



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI OKSİN ÇEŞİTLERİNİN YONCA (*Medicago sativa* L.)'DA SOMATİK  
EMBRYO OLUŞUMUNA ETKİSİ ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA**

**RATİBE SÜLE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANTAKYA**  
**TEMMUZ-2005**

Mustafa Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Yrd. Doç. Dr. Nafiz ÇELİKTAŞ danışmanlığında, Ratibe SÜLE tarafından hazırlanan bu çalışma 22.07.2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd.Doç.Dr. Nafiz ÇELİKTAŞ İmza.....  
Üye : Doç.Dr. Gülşen SERTKAYA İmza.....  
Üye : Yrd.Doç.Dr. Ersin CAN İmza.....

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Kod No:

İmza  
22.07.2005

Prof. Dr. Abdurrahman YİĞİT  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma M.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.

Proje No: 04 M 1001

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	II
ÖNSÖZ .....	III
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VI
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	6
3. MATERYAL VE METOT .....	18
3.1. Materyal .....	18
3.2. Metot .....	18
3.2.1. Donor Bitkilerin Yetiştirilmesi .....	18
3.2.2. Deneme Planı .....	18
3.2.3. Kullanılan Besi Ortamları ve Besi Ortamının Hazırlanması .....	19
3.2.3.1. <i>In vitro</i> Fide Yetiştirme Ortamı .....	19
3.2.3.2. Kallus İndüksiyon Ortamı .....	19
3.2.3.3. Sıvı Süspansiyon Kültür Ortamı .....	19
3.2.3.4. Embriyo Geliştirme Ortamı .....	19
3.2.3.5. Makro ve Mikro Elementlerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması .....	24
3.2.3.6. Jelat (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O ve Na <sub>2</sub> EDTA) Hazırlanması .....	25
3.2.3.7. Vitamin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması .....	25
3.2.3.8. Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması .....	25
3.2.3.9. Stok Solüsyonlardan Yararlanarak Besi Ortamının Hazırlanması .....	26
3.2.4. Yüzey Sterilizasyonu ve <i>In vitro</i> Fide Yetiştirilmesi .....	27
3.2.5. Eksplantların Alınması ve <i>In vitro</i> Kültürü .....	28
3.2.6. Kallus İndüksiyonu .....	29
3.2.7. Sıvı Süspansiyon Kültürü / Somatik Embriyo Oluşumu .....	30

3.2.8. Somatik Embriyo Gelişimi.....	32
3.2.9. Somatik Embriyo Olgunlaştırma.....	33
3.2.10. Sentetik Tohum Elde Edilmesi .....	33
3.2.11. İncelenen Özellikler .....	34
3.2.11.1. Kallus İndüksiyon Oranı (%) .....	34
3.2.11.2. Kallus Ağırlığı (mg/petri) .....	34
3.2.11.3. Somatik Embriyo Sayısı (adet) .....	34
3.2.12. Araştırmada Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	36
4.1. Kallus İndüksiyonu .....	36
4.1.1. Kallus İndüksiyon Oranı (%) .....	38
4.1.2. Kallus Ağırlığı(mg/petri) .....	41
4.1.3. Somatik Embriyo Sayısı (somatik embriyo/g kallus) .....	43
4.1.4. Sentetik Tohum .....	49
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR .....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	60

## ÖZET

**FARKLI OKSİN ÇEŞİTLERİNİN YONCA (*Medicago sativa* L.)'DA  
SOMATİK EMBRİYO OLUŞUMUNA ETKİSİ  
ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA**

2003-2005 yılları arasında yürütülen bu araştırmada; farklı oksin çeşitleri kullanılarak, yonca (*Medicago sativa* L.)'da somatik embriyolar üretmek amaçlanmıştır. Elçi yonca çeşidine ait tohumlar *in vitro*'da çimlendirilmiş ve 6 günlük fidelerden hipokotil ve kotiledon segmentleri,  $1\text{mg l}^{-1}$  2,4-D, NAA, picloram veya dicamba +  $0.2\text{ mg l}^{-1}$  kinetin içeren SH ortamında kültür edilmişlerdir.

Araştırma sonucu; kullanılan oksin çeşidine bağlı olarak kallus indüksiyon oranı %23.6 ile %50.8 arasında değişmiş ve en yüksek değer 2,4-D oksin grubu büyüme düzenleyici içeren ortamlardan elde edilmiştir. Oluşan kallusların ağırlığı ortam kombinasyonlarına bağlı olarak 0.660 mg ile 1.472 mg arasında değişim gösterirken, picloramın ilave edildiği besi ortamlarından en yüksek ortalama elde edilmiştir. Araştırma sonucu 1 g kallus başına 8.6 ile 25.9 arasında somatik embriyo üretilmiştir. Yonca'da somatik embriyo elde etme açısından 2,4-D oksini en etkin büyüme düzenleyicisi olarak saptanmıştır.

2005, 60 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Yonca, *Medicago sativa* L., oksin, somatik embriyo, sentetik tohum

**ABSTRACT****A RESEARCH ON THE EFFECT OF DIFFERENT AUXIN TYPES TO SOMATIC EMBRYOGENESIS OF ALFALFA (*Medicago sativa* L.)**

In this research, conducted from year 2003 to 2005, somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.) were aimed to produce by using various auxin types. The seeds of the variety "Elçi" were germinated and, hypocotyl and cotyledon segments from plantlets of 6 days were cultivated in the medium of SH, consisted of 1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D, NAA, picloram or dicamba + 0.2 mg l<sup>-1</sup> kinetine.

From the result of the research, callus induction ratios were between 23.6 %-50.8 % depending on the types of auxins used and the highest value was obtained from the medium of 2,4-D while the weight of the callus formed varied between 0.660-1.472 mg depending on the medium combinations, the highest average was obtained from the medium of picloram. As a result, somatic embryos, varied in numbers from 8.6 to 25.9, were formed for each 1 g callus. 2,4-D was determined to be the most efficient auxin for obtaining somatic embryos of alfalfa.

2005, 60 Pages

**Key words:** Alfalfa, *Medicago sativa* L., auxin, somatic embryo, artificial seed

### III

## **ÖNSÖZ**

Tez çalışmamın belirlenmesi, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında, değerli fikir ve katkılarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nafiz ÇELİKTAŞ'a (M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü), çalışmanın değişik aşamalarında yardımlarını gördüğüm hocam Yrd. Doç. Dr. Ersin CAN (M.K.Ü) ve değerli arkadaşım Arş. Gör. A. İhsan ÜNLÜ (M.K.Ü)'ye, ayrıca tez süresince benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

SH.....	Schenk ve Hildebrandt
MS.....	Murashige ve Skoog
LS.....	Linsmaier ve Skoog
2,4-D.....	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
NAA.....	Naftalin asetik asit
Picloram.....	4-amino-3,5,6,-trikloropiklonik asit
Dicamba.....	3,6-dikloro-2 metoksibenzoik asit
GA <sub>3</sub> .....	Gibberellik asit
IAA.....	İndol-3 asetik asit
BAP.....	6-benzil amino pürin
IBA.....	İndol –3- bütirik asit
D.K.....	Değişim Katsayısı



**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1 <i>In vitro</i> Fide Yetiştirme Amacı ile Kullanılan MS Besi Ortamının Bileşimi.....	20
Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan SH Kallus İndüksiyon Ortamının Bileşimi.....	21
Çizelge 3.3. Araştırmada Kullanılan B5 Sıvı Süspansiyon Kültür Ortamının Bileşimi.....	22
Çizelge 3.4. Araştırmada Kullanılan BOİ2Y Embriyo Geliştirme Ortamının Bileşimi.....	23
Çizelge 4.1. Farklı Oksin Çeşitlerinin Elçi Yoncasında ( <i>Medicago sativa</i> L.) Kallus İndüksiyon Oranına Ait Varyans Analiz Sonuçları. ....	38
Çizelge 4.2. Elçi Yoncasının ( <i>Medicago sativa</i> L.) Farklı Oksin Uygulamalarında Oluşturduğu Kallus İndüksiyon Oranı Ortalamaları (%) .....	39
Çizelge 4.3. Farklı Oksin Çeşitlerinin Elçi Yoncasının ( <i>Medicago sativa</i> L.) Kallus Ağırlığına Etkisine İlişkin Varyans Analiz Sonuçları. ....	41
Çizelge 4.4. Elçi Yoncasının ( <i>Medicago sativa</i> L.) Farklı Oksin Uygulamalarında Oluşturduğu Kallus Ağırlığı Ortalamaları (mg).....	42
Çizelge 4.5. Elçi Yoncasının ( <i>Medicago sativa</i> L.) Farklı Oksin Çeşidi İçeren Ortamlarda Oluşturduğu Somatik Embriyo Sayıları İle İlgili Varyans Analiz Sonuçları.....	45
Çizelge 4.6. Elçi Yoncasının ( <i>Medicago sativa</i> L.) Farklı Oksin Çeşidi Uygulamalarında Oluşturduğu Somatik Embriyo Sayısı Ortalamaları (somatik embriyo sayısı / gram kallus) .....	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. Plastik Magenta Kutularında MS Besi Ortamında Çimlendirilen 6 Günlük Yonca Fideleri.....	28
Şekil 3.2. <i>In vitro</i> 'da Çimlendirilmiş Fide ve Kültür edilen Eksplantlar.....	29
Şekil 3.3. Kültür Başlangıcından 5 Hafta Sonra Hipokotil Eksplantından SH Ortamında Gelişen Embriyogenik Kallus.....	29
Şekil 3.4. Çalkalayıcı Üzerinde Sıvı Kültür (B5 Ortamında).....	30
Şekil 3.5. Farklı Aşamalarda Somatik Embriyolar İçeren Sıvı Kültürün Steril Bidestile Su ile Yıkayıp Süzülmesi.....	31
Şekil 3.6. Yıkamış ve Süzölmüş Materyalin Steril Filtre Kağıdı Üzerinde Kurutulması.....	32
Şekil 3.7. Pro-embriyogenik Yapılar Taşıyan Materyalin BOİ2Y Embriyo Geliştirme Ortamına Aktarılması.....	33
Şekil 4.1. Hipokotil Eksplantından Kültürün İlk Haftalarında Gelişen Gevşek Sulu Yapılı Kallus.....	37
Şekil 4.2. Kallus İndüksiyon Oranının Saptandığı Aşama (Kültür Başlangıcından 4-5 Hafta Sonra).....	37
Şekil 4.3. Farklı Oksin Uygulamaları Sonucu Oluşan Kallus İndüksiyon Oranı Ortalamaları (%). .....	39
Şekil 4.4. Farklı Oksin Uygulamaları Sonucu Oluşan Kallus Ağırlığı Ortalamaları (mg).....	43
Şekil 4.5. Sıvı Süspansiyon Kültürüne Aktarılmış Embriyogenik Kalluslar.....	44
Şekil 4.6. Yonca Hipokotil ve Kotiledon Segmentlerinden Oluşan Kallusun Sıvı Kültürü Sonrasında Elde Edilen Embriyogenik Yapılar ve Somatik Embriyolar.....	45
Şekil 4.7. Farklı Oksin Uygulamaları Sonucu Oluşan Somatik Embriyo Sayısı Ortalamaları (somatik embriyo/g kallus).....	47
Şekil 4.8. Somatik Embriyoların Kaplanması İle Elde Edilen Sentetik Tohumlar.....	50

## 1.GİRİŞ

Bitkiler güneş enerjisinden fotosentez yoluyla organik maddeleri üretmeleri sayesinde sadece yeryüzündeki beslenmenin temelini değil, aynı zamanda yeryüzündeki yaşamın da temelini oluşturmaktadır. İnsanlar tarafından tüketilen enerjinin %90'ı, proteinin ise %80'i bitkisel kaynaklıdır (MANTELL ve ark.,1985). Geriye kalan enerji ve protein gereksinimi ise hayvansal ürünlerden karşılanır. Bununla birlikte insan beslenmesinde bitkisel ve hayvansal ürünlerin katılma payları ülkelerin gelişmişlik düzeylerine bağlı olarak bazı farklılıklar gösterir ve bu ürünlerin miktarları oranında ülkeler gelişmiş, gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkeler olarak sınıflandırılmaktadır (TÜKEL ve HATIPOĞLU, 1997). Bu kriterlere göre ülkemiz gelişmekte olan ülkeler grubunda yer almaktadır. Çünkü, ülkemizde kişi başına tüketilen bir günlük protein miktarı dünya ortalaması olan 69.2 g'dan fazla olmasına karşılık, tüketilen proteinin %80'ine yakın bir kısmı bitkisel kaynaklı gıda maddelerinden karşılanmaktadır. Bunun nedeni ise, ülkemizde hayvansal ürünlerin üretiminin yetersiz olmasıdır (TÜKEL ve HATIPOĞLU, 1997).

Ülkemizde hayvansal gıda maddeleri üretiminin yetersiz olması, ülkemiz hayvancılığının sorunları ile ilgilidir. Ülkemiz hayvancılığının en önemli sorunlarından birisini kaba yem üretimi oluşturmaktadır.

Tarımsal kaynaklarımıza bakıldığında hayvancılık sektörünün kaba yem ihtiyacının en kolay ve en ucuz şekilde sağlandığı ana kaynağın çayır ve meralar olduğu görülmektedir. Ancak yapılan araştırmalar, ülkemiz yüzeyinin yaklaşık dörtte birini kaplayan bu yenilenebilir doğal kaynaklarımızın aşağı yukarı üçte ikisinin yıllardır süren bilinçsiz kullanılma sonucunda bitki örtüsünü kaybetmiş, çıplaklaşmış ve erozyona uğramış araziler olduğunu göstermektedir (TOSUN, 1996). Vejetasyonu zayıflamış verimi ve kalitesi düşük olan bu meralardan yeterli hayvansal ve bitkisel ürün almak mümkün olmamaktadır (GENÇKAN, 1983).

Diğer önemli bir kaynak olan tarla tarımında yem bitkileri yetiştiriciliği ise yeterli önemi bulamamıştır. Gelişmiş ülkelerde %20-30 civarında yapılmakta olan bu yetiştiricilik ülkemizde ancak %2-3 oranında kalmıştır.

Ülkemiz çayır meralarının yıllardır düzensiz kullanılma nedeniyle verimliliğini önemli derecede yitirmiş olması ve tarla tarımı içinde yembitkileri yetiştiriciliğinin gelişmeyişi yalnızca hayvancılığımızı olumsuz yönde etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda toprak ve su kaynaklarımızın da olumsuz yönde etkilenmesine neden olmaktadır.

Hayvancılığımızın kaba yem sorununu çözmek ve toprak ve su kaynaklarımız üzerindeki olumsuz etkiyi ortadan kaldırmak için çayır meralarımızın, uygun ıslah yöntemleri uygulanarak yeniden bol ve kaliteli yem üretir duruma getirilmeleri sağlanmalıdır. Aynı zamanda yembitkileri yetiştiriciliğini de geliştirmek gerekmektedir.

Verim kapasiteleri düşmüş çayır meraların yeniden bol ve kaliteli yem üretir hale getirilmesi için topoğrafik ve toprak özellikleri işlemeye elverişli olan meralarda meraların sürülerek, yerine bölgenin ekolojik koşullarına uyum göstermiş yembitkilerinden oluşan karışımların ekilmesi uygulanan yöntemlerden birisidir.

Bu tür ıslah çalışmalarında kullanılan yembitkisi türlerinin kullanıldığı bölgenin ekolojik koşullarına çok iyi adapte olması ve mevcut mera şartlarında kaliteli ve bol yem üretecek türler kullanılması gerekmektedir. Bunun için farklı ekolojik bölgelerimiz için uygun yembitkisi tür ve çeşitlerinin geliştirilmesi ve yeterli tohumlarının üretilmesine yönelik çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

Ülkemizin değişik bölgeleri için uygun yembitkisi tür ve çeşitlerinin ortaya konmasında, doğal vejetasyonda bulunan yabancı türler, mevcut çeşitler ve dış kaynaklı materyalden yararlanmak mümkündür. Ülkemiz birçok yembitkisinin anavatanı olması nedeniyle, yembitkisi ıslahı çalışmalarında kullanılacak yabancı yembitkisi popülasyonu açısından iyi bir kaynak oluşturmaktadır.

