

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**BAZI YONCA (*Medicago sativa* L.) ÇEŞİTLERİNDE İN
VİTRO BİTKİ REJENERASYONU**

**Hazırlayan
Nilgün EKİNCİ**

**Danışman
Doç. Dr. Satı UZUN**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**BAZI YONCA (*Medicago sativa* L.) ÇEŞİTLERİNDE İN
VİTRO BİTKİ REJENERASYONU**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Nilgün EKİNCİ**

**Danışman
Doç. Dr. Satı UZUN**

**Temmuz, 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Nilgün EKİNCİ



“Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinde İn Vitro Bitki Rejenerasyonu” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Nilgün EKİNCİ

Danışman

Doç. Dr. Satı UZUN

Tarla Bitkileri ABD Başkanı

Doç. Dr. Satı UZUN

Doç. Dr. Satı UZUN danışmanlığında **Nilgün EKİNCİ** tarafından hazırlanan “**Bazı Yonca (*Medicago sativa* L.) Çeşitlerinde İn Vitro Bitki Rejenerasyonu**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarla Bitkileri** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

16 / 07 / 2019

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Satı UZUN

Üye : Prof. Dr. Cengiz SANCAK

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hamdi ÖZAKTAN



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 2019/08/2019 tarih ve 2019/48-05 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bana tez konusunu belirleyen, çalıőmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, Tez çalıőmam boyunca her konuda yardımına ihtiyaç duyduğum ve bana fazlasıyla destek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Satı UZUN'a teşekkür ederim.

Nilgün EKİNCİ

Temmuz 2019, KAYSERİ

BAZI YONCA (*Medicago sativa* L.) ÇEŞİTLERİNDE İN VİTRO BİTKİ REJENERASYONU

Nilgün EKİNCİ

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz, 2019
Danışman: Doç. Dr. Satı UZUN

ÖZET

Farklı yonca çeşitlerinin somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonuna tepkilerini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis ve Classe yonca çeşitleri kullanılmıştır. Çeşitlere ait fidelerden elde edilen kotiledon ve yaprak eksplantları 4 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L prolin ve 30 g/L sukroz içeren, 8 g/L agar ile katılaştırılan dört farklı (MS, B5, SH ve N6) temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 eksplant olacak şekilde tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür. Araştırma sonucunda petri başına kallus ağırlığı, petri başına somatik embriyo ve bitkicik sayıları sırasıyla 0.253-6.700 g, 0-19.667 adet ve 0-6.667 adet arasında değişim göstermiştir. Yaprak eksplantında en fazla petri başına somatik embriyo ve bitkicik sayısı Ömerbey yonca çeşidinde SH temel besin ortamında elde edilmiştir. Kotiledon eksplantında ise en yüksek petri başına somatik embriyo sayısı OS 66 çeşidinde N6 besin ortamında elde edilirken, bitkicik gelişimi elde edilememiştir.

Gea, Prosementi, Savaş ve Ömerbey çeşitlerinde direkt sürgün rejenerasyonunun amaçlandığı denemelerde ise kotiledon boğumlar, TDZ (0.3 -1.2 mg/L TDZ) ve BAP (1-4 mg/L BAP)'ın farklı konsantrasyonları ile 0.5 mg/L NAA ve 30 g/L sukroz içeren 8 g/L agarla katılaştırılmış 6 farklı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Deneme 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 6 eksplant olacak şekilde tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüştür. Araştırma sonucunda Prosementi ve Gea çeşitlerinde en yüksek sürgün rejenerasyonu frekansı 0.6 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA, Savaş çeşidinde 2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA ve Ömerbey çeşidinde 0.3 mg/LTDZ+0.5 mg/L NAA içeren besin ortamlarında belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kotiledon boğum, sitokinin, somatik embriyogenesis, sürgün rejenerasyonu, temel besin ortamı.

IN VITRO PLANT REGENERATION IN SOME ALFALFA (*Medicago sativa* L.) CULTIVARS

Nilgün EKİNCİ

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master Thesis, June, 2019
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Satı UZUN

ABSTRACT

In order to determine the responses of different alfalfa genotypes to plant regeneration through somatic embryogenesis, Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis and Classe alfalfa cultivars were used. Leaflet and cotyledon explants of the cultivars were cultured on different basal media (MS, B5, SH and N6) containing 4 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L proline and 30 g/L sucrose solidified with 8 g/L agar. The research was carried out in a randomized plots-factorial experimental design with 3 replications and 10 explants per replication. As a result of the research, callus weight per petri dish, the number of somatic embryos and plantlets per petri dish varied respectively between 0.253-6.700 g, 0-19.667 and 0-6.667. The maximum number of somatic embryos and plantlets per petri dish was obtained from Ömerbey alfalfa cultivar cultured on SH basal medium in the leaflet explant; whereas in the cotyledon explant, the highest number of embryos per petri dish was obtained from N6 medium in OS 66 cultivar and no plantlet regeneration was achieved from cotyledon explants.

In the experiments where in vitro direct regeneration was aimed in Gea, Prosementi, Savaş and Ömerbey cultivars, cotyledon nodes were cultured on 6 different MS media containing different concentration of TDZ (0.3 -1.2 mg/L) and BAP (1-4 mg/L), 0.5 NAA, 30 g/L sucrose solidified with 8 g/L agar. The research was carried out in a randomized plots-factorial experimental design with 3 replications and 6 explants per replication. As a result of research, the highest shoot regeneration frequency was obtained from the media containing 0.6 mg/LTDZ+0.5 mg/L NAA in Prosementi and Gea cultivars, and from 2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA in Savaş cultivar and from 0.3 mg/LTDZ+ 0.5 mg/L NAA in Ömerbey cultivar.

Keywords: Basal medium, cotyledon node, cytokinin, somatic embryogenesis, shoot regeneration.



İÇİNDEKİLER

BAZI YONCA (*Medicago sativa* L.) ÇEŞİTLERİNDE İN VİTRO BİTKİ REJENERASYONU

YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
1. BÖLÜM.....	4
GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI.....	4
2. BÖLÜM.....	10
MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
2.1. Materyal.....	10
2.2. Yöntem	10
2.2.1. Genel doku kültürü koşulları	10
2.2.2. Tohum sterilizasyonu.....	11
2.2.3. İn vitro bitkiciklerden eksplant izolasyonu ve kültürlerin oluşturulması .	11
2.2.4. İn vitro bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantlarının kültüre alınması.....	13
3. BÖLÜM.....	17

BULGULAR	17
3.1. Bazı yonca çeşitlerinde kotiledon ve yaprak eksplantlarında farklı temel besin ortamlarının somatik embriyogenesis üzerine etkisi	17
3.2. Ömerbey yonca çeşidinde farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarının somatik embriyogenesis üzerine etkisi	21
3.3. Bazı yonca çeşitlerinde TDZ ve BAP dozlarının kotiledon boğum eksplantında sürgün rejenerasyonuna etkisi	24
4. BÖLÜM	27
TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER	27
4.1.Tartışma	27
4.2.Sonuç ve Öneriler	31
ÖZGEÇMİŞ	37

KISALTMALAR

MS: Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı

2,4-D: Diklorofenoksiasetik Asit

B5: Gamborg B5 Temel Besin Ortamı (1968)

SH: Schenk ve Hildebrandt Temel Besin Ortamı

N6: CHU N6 Temel Besin Ortamı

BAP: 6- Benzilaminopurin

TDZ: Thidiazuron

NAA: α -Naftalenasetik Asit

PEG: Polyetilen Glikol

ABA: Absisik Asit

BBD: Bitki Büyüme Düzenleyicileri

NaOH: Sodyum Hidroksit

HCl: Hidrojen Klorür

TABLÖLAR LİSTESİ



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. Yonca çeşitlerinde kallus oluşumu 14
Şekil 2. Ömerbey yonca çeşidinde somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu 15
Şekil 3. Kotiledon boğum eksplantında sürgün gelişimi 16



GİRİŞ

Yonca (*Medicago sativa* L.) yeryüzünde en fazla tarımı yapılan yem bitkisidir. Uzun ömürlü çok yıllık yabancı döllenmiş otsu bir bitkidir. Yaprakları 3 yaprakçıktan oluşur. Kazık kök yapısına sahip olan yoncanın kökleri yaşlı bitkilerde 8-10 m derine kadar inebilir. Bitki boyu çevre koşullarına göre değişir ve genel olarak 60-100 cm boylanabilir. Dik ya da yatık gelişen formları bulunabilir (Elçi, 2005: 104 s.) Yonca çok geniş bir adaptasyon yeteneğine sahiptir. Yonca, iyi gelişmiş derinlere inen kök sistemi ile genel olarak kurağa dayanıklıdır. Ancak, yıl içinde çok sayıda biçim vermesi ve her biçimden sonra çok fazla yeşil aksam oluşturması nedeniyle diğer kültür bitkilerine oranla suya gereksinimi daha yüksektir. Yonca bölgenin vejetasyon süresine de bağlı olarak yıl içerisinde kurak alanlarda sulanarak yağışlı bölgelerde ise sulanmadan yağışa bağlı olarak 3-7 defa biçilebilir. Yem bitkilerinin kraliçesi olarak bilinen yonca, yem bitkileri arasında en fazla ot verimi ve yem değerine sahip bitkidir. Yonca otu %18-25 oranında protein içerir, hayvanlar için yaş ya da kuru ot olarak hem çok lezzetli hem de vitaminlerce çok zengindir. Özellikle; Tokoferol, Karotin, Ksantofil ve Vitamin A değerleri çok yüksektir (Serin ve Tan, 2001: 7-9s). Yonca; hayvan beslenmesindeki öneminin yanı sıra örtücü bitki, yeşil gübre ve toprak ıslahı açısından da çok önemlidir. Baklagil yem bitkisi olmasından dolayı havadaki azotu toprağa bağlar ve dolayısı ile kendisinden sonra ekilecek yüzlek köklü bitkilere organik madde ve azot bakımından zengin, su tutma kapasitesi yüksek kaliteli toprak bırakır. İyi gelişmiş kazık kök yapısı ile de toprağın derinlerindeki besin maddelerini üst katmanlara taşır (Serin ve Tan, 2001: 7-9s).

Yonca dünyada en fazla yetiştirilen yem bitkisi olmasına rağmen hala yoncanın tarımında ve yem bitkisi olarak kullanımında düşük tohum verimi, yabancı otlar, hastalık ve zararlılar, antibesinsel faktörler, düşük sindirilebilirlik, yetersiz besin elementi kullanımı gibi bazı sorunlarla karşılaşmaktadır (Kumar 2011). Yoncada kendine uyumsuzluk, kendileme depresyonu ve yüksek heterozigotluk görülmektedir.

Yoncadaki bu genetik kompleks yapı önemli tarımsal karakterleri kontrol eden genleri belirlemenin önündeki en büyük engeldir (Kumar, 2011). Ancak son yıllarda alternatif bir teknik olarak transgenik bitki teknolojisi yonca ıslahında tarımsal özellikleri iyileştirmek için kullanılmaktadır. Transgenik bitki teknolojisinde ise doku kültürleri oldukça önemli bir yer tutmaktadır.

