embriyogenik olmayan, e: embriyo

Literatür bilgisi ile tutarlı şekilde kültürün 1., 2. ve 3. aylarında yapılan periyodik gözlemler ile kallus hücrelerinin embriyogenik özellik kazandığı ve proembriyoların oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.27.a). Globüler yapıdaki embriyogenik oluşumların tanımlanabilir bir sınıra sahip olması (Şekil 4.27.b) ve ayrı bir damar sisteminin bulunması (4.27.c), somatik embriyoidleri sürgün tomurcuklarından ayıran önemli bir özellik olarak görülmekte olup benzer bilgilere literatürde de rastlanmaktadır [211]. Tez kapsamında gerçekleştirilen histolojik analizler sonucunda, hızla bölünerek çoğalan embriyogenik hücrelerin farklılaşarak globüler

embriyoların gelişmesi ile sonuçlandığı belirlenmiştir. Birincil embriyogenezi takip eden süreçte, histolojik analizler ile Liu ve ark. (2009) ile Shi ve ark. (2009)'nın bildikleri ile tutarlı şekilde sekonder somatik embriyogenezin gerçekleştiği tespit edilmiş ve sekonder globüler embriyoların oluştuğu belirlenmiştir (4.27.d) [212,213].

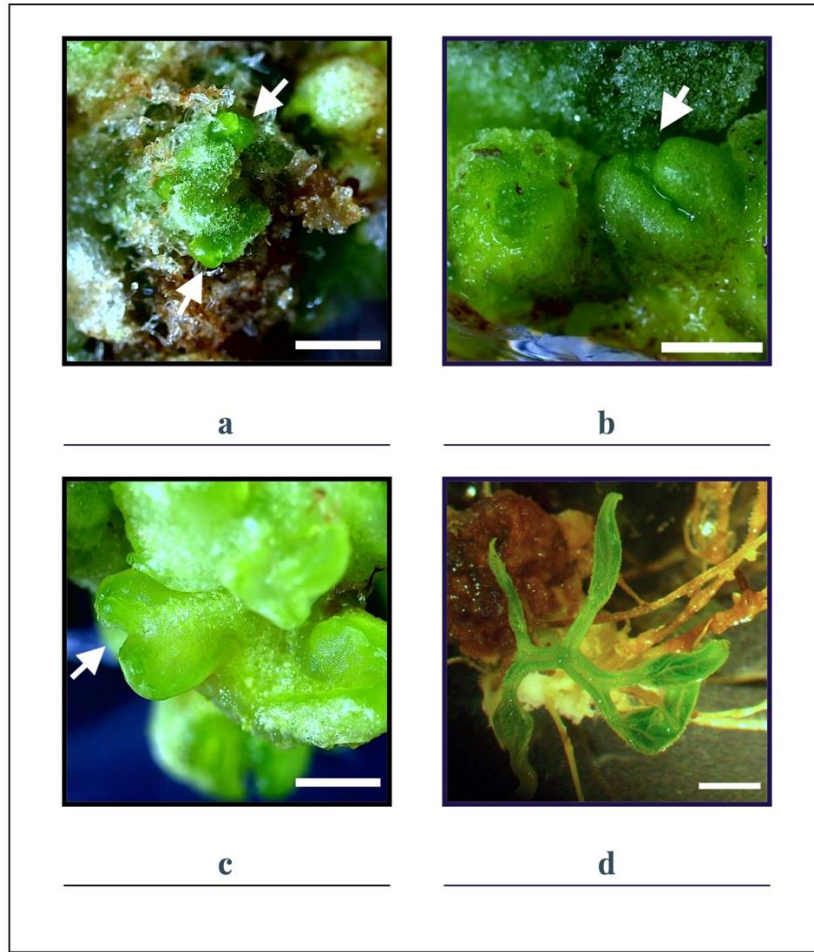


Şekil 4.27. Anter kültüründen (4 numaralı genotip (Tablo 3.1.) elde edilen kallusların parafin blok analizinden elde edilen preparatların floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) altında gözlenmesi a: Kallus dokusunda oluşan pro-embriyogenik yapılar b: kallus dokusu içinde gelişen proembriyolar; c: merkezde kendi damar kaynağı ile kallus dokusunun yüzeyinde oluşan globüler embriyoid; d: sekonder globüler embriyoid gelişimi

4.7. Haploid Bitki Eldesi

Aynı besi ortamında sürekli alt kültürlemenin yapıldığı kallus dokularında hacimsel artış gözlenmekle beraber ileri gelişim aşamalarına geçilmediği tespit edildiğinden literatürde başarılı olduğu belirtilen [108] ve yüksek şeker içeriğine sahip (45 g L^{-1} süktroz ve 45 g L^{-1} maltoz) bulunan MS besi ortamına kallus dokuları transfer edilmiştir. 2. numaralı genotipe ait anterlerden elde edilen kallusların 2.5 mg L^{-1} Kinetin ve 0.5 mg L^{-1} 2,4-D, 45 g L^{-1} süktroz ve 45 g L^{-1} maltoz içeren

MS besisi ortamında kültüründe 2. aydan itibaren sürgün gelişiminin başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. 2.5 mg L⁻¹ Kinetin ve 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D, 45 g L⁻¹ süktroz ve 45 g L⁻¹ maltoz içeren MS besisi ortamında kültüre alınan 2 numaralı genotipe (Tablo 3.1) ait anterden gelişen kallusun farklı gelişim dönemlerindeki görüntüsü a: globular aşamadaki embriyo, b: embriyoid, c: kalp aşamasında embriyo, d: sürgün (a, b, c ve d aynı örneğe ait ve 4 hafta ara ile alınan gelişim görüntüleri)

Bitki doku kültürü ortamı, karbon ve enerji kaynağı olarak genellikle süktroz veya glikoz olarak adlandırılan karbonhidratları içerir ve süktroz baskın olarak floemde bulunur [214]. Yapılan çalışmalar şeker konsantrasyonunun kültür ortamında somatik embriyoların oluşumunu etkilediğini bildirmektedir [215–218]. Ayrıca, salatalık [219], iris [220] ve kavun [218] kültür ortamına yüksek konsantrasyonda süktroz ilave edilerek somatik embriyoların uyartımı gerçekleştirilmiştir. Çeşitli çalışmalar süktroz ve glikoz dışındaki karbonhidratların da kültürlerin büyümesini benzer şekilde desteklediğini göstermiştir [221]. Örneğin Vuke ve Mott (1987), bazı

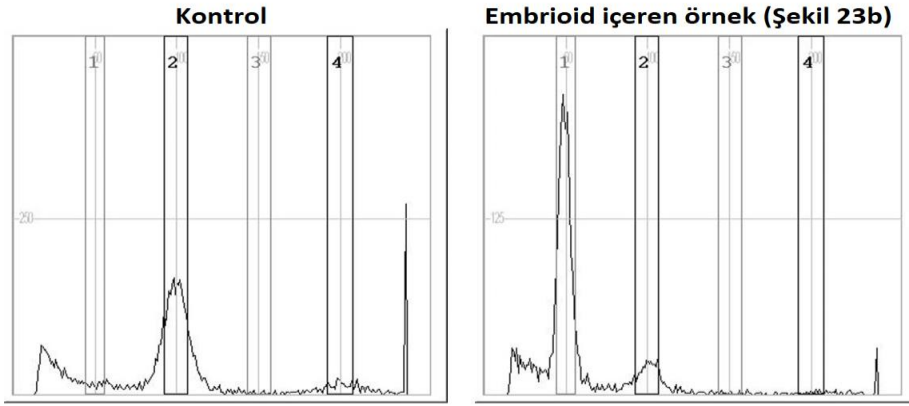
alternatif karbonhidratların, loblolly çamı (*Pinus taeda*) kallus kültürlerinin büyümesini desteklemede sükröz ile karşılaştırılabilir olduğunu bildirmiştir [222].