Yembitkisi çeşit geliştirilmesi çalışmalarında üzerinde öncelikle durulması gereken yembitkisi türü; ülkemizin doğal vejetasyonlarında yabancılarına de sık rastlanan ve geniş arazilerde olmasa da yetiştiriciliği yapılan yonca (*Medicago sativa* L.)'dır. Yonca baklagiller familyasından, Orta Asya orijinli, 60'dan fazla tür içeren geniş bir cinstir. Besleyici ot vermesi, geniş adaptasyon kabiliyeti, uzun

ömürlü olması, özellikle sulanabilen alanlarda yılda birkaç biçim alınabilmesi ve yetiştirildiği toprakların verimliliğini arttırması nedeniyle hem mera ıslahı hem de tarla tarımı içerisinde önemi büyüktür.

Bu türün, ülkemizin değişik bölgelerinin her birisi için yüksek ve kaliteli yem verecek çeşitlerinin geliştirilmesi ve bunların yeterli tohumlarının üretilmesi ülkemiz hayvancılığının kaba yem sorununun çözülmesine büyük katkı sağlayacaktır.

Çok yıllık, yabancı döllenmiş baklagil yembitkisi olan bu bitkide çeşit geliştirilmesi sentetik çeşit ıslahı yöntemiyle yapılmaktadır. Bu yöntemde; muhtelif kaynaklardan sağlanan populasyonlardan seçilen bitkiler poly-cross testi ile incelenir ve bu testler sonucu seçilen klonlar birlikte yetiştirilerek sentetik çeşit elde edilir. Ancak, her biri çok sayıdaki genler tarafından kontrol edilen kantitatif karakterlerin belirli bir çeşitte toplanması, elde edilen bu çeşitten tohum elde edilmesi ve bu tohumun üreticiye iletilmesine kadar geçen süre çok uzundur ve yoğun bir işgücü ve parayı gerektirir.

Son yıllarda diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi, yembitkilerinin ıslahında da biyoteknolojik yöntemler adı verilen tekniklerden yararlanarak, bu bitkilerin ıslah sürecinin kısaltılmasına yönelik yoğun araştırmalar sürdürülmektedir.

Biyoteknolojik yöntemler; arzu edilen genotiplerin çok kısa sürede çoğaltılmalarına, klasik yöntemlerle başarısız olan cinsler ve türler arası melezlerin elde edilmesine olanak sağlayarak, cinsler ve türler arası gen transferine, çok kısa sürede homozigot hatların elde edilmesine ve karakterleri kontrol eden genlerin gen halinde bir organizmadan izole edilerek diğer bir organizmaya aktarılmasına olanak sağlayarak, bitki ıslahında ıslah sürecinin kısaltılmasına katkıda bulunabilmektedir (HATİPOĞLU, 1999).

Biyoteknolojik yöntemler yakın zamana kadar daha çok bazı model bitkilerde uygulanabilirken, günümüzde insan ve hayvan beslenmesinde büyük öneme sahip bitkilere de uygulanabilmesi için yoğun çabalar sürmektedir. Bu araştırmalar sonucu, biyoteknolojik yöntemlerin bazıları günümüzde bazı kültür bitkilerinde başarılı bir şekilde uygulanabilmiş ve bu bitkilerin ıslah programlarında kullanılmaya başlanmıştır. Bu tekniklerin yembitkilerinde de

kullanılması amacıyla özellikle 1980'li yıllardan beri yoğun araştırmalar sürdürölmektedir. Bu araştırmalar sonucunda; Yoncada yonca mozaik virüsüne dayanıklılık geni (HILL ve ark., 1991), tavuk albumin geni (SCHROEDER ve ark., 1991) ve bezelye tohum proteini genlerinin (WANDEL ve ark., 1992) transferi ile transgenik bitkilerin elde edilmesi başarılmıştır. Korunga bitkisinde de transgenik bitkilerin elde edilmesi başarılmıştır (GOLDS ve ark., 1991). Elde edilen bu başarılı sonuçlara karşılık; kültür bitkilerinde biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması ile ilgili henüz birçok problem bulunmaktadır. Herşeyden önce, bir türün belirli bir genotipinde başarılı olmayabilmektedir. Yani; biyoteknolojik yöntemlerin uygulanmasında elde edilecek başarı genotipik bağımlılık göstermektedir. Örneğın; bir yonca genotipinde başarı ile gen transferi yapılabilmesine karşılık, diğeri bir genotipte bu başarılamamaktadır. Söz konusu genotipte bu tekniğın başarılı olabilmesi için, teknikte bu genotip için bazı uyarlamaların yapılması gerekmektedir.

Bitki ıslahında yoğun bir şekilde kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden birisi de somatik embriyogenesisdir. Vejetatif hücrelerden gelişen embriyolar somatik embriyo olarak adlandırılmaktadır.

Somatik embriyogenesis ilk defa havuç bitkisinin somatik dokularından elde edilmiştir. Genel olarak somatik embriyo üretimi için çok değışik bitki kısımları kullanılabilir. Günümüzde buğday (MAES ve ark., 1996), mısır (BRONSEMA, 1997; EMEKLIER ve ark., 1999), çeltik (OZAWA ve KOMAMINE, 1989), soya (HARTWECK ve ark., 1988), bezelye (ÖZCAN ark., 1993) ve yonca (LAI ve MCKERSIE, 1994) gibi birçok önemli kültür bitkisinde yüksek oranda somatik embriyo üreten yöntemler geliştirilmiştir.

Somatik embriyogenesis birçok bitki türünün, özellikle de orman ağaçlarının hızla klonal çoğaltılmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Teorik olarak tek bir eksplant sınırsız sayıda somatik embriyo üretebilir. Bu sınırsız üretim, anaç bitkiden alınan kısıtlı miktardaki materyale bağı olan şekilde çoğaltım karşısında çok büyük bir avantaja sahip olmaktır. Özellikle, bir çok bitki türü için geliştirilen hücre süspansiyon teknikleriyle az bir işçilikle, çok kısa bir sürede çok sayıda iyi gelişmiş embriyo elde etmek mümkün olmaktadır (PARROTT ve ark., 1993).

Somatik embriyoların dölllenme sonucunda gelişen zigotik embriyolara göre en önemli üstünlükleri genetik açılmaların olmamasıdır. Somatik embriyolar, kültüre alınan eksplantın somatik hücrelerinden gelişirler ve eksplantın alındığı bitkinin genotipini muhafaza ettirdiklerinden dolayı klon oluştururlar.

Hücre süspansiyon kültürlerinden sınırsız sayıda somatik embriyo üretilmesi araştırmacıları ticari amaçla kullanılacak mekanik ve otomatik kültür sistemlerinin geliştirilmesine yöneltmiştir. Somatik embriyo kültürleri, bitkilerin hızlı çoğaltılması yanında diğer bazı önemli özellikleri de taşımaktadırlar (PARROT ve ark., 1993). Somatik embriyogenesis yoluyla oluşan ürün bir embriyo olup, tohum içerisinde bulunan embriyonun bir benzeridir. Daha da önemlisi somatik embriyolar tam bir bitki oluşturabilme programına da sahiptirler. Bu yüzden somatik embriyolar kaplanmış tohum olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler.

Somatik embriyoların sentetik tohum olarak kullanımı büyük bir ekonomik öneme sahip olabilir. Somatik embriyolar bitkinin somatik hücrelerinden geliştikleri için zigotik embriyolardaki açılmalar olmamakta ve somatik embriyolardan elde edilen sentetik tohumlardan çoğaltma, klonal çoğaltım şeklinde olmaktadır. Ülkemizde de yembitkileri ıslahında açıklanan biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılabilmesi için, yembitkisi türlerinde bu tekniklerin uygulama prensiplerinin saptanmasına yönelik araştırmaların yapılması gerekmektedir. Bu gereksinim çerçevesinde planlanan bu araştırmada, yoncada (*Medicago sativa* L.) biyoteknolojik yöntemlerin özellikle de somatik embriyoların kaplanması ile oluşturulan suni tohum elde etme uygulamasının temellerini oluşturmak üzere, değişik *in vitro* çoğaltma teknikleri ve somatik embriyo üretme olanakları araştırılmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

SAUNDERS ve BINGHAM (1972), yoncada olgunlaşmamış anter, ovarı, kotiledon, boğum araları ve hipokotil segmentlerinden, BLAYDES (1996) ortamında kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu gerçekleştirdiklerini, en yüksek rejenerasyonun  $100 \text{ mg l}^{-1}$  inositol ve  $2 \text{ mg l}^{-1}$  yeast ekstraktı kombinasyonu ile sağlanırken, kallusların bitkiye dönüşümünün bitki büyüme düzenleyicisi tipi ve kombinasyonlarına, ayrıca donör bitkinin tipine bağlı olarak gerçekleştiğini ve elde edilen tüm rejeneratların donör bitkiler gibi tetraploid olduklarını bildirmişlerdir.

BINGHAM ve ark. (1975), steril koşullarda çimlendirilmiş yonca fidelerinden 3-5 mm uzunluğunda hipokotil segmentlerini izole ederek,  $2 \text{ mg l}^{-1}$  kinetin,  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA ve  $2 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D içeren yarı katı Blaydes ortamında kültür ettiklerini, 28 gün sonunda oluşan kallusları,  $100 \text{ mg l}^{-1}$  inositol ve  $2 \text{ g l}^{-1}$  difco Bacto yeast ekstraktı içeren BLAYDES (1996) ortamına transfer ettiklerini, bir aylık bir süre sonunda sürgün vermeye başlayan kallusları aynı ortamda alt kültüre aldıklarını ve bu ortamda 2-4 hafta sonrasında köklü bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

WALKER ve SATO (1981), ortam bileşimindeki amonyum iyonların *in vitro*'da yonca morfolojisi üzerinde kritik bir etkiye sahip olduğunu, somatik embriyo üretimi için minimum  $12.5 \text{ mM NH}_4^+$  iyonuna ihtiyaç duyulurken, kök teşekkülünün  $50 \text{ mM}$  ve üzerindeki dozlarda engellendiğini ve sürgünlerin  $\text{NH}_4^+$  bulunmayan ortamlara aktarılma durumunda kök gelişiminin başladığını, bu nedenle *in vitro* gelişimin seyri üzerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin tek başlarına değil  $\text{NH}_4^+$  ile birlikte bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

MCKAY ve WALKER (1984), yoncada hücre ve dokulardan ilk bitki rejenerasyonunun 1972 yılında SAUNDERS ve BINGHAM tarafından gerçekleştirildiğini, *in-vitro* koşullarda yonca doku ve hücrelerinden somatik embriyogenensis yoluyla bitki rejenerasyonunda; ortama ilave edilen oksinin yapısal kalite ve kantitesi, ortama ilave edilen oksinin konsantrasyonu ve



rejenerasyon ortamının düşük azot içermesi gibi üç faktörün etkili olduğu bildirilmektedir.

MROGINSKI ve KARTHA (1984), yonca sürgün uçlarından bitki rejenerasyonu için en uygun ortamın 0.2 mg l<sup>-1</sup> NAA içeren B5 ortamı olduğunu, sürgün uçlarından bitki rejenerasyon frekansını etkileyen en önemli faktörün, sürgün ucunun büyüklüğü olduğunu, 2-4 mm uzunluğundaki sürgün uçları kültüre alındığında bunların %80'inden rejenerat elde edildiğini bildirmektedirler.

BROWN ve ATANASSOV (1985), farklı yonca türlerine ait 76 genotipi kallus ve somatik embriyo üretim kapasiteleri açısından kıyasladıkları çalışmalarında, stolonlu kök yapısına sahip yonca türlerinden *Medicago falcata*'ya ait genotiplerin bu özellikler bakımından diğer türlere kıyasla daha üstün bir performans gösterdiğini, yüksek embriyogenik kapasiteli genotiplerde bitkiye dönüşüm oranının da yüksek olduğunu saptamışlardır.

BAUCHAN (1987), *Medicago sativa* türüne ait çeşitlerde önemli zararlara yol açan bazı zararlıların, kendine döllek ve tek yıllık yoncalardan olan *M. scutellata* türünde gövde ve yapraklarındaki tüyler dolayısıyla zarara yol açmadığını, bu özelliğin *M. sativa*'ya aktarılması çalışmalarında uyumsuzluk dolayısıyla embriyo ölümlerinin gözlemlendiği bildirmiştir. Araştırmacı, döllemeden sonraki günlerde, her iki türe ait globular, kalp ve torpedo, dönemlerindeki embriyoları izole ederek, farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, IAA, BAP ve Kinetin içeren MS ile L-glutamin ve L-prolin içeren SH ortamlarında kültür etmiş, *M. scutellata* türüne ait kalp ve torpedo dönemlerindeki embriyoların 0.05 mg/l IAA ve BAP içeren MS ortamında 15-30 gün içerisinde bitkiye dönüştüklerini, *M. sativa* türünde ise en yüksek tepkimenin 50 mM L-glutamin ilave edilmiş SH ortamında sağlandığını ve hem sürgün hem de kök gelişiminin aynı ortamda gerçekleştiğini tespit etmiştir.

MEIJER ve BROWN (1987), yonca *in vitro* kültüründe indüksiyon ortamında embriyo teşekkülü için 5 mM amonyumun mutlak gerekli olduğunu, 10-20 mM düzeyinde amonyumun ise embriyoların sürgüne dönüşümünde optimum doz olarak gözlemlendiğini, ortamdaki amino asitlerin ise embriyo-sürgün dönüşümünde olumsuz etki gösterebildiğini, ancak 1-2 mg l<sup>-1</sup> casein hidrolizat

veya 4.4 mM glutamin ve 3.1 mM prolin kombinasyonlarının olumsuz etkilerinin olmadığını saptamışlardır. Araştırmacılar düşük ya da yüksek şeker konsantrasyonlarının somatik embriyogenesi engelleyici etkisinin olduğunu, bu nedenle de doku kültürü çalışmalarında genelde %3 sakkaroz konsantrasyonunun kullanıldığını bildirmişlerdir.

WAN ve ark. (1988), tetraploid yonca (*Medicago sativa* L.)'da bitki rejenerasyonunun genetik mekanizmasını ortaya koymak amacı ile yürüttükleri çalışmalarında, toplam 72 bitkiden oluşan 7 genotipi test ettiklerini, bunlardan 4'ünün rejenerasyon kabiliyetinin yüksek, 3'ünün ise rejenerasyon olmayan genotiplerden oluştuğunu, yoncada petiollerden rejenerasyonun Rn3 ve Rn4 tamamlayıcı genlerinin etkisi altında olduğunu, genlerin miktarlarının da rejenerasyonun etkinliği üzerinde önemli role sahip olduğunu ve kallus indüksiyonu ile kallus rejenerasyonunun sitoplazmik faktörlerden etkilendiğini bildirmektedirler.

HERNANDEZ-FERNANDEZ ve CHRISTIE (1989), yoncada somatik embriyogenik kapasitenin 2 gen lokusu tarafından kontrol edildiğini ve bunların tekrarlamalı seleksiyon veya geriye melezleme ile istenilen bireyde toplanmasının oldukça kolay olduğunu bildirmişlerdir.

NOLAN ve ark. (1989), bir yıllık yoncalardan olan *Medicago truncatula* türüne ait bitkilerden, 2-5 mm boyutlarındaki yaprak eksplantlarını farklı bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonları içeren B5 ortamında 4 aşamalı olarak kültür ettiklerini, elde ettikleri rejeneratlardan aldıkları yaprak eksplantları ile aynı protokolü tekrarladıklarını, 1. uygulamada oluşan kallusların % 11'i ortalama 0.12 adet embriyo oluştururken, 2. uygulamada % 93 oranında kallusun ortalama 33.5 embriyo ürettiğini, bu nedenle rejenerasyon olmuş bitkilerin donör olarak kullanılmasının somatik embriyogenesis açısından daha etkili bir yöntem olduğunu bildirmişleridir.

ANANDARAJAH ve MCKERSIE (1990), yonca somatik embriyolarından elde edilen fidelerin, tohumdan oluşanlara kıyasla daha zayıf olduklarını, bunları güçlendirmek amacı ile embriyo geliştirme ve olgunlaştırma ortamlarında şeker konsantrasyonlarını % 3'den % 6'ya çıkardıklarını ancak embriyo kalitesi

artarken sayısında azalma meydana geldiğini, maltoz'un ise gelişme ortamında sakkaroz'a kıyasla daha olumlu sonuçlar verdiğini saptamışlardır.