Doku kültürü; “*aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamlarında, bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesi*” olarak tanımlanmaktadır. Doku kültürü teknikleri bitki ıslahında ve bitkilerin ticari üretiminde çok geniş kullanım alanına sahiptir. Bitki doku kültürü işlemlerinin temeli bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu; kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibariyle; meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan rejenerasyon, meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon olarak 3 kısımda incelenebilir. Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon; hücre veya dokulardan değişime neden olacak uygulamalarla sürgün taslakları oluşturmak (Organogenesis) veya somatik embriyogenesis yoluyla olmaktadır (Babaoğlu vd., 2001: 2 s). Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır. Somatik embriyo oluşumu için somatik dokular yüksek oranda oksin içeren ortamda kültüre alınır ve embriyo üretme yeteneği kazanırlar. Zigottan gelişen bitki embriyosunun gösterdiği gelişim safhalarını somatik embriyolar da gösterir. Ancak somatik embriyolar bir endosperm içermezler (Özcan vd., 2001: 71-72s).

Rejenerasyon sistemleri bitkilere gen aktarımı çalışmalarında önemli bir role sahiptir. Farklı gen aktarım teknikleriyle tek bir bitki hücresine herhangi bir organizmadan izole edilen bir gen aktarılmakta ve bu hücreden bitkilerin elde edilmesi için rejenerasyon sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yoncada, in vitro bitki rejenerasyonu üzerine çok fazla çalışmaya rastlanmaktadır. Yoncada in vitro rejenerasyon genellikle somatik embriyogenesis ile yapılmaktadır (Moltrasio vd., 2004). Somatik embriyogenesis yoluyla ilk rejenerasyon çalışması 1972 yılında Saunders ve Bingham tarafından yapılmış ve günümüze kadar birçok araştırmacı tarafından somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu çalışması yürütülmüştür. Yoncada daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde; yaprak (Barbulova vd., 2002), yaprak sapı (Lai vd. 1994; Erişen 2005),

olgunlaşmamış embriyo (Ninkovic vd., 1995), hipokotil (Meijer ve Brown, 1987), süspansiyon kültürü ve mezofil protoplastları (Atanassov ve Brown, 1984) gibi farklı bitki kısımlarından somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Ancak yoncada yapılan somatik embriyogenesis çalışmalarında büyük ölçüde genotipe bağlı bir rejenerasyon görülmektedir. Ayrıca yoncada in vitro direk rejenerasyon çalışmaları da sürgün ucu, boğum ve kotiledon boğum gibi eksplantlar kullanılarak yapılmaktadır (Pupilli vd., 1992; Li vd., 2009; Kumar vd., 2012; Nofouzi vd., 2019). Bu tez çalışmasında da Türkiye’de tescilli bazı yonca çeşitlerinde in vitro koşullarda farklı yöntemlerle bitki rejenerasyonu amaçlanmıştır.



1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Saunders ve Bingham (1972), Blaydes ortamında yürüttükleri çalışmada; kallusların bitkiye dönüşümünün bitki büyüme düzenleyicilerin tipi ve kombinasyonlarına bağlı olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Bingham vd. (1975), in vitroda elde ettikleri yonca fidelerinin hipokotil eksplantlarını kullanarak 2 mg/L difco bacto yeast ekstrakt içeren Blaydes (1996) ortamına aktarmışlar, bir ay sonra sürgün oluşturan kallusları aynı ortamda alt kültüre almışlar ve 4 hafta sonra köklü bitkiler elde etmişlerdir.

Lupotto (1983), yonca (*Medicago sativa* L.)'nın Akdeniz varyetelerinde somatik embriyo gelişimini incelemiştir. Çalışmada eksplant kaynağı olarak hipokotil ve kotiledon kullanmıştır. Eksplantları 2 mg/L 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almış ve sonuçta somatik embriyogenesis ile morfogenezin hormonsuz MS ve yeast ekstrakt içeren ortamda olduğunu gözlemlemiştir.

Mckay ve Walker (1984), somatik embriyogenesis ile yoncada bitki rejenerasyonunda ortama eklenen oksinin kalitesi, konsantrasyonu ve ortamın düşük azot içermesi gibi 3 faktörün etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Brown ve Atanassov (1985), yürüttükleri çalışmada; farklı yonca türlerinden 76 genotipin somatik embriyo ve kallus üretim kapasiteleri açısından kıyaslamışlardır. Kallus ve embriyogenesis açısından genotipler arasında büyük bir varyasyon gözlemlemiştir. Eksplant ve ortam protokolü ne olursa olsun yüksek rejenerasyon

kapasitesine sahip genotiplerin düşük rejenerasyon kapasitesine sahip genotiplerden daha fazla somatik embriyo ürettiğini gözlemlemişlerdir.

Bauchan (1987), *Medicago scutellata* ve *M. sativa* türlerine embriyolar izole edilerek farklı konsantrasyonlarda BAP, 2,4-D, kinetin ve IAA içeren MS ortamında ve L-prolin ve L-glutamin içeren SH ortamında kültüre alınmıştır. *M. scutellata* türüne ait torpedo ve kalp dönemindeki embriyoların 0.05 mg/L IAA ve BAP içeren MS ortamında yaklaşık 30 gün sonra bitkiye dönüştükleri, *M. sativa* türünde ise en iyi başarımın 50 mM L-glutamin ilave edilmiş SH ortamında sağlandığı ayrıca kök ve sürgün gelişiminin aynı ortamda gerçekleştiği tespit etmiştir.

Chen ve Marowitch (1987), *Medicago falcata*'da somatik embriyo oluşturmak amacıyla 17 ekotip incelemişlerdir. Eksplant kaynağı olarak kotiledon, kök, hipokotil ve yaprak kullanmışlardır. Araştırma sonucunda genotip ve rejenerasyon yeteneği arasında önemli bir ilişki olduğunu ve 17 ekotipin 10 tanesinin rejenerasyon yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Meijer ve Brown (1987), Yoncada doku kültürü ile embriyo teşekkülüne; şeker konsantrasyonu, aminoasitler ve amonyumun etkilerini araştırmışlar 10-20 mM düzeyinde amonyumun sürgün oluşumunda optimum doz olduğunu, 1-2 mg/L casein hidrolizat veya 4.4 mM glutamin ve 3.1 mM prolin kombinasyonlarının olumsuz etkilerinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Somatik embriyogenesis için %3 sukroz konsantrasyonunun uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Mc Kersie vd. (1989), eksplant kaynağı olarak çiçeklenmemiş yonca bitkisinin 2. ve 3. boğum aralarındaki sapları kullanmışlardır. Eksplantlar kallus oluşumu için 1 mg/L 2,4-D ilave edilen B5 ortamında kültüre alınmış 14-21 gün sonra ise oluşan kalluslar 0.1 mg/L NAA içeren B5 ortamında alt kültüre alınmıştır. Oluşan embriyolar BOi2Y ortamında 7 gün bekletilmiş ve embriyo oluşumu gözlemlenmiştir.

Nolan vd. (1989), *M. truncatula* türünde somatik embriyogenesis ile bitki regenerasyonu için yaprak eksplantları öncelikle 10 µM NAA+10 µM BAP içeren B5 ortamında kültüre alınmış, daha sonra gelişen kalluslar embriyo olgunlaştırmak için 1

μM NAA ve $10 \mu\text{M}$ BAP içeren ortamlara aktarılmış, sürgün gelişimi için $0.1 \mu\text{M}$ NAA ve $1 \mu\text{M}$ BAP içeren ortama ve bitkiciklerin gelişimi içinde $0.05 \mu\text{M}$ NAA içeren ortama aktarılmıştır. Tohumdan gelişen bitkilerden alınan yapraklar eksplant olarak kullanıldığında rejenerasyon oranı düşük iken rejenere olan bitkiler eksplant kaynağı olarak kullanıldığında rejenerasyon oranının yüksek olduğu bildirilmiştir.

Takamizo vd. (1991), yoncada somatik embriyo oluşumu denemeleri yapmış, bunun için 26 yonca çeşidi kullanmış ve 3 çeşitte somatik embriyo oluşumunun diğerlerine göre düşük olduğunu gözlemlemiştir. Çalışmada B2, B5h, UM ve SH ortamlarını kullanmıştır. 2 mg/L 2,4-D dozunun altında dozlarda somatik embriyo oluşmadığını en fazla somatik embriyo gelişiminin 4 mg/L 2,4-D içeren ortamda olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda Tachiwakaba yonca çeşidinde hipokotil eksplantında somatik embriyo gelişimi için en uygun ortamın 4 mg/L 2,4-D ve BAP içeren UM ortamı olduğunu rapor etmişlerdir.

Pupilli vd. (1992), yoncada boğum eksplantlarını, BAP, N^6 -isopetenil-adenin (2-iP) ve kinetin hormonlarının 7 farklı konsantrasyonunu içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonucunda boğum başına gelişen sürgün sayısında bir değişiklik olmamış ancak; 10 mg/l ve 20 mg/l 2-iP sürgün uzunluğunu artırmıştır.

Scarpa vd. (1993), Araştırmacılar *Medicago polymorpha*'ya ait 17 ekotip incelemişler ve sonuçta 2 ekotipin rejenerasyon yeteneğinin en yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Eksplant kaynaklarını karşılaştırdıklarında ise en yüksek rejenerasyonun hipokotil eksplantında gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

Özgen vd. (1997), Elçi ve Mesa-Sirsa yonca çeşitleri ile yaptıkları çalışmada; çeşitlerin sürgün ucu eksplantlarını kullanmışlar, *in vitro*'da elde ettikleri sürgün uçlarını farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Elçi çeşidinde en fazla sürgün sayısının 0.2 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP besin ortamlarından elde edildiğini, Mesa-Sirsa çeşidinde ise 0.2 mg/L NAA ve 1 mg/L BAP besin ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir.

Ding vd. (2003), 16 farklı yonca çeşidinde 5 mM TDZ ve 0.5 mM NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu frekansını %33- 85 arasında belirlemişlerdir.

Moltrasio vd. (2004), rejenerasyon kalıtımını belirlemek amacıyla, ‘Rambler’ yonca çeşidinden türetilmiş bir rejeneratif klon ile rejeneratif olmayan bir Arjantin klonu arasında çaprazlamalar yapmış ve bu klonların kendilenen dölleri üzerinde rejenerasyon çalışmaları yapmıştır. Araştırma sonucunda somatik embriyogenesinin iki tamamlayıcı gen ile kontrol edildiğini rapor etmiştir.

Erişen (2005), yonca “Verco” çeşidinde hipokotil, kotiledon, gövde, yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında uygulanan farklı protokollerin somatik embriyogenesis üzerine etkisini araştırmıştır. Eksplant kaynağı ile uygulanan protokoller arasında önemli farklılıklar belirlemişlerdir. Çalışmada birinci protokolde en fazla eksplant başına somatik embriyo 78 adet ile hipokotil eksplantından 2. protokolde ise yaprak eksplantından (94 adet) elde edilmiştir.