Tez çalışma bulguları incelendiğinde, yüksek şeker konsantrasyonunun embriyoların gelişimini destekleyerek sürgün oluşumunu indüklediği tespit edilmiştir. Besi ortamında artan şeker konsantrasyonunun ozmotik stres yaratarak, sürgün oluşumunu teşvik etmiş olabileceği düşünülmektedir. Dolayısı ile, yüksek şeker konsantrasyonunun ozmotik etkisinin sürgün gelişimini teşvik ettiği ileri sürülebilir. Yüksek ozmolaritenin olumlu etkisi, doğada embriyoyu çevreleyen ozmolarite değişikliklerini taklit edebileceği bildirilmiştir [223].

Bazı araştırmacıların sükrözün, somatik embriyogenez sırasında bir karbon kaynağı olarak hizmet ettiğini belirtmesinin yanı sıra [217], bazı araştırmacılar da bu kadar yüksek karbonhidrat konsantrasyonuna duyulan ihtiyacın sadece sükrözün beslenme fonksiyonu ile ilgili değil, aynı zamanda ozmotik düzenleyici olarak işlev görmesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [224,225]. Bununla birlikte, somatik embriyogenezde yüksek şeker konsantrasyonunun rolünün hücre ozmolaritesini etkileyebileceği yaygın bir bilgidir. Yüksek konsantrasyonda sükrözün somatik embriyogenez sırasında hücrelerin ozmotik potansiyeli üzerindeki etkisi bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir [225]. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, yüksek şeker konsantrasyonunun sürgün gelişimini teşvik etmesi, karbonhidratın hem besleyici hem de ozmotik düzenleyici işlevlerinin rolü olarak yorumlanabilir. Her ne kadar yüksek şeker konsantrasyonunun çeşitli bitkilerde somatik embriyogenez üzerindeki olumlu etkileri kaydedilse de tez çalışmasında düşük frekansta sürgün elde edilmesi, sürgün oluşumu üzerine diğer faktörlerin etkisinin elimine edilmesinde yeterli olmamıştır.

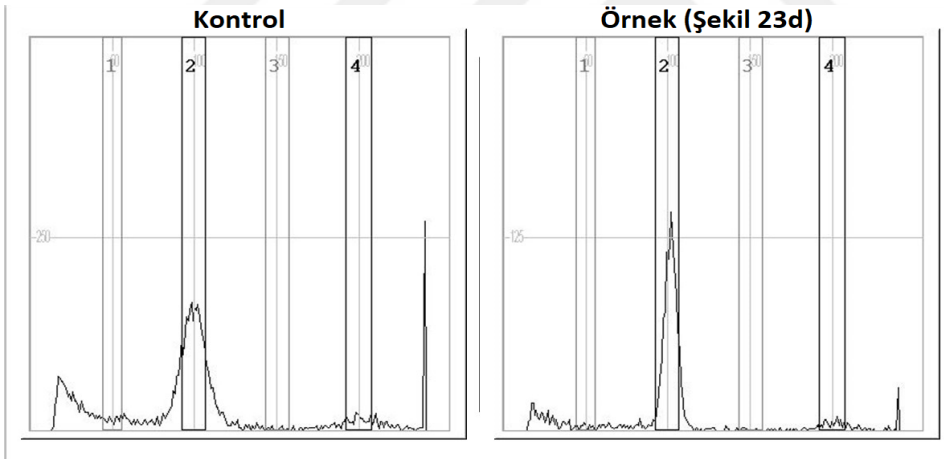
4.8. Anter Kültüründen Elde Edilen Örneklerin Ploidi Düzeylerinin Tespiti

Denemenin ilk aşamasında elde edilen kallusların flow sitometri analizinde, örneklerin miksploidi olduğu belirlenmiştir. Kalluslardan, embriyolar ve sürgünün başarılı bir şekilde elde edilmesinin ardından örnekler mikroskop altında incelenmiş ve özellikle embriyoid içeren kallus dokusunun (Şekil 4.28b) bir kısmı flow sitometri analizine götürülmüş ve diğer kısımları kültürde gelişimleri için bırakılmıştır. Embriyoid içeren kallus örneğinin (Şekil 4.28b) flow sitometri analizi sonucunda örneklerin haploid oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.29). Flow sitometri analizi Mersin'de bulunan T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.29. Şekil 4.28b’de belirtilen 2 numaralı genotipe (Tablo 3.1.) ait anterlerden gelişen ve embrioid içeren kallus dokusunda yapılan flow sitometri analiz sonucunda haploidi tespit edilmiştir.

Şekil 4.28d’de belirtilen ve bitkiye dönüşen örnekten alınan yaprak materyali ile yapılan flow sitometri analizi sonrasında ise örneğin katlanmış haploid olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.30.).



Şekil 4.30. Şekil 4.28d’de belirtilen 2 numaralı genotipe (Tablo 3.1.) ait anterlerden gelişen sürgüne ait doku örneği ile yapılan flow sitometri analiz sonucunda örneğin katlanmış haploid olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Fasulye anter kültüründe besi ortamı (MS ve B5), oksin (2,4-D), sitokinin (kinetin), aktif karbon ve genotiplerin haploid bitki oluşumuna etkisini saptamak amacıyla yürütülen bu araştırmada, toplam 12 adet genotip test edilmiştir. Söz konusu genotiplerin sera ve arazi koşullarında yetiştirilen bitkilerinden alınan anterler farklı konsantrasyonlarda, aktif karbon, kinetin ve 2,4-D içeren MS ve B5 besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Elde edilen kalluslar daha sonra farklı sürgün teşvik ortamlarında kültüre alınarak yüksek frekansta haploid bitkicikler elde edilmeye çalışılmıştır.

Araştırmada, kallus oluşturan anterlerin reaksiyon oranı besi ortamlarına bağlı olarak, %0 ila %40.5 ve genotiplere bağlı olarak, %1.3 ile %6.3 arasında değişiklik göstermiştir. Bu değişikliğin önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Tüm faktör kombinasyonlarının ortalaması olarak anter reaksiyon oranı %3.3 olarak gerçekleşmiştir. Test edilen 2,4-D ve kinetin konsantrasyonları B5 ortamında kallus reaksiyon oranını MS ortamına kıyasla pozitif şekilde etkilemiştir. MS ortamına kıyasla etkinliği istatistiksel olarak belirlenen B5 ortamında ise en yüksek kallus indüksiyon oranı 2,5 mg L⁻¹ kinetin ve 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D içeren kültür ortamında kaydedilmiştir. Genotipler bazında değerlendirildiğinde ise kallus indüksiyon oranı 5 numaralı genotipte sağlanmıştır. Aktif karbon ile kombine edilen 2,4-D ve kinetin içeren MS ve B5 besi ortamının hiçbirinde kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Literatür bilgileri ışığında, fasulyenin, anter kültüründe inatçı bir tür olduğu ve rejenerasyon yeteneğinin genotipe bağlı olarak çok önemli varyasyon gösterdiği bilinmektedir. Fasulye için genotipten bağımsız tekrarlanabilir bir in vitro sistem belirlemek oldukça zor gözükmektedir. Birçok araştırmacı bu kritik soruna çözüm bulmak adına hem bitki büyüme düzenleyicilerinin hem de kültürde materyal olarak kullanılacak eksplant kaynağının rejenerasyon potansiyeli üzerine çalışmalarına devam etmektedir. Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular şimdiye kadar 12 fasulye genotipinin anter kültürü ile rejenerasyon potansiyellerinin değerlendirildiği en kapsamlı literatür bilgisi olma özelliğine sahiptir. Tez kapsamında, 12 farklı fasulye genotipine ait anter örnekleri çok sayıda besi ortamında kültüre alınmış ve bu sayede hem genotipin hem de bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi birlikte araştırılmıştır.