ARCIONI ve ark. (1990), biyoteknolojik yöntemlerin oldukça büyük kazanımlar sağlayıp, klasik yonca ıslahına alternatif bir çizgi sunabileceğini, somoklonal varyasyonla hastalık ve stres koşullarına dayanıklı hatlar seçilebilirken, protoplast füzyonu ve embriyo kültürü ile uyumsuzluk engelinin aşılabilirliğini, olgun ya da olgunlaşmamış eksplantların kullanımı ile, donör bitkilerin kısa sürede çoğaltımının sağlanabileceğini bildirmektedirler.

SUN ve ark. (1991), *Medicago sativa* bitkisinin petiollerini ya da steril filizlerinin hipokotillerini 2,4-D ve kinetin içeren katı B5h ortamında kültüre alarak bol miktarda embriyogenik kalluslar ürettiklerini, 2,4-D içeren B5g sıvı süspansiyon ortamında kaluslardan somatik embriyolar meydana geldiğini, L-prolin, amonyum sülfat ve potasyum nitrat içeren aynı ortamda somatik embriyoları alt kültüre aldıklarını, somatik embriyolardan % 3 sakkaroz, maya ekstraktı ve askorbik asit içeren ½ SH ortamında 20. günde % 96 oranında bitkiye dönüşüm gözlendiğini, toprağa aktarılan bitkilerin ise % 80 oranında yaşadığını gözlemişlerdir.

DENCHEV ve ark. (1991), *Medicago sativa* ve *M. falcata* türlerine ait bitkilerden izole ettikleri yaprak parçacıklarını sıvı B5 ortamında kültür ettikleri çalışmalarında, ortama PEG ilavesinin oluşan embriyoların globular dönemden torpedo safhasına geçişlerini teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

KIELLY ve BOWLEY (1992), embriyonik kapasitesi yüksek ve embriyogenik olmayan yonca genotipleri arasında yaptığı melezleme neticesinde, somatik embriyogenesisin dominant bir karakter olduğunu ve iki gen lokusu tarafından kontrol edildiğini saptamışlardır.

MCELROY ve BROWN (1992), herhangi bir bitkinin *in vitro* rejenerasyonundan köklendirilip toprağa aktarılmasına kadar geçen sürenin oldukça yoğun bir işgücü gerektirdiğini ve her bir aşamada kayıpların söz konusu olduğunu, ayrıca en yoğun kayıpların toprağa aktarma aşamasında gözlendiğini bildirerek, yaptıkları çalışmalarında, yonca petiol eksplantlarından somatik embriyolar elde ettiklerini, oluşan embriyoları, en altına kum üzerine kağıt katman

ve en üste de agar ile katılaştırılmış besi ortamı enjekte edilmiş olan büyütme şişelerinde kültür ettiklerini, sürgün ve kök gelişiminin oldukça iyi bir şekilde ve birlikte teşekkül ettiğini ve bitkilerin direk bu ortamdan saksıya alındıklarını bildirmişlerdir.

NODALSKA (1992), *Lupinus angustifolia*, *L. albus* ve *L. mutabilis* türlerinde olgunlaşmamış kotiledonlardan somatik embriyolar elde ettiklerini ancak *L. luteus* türüne ait bitkilerde bunun gerçekleşmediğini, farklı besi ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerini birincil ve ikincil besi ortamlarında denediğini, en iyi sonucun B5 ortamında  $5 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D'nin tek veya  $0.25 \text{ mg l}^{-1}$  kinetin ile birlikte kullanılması durumunda sağlandığını, ABA ve yüksek oranda  $\text{NH}_4.\text{NO}_3$  içeren ortamlarda olgun somatik embriyolar elde ettiğini embriyo çimlenmesi ve gelişiminin MS ortamında glutamin veya  $\text{GA}_3$  ilavesiyle sağlandığını belirlemişlerdir.

PUPILLI ve ark. (1992), farklı gelişme dönemlerindeki yonca bitkilerine ait, bitkinin değişik yerlerindeki boğum eksplantlarını kültüre aldıkları çalışmalarında, her bir boğumdan tek bir sürgün elde ettiklerini, sürgün gelişiminin  $\text{N}_6$ -isopentenyladenin tarafından teşvik edildiğini bildirirken, donör bitkinin yaşı ya da boğum eksplantının bitkideki pozisyonunun sürgün gelişimi üzerinde etkili olmadığını saptamışlardır.

ROY ve ark. (1992), adi mürdümük (*Lathyrus sativus*) kök eksplantlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında, kallus ve sürgün gelişiminin sadece  $10.7 \mu\text{M}$  NAA ve kallus aşamasında kinetinin artırılan konsantrasyonlarının (14 gün  $0.9 \mu\text{M}$  ve 18 gün  $1.4 \mu\text{M}$ ) bulunduğu MS besi ortamında elde edilebildiğini, oluşan sürgünlerin  $0.5 \mu\text{M}$  IBA ilave edilmiş  $\frac{1}{2}$  MS ortamında köklendirildiklerini ve sürgün eldesinin yıl boyu devam ettiğini, ancak rejenerasyonu sağlayan bitki büyüme düzenleyicilerinin çok spesifik ve sınırlı olduğunu bildirmişlerdir.

LIU ve ark. (1993), *Medicago sativa*'nın kotiledon ve hipokotil segmentlerini  $2 \text{ mg l}^{-1}$  kinetin ve  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D eklenen LS ortamında kültüre alarak kallus ürettiklerini, embriyoidlerin süspansiyon kültürde meydana geldiğini, adventif kök ve sürgünlerin farklılaşmış ortamda üretildiğini ve embriyogenesis ve organogenesisin farklı aşamalarında toplam çözülebilir proteinlerin SDS-

PAGE ile ayrılarak çıkarıldığını, farklılaşmış kök ve sürgünlerde MW ile proteinlerin sırasıyla 80 ve 110 kDa çıktığını bildirmişlerdir.

HAMMAD ve PICCIONI (1993), iki yonca varyetesinde eksplant tipi ve ortam içeriğinin somatik embriyogenesis ve kallus üretiminde etkisini araştırmışlardır. *Medicago sativa* Eguipe ve Borel çeşitlerinin 7 günlük filizlerinin yaprak, kök ve sürgün parçalarını, 6 farklı kültür ortamına koyduklarını, tüm ortamlarda kallus oluştuğu fakat, embriyo oluşumu için prolin ve glutamin gerektiğini bildirmişlerdir.

ÖZCAN ve ark. (1993), Bezelye (*Pisum sativum* L.)’de hızlı bir sürgün gelişimi ve somatik embriyogenesis temini sağlamak amacı ile yaptıkları çalışmalarında kotiledon boyutu ve explantın besi ortamı üzerine yerleşiminin fide gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu, en yüksek rejenerasyonun 7-8 mm uzunluğundaki yeşilimsi kotiledonların kesik uçlarının ortamlarla temas ettirilmesi durumunda elde edildiğini, fidelerin % 80-90 oranında köklendiğini ve normal fertil bitkiler oluşturduklarını, değiştirilmiş MS ortamı içerisinde yüksek NAA (27-215 $\mu$ M) ve 2,4-D (23-181 $\mu$ M) konsantrasyonlarında olgunlaşmamış kotiledonların kültür edilmeleri durumunda somatik embriyolar oluştuğunu saptamışlardır.

PARROTT ve BAILEY (1993), 10.74  $\mu$ M  $\alpha$ -naftalen asetik asit, 11.42  $\mu$ M indole-3-asetik asit, ve 9.29  $\mu$ M kinetin ilavesi ile hazırlanmış Blaydes ortamında kültür edilen yaprak, petiol ve boğum arası eksplantlarından elde edilmiş 300 yonca genotipine ait kallus kültürlerinin B5 vitaminleri ile takviye edilmiş hormonsuz MS ortamında kallus fazı olmaksızın yeni somatik embriyoların meydana geldiğini, ortamdan şekerin çıkarılması durumunda yeni embriyo oluşumunun gerçekleşmediği ve glukoz, maltoz ve fruktoz’un sakkarozla kıyasla daha etkin ikincil embriyo oluşumu sağladığını, ortamda sakkaroz var iken Nikotinik asit’in olmamasının somatik embriyo için ölümcül etki gösterdiğini saptamışlardır.

YU ve PAULS (1993), yoncada somatik embriyogenesisi kontrol eden genlere bağlı RAPD markörlerini tanımlamak amacı ile embriyogenik ve embriyogenik olmayan genotiplerle yapılan melezlerden elde edilen F1

popülasyonunda yürüttükleri çalışmalarında, somatik embriyogenesis ile alakalı polimorfik bantlar elde ettiklerini, somatik embriyogenesis'in 2 dominant tamamlayıcı gen tarafından kontrol edildiğini ve markör'ün A lokusuna bağlandığını belirlemişlerdir.

KRAIC ve ark. (1994), *Medicago sativa* cv. Lucia'nın yaprak, petiol ve sap segmentlerinden GMK ortamında (temel B5 ortamı + 8 mg kinetin + 8 mg 2,4-D, 0.5 mg NAA l<sup>-1</sup>) kallus indüksiyonu gerçekleştirdiğini, B5 ortamı + 0.2 mg l<sup>-1</sup> benzil adenin fosfat ile oluşturulan GMR ortamında kalluslarda morfogenez meydana geldiğini, yeşil globular yapıdaki kalluslardan sürgünler ve kökler ya da yalnızca sürgünlerin oluştuğunu gözlemiş ve GMR köklenme ortamının köklenmeyi teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

DAVEY ve ark. (1994), KARTHA ve GAMBORG (1968)'un 0.2-0.3 mm çapındaki bezelye meristemlerini BAP ve NAA içeren B5 ortamında kültüre alarak, baklagillerde ilk başarılı *in vitro* çoğaltmayı gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.

LAI ve ark. (1994 a), yonca tohumlarına kıyasla somatik embriyolarının farklı karbonhidratlarını bünyelerinde biriktirdiklerini, olgun somatik embriyo kalitesinin fide gelişimi üzerinde belirleyici olduğunu, embriyo boyutları, depo proteinleri ve serbest amino asit miktarı ile aralarında korelasyon olduğu ancak nişasta ile bulunmadığını saptamışlardır.

LAI ve ark. (1994 b), oluşan fidelerin zayıf olmasının yoncada suni tohum teknolojisinin kullanımını sınırlandırıcı bir faktör olduğunu, yavaş büyüme ve gelişmenin depo proteinlerinin somatik embriyoda birikiminin az olmasından kaynaklanabileceğini bildirerek yaptıkları çalışmalarında, sülfürün somatik embriyo gelişmesinde önemli bir bileşen olduğunu tespit etmişlerdir.

KEPCZYNKI ve ark. (1995), *Medicago sativa* L. türünde somatik embriyogenesis üzerine Ja-Me (metil jasmonate) ve ABA (absisik asit)'nin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, SH besi ortamında petiol eksplantlarını kültür ettiklerini, ortama ilave edilen Ja-Me ve ABA'nın *Medicago sativa*'da somatik embriyogenesis ve kallus gelişimini engellediğini saptamışlardır.

RAMOGLONI ve ark. (1996), pampenea isimli bir yonca çeşidinden elde edilen R11 genotipinde yaprak segmentlerini 6 farklı ortamda kültür ettiklerini, somatik embriyo üretimi açısından en iyi uygulamanın, ekplantların 10 $\mu$ M 2,4-D ve 4,6  $\mu$ M kinetin ilave edilmiş MS besi ortamında kültür edilmeleri sonrasında 10-20 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ve 30 mM prolin içeren MS ortamına transfer etmek olduğunu, bu şekilde yaptıkları uygulama neticesinde petri başına 500'ün üzerinde somatik embriyo elde ettiklerini ve oluşan somatik embriyolardan MS veya ½ MS ortamında, donör bitkilerden farklılık göstermeyen rejeneratlar elde ettiklerini bildirmektedirler.

ÖZCAN ve ark. (1996), Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.)'da olgunlaşmamış kotiledon ve embriyo taslaklarını, çeşitli konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS ortamında kültür ettiklerini ve en yüksek bitki rejenerasyonunun 0.5 mg l<sup>-1</sup> BAP ve 2 mg l<sup>-1</sup> NAA içeren ortamındaki kallus oluşumundan sonra gerçekleştiğini, olgunlaşmamış embriyo taslaklarının kotiledonlardan daha yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğunu bununla beraber fide uzamasının en iyi kotiledonlardan elde edildiğini, rejenere olan sürgünleri ½ MS ortamında 1 mg l<sup>-1</sup> IBA veya 1 mg l<sup>-1</sup> NAA ilavesiyle köklendirdiklerini bildirmişlerdir.

ÖZGEN ve ark. (1997), *in vitro* koşullarda yonca (*Medicago sativa* L.) çeşitlerinin hızlı çoğaltımı için yaptıkları çalışmada, "Elçi" ve "Mesa-Sirsa" yonca çeşitlerinde çimlendirme ile elde edilen fidelerden alınan sapçıklarda, *in vitro* koşullarda sürgün oluşumu sağladıklarını bildirmişlerdir. Sapçıkların farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren MS ortamında büyütüldüğü, sürgün sayısının, "Elçi" çeşidinde en fazla 2 mg l<sup>-1</sup> BAP ve 0.2 mg l<sup>-1</sup> NAA; "Mesa-Sirsa" çeşidinde ise, 1 mg l<sup>-1</sup> BAP ve 0.2 mg l<sup>-1</sup> NAA içeren kültür ortamlarında olduğu belirtilmiştir. Her iki çeşitte de, ortalama sap uzunluğunun 2 mg l<sup>-1</sup> BAP ve 0.2 mg l<sup>-1</sup> NAA içeren kültür ortamında önemli bir şekilde daha fazla elde edildiğini, kültür ortamına ilave edilen IBA oranının artırılması ile köklenme miktarının % 80-90 oranına ulaştığı ve çeşitlerde farklı IBA konsantrasyonlarının her bir sürgünde oluşan kök sayısını önemli miktarda etkilediği, fakat her bir sürgünde oluşan kök uzunluğunda IBA konsantrasyonlarının bir etkisi olmadığı

bildirilmiştir. Bununla beraber, “Elçi” çeşidinin her bir kök uzunluğunun “Mesa-Sirsa” çeşidinden daha fazla bulunduğu ve kültür ortamında üretilen sürgünlerde somatik kromozom sayılarının değişmediğini gözlemişlerdir.

ZAGORSKA ve ark. (1997), yoncada anter kültürü yolu ile haploid bireyler elde etmenin çok zor olduğunu belirttikleri çalışmalarında, çok sayıda genotip, ortam ve 30’un üzerinde hormon kombinasyonu denediklerini, en yüksek kallus indüksiyonunun (%76) Blaydes ortamında 9.29  $\mu\text{M}$  kinetin, 9.05  $\mu\text{M}$  2,4-D, 10.74  $\mu\text{M}$  NAA kombinasyonu ile sağlandığını, yine Blaydes ortamında ve 2  $\text{mg l}^{-1}$  zeatin, 500  $\text{mg l}^{-1}$  inositol ve 2  $\text{mg l}^{-1}$  yeast ekstraktı ilavesi ile, % 15.2-12.8 oranlarında rejenere olan bitkilerde haploid, dihaploid ve mixoploid bireylere rastlandığını bildirmişlerdir.

MCLEAN ve NOWAK (1998), çayır üçgülünde somatik embriyogenesis’in kalıtımı ile ilgili yürüttükleri çalışmalarında, hipokotil eksplantından elde edilen bitkiciklerin epikotil orijinlilere kıyasla oldukça yüksek *in vitro* rejenerasyon kabiliyetine sahip olduklarını, bunlar arasında yapılan melezlemeler sonucunda F1, F2 ve BC1 popülasyonlarında yaptıkları incelemelerde rejenerasyon kabiliyetinin 2 tamamlayıcı genin kontrolünde olduğunu saptamışlardır.