Süle (2005), yoncada somatik embriyo üretiminde farklı oksin tiplerinin etkilerini incelemek amacı ile yürüttüğü çalışmada; Elçi yonca çeşidinin tohumlarını in vitro da çimlendirmiş ve 6 günlük fidelerin hipokotil ve kotiledon eksplantlarını 1 mg/l 2,4-D, picloram, NAA veya dicamba+0.2 mg/l kinetin içeren SH ortamında kültüre almıştır. Sonuç olarak kallus indüksiyon oranının %23.6 ile %50.8 arasında değiştiğini ve en yüksek değer 2,4-D içeren ortamdan elde edildiğini gözlemlemiştir.

Vahdati vd. (2008), absisik asitin somatik embriyo olgunlaşmasını ve somatik embriyoların normal bitkilere dönüşmesini teşvik ettiğini bildirmektedir.

Kumar vd. (2012), Beş farklı yonca çeşidinde apikal meristemlerden in vitro direk sürgün rejenerasyonu üzerine TDZ ve BA’nın etkisini inceledikleri çalışmada, 2 mg/L TDZ ve 1 mg/L BA içeren ortamda eksplant başına 35 adet sürgün elde etmişlerdir. Sürgün rejenerasyon frekansının çeşitlere göre % 67 ila 93 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Li vd. (2009), sekiz farklı yonca genotipinde kotiledon node eksplantlarında TDZ ve AgNO₃ içeren besin ortamlarında % 63.8- 82.5 arasında rejenerasyon frekansı elde etmişlerdir.

Zhang vd. (2010), 4 farklı yonca genotipinin rejenerasyon kabiliyetini araştırmışlardır. Bu amaçla kotiledon, kotiledon boğum ve hipokotil eksplantlarını kullanmışlardır. En yüksek kallus oluşum oranı ve rejenerasyon sıklığını Xinjiang Daye çeşidinde elde etmişlerdir. Glutaminin rejenerasyon frekansını artırmak ve rejenerasyon süresini azaltmak bakımından önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Band vd. (2011), iki farklı diploid yonca çeşidinde boğumlardan sürgün rejenerasyonu amacıyla BAP/NAA ve TDZ/AgNO₃ kullanmışlardır. En yüksek sürgün rejenerasyonunu 0.5-0.1 mg/L TDZ veya 0.5-1 mg/L BAP içeren ortamlarda tespit etmişlerdir.

Amini vd. (2016), yoncada yaprak ve yaprak sapı eksplantlarında 2-3 hafta içinde 54 mM proline, 4 mg/L 2.4-D ve 0.4 mg/L kinetin içeren MS besin ortamında embriyonik kallus elde etmişlerdir. Bu embriyonik kalluslar daha sonra hormon içermeyen BOi2Y besin ortamına embriyo gelişimi için aktarılmıştır. Embriyo olgunlaştırma ortamında 50 mg/L *Cuscuta campestris* ekstraktının kontrole göre somatik embriyo gelişimini artırdığını bildirmişlerdir.

Nofouzi vd. (2019), Nimet ve Savaş yonca çeşitlerinde kotiledon boğum, hipokotil ve kök tacında BAP, BAP-IBA ve TDZ içeren besin ortamlarında in vitro sürgün rejenerasyonu amaçlamışlardır. BAP içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantında Nimet çeşidinde sürgün rejenerasyonu % 80-100, Savaş çeşidinde ise % 50-100 arasında, TDZ içeren ortamlara ise Nimet ve Savaş çeşitlerinde % 93.33-100 arasında değişim göstermiştir. En fazla eksplant başına sürgün sayısı Nimet çeşidinde 5 ve 6.33 adet ile 0.25 mg/L BAP ve 0.55 mg/L TDZ, Savaş çeşidinde ise 8.50 ve 4.66 adet ile 0.4 mg/L BAP ve 0.15 mg/L TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir.

Rose (2019), somatik embriyogenesisin bir stres ve hormon etkileşimi sonucu indüklendiğine dair kanıtlar olduğunu, *M. truncatula*'da somatik embriyogenesis

indüksiyon fazı sırasında stres ve spesifik yukarı regüle edilmiş genler arasında ve spesifik hormonlar ve yukarı regüle edilmiş genler arasında bağlantılar olduğunu, *M. truncatula*'daki somatik embriyogenesis çalışmalarında yüksek verimli transkriptomik ve proteomik çalışmaların kullanılması ve bazı bireysel genlerin daha detaylı araştırılmasından fayda olduğu bildirmektedir.



2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada; Prosementi Bologna, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis ve Classe yonca çeşitleri kullanılmıştır. Savaş ve Ömerbey çeşitleri Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil ettirilmiştir. Prosementi, Gea, Artemis çeşitleri Türkiye’de tescilli Classe ise üretim izinli bir çeşittir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Genel doku kültürü koşulları

Çalışmalar Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan petri, magenta, pens, bisturi, beher, saf su ve besin ortamlarının sterilizasyonunda otoklav kullanılmıştır. Otoklavda sterilizasyon işlemi 1.2 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Tüm doku kültürü çalışmaları steril kabin içerisinde yapılmıştır. Steril kabin içerisinde pens ve bisturi gibi kullanılan aletlerin sterilizasyonunda %70 alkol ve Bunzen alevi kullanılmıştır.

Ortamlarda kullanılan tüm bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) uygun çözücülerle çözülmüş ve her BBD için uygun ortamlarda saklanmıştır. Isı ile bozulabilen bitki besin düzenleyicileri ise filtre sterilizasyonu ile sterilize edilerek saklanmış ve besin ortamına otoklav işleminden sonra katılmıştır (Tablo 2.1).

Çalışmada donör bitkilerin yetiştirilmesinde 30 g/L sukroz, 8 g/L agar içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Somatik embriyogenesis çalışmalarında MS, Gamborg B5, Schenk & Hildebrandt (SH) ve CHU (N6) besin ortamları kullanılmıştır (Tablo 2.2.). Hazırlanan besin ortamlarının pH'sı 1N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 5.6 ile 5.8 arasında ayarlanmıştır. Tüm kültürler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyotta, 22±2°C'de ve 3000 lüks ışık yoğunluğundaki iklim dolabı içerisinde bekletilmiştir.

Tablo 2. 1. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri, çözücüleri ve saklama koşulları

BBD	ÇÖZÜCÜ	SAKLAMA KOŞULLARI
BAP	1N NaOH	+4
TDZ	DMSO/filtre sterilizasyonu	-20
NAA	1N NaOH	+4
Kinetin	1 N NaOH	+4
2,4-D	DMSO/alkol	+4
ABA	DMSO/filtre sterilizasyonu	-20

2.2.2. Tohum sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan Prosementi Bologna, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis ve Classe çeşitlerine ait tohumlardan sağlıklı olanlar seçilip steril kabin içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak %50 ticari çamaşır suyu içerisinde 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra; tohumlar 3 defa 5'er dakika olmak üzere saf sudan geçirilip, 30 g/L sukroz, 8 g/L agar içeren MS besin ortamına ekilmiştir.

2.2.3. İn vitro bitkiciklerden eksplant izolasyonu ve kültürlerin oluşturulması

Çimlendirme başlangıcından yaklaşık 15-25 gün sonra somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla Prosementi Bologna, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis ve Classe yonca çeşitlerine ait steril bitkiciklerden elde edilen kotiledon ve yaprak eksplantları 4 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L prolin ve 30 g/L sukroz içeren, 8 g/L agar ile katılaştırılan dört farklı (MS, B5, SH ve N6) temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından yaklaşık 50-60 gün sonra oluşan kalluslar 30 g/L şeker içeren 8 g/L agar ile katılaştırılmış MS besin ortamına aktarılmıştır (Şekil 1, a, b, c, d, e).

Tablo 2. 2. Çalışmada kullanılan temel besin ortamları ve içerikleri

İçerik*	Murashige and Skoog (MS) ¹	Gamborg B5 (B5) ²	Schenk & Hildebrandt (SH) ³	CHU (N6) ⁴
Makro elementler				
CaCl ₂	332.02	113.23	151.00	125.33
KH ₂ PO ₄	170.00	--	--	400.00
KNO ₃	1900.00	2500.00	2500.00	2830.00
MgSO ₄	180.54	121.56	195.05	90.27
NH ₄ NO ₃	1650.00	--	--	--
NaH ₂ PO ₄	--	130.44	--	--
(NH ₄) ₂ SO ₄	--	134.00	--	463.00
(NH ₄)H ₂ PO ₄	--	--	300.00	--
Mikro elementler				
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.10	--
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.20	--
FeNaEDTA	36.70	36.70	19.80	36.70
H ₃ BO ₃	6.20	3.00	5.00	1.60
KI	0.83	0.75	1.00	0.80
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90	10.00	10.00	3.33
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.10	--
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	2.00	1.00	1.50
Vitaminler				
Glycine	2.00	--	--	2.00
Myo-inositol	100.00	100.00	1000.0	--
Nikotinik asit	0.50	1.00	5.0	0.5
Pyridoksin HCL	0.50	1.00	0.5	0.50
Thiamine HCL	0.10	10.00	5.0	1.00

*<https://www.duchefa-biochemie.com/product/category/id/16/name/plant-tissue-culture-media>

¹Murashige and Skoog, 1962; ²Gamborg vd., 1968; ³Schenk & Hildebrandt, 1972; ⁴Chu vd., 1975

Ömerbey yonca çeşidinde ise farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarının somatik embriyogenesis üzerine etkisi belirlemek amacıyla yaprak eksplantları 4 mg/L 2.4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L prolin veya 1 g/L glutamin içeren SH veya N6 ortamında kültüre alınmıştır (Tablo 2.3.). Yaklaşık kültür başlangıcında 45-50 gün sonra gelişen kalluslar 30 g/L sukroz, 30 g/L sukroz+30 g/L PEG veya 30 g/L sukroz+2 mg/L ABA içeren 8 g/L agarla katılaştırılmış MS besin ortamına aktarılmıştır (Şekil 2. a, b, c, d). Daha sonra bütün kültürler 30 g/L şeker içeren 8 g/L agar ile katılaştırılmış MS besin ortamına bitkicik gelişimi için aktarılmıştır (Şekil 2. e, f).

Denemelerde her peri kabına 10 eksplant yerleştirilmiş olup, petri başına kallus ağırlığı ve petri başına embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısı parametreleri belirlenmiştir.