Genel olarak bakıldığında, temelde MS ya da B5 besi ortamı baklagillerde anter ve mikrosporlar için gerekli besi bileşiklerini karşılayabilse de genotipe bağlı gelişim göz önüne alındığında her iki besi ortamı içinde maksimum verimi sağlayacak optimizasyonların yapılması

olası gözükmetedir. Androgenez için kültür ortamında bulunması gereken bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonu türler ve genotipler arasında çeşitlilik gösterse de tüm araştırmacılar haploid embriyo indüksiyonu için bir çeşit büyüme düzenleyicisinin ortamda bulunmasının gerekli olduğu konusunda görüş birliği içinde olsalar da [97] kültür ortamına eklenen BAP, kinetin, TDZ veya IAA gibi bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin besi ortamında eksplantta fenolik bileşiklerin biriktiğinin bir göstergesi olan kahverengileşmeyi yoğunlaştırdığı da bildirilmiştir [188]. Sitokininlerin fenolik bileşiklerin sentezlenmesini uyurabileceği göz önünde bulundurularak besi ortamlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin yüksek konsantrasyonlarda ilavesinin tekrar değerlendirilmesinin kritik bir nokta olduğu düşünülmektedir.

Gelecekteki çalışmalarda, orijinal olarak soya fasulyesi kök hücreleri için tasarlanmış olan B5 besi ortamı gibi baklagiller için tasarlanmış ortamları incelemek faydalı olabilir [172]. Bu deneyde kullanılan ortamlar, karbon kaynağı olarak mikrospor kültüründe en sık kullanılan karbon kaynağı olan sükrozun farklı konsantrasyonlarını içermektedir [226]. Tahıl bitkileri ile yapılan anter kültürü çalışmalarında sükroz yerine maltoz da tercih edilmektedir (Wedzony ve ark. 2009), ancak mevcut sonuçlar maltozun kullanımı için olumlu veya olumsuz bir kanıt sunmamaktadır. Yüksek şeker konsantrasyonlarında dengeli ozmolariteye bağlı olarak embriyogenezin indüklendiği bilgisi ile yüksek sükroz ve maltoz (her ikisi için de 45 mg L^{-1}) ile hazırlanan, Tablo 3.2.'de detayları verilen 35 numaralı (B5 + kinetin 2.5 mg L^{-1} + 2,4-D 0.5 mg L^{-1}) besi ortamında sürgün oluşumu gözlenmesi bu konuda özellikle fasulyede daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir. Her ne kadar çalışmada düşük frekansta bitki oluşumu kaydedilse de mevcut literatürdeki açık göz önüne alındığında, kullanılan her parametre ve bu parametrelere ilişkin süreç ve sonuçların belirlenmesi ve bildirilmesinin kritik bir öneme sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen bulgular, çalışılan genotipler için bildirilen ilk veriler olma özelliğine sahiptir.

Kültür ortamında karbon kaynağı olarak işlev görmesinin yanı sıra sükrozun, ozmolariteyi belirlediği göz önüne alındığında, ortamdaki sükrozun bir kısmının polietilen glikol (PEG) ile değiştirilmesi de test edilmeye değer olabilir, çünkü bu kombinasyon *Brassica napus* L. mikrospor kültürlerinde embriyogenez tetiklemiştir [227]. Alternatif olarak PEG'in denemelerde sükroz yerine kullanılmasının mikrosporlar tarafından alınamayacak kadar büyük bir molekül olan PEG'in ortamın ozmolaritesini belirli bir seviyede tutabileceği düşünülmektedir.

Literatür bilgileri ışığında, *Phaseolus* cinsi içinde tüm çeşitler için ortak bir rejenerasyon protokolü geliştirmekten ziyade çeşide özgü protokollerin geliştirilmesinin, daha olası ve ulaşılabilir olacağı görülmektedir. Genotipten tamamen bağımsız, ekonomik olarak uygulanabilir rejenerasyon protokollerinin oluşturulmasının şu an için daha fazla ve yoğun çalışmalar

gerektirdiği düşünülmektedir. Uygun protokollerin oluşturulması geniş ölçekli, yoğun ve iş birliğine dayalı çalışmalar ile mümkün görünmektedir.

Nüfusun artmasına bağlı olarak, gıda ihtiyacının giderilmesi gün geçtikçe zorlaşmakta, bununla beraber hem ekim alanlarının giderek azalması hem de dayanıklı çeşitleri geliştirmede yaşanan sorunlar ileride yaşanılacağı öngörülen problemlere uygun çözümler üretilmesini gerektirmektedir. Tüm bu sebepler ile yaşanan gıda dengesizliğinin üstesinden gelmede, biyoteknolojik çalışmalar ile desteklenen tarımsal aktivitelerin varlığı da önem kazanmaktadır. Bu açıdan bakıldığında, sunulan bu tez çalışmasına ait bulgular ileri fasulye ıslah, çeşit geliştirme ve gen transfer çalışmaları açısından kaynak teşkil edebilecektir.

Her ne kadar tez çalışmasında düşük frekansta bitkisi eldesi gerçekleşmiş olsa da biyoteknolojik gelişmelerin yakından takip edilmesi, var olan çalışmaların doğru analiz edilerek bu bilgiler ışığında yürütülen çalışmalar ile fasulye için uygun protokollerin belirlenerek haploidizasyon çalışmalarından olumlu sonuçlar elde edilebileceğine dair bilgiler sunmaktadır.

Bilim insanlarının yoğun çalışmaları sayesinde tıpkı fasulye gibi 1970 ve 80'li yıllarda in vitro rejenerasyona dirençli olduğu kabul edilen tahıllar için günümüzde çabalar sonuç vermiş ve başarı elde edilmiş durumdadır. Bu açıdan ele alındığında baklagillere gösterilen yoğun ilgi ve dinamik çalışmalar ile fasulye içinde tekrar edilebilir ve optimize edilmiş protokollerin geliştirilmesi çabaları umut vericidir.

Sonraki çalışmalarda donör bitkiye çeşitli bitki büyüme düzenleyiciler ile anter kültürü çalışmalarından önce ön muamelede bulunulması, anter kültüründe besi ortamına alternatif bitki büyüme düzenleyicileri ile bunların farklı konsantrasyonlarının ile karbon kaynağı olarak maltoz gibi farklı şekerlerin ilavesinin araştırılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra donör bitkilerin arazi koşullarında yetiştirilmesinin serada yetiştirilen bitkilere kıyasla avantaj sağlayabilme potansiyeli de değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. NCBI:txid3885. *Database*, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
2. Günay, A. (2005). *Sebze Yetiştiriciliği* (2005. bs, C. 2).
3. Uysal, F. (2002). *Kalite fonksiyonunun Türkiye'de baklagil dış satımına etkileri* [Yüksek Lisans Tezi]. Akdeniz Üniversitesi.
4. Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., & Attene, G. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), E788-E796.
5. Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., & Chavarro, C. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature genetics*, 46(7), 707-713.
6. Myers, J. R., & Baggett, J. R. (1999). Improvement of snap bean. İçinde *Common bean improvement in the twenty-first century* (ss. 289-329). Springer.
7. Singh, R., Chung, G., & Nelson, R. L. (2007). Landmark research in legumes. *Genome*, 50(6), 525-537.
8. Huxley, A. J., & Griffiths, M. (1992). *Dictionary of gardening*. Stockton Press.
9. Thompson, R., & Watson, W. (2019). *The Gardener Assistant*. Alpha Edition.
10. Vilmorin, A. (2012). *The Vegetable Garden*. Ten Speed Press; English ed edition.
11. Simons, A. J. (1948). *The Vegetable Growers Handbook*. Penguin Books.
12. Şehirali, S. (1988). *Yemeklik dane baklagiller*. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
13. Correa-Viktoria, F. J. (1987). *Pathogenic variation, production of toxic metabolites, and isoenzyme analysis in Phaeoisariopsis griseola (Sacc.) Ferr* [Doktora Tezi]. Michigan State University.
14. Guzmán, P., Gilbertson, R., Nodari, R., Johnson, W., Temple, S., Mandala, D., Mkandawire, A., & Gepts, P. (1995). Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology*, 85(5), 600-607.
15. Liebenberg, M. & P., Z.A. (1997). A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *African Plant Protection*, 3(2), 81-106.
16. Saettler, A. (1991). Angular leaf spot. *Compendium of bean diseases*, 15-16.