KIM ve ark. (1999), dört farklı yonca çeşidinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için yaptıkları çalışmada bu dört kültür arasında Vernal cinsinde bitki rejenerasyonu ve kallus formasyonunun yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca SH, MS ve N6 ortamlarından SH ortamının bitki rejenerasyonu ve kallus formasyonu için en uygun ortam olduğunu, kallus oluşumu için SH besi ortamına 3  $\text{mg l}^{-1}$  2,4-D eklendiğini bildirmişlerdir.

LAKSHMANAN ve TAJI (2000), inceledikleri baklagillerin büyük çoğunluğunda chlorophenoxyasetik asit ve thidiazuron gibi yeni büyüme düzenleyicilerinin somatik emriyolardan yüksek oranda direk rejenerasyon elde edilmesi konusunda büyük avantajlar sağlayabildiğini, ancak düşük orandaki embriyo üretimi, çimlenme ve somatik embriyodan bitkiye dönüşümün zayıf olması ile yüksek orandaki somaklonal varyasyonların halen baklagillerde somatik embriyogenesisin kullanımını kısıtlayıcı faktörler olduğunu bildirmişlerdir.



ÇELİKTAŞ (2001), *Onobrychis sativa* L. bitkisinde genotip, eksplant, oksin ve sitokinin çeşit ve konsantrasyonlarının *in vitro* rejenerasyon üzerindeki etkilerini incelediği çalışmasında, incelenen tüm özellikler açısından sürgün ucunun en etkin eksplant kaynağı olduğunu, kallus indüksiyonu açısından  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D en etkin bulunurken, sürgün oluşumu açısından  $1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $0.3 \text{ mg l}^{-1}$  BAP kombinasyonunun optimum olduğunu,  $2 \text{ mg l}^{-1}$  IBA'nın ise köklendirme için ideal bulunduğunu bildirmiştir.

NEVES ve ark. (2001), farklı *Medicago truncatula* genotiplerinin *in vitro* muhafazası amacı ile  $9.3 \text{ } \mu\text{M}$  zeatin,  $2.22 \text{ } \mu\text{M}$  BAP ya da  $4.5 \text{ } \mu\text{M}$  thidiazuron eklenen MS ortamında kotiledonlardan sürgün çoğaltmışlar, çoğaltılan sürgünleri büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamda geliştirmişlerdir. Mikro sürgünlerin köklenmesinin kullanılan sitokinine bağlı olduğunu ve köklerin zeatin muamelesine dayanıklı olduğunu saptamışlardır.

GALLEGO ve ark. (2001), *Medicago arborea*'nın somatik embriyolarının verimli üretimi için kotiledon, hipokotil, petiol ve yaprak gibi eksplantlar kullanılarak etkili bir bitki rejenerasyon sistemi geliştirmişlerdir. Kullanılan en uygun somatik embriyogenesis kaynağının iki basamaklı bir protokol olduğu saptanmıştır. Eksplantlar 16 saat fotoperiyotta iki ay  $9 \text{ } \mu\text{M}$  kinetin ve  $9 \text{ } \mu\text{M}$  2,4-D içeren MS ortamında inkübe edilmiş, bunu takiben  $2.25 \text{ } \mu\text{M}$  2,4-D içeren kinetinsiz MS ortamına transfer edilmişlerdir. Kültürün ikinci basamağında oksin miktarını azaltmanın ( $2.25 \text{ } \mu\text{M}$ ) ve sitokinin yerini değiştirmenin somatik embriyo üretiminin artırılmasında uygun olmadığı belirtilmiştir. En iyi eksplantın kotiledon ve petioller olduğu tespit edilmiştir (petiol kültüründe 3 ayda somatik embriyoların oluşum miktarı  $18 \pm 0.70$  arasındadır). Somatik embriyolar  $5 \text{ } \mu\text{M}$  indolbutirik asit içeren temel MS ortamında kültüre alındıkları zaman normal bitkicikler oluştuğunu ( $8 \pm \%0.89$ ), kültür ortamında thidiazuron kullanıldığı zaman somatik embriyo oluşmadığı saptanmıştır.  $2.25 \text{ } \mu\text{M}$  2,4-D'nin konsantrasyonu azaltıldığında ve ortamdaki BA uzaklaştırıldığında petiol eksplantı ve BA kullanıldığında kültürün ikinci aşamasında embriyogenesisin gerçekleştiği belirtilmiştir.

TIAN ve ark. (2002), embriyogenik kallusların B5h ve SH4K olmak üzere iki indüksiyon ortamında meydana geldiğini belirtmişlerdir B5 ortamında meydana gelen ve muhafaza edilen kalluslar alt kültür süresince embriyogenik kapasitelerini çabuk kaybederlerken, SH4K ortamında muhafaza süresince kallus yığınları düzgün bir büyüme göstermiştir. SH4K ortamında oluşan embriyolar yüksek çimlenme göstermiştir ve gelişen embriyolardan normal ve tam fertil bitkiler meydana gelmiştir.

RUDUS ve ark. (2002), gibberellin biyosentezini engelleyen içsel GA<sub>3</sub> (Giberellik asit) ve paclobutrozolun'un *Medicago sativa* L.'nin petiollerinden kallus ve somatik embriyogenesis oluşumu üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, GA<sub>3</sub>'ün somatik embriyo miktarını artırırken kallus ağırlığını ise azalttığı belirtilmiştir. Somatik embriyo üretiminin indüksiyon ortamından farklılaşmada içsel GA<sub>3</sub>'ün varlığıyla daha da arttığı gözlenmiştir. Farklılaşma yada indüksiyon ortamına paclobutrazolun katılması embriyo üretimi ve kallus gelişimini engellemiştir. Kallus indüksiyonu ve gelişimi için içsel gibberellin seviyesinin yeterli olduğu bununla beraber özellikle embriyoların farklılaşması için yeterli olmadığı bildirilmiştir.

MANDAL ve GUPTA (2003), aspir bitkisinde kotiledon explantlarından somatik embriyogenesis oluşumuna oksin çeşidi ve konsantrasyonlarının etkisini inceledikleri çalışmada embriyogenik frekansın oksin konsantrasyonuna ve tipine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. 10.74 µM (2 mg l<sup>-1</sup>) NAA'in yüksek somatik embriyo miktarı için optimum olduğu, 5.37µM (1 mg l<sup>-1</sup>) NAA+2,22 µM (0,5 mg l<sup>-1</sup>) BA ile kotiledon eksplantından somatik embriyo gelişiminin maksimum miktarda olduğu belirtilmiştir. Histolojik çalışmalarda, kotiledonun adaksial epidermisinden somatik embriyoların tek hücre orijinli geliştiği saptanmıştır.

MOHAMED ve ark. (2004), *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. bitkisinin süspansiyon kültüründe somatik embriyogenesis vasıtasıyla bitkilerin *in vitro* rejenerasyonunu sağladıkları çalışmada, embriyogenik kallusların 9 µM 2,4-D içeren katı MS ortamında yaprak segmentlerinden meydana geldiğini ve bu embriyogenik kallusların 2,4-D içeren sıvı MS ortamına aktırıldıklarında somatik embriyoların farklılaştığını bildirmişlerdir. 7.9 µM 2,4-D eklenen MS ortamında

somatik embriyoların maksimum frekansa (%33.2) ulaştıklarını gözlemişlerdir. Kotiledon-torpedo biçimli embriyolar çimlenme ve olgunlaşma için büyüme düzenleyicisi içermeyen sıvı MS ortamına aktarıldıkları ve bunların yaklaşık %5'inin çimlendiği, ayrıca katı MS ortamında daha fazla geliştikleri, aynı zamanda somatik embriyoların indüksiyonunda ve çimlenmesinde oksin, sitokinin, karbonhidrat, aminoasit varyasyonlarının etkili olduğunu, ortama eklenen 7.9  $\mu\text{M}$  2,4-D, % 3 sukroz, 4 mg/l glutamin ve 1 $\mu\text{M}$  absisik asitin yüksek frekansda somatik embriyo eldesinde ve aynı zamanda gelişimde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

### **3. MATERYAL VE METOT**

Farklı oksin çeşitleri kullanılarak yonca'da somatik embriyolar üretmek amacıyla, 2003-2005 yılları arasında yürütülen bu araştırma, Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür.

#### **3.1. Materyal**

Araştırmada somatik embriyo elde edebilmek amacı ile laboratuvarında *in vitro* fide (donor bitki olarak kullanılmak üzere) yetiştirmek için çimlendirilen Elçi yonca (*Medicago sativa* L.) çeşidine ait tohumlar, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Döner Sermaye İşletmesinin 2003 yılı ürününden temin edilmiştir.

#### **3.2. Metot**

##### **3.2.1. Donor Bitkilerin Yetiştirilmesi**

Elçi yonca çeşidine ait tohumlar arasından sağlıklı olanlar seçilerek yüzey sterilizasyonları yapılmış ve büyüme düzenleyicisi içermeyen MS (MURASHIGE ve SKOOG, 1962) besi ortamında çimlendirilmiştir.

##### **3.2.2. Deneme Planı**

Araştırmada; temel besi ortamı olarak SCHENK & HILDEBRANDT (1972) ortamı (SH) kullanılmıştır. Bu ortamda dört farklı oksin çeşidi; 2,4-D (2,4 Diklorofenoksi asetik asit), NAA (naftalen asetik asit), pikloram (4- amino-3,5,6-trikloropiklonik asit) ve dicamba (3,6 dikloro-2metoksibenzoikasit)'nın yonca bitkisinde hipokotil ve kotiledon segmentlerinden kallus ve somatik embriyo oluşumuna etkisi incelenmiştir.

Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre düzenlenmiş olup, ana parselleri oksin çeşitleri oluşturmuştur. Her uygulama kombinasyonu on kez tekrarlanmıştır.

### **3.2.3. Kullanılan Besi Ortamları ve Besi Ortamının Hazırlaması**

#### **3.2.3.1. *In vitro* Fide Yetiştirme Ortamı**

Araştırmada kullanılacak olan donör bitkileri yetiştirmek amacı ile Elçi yoncası tohumları büyüme düzenleyicisi içermeyen MURASHIGE ve SKOOG (1962) besi ortamına ekilmiştir. Bu ortamın içeriği Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

#### **3.2.3.2. Kallus İndüksiyon Ortamı**

Araştırmada elde edilen fidelerden izole edilen eksplantlar, temel besi ortamı olarak kullanılan SCHENK & HILDEBRANDT (1972) ortamında kültür edilmişlerdir. Bu ortamın içeriği Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

#### **3.2.3.3. Sıvı Süspansiyon Kültür Ortamı**

SH besi ortamında elde edilen embriyogenik kalluslar somatik embriyo oluşumunu teşvik etmek amacı ile B5 (GAMBORG et. al, 1968) ortamında kültür edilmişlerdir. Bu ortamın içeriği Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

#### **3.2.3.4. Embriyo Geliştirme Ortamı**

Sıvı süspansiyon kültürleri içerisinde oluşan pro-embriyogenik yapılar büyüme düzenleyicisi içermeyen BOİ2Y (BINGHAM et al., 1975) embriyo geliştirme ortamına aktarılmıştır. Bu ortamın bileşimi Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 *In vitro* Fide Yetiştirme Amacı ile Kullanılan MS Besi Ortamının Bileşimi

<b>Makro Elementler</b>	<b>Konsantrasyon (mg l<sup>-1</sup>)</b>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
<b>Mikro elementler</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	15.6
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025
KI	0.83
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
<b>Organik Maddeler</b>	
Thiamine HCl	0.1
Pyridoxine HCl	0.5
Nikotinik asit	0.5
Myo-inositol	100
Sakkaroz	30000
Agar	8000
pH	5.8

Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan SH Kallus İndüksiyon Ortamının Bileşimi

<b>Makro Elementler</b>	<b>Konsantrasyon (mg l<sup>-1</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300
KNO <sub>3</sub>	2500
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	200
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	400
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4350
<b>Mikro elementler</b>	
KI	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.1
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.2
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1
Na <sub>2</sub> EDTA	20
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	15
<b>Vitaminler</b>	
Myo- inositol	200
Nikotinik asit	5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	5
<b>Oksin</b>	
2,4-D/ NAA/ Dicamba/ Picloram	1
<b>Sitokinin</b>	
Kinetin	0.2
<b>Diğer</b>	
Sakkaroz	30000
Agar	6000
pH	5.8

Çizelge 3.3. Araştırmada Kullanılan B5 Sıvı Süspansiyon Kültür Ortamının Bileşimi

<b>Makro Elementler</b>	<b>Konsantrasyon (mg l<sup>-1</sup>)</b>
KNO <sub>3</sub>	2500
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	150
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	250
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	150
<b>Mikro elementler</b>	
KI	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025
NaFe EDTA	43
<b>Vitaminler</b>	
Myo-inositol	100
Nikotinik asit	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10
<b>Oksin</b>	
2,4-D/ NAA/ Dicamba/ Picloram	1
<b>Diğer</b>	
Sakkaroz	20000
pH	5.5



Çizelge 3.4. Araştırmada Kullanılan BOİ2Y Embriyo Geliştirme Ortamının Bileşimi

<b>Makro Elementler</b>	<b>Konsantrasyon (mg l<sup>-1</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1000
KCl	65
KNO <sub>3</sub>	1000
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	347
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300
<b>Mikro Elementler</b>	
KI	0.8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.6
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	4.4
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5
NaFeEDTA	32
<b>Amino Asit</b>	
Glycine	2
<b>Vitaminler</b>	
My-inositol	100
Nikotinik asit	0.5
Pyridoxine HCl	0.1
Thiamine HCl	0.1
<b>Diğer</b>	
Sucrose	50000
Yeast Ekstrakt	2000
Agar	6000
pH	5.8

Araştırmada kullanılan besi ortamlarının tamamında, birim hacimde bulunması gerekli bir çok maddenin miktarlarının dūřuk olması ve bu maddelerin teker teker tartılarak hazırlanması bŸyŸk zaman kaybına neden olacağından besi ortamını oluşturan oğelerin stok solŸsyonları hazırlanmıştır (HATİPOGLU, 1999).

### **3.2.3.5. Makro ve Mikro Elementlerin Stok SolŸsyonlarının Hazırlanması**

Besi ortamlarında bulunması gerekli olan KI,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve jelat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) dışındaki bileşenlerin litrede bulunması gerekli olan miktarlarının 10 katı hassas terazide tartılmıştır. Kimyasallar, manyetik karıştırıcı Ÿzerine yerleştirilmiş, içerisinde 200 ml bidestile su bulunan 2 litrelik cam behere sırasıyla ilave edilmiştir. Karışımı oluşturan elementler iyice özŸndŸkten sonra, karışımın hacmi 1 litreye tamamlanmış ve her biri 150 ml olan, 10 adet plastik stok kabına 100' er ml paylaştırılmıştır. Kapların Ÿzerine yapıştırılan etiketlere besi ortamının adı ve ortamın yapılış tarihi yazılarak derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Besi ortamında daha dūřuk konsantrasyonlarda bulunan mikro elementlerin ise ( $\text{KI}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ise ayrı ayrı stok çözeltileri hazırlanmıştır. SŸz konusu mikro elementlerin her birisi standart besi ortamında olması gereken miktarının 100 katı olacak şekilde hassas terazide tartılmış ve bidestile su içeren behere ilave edilerek manyetik karıştırıcıda özŸnmesi sağlanmıştır. SŸz konusu element tamamen özŸndŸkten sonra karışımın hacmi 100 ml'ye tamamlanmış ve koyu renkli cam stok şişesine konularak buzdolabında muhafaza edilmiştir. Hazırlanacak her bir litre besi ortamı için bu stok özeltelerin bir adedi kullanılmıştır.