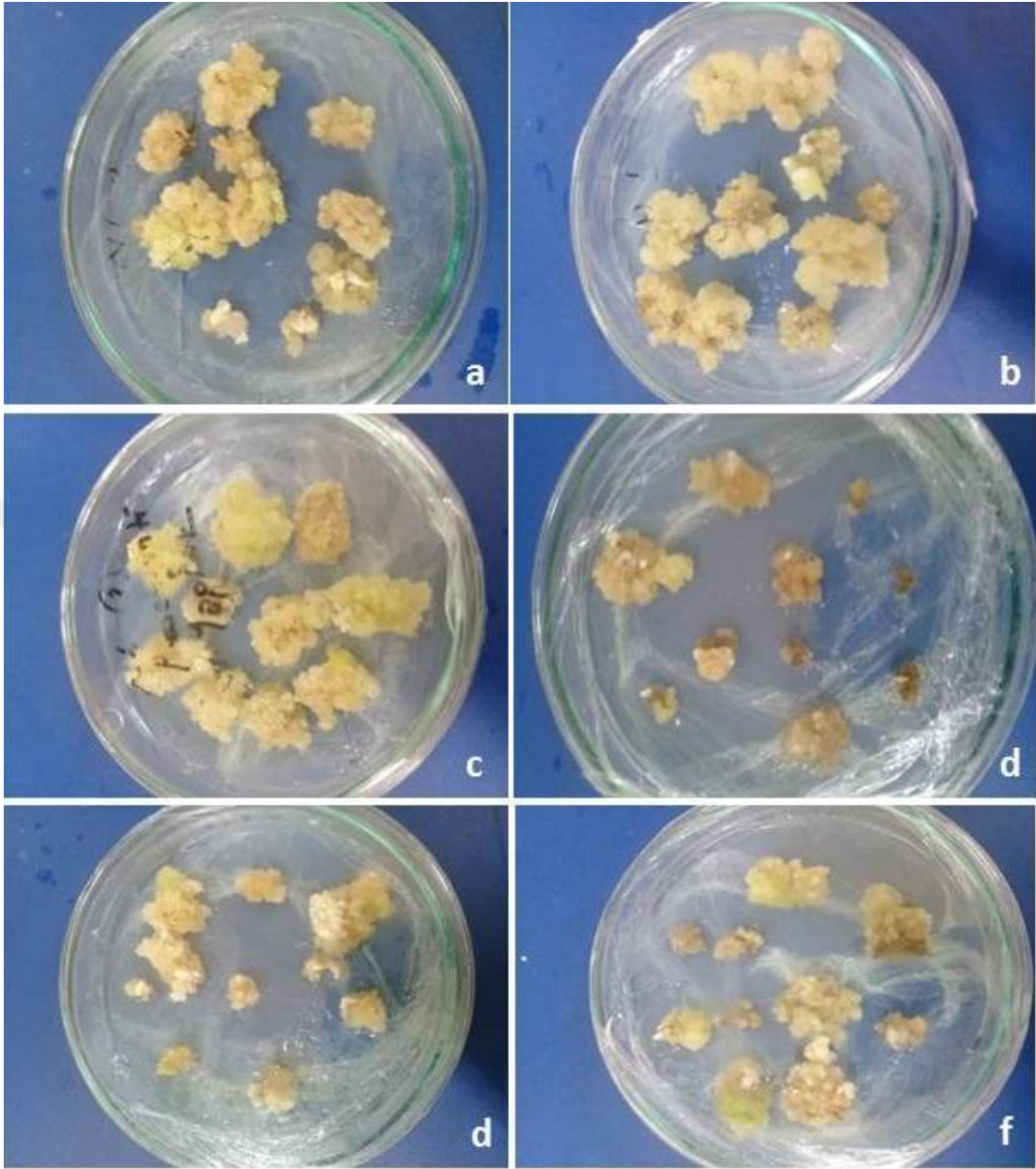
Tablo 2. 3. Ömerbey yonca çeşidinde kullanılan farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortam kombinasyonları

Kallus Geliştirme Ortamı	Embriyo Olgunlaştırma Ortamları
N6+2 g/L prolin+4 mg/L 2.4-D+0.5 mg/L kinetin	2 mg/L ABA+MS
	30 g/L PEG+MS
	MS
SH+2 g/L prolin+4 mg/L 2.4-D+0.5 mg/L kinetin	2 mg/L ABA+MS
	30 g/L PEG+MS
	MS
N6+1 g/L glutamin+ 4 mg/L 2.4-D+ 0.5 mg/L kinetin	2 mg/L ABA+MS
	30 g/L PEG+MS
	MS
SH+1 g/L glutamin+ 4 mg/L 2.4-D+ 0.5 mg/L kinetin	2 mg/L ABA+MS
	30 g/L PEG+MS
	MS

Denemelerde 30 g/L sukroz kullanılmış olup 8 g/L agar ile ortamlar katılaştırılmıştır.

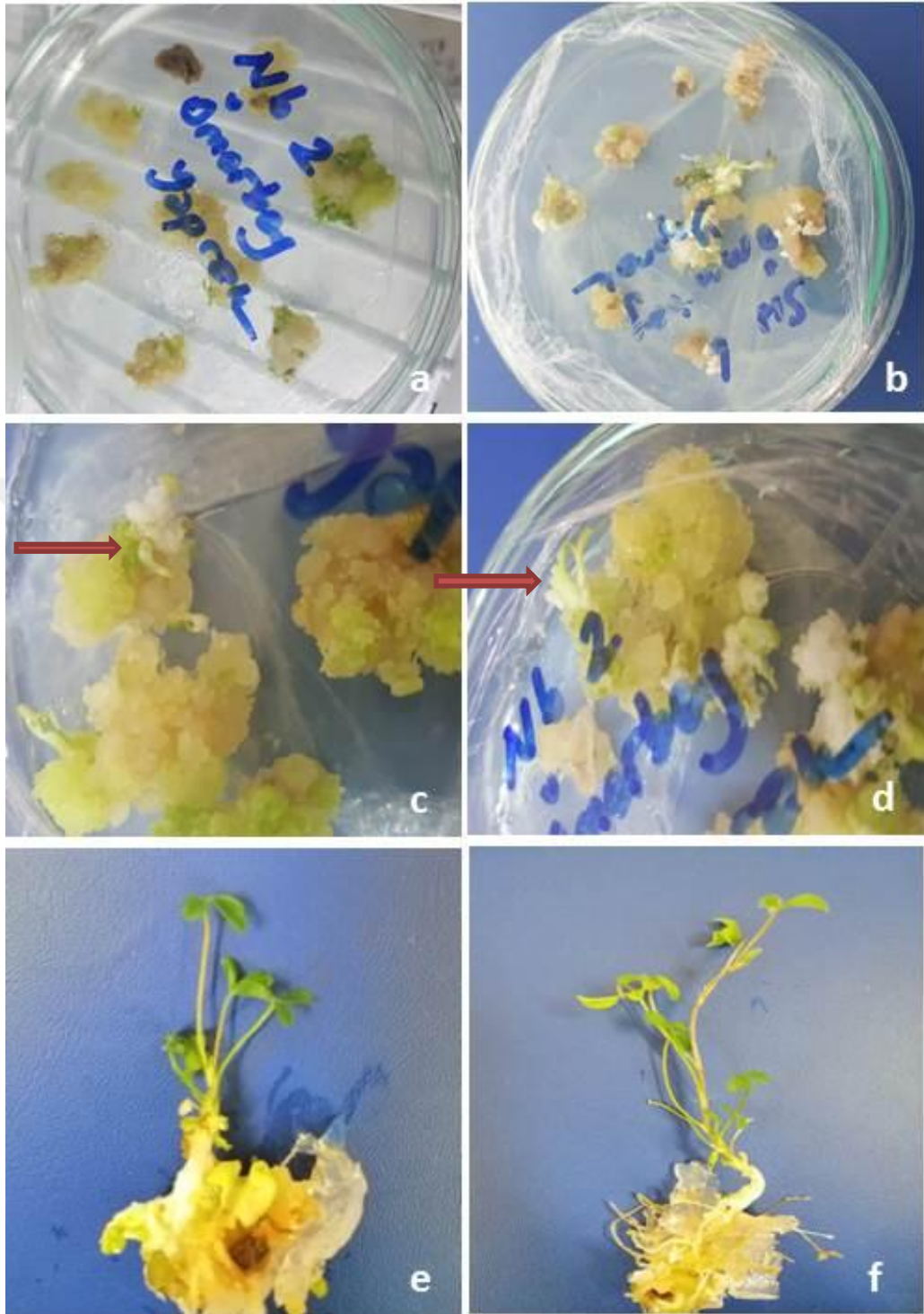
2.2.4. İn vitro bitkiciklerden elde edilen kotiledon boğum eksplantlarının kültüre alınması

In vitro steril koşullarda çimlendirilen Gea, Prosementi, Savaş, Ömerbey çeşitlerinde kültür başlangıcından 15-16 gün sonra kotiledon boğum eksplantları sürgün rejenerasyonu amacıyla TDZ (0.3 -1.2 mg/L TDZ) ve BAP (1-4 mg/L BAP)'ın farklı konsantrasyonlarını, 0.5 mg/L NAA ve 30 g/L sukroz içeren 8 g/L agarla katılaştırılmış 6 farklı MS besin ortamında kültüre alınmıştır (Şekil 3). Kültür başlangıcında yaklaşık 2 ay sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı özellikleri belirlenmiştir.



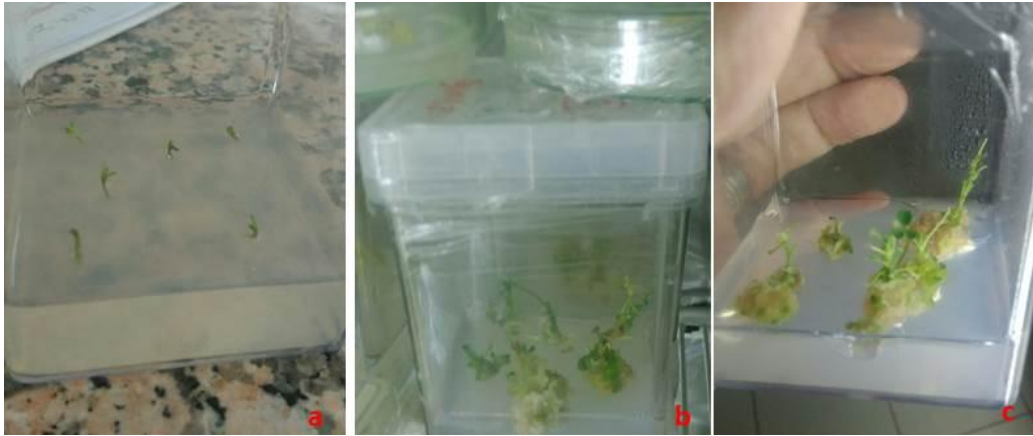
Şekil 1. Yonca çeşitlerinde kallus oluşumu

a. Savaş, b. Gea, c. Prosementi, d. Artemis, e. OS-66, d. Classe



Şekil 2. Ömerbey yonca çeşidinde somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu

- a, b. Kallus oluşumu
- c, d. Embriyo gelişimi
- e, f. Bitkicik gelişimi



Şekil 3. Kotiledon boğum eksplantında sürgün gelişimi

2. 2. 5. Verilerin değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre yürütülmüş olup somatik embriyogenesis çalışmaları 3 tekerrürlü her tekerrürde 10 eksplant, kotiledon boğumlardan sürgün rejenerasyonu denemeleri ise 3 tekerrürlü her tekerrürde 6 eksplant olacak şekilde yürütülmüştür. Yüzde değerler varyans analizinden önce “arcsin” transformasyonuna tabi tutulmuştur. Araştırma sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi “SPSS for Windows” programı ile yapılmıştır. Muamele ortalamaları Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Bazı yonca çeşitlerinde kotiledon ve yaprak eksplantlarında farklı temel besin ortamlarının somatik embriyogenesis üzerine etkisi

Somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey Artemis, Classe ve OS66 çeşitlerine ait yaklaşık 15-25 günlük fidelerden elde edilen kotiledon ve yaprak eksplantları; 4 mg/L 2-4,D+0.5 mg/L kinetin+2 g/L prolin+30 g/L şeker içeren 8 g/L agar ile katılaştırılan MS, B5, SH veya N6 temel besin ortamında kültüre alınmıştır. Yaklaşık 50-60 gün sonra oluşan kalluslar 30 g/L sukroz, 8 g/L agar içeren MS besin ortamında alt kültüre alınmıştır. Denemelerde petri başına kallus ağırlığı, petri başına somatik embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısı parametreleri belirlenmiştir.