17. Schwartz, H., Correa, V., Pineda, D., Otoya, M., & Katherman, M. (1981). Ascochyta, angular and white fly leaf spots in Colombia. *Plant Disease*, 65, 494-496.
18. Wortmann, C. S. (1998). *Atlas of common bean (Phaseolus vulgaris L.) production in Africa* (Sayı 297). CIAT.
19. Erper, I., Karaca, G. H., & Ozkoc, I. (2008). Root rot disease incidence and severity on some legume species grown in Samsun and the fungi isolated from roots and soils. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(7), 501-506.
20. Vural, C., & Soyly, S. (2012). Prevalence and incidence of fungal disease agents affecting bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Research on Crops*, 13(2), 634-640.
21. Angioi, S. A., Rau, D., Attene, G., Nanni, L., Bellucci, E., Logozzo, G., Negri, V., Zeuli, P. S., & Papa, R. (2010). Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(5), 829-843.
22. Gepts, P., & Debouck, D. (1991). Origin, domestication, and evolution of the common bean. *Common beans: research for crop improvement*, 7-53.
23. Graham, P., & Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 131-146.
24. Duran, L. A., Blair, M. W., Giraldo, M., Macchiavelli, R., Prophète, E., Nin, J. C., & Beaver, J. S. (2005). Morphological and molecular characterization of common bean landraces and cultivars from the Caribbean. *Crop Science*, 45(4), 1320-1328.
25. Karataş, A., Büyükdiñç, D. T., İpek, A., Yağcıoğlu, M., Sönmez, K., & Ellialtıoğlu, Ş. Ş. (2017). Türkiye’de Fasulyede Yapılan Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10(1), 16-27.
26. Şehirali, S., Özgen, M., Karagöz, A., Sürek, M., Adak, S., Güvenç, İ., Tan, A., Burak, M., & Kaymak, H. (2005). *Bitki Genetik Kaynaklarının Korunma ve Kullanımı, Türkiye Ziraat Mühendisleri VI. Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005, 22 s.*
27. Varankaya, S., & CEYLAN, E. (2012). Orta Anadolu Bölgesinde Fasulye Tarımında Karşılaşılan Problemler ve Çözüm Önerileri. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 26(1), 15-26.
28. Weissenbacher, M. (2009). *Sources of power: How energy forges human history* (C. 1). ABC-CLIO.
29. Akçin, A. (1988). *Yemeklik Tane Baklagiller Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi*.
30. de Almeida Costa, G. E., da Silva Queiroz-Monici, K., Reis, S. M. P. M., & de Oliveira, A. C. (2006). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food chemistry*, 94(3), 327-330.

31. Sprent, J. I., & Sprent, P. (1990). Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects. *Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects*.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19911956126>
32. Adams, M., Coyne, D., Davis, J., Grahaw, P., & Francis, C. (1985). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Grain Legume Crops. RJ Summer field and EH Roberts (eds.), Collins Professional and Technical Books*.
33. ŞİMŞEK, E. (t.y.). Türkiye’de ve bazı ülkelerde baklagiller üretimindeki işgücü verimliliğinin karşılaştırılması. *Akademik Ziraat Dergisi*, 8(1), 77-88.
34. Veltcheva, M., Svetleva, D., & Petkova, S. (2003). In vitro cultivation and regeneration of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17(1), 50-58.
35. Kulaz, H., & Yilmaz, A. (2014, Ekim 20). *Doğu Anadolu’nun Güneyindeki Yerel Fasulye (Phaseolus vulgaris L.) Genotiplerinin Hidratasyon Kapasiteleri ve Hidratasyon İndekslerinin Belirlenmesi*. 5. Uluslararası Katılımlı Tohumculuk Kongresi.
36. Borém, A., & Fritsche-Neto, R. (2014). *Biotechnology and plant breeding: applications and approaches for developing improved cultivars*. Elsevier.
37. Singh, K., Malhotra, R., & Witcombe, J. R. (1983). *Kabuli chickpea germplasm catalog*.
38. *SOMATİK EMBRİYOGENESİS, HAPLOİT BİTKİ ÜRETİMİ SOMATİK EMBRİYOGENESİS*. (t.y.). Geliş tarihi 18 Aralık 2021, gönderen https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/112002/mod_resource/content/0/BAH%C3%87E%20B%C4%B0TK%C4%B0LER%C4%B0NDE%20B%C4%B0YOTEKNOLOJ%C4%B0-11.%20HAFTA.pdf
39. Savaskan, C., Ellerbrook, C., Fish, L., & Snape, J. (1997). Doubled haploid production in Turkish durum wheats using crosses with maize. *Plant Breeding*, 116(3), 299-301.
40. Duke, J. A. (1981). Legume species. İçinde *Handbook of legumes of world economic importance* (ss. 5-310). Springer.
41. Heywood, V. (1971). Leguminosae; a new systematic purview. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*.
42. Selva, E., Stouffs, B., & Briquet, M. (1989). In vitro propagation of *Vicia faba* L. by micro-cutting and multiple shoot induction. *Plant cell, tissue and organ culture*, 18(2), 167-179.
43. Government of Canada, P. S. and P. C. (t.y.). *MEXICO: PULSE AND SPECIAL CROPS SITUATION AND OUTLOOK*. Geliş tarihi 18 Aralık 2021, gönderen https://publications.gc.ca/site/archieve-archived.html?url=https://publications.gc.ca/collections/collection_2007/agr/A27-18-20-8E.pdf
44. Pellet, P. (1988). İnsan beslenmesinde mercimek ve nohut’un yeri. *Herkes için mercimek Sempozyumu*, 29-30.

45. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Trade Statistics.* (2018). FAOSTAT.
<https://www.fao.org/faostat/en/>
46. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production Statistics.* (2019).
<https://www.fao.org/statistics/en/>
47. *Baklagil Raporu.* (t.y.). Ulusal Baklagil Konseyi. Geliş tarihi 18 Aralık 2021, gönderen
http://www.ubk.org.tr/ziraat_rapor.pdf
48. Kün, E., Çiftçi, C., Birsin, M., Ülger, A., Karahan, S., Zencirci, N., Öktem, A., Güler, M., Yılmaz, N., & Atak, M. (2005). Tahıl ve Yemelik Dane Baklagil Üretimi. *Türkiye Tarım Mühendisliği VI. Teknik Kongresi*, 396-407.
49. *TÜİK - Veri Portalı, Bitkisel Üretim İstatistikleri.* (t.y.). Geliş tarihi 18 Aralık 2021, gönderen
<https://data.tuik.gov.tr/>
50. Akova, Y. (2009). İGEME Bakliyat Raporu. *TC Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi, Ankara.*
51. Ton, A., Karaköy, T., & Anlarsal, A. E. (2014). Türkiye’de Yemelik Tane Baklagiller Üretiminin Sorunları ve Çözüm Önerileri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(4), 175-180.
52. *ITIS - Report: Phaseolus vulgaris L. Taxonomic Serial No.: 26857.* (t.y.). Geliş tarihi 18 Aralık 2021, gönderen
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26857#null
53. Wortmann, C. (2006). *Phaseolus vulgaris L.(common bean): Prota 1: cereals and pulses/Céréales et légumes secs.*
54. Freytag, G., & Debouck, D. G. (2002). Taxonomy, Distribution, and Ecology of the Genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionodeae) in North America, Mexico and Central America. Taxonomía, distribución y ecología del género Phaseolus (Leguminosae-Papilionodeae) en Norteamérica, México y Centroamérica. *SIDA, Botanical Miscellany.*
55. Gentry, H. S. (1969). Origin of the common bean, Phaseolus vulgaris. *Economic Botany*, 23(1), 55-69.
56. Purseglove, J. W. (1968). Tropical crops. Dicotyledons 1 and 2. *Tropical crops. Dicotyledons 1 and 2.*
57. Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (Phaseolus spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.
58. Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.
59. Porch, B., SJ, D., GD, J., & AS, K. (2013). *DJ, & Dempewolf, H.(2013). Use of Wild Relatives and Closely Related Species to Adapt Common Bean to climate Change.*