### 3.2.3.6 Jelat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) Hazırlanması

7,45 gr  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  bir magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş 1 litrelik erlen-mayer kabında 200 cc bidestile su içinde eritilmiş ve eriyik  $90\text{ }^\circ\text{C}$ ' ye kadar ısıtılmıştır. Sıcaklık belirtilen düzeye eriştiğinde çözeltiliye 5,57 g  $\text{FeSO}_4$  ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra karışımın sıcaklığı oda sıcaklığına erişinceye kadar soğutulmuş ve karışım hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan jelat koyu renkli pyrex cam şişe içinde muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3.7. Vitamin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Besi ortamında bulunan Thiamin HCL, Pyridoxine HCl, Nikotinik asit vitaminlerinin 100 mg'ı hassas terazide tartılarak 20-30 ml bidestile suda çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlanmış ve koyu renkli pyrex cam şişeler içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3.8. Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Besi ortamı için gerekli olan oksin grubu büyüme düzenleyicilerinden 2,4-D (2,4 Diklorofenoksi asetik asit), NAA (naftalen asetik asit), pikloram (4- amino-3,5,6- trikloropiklonik asit) ve Dicamba (3,6 dikloro-2metoksibenzoikasit) ile sitokinin grubu büyüme düzenleyicilerinden Kinetin'nin stok solüsyonları, vitaminlerin stok çözeltisi gibi hazırlanmıştır. Büyüme düzenleyicilerinin her birinin 100 mg'ı önce birkaç damla KOH içinde çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlanmış ve koyu renkli pyrex cam şişeler içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3.9. Stok Solüsyonlardan Yararlanarak Besi Ortamının Hazırlanması

Araştırmada kullanılan besi ortamının hazırlanması için aşağıdaki yöntem izlenmiştir.

#### **Karışım I**

100 ml'lik makro ve mikro element stok solüsyonu manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan 1 litrelik pyrex erlenmayer kabına boşaltılarak iyice karıştırılmış ve karışıma stok solüsyonunda bulunmayan mikro elementlerin gerekli miktarları stok solüsyonlarından ilave edilmiştir. Karışımın hacmi bidestile su ile 800 ml'ye tamamlanmıştır. 800 ml'ye tamamlanan karışımın pH'sı 1N KOH ve HCl çözeltilerinin yardımıyla 5.8'e getirilmiştir. Karışım dört eşit parçaya ayrılmış ve her parça 250 ml'lik pyrex şişeye doldurulmuştur. Her şişeye 1,5 gr agar ( $6 \text{ g l}^{-1}$ ) ilave edilmiş ve şişelerin ağızları kapatıldıktan sonra alüminyum kağıtla sarılmıştır. Şişeler içindeki karışım I Otoklavda  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ve 1,2 bar basınç altında 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

#### **Karışım II**

İçerisinde 50 ml bidestile su bulunan ve bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 250 ml'lik pyrex erlenmayer kabı içine SH besi ortamında bulunması gerekli olan 30000 mg sakkaroz ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra 200 mg Myo-İnositol,  $5 \text{ mg l}^{-1}$  Thiamin. HCL,  $5 \text{ mg l}^{-1}$  Nicotinic Asit,  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  Pyridoxine HCl ve  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  Kinetin ilave edilmiştir. Karışım hacmi bidestile su ile 160 ml'ye tamamlandıktan sonra, karışım dört eşit parçaya ayrılmıştır. Her parçaya  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D, NAA, Dicamba veya Pikloram ilave edildikten sonra, karışım hacmi bidestile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım II varyantlarının pH'ları ayrı ayrı 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra Karışım II varyantları steril kabin içinde vakum filtrasyon sistemi yardımı ile,  $0.3 \text{ } \mu\text{m}$  por açıklığına sahip membran filtre yardımı ile nuçe erleni içerisine filtre edilmiştir. Soğuk filtrasyondan geçirilen çözelti steril pyrex şişe içerisine alınmıştır.

Otoklavdan çıkarılan karışım I steril kabin içinde bulunan bir manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Karışımın sıcaklığı 60-70 °C ye düştüğünde karışım II karışım I in üzerine ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Hazır hale gelen besi ortamı varyantları steril kabin içinde steril kültür kaplarına steril pipet yardımıyla doldurulmuştur. Kültür kapları içindeki besi ortamının sıcaklığı oda sıcaklığına düştüğünde içerisi alkol ile sterilize edilmiş, vakum kapaklı plastik saklama kapları içine konulmuş ve kullanılıncaya kadar 10 °C de muhafaza edilmiştir.

Araştırmanın farklı aşamalarında kullanılan farklı besi ortamları genel olarak bu prensipler doğrultusunda hazırlanmıştır. Ancak *In vitro* fide yetiştirme için hazırlanan MS besi ortamında, ortamın tüm bileşenleri gerektiği miktarlarda birleştirilip pH'sı ayarlandıktan sonra organik ve inorganik kısmın tamamı otoklav sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sterilizasyon sonrasında besi ortamı steril kabin içinde steril magenta kaplarına eşit olarak paylaştırılmıştır.

Sıvı süspansiyon kültür ortamında ise ortamın tüm bileşenleri gerektiği miktarlarda birleştirildikten sonra pH gereken değere ayarlanmış, 60 mm yüksekliğindeki cam magentalara eşit miktarlarda paylaştırılmış ve bu şekilde otoklavda sterilize edilmiştir.

#### **3.2.4. Yüzey Sterilizasyonu ve *In vitro* Fide Yetiştirilmesi**

Elçi yonca tohumlarından sağlıklı olanlar seçilerek, ağzı vakum kapaklı bir şişe içerisine alınmış ve çeşme suyu ile çalkalanıp suyu süzölmüştür. Daha sonra steril kabin içerisine alınmış olan tohumlar önce % 96' lık alkol ile 2 dakika, sonrada litresine 23 damla Tween-20 ilave edilmiş olan, % 20'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Tohumlar 4 kez steril destile su ile yıkanarak durulanmıştır. Steril tohumlar otoklavda steril hale getirilmiş olan filtre kağıtları üzerine alınmış ve kurulanmıştır. Tohumlar, içerisinde 100 ml., büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamı bulunan 77x77x77 mm boyutlarındaki plastik magentalara her bir kültür kabına 50 tohum

olacak şekilde ekilmiştir. Besi ortamına ekilen tohumlar 26 °C ve %70 nem düzeyine ayarlanmış iklim dolabında muhafaza edilmiştir.

### 3.2.5. Eksplantların Alınması ve *In vitro* Kültürü

MS besisi ortamına ekilen tohumlardan çimlenen 6 günlük fideler (Şekil 3.1), steril kabin içerisinde bir bistüri yardımı ile kotiledon ve hipokotil segmentlerine ayrılmıştır (Şekil 3.2). Hipokotil segmentleri 0.5 mm boyutlarında kesilirken kotiledon yapraklar ise ortadan 2 parçaya bölünmüşlerdir. İzole edilen eksplantlar 4 farklı oksin içeren SH besisi ortamında kültür edilmiştir. Kotiledon segmentleri kesim bölgeleri besisi ortamına girecek şekilde yerleştirilirken, hipokotil eksplantları ise uzunlamasına yatık olarak kültür edilmişlerdir. Etrafı parafilm ile sarılan 60x15 mm boyutlarındaki kültür kapları (petri) üzerlerine kombinasyon, kültür tarihi ve tekrür numarası bilgileri de yazıldıktan sonra 26 °C sıcaklık ve %70 nem düzeyine ayarlanmış iklim dolabında inkübe edilmiştir.



Şekil 3.1. Plastik Magenta Kutularında MS Besi Ortamında Çimlendirilen 6 Günlük Yonca Fideleri.



Şekil 3.2. *In vitro*'da Çimlendirilmiş Fide ve Kültür edilen Eksplantlar.

### 3.2.6. Kallus İndüksiyonu

İklim dolabına yerleştirilen kültürler periyodik olarak binoküler altında incelenmiş ve kallus oluşum fazı sona erdiğinde, her petri kutusunda kallus oluşturan segmentler sayılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kültür Başlangıcından 5 Hafta Sonra Hipokotil Eksplantından SH Ortamında Gelişen Embriyogenik Kallus.

### 3.2.7. Sıvı Süspansiyon Kültürü / Somatik Embriyo Oluşumu

Oransal hesaplamaları yapıp kallus ağırlıkları alınmış olan embriyogenik kallusların somatik embriyoya dönüşümlerini teşvik etmek amacı ile sıvı B5 süspansiyon kültür ortamına aktarılmıştır. Büyütme şişeleri içindeki sıvı kültürler 120 rpm çalkalama hızına ayarlı çalkalayıcı üzerine yerleştirilmiş ve indirekt ışık koşullarında 26 °C sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Çalkalayıcı Üzerinde Sıvı Kültür (B5 Ortamında).

Sıvı besi ortamında 3-5 haftalık kültür süresi sonunda embriyoidler içeren materyal süzülmüştür (Şekil 3.5). Bu amaçla sterilize edilen süzgeç üzerine delikler açılmış steril filtre kağıtları kullanılmıştır. Sıvı kültür içindeki materyalle birlikte boşaltılmış, üzerine steril bidestile su dökülerek yıkanmış ve süzildükten sonra başka bir filtre kağıdı üzerinde 2 dakika süre ile kuruması beklenmiştir (Şekil 3.6).





Şekil 3.5. Farklı Aşamalarda Somatik Embriyolar İçeren Sıvı Kültürün Steril Bidestile Su ile Yıkayıp Süzülmesi.



Şekil 3.6. Yıkanmış ve Süzölmüş Materyalin Steril Filtre Kağıdı Üzerinde Kurutulması.

### 3.2.8. Somatik Embriyo Gelişimi

Kurutulmuş ve embriyoidler içeren kalluslar BOİ2Y embriyo geliştirme ortamına aktarılmıştır ve bir pens yardımı ile besi ortamına yayılmıştır (Şekil 7). Petri kutuları parafilm ile sarılmış ve 26 °C sıcaklık ve %70 nem düzeyine ayarlanmış iklim dolabında tekrar inkübe edilmiştir. 4-6 haftalık kültür süresinin sonunda stero-mikroskop altında embriyo sayımları yapılmıştır. Bu amaçla bir petri kutusu kapağı üzerine 1 cm<sup>2</sup>'lik kareler çizilmiş ve sayımı yapılacak petriler üzerine kapatılarak her bir kare içindeki somatik embriyolar sayılmıştır.



Şekil 3.7. Pro-embriyogenik Yapılar Taşıyan Materyalin BOİ2Y Embriyo Geliştirme Ortamına Aktarılması.

### 3.2.9. Somatik Embriyo Olgunlaştırma

Sayımları yapılmış olan somatik embriyolar ileri safha embriyolara dönüşmeleri amacı ile BOİ2Y olgunlaştırma ortamında alt kültüre alınmışlardır. Bu ortam embriyo geliştirme ortamı ile tamamen aynı içeriktedir. Bu ortama aktarılmış olan proembriyolar ve ileri safha embriyoları içeren kültürler aynı koşullarda muhafaza edilmişlerdir.

### 3.2.10. Sentetik Tohum Elde Edilmesi

Farklı aşamalardan geçirilerek elde edilen somatik embriyolar sentetik tohum elde etmek amacı ile kaplanmışlardır.

Bu amaçla 100 ml %1'lik Alginik Asit çözeltisi hazırlanmış ve elde edilen somatik embriyolar yavaş yavaş viskoz yapıdaki bu çözelti içine dökülmüş, manyetik karıştırıcı yardımı ile bir süre karıştırılmıştır. Diğer taraftan 100 ml %

2'lik kalsiyum klorit ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerinde yavaş devirde karışmakta olan bu çözelti içerisine viskoz haldeki, içinde somatik embriyolar bulunan alginik asit çözeltisi yavaş yavaş karıştırılmıştır. Böylece 2-3 mm çapında kalsiyum alginat kapsülleri elde edilmiştir.

### **3.2.11. İncelenen Özellikler**

#### **3.2.11.1. Kallus İndüksiyon Oranı (%)**

Kültür başlangıcından 4-6 hafta sonra, kültürler alt kültüre alınmadan önce yapılan incelemeler sonunda kallus oluşturan eksplantların sayısı tespit edilmiş ve bu sayımlardan yararlanarak petri kutusu başına segmentlerin kallus oluşturma oranları her bir varyant için yüzde olarak saptanmıştır.

#### **3.2.11.2. Kallus Ağırlığı (mg)**

Her bir kültür kabında oluşan kallusların sıvı süspansiyon kültürüne alınmadan önce, steril kabin içerisine yerleştirilmiş 0.1 mg hassasiyetli terazi yardımı ile petri kutusu başına ağırlıkları saptanmıştır.

#### **3.2.11.3. Somatik Embriyo Sayısı (adet)**

Sıvı kültüre aktarılırken ağırlıkları saptanan kalluslar, sıvı kültür sonrasında gelişme ortamına aktarılmış ve bu ortamdaki kültür süresi sonunda globular yada daha ileri dönem embriyo sayıları belirlenmiş, sıvı kültüre aktarılan kallus miktarı dikkate alınarak somatik embriyo/gram kallus olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.12. Araştırmada Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

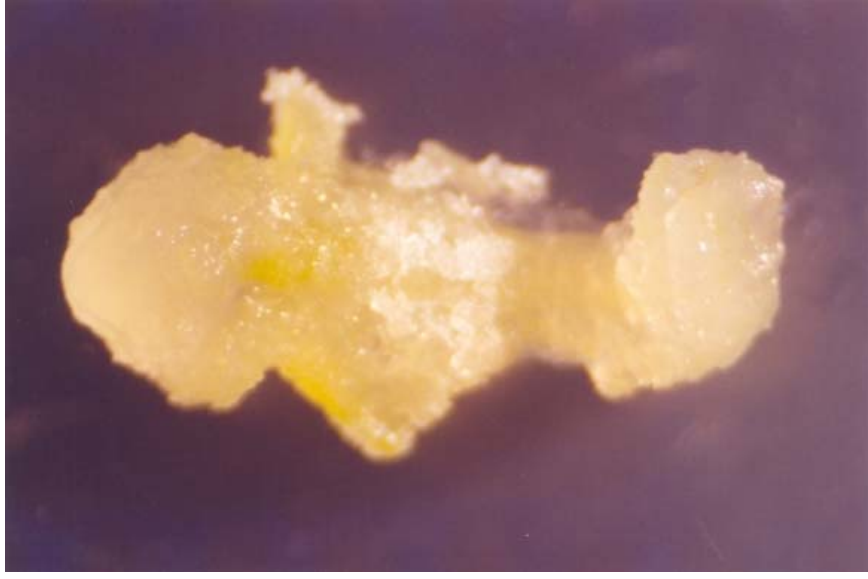
Araştırmada elde edilen verilere tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak MSTATC istatistik programından yararlanılarak varyans analizi uygulanmıştır. Varyans analizi uygulanmadan önce, kallus indüksiyon oranı değerlerine Arcsin  $\sqrt{x}$  transformasyonu, kallus ağırlığı başına somatik embriyo sayısı değerlerine ise  $\sqrt{x+0,5}$  transformasyonu uygulanmıştır. Varyans analizi sonucu önemli çıkan oksin çeşidi ortalamaları LSD testine göre gruptandırılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

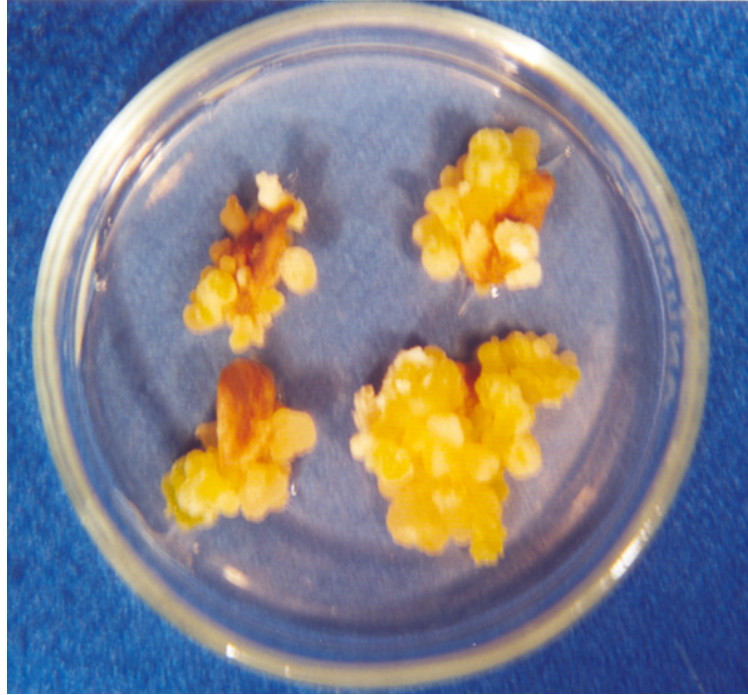
### 4.1. Kallus İndüksiyonu

Kültüre alınan eksplantlar kültür başlangıcından itibaren haftada bir kez stero-mikroskop altında incelenmiş ve oluşan değişimler gözlenmiştir. Kültür başlangıcında eksplantlarda herhangi bir değişim gözlenmezken ilerleyen dönemlerde eksplantlarda kısmi kararmalar ve parlak şeffaf görünümün kaybı başlamıştır. Kültürün ikinci haftası içinde hipokotil ve kotiledon eksplantlarının kesim bölgelerinde şişkinleşmelerle kendini gösteren kallus oluşumu başlamış ve sonraki haftalarda dışa doğru taşan bölümlerle belirginleşmiştir. Genel olarak kullanılan tüm besi ortamı kombinasyonlarında oran ve kaliteleri değişmekle beraber kallus oluşumu gözlenmiştir. Oluşan kallusların açık krem renkli, gevşek sulu yapıda, gevrek kırılğan, yeşil kompakt yapılı, ilerki dönemlerde karlı, hızla çoğalan veya ilk oluştuğu şekli ile kalıp gelişme göstermeyen gibi, farklı özelliklere sahip oldukları saptanmıştır. Bu dönemde yapılan gözlemlerde özellikle NAA büyüme düzenleyicisi içeren ortamlardaki kallusların daha kompakt ve embriyogenik yapıda oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca kültürün ilk haftalarında hipokotil segmentlerinin kesim bölgelerinde daha gevşek yapılı ve sulu, şeffaf kalluslar oluşurken, kotiledonlardan daha sert ve yeşilimsi kallus oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.1). NOLAN ve ark. (1989) tarafından *Medicago truncatula* ve ÇELİKTAŞ (2001) tarafından *Onobrychis sativa* türlerinde de benzer sonuçlar gözlenmiştir. Özellikle NAA ve Picloram bulunan ortamlarda gelişen kalluslarda kültürün ileri dönemlerinde kararmalar gözlenmiştir. ALBRECHT ve KOHLENBACH (1989) *Vicia narbonensis*'de yürüttükleri çalışmada benzer gözlemleri bildirmektedirler.