Varyans analizi sonuçlarına göre petri başına kallus ağırlığında; çeşit, ortam, eksplant, çeşit x ortam, çeşit x eksplant ve çeşit x ortam x eksplant istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde, ortam x eksplant 0.05 düzeyinde, petri başına somatik embriyo sayısında; eksplant, çeşit x ortam ve çeşit x ortam x eksplant 0.01 düzeyinde, petri başına bitkicik sayısında ise; eksplant, çeşit x ortam ve çeşit x ortam x eksplant 0.01 düzeyinde çeşit, ortam, çeşit x eksplant, ortam x eksplant 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1. Bazı yonca çeşitlerinde kotiledon ve yaprak eksplantlarında farklı temel besin ortamlarının petri başına kallus ağırlığı, petri başına somatik embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısına etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Petri Başına Kallus Ağırlığı		Petri Başına Somatik Embriyo Sayısı		Petri Başına Bitkicik Sayısı	
		Kareler Ortalaması	F	Kareler Ortalaması	F	Kareler Ortalaması	F
Çeşit (Ç)	6	4.946	17.674**	36.228	2.047	3.065	2.279*
Ortam (O)	3	12.710	45.420**	44.673	2.524	4.333	3.221*
Eksplant (E)	1	5.676	20.284**	708.482	40.035**	11.524	8.566**
Ç x O	18	1.206	4.310**	44.450	2.512**	3.153	2.344**
Ç x E	6	4.056	14.494**	33.760	1.908	3.065	2.279*
O x E	3	1.066	3.809*	35.641	2.014	4.333	3.221*
Ç x O x E	18	3.481	12.439**	48.252	2.727**	3.153	2.344**
Hata	112	0.280		17.696		1.345	
Genel	167						

*:%5 düzeyinde önemli, **: %1 düzeyinde önemli

Deneme sonucunda çeşitlerde kotiledon ve yaprak eksplantlarında farklı temel besin ortamlarından elde edilen petri başına kallus ağırlığı, petri başına somatik embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısı değerleri Tablo 3.2’de verilmiştir. Tablo 3.2’de çeşitler ayrı ayrı incelendiğinde yaprak eksplantında petri başına kallus ağırlığı; Prosementi çeşidinde en yüksek 3.570 g ile B5 besin ortamında en düşük 2.311 g ile SH ortamında, Gea çeşidinde en yüksek 2.853 g ile N6 besin ortamında en düşük 1.267 g ile B5 besin ortamında, Savaş çeşidinde en yüksek 1.350 g ile MS besin ortamında en düşük 0.503 g ile SH besin ortamında, Ömerbey çeşidinde en yüksek 3.180 g ile N6 besin ortamında en düşük 0.877 g ile B5 besin ortamında, Artemis çeşidinde en yüksek 6.700 g ile MS besin ortamında en düşük 1.893 g ile SH ortamında, Classe çeşidinde en yüksek 3.140 g ile N6 besin ortamında en düşük 0.757 g ile SH ortamında ve OS-66 çeşidinde en yüksek 2.957 g ile MS ortamında en düşük ise 1.500 g ile SH besin ortamında bulunmuştur.

Kotiledon eksplantında çeşitler ayrı ayrı incelendiğinde petri başına kallus ağırlığı; Prosementi çeşidinde en yüksek 1.943 g ile MS besin ortamında en düşük 1.187 g ile SH ortamında, Gea çeşidinde en yüksek 2.467 g ile N6 besin ortamında en düşük 1.077 g ile B5 besin ortamında, Savaş çeşidinde en yüksek 2.503 g ile MS besin ortamında en düşük 0.807 g ile SH besin ortamında, Ömerbey çeşidinde en yüksek 2.703 g ile MS besin ortamında en düşük 1.260 g ile B5 besin ortamında, Artemis çeşidinde en yüksek 2.640 g ile N6 besin ortamında en düşük 0.253 g ile MS ortamında, Classe çeşidinde en yüksek 2.783 g ile MS besin ortamında en düşük 1.143 g ile SH ortamında ve OS-66 çeşidinde en yüksek 1.790 g ile N6 ortamında en düşük ise 0.563 g ile B5 besin ortamında belirlenmiştir.

Yaprak eksplantında petri başına en yüksek somatik embriyo sayısı Prosementi çeşidinde 12 adet ile B5 besin ortamında; Gea, Ömerbey ve Artemis çeşitlerinde sırasıyla 13, 19.667 ve 6.333 adet ile SH besin ortamında; Classe çeşidinde 10.333 adet ile MS besin ortamında ve OS-66 çeşidinde ise 16.333 adet ile N6 besin ortamında elde edilmiş olup, Savaş çeşidinde ise hiç embriyo elde edilememiştir. Kotiledon eksplantında ise Prosementi, Gea ve Artemis çeşitlerinde hiç somatik embriyo elde edilemezken, Savaş çeşidinde N6 ortamında 0.667 adet, Ömerbey çeşidinde MS ve B5 besin ortamında 0.333 adet, Classe çeşidinde SH ortamında 2 adet ve OS-66 çeşidinde N6 ve SH besin ortamlarında 5.333 ve 2.333 adet somatik embriyo elde edilmiştir.

Petri başına bitkicik sayıları incelendiğinde kotiledon eksplantında yonca çeşitlerinde hiçbir ortamda bitkicik gelişimi gözlenmezken, yaprak eksplantında Prosementi çeşidinde 3.667 adet ile B5, Gea ve Artemis çeşitlerinde 2.667 ve 0.667 adet ile SH, Ömerbey çeşidinde ise 1.00 ve 6.667 adet ile N6 ve SH besin ortamlarında bitkicik gelişimi gözlenmiştir.

Tablo 3. 2. Bazı yonca çeşitlerinde kotiledon ve yaprak eksplantlarından farklı temel besin ortamlarında elde edilen petri başına kallus ağırlığı, petri başına somatik embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısına ait ortalama değerler

Çeşit	Temel Besin Ortamı	Petri Başına Kallus Ağırlığı (g/petri)		Petri Başına Somatik Embriyo Sayısı (adet/petri)		Petri Başına Bitkicik Sayısı (adet/petri)	
		Yaprak	Kotiledon	Yaprak	Kotiledon	Yaprak	Kotiledon
Prosementi	N6	3.213 bcd*	1.417 j-s	0 f*	0 f	0 d*	0 d
	MS	2.673 c-h	1.943 e-o	1.333 f	0 f	0 d	0 d
	SH	2.311 d-l	1.187 m-t	0.333 f	0 f	0 d	0 d
	B5	3.570 bc	1.320 l-s	12.00 bcd	0 f	3.667 b	0 d
Gea	N6	2.853 b-f	2.467 d-j	0.67 f	0 f	0 d	0 d
	MS	1.740 g-q	2.310 d-l	0 f	0 f	0 d	0 d
	SH	1.507 i-s	1.623 h-r	13.00 abc	0 f	2.667bc	0 d
	B5	1.267 l-t	1.077 n-t	0 f	0 f	0 d	0 d
Savaş	N6	1.017 n-t	1.330 l-s	0 f	0.667 f	0 d	0 d
	MS	1.350 k-s	2.503 d-ı	0 f	0 f	0 d	0 d
	SH	0.503 st	0.807 p-t	0 f	0 f	0 d	0 d
	B5	0.617 rst	0.937 n-t	0 f	0 f	0 d	0 d
Omerbey	N6	3.180 bcd	2.393 d-k	5.667 c-f	0 f	1.000 cd	0 d
	MS	1.717 g-q	2.703 c-g	0 f	0.333 f	0 d	0 d
	SH	1.327 l-s	1.533 i-s	19.667 a	0 f	6.667 a	0 d
	B5	0.877 o-t	1.260 l-t	1.00 f	0.333 f	0 d	0 d
Artemis	N6	1.950 e-o	2.640 c-h	3.333 ef	0 f	0 d	0 d
	MS	6.700 a	0.253 t	3.00 ef	0 f	0 d	0 d
	SH	1.893 f-o	2.203 d-m	6.333 c-f	0 f	0.667 d	0 d
	B5	1.973 e-n	2.257d-l	1.000 f	0 f	0 d	0 d
Classe	N6	3.140 bcd	3.020 bcd	4.667 def	0 f	0 d	0 d
	MS	2.560 c-ı	3.783 b	10.333 b-e	0 f	0 d	0 d
	SH	0.757 p-t	1.143 m-t	4.667 def	2.000 de	0 d	0 d
	B5	1.530 i-s	1.290 l-t	4.667 def	0 f	0 d	0 d
OS 66	N6	1.820 f-p	1.790 g-q	16.333 ab	5.333 cde	0 d	0 d
	MS	2.957 b-e	0.723 q-t	2.667 ef	0 f	0 d	0 d
	SH	1.500 i-s	1.243 l-t	4.333 def	2.333 ef	0 d	0 d
	B5	1.523 i-s	0.563 rst	3.333 ef	0 f	0 d	0 d

*: Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

3.2. Ömerbey yonca çeşidinde farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarının somatik embriyogenesis üzerine etkisi

Ömerbey çeşidinde farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarının somatik embriyogenesis üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaprak eksplantları 4 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L kinetin+2g/L prolin veya 1 g/L glutamin+30 g/L şeker içeren 8 g/L agar ile katılaştırılmış SH ya da N6 temel besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından yaklaşık 45-50 gün sonra gelişen kalluslar MS+30 g/L sukroz, MS+30 g/L sukroz+30 g/L PEG ya da MS+30 g/L sukroz +2 mg/L ABA içeren 3 farklı besin ortamına, burada embriyo olgunlaşması sağlandıktan bitkicik gelişimi için MS besin ortamına aktarılmıştır.

Tablo 3.3 incelendiğinde; Ömerbey yonca çeşidinde petri başına kallus ağırlığı üzerine aminoasit ve aminoasit x ortam interaksiyonunun etkisi önemsiz bulunurken, ortamların etkisi 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Tablo 3. 3. Ömerbey yonca çeşidinde farklı kallus oluşturma ortamlarının petri başına kallus ağırlığına etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F
Aminoasit (A)	1	0.007	0.041
Ortam (O)	1	1.240	7.319*
A x O	1	0.165	0.977
Hata	8	0.169	
Genel	11		

*:%5 düzeyinde önemli

Tablo 3. 4. Ömerbey yonca çeşidinde farklı kallus oluşturma ortamlarında elde edilen petri başına kallus ağırlığına ait ortalama değerler (g)

Amino asit	Temel Besin Ortamı		Ortalama
	N6	SH	
Prolin	2.201	1.323	1.762
Glutamin	1.918	1.510	1.714
Ortalama	2.060 a*	1.417 b	

*: Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.4’de ortamların ortalaması incelendiğinde; en fazla petri başına kallus ağırlığı 2.060 g ile N6 besin ortamından elde edilmiştir.