60. Jones, A. (1999). Phaseolus bean: Post-harvest operations. *AGSI/FAO: Mejia D. and Lewis B. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. pp, 1-24.
61. Singh, S. P., Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45(3), 379-396.
62. Singh, S. P., & Schwartz, H. F. (2010). Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science*, 50(6), 2199-2223.
63. GARCÍA, E. H., PEÑA-VALDIVIA, C. B., Aguirre, J. R., & MURUAGA, J. S. (1997). Morphological and Agronomic Traits of a Wild Population and an Improved Cultivar of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*L.). *Annals of Botany*, 79(2), 207-213.
64. Debouck, D. G., Hidalgo H, R., Fernandez, F., Correa E, A., & Smithson, J. B. (1986). Morphology of the common bean plant *Phaseolus vulgaris*. *CIAT Series; 04EB-09.01*.
65. Lackey, J. (1981). Tribe 10. Phaseoleae DC. *Advances in legume systematics*, 1, 301-327.
66. Mmbaga, M. T., & Steadman, J. R. (1992). Nonspecific resistance to rust in pubescent and glabrous common bean genotypes. *Phytopathology*, 82(11), 1283-1287.
67. Pillemer, E. A., & Tingey, W. M. (1978). Hooked trichomes and resistance of *Phaseolus vulgaris* to *Empoasca fabae* (Harris). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24(1), 83-94.
68. Gülümser, A., Bozoğlu, H., & Pekşen, E. (2013). *Yemeklik Tane Baklagiller*.
69. Wallace, D., & Enriquez, G. (1980). Daylength and temperature effects on days to flowering of early and late maturing beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of American Society for Horticultural Science*, 105, 583-591.
70. Andersson, M. S., & De Vicente, M. C. (2010). *Gene flow between crops and their wild relatives*. JHU Press.
71. Webster, B. D., Tucker, C., & Lynch, S. P. (1977). A morphological study of the development of reproductive structures of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*, 102, 640-643.
72. Çiftçi, C., & Şehirli, S. (1984). Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşitlerinde değişik özelliklerin fenotipik ve genotipik farklılıkların saptanması. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yayın No: TB, 4*.
73. Ellwood, S. R., Phan, H. T., Jordan, M., Hane, J., Torres, A. M., Avila, C. M., Cruz-Izquierdo, S., & Oliver, R. P. (2008). Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure with *Lens culinaris*. *BMC genomics*, 9(1), 1-11.
74. Reinert, J., & Bajaj, Y. S. (2013). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Springer Science & Business Media.
75. Seguí-Simarro, J. M. (2010). Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76(3), 377-404.
76. Dong, Y.-Q., Zhao, W.-X., Li, X.-H., Liu, X.-C., Gao, N.-N., Huang, J.-H., Wang, W.-Y., Xu, X.-L., & Tang, Z.-H. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. *Plant cell reports*, 35(10), 1991-2019.

77. Sauton, A., & Vaulx, R. D. (1987). Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié. *Agronomie*, 7(2), 141-148.
78. Ishii, T., Karimi-Ashtiyani, R., & Houben, A. (2016). Haploidization via chromosome elimination: means and mechanisms. *Annual review of plant biology*, 67, 421-438.
79. Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., & Abak, K. (2000). Haploid bitki üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi*, 1, 137-189.
80. Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in plant science*, 12(8), 368-375.
81. Khush, G., & Virmani, S. (1996). Haploids in plant breeding. İçinde *In vitro haploid production in higher plants* (ss. 11-33). Springer.
82. Palmer, C. D., & Keller, W. A. (2005). Overview of haploidy. İçinde *Haploids in crop improvement II* (ss. 3-9). Springer.
83. Swanson, E., & Erickson, L. (1989). Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Theoretical and applied genetics*, 78(6), 831-835.
84. Dağüstü, N. (2018). Bitki Doku Kültürü Uygulamalarının Islah Çalışmalarında Kullanılması. *Türktob Dergisi*, 25, 23-26.
85. Krikorian, A., & Berquam, D. L. (1969). Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. *The botanical review*, 35(1), 59-67.
86. Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., & Ferreira, I. C. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial crops and products*, 82, 9-22.
87. Ahuja, R. (1986). Application of biotechnology to forest tree species and problems involved. *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt fuer Forst-und Holzwirtschaft (Germany, FR)*.
88. Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer science & business media.
89. Duran, R. E. (2007). *Tuzlu koşullar için geliştirilebilecek buğday genotiplerinin anter kültür tekniğine uyumu* [Doktora Tezi]. Süleyman Demirel Üniversitesi.
90. Tulecke, W. R. (1953). A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. *Science*, 117(3048), 599-600.
91. Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204(4957), 497-497.
92. Burgin, J., & Nitsch, J. (1967). Obtention de *Nicotiana* haploids apartir determine cultivars. *Ann Physiol Veg*, 9, 377-382.
93. Keller, W. (1987). Haploids from gametophytic cells-recent developments and future prospects. *Plant tissue and cell culture*.

94. WILSON, H. M., MIX, G., & FOROUGH-WEHR, B. (1978). Early microspore divisions and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare* L. *Journal of Experimental Botany*, 29(1), 227-238.
95. Bhojwani, S. S., & Razdan, M. K. (1986). *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier.
96. Cerit, İ., Cömertpay, G., Oyucu, R., ÇAKIR, B., Hatipoğlu, R., & Özkan, H. (2016). Melez Mısır Islahında In-Vivo Katlanmış Haploid Tekniğinde Kullanılan Farklı Inducer Genotiplerin Haploid İndirgeme Oranların Belirlenmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(ÖZEL SAYI-1), 52-57.
97. Croser, J., Lülisdorf, M., Davies, P., Clarke, H., Bayliss, K., Mallikarjuna, N., & Siddique, K. (2006). Toward doubled haploid production in the Fabaceae: progress, constraints, and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(2), 139-157.
98. Çelikleş, N., Tiryakioğlu, M., Can, E., Kutlay, D., & Hatipoğlu, R. (2015). Production of dihaploids in durum wheat using *Imperata cylindrica* L. mediated chromosome elimination. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(1), 48-54.
99. Fazaa, M., El-Sabagh, A., Anis, G., El-Rewainy, I., Barutçular, C., Hatipoğlu, R., & Islam, M. (2016). The agronomical performances of doubled haploid lines of rice (*Oryza sativa* L.) derived from another culture. *J Agric Sci*, 8(5), 177-183.
100. Liu, S., Wang, H., Zhang, J., Fitt, B. D., Xu, Z., Evans, N., Liu, Y., Yang, W., & Guo, X. (2005). In vitro mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Reports*, 24(3), 133-144.
101. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B., & Szarejko, I. (2003). *Doubled haploid production in crop plants: a manual*. Springer Science & Business Media.
102. Szakács, É., Kovács, G., Pauk, J., & Barnabás, B. (1988). Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant cell reports*, 7(2), 127-129.
103. Bajaj, Y. (1990). In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. İçinde *Haploids in crop improvement I* (ss. 3-44). Springer.
104. Cho, M. S., & Zapata, F. J. (1990). Plant regeneration from isolated microspore of indica rice. *Plant and cell physiology*, 31(6), 881-885.
105. Kristiansen, K., & Andersen, S. B. (1993). Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67(1), 105-109.
106. Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., & Fári, M. (1995). Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding*, 114(1), 78-80.
107. Babaoğlu, S., Yorgancıoğlu, M., & Akbudak, M. (2002). *Doku Kültürü: temel laboratuvar teknikleri: bitki biyoteknolojisi-I, doku kültürü ve uygulamaları*.