Kültür başlangıcından 4-5 hafta sonra kallus oluşumlarının tamamlandığı gözlenmiş, kallus morfolojisi göze alınmaksızın kallus oluşturan eksplantların sayısı belirlenmiş ve petri kutusu başına kallus oluşturan eksplantların oranı yüzde (%) olarak saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Hipokotil Eksplantından Kültürün İlk Haftalarında Gelişen Gevşek Sulu Yapılı Kallus.



Şekil 4.2. Kallus İndüksiyon Oranının Saptandığı Aşama (Kültür Başlangıcından 4-5 Hafta Sonra)

#### 4.1.1. Kallus İndüksiyon Oranı (%)

Farklı oksin çeşitleri içeren besi ortamlarında kültüre alınan Elçi yoncasının hipokotil ve kotiledon eksplantlarının kallus indüksiyon oranlarına uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı Oksin Çeşitlerinin Elçi Yoncasında (*Medicago sativa* L.) Kallus İndüksiyon Oranına Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	29	0.129	0.9803
Oksin Çeşidi	3	0.523	3.9641*
Hata	87	0.132	
Genel	119		

\*p≤ 0.05 hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli

DK: %98.83

Çizelgeden izlendiği gibi oksin çeşitleri kallus indüksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir.

Araştırmada incelenen 4 farklı oksin çeşidi için saptanan kallus indüksiyon oranı ortalamaları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3’de verilmiştir. Kallus indüksiyon oranı % 23.6 ile % 50.8 arasında değişim göstermiştir. En yüksek kallus indüksiyon oranı % 50.8 ile 2,4-D oksin grubu büyüme düzenleyici içeren ortamlardan elde edilmiştir. Dicamba oksini içeren ortamlardan elde edilen % 45 oranındaki kallus indüksiyon oranı değeri ise istatistiksel olarak 2,4-D oksininin etkisi ile benzer bulunmuştur. En düşük kallus indüksiyon oranı değeri (% 23.6) Picloram oksini içeren ortamlardan elde edilirken, NAA oksini oluşturduğu % 27.5 oranındaki kallus indüksiyon oranı değeri ile bu oksin çeşidi ile benzer istatistiksel grupta yer almıştır. Bu sonuçlar; yonca hipokotil ve kotiledon segmentlerinden etkin bir kallus indüksiyonu için en uygun büyüme düzenleyicisinin 1mg l<sup>-1</sup> düzeyindeki 2,4-D oksini olduğunu ortaya koymaktadır.

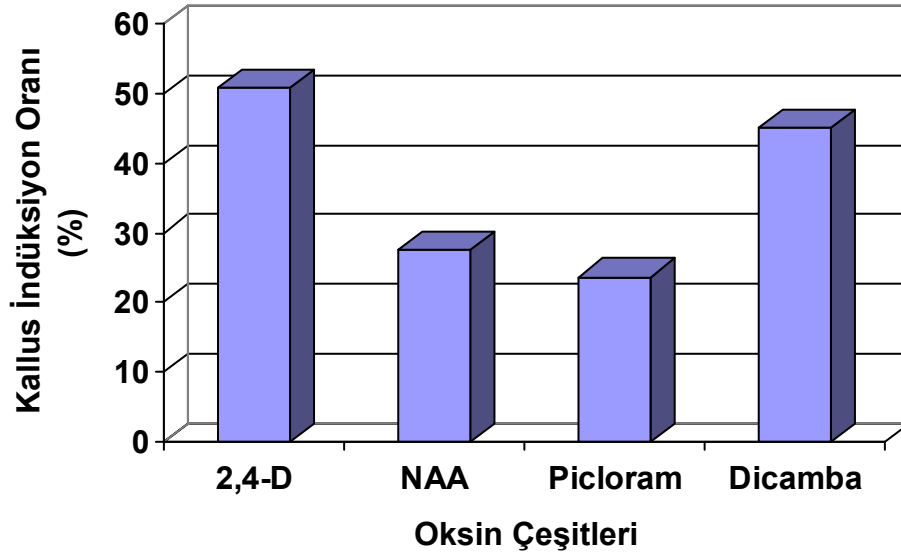


Çizelge 4.2. Elçi Yoncasının (*Medicago sativa* L.) Farklı Oksin Uygulamalarında Oluşturduğu Kallus İndüksiyon Oranı Ortalamaları (%)

Oksin Çeşidi	Kallus İndüksiyon Oranı (%)
2,4-D	50.8 (44.538) <sup>+</sup> A*
NAA	27.5 (25.729) BC
Picloram	23.7 (22.382) C
Dicamba	45.0 (41.036) AB
Ortalama	36.7

\*Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar LSD testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

<sup>+</sup>Açı Transformasyonu Değerleri



Şekil 4.3. Farklı Oksin Uygulamaları Sonucu Oluşan Kallus İndüksiyon Oranı Ortalamaları (%).

Kallus indüksiyonu üzerinde 2,4-D büyüme düzenleyicisinin daha etkin olması ile ilgili bulgularımız NOLAN ve ark. (1989), DENCHEV ve ark. (1991), SCARPA ve ark. (1993), MIA ve MCKERSIE (1994), ZAFAR ve ark. (1995), LI ve DEMARLY (1996) tarafından farklı *Medicago* türleri ile, GU (1987) ve PUPILLI ve ark. (1989) tarafından *Onobrychis sativa*, ORCZYK (1992)'nin *Lupinus* türlerinde, ÖZCAN ve ark. (1993)'nin bezelyede NENZ ve ark. (1996)'nin *Lotus angustissimus* türünde yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri sonuçlar ile uyum içindedir. Bununla birlikte HIROSHI ve ZHUOMENG (1993) korunga doku kültüründe hipokotil ve kotiledon eksplantlarından kallus indüksiyonunda NAA'nın 2,4-D'ye oranla daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum türler arasındaki genotipik farklılıktan kaynaklanmış olabilir.

Doku kültürü çalışmalarında kallus indüksiyonu amacıyla en yaygın olarak kullanılan oksin tipi 2,4-D'dir. Nitekim yonca doku kültürü çalışmalarında pek çok temeli ortaya koymuş olan BINGHAM ve ark. (1975) benzer sonuçları ortaya koymaktadırlar. Doku kültürü çalışmalarında direk organogeneis amaçlandığında ise NAA yoğunlukla tercih edilmektedir (GASPAR ve ark., 1996). Nitekim HIROSHI ve ZHUOMENG (1993), NAA'nın kallus oluşumunda 2,4-D'ye kıyasla daha az etkili olduğunu saptamıştır. Bunun yanısıra PEDERSON (1986) ve GU (1987) oksin grubu büyüme düzenleyicilerinin tek başlarına veya sitokininlerle kombine edilmelerinin yanısıra, oksin/oksin kombinasyonunun sağlanmasının da kallus oluşum oranını önemli düzeyde arttırabileceğini bildirmektedir. Nitekim PARROT ve BAILEY (1993) IAA + NAA + BAP büyüme düzenleyicileri ile oluşturulan besi ortamının yonca'da kallus gelişimi için en etkin kombinasyon olduğunu saptamışlardır.

*In vitro* ortamda farklı türler farklı büyüme düzenleyicisi tiplerine ihtiyaç duyarlar (VASIL ve THORPE, 1994). Benzer sonuçlar STYER ve CHIN (1983) tarafından farklı monokotil ve dikotil bitkilerde yaptıkları çalışmalarla da ortaya konmuştur.

Farklı türler hatta tür içinde genotipler farklı oksinleri metabolize edebilmektedirler (CLOSE ve LUDEMAN, 1987).

Ayrıca herhangi bir donör bitkiden eksplantın izole edildiği dönemdeki bitki fizyolojik durumu da, kullanılan büyüme düzenleyicisinin sentezi, taşınması ve yararışlılığını etkileyebilmektedir (VASIL, 1987). Bitkilerde gerçekleşen değişik metabolizma olayları sonucunda oluşan metabolitler farklı oranlarda depolanmaktadır. Bunun tipi ve oranı değişik bitki doku ve organlarında farklılaşmaktadır. Sentez bölgeleri ve sentezlenme oranları ile taşındıkları ve aktif oldukları dokular ve dönemler farklıdır. THORPE (1980), herhangi bir türde organogenesis'in başlaması için endojen (hücreye ait) oksin/sitokinin dengesinin, eksojen oksin/sitokinin dengesinden daha önemli olduğunu bu nedenle bazen açıklamakta zorlandığımız, istenmeyen yada beklenmeyen *in vitro* gelişimlerin ortaya çıkabileceğini bildirmektedir.

Tüm bu çalışma sonuçları araştırmamızda kullandığımız oksin grubu farklı büyüme düzenleyicilerinin, *in vitro*'da farklı tepkimeler ortaya koymuş olmasını açıklayıcı niteliktedir.

#### 4.1.2. Kallus Ağırlığı (mg/petri)

Farklı oksin çeşitleri içeren besi ortamlarında kültüre alınan Elçi yoncasının hipokotil ve kotiledon eksplantlarının oluşturdukları kallus ağırlığı değerlerine uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı Oksin Çeşitlerinin Elçi Yoncasın (*Medicago sativa* L.)'in Kallus Ağırlığına Etkisine İlişkin Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	7	0.220	0.6989
Oksin Çeşidi	3	0.966	3.0747*
Hata	21	0.314	
Genel	31		

\* $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli

DK: % 55.63

Çizelgeden görüldüğü gibi kullanılan oksin çeşitlerinin kallus ağırlığı üzerindeki etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

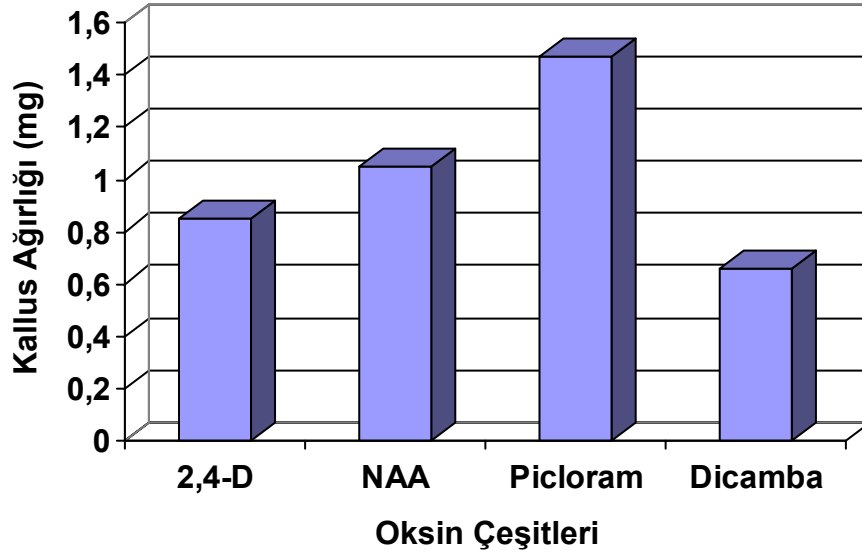
Araştırmada incelenen 4 farklı oksin çeşidi için saptanan kallus ağırlığı ortalamaları Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4’de verilmiştir.

Araştırma sonucu elde edilen kallus ağırlığı değerleri 0.660 mg/petri ile 1.472 mg/petri arasında değişim göstermiştir. En yüksek kallus ağırlığı ortalaması Picloram oksininin ilave edildiği besi ortamlarından elde edilmiştir. NAA büyüme düzenleyicisinin oluşturduğu 1.050 mg/petri düzeyindeki kallus ağırlığı değeri ise Picloram’dan farklı bulunmamış ve benzer istatistiksel grupta yer almışlardır. Kallus ağırlığı açısından en düşük değer Dicamba büyüme düzenleyici içeren ortamlardan elde edilirken, NAA büyüme düzenleyicisinden elde edilen 1.050 mg/petri düzeyindeki kallus ağırlığı ortalaması bununla benzer istatistiki grupta yer almıştır.

Çizelge 4.4. Elçi Yoncasının (*Medicago sativa* L.) Farklı Oksin Uygulamalarında Oluşturduğu Kallus Ağırlığı Ortalamaları (mg)

Oksin Çeşidi	Kallus Ağırlığı (mg /petri)
2,4-D	0.850 B*
NAA	1.050 AB
Picloram	1.472 A
Dicamba	0.660 B
Ortalama	1.008

\*Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar LSD testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.



Şekil 4.4. Farklı Oksin Uygulamaları Sonucu Oluşan Kallus Ağırlığı Ortalamaları (mg).

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4'den de görüldüğü gibi yüksek oranda kallus indüksiyonuna neden olan 2,4-D oksini aynı oranda kallus ağırlığı meydana getirememiştir. Bu durum 2,4-D büyüme düzenleyicisi bulunan ortamlardaki kallusun diğerleri kadar kompakt yapılı değil daha gevşek yapılı olmasından kaynaklanmaktadır.

#### 4.1.3. Somatik Embriyo Sayısı (somatik embriyo/g kallus)

Embriyogenik kalluslar sıvı kültüre aktarılmış ve çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmişlerdir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Sıvı Süspansiyon Kültürüne Aktarılmış Embriyogenik Kalluslar

Sıvı kültür ortamındaki 5 haftalık inkübasyon süresi sonunda kültürler süzölmüş, kurutulmuş ve embriyo geliştirme ortamına aktarılmışlardır. Gelişme ortamında 4 haftalık inkübasyon sonrasında ise globular, kotiledon, kalp ve torpedo dönemlerindeki somatik embriyoların sayımı yapılmıştır (Şekil 4.6).

Farklı oksin çeşitlerinin hipokotil ve kotiledon segmentlerinden oluşan 1 g embriyogenik kallus başına elde edilen somatik embriyo sayılarına uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelgeden izlendiği gibi; 1 g embriyogenik kallus başına somatik embriyo sayısı, kullanılan oksin çeşitlerinden önemli düzeyde etkilenmiştir.