Ömerbey yonca çeşidinde farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarının petri başına somatik embriyo ve petri başına bitkicik sayısına etkisine ait varyans analizi sonuçları Tablo 3.5’te verilmiştir. Tablo 3.5. incelendiğinde; Ömerbey yonca çeşidinde petri başına somatik embriyo sayısı üzerine embriyo olgunlaştırma ortamı, aminoasit x ortam, aminoasit x embriyo olgunlaştırma ortamı ve ortam x embriyo olgunlaştırma ortamı interaksyonunun etkisi istatistiksel olarak önemsiz, aminoasit, ortam ve aminoasit x ortam x embriyo olgunlaştırma ortamı interaksyonunun etkisi istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Petri başına bitkicik sayısında ise; aminoasit, embriyo olgunlaştırma ortamı, aminoasit x ortam, ortam x embriyo olgunlaştırma ortamı ve aminoasit x ortam x embriyo olgunlaştırma ortamı istatistiksel olarak 0.05 düzeyinde önemli iken, ortam ve aminoasit x embriyo olgunlaştırma ortamı interaksyonu 0.01 düzeyinde önemlidir.

Tablo 3. 5. Ömerbey yonca çeşidinde farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarının petri başına somatik embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısına etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Petri Başına Somatik Embriyo Sayısı		Petri Başına Bitkicik Sayısı	
		Kareler Ortalaması	F	Kareler Ortalaması	F
Aminoasit (A)	1	306.250	24.831**	20.250	7.839*
Ortam (O)	1	173.361	14.056**	56.250	21.774**

Embriyo olgunlaştırma (E)	2	16.750	1.358	14.250	5.516*
A x O	1	42.250	3.426	20.250	7.839*
A x E	2	7.583	0.615	9.750	3.774**
O x E	2	6.361	0.516	14.250	5.516*
A x O x E	2	100.750	8.169**	9.750	3.774*
Hata	24	12.333		2.583	
Genel	35				

*:%5 düzeyinde önemli, **: %1 düzeyinde önemli

Tablo 3. 6. Ömerbey yonca çeşidinde farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarında elde edilen petri başına somatik embriyo sayısına ait ortalama değerler (adet)

Kallus Geliştirme Ortamı		Embriyo Olgunlaştırma Ortamları		
Aminoasit	Temel Besin Ortamı	2 mg/L ABA	30 g/L PEG	MS
2 g/L Prolin	N6	11.667 bc*	11.333 bc	7.667 cd
	SH	11.667 bc	16.667 ab	22.000 a
1 g/L Glutamin	N6	3.667 d	7.667 cd	8.333 cd
	SH	10.000 cd	10.333 bcd	6.000 cd

Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.6'da ortalama değerler incelendiğinde Ömerbey yonca çeşidinde petri başına somatik embriyo sayısı en yüksek 22 adet ile SH besin ortamında, prolin uygulamasında ve embriyo olgunlaştırma ortamı olarak MS temel besin ortamı kullanıldığında elde edilmiştir. En düşük değer ise 3.667 adet ile kallus oluşturma ortamı olarak N6 besin ortamı ve 1 g/L glutamin ve embriyo olgunlaştırma ortamı olarak ABA uygulandığında elde edilmiştir. Genel olarak hem N6 hem de SH besin ortamlarında 2 g/L prolin içeren kallus oluşturma ortamlarında daha fazla somatik embriyo sayısı tespit edilmiştir.

Tablo 3. 7. Ömerbey yonca çeşidinde farklı kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarında elde edilen petri başına bitkicik sayısına ait ortalama değerler (adet)

Kallus Geliştirme Ortamı		Embriyo Olgunlaştırma Ortamları		
Aminoasit	Temel Besin Ortamı	2 mg/L ABA	30 g/L PEG	MS
2 g/L Prolin	N6	0 c	0 c	0 c
	SH	0 c	5 ab	7 a
1 g/L Glutamin	N6	0 c	0 c	0 c
	SH	0 c	3 bc	3 bc

Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

Ömerbey yonca çeşidinde petri başına bitkicik sayısı en yüksek 7 ve 5 adet ile 2 g/L prolin içeren SH besin ortamında kallus oluşumundan sonra MS ve MS+PEG ortamında alt kültüre alınan yaprak eksplantlarından elde edilmiştir (Tablo 3.7.).

3.3. Bazı yonca çeşitlerinde TDZ ve BAP dozlarının kotiledon boğum eksplantında in vitro sürgün rejenerasyonuna etkisi

Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey çeşitlerine ait kotiledon boğum eksplantları izole edilerek 0.3-1.2 mg/L TDZ, 1-4 mg/L BAP ve 0.5 mg/L NAA içeren 6 farklı ortamda 3 tekerrürlü olarak kültüre alınmışlardır. Kültür başlangıcından yaklaşık 2 ay sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayıları belirlenmiştir.

Tablo 3. 8. Bazı yonca çeşitlerinde TDZ ve BAP dozlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısına etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi		Eksplant Başına Sürgün Sayısı	
		Kareler Ortalaması	F	Kareler Ortalaması	F
Çeşit	3	2476.468	20.698**	8.112	27.657**
Ortam	5	678.291	5.669**	0.339	1.156
Çeşit x Ortam	15	425.667	3.558**	1.880	6.410**
Hata	48	119.648		0.293	
Genel	71				

*:%5 düzeyinde önemli, **: %1 düzeyinde önemli

Tablo 3.8 incelendiğinde; sürgün oluşturan eksplant yüzdesi üzerine çeşit, ortam ve çeşit x ortam interaksyonu istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunurken, eksplant başına sürgün sayısı üzerine çeşit ve çeşit x ortam interaksyonu istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Deneme sonucunda, bazı yonca çeşitlerinin farklı TDZ ve BAP dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri Tablo 3.9’da verilmiştir. Tablo 3.9.’da çeşitlerin ortalamaları incelendiğinde sürgün oluşturan eksplant yüzdesi en yüksek % 86.22 ile Prosementi çeşidinden elde edilmiş olup bunu sırasıyla %70.37, %64.81 ve %47.22 ile Ömerbey, Savaş ve Gea çeşitleri izlemiştir. Ortamların ortalama değerleri incelendiğinde, en yüksek sürgün oluşturan eksplant yüzdesi %80.56 ile 2 mg/L BAP içeren ortamdaki elde edilmiş olup bunu sırasıyla 1 mg/L BAP, 0.6 mg/L TDZ, 4 mg/L BAP, 0.3 mg/L TDZ ve 1.2 mg/L TDZ içeren ortamlar izlemiştir.

Çeşitler kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise en yüksek sürgün oluşturan eksplant yüzdesi Prosementi çeşidinde %100 ile 0.6 mg/L TDZ, Gea çeşidinde %77.78 ile 0.6 mg/L TDZ, Savaş çeşidinde %88.89 ile 2 mg/L BAP ve Ömerbey çeşidinde %88.89 ile 0.3 mg/L TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir.

Tablo 3. 9. Bazı yonca çeşitlerinin farklı TDZ ve BAP dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri (%)

Ortamlar	Çeşitler				Ortalama
	Prosementi	Gea	Savaş	Ömerbey	
0.3 mg/LTDZ+0.5 mg/L NAA	66.67 (54.74) c-h*	27.78 (31.54) ı	38.89 (38.51) ghi	88.89 (73.94) abc	55.55 b***
0.6 mg/LTDZ+ 0.5 mg/L NAA	100.00 (90.00) a	77.78 (62.18) b-f	55.56 (48.25) e-ı	50.00 (45.00) f-ı	70.83 a
1.2 mg/LTDZ+0.5 mg/L NAA	72.22 (58.46) c-g	27.78 (31.06) ı	61.11 (51.97) d-ı	55.56 (48.25) e-ı	54.17 b
1 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	83.33 (70.21) a-d	55.56 (48.25) e-ı	83.33 (65.90) b-f	66.67 (55.21) c-h	72.22 a
2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	88.89 (73.94) abc	61.11 (51.49) d-ı	88.89 (73.94) abc	83.33 (70.21) b-e	80.56 a
4 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	94.44 (81.97) ab	33.33 (34.79) hı	61.11 (51.97) d-ı	77.78 (66.49) b-e	66.67 a
Ortalama	86.22 a**	47.22 c	64.81 b	70.37 b	

*: Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

** : Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

*** : Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

Parantez içleri transformasyon değerlerini göstermektedir

Tablo 3. 10. Bazı yonca çeşitlerinin farklı TDZ ve BAP dozlarında eksplant başına sürgün sayıları (adet)

Ortamalar	Çeşitler				Ortalama
	Prosementi	Gea	Savaş	Ömerbey	
0.3 mg/LTDZ+0.5mg/L NAA	2.33 d-g*	1.50 f-1	2.28 d-h	2.40 d-g	2.13
0.6 mg/LTDZ+0.5mg/L NAA	2.61 c-e	2.48 c-f	1.33 g-1	2.00 d-1	2.11
1.2 mg/LTDZ+0.5mg/L NAA	2.17 d-1	5.11 a	1.25 h1	1.75 e-1	2.57
1 mg/L BAP+0.5mg/L NAA	2.14 d-1	3.92 b	1.13 ı	1.66 e-1	2.21
2 mg/L BAP+0.5mg/L NAA	2.31 d-1	3.44 bc	1.89 d-1	1.61 e-1	2.31
4 mg/L BAP+0.5mg/L NAA	1.75 e-1	2.83 cd	2.13 d-1	2.33 d-g	2.26
Ortalama	2.22 b**	3.21 a	1.67 d	1.96 bc	

* : Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

** : Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.10'da çeşitlerin ortalamaları incelendiğinde eksplant başına sürgün sayısı en yüksek 3.21 adet ile Gea çeşidinden elde edilmiş olup bunu sırasıyla 2.22 adet, 1.96 adet ve 1.67 adet ile Prosementi, Ömerbey ve Savaş çeşitleri izlemiştir. Ortamların ortalama değerleri incelendiğinde, eksplant başına sürgün sayısı en yüksek 2.57 adet ile 1.2 mg/L TDZ içeren ortamdan elde edilmiş olup bunu sırasıyla 2 mg/L BAP, 4 mg/L BAP, 1 mg/L BAP, 0.3 mg/LTDZ ve 0.6 mg/L TDZ içeren ortamlar izlemiştir. Çeşitler kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise eksplant başına sürgün sayısı en yüksek, Gea çeşidinde 5.11 adet ile 1.2 mg/L TDZ, Prosementi çeşidinde 2.61 adet ile 0.6 mg/LTDZ, Ömerbey çeşidinde 2.40 adet ile 0.3 mg/L TDZ ve Savaş çeşidinde 2.28 adet ile 0.3 mg/L TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir. Çeşitler büyümeyi düzenleyici tipine göre sürgün oluşum yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından farklı tepkiler göstermiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1.Tartışma

Farklı yonca çeşitlerinde in vitro bitki rejenerasyonu elde etmek amacıyla yürütülen bu çalışma 2017-2019 yılları arasında Seyrani Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Araştırmada Prosementi, Gea, Savaş, Ömerbey, OS66, Artemis ve Classe yonca çeşitleri kullanılmıştır. Çeşitlere ait yaprak ve kotiledon eksplantları 4 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 2 g/L prolin ve 30 g/L sukroz içeren, 8 g/L agar ile katılaştırılan dört farklı MS, B5, SH ve N6 temel besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda tüm çeşitlerde her iki eksplantta da bütün ortamlarda kallus oluşumu gözlenmiştir. Kallus ağırlığı bakımından çeşit x eksplant x ortam interaksyonu önemli bulunmuştur. En yüksek kallus ağırlığı petri başına 6.7 g ile Artemis çeşidinde yaprak eksplantında MS besin ortamında elde edilirken en düşük yine Artemis çeşidinde kotiledon eksplantında MS besin ortamında elde edilmiştir. Benzer şekilde petri başına somatik embriyo sayısı ve petri başına bitkicik sayısında da çeşit x eksplant x ortam interaksyonu önemli bulunmuştur.