108. Grewal, R. K., Lulsdorf, M., Croser, J., Ochatt, S., Vandenberg, A., & Warkentin, T. D. (2009). Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.): role of stress treatments. *Plant Cell Reports*, 28(8), 1289-1299.
109. Smýkal, P. (2000). Pollen embryogenesis-the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, 43(4), 481-489.
110. Lauxen, M. da S., Kaltchuk-Santos, E., Hu, C., Callegari-Jacques, S. M., & Bodanese-Zanettini, M. H. (2003). Association between floral bud size and developmental stage in soybean microspores. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, 515-520.
111. Salas, P., Rivas-Sendra, A., Prohens, J., & Seguí-Simarro, J. M. (2012). Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica*, 184(2), 235-250.
112. Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2005). Meiotic metaphase I to telophase II as the most responsive stage during microspore development for callus induction in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27(4), 675-685.
113. Summers, W. L., Jaramillo, J., & Bailey, T. (1992). Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus. *HortScience*, 27(7), 838-840.
114. Irikova, T. (2008). *Obtaining and genotype investigations of androgenic haploids from Bulgarian pepper (Capsicum annuum L.) varieties* [Doktora Tezi]. University of Plovdiv.
115. Rodeva, V., Gudeva, L. K., Grozeva, S., & Trajkova, F. (2007). Obtaining haploids in anther culture of pepper *Capsicum annuum* L. and their inclusion in the breeding process. *Journal of Agriculture and Plant Sciences*, 7(1), 7-18.
116. Dodds, J. H., & Roberts, L. W. (1985). *Experiments in plant tissue culture*. International Potato Center.
117. Hatipoğlu, R. (1999). *Bitki biyoteknolojisi*. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gn. Yayınları.
https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=tr&user=GScpH_AAAA AJ&cstart=100&pagesize=100&sortby=pubdate&citation_for_view=GScpH_AAAAAJ:9ZlFYXVOiuMC
118. Abdollahi, M. R., & Rashidi, S. (2018). Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2, 4-D and silver nitrate containing media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 133(1), 39-49.
119. Arı, E. (2006). *Türkiye" de doğal olarak yetişen Anemone coronaria var. coccinea" da anter kültürü çalışmaları* [Doktora Tezi]. Çukurova Üniversitesi.
120. Genovesi, A. D., & Collins, G. (1982). In vitro production of haploid plants of corn via anther culture 1. *Crop Science*, 22(6), 1137-1144.

121. Morrison, R. A., Koning, R. E., & Evans, D. A. (1986). Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *Journal of plant physiology*, 126(1), 1-9.
122. Sunderland, N., Xu, Z., & Huang, B. (1981). *Recent advances in barley anther culture*. Barley genetics IV: proceedings of the Fourth International Barley Genetics Symposium, Edinburgh, 22-29 July 1981/patron, HRH the Duke of Edinburgh.
123. Wenzel, G., & Uhrig, H. (1981). Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 59(6), 333-340.
124. KUMLAY, A. M., & ERYİĞİT, T. (2011). Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: bitki hormonları. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 1(2), 47-56.
125. Davies, P. J. (2013). *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Springer Science & Business Media.
126. Gray, W. M. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS biology*, 2(9), e311.
127. Keshishian, E. A., & Rashotte, A. M. (2015). Plant cytokinin signalling. *Essays in biochemistry*, 58, 13-27.
128. Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 12.
129. Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1392-1392.
130. Williams, M. (2011). Introduction to phytohormones. Teaching tools in plant biology: Lecture notes. *The Plant Cell (online)*, doi/10.1105/tpc, 110.
131. Koprna, R., De Diego, N., Dundálková, L., & Spíchal, L. (2016). Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 24(3), 484-492.
132. Amasino, R. (2005). 1955: Kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiology*, 138(3), 1177-1184.
133. Schumaker, K. S., & Gizinski, M. J. (1993). Cytokinin stimulates dihydropyridine-sensitive calcium uptake in moss protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), 10937-10941.
134. Schumaker, K. S., & Gizinski, M. J. (1995). 1, 4-Dihydropyridine Binding Sites in Moss Plasma Membranes: PROPERTIES OF RECEPTORS FOR A CALCIUM CHANNEL ANTAGONIST (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(40), 23461-23467.
135. Yang, D. (2013). Biological activities of kinetin on animals. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(6), 671-675.
136. Zhang, K., Letham, D. S., & John, P. C. (1996). Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34 cdc2-like H1 histone kinase. *Planta*, 200(1), 2-12.

137. Sönmez, E. (2019). *In vitro* koşullarda *valeriana officinalis* l. bitkisinin farklı eksplantlarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi [Yüksek Lisans Tezi]. Kütahya Dumlupınar Üniversitesi.
138. Gamborg, O. L., Constabel, F., Fowke, L., Kao, K., Ohyama, K., Kartha, K., & Pelcher, L. (1974). Protoplast and cell culture methods in somatic hybridization in higher plants. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 16(4), 737-750.
139. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
140. Mroginski, L., & Kartha, K. (1981). Regeneration of pea (*Pisum sativum* L. cv. Century) plants by in vitro culture of immature leaflets. *Plant Cell Reports*, 1(2), 64-66.
141. Hussey, G., & Gunn, H. (1984). Plant production in pea (*Pisum sativum* L. cvs. Puget and Upton) from long-term callus with superficial meristems. *Plant Science Letters*, 37(1-2), 143-148.
142. Rubluo, A., Kartha, K., Mroginski, L., & Dyck, J. (1984). Plant regeneration from pea leaflets cultured in vitro and genetic stability of regenerants. *Journal of plant physiology*, 117(2), 119-130.
143. Kysely, W., Myers, J. R., Lazzeri, P. A., Collins, G. B., & Jacobsen, H.-J. (1987). Plant regeneration via somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant cell reports*, 6(4), 305-308.
144. Polanco, M. C., Peláez, M. I., & Ruiz, M. L. (1988). Factors affecting callus and shoot formation from in vitro cultures of *Lens culinaris* Medik. *Plant cell, tissue and organ culture*, 15(2), 175-182.
145. Jackson, J. A., & Hobbs, S. L. (1990). Rapid multiple shoot production from cotyledonary node explants of pea (*Pisum sativum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 26(8), 835-838.
146. Özcan, S., Barghchi, M., Firek, S., & Draper, J. (1992). High frequency adventitious shoot regeneration from immature cotyledons of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant cell reports*, 11(1), 44-47.
147. Polanco, M., & Ruiz, M. (1997). Effect of benzylaminopurine on in vitro and in vivo root development in lentil, *Lens culinaris* Medik. *Plant Cell Reports*, 17(1), 22-26.
148. Mehta, A. (1966). IN VITRO INITIATION+ GROWTH OF ROOT CALLUS OF PHASEOLUS VULGARIS L. *INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY*, 4(3), 187-+.
149. Haddon, L., & Northcote, D. (1976). The influence of gibberellic acid and abscisic acid on cell and tissue differentiation of bean callus. *Journal of cell science*, 20(1), 47-55.
150. Crocomo, O., Peters, J., & Sharp, W. (1976). Interactions of phytohormones on the control of growth and root morphogenesis in cultured *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Turrialba*, 26(3), 232-236.