Araştırmada incelenen 4 farklı oksin çeşidi için saptanan 1 g embriyogenik kallus başına somatik embriyo sayısı ortalamaları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Elçi Yoncasının (*Medicago sativa* L.) Farklı Oksin Çeşidi İçeren Ortamlarda Oluşturduğu Somatik Embriyo Sayıları İle İlgili Varyans Analiz Sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri
Tekerrür	7	237.361	1.5774
Oksin Çeşidi	3	501.378	3.3320*
Hata	21	150.475	
Genel	31		

\* $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak önemli

DK: % 86.68



Şekil 4.6. Yonca Hipokotil ve Kotiledon Segmentlerinden Oluşan Kallusun Sıvı Kültürü Sonrasında Elde Edilen Embriyogenik Yapılar ve Somatik Embriyolar.

Çizelge 4.6 ve Şekil 4.7'nin incelenmesinden görüldüğü gibi, farklı oksin çeşitlerinin oluşturduğu somatik embriyo sayıları 8.6 ile 25.9 arasında değişim göstermiştir. En yüksek somatik embriyo sayısı 2,4-D oksin grubu büyüme düzenleyicisi içeren ortamlarda oluşmuştur. Diğer oksin çeşitleri farklı sayılarda somatik embriyolar üretmiş, ancak bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmayarak her üç oksin çeşidi de aynı istatistiksel grup içinde yer almışlardır.

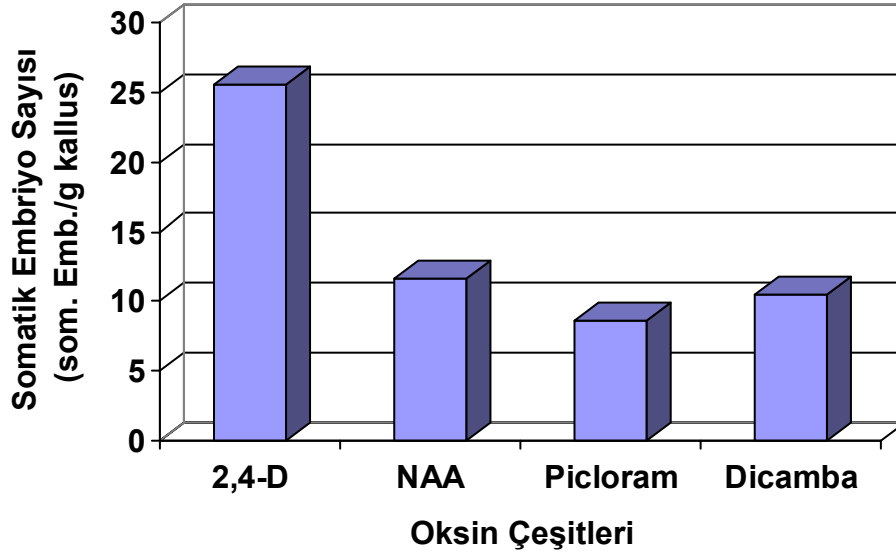
Çizelge 4.6. Elçi Yoncasının (*Medicago sativa* L.) Farklı Oksin Çeşidi Uygulamalarında Oluşturduğu Somatik Embriyo Sayısı Ortalamaları (somatik embriyo sayısı / gram kallus)

Oksin Çeşidi	Somatik Embriyo Sayısı
2,4-D	25.9 (5.358) A
NAA	11.6 (3.590) B
Picloram	8.6 (3.128) B
Dicamba	10.5 (2.814) B
Ortalama	14.1

\*Aynı sütun içinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar LSD testine göre  $p \leq 0.05$  hata sınırları içinde istatistiksel olarak farklı değildir.

<sup>†</sup>Karekök Transformasyon Değerleri





Şekil 4.7. Farklı Oksin Uygulamaları Sonucu Oluşan Somatik Embriyo Sayısı Ortalamaları (somatik embriyo/g kallus)

Pek çok araştırmacı 2,4-D ile oluşturulmuş ortamlardan çok miktarda kallus ve somatik embriyo geliştiğini bildirmişlerdir (ORCZYK, 1992; ÖZCAN ve ark., 1993). Diğer taraftan NOLAN ve ark. (1989) ise *Medicago truncatula* türünde NAA yerine 2,4-D kullanılması durumunda somatik embriyo gelişmediğini tespit etmişlerdir. Bu durum çalışılan türler arasındaki farklılıktan, türlerin sahip oldukları içsel hormon seviyelerinden ve donör bitkilerin fizyolojik durumlarından kaynaklanmış olabilir.

Araştırmada elde ettiğimiz somatik embriyo sayıları aynı türde, NOLAN ve ark. (1989)'nın çalışmalarını yürüttükleri genotiplerden birisinden ve DENCHEV ve ark. (1991)'nin çalışmalardan elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir. Diğer taraftan yine NOLAN ve ark. (1989)'nın çalıştıkları diğer genotipten ve DENCHEV ve ark. (1993) tarafından yürütülen diğer bir çalışmadan elde edilen somatik embriyo sayılarının çok altındadır. Dikkat edilirse aynı araştırma içerisinde farklı genotipler dahi farklı reaksiyonlar göstermişlerdir. Dolayısı ile

çalışılan genotipler başta olmak üzere pek çok faktörün farklı olduğu durumda böylesi bir sonucun ortaya çıkması doğaldır.

Yoncada somatik embriyogenesis genetik kontrol altındadır. Dolayısıyla reaktif ve reaktif olmayan genotipler mevcuttur (REISCH ve BINGHAM, 1980; BROWN ve ATANASSOV, 1985; HERNANDEZ-FERNANDEZ ve CHRISTIE, 1989; PARROT ve ark., 1993; KIELLY ve BOWLY, 1992). WAN ve ark. (1988), diploid yoncada bu mekanizmanın Rn1 ve Rn2 adı verilen iki dominant gen tarafından kontrol edildiğini bildirmektedirler. Aynı araştırıcılar kallus indüksiyonu ve somatik embriyogenesis'in iki genetik sistem tarafından kontrol edildiğini, bunlardan birinin nukleusda diğerinin ise sitoplazmada konumlandığını saptamışlardır.

Araştırmalarımızı yürüttüğümüz Elçi yonca çeşidinin tetraploid bir yonca olması da çalışmalar arasında farklılıklar olmasının bir nedeni olabilir.

Araştırmamızda, sıvı kùltüre alınan embriyogenik kallusların bir kısmında pro-embriyogenik yapıların oluşumu gözlenmesine rağmen, tamamında bu yapıların gelişmi beklendiğinden sıvı kùltürde bekletme süresi biraz uzadı. Ancak bu fazla bekletmenin olumlu sonuçları saptanmadı. Zira, DENCHEV ve ark. (1991) embriyogenik kallusların 2,4-D oksini içeren sıvı kùltür ortamında uzun süreli kalması durumunda somatik embriyo gelişiminin engellendiği söylemektedirler. Bu durum araştırmamızdaki sonucu açıklar niteliktedir.

Öte taraftan DENCHEV ve ark. (1991) yonca'da donor bitkinin yetişme şartlarının dolayısıyla fizyolojik durumunun, somatik embriyogenesis üzerinde etkili olduğunu bildirerek, kùltür öncesi sıcaklık ve fotoperiyot süresi uygulamalarının embriyo sayısını arttırabileceğini, bunun da oluşan polifenolik bileşiklerden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Araştırmamızda donor bitkilere herhangi bir ön muamele yapmamış olmamız da elde edilen somatik embriyo sayı ve kalitesi üzerinde etkili olmuş olabilir.

DENCHEV ve ark. (1993) yonca sıvı süspansiyon kùltüründe 17. gün sonunda pH'da 0.7 birimlik bir değişimin saptandığını, bunun ise embriyo oranında bir miktar artışa yol açtığını bildirmektedirler.

Araştırmamız sonunda somatik embriyoların kaplanması ile suni tohum elde etme amacımıza uygun kalitede embriyoların gelişmediğini saptadık. Bu durum genetik kaynaklı olabildiği gibi kullanılan besi ortamı bileşenleri ve inkübasyon koşullarından da kaynaklanmış olabilir. LAI ve MCKERSIE (1994 a), somatik embriyoların üç farklı fazda olgunlaştıklarını, özellikle de faz I'de ortamın nişasta değil ama depo proteinleri ile değiştirilmesi sayesinde embriyo kalitesinin artacağını bildirmektedirler.

#### **4.1.4. Sentetik Tohum**

Araştırma boyunca farklı aşamalardan geçirilerek elde edilen farklı aşamalardaki somatik embriyolar, alginik asit ve kalsiyum klorit çözeltisi ile kaplanmak suretiyle 2-3 mm boyutunda kalsiyum alginat kapsülleri elde edilmiştir (Şekil 4.8).

Elde edilen kapsüllerin çok fazla sertleşmediği ve elastik yapıda oldukları yapılan inceleme sonucu saptanmıştır. Bu olumlu durumun sentetik tohumların toprağa aktarılması aşamasında oldukça önemli olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada seçilen ve alginik asit çözeltisine konulan somatik embriyoların tamamı, kalsiyum klorit içerisine dökülmüş ve bu durum bazı embriyoların tek bir kapsülde birlikte olmasına yol açmıştır.



Şekil 4.8. Somatik Embriyoların Kaplanması İle Elde Edilen Sentetik Tohumlar

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Farklı oksin çeşitleri kullanılarak yonca'da somatik embriyolar üretmek amacıyla 2003-2005 yılları arasında yürütülen bu araştırmada; somatik embriyo elde edebilmek amacı ile laboratuvar koşullarında *in vitro* fide (donor bitki olarak kullanılmak üzere) yetiştirmek için çimlendirilen Elçi yonca (*Medicago sativa* L.) çeşidine ait tohumlar, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Döner Sermaye İşletmesinin 2003 yılı ürününden temin edilmiştir. Araştırma, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür.

*In vitro*'da çimlendirilen 6 günlük fidelerden alınan hipokotil ve kotiledon eksplantları, farklı oksin çeşitleri içeren SH besi ortamında kültür edilmiştir. Araştırma sonuçları incelendiğinde tüm besi ortamı kombinasyonlarından farklı oranlarda kallus indüksiyonu gerçekleşmiştir.

Araştırma sonucu kallus indüksiyon oranı oksin çeşitlerine bağlı olarak, %23.6 ile %50.8 arasında değişim göstermiştir. En yüksek kallus indüksiyon oranı %50.8 ile 2,4-D oksin grubu büyüme düzenleyici içeren ortamlardan elde edilmiştir.

Elde edilen kalluslar sıvı süspansiyon kültürüne alınmadan önce hassas terazide tartımları yapılmıştır. Elde edilen sonuçların analizi neticesinde, kallus ağırlığı değerleri kullanılan oksin çeşidine bağlı olarak 0.660 mg/petri ile 1.472 mg/petri arasında değişim göstermiştir. En yüksek kallus ağırlığı ortalaması Picloram oksininin ilave edildiği besi ortamlarından elde edilmiştir.

Oluşan kalluslar aynı oranda ve aynı oksini içeren B5 sıvı süspansiyon kültürüne aktarılmış ve çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmişlerdir. Inkübasyon süresi sonunda bol miktarda pro-embriyogenik yapı oluşmuştur. Elde edilen bu materyal daha sonra süzölmüş ve kurutulmuştur.

Farklı gelişim dönemlerinde somatik embriyolar içeren materyal büyüme düzenleyicisi içermeyen BOİ2Y somatik embriyo geliştirme ortamına aktarılmıştır. Bu ortamdaki inkübasyon süresi sonunda elde edilen globular, kotiledon, kalp ve torpedo aşamalarındaki somatik embriyoların sayımları

yapılmıştır. Elde edilen verilerin analizi sonucu farklı oksin çeşitlerinin oluşturduğu 1 g kallus başına somatik embriyo sayıları 8.6 ile 25.9 arasında değişim göstermiştir. En yüksek somatik embriyo sayısı 2,4-D oksin grubu büyüme düzenleyicisi içeren ortamlarda oluşmuştur.

Elde edilen farklı dönemlerdeki somatik embriyolar alginik asit ve kalsiyum klorit çözeltileri ile kaplanmak suretiyle rejenerasyon edilmelerine gerek kalmadan toprağa ekilebilecek kaplanmış sentetik tohumlar haline getirilmişlerdir.

Yürüttüğümüz araştırma yoncada ıslah çalışmalarını oldukça kısaltabilecek sonuçlar içermektedir. Zira farklı aşamalar sonunda sadece 1 g kallustan yaklaşık 26 somatik embriyo elde edilebilmektedir. Dolayısıyla bu 26 tane, donör bitki ile tamamen aynı genetik yapıda birey demektir. Bu ise sentetik çeşit ıslahı çalışmalarında seçilmiş bireylerin hızlı çoğaltımında büyük avantajlar sunmaktadır.

Çalışmanın, kullandığımız büyüme düzenleyicilerinin farklı dozları ve farklı besin ortamları ile devam ettirilmesini önerebiliriz. Aynı zamanda çalışmada farklı oksin sitokinin veya oksin oksin kombinasyonlarının yapılması elde edilebilecek somatik embriyo sayısı ve kalitesi üzerinde etkili bir uygulama olabilir.

Büyüme düzenleyicilerinin yanı sıra ortamın diğer bileşenleri, özellikle de karbonhidrat kaynakları, amino asitler ve vitaminler üzerinde de araştırmalar yapılması özellikle somatik embriyo kalitesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu arada farklı katılaştırıcılar üzerinde çalışmalar yürütülmesi de çalışmanın etkinliğini artırıcı bir uygulama olabilir düşüncesindeyiz.

Araştırma sonuçları; 2,4-D büyüme düzenleyicisinin incelenen özellikler açısından daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Dolayısıyla daha spesifik ve pahalı olan picloram ve dicamba gibi oksinlerin bu tip çalışmalarda tercih edilmemesi çalışmanın daha ekonomik olması açısından büyük önem taşıyacaktır..

Araştırmamızda özellikle sıvı süspansiyon kültüründe, pro-embriyogenik yapıların tamamının somatik embriyolara dönüşümlerini beklediğimizden inkübasyon süresi biraz uzun tutulmuştur. Oksin içeren ortamda uzun süreli

inkübasyonunun embriyo kalitesi üzerinde olumsuz etkisi saptandığından bu konuda özellikle dikkatli olunmasını öneririz.

Araştırmada tohum orjinli eksplantlar kullanılmıştır. Ancak bitkilerin farklı vejetatif aksamalarında içsel hormon seviyesine bağlı olarak reaksiyon yüzdelerinde artışlar olması muhtemeldir. Bu nedenle yapılacak benzer çalışmalarda farklı bitki parçacıklarının kullanılması da tavsiye ederiz.

Sentetik tohum elde edilmesinde alginik asit ve kalsiyum klorit çözeltilerinin konsantrasyonları üzerinde de farklı uygulamalar yapılmasını öneririz. Böylece tarla performansları açısından en uygun elastikiyette tohumların elde edilmesi sağlanacaktır. Ayrıca çalışmamızda karşımıza çıkan tek bir sentetik kapsülde birden fazla embriyo oluşması sorununun, embriyoların bir kaşık-spatül yardımı ile bir miktar alginik asit çözeltisi ile birlikte tek tek alınıp, kalsiyum klorit çözeltisine dökülmesi ile aşılabileceğini düşünüyoruz.

Ayrıca, gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalarda donör bitkinin fizyolojik ihtiyaçlarının saptanması, eksplantın yaşı, kültür öncesi değişik stres faktörleri ile ön muameleler konularına özen gösterilmesini öneririz.

Kültür sonrasındaki inkübasyon koşulları, çalışmanın başarısını etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Dolayısıyla bu konuya dikkat edilmesi, özelliklede sıvı kültür aşamasında mümkün ise inkübatörlü çalkalayıcı kullanılması daha olumlu sonuçların alınmasında etkili olabilecektir.