Araştırma sonucunda en fazla petri başına somatik embriyo sayısı Prosementi çeşidinde B5 besin ortamında; Gea, Ömerbey ve Artemis çeşitlerinde SH besin ortamında; Classe çeşidinde MS besin ortamında ve OS-66 çeşidinde ise N6 besin ortamında yaprak eksplantında elde edilmiş olup, Savaş çeşidinde yaprak eksplantında hiç embriyo elde edilememiş sadece N6 besin ortamında kotiledon eksplantında somatik embriyo elde edilmiştir.

En yüksek petri başına somatik embriyo sayıları yaprak eksplantında Prosementi, Gea, Ömerbey, Artemis, Classe ve OS-66 çeşitlerinde sırasıyla 12.00, 13.00, 19.667, 6.333, 10.333 ve 16.333 adet, kotiledon eksplantında Savaş, Ömerbey, Classe ve OS-66 çeşitlerinde sırasıyla 0.667, 0.333, 2 ve 5.333 adet olarak kaydedilmiştir. Petri başına bitkicik sayıları incelendiğinde kotiledon eksplantında yonca çeşitlerinde hiçbir ortamda bitkicik elde edilemezken, yaprak eksplantında Prosementi çeşidinde 3.667 adet, Gea çeşidinde 2.667 adet, Artemis çeşidinde 0.667 adet, Ömerbey çeşidinde 6.667 adet bitkicik elde edilmiştir. Daha önce yonca ile yapılan çalışmalarda somatik embriyo oluşumunda etkili olan faktörler genotip, eksplant kaynağı ve besin ortamının içeriği olarak bildirilmektedir (Erişen, 2005). Brown ve Atanassov (1985), yürüttükleri çalışmada; farklı yonca türlerinden 76 genotipi somatik embriyo ve kallus üretim kapasiteleri açısından kıyaslamışlardır. Kallus ve embriyogenesis açısından genotipler arasında büyük bir varyasyon gözlemlemişlerdir. Eksplant ve ortam protokolü ne olursa olsun yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip genotiplerin düşük rejenerasyon kapasitesine sahip genotiplerden daha fazla somatik embriyo ürettiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Chen ve Marowitch (1987), *Medicago falcata*'da somatik embriyo oluşturmak amacıyla 17 ekotip incelemiş, eksplant kaynağı olarak kotiledon, kök, hipokotil ve yaprak kullanmıştır. Araştırma sonucunda genotip ve rejenerasyon yeteneği arasında önemli bir ilişki olduğunu ve 17 ekotipin 10 tanesinin rejenerasyon yeteneğine sahip olduğunu bildirmiştir. Nolan vd. (1989) ise *M. truncatula* türünde tohumdan gelişen bitkilerden alınan yapraklar eksplant olarak kullanıldığında rejenerasyon oranı düşükken rejenere olan bitkiler eksplant kaynağı olarak kullanıldığında rejenerasyon oranının yüksek olduğunu, Moltrasio vd. (2004) de resiprokal melezler ve anaç klonların kendilenmiş döllerini ile yürüttükleri denemelerde somatik embriyogenesisin iki tamamlayıcı genin kontrolü altında olduğunu tespit etmişlerdir.

Erişen (2005) somatik embriyogenesis ile rejenerasyonun büyük oranda genotipe bağlı olduğu ancak kullanılan protokoller ve eksplant seçiminin de embriyo oluşumunda etkili olduğunu bildirmektedir. Erişen (2005) rejenerasyon yeteneğine sahip Verco çeşidinde yaprak eksplantında eksplant başına 94 adet somatik embriyo elde ederken, yaprak sapı eksplantında 6 adet somatik embriyo elde etmiştir ve elde ettiği somatik embriyo sayılarının bu denemede elde edilen değerlerden oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Temel besin ortamları incelendiğinde yaprak eksplantında çeşitlere göre değişmekle birlikte N6, B5 ve SH ortamlarında daha fazla petri başına somatik embriyo sayısı elde edilmiştir. Petri başına bitkicik sayıları incelendiğinde Prosementi çeşidinde en fazla petri başına bitkicik sayısı B5 ortamında elde edilirken Gea, Ömerbey ve Artemis çeşitlerinde SH ortamında elde edilmiştir. Takamizo vd. (1991), 26 yonca çeşidinde somatik embriyo oluşumunu inceledikleri çalışmalarında B2, B5h, UM ve SH ortamlarını kullanmıştır. Araştırma sonucunda Tachiwakaba yonca çeşidinde hipokotil eksplantanında somatik embriyo gelişimi için en uygun ortamın 4 mg/L 2,4.D ve BAP içeren UM ortamı olduğunu tespit etmişlerdir. Erişen (2005) ise yoncada en yüksek eksplant başına embriyo ve sürgün sayısını B5h besin ortamında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Saha vd. (2011) bitki türlerinde embriyo rejenerasyonu ve gelişimi için her elementin ayrı bir etkiye sahip olduğunu, ortamın makro ve mikro element içeriğinin embriyo oluşumunu ve gelişimini etkilediğini rapor etmişlerdir.

Aminoasitler proteinlerin, nükleik asitlerin ve bitki hormonlarının yapıtaşı olması nedeniyle bitkilerin yapı ve fonksiyonları için gereklidir. Bu nedenle somatik embriyogenesis çalışmalarında genellikle azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Mariashibu vd., 2013). Stuart ve Strickland (1984) prolin veya diğer amino asitlerin hem embriyo büyüklüğünü hem de embriyonun bitkiye dönüşümünü artırdığını ve kaliteli somatik embriyogenesis için aminoasitlerin ortama eklenmesi gerektiğini belirtmektedir. Romagnoli vd. (1996) prolinin embriyo gelişimi için önemli olduğunu ancak glutaminin embriyo gelişimini düzenlemediğini, Zhang vd. (2010) ise glutaminin embriyo gelişimi için önemli olduğunu bildirmektedir. Ömerbey yonca çeşidinde kallus oluşturma ve embriyo olgunlaştırma ortamlarının somatik embriyogenesis üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yürütülen denemede kallus geliştirme ortamında 2 g/L prolin veya 1 g/L glutamin kullanılmıştır. Deneme sonucunda genel olarak hem N6 hem de SH besin ortamlarında 2 g/Lprolin içeren kallus oluşturma ortamlarından daha fazla somatik embriyo sayısı elde edilmiştir. Araştırmacılar tarafından elde edilen farklı sonuçlar araştırmalarda genotiplerin farklı olmasından, ortam, aminoasit konsantrasyonu ya da eksplanttan kaynaklanmış olabilir. Nitekim Hita vd (2003), *Medicago arborea*'da somatik embriyogenesis üzerine prolinin pozitif etkisinin eksplant tipine ve prolin konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini bildirmiştir.

Ömerbey yonca çeşidinde petri başına bitkicik sayısı en yüksek 7 ve 5 adet ile 2 g/L prolin içeren SH besin ortamında kallus oluşumundan sonra MS ve MS+PEG ortamında alt kültüre alınan yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. Aynı ortamlarda somatik embriyo sayısı da 22 ve 16.667 adet ile en yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde Salaj vd. (2004)'te somatik embriyo olgunlaşması için PEG'in ve karbonhidrat kaynağının önemli olduğunu bildirmektedir.

Prosementi, Gea, Savaş ve Ömerbey çeşitlerinde kotiledon boğumlardan sürgün rejenerasyonu amacıyla yürütülen denemede kotiledon boğum eksplantları izole edilerek 0.3-1.2 mg/L TDZ, 1-4 mg/L BAP ve 0.5 mg/L NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Deneme sonucunda sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve eksplant başına sürgün sayılarında çeşit x ortam interaksyonunun önemli olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Nofouzi vd. (2019)'un elde ettikleri sonuçlarda benzerlik göstermektedir. Nofouzi vd (2019)'da genotip ve BBD konsantrasyonlarının yoncada kotiledon boğum eksplantında rejenerasyon frekansı ve eksplant başına sürgün sayısında önemli olduğunu bildirmektedir. Benzer şekilde Ding vd. (2003), 16 farklı yonca çeşidinde 5 mM TDZ ve 0.5 mM NAA içeren ortamda sürgün rejenerasyonu frekansının çeşitlere göre %33- 85 arasında değiştiğini, Kumar vd. (2012) ise 5 farklı yonca çeşidinde apikal meristemlerden in vitro direk sürgün rejenerasyonu üzerine TDZ ve BA'nın etkisini inceledikleri çalışmada sürgün rejenerasyonu frekansının çeşitlere göre ve BBD'lere göre % 67 ile 93 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada sürgün oluşturan eksplant yüzdesi %27.78 ile %100 arasında değişim göstermiş olup en yüksek Prosementi çeşidinde en düşük ise Gea çeşidinde tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayıları ise 1.13-5.11 arasında değişim göstermiş olup, en yüksek eksplant başına sürgün sayısı Gea çeşidinde, en düşük ise Savaş çeşidinden elde edilmiştir. Nofouzi vd. (2019) en fazla eksplant başına sürgün sayısını Nimet çeşidinde 5 ve 6.33 adet ile sırasıyla 0.25 mg/L BAP ve 0.55 mg/L TDZ, Savaş çeşidinde ise 8.50 ve 4.66 adet ile sırasıyla 0.4 mg/L BAP ve 0.15 mg/L TDZ içeren ortamlarda bildirmiştir. Li vd. (2009), 8 farklı yonca genotipinde kotiledon boğum eksplantında TDZ ve AgNO₃ içeren besin ortamlarında eksplant başına 2.8-5.9 adet sürgün elde ederken; Kumar vd. (2012) BAP, kinetin ve TDZ'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarında eksplant başına 0.2-35 adet sürgün elde etmişlerdir. Çalışmalar

arasındaki farklılıklar çeşitlerden veya kullanılan BBD'lerin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarından kaynaklanmış olabilir. Nitekim Kumar vd. (2012), TDZ'nin BAP ya da kinetin ile kombinasyonlarının adventif sürgün sayısını artırdığını ve TDZ-BAP kombinasyonlarının TDZ-kinetin kombinasyonlarına göre daha iyi sinergistik etki gösterdiğini bildirmektedir.