151. Malik, K. A., & Saxena, P. K. (1991). Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotive role of N 6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. *Planta*, 184(1), 148-150.
152. Mok, D., Mok, M., & Rabakoarihanta, A. (1978). Interspecific hybridization of *Phaseolus vulgaris* with *P. lunatus* and *P. acutifolius* [beans]. *Theoretical and Applied Genetics*.
153. Peralta, L., Carrillo Castañeda, G., & Salceda, S. (1978). Estudio sobre el desarrollo de citocultivos de *Phaseolus vulgaris* L. y *Lycopersicum esculentum* en medios suplementados con aguamiel y agua de coco Study on development of citocultivations of *Phaseolus vulgaris* L. and *Lycopersicum esculentum* in medium supplementd with aguamiel and coconut mik. *Agrociencia (México)*.(no. 31) p. 75-81.
154. Crocomo, O., GALO, L., Tonin, G., & Sacchi, N. (1979). Developmental control of *Phaseolus vulgaris* using embryo axis culture. *Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba*, vl, nl, 55-58.
155. Malmberg, R. L. (1979). Regeneration of whole plants from callus culture of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L. *Planta*, 146(2), 243-244.
156. Kartha, K., Pahl, K., Leung, N., & Mroginski, L. (1981). Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1671-1679.
157. Rubluo, A., & Kartha, K. (1985). In vitro culture of shoot apical meristems of various *Phaseolus* species and cultivars. *Journal of plant physiology*, 119(5), 425-433.
158. Benedicic, D., Ravnika, M., & Gogala, N. (1991). *The influence of jasmonic acid on the development of Phaseolus vulgaris shoot culture*. 85-86.
159. Mohamed, M. F., Coyne, D. P., & Read, P. E. (1993). Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(1), 158-162.
160. de Oliveira, P., Pasqual, M., & Lopes, P. (1994). Effect of cytokinins and auxins on in vitro callus formation of bean anthers (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Eriparza). *Revista Ceres (Brazil)*.
161. Fernandez-Caso, M., Pelaez, M. I., & Ruiz, M. L. (1996). Onset of in vitro morphogenic response and protein pattern changes in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of plant physiology*, 149(6), 757-761.
162. Klu, G., Jacobsen, E., & Van Harten, A. (1997). Induced mutations in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. DC) with low tannin content. *Euphytica*, 98(1), 99-107.
163. Zhang, Z., Coyne, D. P., & Mitra, A. (1997). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(3), 300-305.

164. Santalla Ferradás, M., Power, J., & Davey, M. (1998). *Efficient in vitro shoot regeneration responses of Phaseolus vulgaris and P. coccineus*.
165. de Carvalho, M. H. C., Van Le, B., Zuily-Fodil, Y., Thi, A. T. P., & Van, K. T. T. (2000). Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Science*, 159(2), 223-232.
166. ISTA. (1996). International Seed Testing Association (Uluslararası Tohum Test Örgütü).
167. Rudolf, K., Bohanec, B., & Hansen, M. (1999). Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding*, 118(3), 237-241.
168. Zheng, M. Y. (2003). Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*)–doubled haploid production via induced embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(3), 213-230.
169. Munoz, L., Baudoin, J., & Bradfer, C. (1993). In-vitro induction of androgenesis in *Phaseolus*. *Ann Rep Bean Improv Coop*, 36, 18-19.
170. Muñoz, L. C., & Baudoin, J. P. (2002). Improvement of in vitro induction of androgenesis in *Phaseolus* beans (*P. vulgaris* L. and *P. coccineus* L.). *Acta Agronomica*, 51(3-4), 81-87.
171. Lulsdorf, M., Croser, J., & Ochatt, S. (2011). Androgenesis and Doubled-Haploid Production in Food Legumes. İçinde *Biology and breeding of food legumes* (C. 159, ss. 159-177). CABI.
172. Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
173. Eti, S. (1990). Çiçek tozu miktarını belirlemede kullanılan pratik bir yöntem. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(4), 49-58.
174. Eti, S. (1991). Bazı Meyve Tür ve Çeşitlerinde Değişik in vitro Testler Yardımıyla Çiçek Tozu Canlılık ve Çimlenme Yeteneklerinin Belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(1). <https://avesis.cu.edu.tr/yayin/2118e378-70f0-447f-8eb0-204a78282ffb/bazi-meyve-tur-ve-cesitlerinde-degisik-in-vitro-testler-yardimiyla-cicek-tozu-canlilik-ve-cimlenme-yeteneklerinin-belirlenmesi>
175. Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique. *Plant microtechnique*.
176. Tuna, M. (2016). *Flow Sitometri ve Tarımsal Alanlarda Kullanımı*.
177. Zamir, D., Jones, R. A., & Kedar, N. (1980). Anther culture of male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. *Plant Science Letters*, 17(3), 353-361.
178. Oyebanji, O., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N., Idris, M., Nnodi, U., Afolabi, A., & Ogbadu, G. (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20).
179. Misra, A. N., & Misra, M. (2012). Sterilisation techniques in plant tissue culture. *Life Science Center, Fakir Mohan University, Balasore-756020*.

180. Sabzikar, R., Sticklen, M. B., & Kelly, J. D. (2010). In vitro regeneration and morphogenesis studies in common bean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(1), 97-105.
181. Svetleva, D., Velcheva, M., & Bhowmik, G. (2003). Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. *Euphytica*, 131(2), 189-200.
182. Wodzicki, T. J. (1978). Seasonal variation of auxin in stem cambial region of *Pinus sihestris* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 47(3), 225-231.
183. Saam, M., Hosfield, G., & Saunders, J. (1987). In vitro propagation of dry bean from seedling shoot tips. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 112, 852-855.
184. Jacobsen, H.-J. (1991). Somatic embryogenesis in seed legumes: the possible role of soluble auxin receptors. *Israel Journal of Plant Sciences*, 40(2), 139-143.
185. Lazzeri, P. A., Hildebrand, D. F., & Collins, G. B. (1987). Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10(3), 197-208.
186. Quintero-Jiménez, A., Espinosa-Huerta, E., Acosta-Gallegos, J., Guzmán-Maldonado, H., & Mora-Avilés, M. (2010). Enhanced shoot organogenesis and regeneration in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 102(3), 381-386.
187. Hammat, N. (1986). Regeneration in legumes. *Vasil IK (Ed) Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 3, 67-95.
188. Gatica Arias, A. M., Muñoz Valverde, J., Ramírez Fonseca, P., & Valdez Melara, M. (2010). In vitro plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. *Electronic journal of Biotechnology*, 13(1), 6-7.
189. Barikissou, E., & Baudoin, J.-P. (2011). Refinement of an in vitro Culture Technique for the Rescue of Globular Embryos Using Microcutting for *P. vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *Tropicultura*, 29(4), 218-224.
190. Thảo, N. T., Thảo, N. T. P., Hassan, F., & Jacobsen, H. J. (2013). In vitro propagation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Sci Dev*, 11, 868-876.
191. Dorneles, L. T., Oliveira, A. C. de, & Siebeneichler, S. C. (1994). Plant regeneration of blackbean (*phaseolus vulgaris*) via organogenesis. *Ciência Rural*, 24(2), 287-290.
192. Lamseejan, S., Tonguthaisri, T., Wongpiyasatid, A., Unsrisong, S., Jonglaekha, N., & Kumpai, S. (1992). Induction of multiple shoots from cotyledonary node of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Witthayasan Kasetsart (Sakha Witthayasat)*.
193. Ruiz, M., & Pelaez, M. (2019). A Comparative Study Of Callus Formation And Plant Regeneration From Different Explants Of *Phaseolus Vulgaris* And *Ph. Coccineus*. *İçinde Genetic manipulation in plant breeding* (ss. 495-498). De Gruyter.