## KAYNAKLAR

- ALBRECHT, C. ve KOHLENBACH, H.W., 1989. Induction of Somatic Embryogenesis in Leaf-Derived Callus of *Vicia narbonensis* L.. **Plant Cell Reports**, 8: 267-269.
- ANANDARAJAH, K. ve MCKERSIE, B. D., 1990. Enhanced Vigor of Dry Somatic Embryos of *Medicago sativa* L. With Increased Sucrose. **Plant Science**, 71: 261-266.
- ARCIONI, S. ve DAMIANI, F., PEZOTTI, M. ve LUPOTTO, E., 1990. Forage Crops I., Legumes. In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry 10 Legumes and Oilseed** Edited by Y.P.S. Bajaj, Springer Verlag, Berlin.
- 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. ve SAUNDERS, J.W., 1975. Breeding Alfalfa Which Regenerates From Callus Tissue in Culture. **Crop Science**, 15:719-720.
- BRONSEMA, F.B.F., VAN OOSTVEEN, W.J.F., VAN LAMMAREN, A.A.M., 1997. Comparative Analysis of Callus Formation and Regeneration on Cultured Immature Maize Embryos of The Inbred Lines A118 and A632. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 50: 47-65.
- BROWN, D.C.W ve ATANASSOV, A., 1985. Role of Genetic Background in Somatic Embryogenesis in *Medicago*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 4:111-122.
- BLAYDES, D.F., 1966. Interaction of Kinetin and Various Inhibitors in the Growth of Soybean Tissue. **Physiol Plant**, 19:748-753.
- CLOSE, K.R. VE LUDEMAN, L.A., 1987. The Effects of Auxin Like Plant Growth Regulators and Osmotic Regulation on Induction of Somatic Embryogenesis from Elite Maize Inbreds. **Plant Sci.**, 52: 81-89.
- ÇELİKTAŞ, N., 2001. Korunga (*Onobrychis sativa* L.) Islahında In Vitro Kültür Tekniklerinden Yararlanma Olanakları Üzerinde Bir Araştırma. Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- DAVEY, M.R., KUMAR, V. ve HAMMATT, N. 1994. In Vitro Culture of Legumes. In: **Plant Cell and Tissue Culture**, I.K. Vasil and T.A. Thorpe (eds.), pp; 313-329, Cluwer Academic Publishers, Boston/London.
- DENCHEV, P., VELCHEVA, M. ve ATANASSOV, A., 1991. New Approach to Direct Somatic Embryogenesis in *Medicago*. **Plant Cell Reports**, 10: 338-341.
- DENCHEV, P., KUKLIN, A. I., ATANASSOV, A.I ve SCRAGG, A. H., 1993. Kinetic Studies of Embryo Development And Nutrient Utilization in an Alfalfa Direct Somatic Embryogenic System. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 33: 67-73.
- EMEKLİER, Y., ÖZCAN, S., AVCI-BİRSİN, M., MİRİCİ, S. ve URANBEY, S., 1999. Mısırdaki *In Vitro* Somatik Embriyogenesis Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Araştırma Fonu Projesi, Ankara.
- GALLEGO, P., HITA, O., VILLABOS, N., DORADO, A., MARTIN, L., GUERRA, H., 2001. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in



- Medicago arborea* L. **In Vitro Cellular and Development Biology- Plant**. 37(2): 199-203.
- GAMBORG, O., MILLER, R. ve OJIMA, K., 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. **Exp. Cell Res.**, 50:151-158.
- GASPAR, T., KEVERS, C., PENEL, C., GREPPIN, H., REID, D.M. ve THORPE, T.A., 1996. Plant Hormones and Growth Regulators in Plant Tissue Culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, 32:272-289.
- GENÇKAN, S., 1983. Yembitkileri Tarımı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 467.
- GOLDS, T.J., LEE, J.Y., HUSNAIN, T., GHOSE, T.K. ve DAVEY, M.R., 1991. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Transformation of Forage Legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. **J. Exp. Bot.** 42: 1147-1157.
- GU, Z. 1987. Callus Culture of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis. **Annals of Botany** 60 (3): 309-313.
- HAMMAD, A.H.A., PICCIONI, E., STANDARDI, A., 1993. Effect of Explant Type and Media Composition on Callus Production and Somatic Embryogenesis on Two Alfalfa Varieties. **Agricoltura Medditerranea**, 123(2): 231-235.
- HARTWECK, L.M., LAZZERI, P.A, CUI, D., COLLINS, G.B., WILLIAMS, E.G, (1988). Auxin-Orientation Effects on Somatic Embryogenesis from Immature Soybean Cotyledons. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** , 24:821-828.
- HATİPOĞLU, R., 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitabı. Yayın No: A-58.
- HERNANDEZ-FERNANDEZ, M.M. ve CHRISTIE, B.R., 1989. Inheritance of Somatic Embryogenesis in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Genome**, 32:318-321.
- HILL, K.K. JARVIS-EAGAN, N., HALK, E.L. KRAHN, K.J., LIAO, L.W., MATHEWSON, R.S., MERLO, D.J., NELSON, S.E., RASHKA, K.E. ve LOESCH-FRIES, S. 1991. The Development of Virus Resistant Alfalfa, *Medicago sativa*. **Bio/technology** 9:373-377.
- HIROSHI, N. ve ZHUOMENG, Y., 1993. Tissue Culture of Sainfoin. Proceedings of The XVII International Grassland Congress, 1044-1045.
- KEPCZYNSKI, J., FLOREK, I., ELLIS, R.H., BLACK, M., MURDOCH, A.J., HONG, T.D., 1995. The Influence of JA-Me and ABA on Induction of Somatic Embryogenesis in *Medicago sativa* L. Tissue Cultures. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**. No:30 137-140. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht; Netherlands.
- KIELLY, G.A. ve BOWLEY, S.R., 1992. Genetic Control of Somatic Embryogenesis in Alfalfa. **Genome**, 35: 474-477.
- KIM, K.Y., SHIN, J.S., RIM, Y.W., CHOI, K.J., JANG, Y.S., KIM, W.H., LEE, B.H., JO, J., 1999. Callus Formation From Alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed and plant regeneration. **Journal of the Korean Society of Grassland Science**. 19(1): 23-30.
- KRAIC, J., UZIK, M., HAUPTVOGEL, P., 1994. Plant Regeneration from Callus 49 Cultures of Alfalfa. **Biologia Bratislava**. (1): 59-63

- LAI, F.M., MCKERSIE, B.D., (1994 a). Regulation of Starch And Protein Accumulation in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Somatic Embryos. **Plant Science**, 100: 211-219.
- LAI, F.M., MCKERSIE, B.D., (1994 b). Regulation of Storage Protein Synthesis By Nitrogen And Sulfur Nutrients In Alfalfa (*Medicagp sativa* L.) Somatic Embryos. **Plant Science**, 103: 209-221.
- LAKSHMANAN P., TAJI, A., 2000. Somatic Embryogenesis in Leguminous Plants. **Plant Biol (Stuttg)** 2: 136-148
- LI, X.Q. ve DEMARLY, Y., 1996. Somatic Embriyogenesis and Plant Regeneration in *Medicago suffruticosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 44(1): 79-81.
- LIU, S.L., LUO, S., WAN, T.Y., WU, Z.D., HAN, B.W., 1993. A Preliminary Study of Lucerne Tissue Culture, Specific Proteins and Differentiation of Adventitious Buds and Roots. **Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis**. 19(3):35-39.
- MAES, O.C., CHIBBAR, R.N., CASWELL, K., LEUNG, N., KARTHA, K.K., (1996). Somatic Embryogenesis from Isolated Scutella of Wheat: Effects of Physical, Physiological and Genetic Factors. **Plant Sci.**, 121: 75-84.
- MANDAL, A.K.A. and DUTTA GUPTA, S., 2003. Somatic Embryogenesis of Safflower: Influence of Auxin and Ontogeny of Somatic Embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 72(1): 27-31.
- MANTELL, S.H., MATTHEWS, J.A. ve MCKEE, R.A., (1985). Principles of Plant Biotechnology. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- MCELROY, A.R., ve BROWN; D.C., 1992. A Transplant Plug Technique For Production of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Plants From Somatic Embryos. **Can.J. Plant Sci.**, 72:483-485.
- MCKAY, T. ve 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.
- MCLEAN, N.L. and NOWAK, J., 1998. Inheritance of somatic embryogenesis in red clover (*Trifolium pratense* L.). **TAG Theoretical and Applied Genetics**: Volume 97, Number 4 , 1998 Pages: 557 – 562.
- MEIJER, E.G.M. ve 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
- MOHAMED, V.S., WANG, C.S., THIRUVENGADAM, M., JAYALABAN, N., 2004. In Vitro Plant Regeneration Via Somatic Embryogenesis Through Cell Suspension Cultures of Horsegram [*Macrotyloma Uniflorum* (Lam.) Verdc.]. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**. 40(3): 284-286.
- MROGONSKI, L.A. ve KARTHA, K.K. 1984. Tissue Culture of Legumes for Crop Improvement. **Plant Breeding Reviews**, 2: 215-261.
- MURASHIGE, T. ve SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiol Plant**, 15:473-497.

- NENZ, E., PUPILLI, F., DAMIANI, F., CENCI, C.A. ve ARCIONI, S., 1996. Plant Regeneration and Genetic Transformation of *Lotus angustissimus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 45: 145-152.
- NEVES, L.O., TOMAZ, L., FEVERERIO, M.P.S., 2001. Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. c.v. *Jemalong* and *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 67(1): 81-84.
- NODALSKA, O.A., 1992. Somatic Embryogenesis of Agriculturally Important Lupin Species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 28:19-25.
- NOLAN, K.E., ROSE, R.J. ve GORTS, J.R., 1989. Regeneration of *Medicago truncatula* from Tissue Culture: Increased Somatic Embryogenesis Using Explants from Regenerated Plants. **Plant Cell Reports**, 8: 278-281.
- ORCZYK, A.N., 1992. Somatic Embryogenesis of Agriculturally Important Lupin Species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 28: 19-25.
- OZAWA, K., KOMAMINE, A., (1989). Establishment of A System of High – Frequency Embryogenesis From Long-Term Suspensions Cultures of Rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.**, 77: 205-211.
- ÖZCAN, S., BARGHCHI, M., FIREK, S. ve DRAPER, J., 1993. Efficient Adventitious Shoot Regeneration and Somatic Embryogenesis in Pea. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 34:271-277.
- ÖZCAN, S., SEVIMAY, C.S., YILDIZ, M., SANCAK, C. ve ÖZGEN, M., 1996 (a), Prolific Shoot Regeneration From Immature Embryo Explants of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 16:200-203.
- ÖZGEN, M., ALTINOK, S., ÖZCAN, S. ve SEVIMAY, C.S., 1997. In Vitro Micropropagation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. **Tr. J. Of Botany**, 21:1-4.
- PARROT, W.A. ve BAILEY, M.A., 1993. Characterization of Recurrent Somatic Embryogenesis of Alfalfa on Auxin-Free Medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 32: 69-76.
- PARROT, W.A., MERKLE, S.A., WILLIAMS, E.G., 1993. Somatic Embryogenesis: Potential for Use in Propagation and Gene Transfer Systems. In: Murray, D.R. (ed), **Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology**, pp. 158-200, C.A.B International, UK.
- PEDERSON, G.A., 1986. In Vitro Culture and Somatic Embryogenesis of Four *Trifolium* Species. **Plant Science**, 45: 101-104.
- PICCIONI, E., ROSELLINI, D., FALCINELLI, M. Ve STANDARDI, A., 1996. Micropropagation of Mother Plants of Lucerne (*Medicago sativa* L.) for Somatic Embryogenesis. **Euphytica** 89(2): 193-200.
- PUPILLI, F. DAMIANI, F., PEZZOTTI, M. ve ARCIONI, S. 1989. Plant Regeneration from Callus Protoplasts of *Onobrychis viciifolia* Scop. (Sainfoin). **Plant Science (Limerick)** 63 (1): 87-94.
- PUPILLI, F., DAMIANI, F., NENZ, E. ve ARCIONI, S., 1992. In Vitro Propagation of *Medicago* and *Lotus* Species By Node Culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** 28P: 167-171.

- REISCH, B. ve BINGHAM, E.T, 1980. The Genetic Control of Bud Formation from Callus Cultures of Diploid Alfalfa. **Plant Sci. Lett.**, 22: 71-77.
- ROMAGNOLI, M.V., ORTIZ, J.P.A., CERVIGNI, G.D., HEISTERBORG, C. ve VALLEJOS, R.H., 1996. High Frequency Somatic Embryogenesis With A Pampennea- Derived Genotype of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Euphytica** 90(1): 89-93.
- ROY, P.K., BARAT, G.K. ve MEHTA, S.L., 1992. In Vitro Plant Regeneration from Callus Derived from Root Explants of *Lathyrus sativus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 29:135-138.
- RUDUS, I., KEPZYNSKA, E., KEPZYNSKI, J., 2002. Regulation of *Medicago sativa* L. Somatic Embryogenesis by Gibberellins. **Plant Growth Regulation**. 36(1): 91-95.
- 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. ve ARCIONI, S., 1993. Plant Regeneration From Callus And Protoplasts in *Medicago polymorpha*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 35: 49-57.
- SCHROEDER, H.E., KHAN, M.R.J., KNIBB, W.R., SPENCER, D. Ve HIGGINS, T.J.V. 1991. Expression of a Chicken Ovalalbumin Gene in Three Lucerne Cultivars. **Aust. J. Plant Physiol.** 18: 495-505.
- STYER, D.J. ve CHIN, C.K., 1983. Meristem and Shoot Tip Culture for Propagation, Pathogen Elimination and Germplasm Preservation. **Hort. Rev.** 5: 221-227.
- SUN, J.X., FU, J.R., HUANG, X.L., HUANG, S.Z., 1991. A Study of Somatic Embryogenesis and Plantlet Formation in Lucerne (*Medicago sativa* L.). I. Increasing Healthy Somatic Embryos and Plantlet Formation. **Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni.** 30(2): 106-112.
- THORPE, T. A., 1980. Organogenesis in vitro: Structural, Physiological And Biochemical Aspects. In: Vasil IK(ed), **Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture**, Int. Rev. Cytol. Suppl., 11A: 71-111.
- TIAN L., BROWN, D.C.W., WATSON E., 2002. Continuous Long-Term Somatic Embryogenesis In Alfalfa. **In Vitro Cellular And Development Biology-Plant.** 38 (3): 279-284.
- TÜKEL, T. ve HATİPOĞLU, R., 1997. Çayır-Mer'a Amenajmanı. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitapları Yayın No: A-59.
- TOSUN, F., 1996. Türkiye'de Kaba Yem Üretiminde Çayır-Mer'a ve Yembitkileri Yetiştiriciliğinin Dünü, Bugünü ve Yarını. Türkiye 3. Çayır-Mer'a ve Yembitkileri Kongresi, 17-19 Haziran, Erzurum.
- VASIL, I.K., 1987. Developing Cell Tissue Systems for the Improvement of Cereal and Crops. **J. Plant Physiol.** 128: 193-218.
- VASIL, I.K. ve THORPE, T.,A.,(1994). Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publisher, 37-70.
- WALKER, K.A. ve SATO, S.J., 1981. Morphogenesis in Callus Tissue of *Medicago sativa*: The Role of Ammonium Ion In Somatic Embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1:109-121.

- WAN, Y., SORENSEN, E.L. ve LIANG, G.H., 1988. Genetic Control of In Vitro Regeneration In Alfalfa (*Medicago sativa L.*). **Euphytica** 39: 3-9.
- WANDEL, C.I., KHAN, M.R.I., CRAIG, S., SHROEDER, H.E., SPENCER, D. ve HIGGINS, T.J.V., 1992. Vicilin With Carboxy-Terminal KDEL is Retained in The Endoplasmic Reticulum and Accumulates to High Levels In The Leaves of Transgenic Plants. **The Plant Journal** 2(2): 181-192.
- YU, K., PAULS, K.P., 1993. Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa. **Plant Mol Biol.** 1993 ; 22(2):269-77.
- ZAFAR, Y., NENZ, E., DAMIANI, F., PUPILLI, F. ve ARCIONI, S., 1995. Plant Regeneration From Explant And Protoplast Derived Calluses of *Medicago littoralis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 41: 41-48.
- ZAGORSKA, N., DIMITROV, B., GADEVA, P. ve ROBEVA, P., 1997. *Medicago* Regeneration and Characterization of Plants Obtained from Anther Cultures in *sativa L.* **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, 33: 107-110.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Hatay'ın Kırıkhan ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi aynı ilçede tamamladıktan sonra 1998 yılında M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne girmeye hak kazandım ve 2002 yılı yaz döneminde mezun oldum. Aynı yıl yüksek lisans eğitimime başladım ve halen eğitime devam etmekteyim