4.2.Sonuç ve Öneriler

Tez çalışması kapsamında ülkemizde yetiştirilen bazı yonca çeşitlerinde öncelikle somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda kullanılan çeşitler değerlendirildiğinde en yüksek somatik embriyo ve bitkicik sayısı sırasıyla 19.667 ve 6.667 adet ile Ömerbey çeşidinden SH temel besin ortamında yaprak eksplantından elde edilmiştir. Petri başına somatik embriyo ve petri başına bitkicik sayılarında çeşit x eksplant x ortam interaksyonu önemli bulunmuştur. Petri başına somatik embriyo ve bitkicik sayıları birlikte değerlendirildiğinde Ömerbey çeşidinin somatik embriyogenesis ile bitki rejenerasyonu için ümitvar bir çeşit olduğu söylenebilir. Çeşitlerde somatik embriyo sayısı ve kalitesini artırmak amacıyla ileride yapılacak çalışmalarda farklı eksplantlarda 2,4-D konsantrasyonu, aminoasit kaynak ve dozları denenebilir.

BAP ve TDZ içeren ortamlarda kotiledon boğum eksplantından direkt sürgün rejenerasyonunun amaçlandığı denemelerde ise en yüksek sürgün rejenerasyon frekansı Prosementi çeşidinde, en düşük Gea çeşidinde kaydedilmiştir. Prosementi ve Gea çeşitlerinde en yüksek sürgün rejenerasyonu frekansı 100 ve %77.78 ile 0.6 mg/L TDZ+ 0.5 mg/L NAA içeren besin ortamından, Savaş çeşidinde % 88.89 ile 2 mg/L BAP+ 0.5 mg/L NAA içeren besin ortamından ve Ömerbey çeşidinde ise %88.89 ile 0.3 mg/LTDZ+ 0.5 mg/L NAA içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 5.11 adet ile Gea çeşidinde 1.2 mg/LTDZ+0.5mg/L NAA içeren besin ortamında tespit edilmiştir. Kotiledon boğumlar in vitro bitki rejenerasyonu için oldukça elverişli eksplant kaynağıdır, farklı sitokinin kaynakları, doz ve kombinasyonları ile sürgün rejenerasyon oranı ve eksplant başına sürgün sayılarının artırılması yönünde çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Amini, M., Deljou, A., Nabiabad, H.S., 2016. Improvement of in vitro embryo maturation, plantlet regeneration and transformation efficiency from alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos using *Cuscuta campestris* extract. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, **22**(3): 321-330.
- Atanassov, A., Brown, D.C., 1984. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **3**(2):149-162.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, A.A., 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, 1-35. In: Bitki Biyoteknolojisi- Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Band, S. M., Ghadimzadeh, M., Jafari, M., Bernousi, I., 2011. Direct shoot regeneration from stem nodal explants of two wild *Medicago* species- *Medicago scutellata* and *Medicago rigidula*. **Australian Journal of Crop Science**, **5**(6): 668.
- Barbulova, A. Alantcheva, A., Zhiponova, M., Vlahoca, M., Atassanov A., 2002. Establishment of embryogenic potential of economically important Bulgarian alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.). **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, **16**(1): 55-63.
- Bauchan, G.R., 1987. Embryo Culture of *Medicago scutellata* and *M. sativa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **10**:21-29.
- Bingham, E.T., Hurley, L.V., Kaatz, D.M, Saunders, J.W., 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. **Crop Science**, **15**:719-720.
- Brown, D.C.W, Atanassov, A., 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **4**:111-122.
- Chen, T.H.H., Marowitch, J., 1987. Screening of *Medicago falcata* germplasm for in vitro regeneration. **Journal Plant Physiology**, **128**:271-277.
- Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y., Bi, F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen. **Sci. Scinica**, 18659-668.
- Ding, Y.L., Aldao-Humble, G., Ludlow, E., Drayton, M., Lin, Y.H., Nagel, J., Dupal, M., Zhao, G., Pallaghy, C., Kalla, R., Emmerling, M., 2003. Efficient plant

- regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Medicago* and *Trifolium* species. **Plant Science**, **165**(6), pp.1419-1427.
- Elçi, Ş., 2005. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara, 486 s.
- Erişen, S. 2005. Yonca (*Medicago sativa* L.)’da somatik embriyogenesis aracılığıyla bitki rejenerasyonu, **Tarım Bilimleri Dergisi** **2005**,**11**(3):311-315
- Gamborg, O. L., Miller, R., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, **50**(1), 151-158.
- Hita, O., Gallego, P., Villalobos, N., Lanas, I., Blazquez, A., Martin, J.P., Fernandez, J., Martin, L. Guerra, H., 2003. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, **72**(1):13-18.
- Kumar, S., Tiwari, R., Chandra, A., Sharma, A., Bhatnagar, R. K. 2012. In vitro direct plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of lucerne (*Medicago sativa* L.). **Grass and Forage Science**, **68**(3), 459-468.
- Kumar, S., 2011. Biotechnological advancements in alfalfa improvement. **Journal of applied genetics**, **52**(2), pp.111-124.
- Lai, F., Bryan D, McKersie. 1994. Regulation of storage protein synthesis by nitrogen and sulfur nutrients in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. **Plant science**, **103**: 209-221.
- Li, J.J., Wu, Y.M., Wang, T., Liu, J.X., 2009. In vitro direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa*. **Biologia plantarum**, **53**(2): 325-328.
- Lupotto, E., 1983. Propagation of an embryogenic culture of *Medicago sativa* L . **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, **111**:95-104.
- Mariashibu, T.S., Subramanyam, K., Arun, M., Theboral, J., Rajesh, M., Rengan, S.K., Chakravarthy, R., Manickavasagam, M., Ganapathi, A., 2013. Assessment of somatic embryogenesis potency in Indian soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars. **Indian Journal of Experimental Biology**, **51**: 849-859
- Mc Kersie, B.D., Senaratna, T., Bowley, S.R., Brown, D.C.W., Krochko, J.E., Bewley, J.D., 1989. Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.), **In Vitro Cellular Developmental Biology**, **25**: 1183-1188.

- Mckay, T., Walker, K., 1984. Legumes. In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol 3 Crop Species, P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y. Yamada (eds), PP: 171-191. Macmillan Publishing Company New York.
- Meijer, E.G.M., Brown, D.C.W., 1987. Role of Exogenous Reduced Nitrogen and Sucrose in Rapid High Frequency Somatic Embryogenesis in *Medicago sativa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **10**:11-19
- Moltrasio, R., Robredo, C. G., Gómez, M. C., Paleo, A. H. D., Díaz, D. G., Rios, R. D., Franzone, P. M. 2004. Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **77**(2), 119-124.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, **15**(3), 473-497.
- Ninkovic, S., Miljus-Djukic, J., Neskovic, M., 1995. Genetic transformation of alfalfa somatic embryos and their clonal propagation through repetitive somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **42** (3): 255-260.
- Nofouzi, F., Oğuz, M. Ç., Khabbazi, S. D., Ergül, A. 2019. Improvement of the in vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Medicago sativa* L. **Turkish Journal of Agriculture & Forestry**, **43**(1): 96-104.
- Nolan, K.E., Rose, R.J., Gorts, J.R., 1989. Regeneration of *Medicago trunculata* from Tissue Culture: Increased Somatic Embryogenesis Using Explants from Regenerated Plants. **Plant Cell Reports**, **8**: 278-281.
- Özcan, S., Babaoğlu, M., Sancak, C., 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri, 71-88. In: Bitki Biyoteknolojisi- Doku Kültürü ve Uygulamaları (Eds: M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Özgen, M., Altınok, S., Özcan, S., Sevimay, C.S., 1997. *In Vitro* Micropropagation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Cultivars, **Turkish Journal of Botany**, **21**: 275-278.
- Pupilli, F., Damiani, F., Nenz, E., Arcioni, S., 1992. *In Vitro* Propagation of *Medicago* and *Lotus* Species by Node Culture, **In Vitro Cellular Developmental Biology** **28**: 167-171.
- Romagnoli, M.V., Ortiz, J.P.A., Cervigni, G.D., Heisterborg, C., Vallejos, R.H., 1996. High frequency somatic embryogenesis with a pampeana-derived genotype of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Euphytica**, **90**(1): .89-93.

- Rose, R. J. 2019. Somatic embryogenesis in the *Medicago truncatula* model: cellular and molecular mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, **10**: 267.
- Saha, P., Bandyopadhyay, S., Raychaudhuri, S.S., 2011. Formulation of nutrient medium for in vitro somatic embryo induction in *Plantago ovata* Forsk. **Biological Trace Element Research**, **140**(2): .225-243.
- Salaj, T., Matúšová, R, Salaj, J. 2004. The effect of carbohydrates and polyethylene glycol on somatic embryo maturation in hybrid fir *Abies alba* x *Abies numidica*. *Acta Biologica Cracoviensia (Series Botanica)*, 1(46):159-167.
- Saunders, J.W. ve Bingham, E.T., 1972. Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue. **Crop Science**, **12**: 804-808.
- Scarpa, G.M., Pupilli, F., Damiani, F., 1993. Plant regeneration from callus and protoplasts in *Medicago polymorpha*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **35**:49-57.
- Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, **50**(1), 199-204.
- Serin, Y., Tan, M., 2001. Baklagil Yem Bitkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 177 s.
- Stuart, D.A., Strickland, S.G., 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L.I. The role of amino acid additions to the regeneration medium. **Plant Science Letters**, **34**(1-2): 165-174.
- Süle, R., 2005. Farklı Oksin Çesitlerinin Yonca (*Medicago sativa* L.)`da Somatik Embriyo Olusumuna Etkisi Üzerinde Bir Arastırma, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Antakya.
- Takamizo, T., Sugino, K., Ohsugi, R., 1991. Somatic embryogenesis in a recalcitrant cultivar of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in an improved medium. **Bulletin of the National Grassland Research Institute (Japan)**, **44**:15-22.
- Vahdati K, Bayat SH, Ebrahimzadeh H, Jariteh M, Mirmasoumi M., 2008. Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **93**:163–171. doi:10.1007/s11240-008-9355-3

Zhang, H., Huang, Q. M., Jin, S.U. 2010. Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **Agricultural sciences in China**, **9**(2), 170-178.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Nilgün EKİNCİ
Uyruğu: Türkiye (T.C)
Doğum Tarihi ve Yeri: 07.06.1981 - Kayseri
Medeni Durum: Bekar
e-mail: nilgunakgunduz@hotmail.com
Yazışma Adresi:

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü	Devam ediyor
Lisans	Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi	2015
Lise	Talas lisesi, Kayseri	1998

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2017-Halen	Doğatek ARGE	Ziraat Mühendisi

YABANCI DİL

İngilizce