194. Sha Valli Khan, P., Prakash, E., & Rao, K. (2002). *Callus induction and plantlet regeneration in Bixa orellana L., an annatto-yielding tree Plant.*
195. George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2007). *Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background* (C. 1). Springer Science & Business Media.
196. Buyukalaca, S., & Mavituna, F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant cell, tissue and organ culture*, 46(3), 227-235.
197. Chen, C., Kasha, K., & Marsolais, A. (1984). Segmentation patterns and mechanisms of genome multiplication in cultured microspores of barley. *Canadian journal of genetics and cytology*, 26(4), 475-483.
198. Croser, J. S., Lulsdorf, M. M., Grewal, R. K., Usher, K. M., & Siddique, K. H. (2011). Isolated microspore culture of chickpea (*Cicer arietinum* L.): induction of androgenesis and cytological analysis of early haploid divisions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(3), 357-368.
199. Ochatt, S., Pech, C., Grewal, R., Conreux, C., Lulsdorf, M., & Jacas, L. (2009). Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). *Journal of plant physiology*, 166(12), 1314-1328.
200. Walters, D. R., Cowley, T., & Weber, H. (2006). Rapid accumulation of trihydroxy oxylipins and resistance to the bean rust pathogen *Uromyces fabae* following wounding in *Vicia faba*. *Annals of Botany*, 97(5), 779-784.
201. Graybosch, R. A., & Palmer, R. G. (1988). Male sterility in soybean-an overview. *American journal of botany*, 75(1), 144-156.
202. Kumar, G., & Chaudhary, N. (2016). Induced cytotoxic variations and syncyte formation during microsporogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Cytology and Genetics*, 50(2), 121-127.
203. PARATASILPIN, T. (1978). Vegetative development of field bean pollen grain cultured in vitro. *Journal of the Science Society of Thailand*, 4, 139-145.
204. Bayliss, K., Wroth, J., & Cowling, W. (2004). Pro-embryos of *Lupinus* spp. produced from isolated microspore culture. *Australian Journal of Agricultural Research - AUST J AGR RES*, 55. <https://doi.org/10.1071/AR03226>
205. Cardoso, M. B., Bodanese-Zanettini, M. H., Mundstock, E. C. de, & Kaltchuk-Santos, E. (2007). Evaluation of gelling agents on anther culture: response of two soybean cultivars. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 933-939.
206. Supena, E. D. J., Winarto, B., Riksen, T., Dubas, E., Van Lammeren, A., Offringa, R., Boutilier, K., & Custers, J. (2008). Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *Journal of experimental botany*, 59(4), 803-814.

207. Zambre, M., Goossens, A., Cardona, C., Van Montagu, M., Terryn, N., & Angenon, G. (2005). A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean) and its use to assess the role of arcelins in resistance to the Mexican bean weevil. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), 914-924.
208. Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell*, 25(9), 3159-3173.
209. Skoog, F., & Miller, C. (1957). *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured*. Vitro Symp Soc Exp Biol.
210. Karlsson, S. B., & Vasil, I. K. (1986). Morphology and ultrastructure of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* (Guinea grass) and *Pennisetum purpureum* (Napier grass). *American journal of botany*, 73(6), 894-901.
211. Quiroz-Figueroa, F., Fuentes-Cerda, C., Rojas-Herrera, R., & Loyola-Vargas, V. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20(12), 1141-1149.
212. Liu, L., Fan, X., Zhang, J., Yan, M., & Bao, M. (2009). Long-term cultured callus and the effect factor of high-frequency plantlet regeneration and somatic embryogenesis maintenance in *Zoysia japonica*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(6), 673-680.
213. Shi, X., Dai, X., Liu, G., Zhang, J., Ning, G., & Bao, M. (2010). Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(2), 117-125.
214. Zimmermann, M. (1975). List of sugar and sugar alcohols in sieve-tube exudates. *Encyclopedia of plant physiology*, 479-503.
215. Gray, D., McColley, D., & Compton, M. E. (1993). High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(3), 425-432.
216. Kamada, H., Kobayashi, K., Kiyosue, T., & Harada, H. (1989). Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In vitro cellular & developmental biology*, 25(12), 1163-1166.
217. Lou, H., & Kako, S. (1995). Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Scientia Horticulturae*, 64(1-2), 11-20.
218. Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., & Ito, A. (2001). Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Scientia Horticulturae*, 90(1-2), 85-92.
219. Luo, H., Obara-Okeyo, P., Tamaki, M., & Kako, S. (1996). Influence of sucrose concentration on in vitro morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explant. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*, 71, 497-502.

220. Jehan, H., Courtois, D., Ehret, C., Lerch, K., & Petiard, V. (1994). Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. *Plant Cell Reports*, 13(12), 671-675.
221. Verma, D. C., & Dougall, D. K. (1977). Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant physiology*, 59(1), 81-85.
222. Vuke, T., & Mott, R. (1987). Growth of loblolly pine callus on a variety of carbohydrate sources. *Plant cell reports*, 6(2), 153-156.
223. Merkle, S., Parrott, W., & Flinn, B. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. İçinde *In vitro embryogenesis in plants* (ss. 155-203). Springer.
224. Biahoua, A., & Bonneau, L. (1999). Control of in vitro somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. *Plant Cell Reports*, 19(2), 185-190.
225. Litz, R. (1986). Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111(6), 969-972.
226. da Silva, J. B., Pereira, F. V., & Druzian, J. I. (2012). Cassava starch-based films plasticized with sucrose and inverted sugar and reinforced with cellulose nanocrystals. *Journal of Food Science*, 77(6), N14-N19.
227. Ferrie, A., & Keller, W. (2007). Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embryogenesis in the Brassicaceae. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(4), 348-355.

EKLER

Ek 1. Bitki büyümeyi düzenleyicilerininçözücüleri, saklama koşulları ve stok çözelti konsantrasyonları

Hormonlar	Çözücü	Saklama Koşulu	Stok Çözelti Konsantrasyonu mg ml⁻¹
Oksin			
2,4-D	Su	2-8 °C	1
NAA	NaOH	2-8 °C	1
IBA	EtOH / NaOH	2-8 °C	1
IAA	EtOH / NaOH	0 °C	1
Sitokinin			
BAP	NaOH	2-8 °C	1
TDZ	DMSO	0 °C	1
Kinetin	NaOH	0 °C	1

Ek 2. MS Besi Ortamı Formülasyonu

Murashige Skoog Bazal Besi Ortamı	
Bileşim	mg L⁻¹
Amonyum nitrat	1650
Borik Asit	6.2
Calcium chloride anhydrous	332.2
Cobalt chloride • 6H ₂ O	0.025
Cupric sulfate • 5H ₂ O	0.025
Na ₂ -EDTA	37.26
Demir sülfat • 7H ₂ O	27.8
Magnezyum sülfat	108,7
Manganez sülfat • H ₂ O	16.9
Molybdic acid (sodium salt) • 2H ₂ O	0.25
Potassium iodide	0.83
Potasyum nitrat	1900
Potasyum fosfat monobazik	170
Çinko sülfat • 7H ₂ O	8.6
Organik	mg L⁻¹
Glisin (free base)	2
myo-Inositol	100
Nikotinik asit (free acid)	0.5
Pyridoxin • HCl	0.5
Thiamin • HCl	1
1 L için gerekli miktar (gram)	4.3
Oda sıcaklığında pH (± 0.5)	3.9

Ek 3. Gamborg B5 besi ortamı formülasyonu

Gamborg B5 Bazal Besi Ortamı	
Bileşim	mg L-1
Amonyum sülfat	134
Borik asit	3
Calcium chloride anhydrous	113.24
Cobalt chloride • 6H ₂ O	0.025
Cupric sulfate • 5H ₂ O	0.025
Na ₂ -EDTA	37.3
Demir sülfat • 7H ₂ O	27.8
Manganez sülfat • H ₂ O	10
Molybdic asit (sodium salt) • 2H ₂ O	0.25
Potassium iodide	0.75
Potasyum nitrat	2500
Çinko sülfat • 7H ₂ O	2
Organik	mg L-1
myo-Inositol	100
Nikotinik asit (free acid)	1
Pyridoxin • HCl	1
Thiamin • HCl	10
1 L için gerekli miktar (gram)	3.2
Oda sıcaklığında pH (± 0.5)	4